



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113301954 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202080009083.4

(72) 发明人 奥夫尔·曼德尔波姆

(22) 申请日 2020.01.13

平沙斯·楚克尔曼

(65) 同一申请的已公布的文献号

斯提潘·约尼奇

申请公布号 CN 113301954 A

蒂哈娜·莱纳克罗维斯

(43) 申请公布日 2021.08.24

保拉·库坎布里克

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理有限公司 11682

62/791,808 2019.01.13 US

专利代理人 金洁 郁春艳

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.CI.

2021.07.13

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 43/00 (2006.01)

PCT/IL2020/050047 2020.01.13

A61P 3/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02020/144697 EN 2020.07.16

WO 2017021526 A1, 2017.02.09

(73) 专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究

审查员 夏颖

发展有限公司

权利要求书2页 说明书30页
序列表13页 附图17页

(54) 发明名称

特异性针对人类连接蛋白-2的抗体

(57) 摘要

本发明提供了以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白-2(连接蛋白-2、脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白-2、脊髓灰质炎病毒受体样蛋白2、CD112或PRR-2,是一种具有两个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域的单次跨膜糖蛋白)并抑制它与TIGIT和/或CD112R的结合的单克隆抗体。所述抗体识别连接蛋白-2蛋白(CD112)、阻止它与具有Ig和TIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)和CD112R(PVRIG)的结合并抑制对淋巴细胞例如自然杀伤(NK)细胞和T-细胞的抑制活性。本发明还提供了用于癌症免疫疗法和诊断的药物和方法。本发明最后还提供了包含与连接蛋白-2结合的scFv抗体的嵌合抗原受体(CAR)。

1.一种与连接蛋白-2结合的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含选自下述的CDR组:

i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是RFTMS (SEQ ID NO:1);HC CDR2是TISSGGSYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2);HC CDR3是DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3);LC CDR1是KSSQSLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4);LC CDR2是FASTRES (SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6);和

ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SYWIH (SEQ ID NO:11);HC CDR2是AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12);HC CDR3是LVGTFDY (SEQ ID NO:13);LC CDR1是KASQNNGINVV (SEQ ID NO:14);LC CDR2是SASYRYS (SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16)。

2.根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其包含选自SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:17的重链可变区或与所述重链可变区序列具有至少95%序列相似性的类似物。

3.根据权利要求1所述的抗体或抗体片段,其包含选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:18的轻链可变区序列或与所述轻链可变区序列具有至少95%序列相似性的类似物。

4.根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段,其包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:7,并且所述轻链包含SEQ ID NO:8。

5.根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段,其包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:17,并且所述轻链包含SEQ ID NO:18。

6.根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体片段,其中所述抗体片段是单链Fv (scFv)。

7.根据权利要求6所述的抗体片段,其包含选自SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22的序列或其与所述序列具有至少85%序列相似性的变体。

8.根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体以 $10^{-9} M$ 至 $10^{-11} M$ 的亲和性与人类连接蛋白-2结合。

9.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段的重链和轻链可变区。

10.权利要求9所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含选自SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:19的序列或其与所述序列具有至少85%同一性的变体。

11.权利要求9所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸选自SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:20或其与所述序列具有至少85%同一性的变体。

12.一种质粒,其包含至少一种根据权利要求9所述的多核苷酸。

13.一种细胞,其包含根据权利要求9所述的多核苷酸。

14.一种细胞,其能够产生根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体。

15.根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段,其被附连到细胞毒性组成部分、放射活性组成部分或可识别组成部分。

16.一种药物组合物,其包含至少一种根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或其片段作为活性成分,以及可药用赋形剂、稀释剂、盐或载体。

17.根据权利要求16所述的药物组合物的用途,其用于制备治疗结肠癌、乳腺癌或肺癌的药物。

18. 根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段的用于制备诊断工具组合物的用途，所述诊断工具组合物用于诊断过表达连接蛋白-2的癌症，所述用途包括将生物样品与所述抗体或抗体片段相接触。

19. 一种用于在对象中诊断癌症的药剂盒，其包含至少一种根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段。

20. 一种嵌合抗原受体 (CAR) , 其包含至少一种根据权利要求1至3中的任一项所述的抗体或抗体片段，以及CD8茎结构域、CD28TM结构域、41BB结构域和CD3 ζ 结构域。

21. 一种淋巴细胞群，其被工程化改造以表达根据权利要求20所述的CAR。

22. 一种T-细胞群或NK-细胞群，其被工程化改造以表达根据权利要求20所述的CAR。

23. 根据权利要求22所述的T-细胞群，其中所述T-细胞表达选自SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24或其与所述序列中的任一者具有至少85 % 序列相似性的类似物的scFv序列，以及CD8茎结构域、CD28TM结构域、41BB结构域和CD3Z结构域。

24. 根据权利要求20所述的CAR的用途，其用于制备治疗结肠癌、乳腺癌或肺癌的药物。

25. 根据权利要求21的细胞群的用途，其用于制备治疗结肠癌、乳腺癌或肺癌的药物。

特异性针对人类连接蛋白-2的抗体

技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗领域，并涉及与人类蛋白连接蛋白-2(CD112)结合的抗体及其片段、编码这些抗体和片段的多核苷酸序列和产生它们的细胞。本发明还涉及包含这些抗体和片段的治疗和诊断组合物，以及使用它们治疗和诊断疾病、特别是癌症的方法。

背景技术

[0002] 通过例如用特异性针对肿瘤细胞上的抗原的抗体治疗、使用抗原呈递细胞与肿瘤细胞的融合体治疗或通过抗肿瘤T细胞的特异性激活，癌症免疫疗法被用于产生并增强抗肿瘤免疫应答。在患者中召集针对肿瘤细胞的免疫细胞(例如T细胞)的能力，提供了一种对抗到目前为止被认为是不可治愈的癌症类型和转移瘤的治疗模式。

[0003] T细胞介导的免疫应答包括多个连续步骤，它们受到控制免疫应答强度的共刺激和共抑制信号之间的平衡的调控。被称为免疫检查点的抑制信号对于维持自我耐受和限制免疫介导的附带组织损伤来说至关重要。当感染或免疫激发被清除、恶化或持续时，这些抑制信号改变，并且这些改变影响T细胞的应答并重塑免疫应答。

[0004] 免疫检查点蛋白的表达被肿瘤改变。例如，癌细胞表面上程序性死亡配体1(PD-L1)上调，允许它们与T细胞上表达的检查点分子PD-1结合。这导致原本可能攻击肿瘤细胞的T细胞的抑制，并允许所述肿瘤细胞避开宿主免疫系统。因此，免疫检查点代表了激活针对癌症的功能性细胞免疫的重要屏障。因此，特异性针对T细胞上的抑制性配体(例如PD-1)的拮抗性抗体是正被用于癌症治疗的针对免疫检查点的靶向药剂的实例(例如纳武单抗和派姆单抗)。免疫检查点分子的另一个实例是具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。TIGIT是在包括T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)在内的各种不同免疫细胞上表达的一种共抑制分子。TIGIT以高亲和性与脊髓灰质炎病毒受体(PVR)和连接蛋白-2结合。

[0005] 也被称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白-2、脊髓灰质炎病毒受体样蛋白2、CD112或PRR-2的连接蛋白-2(Nectin-2)，是一种具有两个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域的单次跨膜糖蛋白。连接蛋白-2参与介导细胞与细胞外基质分子的粘附，充当粘附连接的质膜组分之一。它还充当单纯疱疹病毒和伪狂犬病病毒的某些突变株的进入受体，并参与这些病毒的细胞间传播。该基因的变异已与多发性硬化症严重程度的差异相关联。重要的是，连接蛋白-2还可以充当T细胞信号传导的调节物。取决于它所结合的受体，它可以是T细胞功能的共刺激剂或共抑制剂。在与CD226(DNAM-1)结合后，它刺激T细胞增殖和细胞因子包括IL-2和IFN γ 的产生，而在与PVRIG(CD112R)和/或TIGIT相互作用后，它抑制T细胞增殖。这两种相互矛盾的相互作用是竞争性的。

[0006] 已显示连接蛋白-2在包括乳腺癌和卵巢癌在内的各种不同肿瘤中过表达(Oshima等，Molecular Cancer 2013)。连接蛋白-2在肿瘤细胞上的存在导致预后不良和T细胞活性降低(Stamm等，Oncogene 2018)。

[0007] 美国专利申请号2017/0037133公开了一种针对CD112(连接蛋白-2、PVRL2)、CD155(PVR)、半乳凝素-9、TIM-3和/或TIGIT的抑制剂，用于治疗血源性癌症、特别是急性髓系白

血病(AML)的方法中。所述抑制剂可以是抗体构建物。

[0008] 对于提供在单独或与其他药剂相组合时可以增强免疫系统的细胞以攻击肿瘤或病毒感染的细胞的另外的且更加有效、特异、安全和/或稳定的药剂,存在着尚未满足的需求。抑制连接蛋白-2与CD112R和TIGIT的结合的单克隆抗体可能就是这样的药剂。

发明内容

[0009] 本发明提供了识别连接蛋白-2蛋白(CD112)、阻止它与具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)和CD112R(PVRIG)的结合并抑制对淋巴细胞例如自然杀伤(NK)细胞和T-细胞的抑制活性的抗体及其片段。本文公开的抗连接蛋白-2抗体能够与癌细胞上存在的连接蛋白-2结合。这些抗体及其片段的特征在于具有独特的成组CDR序列,对人类连接蛋白-2具有高亲和性和高特异性,并且可以作为独立疗法和与其他抗癌药剂相组合用于癌症免疫疗法,以对抗肿瘤免疫逃避。所述抗体也可用于治疗病毒感染,并且可以用于癌症诊断。本发明还包含CAR-T细胞和将它们用于过继性疗法的方法。

[0010] 现在已公开,本文中描述的高亲和性抗连接蛋白-2抗体阻断TIGIT-和/或CD112R-连接蛋白-2相互作用并随后恢复T和NK细胞活性。本发明的抗体对人类连接蛋白-2高度特异。这些性质使得本发明的单克隆抗体成为用于癌症免疫疗法的有价值的候选物,能够以较低剂量给药并具有较少副作用。

[0011] 有利的是,发现根据本发明所述的抗连接蛋白-2mAb诱导T细胞增殖,其方式与抗PD-1和抗CTLA-4mAb所诱导的T细胞增殖相似。某些所述抗连接蛋白-2mAb与临幊上批准的治疗性抗PD-1和抗CTLA4 mAb的组合导致活性的显著提高,高于由任何单独的mAb所诱导的活性水平。令人吃惊的是,本文中描述的抗连接蛋白-2mAb与抗PD-1抗体的某些组合在肿瘤细胞灭杀方面表现出协同效应。对于人类外周血单核细胞(PBMC),并且主要是在T细胞中,显示出所述诱导作用。此外,抗连接蛋白-2mAb能够在靶癌细胞存在下诱导NK细胞活化。还已公开,某些抗连接蛋白-2抗体对DNAM-1的共刺激信号传导没有阻断作用,因此它们对免疫诱导信号没有有害效应。此外,已发现本文描述的抗体对人类或食蟹猴连接蛋白-2蛋白高度特异。

[0012] 本文公开的抗连接蛋白-2mAb可以具有可能进一步触发抗癌免疫应答的功能性重链(Fc)。

[0013] 本文中描述的某些连接蛋白-2mAb可能能够以不依赖于免疫的方式降低肿瘤细胞的生存力。

[0014] 根据一个方面,本发明提供了一种抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其与人类连接蛋白-2特异性结合并抑制它与受体TIGIT和CD112R中的至少一者的结合,所述抗体对人类连接蛋白-2具有至少 10^{-9} M的亲和性。

[0015] 本发明还描述了一种能够抑制人类连接蛋白-2与人类TIGIT或CD112R的结合的抗体或其抗体片段,其与T-淋巴细胞和/或自然杀伤(NK)细胞一起用于治疗癌症,所述抗体对人类连接蛋白-2具有至少 10^{-9} M的亲和性。

[0016] 根据某些实施方式,所述抗体与人类连接蛋白-2特异性结合并抑制它与TIGIT和CD112R的结合。

[0017] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含选自下述的6个CDR的组序列:

[0018] i. 包含SEQ ID NO:7的重链(HC)可变区的三个互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:8的轻链(LC)可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;和

[0019] ii. 包含SEQ ID NO:17的重链可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:18的轻链可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0020] 存在几种本领域中已知的用于确定给定抗体分子的CDR序列的方法,但不存在标准的明确方法。来自于抗体重链和轻链可变区的CDR序列的确定可以按照本领域中已知的任何方法,包括但不限于被称为KABAT、Chothia和IMGT的方法来做出。所选的CDR组可以包括通过一种以上的方法鉴定的序列,即例如某些CDR序列可以使用KABAT来确定,某些序列使用IMGT来确定。根据某些实施方式,所述mAb可变区的CDR序列使用IMGT方法来确定。

[0021] 根据某些实施方式,所述抗体或片段包含被称为克隆7的单克隆抗体的CDR序列,即包含在SEQ ID NO:7中示出的重链可变区中的三个CDR序列和包含在SEQ ID NO:8中示出的轻链可变区中的三个CDR序列,或包含被称为克隆11的单克隆抗体的CDR序列,即包含在SEQ ID NO:17中示出的重链可变区中的三个CDR序列和包含在SEQ ID NO:18中示出的轻链可变区中的三个CDR序列。

[0022] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列RFTMS (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列TISSGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:2) 的重链CDR2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3) 的重链CDR3。

[0023] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列RFTMS (SEQ ID NO:1) 的HC CDR1;(ii) 包含序列TISSGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:2) 的HC CDR2;和(iii) 包含序列DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3) 的HC CDR3。

[0024] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4) 的轻链CDR1。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列FASTRES (SEQ ID NO:5) 的轻链CDR2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR3。

[0025] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4) 的LC CDR1;(ii) 包含序列FASTRES (SEQ ID NO:5) 的LC CDR2;和(iii) 包含序列QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6) 的HC CDR3。

[0026] 根据某些特定实施方式,所述抗体或片段包含含有序列RFTMS (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1序列,含有序列TISSGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:2) 的重链CDR2,含有序列DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3) 的重链CDR3,含有序列KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4) 的轻链CDR1,含有序列FASTRES (SEQ ID NO:5) 的轻链CDR2,和含有序列QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR3,或其在高变区(HVR)序列中包含不超过5%的氨基酸替换、缺失和/或插入的类似物。

[0027] 根据某些特定实施方式,所述抗体或片段包含由下述构成的CDR6个CDR的组序列:

[0028] i. 具有SEQ ID NO:1中示出的序列的重链CDR1;

[0029] ii. 具有SEQ ID NO:2中示出的序列的重链CDR2;

[0030] iii. 具有SEQ ID NO:3中示出的序列的重链CDR3;

- [0031] iv. 具有SEQ ID NO:4中示出的序列的轻链CDR1；
[0032] v. 具有SEQ ID NO:5中示出的序列的轻链CDR2；和
[0033] vi. 具有SEQ ID NO:6中示出的序列的轻链CDR3。
- [0034] 根据某些实施方式,所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:7中示出的重链可变区或其与所述重链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。
- [0035] 根据某些实施方式,所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:8中示出的轻链可变区或其与所述轻链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物。
- [0036] 根据特定实施方式,所述抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:7中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8中示出的序列的轻链可变区,或其与所述轻链和/或重链序列具有至少90%序列同一性的类似物。
- [0037] 根据某些实施方式,所述抗体或片段包含被称为克隆11的单克隆抗体的CDR序列,即包含在SEQ ID NO:17中示出的重链可变区中的三个CDR序列和包含在SEQ ID NO:18中示出的轻链可变区中的三个CDR序列。
- [0038] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列SYWIH (SEQ ID NO:11) 的重链CDR1。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12) 的重链CDR2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列LVGTFDY (SEQ ID NO:13) 的重链CDR3。
- [0039] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列SYWIH (SEQ ID NO:11) 的HC CDR1; (ii) 包含序列AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12) 的HC CDR2; 和(iii) 包含序列LVGTFDY (SEQ ID NO:13) 的HC CDR3。
- [0040] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14) 的轻链CDR1。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列SASYRYS (SEQ ID NO:15) 的轻链CDR2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含含有序列QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16) 的轻链CDR3。
- [0041] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14) 的LC CDR1; (ii) 包含序列SASYRYS (SEQ ID NO:15) 的LC CDR2; 和(iii) 包含序列QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16) 的HC CDR3。
- [0042] 根据某些特定实施方式,抗体或片段包含含有序列SYWIH (SEQ ID NO:11) 的重链CDR1序列,含有序列AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12) 的重链CDR2,含有序列LVGTFDY (SEQ ID NO:13) 的重链CDR3,含有序列KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14) 的轻链CDR1,含有序列SASYRYS (SEQ ID NO:15) 的轻链CDR2,和含有序列QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16) 的轻链CDR3,或其在高变区(HVR)序列中包含不超过5%的氨基酸替换、缺失和/或插入的类似物。
- [0043] 根据某些特定实施方式,所述抗体或片段包含由下述CDR构成的6个CDR的组序列:
- [0044] i. 具有SEQ ID NO:11中示出的序列的重链CDR1；
[0045] ii. 具有SEQ ID NO:12中示出的序列的重链CDR2；
[0046] iii. 具有SEQ ID NO:13中示出的序列的重链CDR3；
[0047] iv. 具有SEQ ID NO:14中示出的序列的轻链CDR1；
[0048] v. 具有SEQ ID NO:15中示出的序列的轻链CDR2；和
[0049] vi. 具有SEQ ID NO:16中示出的序列的轻链CDR3。

[0050] 根据某些实施方式,所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:17中示出的重链可变区或其与所述重链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0051] 根据某些实施方式,所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:18中示出的轻链可变区或其与所述轻链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物。

[0052] 根据特定实施方式,所述抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:17中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:18中示出的序列的轻链可变区,或其与所述轻链和/或重链序列具有至少90%序列同一性的类似物。

[0053] 根据某些实施方式,所述抗体是分离的单克隆抗体。

[0054] 根据某些实施方式,所述抗体或其片段以至少 5×10^{-9} M的亲和性识别人类连接蛋白-2。根据其他实施方式,所述抗体或抗体片段以 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M或甚至更高的亲和性结合人类连接蛋白-2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段以 10^{-9} M至 10^{-11} M范围内的亲和性结合到人类连接蛋白-2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段以 10^{-9} M至 10^{-10} M范围内的亲和性结合到人类连接蛋白-2。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段以 10^{-10} M至 10^{-11} M范围内的亲和性结合到人类连接蛋白-2。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0055] 上述分离的抗体和片段的类似物和衍生物,也在本发明的范围之内。

[0056] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段类似物与所述参比抗体序列的高变区具有至少90%的序列同一性。

[0057] 根据某些实施方式,所述分离的抗体或其片段的类似物或衍生物与所述参比抗体序列的可变区具有至少91、92、93、94、95、96、97、98或99%的序列同一性。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0058] 根据某些实施方式,根据本发明所述的抗体或抗体片段包含在SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:17中示出的重链可变区或与所述序列具有至少95%序列相似性的类似物。

[0059] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含在SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:18中示出的轻链可变区或与所述序列具有至少95%序列相似性的类似物。

[0060] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含重链和轻链,其中:(i)所述重链包含SEQ ID NO:7并且所述轻链包含SEQ ID NO:8;或(ii)所述重链包含SEQ ID NO:17并且所述轻链包含SEQ ID NO:18。也包括所述抗体或片段的与所述重链或轻链具有至少95%序列相似性的类似物。

[0061] 根据某些实施方式,所述类似物与上述抗体轻链或重链可变区具有至少96、97、98或99%的序列相似性或同一性。根据某些实施方式,所述类似物包含对所述高变区的一个或多个CDR序列、即在SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、11、12、13、14、15和16中示出的CDR序列中的任一序列的不超过一个氨基酸替换、缺失或添加。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据某些实施方式,所述氨基酸替换是保守替换。

[0062] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含具有上文定义的轻链和重链区的高变区(HVR),其中1、2、3、4或5个氨基酸被替换、缺失和/或添加。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0063] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含具有上文定义的轻链和重链区的HVR,其中一个氨基酸被替换。根据特定实施方式,所述抗体或抗体片段包含如上所定义的

CDR,其中一个氨基酸被替换。

[0064] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含选自下述的CDR组:

[0065] i . 6个CDR的组,其中:HC CDR1是RFTMS (SEQ ID NO:1);HC CDR2是TISSGGSYTYYPDSVK (SEQ ID NO:2);HC CDR3是DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3);LC CDR1是KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4);LC CDR2是FASTRES (SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6);和

[0066] ii . 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SYWIH (SEQ ID NO:11);HC CDR2是AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12);HC CDR3是LVGTFDY (SEQ ID NO:13);LC CDR1是KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14);LC CDR2是SASYRYS (SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16)。

[0067] 本发明还提供了抗体及其结合片段,其包含重链和轻链,其中所述链包含一组重链可变区序列和轻链可变区序列,所述组选自:

[0068] i . SEQ ID NO:7和8;以及

[0069] ii . SEQ ID NO:17和18。

[0070] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段能够抑制人类连接蛋白-2与T细胞或NK细胞上表达的TIGIT或CD112R的结合。

[0071] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段能够抑制人类连接蛋白-2与T细胞或NK细胞上表达的TIGIT和CD112R的结合。

[0072] 根据特定实施方式,所述抗体选自嵌合抗体和至少包含抗体的抗原结合部分的抗体片段。根据特定实施方式,所述抗体是嵌合抗体。根据其他实施方式,所述嵌合抗体包含人类恒定区。根据特定实施方式,所述抗体片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的CDR区、单链可变区(scFV)、单链抗体(scab)、“双体抗体”和“线性抗体”。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0073] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含选自下述的恒定区:小鼠IgG1,小鼠IgG2a,小鼠IgG2b,小鼠IgG3,人类IgG1,人类IgG2,人类IgG3和人类IgG4。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0074] 根据某些特定实施方式,所述单克隆抗体是嵌合单克隆抗体。

[0075] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体包含源自于人类的恒定区。

[0076] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3和人类IgG4。

[0077] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1和人类IgG2。

[0078] 根据某些实施方式,提供了一种包含如上所述的抗体或其片段的偶联物。

[0079] 根据本发明所述的抗体或其片段可以被附连到细胞毒性组成部分、放射活性组成部分或可识别组成部分。

[0080] 根据本发明的另一方面,提供了编码对人类连接蛋白-2具有高亲和性和特异性的抗体的多核苷酸序列以及带有这些多核苷酸序列的载体和宿主细胞。

[0081] 根据某些实施方式,提供了编码上述重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0082] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码能够与人类连接蛋白-2蛋白内被下述

