



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114040800 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202080036935.9

(22) 申请日 2020.04.09

(30) 优先权数据

62/831713 2019.04.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/027498 2020.04.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/210512 EN 2020.10.15

(71) 申请人 阿波科有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州, 牛顿市, 桥街90号,

邮编:02458

(72) 发明人 斯蒂芬诺·文森索·古洛

肯尼斯·埃文·汤普森

(74) 专利代理机构 北京市京师律师事务所

11665

代理人 黄熊

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书5页 说明书38页

序列表31页 附图6页

(54) 发明名称

杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1 (KLRG1) 耗竭抗体

(57) 摘要

受体杀伤细胞凝集素样受体G1 (killer cell lectin-like receptor G1, KLRG1) 在T细胞和NK细胞上表达, 所述KLRG1与上皮细胞和间充质细胞上的配体结合。KLRG1的配体已被描述为E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白。本公开涉及并且产生自结合KLRG1的细胞外结构域 (extracellular domain, ECD) 但不干扰其与配体E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白的相互作用的抗体的探索和表征。所述抗体已经通过小鼠杂交瘤技术得到, 并且可以通过将所述抗体的互补决定区 (complementary determining region, CDR) 移植到人构架中而人源化。所述抗体可用作有效的治疗剂。本公开中提供了各种抗体或此类抗体的抗原结合片段, 以及各种治疗和/或诊断方法以及其他特征。

1. 一种耗竭有需要的受试者中表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域结合的方法,所述方法包括:

向所述受试者递送有效量的抗体或其片段,

其中所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的所述细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1的所述细胞外结构域,从而耗竭所述受试者中表达KLRG1的T细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,

其中所述抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14;和/或

其中所述抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述KLRG1包括人KLRG1或食蟹猴KLRG1。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体或其片段包括单克隆抗体或其片段。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段特异性结合包含至少五个连续氨基酸的表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56) 或其片段。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

7. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

8. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

9. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

10. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

11. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

12. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

13. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

14. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

15. 如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻

链可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

16.如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

17.如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

18.如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包括嵌合抗体或其片段。

19.如权利要求4所述的方法,其中所述单克隆抗体或其片段包括人源化抗体或其片段。

20.一种治疗有需要的受试者中与过量的表达KLRG1的T细胞相关联的疾患的方法,所述方法包括:

向所述受试者递送治疗有效量的抗体或其片段,所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的所述细胞外结构域的结合,并且耗竭表达KLRG1的T细胞,

其中向所述受试者的所述递送耗竭了过量的表达KLRG1的T细胞,

其中所述递送不释放检查点抑制和随后的对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活,从而治疗所述疾患,

其中所述抗体或其片段包含:

重链可变区,所述重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14;并且/或者

其中所述抗体或其片段包含:

轻链可变区,所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

21.如权利要求20所述的方法,

其中所述疾患包括移植疾患,并且

其中向所述受试者的所述递送耗竭了攻击所述受试者中的移植组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。

22.如权利要求20所述的方法,

其中所述疾患包括自身免疫性疾病,并且

其中向所述受试者的所述递送耗竭了攻击所述受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。

23.一种治疗受试者的癌症的方法,其中所述癌症包括表达KLRG1的癌细胞,所述方法包括:

向所述受试者递送治疗有效量的抗体或其片段,所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的所述细胞外结构域的结合,

其中向所述受试者的所述递送耗竭了表达KLRG1的癌细胞,并且

其中所述递送不释放检查点抑制和随后的对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活，

其中所述抗体或其片段包含：

重链可变区，所述重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14；并且/或者

其中所述抗体或其片段包含：

轻链可变区，所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

24. 一种用于治疗受试者中的癌症的辅助疗法，其中所述受试者正在经受检查点疗法，而不管所述癌症是否表达KLRG1，所述辅助疗法包括：

向所述受试者递送治疗有效量的抗体或其片段，所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域，而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的所述细胞外结构域的结合，

其中所述递送耗竭了攻击所述受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞，

其中所述抗体或其片段包含：

重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区；和/或

其中所述抗体或其片段包含：

轻链可变区，所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

25. 一种耗竭混合细胞群中表达KLRG1的细胞的方法，其中所述表达KLRG1的细胞包括选自T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞的一种或多种细胞，所述方法包括：

向所述混合细胞群递送有效量的抗体或其片段，所述抗体或其片段特异性结合KLRG1并耗竭表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞，从而耗竭所述混合细胞群中表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞，

其中所述抗体或其片段包含：

重链可变区，所述重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14；并且/或者

其中所述抗体或其片段包含：

轻链可变区，所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

26. 一种抗体或其片段，所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域，但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1，并且当施用于受试者时耗竭表达KLRG1的细胞。

27. 如权利要求26所述的抗体或其片段，

其中所述抗体或其片段包含：

重链可变区，所述重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14；并且/或者

其中所述抗体或其片段包含：

轻链可变区，所述轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区：SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

28. 如权利要求26所述的抗体或其片段，其中所述KLRG1包括人KLRG1或食蟹猴KLRG1。

29. 如权利要求26所述的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包括单克隆抗体或其片段或衍生物。

30. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段特异性结合包含至少五个连续氨基酸的表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56) 或其片段。

31. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

32. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

33. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

34. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

35. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

36. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

37. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

38. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

39. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

40. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

41. 如权利要求29所述的抗体或其片段，其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变

区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

42. 如权利要求29所述的抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一的序列。

43. 如权利要求29所述的抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包括嵌合抗体或其片段。

44. 如权利要求29所述的抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包括人源化抗体或其片段。

45. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求29所述的单克隆抗体或其片段,以及药学上可接受的载体。

46. 一种试剂盒,所述试剂盒包含如权利要求29所述的单克隆抗体或其片段,以及使用说明。

47. 一种选择性耗竭表达KLRG1的CD8效应T细胞而非初始T细胞或调节性T细胞的方法,所述方法包括:

向受试者递送有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白中的至少一者竞争结合KLRG1的所述细胞外结构域,从而选择性耗竭表达KLRG1的CD8效应T细胞。

## 杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1 (KLRG1) 耗竭抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年4月9日提交的美国临时专利申请号62/831,713的权益,并且该美国临时专利申请的全部内容并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及特异性结合杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1) 的抗体或其抗原结合片段。此类抗体或此类抗体的抗原结合片段可用于各种治疗或诊断目的,包括治疗自身免疫性疾病、癌症和提高疫苗的有效性。

### 背景技术

[0004] 自身免疫和移植

[0005] 细胞损伤发生在许多疾病中,是细胞毒性T细胞攻击的结果。例如,致病性细胞毒性T细胞是发生在疾病包涵体肌炎中的肌肉破坏中的关键要素。细胞毒性T细胞损伤组织的类似机制牵涉其他自身免疫性疾病,诸如多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病、炎症性肠病、自身免疫性甲状腺疾病、1型糖尿病、斑秃、白塞病、强直性脊柱炎和原发性胆汁性肝硬化。