抗体结合的表位结合的抗体或抗体片段或链: (i) 具有SEQ ID NO:7的重链可变区和SEQ ID NO:8的轻链可变区的抗体(在本文中被鉴定为克隆7);或(ii)具有SEQ ID NO:17的重链可变区和SEQ ID NO:18的轻链可变区的抗体(在本文中被鉴定为克隆11)。

[0083] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码包含在选自下述的序列中示出的序列的抗体或抗体片段或链: (i) SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8;和(ii) SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0084] 根据另一些实施方式,根据本发明所述的多核苷酸序列编码抗体或抗体片段或链,其包含:

[0085] i . 6个CDR的组,其中:HC CDR1是RFTMS (SEQ ID NO:1);HC CDR2是TISSGGSYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2);HC CDR3是DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3);LC CDR1是KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4);LC CDR2是FASTRES (SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6);或

[0086] ii . 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SYWIH (SEQ ID NO:11);HC CDR2是AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12);HC CDR3是LVGTFDY (SEQ ID NO:13);LC CDR1是KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14);LC CDR2是SASYRYS (SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16)。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0087] 根据某些实施方式,上文定义的多核苷酸序列编码选自下述的分子:抗体,至少包含抗原结合部分的抗体片段,和包含所述抗体或抗体片段的抗体偶联物。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0088] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码单克隆抗体重链可变区,其包含SEQ ID NO:7中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0089] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码单克隆抗体重链可变区,其包含SEQ ID NO:17中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0090] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码单克隆抗体轻链可变区,其包含SEQ ID NO:8中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0091] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码单克隆抗体轻链可变区,其包含SEQ ID NO:18中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0092] 根据某些实施方式,本发明提供了一种多肽,其包含由上文公开的至少一个多核苷酸序列编码的至少一个序列。

[0093] 另一方面,本发明提供了一种核酸构建物,其包含编码根据本发明所述的至少一个抗体链或其片段的核酸分子。根据某些实施方式,所述核酸构建物是质粒。

[0094] 根据某些实施方式,所述质粒包含在选自下述的序列中示出的至少一个多核苷酸序列:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0095] 另一方面,本发明提供了一种细胞,其能够产生包含上文定义的特定CDR序列和/或特定重链和轻链可变区的抗体或抗体片段。

[0096] 根据某些实施方式,提供了一种细胞,其包含上文公开的至少一个多核苷酸序列。

[0097] 根据某些实施方式,所述产生单克隆抗体的细胞是杂交瘤细胞。

[0098] 根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含以高亲和性和特异性识别

人类连接蛋白-2的至少一种抗体、抗体片段或其偶联物作为活性成分,和任选的至少一种可药用赋形剂、稀释剂、盐或载体,其中所述至少一种抗体或抗体片段能够抑制人类连接蛋白-2与人类TIGIT和/或CD112R的结合。

[0099] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含能够与人类连接蛋白-2蛋白内被选自下述的单克隆抗体结合的表位结合的单克隆抗体或其片段:具有上文公开的可变区和CDR序列的克隆7和克隆11。

[0100] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含至少一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含下述CDR组:

[0101] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是(SEQ ID NO:1);HC CDR2是(SEQ ID NO:2);HC CDR3是(SEQ ID NO:3);LC CDR1是(SEQ ID NO:4);LC CDR2是(SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:6);或

[0102] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是(SEQ ID NO:11);HC CDR2是(SEQ ID NO:12);HC CDR3是(SEQ ID NO:13);LC CDR1是(SEQ ID NO:14);LC CDR2是(SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:16)。

[0103] 每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0104] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含一种抗体或其片段,其包含具有选自SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:17的序列的重链可变区。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0105] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含一种抗体或其片段,其包含具有选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:18的序列的轻链可变区。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0106] 根据特定实施方式,所述药物组合物包含一种抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:7中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8中示出的序列的轻链可变区。

[0107] 根据特定实施方式,所述药物组合物包含一种抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:17中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:18中示出的序列的轻链可变区。

[0108] 还提供了本发明的抗体的单链可变区(scFv)分子。所述scFv分子包含表达在一条多肽链中的抗体的抗原结合部位。根据某些实施方式,本发明了包含所述抗连接蛋白-2抗体的重链和轻链可变区的scFv分子。根据某些实施方式,所述scFv在所述两个可变区之间包含铰链区。

[0109] 根据某些实施方式,所述scFv序列阐述在SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24或其与所述序列具有至少85%序列相似性的类似物中。根据某些实施方式,所述scFv类似物与选自SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的序列具有至少90%的序列同一性。

[0110] 根据本发明的另一方面,提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含能够与连接蛋白-2结合的细胞外部分(结合结构域)。

[0111] 根据某些实施方式,所述CAR包含细胞外部分,其含有本文中描述的任何提供的抗体或其片段。

[0112] 根据某些实施方式,所述CAR包含连接蛋白-2结合位点,所述结合位点包含选自下述的6个CDR序列:

[0113] i. 包含SEQ ID NO:7的重链(HC)可变区的三个互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:8的轻链(LC)可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;和

[0114] ii. 包含SEQ ID NO:17的重链可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:18的轻链可变区的三个CDR, 或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0115] 根据某些实施方式, 所述CAR包含连接蛋白-2结合位点, 所述结合位点包含选自下述的CDR组:

[0116] i . 6个CDR的组, 其中: HC CDR1是RFTMS (SEQ ID NO:1) ; HC CDR2是TISSGGSYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2) ; HC CDR3是DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3) ; LC CDR1是KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4) ; LC CDR2是FASTRES (SEQ ID NO:5) ; 并且LC CDR3是QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6) ; 和

[0117] ii . 6个CDR的组, 其中: HC CDR1序列是SYWIH (SEQ ID NO:11) ; HC CDR2是AVYPGNSDSINYNQKFKA (SEQ ID NO:12) ; HC CDR3是LVGTFDY (SEQ ID NO:13) ; LC CDR1是KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14) ; LC CDR2是SASYRYS (SEQ ID NO:15) ; 并且LC CDR3是QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16) 。

[0118] 根据某些实施方式, 所述CAR包含含有SEQ ID NO:22或24的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域。

[0119] 根据某些实施方式, 提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的淋巴细胞。

[0120] 根据某些实施方式, 提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的T细胞, 并用CAR-T表示。根据某些实施方式, 提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的NK细胞, 并用CAR-NK表示。

[0121] 根据某些实施方式, 提供了被工程化改造以表达本文中描述的CAR的淋巴细胞的群体。根据特定实施方式, 提供了被工程化改造以表达本文中描述的CAR的T-细胞或NK-细胞的群体。

[0122] 根据某些实施方式, 所述CAR包含单链可变区 (scFv), 其包含本文中描述的抗体的重链和轻链可变区。

[0123] 根据本发明, 还提供了一种单链可变区 (scFv), 其包含本文中描述的抗体的重链和轻链可变区。根据某些实施方式, 在所述可变区之间存在铰链区。

[0124] 根据某些实施方式, 所述scFv序列阐述在SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24或其与任何所述序列具有至少85%序列相似性的类似物中。

[0125] 在某些实施方式中, 本发明还提供了编码CAR的多核苷酸, 所述CAR包含在SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:23中示出的序列。

[0126] 根据某些实施方式, 所述CAR包含选自scFv序列、CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3 ζ (CD3Z, Zetta) 结构域的至少一个蛋白质结构域。根据某些实施方式, 所述CAR包含scFv结构域。根据某些实施方式, 所述CAR包含CD8茎结构域。根据某些实施方式, 所述CAR包含CD28 TM结构域。根据某些实施方式, 所述CAR包含CD3Z结构域。根据某些实施方式, 所述CAR包含41BB结构域。根据特定实施方式, 所述CAR包含CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3Z结构域。

[0127] 根据某些实施方式, 所述CAR包含scFv序列, 其包含本文中公开的抗体的连接蛋白-2结合位点和选自下述的至少一个结构域: CD8茎结构域, CD28 TM结构域, 41BB结构域和CD3Z结构域。根据特定实施方式, 所述CAR包含scFv序列, 其包含本文中公开的抗体的连接

蛋白-2结合位点以及CD8茎结构域、D28 TM结构域、41BB结构域和CD3Z结构域。

[0128] 根据特定实施方式,提供了一种工程化T细胞,其表达选自下述的scFv序列:SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24或其与任何所述序列具有至少85%序列相似性的类似物;以及CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3Z结构域。

[0129] 根据某些实施方式,提供了T细胞的群体,其包含的T细胞表达选自下述的scFv序列:SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24或其与任何所述序列具有至少85%序列相似性的类似物;以及CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3Z结构域。

[0130] 根据一个方面,本发明提供了一种在对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的至少一种包含本文中所描述的CAR的淋巴细胞。

[0131] 还提供了药物组合物,其包含根据本发明所述的至少一种抗体、抗体片段或抗体偶联物,用于通过抑制连接蛋白-2与NK细胞上表达的TIGIT和/或CD112R的结合来恢复NK细胞毒性。

[0132] 根据其他实施方式,所述抗体、抗体片段或抗体偶联物能够抑制人类连接蛋白-2与T-细胞上表达的TIGIT和/或CD112R的结合。

[0133] 根据某些实施方式,根据本发明所述药物组合物被用于癌症免疫疗法或增强免疫应答。

[0134] 根据某些实施方式,所述药物组合物还包含表达TIGIT和/或CD112R的人类淋巴细胞。

[0135] 根据某些实施方式,所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和自然杀伤T(NKT)细胞的杀伤细胞。

[0136] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0137] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含表达TIGIT和/或CD112R的自体或同种异体NK细胞。

[0138] 可以使用根据本发明所述的组合物治疗的癌症可以是表达连接蛋白-2的任何癌症。根据某些实施方式,所述癌症过表达连接蛋白-2。根据本发明的某些实施方式,所述癌症是转移癌症。根据某些实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于在对象中抑制转移瘤的形成或分布或减少转移瘤的总数。

[0139] 根据本发明的某些实施方式,所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、肺癌、甲状腺癌、前列腺癌、脑癌、肾癌、喉癌、咽癌、膀胱癌、肝癌、纤维肉瘤、子宫内膜细胞癌、成胶质细胞瘤、肉瘤、髓系白血病和淋巴瘤。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0140] 根据某些实施方式,所述癌症是实体癌症。根据某些特定实施方式,所述实体癌症选自乳腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌和卵巢癌。

[0141] 根据某些实施方式,实体肿瘤通过CAR-T或CAR-NK来治疗。根据特定实施方式,实体肿瘤通过CAR-T来治疗。根据另外的实施方式,血液癌症使用CAR-NK或CAR-T细胞来治疗。根据特定实施方式,血液癌症使用CAR-NK细胞来治疗。

[0142] 根据某些实施方式,所述癌症是低分级神经胶质瘤。根据某些实施方式,所述癌症是肾透明细胞癌(KIRC)。根据某些实施方式,所述癌症是肺腺癌。

[0143] 根据某些实施方式,所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肺癌、前列

腺癌和脑癌。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0144] 根据其他实施方式,所述癌症是血液癌症。根据某些实施方式,所述药物组合物如果用于治疗癌症,则与人类淋巴细胞一起使用。

[0145] 根据某些实施方式,所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和NKT细胞的杀伤细胞。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0146] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0147] 根据某些实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于预防或治疗病毒感染。

[0148] 根据另一方面,本发明提供了一种使用上文定义的单克隆抗体或抗体片段来抑制人类连接蛋白-2与TIGIT或CD112R的结合的方法。

[0149] 根据另一方面,本发明提供了一种在需要的对象中增强免疫应答的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的本文中描述的抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0150] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要的对象给药治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白-2并且能够抑制它与它的配体的结合的至少一种抗体、抗体片段或偶联物。

[0151] 根据本发明的某些实施方式,所述治疗有效量导致所述对象中肿瘤尺寸或转移瘤数目的降低。

[0152] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药或进行至少一种另外的抗癌疗法。根据某些实施方式,所述另外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0153] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白-2的抗体和另外的抗癌药剂。根据某些实施方式,所述另外的抗癌药剂选自:免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂。

[0154] 根据其他实施方式,所述另外的免疫调节剂是结合到人类连接蛋白-2之外的抗原的抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0155] 根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对免疫检查点分子的抗体。根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对选自下述的免疫检查点分子的抗体:人类程序性细胞死亡蛋白1(PD-1),PD-L1和PD-L2,癌胚抗原相关细胞粘附分子1(CEACAM1),淋巴细胞活化基因3(LAG3),CD137,OX40(也被称为CD134),杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),TIGIT,PVR,CTLA-4,NKG2A,GITR和任何其他检查点分子或其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对PD-1的抗体。根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对CTLA-4的抗体。

[0156] 根据某些实施方式,所述抗癌药剂选自:爱必妥,阿糖胞苷,氟达拉滨,氟尿嘧啶,巯基嘌呤,甲氨蝶呤,硫鸟嘌呤,吉西他滨,长春新碱,长春碱,长春瑞滨,卡莫司汀,洛莫司丁,苯丁酸氮芥,环磷酰胺,顺铂,卡铂,异环磷酰胺,二氯甲基二乙胺,美法仑,噻替派,达卡巴嗪,博来霉素,放线菌素D,柔红霉素,多柔比星,伊达比星,丝裂霉素,米托蒽醌,普卡霉素,依托泊苷,替尼泊苷,及其任何组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0157] 根据某些实施方式,所述抗癌药剂是表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂。根据某些实施方式,所述EGFR抑制剂选自西妥昔单抗(爱必妥®)、帕尼单抗(Vectibix®)和耐昔妥珠单抗(Portrazza®)。根据某些实施方式,所述EGFR抑制剂是西妥昔单抗

(爱必妥®)。

[0158] 根据本发明的某些实施方式,所述对象是人类对象。

[0159] 根据本发明的某些实施方式,所述用法进一步包括使用下调免疫共抑制受体的活性或表达的药剂。

[0160] 根据本发明的某些实施方式,所述免疫细胞是T细胞。

[0161] 根据本发明的某些实施方式,所述免疫共抑制受体选自PD-1、TIGIT、PVR、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4、CD96、BY55、LAIR1、SIGLEC10和2B4。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0162] 根据一个方面,本发明提供了一种调节免疫系统功能和/或活性的方法,所述方法包括使用根据本发明所述的抗体调节连接蛋白-2与TIGIT和/或CD112R的结合。

[0163] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括在对象中阻止或减少转移瘤的形成、生长或扩散。

[0164] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括向需要的对象给药包含能够抑制人类连接蛋白-2与人类TIGIT或CD112R结合的抗体或其抗体片段的药物组合物,并向所述对象进一步给药人类淋巴细胞。

[0165] 根据某些实施方式,所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和NKT细胞的杀伤细胞。

[0166] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0167] 本发明还提供了一种预防或治疗病毒感染的方法,所述方法包括向对象给药至少一种特异性针对人类连接蛋白-2的抗体或其至少包含抗原结合结构域的片段,其中所述mAb或其片段能够抑制连接蛋白-2与TIGIT或CD112R的结合。

[0168] 根据一个方面,本发明提供了一种在对象中诊断或预后癌症的方法,所述方法包括使用本文中所描述的至少一种抗体来确定所述对象的生物样品中连接蛋白-2的表达水平。

[0169] 根据另一方面,本发明还包括一种确定或定量样品中的连接蛋白-2的方法,所述方法包括将生物样品与抗体或抗体片段相接触并测量复合体形成的水平,其中所述抗体或抗体片段包含:

[0170] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是(SEQ ID NO:1);HC CDR2是(SEQ ID NO:2);HC CDR3是(SEQ ID NO:3);LC CDR1是(SEQ ID NO:4);LC CDR2是(SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:6);或

[0171] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是(SEQ ID NO:11);HC CDR2是(SEQ ID NO:12);HC CDR3是(SEQ ID NO:13);LC CDR1是(SEQ ID NO:14);LC CDR2是(SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:16)。

[0172] 根据某些实施方式,确定和定量方法可以体外或离体进行,或者可用于诊断与连接蛋白-2的表达相关的病症。根据本发明所述的抗体也可用于设置筛选方法。例如,可以构建酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA)以及诸如IHC或FACS的方法,使用所述抗体和本领域中已知的方法测量分泌的或细胞结合的多肽的水平。

[0173] 根据某些实施方式,所述用于检测或定量细胞上表达的或分泌到生物培养基中的连接蛋白-2的存在方法包括下述步骤:

[0174] i. 将样品与特异性针对人类连接蛋白-2的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段温育；

[0175] ii. 使用可检测探针检测结合的连接蛋白-2。

[0176] 根据某些实施方式，所述方法还包括下述步骤：

[0177] iii. 将(ii)的量与从含有已知量的连接蛋白-2的参比样品获得的标准曲线进行比较；和

[0178] iv. 从所述标准曲线计算所述样品中连接蛋白-2的量。

[0179] 根据某些特定实施方式，所述样品是体液。

[0180] 根据某些实施方式，所述方法在体外或离体进行。

[0181] 还提供了一种用于测量生物样品中连接蛋白-2的表达或存在的试剂盒，所述试剂盒包含根据本发明所述的至少一种抗体或抗体片段。根据某些实施方式，所述试剂盒包含的抗体或抗体片段包含：

[0182] i. 6个CDR的组，其中：HC CDR1是(SEQ ID NO:1)；HC CDR2是(SEQ ID NO:2)；HC CDR3是(SEQ ID NO:3)；LC CDR1是(SEQ ID NO:4)；LC CDR2是(SEQ ID NO:5)；并且LC CDR3是(SEQ ID NO:6)；或

[0183] ii. 6个CDR的组，其中：HC CDR1序列是(SEQ ID NO:11)；HC CDR2是(SEQ ID NO:12)；HC CDR3是(SEQ ID NO:13)；LC CDR1是(SEQ ID NO:14)；LC CDR2是(SEQ ID NO:15)；并且LC CDR3是(SEQ ID NO:16)。

[0184] 根据一个方面，本发明提供了一种用于检测癌症的药剂盒，所述诊断药剂盒包含本文中所公开的抗体或其抗体片段。

[0185] 根据某些实施方式，本发明提供了一种诊断、早期检测免疫相关疾病或增殖性疾病、评估其严重性或对其分期的方法，所述方法包括使用根据本发明所述的抗体或其片段或偶联物确定来自于对象的样品中连接蛋白-2的表达、浓度或活性，并将所述连接蛋白-2的表达或活性与连接蛋白-2表达、浓度或活性的参比量进行比较。所述参比量可以从获自正常对象、处于所述疾病的不同阶段的同一对象的样品获得，或者从大群对象的临床数据确定。

[0186] 从后文中给出的详细描述，本发明的其他实施方式和完整适用性范围将变得显而易见。然而，应该理解，所述详细描述和具体实例尽管指明了本发明的优选实施方式，但仅仅作为说明提供，因为对于本领域技术人员来说，从该详细描述，本发明的精神和范围之内的各种不同改变和修改将变得显而易见。

附图说明

[0187] 图1A-1C描绘了低分级神经胶质瘤(A)、肾透明细胞癌(B)和肺腺癌(C)患者的连接蛋白-2表达水平(如所示高或低)与生存概率的相关性。数据集从TCGA网站获得，并使用oncolnc.org网站进行分析(<https://doi.org/10.7717/peerj.cs.67>)。

[0188] 图2是在免疫细胞上表达的受体的示意图及其对肿瘤表达的或抗原呈递细胞(APC)上的连接蛋白-2的相应亲和性。TIGIT是许多免疫细胞(例如T和NK细胞)上的共抑制受体；DNAM-1(也被称为CD226)是许多免疫细胞(例如T细胞)上的活化受体，CD112R(也被称为PVRIG)是淋巴系免疫细胞(例如T和NK细胞)上的共抑制受体；连接蛋白-2(CD112)是免疫

细胞的抑制配体,基于所描绘的亲和性,主要通过它与CD112R的结合起作用。

[0189] 图3A-3D.产生的抗连接蛋白-2mAb的结合和阻断特征的分析。图3A示出了抗连接蛋白-2抗体克隆与内源表达连接蛋白-2的MDA-231细胞或过表达连接蛋白-2的8866-人类连接蛋白-2细胞的结合。图3B示出了结合到8866-人类连接蛋白2细胞的CD112R-Fc的FACS分析的结果。在所产生的抗体中,三个克隆 (#9、11和13) 部分阻断这些相互作用,而一个克隆 (#7) 完全阻断它们。图3C示出了结合到8866-人类连接蛋白2细胞的DNAM-1-Fc的FACS分析的结果。除了克隆15之外,其他克隆 (#7-13) 均不阻断活化受体DNAM-1与连接蛋白-2的结合。图3D示出了在抗连接蛋白-2抗体克隆7和11存在下,结合到CHOK1-人类连接蛋白2细胞的TIGIT-Fc的FACS分析的结果。两个克隆均阻断>66 %的TIGIT-Fc结合。

[0190] 图4A-4C描绘了连接蛋白-2被抗连接蛋白-2mAb(在X轴上指示)的阻断增强NK细胞活化。NK活化通过CD107a的表面表达的诱导来测量,并且被表示成与对照IgG相比的变化倍数(Y轴)。示出了人类癌细胞系A549(肺腺癌)(图4A)和MDA-MB-231(乳腺腺癌)(图4B)的结果。对于克隆#3、7和11观察到最显著的效果。*=p<0.04, **p<0.02, ***p<0.002, 通过双尾student t-检验。示出了5位供体中的1位的代表性数据。克隆7和11的人类IgG1嵌合变体进一步增加脱粒(图4C),导致与同型对照相比>200%的脱粒。***p<0.002。示出了2位供体中的1位的代表性数据。

[0191] 图5A-5B证实了mAb克隆7和11与人类和猴连接蛋白-2的结合是相似的。图5A描绘了两种mAb的叠放结合曲线,所述mAb在连续三倍稀释液中以13.3nM-0.02nM范围内的浓度添加到表达人类或食蟹猴(Cyno)连接蛋白-2(蛋白质ID:XP_005589607.1)的CHO细胞。这种测定的FACS分析的结果被表示成与被设定到100%的最大结合相比的相对结合强度。将以1:250稀释的山羊抗小鼠647Ab用于检测。还呈现了这个测定的数据分析的概述,其进一步证实两种mAb以高的且相近的亲和性与人类和食蟹猴(Cyno)连接蛋白-2(蛋白质id:XP_005589607.1)结合。还使用绿猴属(Chlorocebus)(非洲绿猴)连接蛋白-2(由Vero细胞表达的XP_007995342.1)研究了抗连接蛋白-2mAb的结合。图5B示出了通过如为图5A所述的FACS分析测试的抗连接蛋白-2mAb与内源人类连接蛋白-2(由293T细胞表达)和内源非洲绿猴连接蛋白-2(由Vero细胞表达)的结合(Ab范围:20-0.0003nM)。这个分析揭示出对于两种抗连接蛋白-2抗体克隆来说,抗体与人类和猴连接蛋白-2靶两者的结合相似,具有高亲和性,这在概述表中也是明显的。