[0006] 类似的损伤机制也存在于实体器官移植,诸如移植物抗宿主病和与CD8+T细胞攻击组织相关联的移植环境中发展的器官排斥中,其中有增加比例的高效力的分化增加的T细胞,诸如T效应记忆 (Teffector memory, TEM) 细胞和T效应记忆RA (T effector memory RA, TEMRA) 细胞。

[0007] 如在PCT申请号PCT/US2017/051776中所述,杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1),一种已知存在于衰老细胞毒性T细胞上的细胞表面标记,已经被本公开的发明人证明也存在于具有高杀伤潜力的细胞毒性T细胞上。例如,在包涵体肌炎的情况下,细胞表面KLRG1标记直接杀伤健康肌细胞的T细胞。与关于小鼠和人类的血液中表达KLRG1的T细胞的衰老性和无活性的先前研究的教导不同,表达KLRG1的T细胞可以是有活性和致病性的,使它们成为细胞耗竭疗法的有利靶标。

[0008] 在一个示例中,此类细胞耗竭疗法包括向有需要的受试者施用有效量的KLRG1耗竭剂(例如,表达KLRG1的细胞的耗竭剂)。KLRG1耗竭剂可靶向KLRG1的细胞外结构域,包括抗体依赖性细胞毒性(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)效应子功能,并且可以消除或减少损伤健康细胞的细胞毒性T细胞和/或NK细胞的数量。

[0009] 施用KLRG1耗竭剂也可有效治疗白血病和淋巴瘤,白血病和淋巴瘤也涉及CD8+T细胞的异常扩增。特别地,T细胞大颗粒淋巴细胞白血病(T cell large granular lymphocytic leukemia, T-LGLL)是一种以晚期分化CD8+T细胞的扩增为特征的白血病,并且NK细胞淋巴增生性疾患是一种以NK细胞扩增为特征的白血病。鼻外NK/T细胞淋巴瘤是一种相关疾患。

[0010] KLRG1是一种II型跨膜蛋白,并且是调节T细胞和NK细胞的活性的共抑制受体。其

细胞外部分含有C型凝集素结构域,C型凝集素结构域的已知配体是钙粘蛋白,并且其细胞内部分含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,ITIM)结构域,该ITIM结构域负责共抑制T细胞受体(T cell receptor, TCR)介导的信号传导。在各种实施方案中,配体可以是E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、R-钙粘蛋白、或它们的组合。

[0011] 与KLRG1的钙粘蛋白配体相关联,KLRG1可以以与许多其他T细胞共抑制受体诸如CTLA-4、PD-1、LAG-3和TIM-3相似的方式作为共抑制受体起作用。因此,KLRG1是免疫疗法诸如癌症免疫疗法的有利靶标。例如,向有需要的受试者施用有效量的KLRG1/配体结合剂可以破坏KLRG1信号传导并激活CD8+细胞毒性T和/或NK细胞。因此,KLRG1/配体结合剂具有许多治疗用途,包括用于治疗癌症,而不管癌症本身是否表达KLRG1。

[0012] 然而,已经观察到,在患有自身免疫性疾病的患者中,使用检查点抑制剂免疫疗法的癌症治疗增加了突发的风险。然而,这些突发与改善的癌症预后相关联。正如Ted Bosworth在2018年6月25日在Rheumatology News上发表的题为“Checkpoint inhibitors in autoimmune disease:More flares,better cancer outcomes”的文章中所指示的,“随着检查点抑制剂的引发,检查点抑制剂主要被提供用于治疗黑素瘤(59%)和非小细胞肺癌(36%),42%的PAD患者发展出了疾病突发。在这些疾病突发中,30%被认为是严重的.....然而,与没有突发或具有免疫相关不良事件的患者相比,那些具有突发或另一免疫相关不良事件的患者具有显著更好的无进展生存期(P=.016)和总生存期(P=.004)”不受理论束缚,本研究表明检查点抑制的释放激活了除了肿瘤特异性外,还具有各种类型的特异性的CD8+细胞毒性T和/或NK细胞,这可能导致在所治疗的患者中引发或重新激活自身免疫性疾病。

[0013] 因此,本领域中需要用于经受检查点疗法的癌症患者的辅助疗法(不管癌症是否表达KLRG1),其中辅助疗法包括使用KLRG1结合剂来耗竭攻击自身组织的致病性T细胞和/或NK细胞,有利的是没有损失针对癌细胞的T细胞和/或NK细胞<sup>1</sup>。

[0014] 因此,本领域中需要治疗患有其中癌细胞表达KLRG1的类型的癌症的患者,其中治疗包括使用KLRG1结合剂来耗竭表达KLRG1的癌细胞,其中KLRG1结合剂不释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活。

#### <sup>1</sup> 申请人的工作实施例 6

[0015]

[0016] 因此,在自身免疫领域中需要使用KLRG1结合剂来耗竭攻击自身组织的致病性T细胞和/或NK细胞,其中KLRG1结合剂不释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T细胞和/或NK细胞的激活。

[0017] 因此,在移植领域中需要使用KLRG1结合剂来耗竭攻击移植组织的致病性T细胞和/或NK细胞,其中KLRG1结合剂不释放检查点抑制和随后对针对移植的或自身的组织或细胞的致病性CD8+细胞毒性T细胞和/或NK细胞的激活。

#### 发明内容

[0018] 受体杀伤细胞凝集素样受体G1(killer cell lectin-like receptor G1,KLRG1)在T细胞和NK细胞上表达,所述KLRG1与上皮细胞和间充质细胞上的配体结合。在T细胞和NK



细胞上表达的KLRG1配体已被描述为E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白。本公开提供了结合KLRG1的细胞外结构域(ECD),但不干扰KLRG1与配体E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白的相互作用的结合剂(诸如抗体)的探索和表征。本文所述的抗体已经通过小鼠杂交瘤技术得到,并且可以通过将所述抗体的互补决定区(CDR)移植到人构架中而人源化。提供用于本文的抗体可用作有效的治疗剂。

[0019] 在许多不同的实施方案中,本文公开了一种在需要耗竭治疗的受试者中耗竭表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合的方法的一个示范性实施方案。该方法包括向受试者递送有效量的抗体或该抗体的片段。抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1的细胞外结构域,从而耗竭受试者中表达KLRG1的T细胞。

[0020] 在一些实施方案中,抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。替代地或另外地,抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

[0021] KLRG1可包含人KLRG1或食蟹猴KLRG1。

[0022] 在一些实施方案中,抗体或其片段可包含单克隆抗体或其片段。在一些此类示例中,单克隆抗体或其片段可特异性结合表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56)或其包含至少五(5)个连续氨基酸的片段。单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。或者,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:11,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:13,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:15,或与该序列大约至少90%同一的序列。

[0023] 在抗体或其片段包含单克隆抗体或其片段的一些实施方案中,单克隆抗体或其片

段可包含嵌合抗体或其片段。在抗体或其片段包含单克隆抗体或其片段的一些实施方案中,单克隆抗体或其片段可以包含人源化抗体或其片段

[0024] 本公开的另一个示例性实施方案提供了一种在需要治疗的受试者中治疗与过量的表达KLRG1的T细胞相关联的疾患的方法。该方法包括向受试者递送治疗有效量的抗体或该抗体的片段,该抗体或该抗体的片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。对受试者的递送耗竭了表达KLRG1的T细胞,并且不释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T细胞和/或NK细胞的激活,从而治疗该疾患。抗体或该抗体的片段包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。另外或替代地,抗体或该抗体的片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

[0025] 在一些实施方案中,所述疾患可以包括移植相关疾患,并且至受试者的递送可耗竭攻击受试者中的移植组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。或者,所述疾患可包括自身免疫性疾病,并且至受试者的递送可耗竭攻击受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。

[0026] 本公开的又一个示例性实施方案提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其中所述癌症包括表达KLRG1的癌细胞。该方法包括向受试者递送治疗有效量的抗体或该抗体的片段,该抗体或该抗体的片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。至受试者的递送耗竭了表达KLRG1的癌细胞,并且该递送不释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活。抗体或该抗体的片段包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。另外或替代地,抗体或该抗体的片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

[0027] 本公开中提供的疗法的一个非限制性示例性实施方案是一种用于治疗受试者的癌症的辅助疗法,其中受试者正在经受检查点疗法。无论癌症是否表达KLRG1,都执行该方法。辅助疗法包括向受试者递送治疗有效量的抗体或该抗体的片段,该抗体或该抗体的片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。该递送耗竭攻击受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。抗体或该抗体的片段包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。另外或替代地,抗体或该抗体的片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

[0028] 本文还公开了一种在混合细胞群中耗竭表达KLRG1的细胞的方法的一个示例性实施方案,其中表达KLRG1的细胞包括选自T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞组成的组的一种或多种细胞。该方法包括向混合细胞群递送有效量的抗体或该抗体的片段,该抗体或该抗

体的片段特异性结合KLRG1并耗竭表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞,从而耗竭混合细胞群中表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞。抗体或该抗体的片段包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。另外或替代地,抗体或该抗体的片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15

[0029] 本公开还提供了抗体或此类抗体的片段的示例性实施方案。抗体或该抗体的片段的一个非限制性示例性实施方案是特异性结合KLRG1的细胞外结构域但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1的抗体或该抗体的片段。当施用于受试者时,抗体或该抗体的片段会耗竭表达KLRG1的细胞。

[0030] 在一些实施方案中,抗体或该抗体的片段可包含重链可变区,该重链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、或SEQ ID NO:14。另外或替代地,抗体或该抗体的片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含以下氨基酸序列的三个互补决定区:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。

[0031] 抗体或该抗体的片段可使得KLRG1包含人KLRG1或食蟹猴KLRG1。

[0032] 抗体或该抗体的片段可包含单克隆抗体或其片段或衍生物。在一些此类示例中,单克隆抗体或其片段可特异性结合表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56) 或其包含至少五(5)个连续氨基酸的片段。单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。或者,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:11,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:13,或与该序列大约至少90%同一的序列。进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与该序列大约至少90%同一的序列。更进一步替代地,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:15,或与该序列大约至少90%同一的序列。

[0033] 在抗体或其片段包含单克隆抗体或其片段的一些实施方案中,单克隆抗体或其片段可包含嵌合抗体或其片段。在抗体或其片段包含单克隆抗体或其片段的一些实施方案

中,单克隆抗体或其片段可以包含人源化抗体或其片段。

[0034] 本领域技术人员应理解,上面提供的限制中的许多限制可适用于示例性实施方案中的每个示例性实施方案,以及本公开中所提供的其他实施方案。作为非限制性示例,在本公开提供的实施方案中的任何实施方案中,单克隆抗体或其片段可包含人源化抗体或其片段、或嵌合抗体或其片段

[0035] 本公开还提供了示例性药物组合物。在一个非限制性示例性实施方案中,药物组合物包含如本文所公开的抗体或该抗体的片段、单克隆抗体或该抗体的片段、或此类抗体或片段的衍生物(例如,上文所述或在本公开中诸如在权利要求29中以其他方式提供的抗体)中的一者或多者,以及药学上可接受的载体。

[0036] 本公开还提供了示例性试剂盒。在一个非限制性的示例性实施方案中,试剂盒包含如本文所公开的抗体或该抗体的片段、单克隆抗体或该抗体的片段、或此类抗体或片段的衍生物(例如,上文描述或本公开中诸如在权利要求29中以其他方式提供的抗体)和使用说明。

### 附图说明

[0037] 从以下结合附图的详细描述将更全面地理解本公开,在附图中:

[0038] 图1提供了ABC\_G1D03的结合表位的肽图谱的一个示例性实施方案,示出了抗体与由氨基酸“PLNFSRI”(SEQ ID NO:56)定义的肽序列的结合;

[0039] 图2提供了KLRG1(20)与源自PDB晶体结构3ff7的E-钙粘蛋白(3)结合的三维表示,其中第一高亮显示区域(40)对应于KLRG1上由氨基酸“PLNFSRI”(SEQ ID NO:56)定义的ABC\_G1D03的结合位点,并且第二高亮显示区域(50)对应于在KLRG1与E-钙粘蛋白之间的结合界面;

[0040] 图3提供了示出CD8+人T细胞上的非阻断KLRG1阻断抗体的活性的表格和结果图;与KLRG1阻断抗体(mAb23)相比,非阻断抗体具有低刺激人CD8 T细胞中的干扰素 $\gamma$ 释放的活性;

[0041] 图4提供了示出T细胞亚群上的KLRG1表达的图表,其中与初始T细胞(TN和TCM)相比,KLRG1在效应T细胞(TEM和TEMRA)上差异表达,所述效应T细胞是CCR7<sup>-</sup>,所述初始T细胞是CCR7<sup>+</sup>;

[0042] 图5提供了对来自非人灵长类全血的CD8 T细胞的流式细胞术分析,高亮显示了ABC-HG1D03对KLRG1<sup>+</sup>T细胞的耗竭效应;值得注意的是,KLRG1阳性细胞对应于效应表型,并且ABC-HG1D03导致该隔室的完全但选择性的耗竭;

[0043] 图6提供了示出ABC-HG1D03对非人灵长类动物中的%KLRG1<sup>+</sup>CD8 T细胞的剂量依赖性效应的图表;和

[0044] 图7提供了示出ABC-HG1D03在非人灵长类动物中的调节性T细胞节约(sparing)效应的图表。

### 具体实施方式

[0045] 现在将描述某些示例性实施方案以提供对本文所公开的抗体、其片段、物质组合物、试剂盒以及相关方法和疗法的结构、功能、制造和用途的原理的整体理解。本领域的技

术人员应理解,本文所述和附图中示出的公开内容是非限制性的示例性实施方案,并且本公开的范围仅由权利要求限定。结合一个示例性实施方案说明或描述的特征可以与其他实施方案的特征组合。此类修改和变化旨在被包括在本公开的范围之内。