[0192] 图6A-6B示出了抗人类连接蛋白-2抗体对T细胞增殖的影响。将人类PBMC用CFSE标记,并在PHA-L和所指示的抗体存在下与靶细胞MDA-MB-231(6A)或A549(6B)温育。结果被呈现为相对于对照的增殖提高倍数。示出了代表所测试的7位PBMC供体的1位供体的结果。

[0193] 图7A-7B示出了单独的或与已知的检查点阻断剂相组合的抗人类连接蛋白-2抗体对CD8+T细胞增殖的影响。将人类PBMC用CFSE标记,并在PHA-L和所指示的抗体存在下与靶细胞RKO(图7A)或A549(图7B)温育。结果被呈现为相对于对照的增殖提高倍数。测试的所有组合均导致与单独的处理相比CD8+T细胞增殖的显著提高。示出了所测试的2位PBMC供体中的1位供体的结果。

[0194] 图8A-8B示出了抗人类连接蛋白-2抗体对IFN γ 的影响。如图7所述将人类PBMC与靶细胞温育。96小时后将板离心并收集上清液。IFN γ 定量使用Biologen的人类IFN- γ ELISA MAXTM Deluxe,按照制造商的方案来进行。示出了所测试的5位PBMC供体中的1位供体

的结果。

[0195] 图9A-9B示出了单独的或与已知检查点阻断剂相组合的抗人类连接蛋白-2抗体对hPBMC对肿瘤细胞的灭杀的影响。测定如图7所述来进行。在96-120小时后将免疫细胞移除，将肿瘤细胞充分清洗，并使用CellTiter-Glo®按照制造商的方案确定附着型肿瘤细胞的存活率。所有结果均在试剂盒的线性范围内。结果被呈现为相对于对照的肿瘤细胞杀伤的提高倍数。测试的所有组合均导致与单独的处理相比肿瘤细胞杀伤的显著提高。示出了所测试的2位PBMC供体中的1位供体的结果。

[0196] 图10示出了连接蛋白-2mAb对体内肿瘤发展的影响。将Scid雌性小鼠(n=33)用基质胶中的 5×10^6 个MDA-MB-231细胞SC注射。在肿瘤达到 $80-120\text{mm}^3$ 后，将小鼠随机分成三组，并以不知情的方式通过均以3mg/kg的剂量i.v.注射PBS(浅灰色菱形)、hIgG1对照Ab(灰色正方形)或克隆-7-人类IgG1(2.7.1)(黑色圆圈)，每周两次进行治疗。 $*p < 0.04$, $**p < 0.02$, $***p < 0.008$ 。

[0197] 图11A-11B示出单独的或与PD-1组合的带有hIgG2 Fc的连接蛋白-2mAb对肿瘤细胞杀伤和PBMC增殖的影响。不使用Ab或使用克隆-11-人类IgG2(2.11.2)、Keytruda™(两者均为 $3.5\mu\text{g}/\text{ml}$)或它们的组合(每种 $3.5\mu\text{g}/\text{ml}$)，在 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-L存在下将A549细胞与PBMC以7:1的E:T比共温育96h。示出了肿瘤细胞杀伤(图11A)和PBMC(T细胞)增殖(图11B)。 $*p < 0.01$, $**p < 0.002$, $***p < 0.0008$ 。

[0198] 图12A-12E示出了在表达连接蛋白-2的肿瘤细胞存在下，表达源自于克隆7和克隆11抗体的scFv的CAR-T(分别为CAR-T 2.07和CAR-T 2.11)对特异性T细胞活化的影响。将来自于健康供体的PBMC用CAR-T构建物转导。这些构建物的总体示意图示出在图12A中，其中scFv表示本文中描述的连接蛋白-2mAb的单链。将连接蛋白-2CAR-T PBMC与U937或BT-474靶细胞以不同的E:T比温育。示出了靶细胞的杀伤(图12B和12D)以及活化的PBMC的IFN γ 分泌(图12C和12E, $p < 0.03$)。图12B-E描绘了对每种细胞系进行的三个实验中的代表性实验(CAR-T 2.07灰色条,CAR-T 2.11黑色条)。

具体实施方式

[0199] 本发明提供了特异性针对人类连接蛋白-2的有效抗体。本发明还提供了所述抗体的生产和作为治疗剂的用途。具体来说，本发明的mAb可用于增强抗肿瘤杀伤活性，并且可以用作诊断试剂。在某些实施方式中，本发明提供了特异性针对连接蛋白-2的抗体，用于高效恢复针对过表达连接蛋白-2的癌细胞的免疫活性。在其他实施方式中，本文中描述的抗体用于治疗病毒感染。所述抗体通过阻断连接蛋白-2来阻止疱疹病毒进入细胞。

[0200] 当在本文中使用时，术语“抗原”是指能够引发抗体形成并被抗体特异性结合的分子或分子的一部分。抗原可能具有一个或一个以上的表位。上文提到的特异性结合意指所述抗原以高度选择性的方式与其相应抗体反应，并且不与可能由其他抗原唤起的大量其他抗体反应。根据本发明的某些实施方式，抗原是连接蛋白-2蛋白。

[0201] 当在本文中使用时，术语“连接蛋白-2”或“连接蛋白细胞粘附分子2”是指一种人类质膜糖蛋白，也被称为CD112和PVRL2。所述连接蛋白-2蛋白是单程I型膜糖蛋白，具有两个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域。该蛋白是粘附连接的质膜组分之一。它还充当单纯疱疹病毒和伪狂犬病病毒的某些突变株的进入受体，并参与这些病毒的细胞间传播。根

据本发明的示例性连接蛋白-2在下述SwissPort、UniPort和GenBank代号或登记号中示出: Gene ID:5819,Q92692,I68093,NP_001036189.1,NP_002847.1和#Q92692。

[0202] 根据本发明所述的抗体或其片段结合到连接蛋白-2中的表位。具体来说,所述抗体结合到连接蛋白-2蛋白的胞外域(细胞外部分)内的表位。

[0203] 当在本文中使用时,术语“抗原决定簇”或“表位”是指抗原分子的与特定抗体特异性反应的区域。应用本领域中已知的方法,源自于表位的肽序列可以单独地或与载体组成部分联合,用于免疫动物并产生另外的多克隆或单克隆抗体。源自于表位的分离的肽可用于诊断方法中以检测抗体。

[0204] 应该指出,亲和性可以使用已知方法例如表面等离子体共振(SPR)(描述在 Scarano S,Mascini M,Turner AP,Minunni M.,用于基于亲和性的生物传感器的表面等离子体共振成像(Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors),Biosens Bioelectron.2010,25:957-66中)来定量,并且可以使用例如解离常数Kd来计算,使得较低的Kd反映出较高的亲和性。

[0205] 抗体或免疫球蛋白包含通过二硫键连接在一起的两条重链和两条轻链,每条轻链通过二硫键以“Y”形构型连接到相应的重链。抗体的蛋白水解消化得到Fv(可变片段)和Fc(结晶片段)结构域。抗原结合结构域Fab包括其中多肽序列变化的区域。术语F(ab')₂表示通过二硫键连接在一起的两个Fab'臂。抗体的中心轴被称为Fc片段。每条重链在一个末端处具有可变结构域(V_H),后面跟有多个恒定结构域(C_H)。每条轻链在一个末端处具有可变结构域(V_L)并在其另一个末端处具有恒定结构域(C_L),所述轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐,并且所述轻链恒定结构域与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。每对轻链和重链的可变结构域形成抗原结合部位。轻链和重链上的结构域具有相同的总体结构,并且每个结构域包含4个序列相对保守的构架区,其通过3个被称为互补决定区(CDR 1-3)的高变结构域相连。这些结构域对所述抗原结合部位的特异性和亲和性有贡献。

[0206] 来自于给定重链或轻链可变序列的CDR的鉴定或确定,通常使用本领域中已知的几种方法之一来进行。例如,这种确定按照Kabat(Wu T.T和Kabat E.A.,J Exp Med,1970;132:211-50)和IMGT(Lefranc M-P等,Dev Comp Immunol,2003,27:55-77)来进行。

[0207] 当使用术语“具有某个序列的CDR”或类似术语时,它包括其中所述CDR包含所述指定的序列的选项以及其中所述CDR由所述指定的序列构成的选项。

[0208] 抗体的抗原特异性是基于高变区(HVR),即轻链和重链两者的一起形成抗原结合部位的独特CDR序列。

[0209] 重链的同种型(γ 、 α 、 δ 、 ϵ 或 μ)决定免疫球蛋白类别(分别为IgG、IgA、IgD、IgE或IgM)。轻链具有两种同种型(κ 或 λ)。两种同种型存在于所有抗体类别中。

[0210] 术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且包括单克隆抗体(包括全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体和长度足以显示出所需生物活性即与人类连接蛋白-2的结合的抗体片段。

[0211] 根据本发明所述的一种或多种抗体包括完整抗体例如多克隆抗体或单克隆抗体(mAb)及其蛋白水解片段例如Fab或F(ab')₂片段。单链抗体也在本发明的范围之内。

[0212] 抗体片段

[0213] “抗体片段”只包含完整抗体的一部分,通常包括所述完整抗体的抗原结合部位,

并因此保留结合抗原的能力。本定义涵盖的抗体片段的实例包括 (i) Fab片段, 其具有VL、CL、VH和CH1结构域; (ii) Fab'片段, 其是在CH1结构域的C-端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段; (iii) 具有VH和CH1结构域的Fd片段; (iv) 具有VH和CH1结构域并且在CH1结构域的C-端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fd'片段; (v) 具有抗体的单一臂的VL和VH结构域的Fv片段; (vi) 由VH结构域构成的dAb片段 (Ward等, Nature 1989, 341, 544-546); (vii) 分离的CDR区; (viii) F(ab')₂片段, 其是包括在铰链区通过二硫桥相连的两个Fab'片段的二价片段; (ix) 单链抗体分子 (例如单链Fv; scFv) (Bird等, Science 1988, 242, 423-426; 和 Huston等, Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 1988, 85, 5879-5883); (x) 具有两个抗原结合部位的“双体抗体”, 其包含在同一多肽链中与轻链可变结构域(VL)相连的重链可变结构域(VH) (参见例如EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, 90, 6444-6448); (xi) “线性抗体”, 其包含一对串联的Fd区段 (VH-CH1-VH-CH1), 所述区段与互补的轻链多肽一起, 形成一对抗原结合区 (Zapata等, Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; 和美国专利号5,641,870)。

[0214] 已开发了用于生产抗体片段的各种不同技术。传统上, 这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化产生 (参见例如Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992) 和Brennan等, Science, 229:81(1985))。然而, 这些片段现在可以由重组宿主细胞直接产生。例如, 所述抗体片段可以从抗体噬菌体文库分离。或者, Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌回收并化学偶联, 以形成F(ab')₂片段 (Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab')₂片段可以从重组宿主细胞培养物直接分离。用于生产抗体片段的其他技术对于专业技术人员来说将是显而易见的。在其他实施方式中, 所述选择的抗体是单链Fv片段 (scFv)。

[0215] 单链抗体可以是具有抗原结合能力并包含与免疫球蛋白轻链和重链的可变区同源或类似的氨基酸序列的单链复合多肽, 即连接的V_H-V_L或单链Fv (scFv)。用于生产单链抗体的技术 (美国专利号4,946,778) 可以改编以适用于生产针对连接蛋白-2的单链抗体。

[0216] 当在本文中使用时, 术语“单克隆抗体” (mAb) 是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体, 即构成所述群体的各个抗体除了可能少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一抗原。此外, 与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制备物相反, 每个单克隆抗体针对所述抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应被解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。mAb可以通过本领域技术人员已知的方法获得。例如, 按照本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等, Nature 1975, 256, 495描述的杂交瘤方法来制造, 或者可以通过重组DNA方法来制造 (参见例如美国专利号4,816,567)。单克隆抗体也可以使用例如在Clackson等, Nature 1991, 352, 624-628或Marks等, J.Mol.Biol., 1991, 222:581-597中描述的技术, 从噬菌体抗体文库来分离。

[0217] 通过功能性可变重链 (VH) 和可变轻链 (VL) 基因的快速鉴定和克隆来设计和开发源自于单克隆抗体的重组单价抗原结合分子以及被优化以用于在重组细菌中表达的合成DNA序列的设计和克隆, 被描述在Fields等, 2013, 8(6):1125-48中。

[0218] 本发明的mAb可以是包括IgG、IgM、IgE、IgA和IgD的任何免疫球蛋白类别。生产mAb的杂交瘤可以在体外或体内培养。mAb的高滴度可以通过体内生产来获得, 其中将来自于个

体杂交瘤的细胞腹膜内注射到原始初免的Balb/c小鼠中,以产生含有高浓度所需mAb的腹水。mAb可以使用本领域技术人员公知的方法从这些腹水或从培养上清液纯化。

[0219] 也考虑到了与本发明的抗体的高变区具有特异性免疫反应性的抗独特型抗体。

[0220] 本发明提供了一种包含抗原结合结构域(ABD)的单克隆抗体或抗体片段,所述抗原结合结构域包含轻链的三个CDR和重链的三个CDR,其中所述ABD与包含下述链的单克隆小鼠抗体的ABD具有至少90%的序列同一性或相似性:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的可变重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的可变轻链(在本文中被鉴定为克隆7);或(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的可变重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的可变轻链(在本文中被鉴定为克隆11)。这些抗体可以具有与抗体克隆7或克隆11的相应ABD具有至少93%、至少94%、至少95%、至少96、至少97、至少98、至少99%序列同一性或相似性或100%序列同一性的ABD结构域。

[0221] 序列同一性是两个不同序列之间精确匹配的氨基酸或核苷酸的量。序列相似性允许将氨基酸的保守替换确定为是相同的氨基酸。本文中描述的多核苷酸序列可以被密码子优化,用于在特定细胞例如人类细胞中表达。密码子优化不改变所述抗体链的编码氨基酸序列,但可以例如提高在细胞中的表达。

[0222] 本发明还提供了根据本发明所述的抗体分子的保守氨基酸变体。根据本发明所述的变体也可以被制造成保留所述被编码的蛋白质的总体分子结构。给定构成所公开的蛋白产物的各个氨基酸的性质,专业技术人员将会认识到一些合理的替换。氨基酸替换即“保守替换”,可以例如在所涉及的残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性方面的相似性的基础上做出。当在本文中使用时,术语“抗体类似物”是指从另一个抗体通过一个或多个保守氨基酸替换衍生的抗体。

[0223] 当在本文中使用时,术语“抗体变体”是指包含本发明的抗体的任何分子。例如,其中所述抗体或其抗原结合片段被连接到另一个化学组成部分的融合蛋白被认为是抗体变体。

[0224] 所述抗体序列的类似物和变体也在本发明的范围之内。它们包括但不限于所述序列内氨基酸的保守和非保守替换、插入和缺失。这些修饰和得到的抗体类似物或变体在本发明的范围之内,只要它们提供或甚至提高所述抗体与人类连接蛋白-2的结合即可。

[0225] 本领域技术人员已知的氨基酸的保守替换在本发明的范围之内。保守氨基酸替换包括将一个氨基酸用具有相同类型的官能团或侧链例如脂族、芳香族、带正电荷、带负电荷的官能团或侧链的另一个氨基酸代替。这些替换可能增强口服生物可利用性、穿透性和向特定细胞群体的靶向、免疫原性等。专业技术人员将会认识到,对肽、多肽或蛋白质序列做出的改变、添加或缺失所述被编码序列中的单个氨基酸或小比例氨基酸的各个替换、缺失或添加,在所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸替换的情况下,是“保守修饰的变体”。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表在本领域中是公知的。例如,根据本领域中已知的一个表,下面的6个组各自含有彼此为保守替换的氨基酸:

[0226] 1)丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T);

[0227] 2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0228] 3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0229] 4)精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0230] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);和

[0231] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W)。

[0232] 应该强调的是,所述变体链序列使用特异性引物通过测序方法来确定。对同一序列使用不同的测序方法,由于技术问题和不同的引物,可能产生略微不同的序列,特别是在序列末端中。

[0233] 当在本文中使用时,术语“具有抗体的抗原结合部分的分子”和“抗原结合片段”打算不仅包括任何同种型和通过任何动物细胞系或微生物产生的完整的免疫球蛋白分子,而且包括其抗原结合反应性部分,包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、其重链和/或轻链的可变部分、Fab微型抗体(参见例如WO 93/15210、美国专利申请08/256,790、WO 96/13583、美国专利申请08/817,788、WO 96/37621、美国专利申请08/999,554)和并入这种反应性部分的单链抗体,以及其中已物理插入有这些抗体反应性部分的任何其他类型的分子。这些分子可以通过任何已知的技术包括但不限于酶切割、肽合成或重组技术来提供。

[0234] 本文中的抗体特别包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源,而所述链的其余部分与源自于另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源,以及这些“嵌合”抗体的片段,只要它们表现出所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。此外,可以进行互补决定区(CDR)接枝,以改变抗体分子的某些性质,包括亲和性或特异性。CDR接枝的非限制性实例公开在美国专利5,225,539中。

[0235] 嵌合抗体是其不同部分源自于不同动物物种的分子,例如那些具有源自于鼠类mAb的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的分子。具有基本上来自于人类抗体(被称为受体抗体)的可变区构架残基和基本上来自于小鼠抗体(被称为供体抗体)的CDR的抗体,也被称为人源化抗体。嵌合抗体主要用于在应用中降低免疫原性和在生产中提高产率,例如在鼠类mAb具有从杂交瘤生产的更高产率但在人类中更高的免疫原性的情况下,使用人类/鼠类嵌合mAb。嵌合抗体和它们的生产方法在本领域中是已知的(例如PCT专利申请WO 86/01533、WO 97/02671、WO 90/07861、WO 92/22653和美国专利5,693,762、5,693,761、5,585,089、5,530,101和5,225,539)。

[0236] 根据某些实施方式,所述抗体是单克隆抗体。

[0237] 根据某些特定实施方式,所述单克隆抗体是嵌合单克隆抗体。

[0238] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体包含源自于人类的恒定区。

[0239] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3和人类IgG4。

[0240] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1和人类IgG2。

[0241] 根据特定实施方式,提供了一种识别人类连接蛋白-2的嵌合单克隆抗体,其包含:

[0242] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是(SEQ ID NO:1);HC CDR2是(SEQ ID NO:2);HC CDR3是(SEQ ID NO:3);LC CDR1是(SEQ ID NO:4);LC CDR2是(SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:6);或

[0243] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是(SEQ ID NO:11);HC CDR2是(SEQ ID NO:12);HC CDR3是(SEQ ID NO:13);LC CDR1是(SEQ ID NO:14);LC CDR2是(SEQ ID NO:15);

并且LC CDR3是(SEQ ID NO:16)。

[0244] 药理学

[0245] 在制药和药物剂型中,活性药剂优选地与一种或多种可药用载体和任选的任何其他治疗性成分一起使用。所述载体必须在与所述剂型的其他成分相容和不对其接受者过度有害的意义上是可药用的。所述活性药剂以有效实现如上所述的所需药理效果的量和适合于实现所需暴露的量提供。

[0246] 通常,将本发明的抗体及其包含抗体的抗原结合部分或包含包括肽模拟物在内的另一个多肽的片段和偶联物悬浮在无菌盐水溶液中,用于治疗性用途。所述药物组合物可以被可选地配制成控制活性成分(包含抗体的抗原结合部分的分子)的释放或延长它在患者系统中的存在。大量适合的药物递送系统是已知的,并且包括例如可植入药物释放系统、水凝胶、羟甲基纤维素、微胶囊、脂质体、微乳液、微球等。受控释放制剂可以通过使用聚合物来复合或吸附根据本发明所述的分子来制备。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)的基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物的基质。根据本发明所述的分子即抗体或抗体片段从这种基质释放的速率取决于所述分子的分子量、所述基质内所述分子的量和被分散粒子的尺寸。

[0247] 本发明的药物组合物可以通过任何适合的手段给药,例如口服、局部、鼻内、皮下、肌肉内、静脉内、动脉内、关节内、病灶内、肿瘤内或肠胃外给药。通常,将静脉内(i.v.)给药用于递送抗体。

[0248] 对于本领域普通技术人员来说,显然根据本发明所述的分子的治疗有效量将尤其取决于给药计划、给药的分子的单元剂量、所述分子是否与其他治疗剂组合给药、患者的免疫状态和健康、所述给药的分子的治疗活性、它在血液循环中的持久性和主治医师的判断。

[0249] 当在本文中使用时,术语“治疗有效量”是指在哺乳动物中有效治疗疾病或障碍的药物的量。在癌症的情况下,所述药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数目,减小肿瘤尺寸,抑制(即在一定程度上减缓并且优选地停止)癌细胞浸润到周围器官中,抑制(即在一定程度上减缓并且优选地停止)肿瘤转移,在一定程度上抑制肿瘤生长,和/或在一定程度上缓和与所述障碍相关的一种或多种症状。在所述药物可以阻止现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的情况下,它可能具有细胞抑制性和/或细胞毒性。对于癌症疗法来说,体内效能可以例如通过评估存活时间长度、疾病进展时间(TTP)、响应率(RR)、响应持续时间和/或生活质量来衡量。

[0250] 适合于通过本发明治疗的癌症包括但不限于上皮癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、中等级别/滤泡性NHL、中等级别弥漫性NHL、高级别成免疫细胞性NHL、高级别成淋巴细胞性NHL、高级别小非裂解细胞NHL、巨大肿块(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性粒细胞性白血病和移植后淋巴增殖性障碍(PTLD),以及与斑痣、水肿

(例如与脑肿瘤相关的水肿) 和Meigs综合征相关的异常血管增殖。优选地,所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波济氏肉瘤、类癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。适合于本发明的治疗的癌性病症包括转移性癌症。

[0251] 根据其他实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于治疗以连接蛋白-2的过表达为特征的癌症。与连接蛋白-2过表达相关的癌症类型可以使用已知的数据库例如The Cancer Genome Atlas(TCGA)来鉴定。根据某些实施方式,可以使用根据本发明所述的组合物治疗的癌症选自肾上腺皮质癌(ACC)、嫌色肾细胞癌(KICH)、肝细胞癌(LIHC)、结肠和直肠腺癌(COAD、READ)、胰腺导管腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、乳头状肾癌(KIRP)、肺腺癌(LUAD)、头颈鳞状细胞癌(HNSC)、前列腺腺癌(PRAD)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、宫颈癌(CESC)、皮肤黑素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、尿路上皮膀胱癌(BLCA)、透明细胞肾癌(KIRC)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、子宫癌肉瘤(UCS)、肉瘤(SARC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、乳头状甲状腺癌(THCA)、多形性胶质细胞瘤(GBM)、乳腺癌(BRCA)、低级别神经胶质瘤(LGG)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0252] 作为活性成分的本发明的分子被溶解、分散或混合在公知的可药用并且与所述活性成分相容的赋形剂中。适合的赋形剂是例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。其他适合的载体对于本领域技术人员来说是公知的。此外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质例如润湿或乳化剂、pH缓冲剂。