[0046] 杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1) 是一种II型跨膜蛋白,其可通过调节T细胞和NK细胞的活性而用作共抑制受体。KLRG1的细胞外部分含有C型凝集素结构域,C型凝集素结构域的已知配体是钙粘蛋白。KLRG1的细胞内部分含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (immunoreceptor tyrosinebased inhibitory motif,ITIM) 结构域,该ITIM结构域负责共抑制T细胞受体 (TCR) 介导的信号传导。KLRG1配体包括E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、R-钙粘蛋白以及它们的组合。

[0047] 受体杀伤细胞凝集素样受体G1 (killer cell lectin-like receptor G1,KLRG1) 在T细胞和NK细胞上表达,所述KLRG1与上皮细胞和间充质细胞上的配体结合。KLRG1的配体可以是E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白。

[0048] 在人类中,KLRG1表达通常局限于免疫系统的细胞,特别是CD8阳性T细胞、NK细胞,以及在较小程度上CD4阳性T细胞。KLRG1表达已经与晚期分化表型相关联。当抗原特异性T细胞分化时,它们可获取细胞毒性分子的增加表达,并且因此可具有增加的细胞毒性潜力。

[0049] 本公开至少部分基于在PCT申请号PCT/US2017/051776中描述的探索—KLRG1,一种已知存在于衰老细胞毒性T细胞上的细胞表面标记,也存在于具有高杀伤潜力的细胞毒性T细胞上。例如,在包涵体肌炎的情况下,KLRG1可标记直接杀伤健康肌细胞的T细胞。

[0050] 因此,表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞可以是致病性的,并且因此是细胞耗竭疗法的有利靶标。例如,向有需要的受试者施用有效量的具有抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 效应子功能的KLRG1耗竭剂 (例如,表达KLRG1的细胞耗竭剂),可以消除或减少损伤健康细胞的细胞毒性T细胞和/或NK细胞的数量,例如在自身免疫性疾病和移植疾患中。

[0051] 包括施用表达KLRG1的细胞耗竭剂的方法在治疗具有表达KLRG1的癌细胞的患者中也是有利的。

[0052] 明显地,本文公开的表达KLRG1的细胞耗竭剂具有不中断KLRG1作为由E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、R-钙粘蛋白或它们的组合与KLRG1的细胞外结构域的结合介导的淋巴细胞共抑制受体功能的额外特性。

[0053] 细胞表面KLRG1的突出生物学功能是通过用作淋巴细胞共抑制受体来抑制细胞毒性T细胞和/或NK细胞的细胞毒性和增殖。淋巴细胞共抑制受体响应于激活信号,诸如在主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex,MHC) 的情境中与T细胞受体 (TCR) 结合的抗原肽调节适应性免疫系统 (例如,T细胞和NK细胞) 的作用。本领域中已知的其他共抑制受体包括PD-1、LAG-3、TIM-3和CTLA4。共抑制受体的作用通常可通过以下方式进行:将配体与共抑制受体的细胞外结构域结合,随后通过位于共抑制受体的细胞内结构域中的基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 募集细胞内磷酸酶。共抑制受体的作用通常是抑制TCR衔接的免疫应答。

[0054] 通过不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合,可以维持KLRG1作为淋巴细胞共抑制受体的功能。因为KLRG1结合剂不释放检查点抑制,所以可以维持对潜在致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞活化的抑制。

[0055] 因此,本文所公开的KLRG1耗竭剂和相关方法不仅耗竭受试者中表达KLRG1的T细

胞和/或NK细胞,而且另外不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。受试者中表达KLRG1的T细胞和/或表达KLRG1的NK细胞和/或表达KLRG1的癌细胞的靶向耗竭可以由KLRG1特异性抗体或其抗原结合片段的Fc区和/或由与其KLRG1特异性抗原结合片段缀合的Fc肽和/或由与KLRG1特异性抗体或其抗原结合片段缀合的细胞毒性剂来介导。国际专利申请公开号WO 02/44215描述了结合分子,所述结合分子包含或由抗体的抗原结合位点和肽结合Fc效应分子组成。

[0056] 本公开的选定实施方案

[0057] 本文公开了在需要治疗的受试者中耗竭表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合的方法。本文提供的方法包括向需要治疗的受试者递送有效量的KLRG1耗竭剂(诸如抗体或其片段),该KLRG1耗竭剂特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争与KLRG1的细胞外结构域的结合,从而耗竭受试者中表达KLRG1的T细胞。

[0058] 本文还公开了选择性耗竭表达KLRG1的CD8效应T细胞,而不是初始T细胞或调节性T细胞的方法,所述方法包括向受试者递送有效量的抗体或其片段,使得所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白中的至少一者竞争与KLRG1的细胞外结构域的结合,从而选择性耗竭表达KLRG1的CD8效应T细胞。

[0059] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。

[0060] 在所述方法的一些实施方案中,KLRG1可以是人KLRG1或食蟹猴KLRG1。

[0061] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包括单克隆抗体或其片段或衍生物。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可特异性结合表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56)或其包含至少五(5)个连续氨基酸的片段。单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。11. 在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与

该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包括嵌合抗体或其片段。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包括人源化抗体或其片段。

[0062] 本文公开了在需要治疗的受试者中治疗与过量或不希望的表达KLRG1的T细胞相关联的疾患的方法,其中所述方法包括向受试者递送治疗有效量的KLRG1耗竭剂。KLRG1耗竭剂可包括抗体或其片段,所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合,并且可耗竭表达KLRG1的T细胞,其中向受试者的递送耗竭了过量的或不希望的表达KLRG1的T细胞。此类递送可以某种方式执行,使得递送不会释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活,从而治疗疾患。

[0063] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。在所述方法的一些实施方案中,所述疾患可以是移植相关疾患,其中向受试者的递送耗竭了攻击受试者中的移植组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。在所述方法的一些实施方案中,所述疾患可以是自身免疫性疾病,其中向受试者的递送耗竭了攻击受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。

[0064] 本文公开了治疗受试者的癌症的方法,其中所述癌症包括表达KLRG1的癌细胞。所述方法可包括向受试者递送治疗有效量的KLRG1耗竭剂,诸如抗体或其片段,所述KLRG1耗竭剂特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。向受试者的递送可耗竭表达KLRG1的癌细胞,并且所述递送可以这样做,与此同时不释放检查点抑制和随后对针对自身组织的致病性CD8+细胞毒性T和/或NK细胞的激活。

[0065] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。

[0066] 本文公开了用于治疗受试者,诸如正在进行检查点疗法的受试者的癌症的辅助疗法。无论癌症是否表达KLRG1,都可以执行所述方法。所提供的辅助疗法可包括向受试者递送治疗有效量的KLRG1耗竭剂,诸如抗体或其片段,所述KLRG1耗竭剂特异性结合KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合。