[0253] 根据本发明所述的药物组合物可以与抗肿瘤组合物一起给药。

[0254] 当在本文中使用时,术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性措施两者。需要治疗的对象包括已经患有所述障碍的对象以及将要预防所述障碍的对象。

[0255] 术语“癌症”指称或描述哺乳动物中的一种通常以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于上皮癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这些癌症的更具体的实例包括黑素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌或子宫内膜癌。

[0256] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药所述药物组合物作为包括给药至少一种另外的抗癌药剂在内的治疗方案的一部分。

[0257] 根据某些实施方式,所述抗癌药剂选自抗代谢物、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、天冬酰胺酶、烷化剂、抗肿瘤抗生素及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0258] 根据某些实施方式,所述抗代谢物选自阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨和羟基脲。根据某些实施方式,所述有丝分裂抑制剂选自长春新碱、长春碱和长春瑞滨。根据某些实施方式,所述拓扑异构酶抑制剂选自拓扑替康和伊立替康。根据某些实施方式,所述烷化剂选自白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、二氯甲基乙胺、美法仑、噻替派、达卡巴嗪和丙卡巴肼。根据某些实施方式,所述抗肿瘤抗生素选自博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌和普卡霉素。根据某些实施方式,所述拓扑异构酶II抑制剂选自依托泊苷和替尼泊苷。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0259] 根据某些特定实施方式,所述另外的抗癌药剂选自贝伐单抗、卡铂、环磷酰胺、多

柔比星盐酸盐、吉西他滨盐酸盐、拓扑替康盐酸盐、噻替派及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0260] 根据本发明所述的单克隆抗体可以与至少一种抗癌药剂一起用作组合疗法的一部分。根据某些实施方式，所述另外的抗癌药剂是免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂或化学治疗剂。

[0261] 根据某些实施方式，所述抗癌药剂是作为激动剂或拮抗剂的免疫调节剂，例如针对免疫检查点分子的抗体。

[0262] 检查点免疫疗法阻断已被证明是令人兴奋的癌症治疗新场所。免疫检查点途径由一系列共刺激和抑制性分子构成，这些分子协同工作，以便维持自身耐受性并保护组织在生理条件下不受免疫系统损伤。肿瘤利用某些检查点途径以便逃避免疫系统。因此，抑制这些途径已成为一种有前途的抗癌治疗策略。

[0263] 抗细胞毒性T淋巴细胞4 (CTLA-4) 抗体伊匹单抗 (在2011年批准) 是对癌症患者的治疗显示出益处的第一种免疫治疗剂。所述抗体干扰抗原呈递到T细胞期间的抑制性信号。抗程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体派姆单抗 (在2014年批准) 阻断由T细胞表达的PD-1受体的负免疫调控信号传导。另一种抗PD-1药剂在2014年提交管理部门批准，用于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC)。积极的研究目前正在探索许多其他免疫检查点，其中包括CEACAM1、NKG2A、B7-H3、B7-H4、VISTA、CD112R、淋巴细胞活化基因3 (LAG3)、CD137、OX40 (也被称为CD134) 和杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)。

[0264] 根据某些特定实施方式，所述免疫调节剂选自：抑制CTLA-4的抗体，抗人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、PD-L1和PD-L2抗体，活化的细胞毒性淋巴细胞，淋巴细胞活化剂，针对CEACAM的抗体，针对TIGIT的抗体和RAF/MEK途径抑制剂。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据某些特定实施方式，所述另外的免疫调节剂选自针对PD-1的mAb、针对PD-L1的mAb、针对PD-L2的mAb、针对CEACAM1的mAb、针对CTLA-4的mAb、针对TIGIT的mAB、PVR、白介素2 (IL-2) 或淋巴因子活化的杀伤 (LAK) 细胞。

[0265] 根据其他实施方式，所述另外的抗癌药剂是化学治疗剂。可以与根据本发明所述的抗体一起或分开地给药的化学治疗剂可以包括本领域中已知的表现出抗癌活性的任何此类药剂，包括但不限于：米托蒽醌，拓扑异构酶抑制剂，来自于长春花的纺锤体毒素：长春碱、长春新碱、长春瑞滨 (taxol)、紫杉醇、多西他赛；烷化剂：二氯甲基二乙胺，苯丁酸氮芥，环磷酰胺，美法仑，异环磷酰胺；甲氨蝶呤；6-巯基嘌呤；5-氟尿嘧啶，阿糖胞苷，吉西他滨；鬼臼毒素：依托泊苷，伊立替康，拓扑替康，达卡巴嗪；抗生素类：多柔比星 (阿霉素)，博来霉素，丝裂霉素；亚硝基脲类：卡莫司汀 (BCNU)，洛莫司汀，表柔比星，伊达比星，柔红霉素；无机离子：顺铂，卡铂；干扰素，天冬酰胺酶；激素：他莫昔芬，亮丙瑞林，氟他胺和醋酸甲地孕酮。

[0266] 根据某些实施方式，所述化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位络合物、蒽二酮取代的脲、甲基肼衍生物，肾上腺皮质激素抑制剂、肾上腺皮质类固醇、孕激素、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺激素释放激素类似物。根据另一个实施方式，所述化学治疗剂选自5-氟尿嘧啶 (5-FU)、甲酰四氢叶酸 (LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多西他赛。可以使用一种或多种化学治疗

剂。

[0267] 在某些实施方式中,根据本发明所述的药物组合物用于治疗癌症或用于增强免疫应答。

[0268] 术语“增强免疫应答”是指提高免疫系统的应答性和诱导或延长它的记忆。根据本发明所述的药物组合物可用于在疫苗接种后刺激免疫系统。因此,在一个实施方式中,所述药物组合物可用于改进疫苗接种。

[0269] 在某些实施方式中,所述癌症选自肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌和子宫内膜细胞癌。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0270] 根据某些实施方式,包含根据本发明所述的至少一种抗体或其片段的药物组合物和包含另外的免疫调节剂或激酶抑制剂的药物组合物,用于通过分给药治疗癌症。

[0271] 根据另一方面,本发明提供了一种在需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的根据本发明所述的单克隆抗体或抗体片段。

[0272] 当在本文中使用时,术语“有效量”是指所述单克隆抗体或抗体片段的足以在给药到对象时具有目标治疗效果的量。实现所述治疗最终结果所需的有效量可能取决于多种因素,包括例如肿瘤的具体类型和患者病症的严重性,以及所述组合是否进一步与辐射共同给药。在本发明的情形中,所述活性药剂的有效量(剂量)应该足以在所述对象中随时间实现有益治疗响应,包括但不限于肿瘤生长的抑制、肿瘤生长速率的降低、肿瘤和转移瘤生长的阻止和存活率提高。

[0273] 本文中描述的组合物的毒性和治疗效能可以通过标准的制药程序,在细胞培养物或实验动物中确定,例如通过确定主题化合物的IC50(提供50%抑制的浓度)和最高耐受剂量。从这些细胞培养物测定法和动物研究获得的数据可用于配制在人类中使用的多种剂量。所述剂量可能尤其是随着所使用的剂型、所选的给药方案、用于治疗的药剂的组成和使用的给药途径以及其他相关因素而变。精确的剂型、给药途径和剂量可以由各个医师根据患者的状况来选择。取决于待治疗的病症的严重性和响应性,给药也可以是缓释组合物的单次给药,并且治疗过程持续数天到数周或直至实现治愈或实现疾病状态的消减。待给药的组合物的量当然取决于待治疗的对象、患病的严重性、给药方式、处方医师的判断和所有其他相关因素。

[0274] 术语将物质、化合物或药剂“给药”到对象,可以使用本领域技术人员已知的各种不同方法之一来进行。例如,化合物或药剂可以肠内或肠胃外给药。肠内是指通过胃肠道给药,包括经口、舌下或直肠给药。肠胃外给药包括静脉内、真皮内、肌肉内、腹膜内、皮下、眼、舌下、鼻内、通过吸入、脊髓内、大脑内和透皮(通过例如经皮肤导管吸收)给药。化合物或药剂也可以适合地通过可重复装填或生物可降解聚合物装置或其他装置例如贴片和泵,或通过提供所述化合物或药剂的延长、缓慢或受控释放的剂型来引入。给药也可以进行例如一次、多次,和/或在一个或多个延长的时间段内进行。在某些实施方式中,所述给药包括直接给药(包括自我给药)和间接给药(包括开药的行动)两者。例如,当在本文中使用时,指示患者自我给药药物或由另一人给药药物的医师和/或向患者提供药物处方的医师,正在对所述患者给药所述药物。

[0275] 抗体通常以约0.1至约20mg/kg患者体重、通常为约0.5至约10mg/kg、通常为约1至

约5mg/kg范围内的剂量给药。就此而言，优选地使用循环半衰期为至少12小时、优选为至少4天、更优选长达21天的抗体。嵌合抗体预期具有长达14-21天的循环半衰期。在某些情况下，给药大的负荷剂量，随后在治疗期内给药定期(例如每周)维持剂量，可能是有利的。抗体也可以通过缓释递送系统、泵和用于连续输注的其他已知递送系统来递送。

[0276] 本发明的抗体可用于基于CAR的过继性免疫疗法，所述疗法利用包含CAR的工程化淋巴细胞治疗癌症。作为非限制性实例，在本文中描述了CAR-T系统。

[0277] 所述T细胞疗法将嵌合抗原受体(CAR)用于癌症或肿瘤的治疗(剂CAR-T细胞疗法)。CAR-T细胞疗法是一种细胞免疫疗法，其涉及向癌症患者给药作用于肿瘤细胞并引起肿瘤细胞凋亡的遗传工程改造的T-细胞。所述遗传工程改造的T细胞通过使用基因转移技术在T细胞上表达具有与细胞内结构域例如CD3 ζ 链序列的片段组合的抗体可变区(VL和VH)的CAR来制备。CAR是其中将特异性针对肿瘤抗原的单克隆抗体的轻链和重链可变区彼此相连，然后在C-端一侧处连接到T-细胞受体(TCR)链的嵌合蛋白的通用术语。

[0278] 根据某些实施方式，所述CAR包含选自CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3 ζ 结构域的至少一个蛋白质结构域。根据某些实施方式，所述CAR包含CD8茎结构域。根据某些实施方式，所述CAR包含CD28 TM结构域。根据某些实施方式，所述CAR包含CD3 ζ 信号传导结构域。根据某些实施方式，所述CAR包含41BB结构域。根据特定实施方式，所述CAR包含CD8茎结构域、CD28 TM结构域、41BB结构域和CD3 ζ 结构域。

[0279] 根据某些实施方式，所述CAR包含源自于4-1BB(或41BB或CD137)、ICOS、OX40、CD27、KIR2DS2、MYD88-CD40或CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中，所述CAR包含CD3 ζ 、41BB和CD28的信号传导结构域。

[0280] 根据某些实施方式，所述CAR包含选自CD28 TM、DAP12 TM、CD8 TM、CD3 ζ TM、DAP10 TM和ICOS TM的跨膜结构域(TM)。

[0281] 根据某些实施方式，所述CAR包含铰链区序列。根据某些实施方式，所述铰链区序列源自于CD8、CD28或IgG4铰链。

[0282] 根据某些实施方式，提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，其包含根据本发明所述的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。根据某些实施方式，提供了一种遗传工程改造的淋巴细胞，在其表面上表达有所述CAR。根据某些特定实施方式，提供了一种在其表面上表达有所述CAR的遗传工程改造的T细胞(CAR-T细胞)。

[0283] 根据某些实施方式，所述CAR包含连接蛋白-2结合位点，所述结合位点包含选自下述的6个CDR序列：

[0284] i. 包含SEQ ID NO:7的重链(HC)可变区的三个互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:8的轻链(LC)可变区的三个CDR，或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物；和

[0285] ii. 包含SEQ ID NO:17的重链可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:18的轻链可变区的三个CDR，或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0286] 根据某些实施方式，所述类似物或衍生物与所述抗体或片段序列具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0287] 根据某些实施方式，所述CAR包含连接蛋白-2结合位点，所述结合位点包含选自下述的6个CDR序列：

[0288] i. 包含SEQ ID NO:7的重链(HC)可变区的三个互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:8的轻链(LC)可变区的三个CDR;和

[0289] ii. 包含SEQ ID NO:17的重链可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:18的轻链可变区的三个CDR。

[0290] 根据某些实施方式,所述CAR包含连接蛋白-2结合位点,所述结合位点包含选自下述的CDR组:

[0291] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是RFTMS (SEQ ID NO:1);HC CDR2是TISSGGSYTYPDSVKG (SEQ ID NO:2);HC CDR3是DRDFYGPYYAMDY (SEQ ID NO:3);LC CDR1是KSSQSLLNSGNQKNYLA (SEQ ID NO:4);LC CDR2是FASTRES (SEQ ID NO:5);并且LC CDR3是QQHYTTPLT (SEQ ID NO:6);和

[0292] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SYWIH (SEQ ID NO:11);HC CDR2是AVYPGNSDSNYNQKFKA (SEQ ID NO:12);HC CDR3是LVGTFDY (SEQ ID NO:13);LC CDR1是KASQNVGINVV (SEQ ID NO:14);LC CDR2是SASYRYS (SEQ ID NO:15);并且LC CDR3是QQYNTNPFT (SEQ ID NO:16)。

[0293] 根据某些实施方式,所述CAR包含含有SEQ ID NO:20或22或与SEQ ID NO:20或22具有至少85%同一性的类似物的抗原结合结构域,以及跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域。

[0294] 根据某一方面,本发明提供了一种包含本文中描述的CAR的细胞。根据某些实施方式,所述细胞表达或能够表达本发明的CAR。根据某些实施方式,所述细胞是淋巴细胞。根据某些实施方式,所述细胞选自T细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0295] 根据某些实施方式,所述细胞例如T-细胞包含编码本发明的CAR的核酸分子。根据其他实施方式,所述细胞例如T-细胞包含含有编码本发明的CAR的核酸分子的核酸构建物。根据另一个实施方式,本发明提供了一种载体,其包含编码本发明的CAR的核酸构建物或分子。根据这些实施方式,所述T-细胞能够表达或表达本发明的CAR。

[0296] 根据某些实施方式,提供了一种淋巴细胞,其被工程化改造以表达本文中描述的CAR。根据某些实施方式,提供了一种T细胞,其被工程化改造以表达本文中描述的CAR。

[0297] 根据另外的实施方式,提供了一种NK细胞,其被工程化改造以表达本文中描述的CAR。

[0298] 本发明的CAR包含跨膜结构域(TM结构域)、共刺激结构域和活化结构域。根据某些实施方式,所述TM结构域是选自CD4、CD3 ζ 、CD28和CD8的受体的TM结构域或其与所述原始序列具有至少85%氨基酸同一性的类似物,和/或所述共刺激结构域选自CD28、4-1BB、OX40、iCOS、CD27、CD80和CD70蛋白的共刺激结构域、其与原始序列具有至少85%氨基酸同一性的类似物及其任何组合,和/或所述活化结构域选自FcR γ 和CD3- ζ 活化结构域。根据某些实施方式,所述CAR包含前导肽。

[0299] 根据某些实施方式,本发明提供了一种细胞组合物,其包含多个本发明的细胞例如CAR展示细胞。

[0300] 术语“约”意味着对于特定值来说应该假设的可接受的误差范围,例如至多5%或10%。

[0301] 诊断

[0302] 本发明还公开了用于诊断和预后癌症的方法。

[0303] 根据一个方面,本发明提供了一种在对象中诊断和/或预后癌症或传染性疾病的方法,所述方法包括使用本文中所描述的至少一种抗体来确定所述对象的生物样品中连接蛋白-2的表达水平的步骤。

[0304] 术语“生物样品”涵盖了从生物体获得的可用于诊断或监测测定法的各种不同的样品类型。所述术语涵盖了血液和生物来源的其他液体样品、实体组织样品例如活检样本或组织培养物或源自于它们的细胞及其后代。此外,所述术语涵盖了循环的肿瘤或其他细胞。所述术语特别涵盖了临床样品,并且还包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、血清、血浆、尿液、羊水、包括用于眼部样品的房水和玻璃体液在内的生物流体和组织样品。所述术语还涵盖在获取后以任何方式处理过的样品,例如用试剂处理、增溶或富集某些组分的样品。

[0305] 确定连接蛋白-2的表达水平可以通过本文中描述的标记的抗连接蛋白-2抗体来进行。确定所述表达可以例如通过ELISA进行。

[0306] 本发明的方法还可以包括将所述表达水平与对照水平进行比较的步骤。

[0307] 展现下面的实施例是为了更全面地说明本发明的某些实施方式。它们绝不应该被解释为限制本发明的范围。

[0308] 实施例

[0309] 现在将参考下述实施例,所述实施例与上面的描述一起,以非限制性方式说明本发明。

[0310] 通常,本文中使用的命名法和在本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学、免疫学和重组DNA技术。这样的技术在本领域中是公知的。为了方便读者,在整个本文件中提供了涉及公知程序的其他通用参考文献。

[0311] 实施例1.连接蛋白-2mRNA的高表达与各种不同癌症患者的不良生存概率相关

[0312] 对来自于TCGA网站的数据进行了连接蛋白-2mRNA表达与生存概率之间的相关性的研究,并使用oncolog.org网站进行分析 (<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>)。对于低分级神经胶质瘤(图1A; p=5.22E-5)、肾透明细胞癌(图1B; p=0.00037)和肺腺癌(图1C; p=0.0319)患者来说,这种相关性由图1中的箭头指明。

[0313] 实施例2.连接蛋白-2通过特异性受体结合并影响免疫细胞

[0314] 在免疫细胞上表达的受体及其对肿瘤表达的或抗原呈递细胞(APC)上的连接蛋白-2的相应亲和性的示意图(图2)。TIGIT与免疫细胞例如T和NK细胞上的共抑制受体相关; DNAM-1(也被称为CD226)与免疫细胞(例如T细胞)上的活化受体相关,并且CD112R(也被称为PVRIG)与淋巴系免疫细胞(例如T和NK细胞)上的共抑制受体相关;连接蛋白-2(CD112)是免疫细胞的抑制配体,主要通过它与CD112R的结合起作用。根据本发明,抗连接蛋白-2mAb可以阻断连接蛋白-2与其配体CD112R和/或TIGIT的相互作用,并提高免疫细胞的活化。

[0315] 实施例3.抗连接蛋白-2mAb的结合和阻断特征的分析

[0316] 连接蛋白-2克隆不与不表达连接蛋白-2的亲代8866细胞(EBV阳性伯基特淋巴瘤)结合。图3A示出了抗连接蛋白-2抗体克隆与内源性表达连接蛋白-2的MDA-MB-231(乳腺腺癌)细胞(黑色条)或过表达连接蛋白-2的8866-人类连接蛋白-2细胞(灰色条)的结合。所有的mAb均使用30ul/孔的杂交瘤上清液。将以1:250稀释的山羊抗小鼠647Ab用于检测。图3B

示出了结合到8866-人类连接蛋白2细胞的CD112R-Fc(与人类IgG1的Fc区融合的CD112R的细胞外结构域)的FACS分析的结果。在所产生的抗体中,三个克隆(#9、11和13)部分阻断这些相互作用,而一个克隆(#7)完全阻断它们。图3C示出了结合到8866-人类连接蛋白2细胞的DNAM-1-Fc的FACS分析的结果。除了克隆15之外,其他克隆(#7-13)均不阻断活化受体DNAM-1与连接蛋白-2的结合。图3D示出了在抗连接蛋白-2抗体克隆7和11存在下,结合到CHOK1-人类连接蛋白2细胞的TIGIT-Fc的FACS分析的结果。两个克隆均阻断>66%的TIGIT-Fc结合。所有的Fc蛋白均以20 μ g/ml的浓度使用,并与30ul/孔的所指示的mAb上清液共温育。将以1:200稀释的抗人类APC Ab (Jackson immunoresearch AB_2340526)用于检测。这些结果表明某些克隆可以阻止所述抑制受体的结合,而对活化受体的结合没有任何干扰。

[0317] 实施例4.连接蛋白-2被抗连接蛋白2mAb的阻断增强NK细胞活化

[0318] 将来自于健康供体的NK细胞在不同mAb和2:1的E:T比的靶细胞系存在下在37°C温育2小时。NK活化通过CD107a的表面表达的诱导来测量,并且被描绘成与对照IgG相比的变化倍数(Y轴)。所有mAb以5 μ g/ml的浓度使用。图4中示出了人类癌细胞系A549(图4A和4C,肺腺癌)和MDA-MB-231(图4B,乳腺腺癌)的结果。对于克隆#3、7和11观察到最显著的效果。*=p<0.04,**p<0.02,***p<0.002,通过双尾student t-检验。示出了5位供体中的1位的代表性数据。克隆7和11的人类IgG1嵌合变体进一步增加脱粒(图4C),导致与同型对照相比>200%的脱粒。***p<0.002。示出了2位供体中的1位的代表性数据。该数据表明连接蛋白-2被特异性克隆的阻断提高了NK细胞针对大量靶的活性。此外,具有效应物Fc进一步提高NK活性,表明了所述mAb的另一种可能的作用方式。

[0319] 实施例5.连接蛋白-2在各种不同癌细胞中表达

[0320] 通过FACS分析了连接蛋白-2和PVR在各种不同人类肿瘤细胞系上的表达。对黑素瘤细胞、乳腺癌细胞、结肠直肠癌(CRC)细胞、肾细胞(HEK)、肺癌细胞、前列腺癌细胞和脑肿瘤细胞(GBM)进行了分析,它们都表达PVR和连接蛋白-2。使用可商购的抗连接蛋白-2抗体(克隆Tx31)和内部自制的抗PVR mAb。所有mAb均以2 μ g/ml的浓度使用。将以1:250稀释的山羊抗小鼠647抗体用于检测。发现连接蛋白-2在不同癌细胞中高表达。

[0321] 实施例6.抗连接蛋白-2mAb与人类和食蟹猴的连接蛋白-2的结合相似

[0322] 研究了抗连接蛋白-2mAb(克隆7和11)与人类(蛋白质ID:Q92692)和食蟹猴(Cyno)(蛋白质id:XP_005589607.1)的连接蛋白-2的结合。食蟹猴与人类连接蛋白-2之间的蛋白质序列比对揭示出成熟蛋白的细胞外结构域具有14个在两个物种之间不同的氨基酸。图5A描绘了两种mAb的叠放结合曲线,所述mAb在连续三倍稀释液中以13.3nM-0.02nM范围内的浓度添加到表达人类或食蟹猴连接蛋白-2的CHO细胞。这种测定的FACS分析的结果被表示成与被设定到100%的最大结合相比的相对结合强度。将以1:250稀释的山羊抗小鼠647Ab (Jackson immunoresearch AB_2338910)用于检测。还呈现了这个测定的数据分析的概述,其进一步证实两种mAb以高的且相近的亲和性与人类和食蟹猴连接蛋白-2结合。