合。向受试者的递送可耗竭攻击受试者中的自身组织的表达KLRG1的致病性T细胞和/或NK细胞。

[0067] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。

[0068] 本文公开了耗竭混合细胞群中表达KLRG1的细胞的方法。表达KLRG1的细胞可包括选自自由T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞组成的组的一种或多种细胞。所述方法可包括向混合细胞群递送有效量的KLRG1耗竭剂,诸如抗体或其片段,所述KLRG1耗竭剂特异性结合KLRG1并耗竭表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞,从而耗竭混合细胞群中表达KLRG1的T细胞和/或NK细胞和/或癌细胞。

[0069] 在所述方法的一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。

[0070] 本文公开了KLRG1耗竭剂,所述KLRG1耗竭剂特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1,并且当施用于受试者时耗竭表达KLRG1的细胞。KLRG1耗竭剂可包括抗体或其片段,所述抗体或其片段特异性结合KLRG1的细胞外结构域,但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1,并且当施用于受试者时耗竭表达KLRG1的细胞。

[0071] 在一些实施方案中,该抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的三个互补决定区;和/或该抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15的氨基酸序列的三个互补决定区。在一些实施方案中,KLRG1可以是人KLRG1或食蟹猴KLRG1。在一些实施方案中,抗体或其片段可包括单克隆抗体或其片段或衍生物。在一些实施方案中,单克隆抗体或其片段可特异性结合表位PLNFSRI (SEQ ID NO:56) 或其包含至少五(5)个连续氨基酸的片段。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区可包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区可包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少



90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或与该氨基酸序列大约至少90%同一的序列。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包括嵌合抗体或其片段。在一些方面中,单克隆抗体或其片段可包括人源化抗体或其片段。本文公开了药物组合物,所述药物组合物包含上述单克隆抗体或其片段中的一者或多者,以及药学上可接受的载体。鉴于本公开,本领域技术人员将理解可以使用的各种药学上可接受的载体,包括但不限于(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末黄芪胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂用蜡;(9)油类,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;(21)组氨酸缓冲溶液;和(21)药物制剂中所采用的其他无毒相容物质。本文还公开了试剂盒,所述试剂盒可包含上述单克隆抗体或其片段中的一者或多者,以及使用说明。应当理解的是,在本文所用的术语“片段”的程度上,无论是否使用术语“一个或多个片段”,片段也可以是多于一个片段。

#### [0072] 定义

[0073] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语与本公开所属领域的技术人员通常理解的含义相同。本文在本公开的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且并非旨在限制本公开和本文所述或以其他方式提供的任何发明。

[0074] 根据37C.F.R§1.822和既定的用法两者,氨基酸在本文中用单字母的代码或三字母代码表示。

[0075] 本文引用的所有出版物、专利申请、专利、专利公开和其他参考文献的全文针对与提及引用文献的句子和/或段落相关的教导而以引用方式并入。

[0076] 如在本公开和所附权利要求的描述中所使用的,除非上下文清楚地另外指出,否则单数形式“一种(个)”和“该”旨在也包括复数形式。

[0077] 如本文所用,“和/或”是指并涵盖相关列出项目中的一个或多个项目的任何和所有可能的组合,以及当在替代方案(“或”)中解释时缺少组合。

[0078] 当提及可测量的值,诸如多肽的量、剂量、时间、温度、酶促活性或其他生物活性等时,如本文所用的术语“大约”和“大致”意欲涵盖指定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $+ 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0079] 过渡短语“基本上由……组成”意谓权利要求的范围将被解释为涵盖权利要求中叙述的特定材料或步骤，“以及那些不会实质上影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的材料或步骤”。参见In re Herz, 537F.2d 549, 551-52, 190USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (原文中的重点); 还参见MPEP§2111.03。

[0080] 当应用于本公开的多核苷酸或多肽序列时, 术语“基本上由……组成”(和语法变体) 意谓多核苷酸或多肽, 所述多核苷酸或多肽由所叙述的序列(例如, SEQ ID NO) 和所叙述的序列的N末端和/或C末端上的总共十个或更少(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) 附加氨基酸组成, 使得多肽的功能没有实质性改变。十个或更少的附加氨基酸的总数可以包括加总在一起的两个末端上的附加氨基酸的总数。

[0081] 如本文所用的“有效量”是提供所需效应的量。术语“有效量”是指这样的剂量或量, 所述剂量或量足以降低KLRG1活性以导致患者症状改善或实现所需生物学结局, 例如, 降低KLRG1活性、调节淋巴细胞共抑制反应、增加或减少细胞毒性T细胞和NK细胞的激活、或增加或减少细胞毒性T细胞或NK细胞的IFN  $\gamma$  释放。

[0082] 如本文所用的“治疗有效”量是向受试者提供某种改善或益处的量。换句话说, “治疗有效”量是将在受试者中提供至少一种临床症状的某种减轻、缓解或减少的量。本领域技术人员将理解, 治疗效应不必是完全的或治愈性的, 只要向受试者提供某种益处即可。

[0083] 术语“治疗”旨在指受试者病症的严重程度降低, 或至少部分改善或改进, 以及实现至少一种临床症状的某种减轻、缓解或减少。

[0084] 如本文所用的针对T细胞和/或NK细胞和/或表达KLRG1的癌细胞的术语“耗竭”是指受试者或样品中所述细胞数量的可测量的减少。减少可以是至少约10%, 例如至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多。在某些实施方案中, 该术语是指受试者或样品中T细胞和/或NK细胞和/或表达KLRG1的癌细胞的数量减少到低于可检测限的量。

[0085] 如本文所用的术语“自身免疫性疾患”是指与自身免疫反应相关联的任何疾患。示例包括但不限于多发性硬化症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、狼疮、炎症性肠综合征和肠易激综合征。

[0086] 如本文所用的术语“癌症”是指任何良性或恶性的异常细胞生长。示例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、皮肤癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、恶性黑素瘤、卵巢癌、脑癌、原发性脑癌、头颈癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、头颈恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤、卵巢恶性肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、维尔姆斯瘤、宫颈肿瘤、睾丸癌、膀胱癌、胰腺癌、胃癌、结肠恶性肿瘤、前列腺恶性肿瘤、泌尿生殖系统恶性肿瘤、甲状腺恶性肿瘤、食管恶性肿瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、肾上腺癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌肿瘤、绒毛膜癌、蕈样肉芽肿、恶性高钙血症、宫颈增生、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性、慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、毛细胞白血病、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、卡波西氏肉瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、霍奇金病、非霍奇金氏淋巴瘤、软组织肉瘤、骨原性肉瘤、原发性巨球蛋白血症和成视网膜细胞瘤。在一些实施方案中, 癌症选自自由形成肿瘤的癌症组成的组。本领域技术人员将认识到哪些癌症落入该组的范围内。

[0087] 术语“移植”是指将组织切片或完整的器官从其原始天然部位或宿主中取出并转

移到同一个人或单独个体中的新位置。治疗移植受体的方法涉及抑制器官或组织移植排斥,特别是哺乳动物中的器官或组织移植排斥的方法。更具体地,本公开涉及抑制有需要的哺乳动物中的移植排斥的方法,所述方法可包括向此类哺乳动物施用移植排斥抑制量的抗KLRG1结合剂,包括特异性结合KLRG1的抗体及其片段。