[0323] 还使用源自于绿猴属(非洲绿猴)的Vero细胞研究了抗连接蛋白-2mAb的结合。这个物种表达与人类连接蛋白-2具有97%相似性的连接蛋白-2蛋白(XP_007995342.1)。图5B示出了通过如为图5A所述的FACS分析测试的抗连接蛋白-2mAb与内源人类连接蛋白-2(由293T细胞表达)和内源非洲绿猴连接蛋白-2(由Vero细胞表达)的结合(Ab范围:20-0.0003nM)。这个分析揭示出对于两种抗连接蛋白-2抗体克隆来说,抗体与人类和猴连接蛋白-2结合相似。

白-2靶两者的结合相似,具有高亲和性,这在概述表中也是明显的。

[0324] 实施例7.抗人类连接蛋白-2mAb影响T细胞增殖

[0325] 将人类PBMC用CFSE(C34554 ThermoFischer)标记,并在0.2 μ g/ml PHA-L(Roche)和2 μ g/ml的所指示的抗体存在下与靶细胞MDA-MB-231(图6A)或A549(图6B)温育。在温育后,收集免疫细胞并通过抗人类CD8抗体进行染色。通过CFSE信号强度评估CD8+T细胞的细胞增殖。将mIgG处理的细胞的CFSE水平设定为1。结果被呈现为相对于该对照的增殖提高倍数。实验进行一式四份;通过双尾student t-检验,所有p值均低于0.02。示出了代表所测试的7位PBMC供体的1位供体的结果。所述数据表明,在来自于不同来源的肿瘤细胞存在下,连接蛋白-2被所指示的克隆的阻断提高了CD8+T细胞的增殖。

[0326] 实施例8.单独的或与已知检查点阻断剂相组合的抗人类连接蛋白-2mAb影响CD8+T细胞增殖

[0327] 为了研究所述mAb对T细胞增殖的影响,将人类PBMC用CFSE标记,并在0.2 μ g/ml PHA-L和2 μ g/ml的所指示的抗体存在下与靶RKO(人类结肠癌细胞;图7A)或A549(图7B)细胞温育。对于组合治疗来说,每种mAb以2 μ g/ml的浓度添加。在温育后,收集免疫细胞并通过抗人类CD8抗体进行染色。分析整个群体和CD8增殖细胞,并将mIgG处理的细胞的CFSE水平设定为1。实验进行一式四份;通过双尾student t-检验,所有p值均低于0.02。结果被呈现为相对于所述对照的增殖提高倍数。示出了所测试的2位PBMC供体中的1位供体的结果。测试的所有组合均导致与单独的处理相比CD8+T细胞增殖的显著提高。

[0328] 实施例9.抗人类连接蛋白-2抗体影响IFN γ 的分泌

[0329] 将人类PBMC用CFSE标记,并在0.2 μ g/ml PHA-L和2 μ g/ml的所指示的抗体存在下与靶细胞RKO(图8A)或A549(图8B)温育。对于组合治疗来说,每种mAb以2 μ g/ml的浓度添加。在96小时后将板离心并收集上清液。IFN γ 定量使用Biolegend的人类IFN- γ ELISA MAXTM Deluxe,按照制造商的方案来进行。示出了所测试的5位PBMC供体中的1位供体的结果。所有处理均导致IFN γ 分泌的显著提高(p<0.001,双尾student t-检验)。

[0330] 实施例10.单独的或与已知检查点阻断剂相组合的抗人类连接蛋白-2抗体影响hPBMC对肿瘤细胞的灭杀

[0331] 所述测定法如实施例8中所述来进行。在96-120小时后将免疫细胞移除,将肿瘤细胞充分清洗,并使用CellTiter-Glo[®]按照制造商的方案确定附着型肿瘤细胞的存活率。所有结果均在试剂盒的线性范围内。将mIgG处理的孔中肿瘤细胞的灭杀设定为1。所有单独的处理均显著(p<0.01,双尾t-检验)提高了肿瘤细胞的灭杀(图9A,RKO;图9B,A549)。示出了所测试的2位PBMC供体中的1位供体的结果。测试的大多数组合导致与单独的处理相比肿瘤细胞灭杀的显著提高。

[0332] 实施例11.连接蛋白-2mAb在体内显著抑制肿瘤发展

[0333] 将Scid雌性小鼠(n=33)用基质胶中的5x10⁶个MDA-MB-231细胞SC注射。在肿瘤达到80-120mm³后,将小鼠随机分成三组,并以不知情的方式通过均以3mg/kg的剂量i.v.注射PBS(浅灰色菱形;图10)、hIgG1对照Ab(灰色正方形)或克隆-7-人类IgG1(2.7.1)(黑色圆圈),每周两次进行治疗。如图10中所示,对于克隆2.7.1观察到显著的肿瘤生长抑制(TGI),其始于治疗后第7天,并在研究结束时达到54%.*p<0.04,**p<0.02,***p<0.008。

[0334] 实施例12.带有人类IgG2 Fc的嵌合连接蛋白-2mAb与抗PD-1mAb协同地导致肿瘤

细胞杀伤和PBMC增殖的提高

[0335] 不使用Ab或使用克隆-11-人类IgG2(2.11.2)、KeytrudaTM(两者均为3.5μg/ml)或它们的组合(每种3.5μg/ml),在4μg/ml PHA-L存在下将A549细胞与PBMC以7:1的E:T比共温育96h。对2.11.2处理组观察到肿瘤细胞杀伤(图11A)和PBMC(T细胞)增殖(图11B)的显著提高,其在与抗PD-1Ab Keytruda组合时进一步提高。 $*p<0.01, **p<0.002, ***p<0.0008$ 。

[0336] 实施例13.在表达连接蛋白-2的肿瘤细胞存在下,表达源自于克隆7和11的scFv的CAR-T细胞被特异性激活

[0337] 将来自于健康供体的PBMC用不同的CAR-T构建物转导,所述构建物包含根据本发明所述的scFv分子和至少一个调控、跨膜和/或刺激区。在图12A中示出的示意图中,CAR-T包含scFv和4个区域:CD8茎,CD28 TM,4-1BB和CD3ζ。将连接蛋白-2CAR-T 2.07(源自于克隆7的结合位点)或CAR-T 2.11(源自于克隆11的结合位点)PBMC与U937或BT-474靶细胞以不同的E:T比温育。在绝大多数所测试的E:T比下,靶细胞的杀伤(图12B和12D)($p<0.005$,除了由NS所指示的之外)和IFN γ 被活化的PBMC的分泌(图12C和12E, $p<0.03$)是显著的。图12B-E描绘了对每种细胞系进行的三个实验中的代表性实验(CAR-T 2.07灰色条,CAR-T 2.11黑色条)。

[0338] 实施例14.抗体序列

[0339] 表1详述了本发明的某些抗体序列。

[0340] 表1.

SEQ ID #	描述	类型	带有前导肽的 SEQ ID #*
1	克隆 7 HC CDR1	氨基酸	[0341]
2	克隆 7 HC CDR2	氨基酸	
3	克隆 7 HC CDR3	氨基酸	
4	克隆 7 LC CDR1	氨基酸	
5	克隆 7 LC CDR2	氨基酸	
6	克隆 7 LC CDR3	氨基酸	
7	克隆 7 HC	氨基酸	25
8	克隆 7 LC	氨基酸	26
9	克隆 7 HC	核酸	27
10	克隆 7 LC	核酸	28
11	克隆 11 HC CDR 1	氨基酸	
12	克隆 11 HC CDR 2	氨基酸	
13	克隆 11 HC CDR 3	氨基酸	
14	克隆 11 LC CDR 1	氨基酸	
15	克隆 11 LC CDR 2	氨基酸	
16	克隆 11 LC CDR 3	氨基酸	
17	克隆 11 HC	氨基酸	29
18	克隆 11 LC	氨基酸	30
19	克隆 11 HC	核酸	31
20	克隆 11 LC	核酸	32
21	scFv 克隆 7	核酸	[0342]
22	scFv 克隆 7	氨基酸	
23	scFv 克隆 11	核酸	
24	scFv 克隆 11	氨基酸	

[0343] *除了添加有前导肽之外,序列ID Nos. 25-28和29-32分别对应于序列7-10和17-20。

[0344] 前述特定实施方式的描述非常充分地揭示出本发明的总体本质,使得其他人可以通过应用当前的知识容易地修改和/或改编这些特定实施方式以适应于各种不同的应用,而无需过多的实验并且不背离所述通用概念,因此,这些改编和修改应当并且打算被包含在所公开的实施方式的等同性的含义和范围之内。应当理解,本文中采用的短语或术语是出于描述而不是限制的目的。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展有限公司
[0003] 里耶卡医学大学
[0004] <120> 特异性针对人类连接蛋白-2的抗体
[0005] <130> Yissum/0156 PCT
[0006] <150> US 62/791808
[0007] <151> 2019-01-13
[0008] <160> 32
[0009] <170> PatentIn version 3.5
[0010] <210> 1
[0011] <211> 5
[0012] <212> PRT
[0013] <213> Mus musculus
[0014] <400> 1
[0015] Arg Phe Thr Met Ser
[0016] 1 5
[0017] <210> 2
[0018] <211> 17
[0019] <212> PRT
[0020] <213> Mus musculus
[0021] <400> 2
[0022] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
[0023] 1 5 10 15
[0024] Gly
[0025] <210> 3
[0026] <211> 13
[0027] <212> PRT
[0028] <213> Mus musculus
[0029] <400> 3
[0030] Asp Arg Asp Phe Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[0031] 1 5 10
[0032] <210> 4
[0033] <211> 17
[0034] <212> PRT
[0035] <213> Mus musculus
[0036] <400> 4
[0037] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
[0038] 1 5 10 15

[0039] Ala
 [0040] <210> 5
 [0041] <211> 7
 [0042] <212> PRT
 [0043] <213> Mus musculus
 [0044] <400> 5
 [0045] Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 [0046] 1 5
 [0047] <210> 6
 [0048] <211> 9
 [0049] <212> PRT
 [0050] <213> Mus musculus
 [0051] <400> 6
 [0052] Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
 [0053] 1 5
 [0054] <210> 7
 [0055] <211> 122
 [0056] <212> PRT
 [0057] <213> Mus musculus
 [0058] <400> 7
 [0059] Asp Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0060] 1 5 10 15
 [0061] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
 [0062] 20 25 30
 [0063] Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Thr Leu Asp Trp Val
 [0064] 35 40 45
 [0065] Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 [0066] 50 55 60
 [0067] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0068] 65 70 75 80
 [0069] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [0070] 85 90 95
 [0071] Thr Arg Asp Arg Asp Phe Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 [0072] 100 105 110
 [0073] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0074] 115 120
 [0075] <210> 8
 [0076] <211> 113
 [0077] <212> PRT

- [0078] <213> Mus musculus
- [0079] <400> 8
- [0080] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Ile Ser Val Gly
- | | | | | |
|--------|---|---|----|----|
| [0081] | 1 | 5 | 10 | 15 |
|--------|---|---|----|----|
- [0082] Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
- | | | | |
|--------|----|----|----|
| [0083] | 20 | 25 | 30 |
|--------|----|----|----|
- [0084] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
- | | | | |
|--------|----|----|----|
| [0085] | 35 | 40 | 45 |
|--------|----|----|----|
- [0086] Ser Pro Lys Leu Leu Val His Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
- | | | | |
|--------|----|----|----|
| [0087] | 50 | 55 | 60 |
|--------|----|----|----|
- [0088] Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
- | | | | | |
|--------|----|----|----|----|
| [0089] | 65 | 70 | 75 | 80 |
|--------|----|----|----|----|
- [0090] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
- | | | | |
|--------|----|----|----|
| [0091] | 85 | 90 | 95 |
|--------|----|----|----|
- [0092] His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
- | | | | |
|--------|-----|-----|-----|
| [0093] | 100 | 105 | 110 |
|--------|-----|-----|-----|
- [0094] Lys
- [0095] <210> 9
- [0096] <211> 366
- [0097] <212> DNA
- [0098] <213> Mus musculus
- [0099] <400> 9
- [0100] gacgtgaatc tggtggagtc tgggggaggc tttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc 60
- [0101] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aggtttacca tgtcttggt tcgccagact 120
- [0102] ccggagaaga cattggactg ggtcgcaacc attagtagtg gtggttctta cacctactat 180
- [0103] ccagacagtg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
- [0104] ctgcaaata gcatgtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagatcga 300
- [0105] gatttctacg gcccttacta tgctatggac tactgggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
- [0106] tcctca 366
- [0107] <210> 10
- [0108] <211> 339
- [0109] <212> DNA
- [0110] <213> Mus musculus
- [0111] <400> 10
- [0112] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatct cagtaggaca gaaggtcact 60
- [0113] atgagctgca agtccagtca gagcctttta aatagtggca atcaaaagaa ctatggcc 120
- [0114] tggtaccagg aaaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tacactttgc atccactagg 180
- [0115] gaatctgggg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cactcttacc 240
- [0116] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttataccact 300

- [0117] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
[0118] <210> 11
[0119] <211> 5
[0120] <212> PRT
[0121] <213> Mus musculus
[0122] <400> 11
[0123] Ser Tyr Trp Ile His
[0124] 1 5
[0125] <210> 12
[0126] <211> 17
[0127] <212> PRT
[0128] <213> Mus musculus
[0129] <400> 12
[0130] Ala Val Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0131] 1 5 10 15
[0132] Ala
[0133] <210> 13
[0134] <211> 7
[0135] <212> PRT
[0136] <213> Mus musculus
[0137] <400> 13
[0138] Leu Val Gly Thr Phe Asp Tyr
[0139] 1 5
[0140] <210> 14
[0141] <211> 11
[0142] <212> PRT
[0143] <213> Mus musculus
[0144] <400> 14
[0145] Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn Val Val
[0146] 1 5 10
[0147] <210> 15
[0148] <211> 7
[0149] <212> PRT
[0150] <213> Mus musculus
[0151] <400> 15
[0152] Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
[0153] 1 5
[0154] <210> 16
[0155] <211> 9

[0156]	<212> PRT			
[0157]	<213> Mus musculus			
[0158]	<400> 16			
[0159]	Gln Gln Tyr Asn Thr Asn Pro Phe Thr			
[0160]	1	5		
[0161]	<210> 17			
[0162]	<211> 116			
[0163]	<212> PRT			
[0164]	<213> Mus musculus			
[0165]	<400> 17			
[0166]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Thr Arg Pro Gly Ala			
[0167]	1	5	10	15
[0168]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr			
[0169]	20	25	30	
[0170]	Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0171]	35	40	45	
[0172]	Gly Ala Val Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0173]	50	55	60	
[0174]	Lys Ala Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Ala Tyr			
[0175]	65	70	75	80
[0176]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0177]	85	90	95	
[0178]	Thr Lys Leu Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu			
[0179]	100	105	110	
[0180]	Thr Val Ser Ser			
[0181]	115			
[0182]	<210> 18			
[0183]	<211> 107			
[0184]	<212> PRT			
[0185]	<213> Mus musculus			
[0186]	<400> 18			
[0187]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ser Ile Gly			
[0188]	1	5	10	15
[0189]	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn			
[0190]	20	25	30	
[0191]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile			
[0192]	35	40	45	
[0193]	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
[0194]	50	55	60	

[0195] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[0196] 65 70 75 80
[0197] Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asn Pro Phe
[0198] 85 90 95
[0199] Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0200] 100 105
[0201] <210> 19
[0202] <211> 348
[0203] <212> DNA
[0204] <213> Mus musculus
[0205] <400> 19
[0206] gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctgacaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
[0207] tcctgcaagg cttctggcta cattttacc agctactgga ttcaactgggt aaaacagcgg 120
[0208] cctggacagg gtctgaatg gattggcgct gtttatcctg gaaatagtga ttcttaactac 180
[0209] aaccagaagt tcaaggccaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240
[0210] atggagctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggtct attactgtac aaagcttagtt 300
[0211] gggacgtttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag ttcctcgt 348
[0212] <210> 20
[0213] <211> 321
[0214] <212> DNA
[0215] <213> Mus musculus
[0216] <400> 20
[0217] gacattgtga tgaccaggc tcaaaaattc atgtcctcat caataggaga cagggtcagc 60
[0218] gtcacctgca aggccagtca gaatgtggc attaatgttag tttggtatca acagagagca 120
[0219] gggcagtctc ctaaaacact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
[0220] cgcttcacag gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0221] gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacacca atccattcac gttcggctcg 300
[0222] gggacaaagt tggaaataaa a 321
[0223] <210> 21
[0224] <211> 750
[0225] <212> DNA
[0226] <213> Artificial sequence
[0227] <220>
[0228] <223> DNA
[0229] <400> 21
[0230] gacgtgaatc tggtgaggc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0231] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aggtttacca tgtcttggt tcgccagact 120
[0232] ccggagaaga cattggactg ggtcgcaacc attagtagtg gtggttctta cacctactat 180
[0233] ccagacagtg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

[0234] ctgcaaatga gcagtcgtgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagatcga 300
 [0235] gatttctacg gcccttacta tgcttatggac tactgggtc aaggAACCTC agtcaccgtc 360
 [0236] tcctcagggtg gaggtggctc cggaggaggt ggTTCTGGAG gaggtggttc tGATATCGTG 420
 [0237] atgacacagt ctccatcctc cctggctatc tcagtaggac agaaggTCAC tatgagCTGC 480
 [0238] aagtccagtc agagcTTTT aaatagtggc aatcaaaaga actatTTGC ctggTACCAg 540
 [0239] caaaaaccag gacagtctcc taaacttctg gtacacttg catccactag ggaatctggg 600
 [0240] gtccctgatc gcttcatagg cagtggatct gggacagatt tcactttac catcagcagt 660
 [0241] gtgcaggctg aagacctggc agattactc tgtcagcaac attataccac tccgctcacg 720
 [0242] ttccggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 750
 [0243] <210> 22
 [0244] <211> 250
 [0245] <212> PRT
 [0246] <213> Artificial sequence
 [0247] <220>
 [0248] <223> Protein
 [0249] <400> 22
 [0250] Asp Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0251] 1 5 10 15
 [0252] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
 [0253] 20 25 30
 [0254] Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Thr Leu Asp Trp Val
 [0255] 35 40 45
 [0256] Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 [0257] 50 55 60
 [0258] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0259] 65 70 75 80
 [0260] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [0261] 85 90 95
 [0262] Thr Arg Asp Arg Asp Phe Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 [0263] 100 105 110
 [0264] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 [0265] 115 120 125
 [0266] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
 [0267] 130 135 140
 [0268] Pro Ser Ser Leu Ala Ile Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys
 [0269] 145 150 155 160
 [0270] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 [0271] 165 170 175
 [0272] Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val His

[0273]	180	185	190
[0274]	Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser		
[0275]	195	200	205
[0276]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu		
[0277]	210	215	220
[0278]	Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr		
[0279]	225	230	235
[0280]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0281]		245	250
[0282]	<210> 23		
[0283]	<211> 714		
[0284]	<212> DNA		
[0285]	<213> Artificial sequence		
[0286]	<220>		
[0287]	<223> DNA		
[0288]	<400> 23		
[0289]	gagggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctgacaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60		
[0290]	tcctgcaagg cttctggcta catttttacc agctacttgaa ttcaactgggt aaaacagcgg 120		
[0291]	cctggacagg gtctggaatg gattggcgct gtttatcctg gaaatagtga ttctaactac 180		
[0292]	aaccagaagt tcaaggccaa gcccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240		
[0293]	atggagctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggctt attactgtac aaagcttagtt 300		
[0294]	ggcacgtttt actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcggt tggaggtggc 360		
[0295]	tccggaggag gtgggtctgg aggaggtggt tctgatatcg tcatgaccca gtctaaaaaa 420		
[0296]	ttcatgtcct catcaatagg agacagggtc agcgtcacct gcaaggccag tcagaatgtg 480		
[0297]	ggcattaatg tagttggta tcaacagaga gcagggcagt ctcctaaaac actgattac 540		
[0298]	tcggcatcct accggtacag tggagtcct gatgcattca caggcagtgg atctggaca 600		
[0299]	gatttcactc tcaccatcg caatgtcag tctgaagact tggcagagta ttctgtcag 660		
[0300]	caatataaca ccaatccatt cacgttcggc tcggggacaa agttggaaat aaaa 714		
[0301]	<210> 24		
[0302]	<211> 238		
[0303]	<212> PRT		
[0304]	<213> Artificial sequence		
[0305]	<220>		
[0306]	<223> Protein		
[0307]	<400> 24		
[0308]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Thr Arg Pro Gly Ala		
[0309]	1 5 10 15		
[0310]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr		
[0311]	20 25 30		

[0312]	Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0313]	35	40	45	
[0314]	Gly Ala Val Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0315]	50	55	60	
[0316]	Lys Ala Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0317]	65	70	75	80
[0318]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0319]	85	90	95	
[0320]	Thr Lys Leu Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu			
[0321]	100	105	110	
[0322]	Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
[0323]	115	120	125	
[0324]	Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ser			
[0325]	130	135	140	
[0326]	Ser Ile Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val			
[0327]	145	150	155	160
[0328]	Gly Ile Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Gln Ser Pro Lys			
[0329]	165	170	175	
[0330]	Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg			
[0331]	180	185	190	
[0332]	Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn			
[0333]	195	200	205	
[0334]	Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr			
[0335]	210	215	220	
[0336]	Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0337]	225	230	235	
[0338]	<210> 25			
[0339]	<211> 141			
[0340]	<212> PRT			
[0341]	<213> Mus musculus			
[0342]	<400> 25			
[0343]	Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly			
[0344]	1	5	10	15
[0345]	Val Gln Cys Asp Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys			
[0346]	20	25	30	
[0347]	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
[0348]	35	40	45	
[0349]	Ser Arg Phe Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Thr Leu			
[0350]	50	55	60	

[0351]	Asp Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro			
[0352]	65	70	75	80
[0353]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn			
[0354]	85	90	95	
[0355]	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met			
[0356]	100	105	110	
[0357]	Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Asp Phe Tyr Gly Pro Tyr Tyr Ala Met			
[0358]	115	120	125	
[0359]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0360]	130	135	140	
[0361]	<210> 26			
[0362]	<211> 133			
[0363]	<212> PRT			
[0364]	<213> Mus musculus			
[0365]	<400> 26			
[0366]	Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Phe Leu Leu Leu Trp Val Ser			
[0367]	1	5	10	15
[0368]	Gly Ala Cys Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala			
[0369]	20	25	30	
[0370]	Ile Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser			
[0371]	35	40	45	
[0372]	Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln			
[0373]	50	55	60	
[0374]	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val His Phe Ala Ser Thr Arg			
[0375]	65	70	75	80
[0376]	Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[0377]	85	90	95	
[0378]	Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr			
[0379]	100	105	110	
[0380]	Phe Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr			
[0381]	115	120	125	
[0382]	Lys Leu Glu Leu Lys			
[0383]	130			
[0384]	<210> 27			
[0385]	<211> 423			
[0386]	<212> DNA			
[0387]	<213> Mus musculus			
[0388]	<400> 27			
[0389]	atgaacttcg ggctcagatt gatttccctt gtccttactt taaaagggtgt ccagtgtgac	60		

[0390] gtgaatctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc 120
 [0391] tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagg tttaccatgt cttgggttcg ccagactccg 180
 [0392] gagaagacat tggactgggt cgcaaccatt agtagtggtg gttcttacac ctactatcca 240
 [0393] gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 [0394] caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtacaag agatcgagat 360
 [0395] ttctacggcc cttactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
 [0396] tca 423
 [0397] <210> 28
 [0398] <211> 399
 [0399] <212> DNA
 [0400] <213> Mus musculus
 [0401] <400> 28
 [0402] atggaatcac agaccaggt cctcatgttt cttctgctct gggtatctgg tgcctgttca 60
 [0403] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatct cagtaggaca gaaggtcact 120
 [0404] atgagctgca agtccagtca gaggctttta aatagtggca atcaaaaagaa ctatttggcc 180
 [0405] tggtaccaggc aaaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tacacttgc atccactagg 240
 [0406] gaatctgggg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cactcttacc 300
 [0407] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttataccact 360
 [0408] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 399
 [0409] <210> 29
 [0410] <211> 135
 [0411] <212> PRT
 [0412] <213> Mus musculus
 [0413] <400> 29
 [0414] Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 [0415] 1 5 10 15
 [0416] Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Thr Arg
 [0417] 20 25 30
 [0418] Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
 [0419] 35 40 45
 [0420] Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 [0421] 50 55 60
 [0422] Glu Trp Ile Gly Ala Val Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn
 [0423] 65 70 75 80
 [0424] Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser
 [0425] 85 90 95
 [0426] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 [0427] 100 105 110
 [0428] Tyr Tyr Cys Thr Lys Leu Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0429]	115	120	125
[0430]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[0431]	130	135	
[0432]	<210> 30		
[0433]	<211> 127		
[0434]	<212> PRT		
[0435]	<213> Mus musculus		
[0436]	<400> 30		
[0437]	Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser		
[0438]	1 5 10 15		
[0439]	Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser		
[0440]	20 25 30		
[0441]	Ser Ser Ile Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn		
[0442]	35 40 45		
[0443]	Val Gly Ile Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Gln Ser Pro		
[0444]	50 55 60		
[0445]	Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp		
[0446]	65 70 75 80		
[0447]	Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0448]	85 90 95		
[0449]	Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn		
[0450]	100 105 110		
[0451]	Thr Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0452]	115 120 125		
[0453]	<210> 31		
[0454]	<211> 405		
[0455]	<212> DNA		
[0456]	<213> Mus musculus		
[0457]	<400> 31		
[0458]	atggaatgtta actggatact tcctttatt ctgtcgtaa cctcaggggt ctactcagag 60		
[0459]	gttcagctcc agcagtctgg gactgtgctg acaaggcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120		
[0460]	tgcaggctt ctggctacat ttttaccagc tactggattc actggtaaa acagcggcct 180		
[0461]	ggacagggtc tggaatggat tggcgcttt tatcctggaa atagtgattc taactacaac 240		
[0462]	cagaagttca aggccaaggc caaactgact gcagtcacat ccaccagcac tgcctacatg 300		
[0463]	gagctcagca gcctgacaag tgaggactt gcggtctatt actgtacaaa gctagttggg 360		
[0464]	acgttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcg 405		
[0465]	<210> 32		
[0466]	<211> 381		
[0467]	<212> DNA		

[0468] <213> Mus musculus
[0469] <400> 32
[0470] atggagtcac agactcagg ctgttatac atgttgctgt gttgtctgg tggatgga 60
[0471] gacattgtga tgaccaggc tcaaaaattc atgcctcat caataggaga cagggtcagc 120
[0472] gtcacctgca aggccagtca gaatgtggc attaatgttag ttggatca acagagagca 180
[0473] gggcagtctc ctaaaacact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 240
[0474] cgcttcacag gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 300
[0475] gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacacca atccattcac gttcggctcg 360
[0476] gggacaaagt tggaaataaa a 381

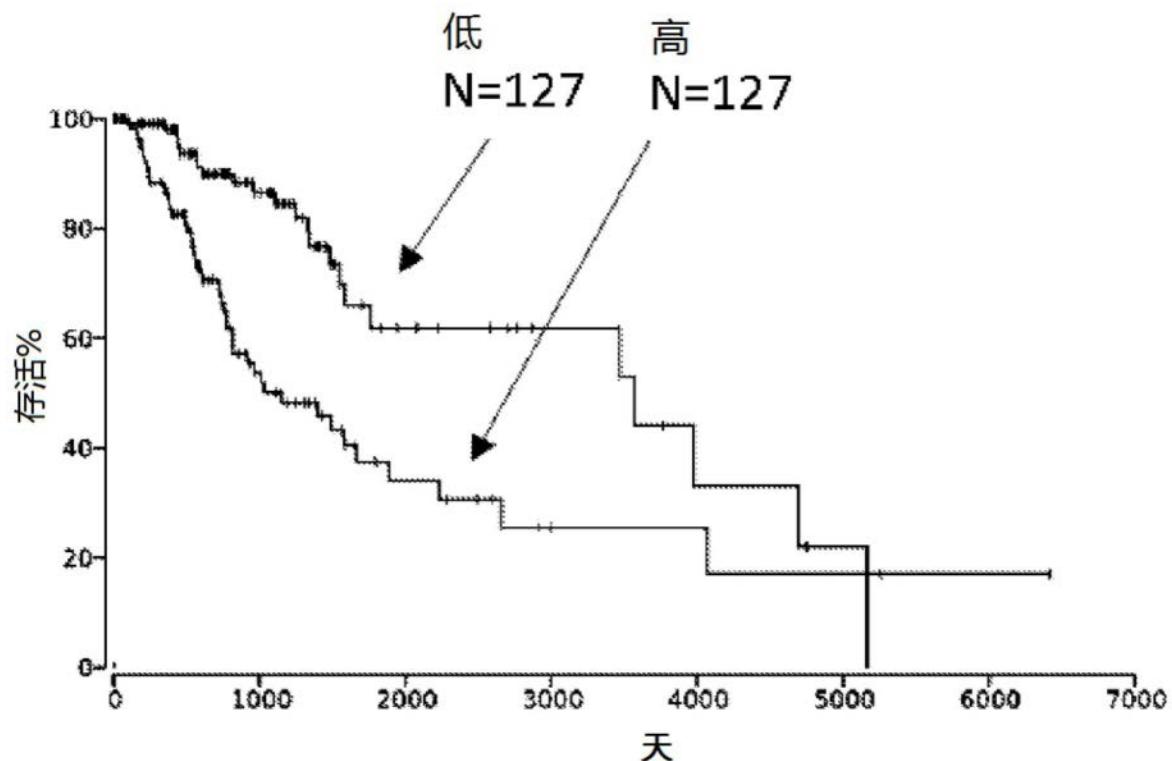


图1A

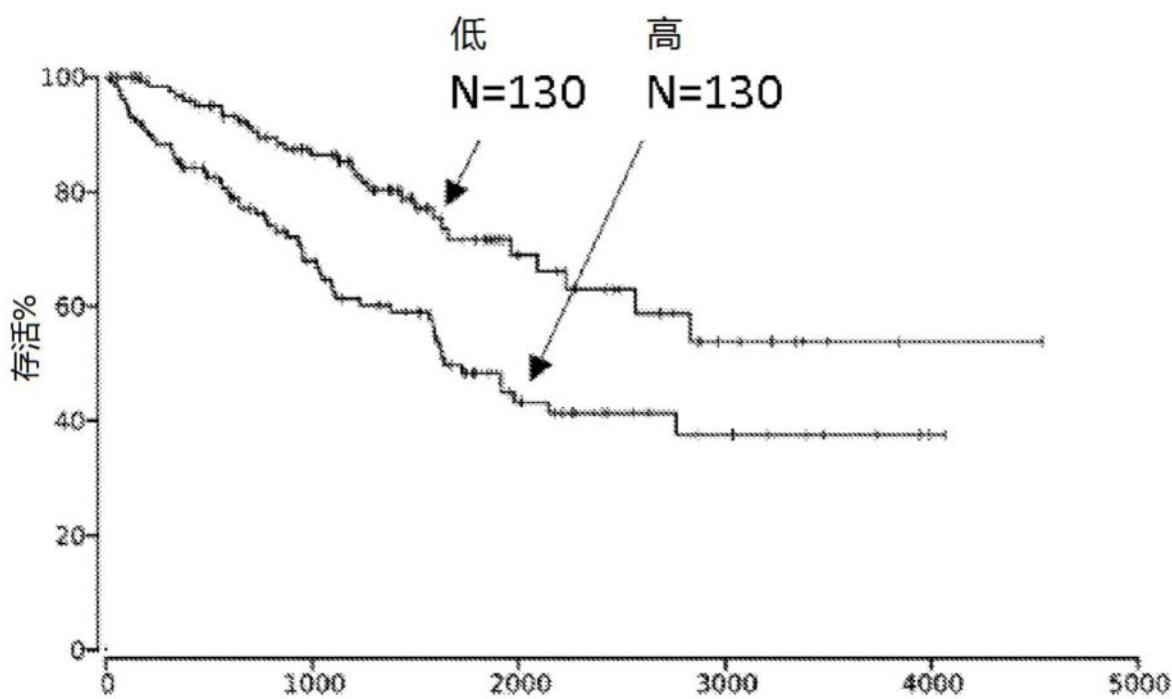


图1B

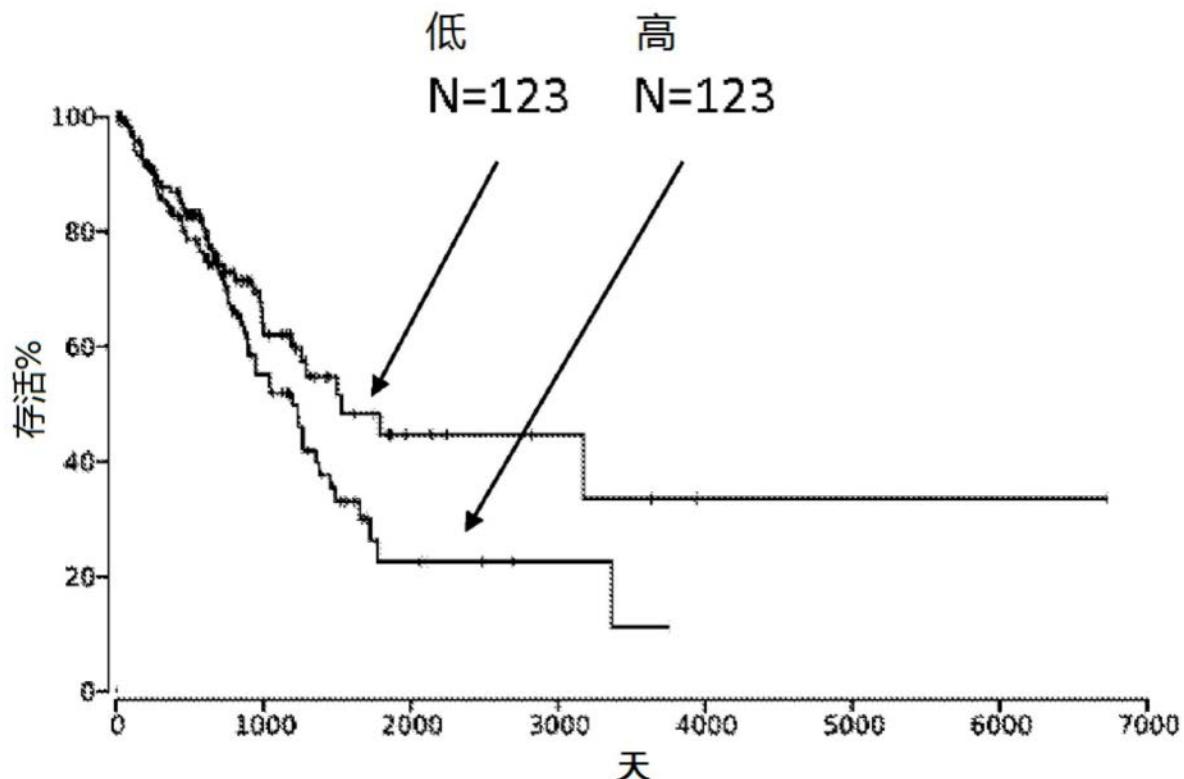


图1C

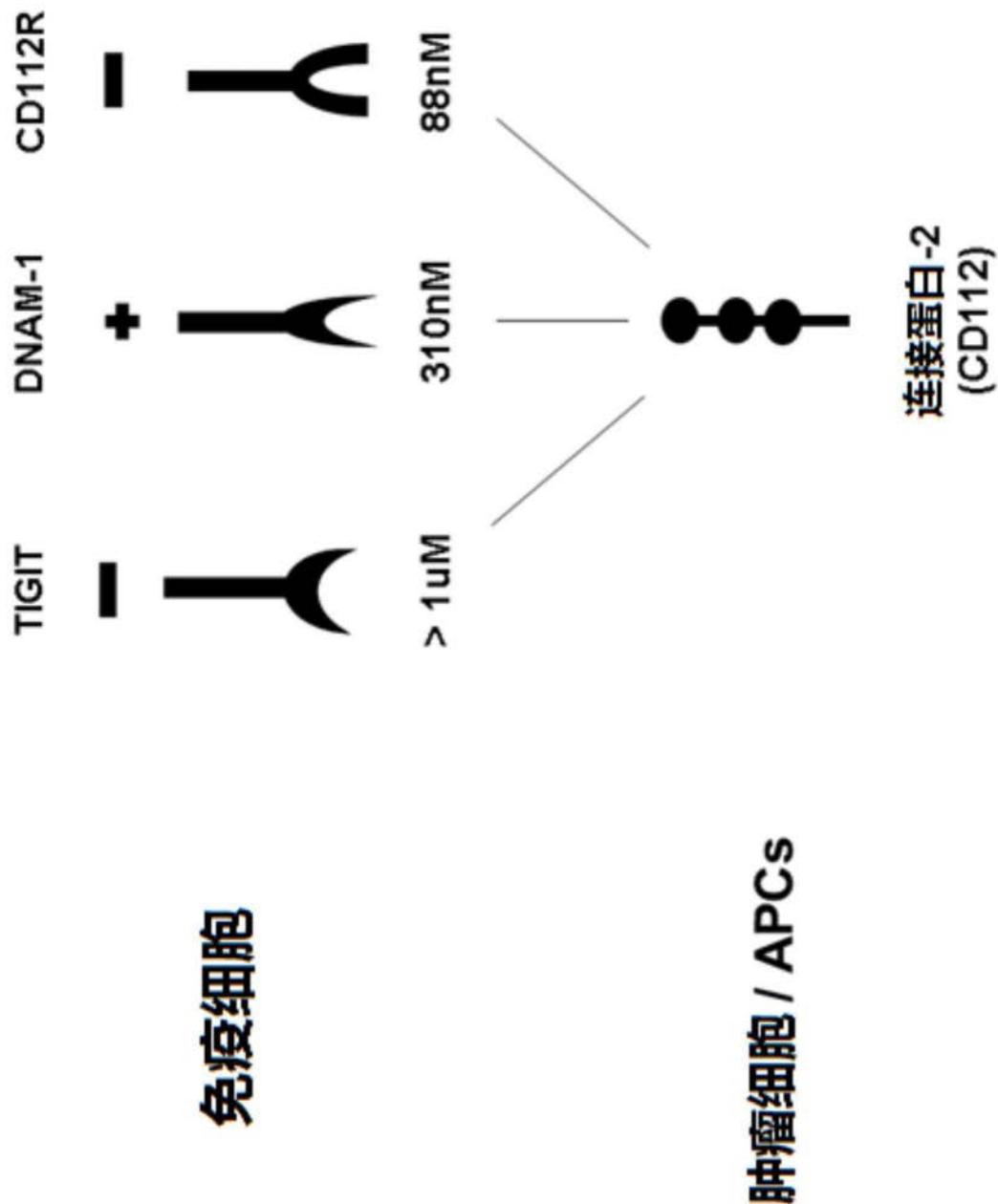


图2

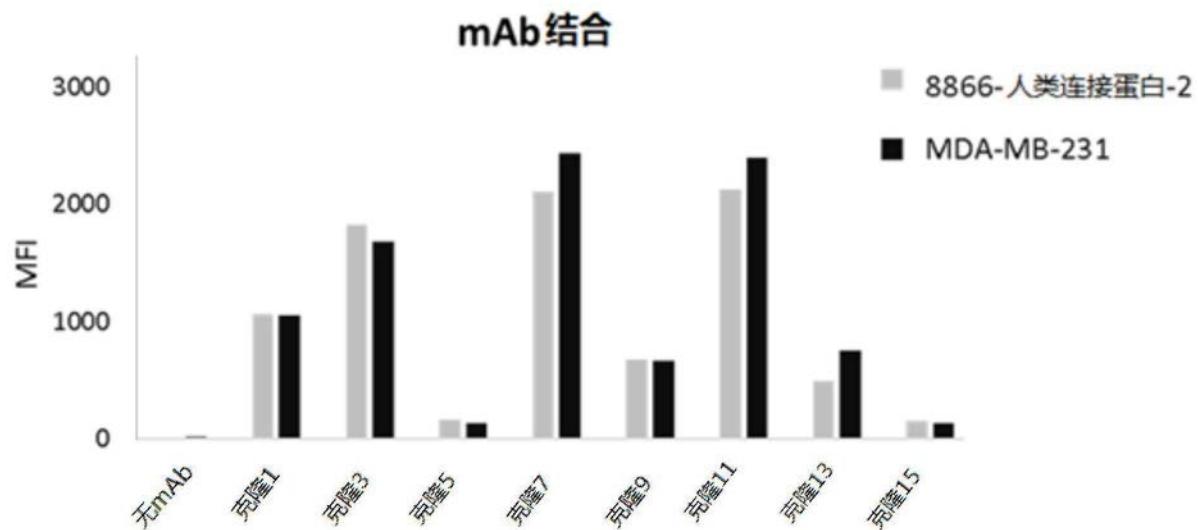


图3A

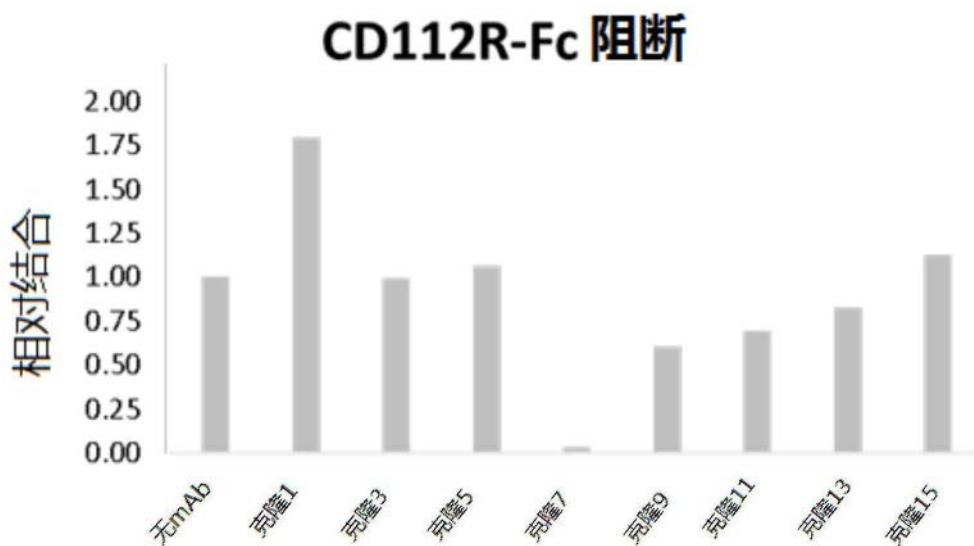


图3B

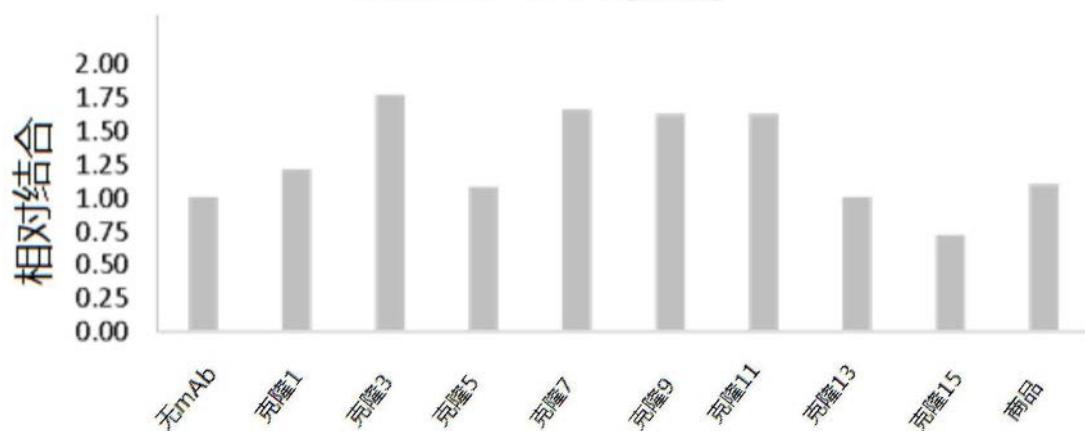
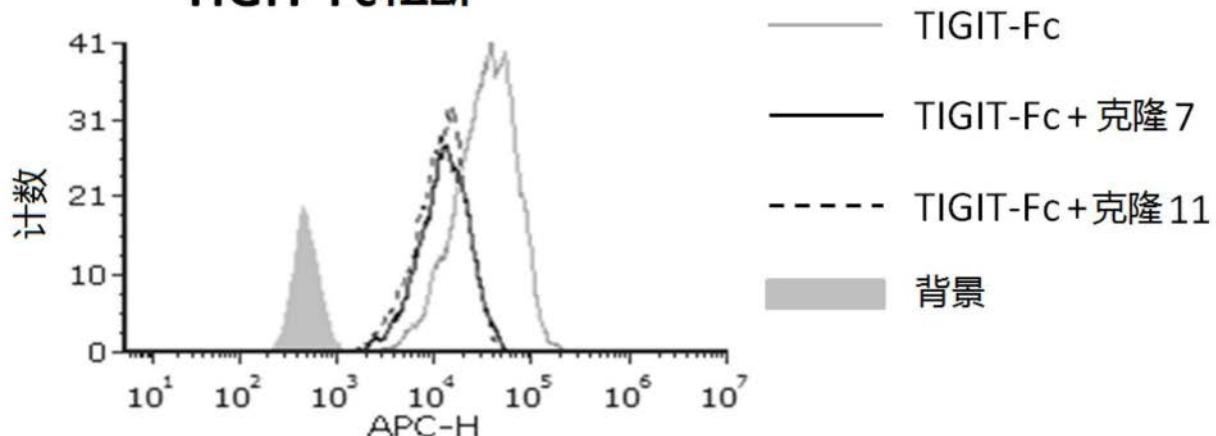
DNAM-1-Fc 阻断**TIGIT-Fc 阻断**