[0088] 术语“分离的”可以指基本上不含细胞物质、病毒物质和/或培养基(当通过重组DNA技术生产时)或化学前体或其他化学物质(当化学合成时)的多肽。此外,“分离的片段”是多肽的片段,该片段不是天然存在作为片段的并且在天然状态下将不会存在。“分离的”并不意味着制备物在技术上是纯的(均质的),但是它足够纯以提供可用于预期目的的形式多肽或核酸。因此,术语“分离的”是指基本上没有其自然环境的分子。例如,分离的蛋白质基本上不含细胞物质或其所来源的细胞或组织来源的其他蛋白质。术语“分离的”还指这样的制备物,其中分离的蛋白质足够纯以作为药物组合物施用的,或者大致至少70-80% (w/w) 纯,更优选大致至少80-90% (w/w) 纯,甚至更优选大致90-95% 纯;并且最优选地,大致至少95%、大致至少96%、大致至少97%、大致至少98%、大致至少99%或大致至少100% (w/w) 纯。

[0089] 当应用于多肽时,术语“片段”将被理解为意谓这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列相对于参考多肽或氨基酸序列具有减小的长度,并且包含、基本上由和/或由与参考多肽或氨基酸序列同一或几乎同一(例如,约90%、约92%、约95%、约98%、约99%同一)的连续氨基酸的氨基酸序列组成。根据本公开的此类多肽片段可以在适当的情况下被包含在其为组分的更大的多肽中。在一些实施方案中,此类片段可包含、基本上由和/或由具有根据本公开的多肽或氨基酸序列的至少约4个、约6个、约8个、约10个、约12个、约15个、约20个、约25个、约30个、约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约150个、约200个或更多个连续氨基酸的长度的肽组成。

[0090] 如本文所用,除非另外指明,否则术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用并且涵盖肽和蛋白质两者。

[0091] “融合蛋白”是当编码未发现在自然中融合在一起的两种(或更多种)不同多肽的两个异源核苷酸序列或其片段在正确的翻译阅读框中融合在一起时产生的多肽。说明性的融合多肽包括本公开的多肽(或其片段)与谷胱甘肽s-转移酶、麦芽糖结合蛋白或报告蛋白(例如,绿色荧光蛋白、 $\beta$ -葡糖醛酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶等)、血凝素、c-myc、FLAG表位等的全部或一部分的融合体。

[0092] 如本文所用,“功能性”多肽或“功能性片段”是基本上保留至少一种通常与该多肽相关联的生物活性(例如,靶蛋白结合)的多肽或片段。在特定实施方案中,“功能性”多肽或“功能性片段”基本上保留了未修饰的肽所具有的所有活性。“基本上保留”生物活性是指多肽保留了天然多肽的生物活性的至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约75%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或更多(并且可甚至具有比天然多肽更高的活性水平)。“非功能性”多肽是表现出很少或基本上没有通常与该多肽相关联的可检测生物活性(例如,最多只有微不足道的量,例如,小于约10%或甚至小于约5%)的多肽。诸如蛋白质结合的生物活性可以使用本领域中众所周知和本文所述的测定来测量。

[0093] 抗体和组合物

[0094] 本公开允许鉴定和表征特异性结合细胞的KLRG1的细胞外结构域,而不干扰E-钙

粘蛋白、R-钙粘蛋白和/或N-钙粘蛋白与KLRG1的细胞外结构域的结合的抗体。此类抗体可有利地用于耗竭受试者中表达细胞表面KLRG1的细胞,例如以用于研究或治疗目的。此类抗体可用于治疗与致病性和自身免疫性T细胞以及表达KLRG1的癌细胞相关联的疾患。因此,本公开的一个方面涉及抗体或其片段,所述抗体或其片段当施用于受试者时特异性结合KLRG1的细胞外结构域并耗竭表达KLRG1的细胞。此类抗体或其片段可用作用于癌症治疗的辅助疗法,而不管癌细胞是否表达KLRG1。

[0095] 完整抗体,也称为免疫球蛋白,通常是由两条各约25kDa的轻(L)链和两条各约50kDa的重(H)链构成的四聚糖基化蛋白质。抗体中存在两种类型的轻链,命名为 $\lambda$ 链和K链。取决于重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为以下五大类:A、D、E、G、和M,并且这些大类中的几种可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG 1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0096] 不同种类的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是在本领域中众所周知的。简而言之,每个轻链可以由N末端可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)构成。每个重链可以由N末端可变结构域(VH)、三个或四个恒定结构域(CH)和铰链区构成。最接近VH的CH结构域被命名为CH1。VH结构域和VL结构域包含或由四个称为构架区域的相对保守序列的区域(FR1、FR2、FR3和FR4)组成,所述区域形成了称为互补决定区(CDR)的高变序列的三个区域的支架。CDR可包含大多数负责与抗原特异性相互作用的残基。该三个CDR被称为CDR1、CDR2和CDR3。重链上的CDR组分被称为H1、H2和H3,而轻链上的CDR组分相应地被称为L1、L2和L3。CDR3,尤其是H3,是抗原结合结构域内分子多样性的最大来源。例如,H3可以短至两个大于26的氨基酸残基。

[0097] Fab片段(片段抗原结合)或Fab包含或由通过恒定区之间的二硫键共价连接的VH-CH1结构域和VL-CL结构域组成。本领域技术人员已知,Fab(50,000道尔顿)是由IgG和IgM产生的单价片段,包含或由通过分子内二硫键连接的VH区域、CH1区域和VL区域、CL区域组成。为了克服Fv中非共价连接的VH结构域和VL结构域在宿主细胞中共表达时解离的趋势,可以构建所谓的单链(single chain,sc)Fv片段(scFv)。在scFv中,一种柔性且足够长的多肽将VH的C末端连接至VL的N末端,或者将VL的C末端连接至VH的N末端。最常见地,15个残基(Gly4Ser)3肽可以用作接头,但是其他接头也是本领域中已知的。

[0098] 抗体多样性是编码可变区的多个种系基因和多种体细胞事件组合装配的结果。体细胞事件可包括重组具有多样性(D)的可变基因区段和接合(J)基因区段以制备完整的VH区域,以及重组可变基因区段和接合基因区段以制备完整的VL区域。重组过程本身是不精确的,导致在V(D)J接合处氨基酸的丢失或增加。这些多样性机制发生在抗原暴露前发育中的B细胞中。在抗原刺激后,B细胞中表达的抗体基因可以经历体细胞突变。

[0099] 基于种系基因区段的估计数量、这些区段的随机重组和随机VH-VL配对,可以根据Fundamental Immunology,第3版,Paul编著,Raven Press,New York,N.Y.,1993产生多达约 $1.6 \times 10^7$ 种不同的抗体。当考虑到有助于抗体多样性的其他过程(诸如体细胞突变)时,据认为可潜在地产生超过 $1 \times 10^{10}$ 个不同抗体,如由Immunoglobulin Genes,第2版,Jonio等人编著,Academic Press,San Diego,Calif.,1995所支持的。由于抗体多样性中所涉及的许多过程,高度不可能的是独立产生的抗体将在CDR中具有相同的氨基酸序列。