图3D

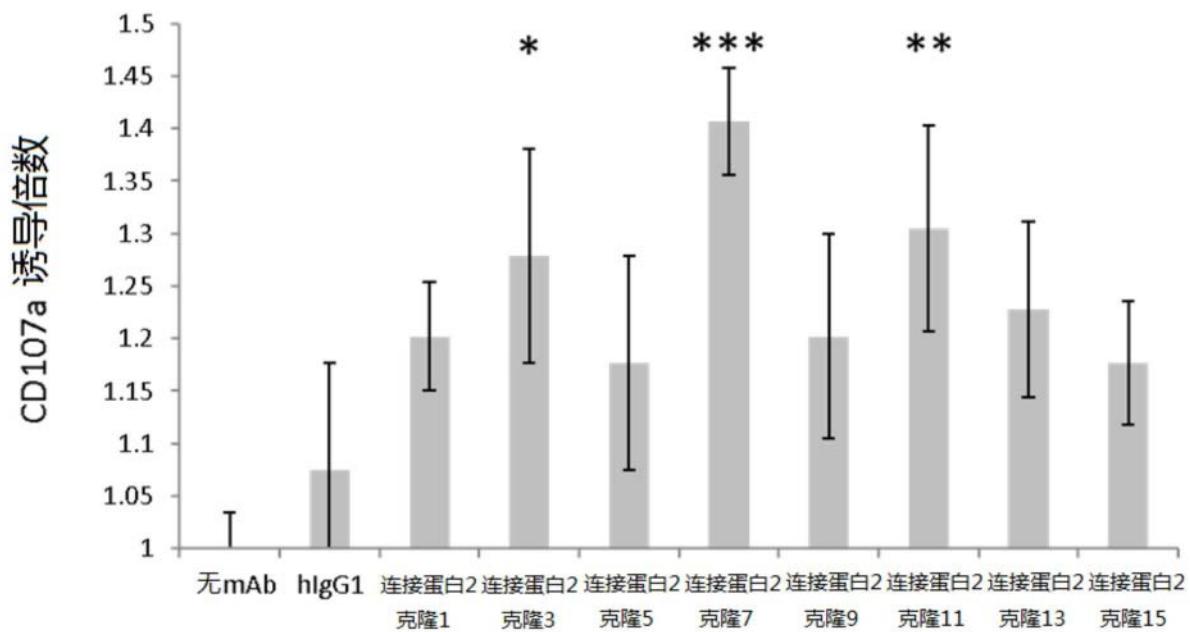
A549

图4A

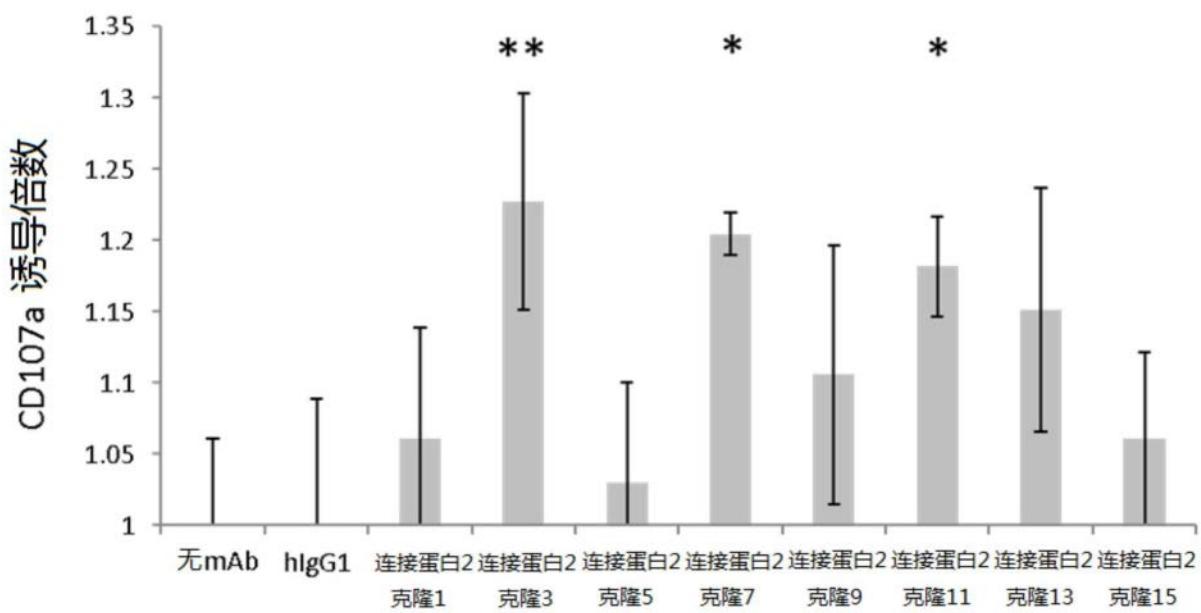
MDA-MB-231

图4B

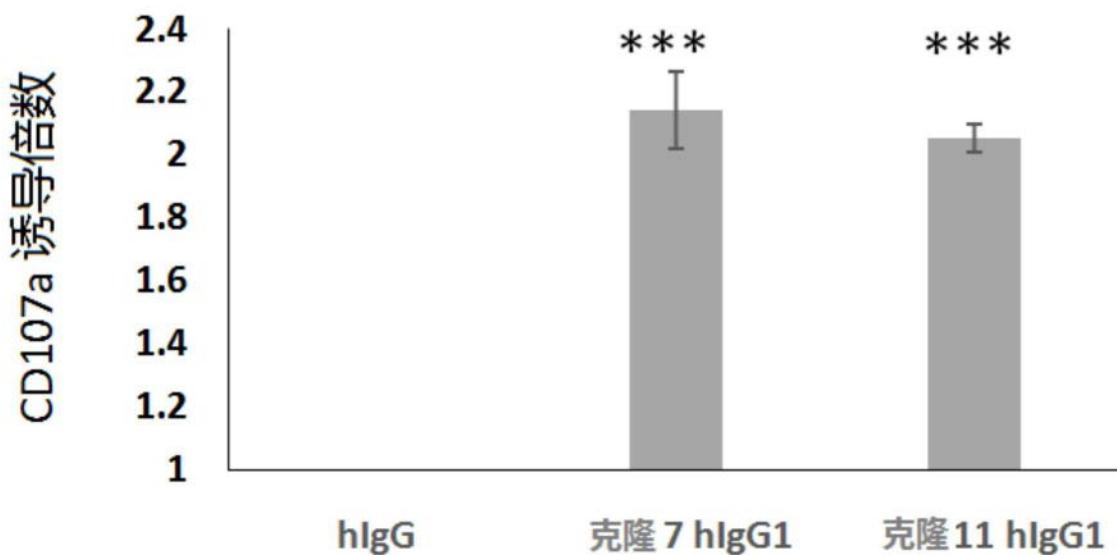
A549

图4C

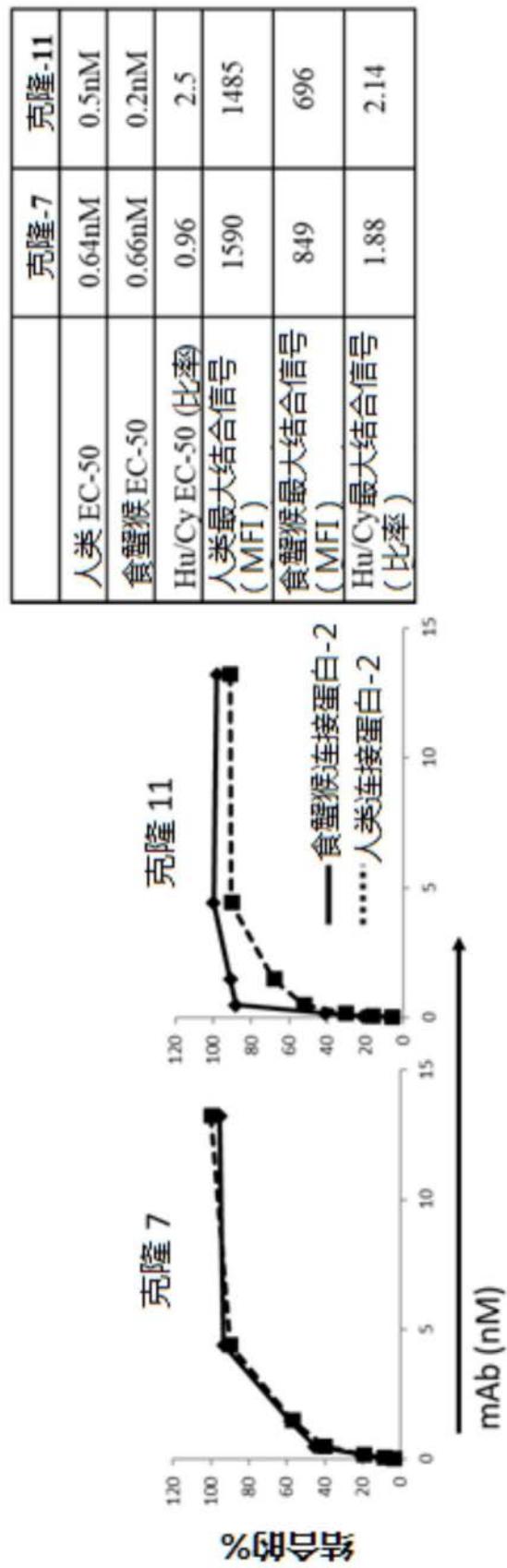


图 5A

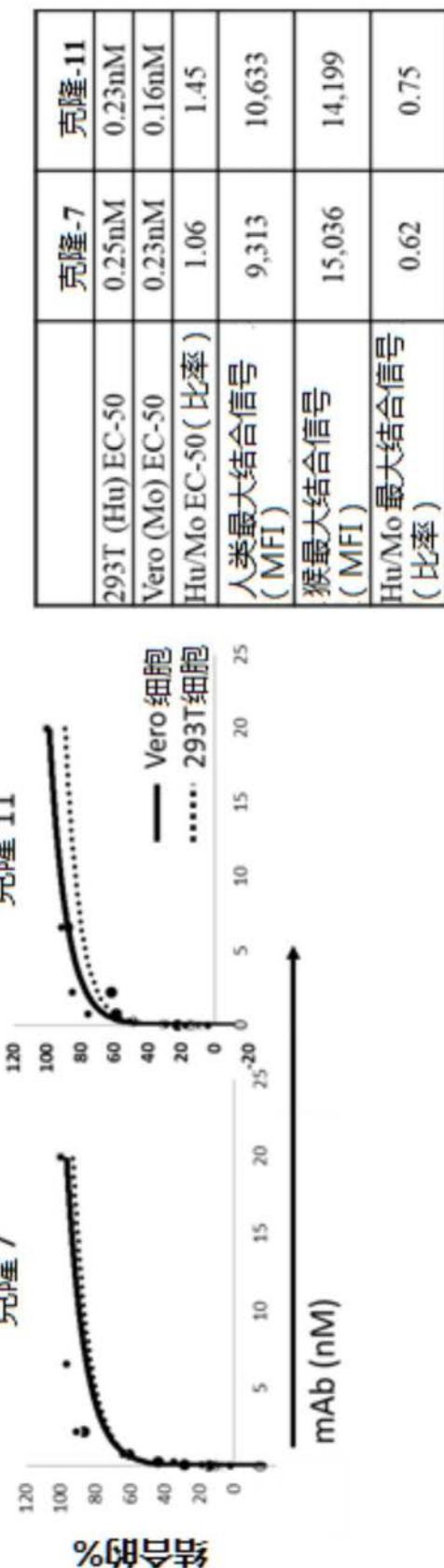


图5B

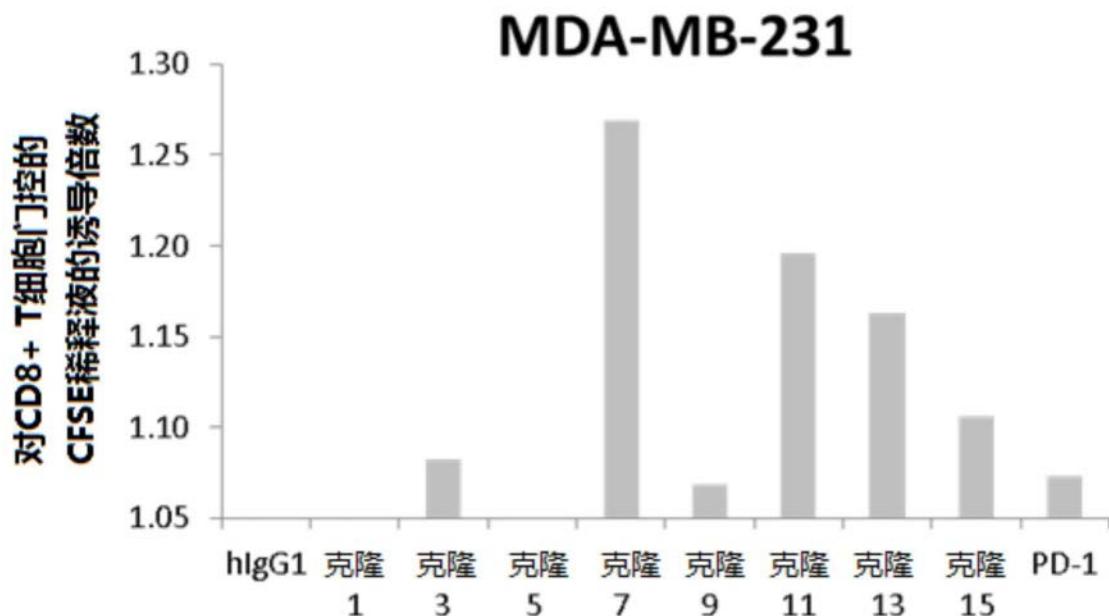


图6A

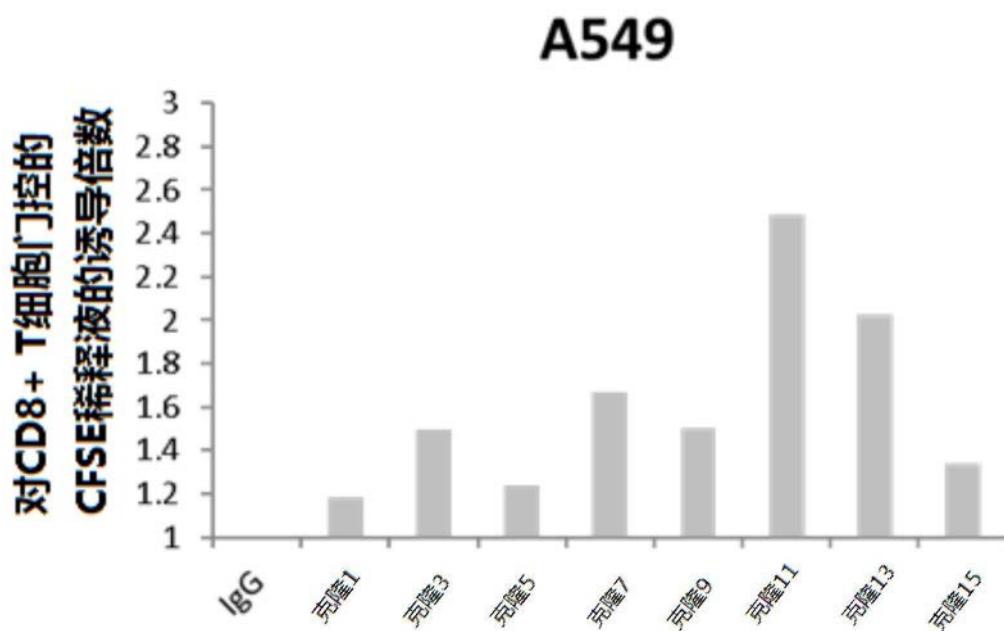


图6B

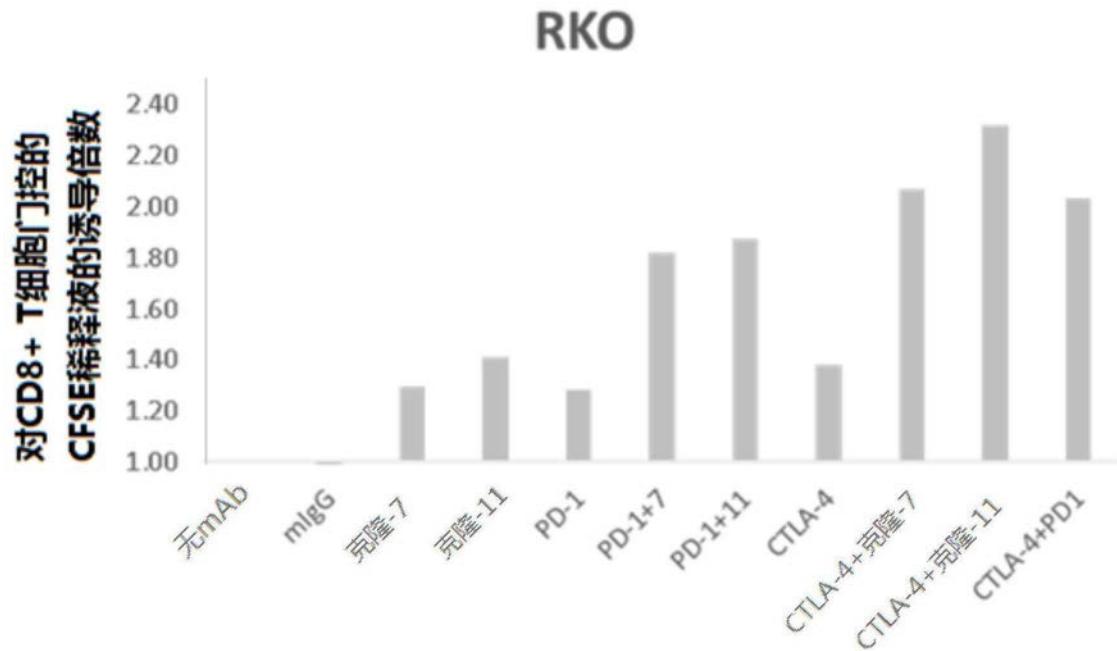


图7A

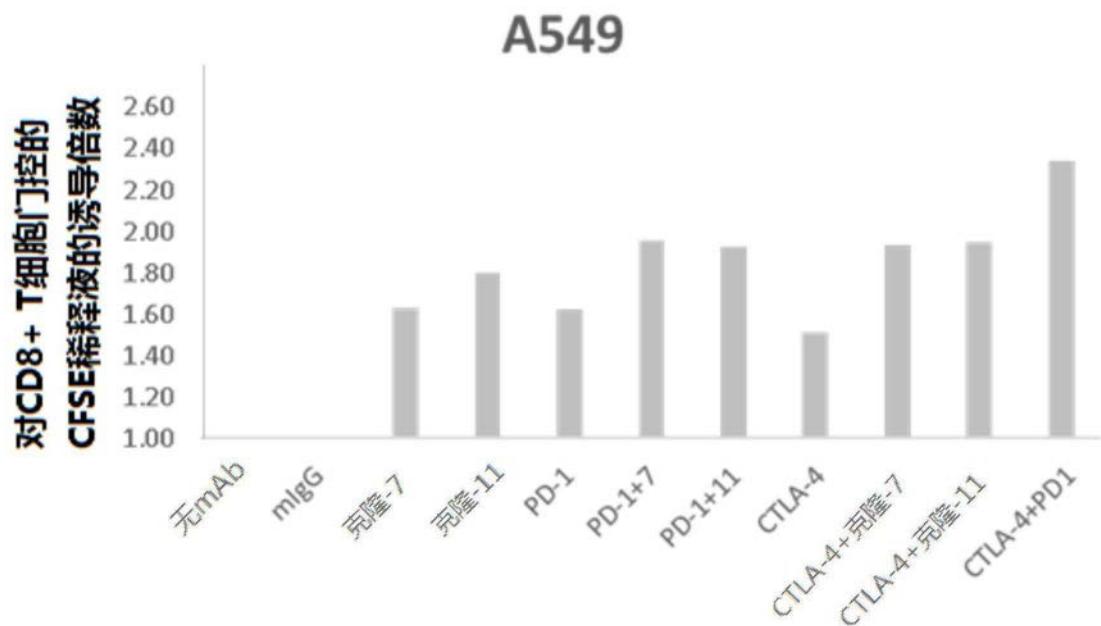


图7B

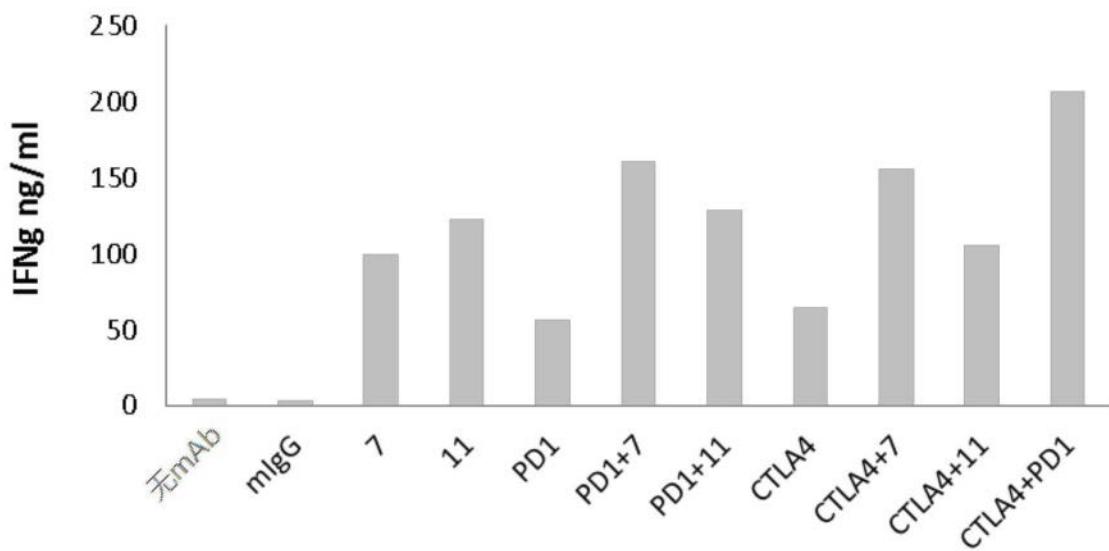
RKO

图8A

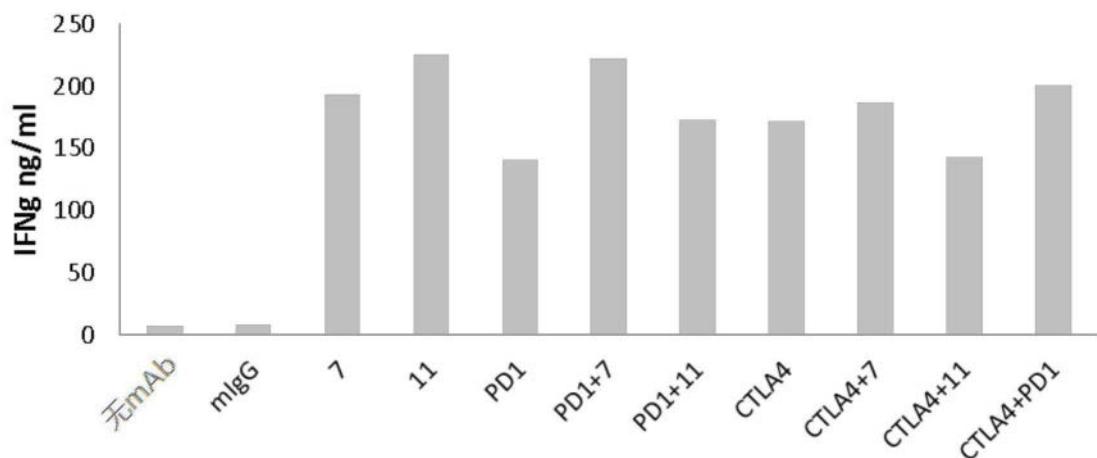
A549

图8B

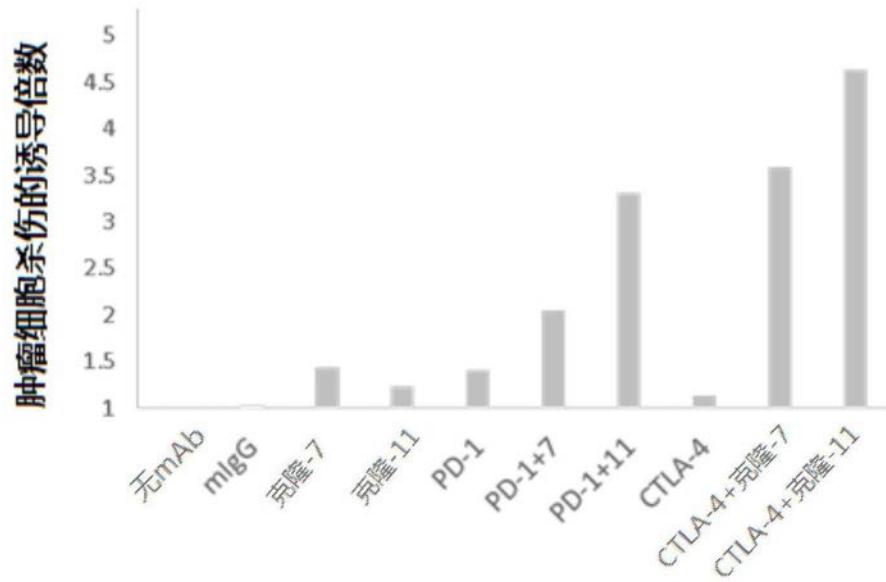
RKO

图9A

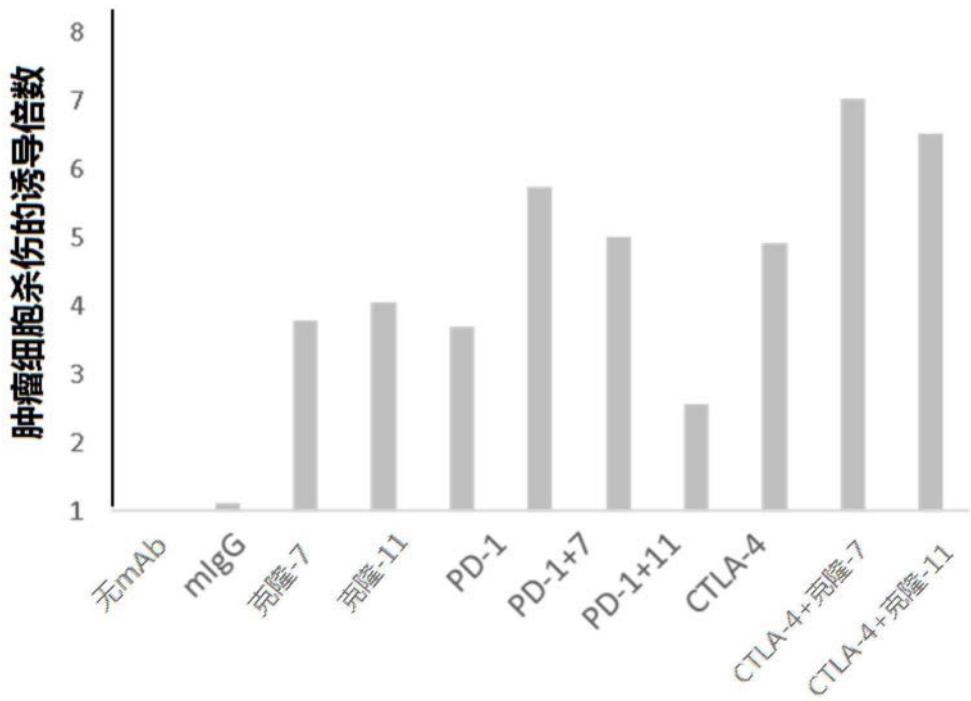
A549

图9B

MDA-MB- 231

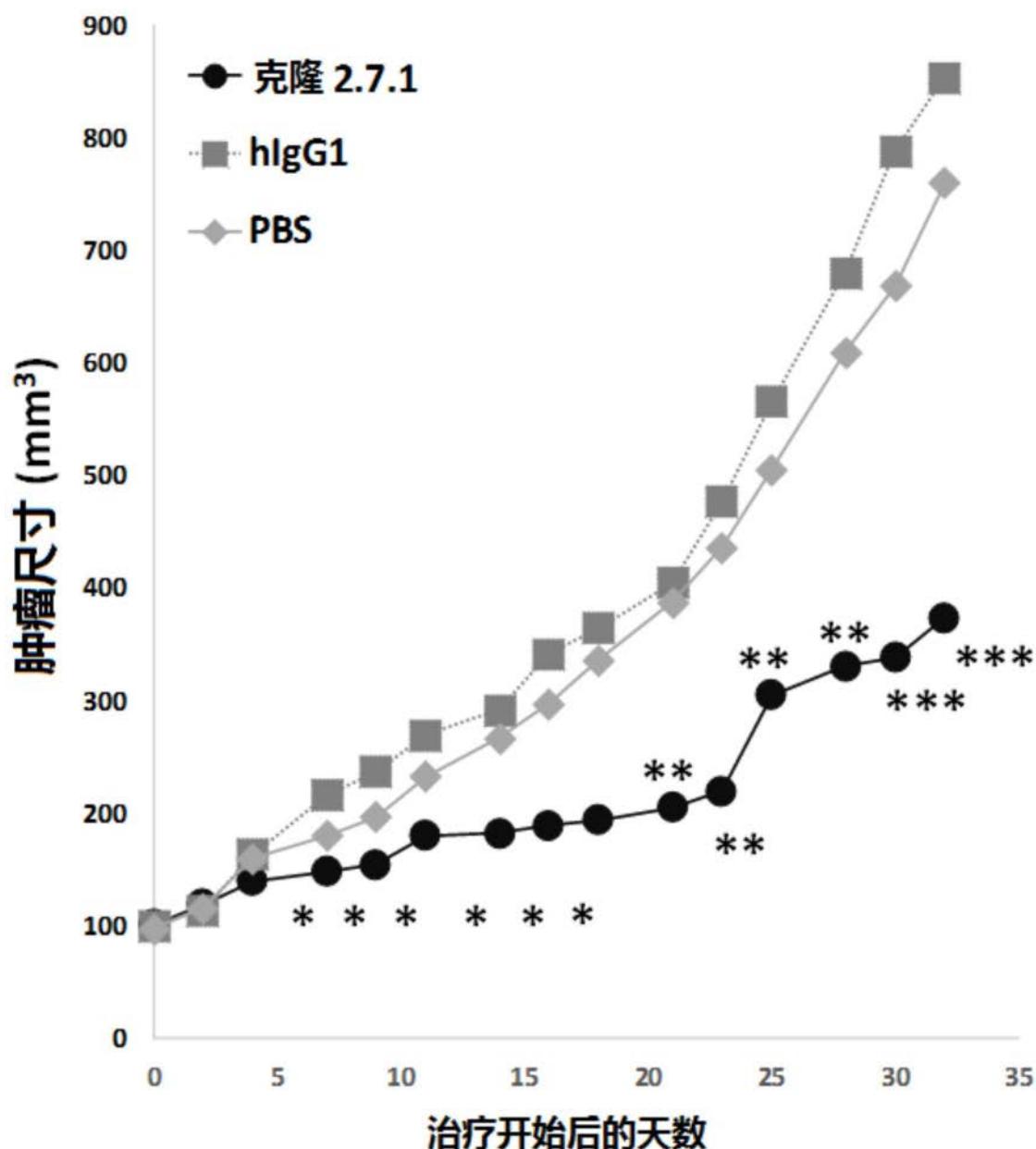


图10

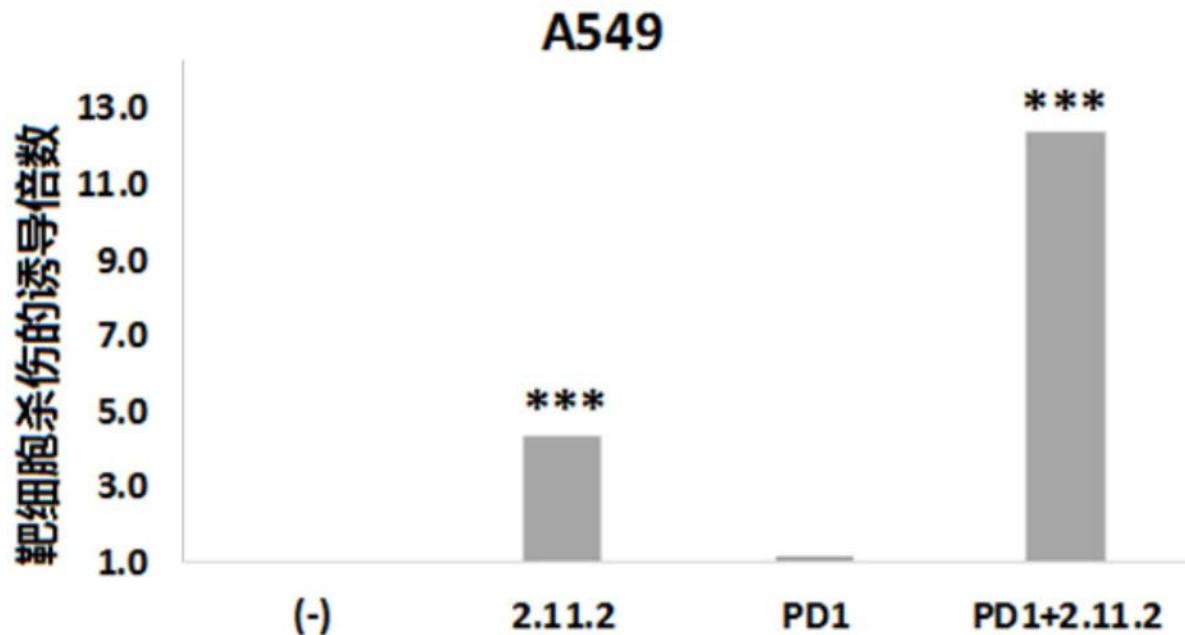


图11A

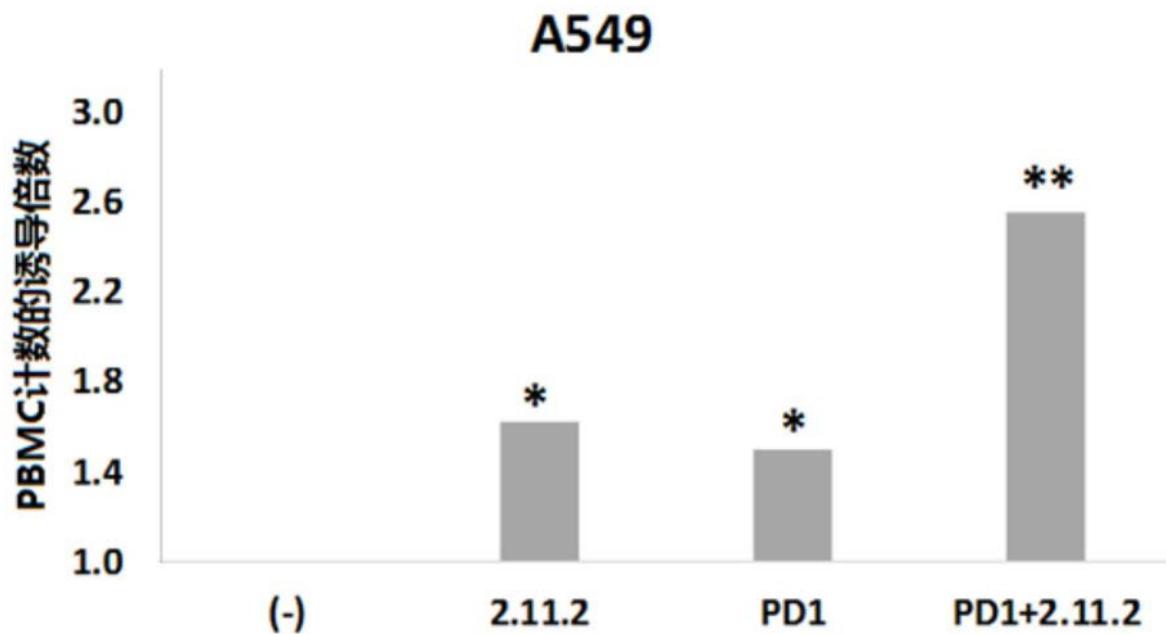


图11B

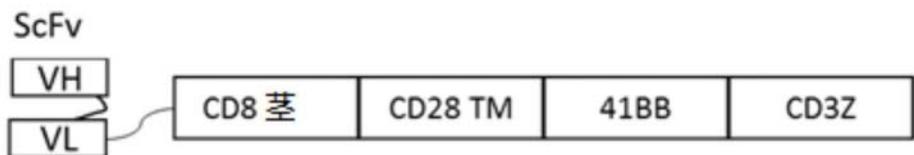


图12A

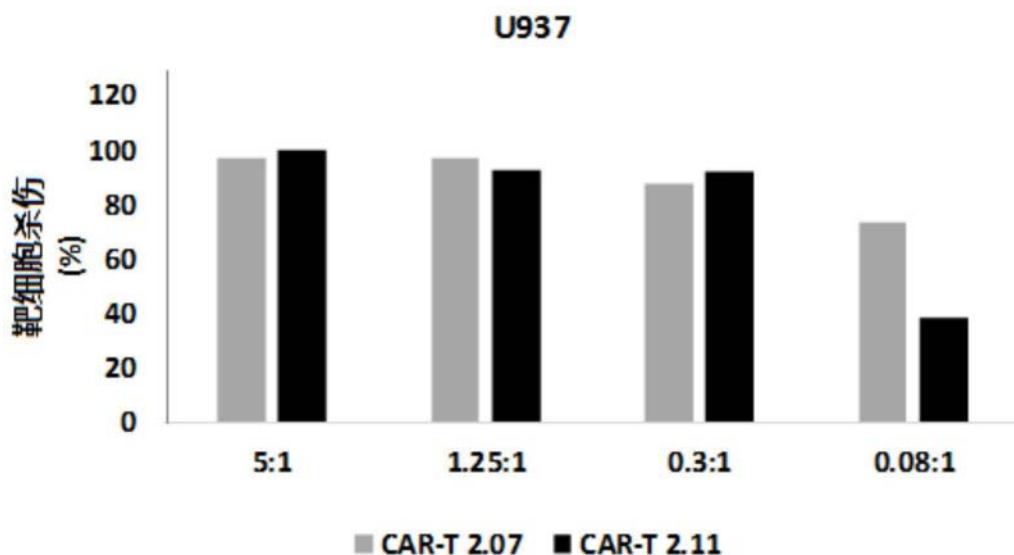


图12B

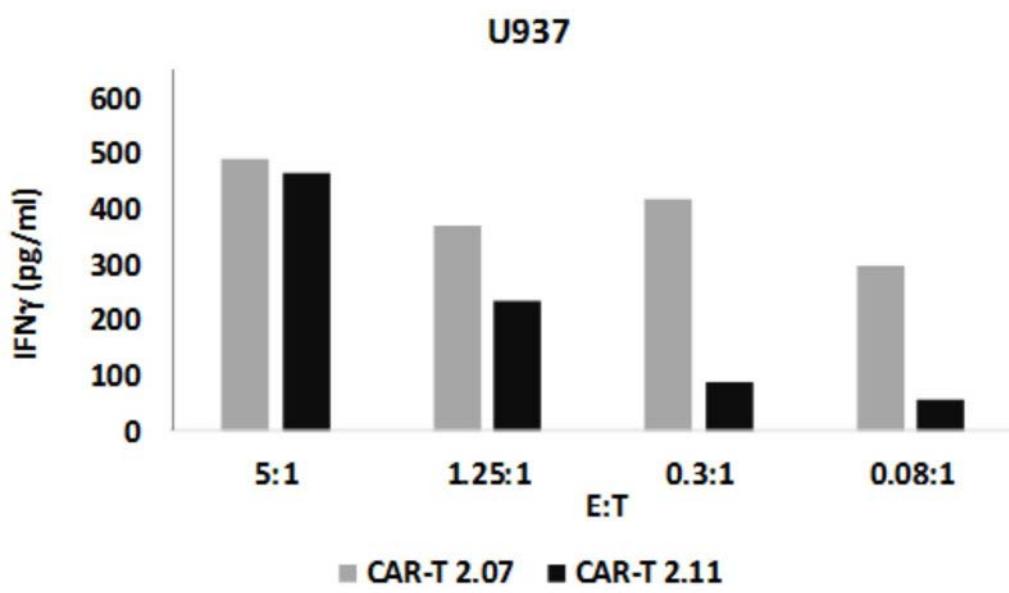


图12C

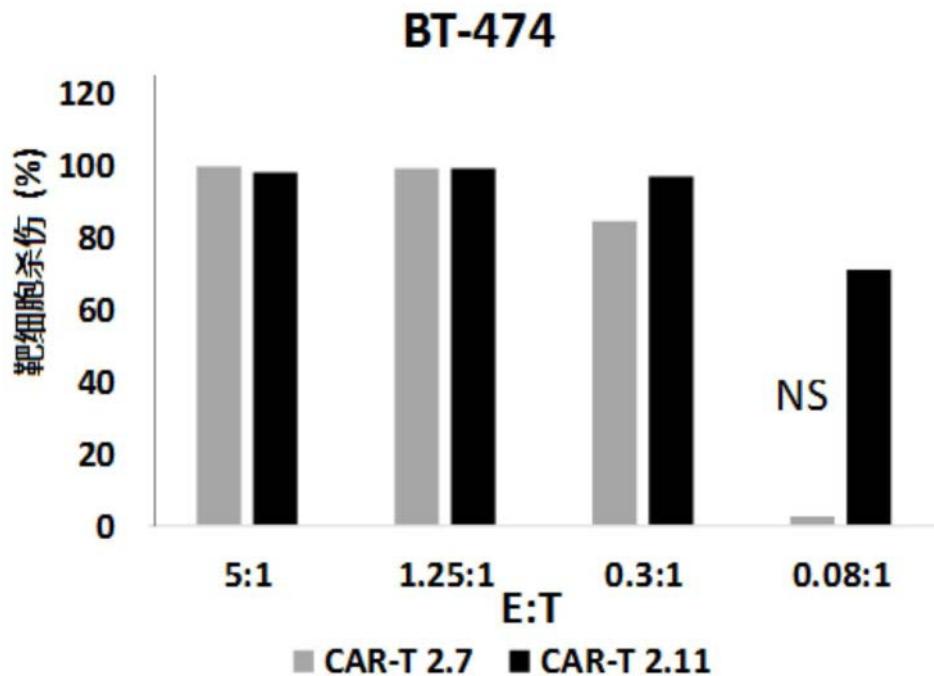


图12D

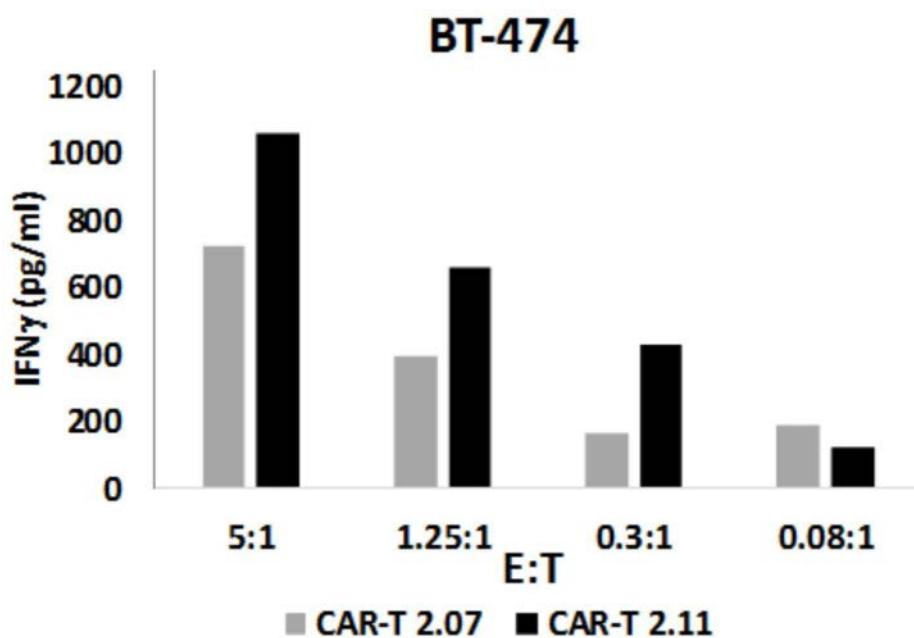


图12E