[0100] 本公开提供了来源于人免疫球蛋白基因文库的新颖CDR,所述新颖CDR有效耗竭表达细胞表面KLRG1的细胞。用于携带CDR的支架结构通常可以是但不限于抗体重链或轻链或

其一部分,其中CDR位于与天然存在的VH和VL的CDR对应的位置。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可以例如如在Rabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,No.91-3242,National Institutes of Health Publications,Bethesda,Md.,1991中所述确定。

[0101] 表达KLRG1的细胞的耗竭

[0102] 抗体,诸如本文所述的那些抗体,在免疫系统中表现至少两种功能。它们结合抗原,例如KLRG1,并通过免疫球蛋白效应子功能消除这些抗原,包括表达所述抗原的细胞,所述免疫球蛋白效应子功能包括但不限于补体系统的激活或与吞噬细胞诸如巨噬细胞和/或其他免疫细胞诸如NK细胞、白细胞、血小板和胎盘滋养层上的细胞受体(Fc受体)的相互作用。

[0103] 抗体依赖性细胞吞噬作用(Antibody-dependent cellular phagocytosis,ADCP)、抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)和补体依赖性细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)是三种众所周知的抗体介导的用于杀伤并由此耗竭靶细胞的机制。

[0104] 虽然不受机制或理论的束缚,但是通过抗体的抗原结合区(可变结构域)将抗体结合至靶细胞可以提供通过抗体的恒定区的一个或多个Fc区将靶细胞连接至免疫效应物。

[0105] 在ADCC中,通常抗体的fc区与免疫效应细胞(例如,NK细胞)上的Fc $\gamma$ RIIIa受体结合,此可随后杀伤靶细胞。在ADCP中,通常抗体的fc区与免疫效应细胞(例如,巨噬细胞)上的Fc $\gamma$ RIIa受体结合,此可随后吞噬并杀伤靶细胞。当免疫复合物C1q结合至与靶细胞结合的抗体的fc区时,诱导了CDC,从而触发了膜攻击复合物的形成,所述膜攻击复合物在靶细胞表面打孔。

[0106] 因此,抗体的恒定区介导效应子功能,包括补体的激活和与Fc受体的相互作用,从而实现诸如ADCC、ADCP或CDC的效应。CH1结构域和CK结构域或CA结构域都不介导效应子功能,这就是为什么Fab没有显示ADCC、ADCP或CDC的原因。

[0107] 有三种类型的Fc $\gamma$ 受体,Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RII(CD 32)和Fc $\gamma$ RIII(CD 16)。只有Fc $\gamma$ RI能够以单体形式结合IgG,并且与免疫球蛋白受体Fc $\gamma$ RI和Fc $\gamma$ RII相比,Fc $\gamma$ RI受体的亲和力很高。高亲和力受体Fc $\gamma$ RI在单核细胞、巨噬细胞和树突细胞上组成型表达,并且可在嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上诱导表达。因此,这些细胞可以通过结合至靶细胞的包含fc区的抗体或其抗体片段被募集到靶细胞。

[0108] Fc $\gamma$ RIIIa受体在巨噬细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞上存在,并且Fc $\gamma$ RIIIb受体在B细胞、巨噬细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞上存在。Fc $\gamma$ RIIIa受体在NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞和T细胞上存在,并且Fc $\gamma$ RIIIb受体在嗜中性粒细胞上高度表达。同样,这些各种细胞类型可以通过结合至靶细胞的抗体,经由结合至靶细胞的包含fc区的抗体或抗体片段而被募集到靶细胞上。

[0109] 因此,在一些方面中,包括抗体及其抗原结合片段在内的KLRG1结合分子,及其方法,包括那些与受试者中或体外KLRG1耗竭相关的方法,包括KLRG1抗原结合位点以及其抗体恒定结构域或片段。这可以作用以调节效应子功能,包括但不限于ADCC、ADCP或CDC。在一些方面中,KLRG1结合分子包含或由抗体的抗原结合位点和结合肽的Fc效应分子组成,如国际专利申请公开号W0 02/44215中所述。

[0110] 免疫毒素作为用于耗竭表达KLGR1的细胞的手段

[0111] 在一些方面中,由本公开提供的抗体和/或其抗原结合片段缀合至毒性剂,并且因此ADCC、ADCP或CDC中不一定依赖于内源性效应细胞来耗竭靶细胞,例如表达细胞表面KLGR1的致病细胞和/或癌细胞。

[0112] 包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。与细胞毒性剂、药物等缀合的抗体也被称为抗体-药物缀合物。免疫缀合物可具有足够长时间段的半衰期来使抗体-药物缀合物内化、降解并诱导释放的毒素进行细胞杀伤。细胞毒素或细胞毒性剂可包括任何对细胞有害(例如,杀伤细胞)的药剂。用于形成本公开的免疫缀合物的合适细胞毒性剂包括紫杉醇、微管蛋白抑制剂(tubulysin)、duostatin、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、美登素或其类似物或衍生物、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素;卡里奇霉素或其类似物或衍生物、抗代谢物(诸如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨)、烷化剂(诸如氮芥、噻替哌、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物,诸如卡铂;以及倍癌霉素A、倍癌霉素SA、CC-1065(又称为拉奇霉素)或CC-1065的类似物或衍生物)、尾海兔素、奥瑞斯他汀、吡咯并[2,1-c][1,4]苯二氮卓类(PDB)、吲哚啉并苯二氮卓类(IGN)或其类似物、抗生素(诸如更生霉素(先前是放线菌素)、博莱霉素、柔红霉素(先前是道诺霉素)、多柔比星、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素(AMC))、抗有丝分裂剂(例如,靶向微管蛋白的药剂),诸如白喉毒素及相关分子(诸如白喉A链及其活性片段和杂交分子);蓖麻毒素(诸如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV)、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、alorin、皂草素、莫迪素、gellanin、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 $\alpha$ -八叠球菌素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、多花白树毒蛋白、丝林霉素、局限曲菌素、酸霉素和伊诺霉素毒素。其他合适的缀合分子包括抗微生物/裂解肽,诸如CLIP、蛙皮素2、蜂毒肽(mellitin)、天蚕素和P18;核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素和假单胞菌属内毒素。

[0113] 补充治疗剂

[0114] 本公开的抗体,包括其片段和其缀合物,可以任选地与其他治疗剂一起递送至患者。附加治疗剂可以与本公开的抗体同时递送。如本文所用,词语“同时”意味着在时间上足够接近以产生组合效应(即,同时可以是同时的,或者其可以是在彼此之前或之后的短时间段内发生的两个或更多个事件)。

[0115] 在一些实施方案中,本公开的抗体可以与诸如以下抗癌剂联合施用:1)长春花生物碱(例如,长春花碱、长春新碱);2)表鬼臼毒素(例如,依托泊苷和替尼泊苷);3)抗生素(例如,更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素(道诺霉素;红比霉素)、多柔比星、博莱霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素(丝裂霉素C));4)酶(例如,L-天冬酰胺酶);5)生物反应调节剂

(例如,干扰素- $\alpha$ );6) 铂配位络合物(例如,顺铂和卡铂);7) 葱二酮类(例如,米托蒽醌);8) 取代的脲(例如,羟基脲);9) 甲基胍衍生物(例如,丙卡巴嗪(N-甲基胍;MIH);10) 肾上腺皮质抑制剂(例如,米托坦(o,p'-DDD)和氨鲁米特);11) 肾上腺皮质类固醇(例如,强的松);12) 黄体酮类(例如,己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮);13) 雌激素(例如,己烯雌酚和乙炔雌二醇);14) 抗雌激素(例如,它莫西芬);15) 雄激素(例如,丙酸睾酮和氟甲睾酮);16) 抗雄激素(例如,氟他胺);和17) 促性腺激素释放激素类似物(例如,亮丙瑞林)。在一些实施方案中,本公开的抗体可与诸如以下的抗血管生成剂联合施用:VEGF的抗体(例如,贝伐单抗(AVASTIN)、兰尼单抗(LUCENTIS))和其他血管生成促进剂(例如,bFGF、血管生成素-1)、 $\alpha$ -v/ $\beta$ -3血管整合素的抗体(例如,VITAXIN)、血管抑素、内皮抑制素、达肝素、ABT-510、CNGRC肽TNF $\alpha$ 缀合物、环磷酰胺、康普瑞汀A4磷酸盐、二甲基咕吨酮乙酸、多西紫杉醇、来那度胺、恩扎妥林、紫杉醇、紫杉醇白蛋白稳定化的纳米粒子制剂(紫杉醇)、大豆异黄酮(染料木黄酮)、枸橼酸它莫昔芬、沙利度胺、ADH-1(EXHERIN)、AG-013736、AMG-706、AZD2171、甲苯磺酸索拉非尼、BMS-582664、CHIR-265、帕唑帕尼、PI-88、瓦他拉尼、依维莫司、苏拉明、苹果酸舒尼替尼、XL184、ZD6474、ATN-161、西仑吉肽和赛来昔布。

[0116] 在一些实施方案中,包括但不限于自身免疫性疾病治疗或移植治疗,本公开的抗体可以与免疫抑制剂联合施用,所述免疫抑制剂包括例如环孢菌素A、雷帕霉素、糖皮质激素、硫唑嘌呤、咪唑立宾、阿司匹林衍生物、羟氯喹、氨甲蝶呤、环磷酰胺和FK506(他克莫司)。

#### [0117] 抗体相关定义

[0118] 如本文所用的术语“抗体”是指所有类型的免疫球蛋白,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。抗体可以是单克隆的或多克隆的,并且可以是任何来源的物种,包括例如小鼠、大鼠、兔、马、山羊、绵羊、骆驼或人,或者可以是嵌合抗体。抗体可以根据例如在美国专利号4,474,893或美国专利号4,816,567中公开的方法生产的重组单克隆抗体。抗体也可以化学地构建,例如根据美国专利号4,676,980中公开的方法。

[0119] 术语“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”和“结合片段”是指抗体分子的一部分,所述部分包含负责抗体与抗原之间的特异性结合的氨基酸。在抗原较大的情况下,抗原结合结构域可以仅结合抗原的一部分。抗原分子的负责与抗原结合结构域特异性相互作用的部分被称为“表位”或“抗原决定簇”。

[0120] 虽然抗原结合结构域通常包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH),然而,它不一定必须包含两者。例如,所谓的Fd抗体片段仅由VH结构域组成,但仍保留了完整抗体的某种抗原结合功能。

[0121] 抗KLRG1抗体可任选地包含抗体恒定区或其部分。例如,VL结构域可已经在其C末端附接了包含人CK或C $\lambda$ 链的抗体轻链恒定结构域。类似地,基于VH结构域的特异性抗结合结构域可已经附接了来源于任何抗体同种位的免疫球蛋白重链的全部或部分,例如IgG、IgA、IgE和IgM以及任何同种位亚类,所述同种位亚类包括但不限于IgG1和IgG4。C末端片段的DNA和氨基酸序列是本领域中众所周知的。

[0122] 术语“库(repertoire)”是指完全或部分来源于编码所表达的免疫球蛋白的序列的核苷酸的遗传多样性集合。所述序列可以通过例如H链的V区段、D区段和J区段以及例如L链的V区段和J区段的体内重排产生。或者,序列可以响应于此重排发生而通过体外刺激从

细胞系生成。或者,可以通过核苷酸合成、随机诱变和其他方法(例如如在美国专利号5,565,332中所公开的方法)将例如未重排的V区段与D区段和J区段进行组合,来获得部分或全部序列。

[0123] 术语“特异性相互作用”和“特异性结合”是指两种分子形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合可以以高亲和力和低至中等容量为特征,如与非特异性结合不同,所述非特异性结合通常具有低亲和力和中等至高容量。通常,当亲和力常数 $K_A$ 高于约 $10^6 M^{-1}$ ,或更优选高于约 $10^8 M^{-1}$ 时,结合被认为是特异性的。如果必要的话,可以减少非特异性结合而基本上不影响特异性结合,例如通过改变结合条件。合适的结合条件,诸如抗体的浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合的时间、封闭剂(例如,血清白蛋白、乳酪蛋白)的浓度等,可由技术人员使用常规技术进行优化。

[0124] 在某些实施方案中,抗体可以以KD表示的为至少约2nM、约1nM、约100pM、约10pM或约5pM的亲和力特异性结合人或小鼠或猴KLRG1的细胞外结构域(ECD)内的表位。人和食蟹猴ECD的氨基酸序列在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中列出,如下面的工作实施例1中所列。

#### [0125] 抗体结合特异性

[0126] 预期本公开的抗体也可以与其他蛋白质结合,所述其他蛋白质包括例如包含全部或部分KLRG1的重组蛋白质。

[0127] 本领域技术人员将认识到,本公开的抗体可用于检测、测量和抑制与KLRG1略有不同的蛋白质。只要靶蛋白包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的序列中的至少约130个、约100个、约80个、约60个、约40个或约20个连续氨基酸的任何序列至少约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更高同一的序列,就可以预期抗体保持结合特异性。同一性百分比是通过标准比对算法确定的,所述标准比对算法为例如在Altschul等人,(1990) *J.Mol.Biol.*,215:403-410中描述的基本局部比对工具(Basic Local Alignment Tool, BLAST)、Needleman等人,(1970) *J.Mol.Biol.*,48:444-453的算法、或Meyers等人,(1988) *Comput.Appl.Biosci.*,4:11-17的算法。

[0128] 除了序列同源性分析外,还可进行表位作图(参见例如,Epitope Mapping Protocols,Morris编著,Humana Press,1996)和二级和三级结构分析以辨识由所公开的抗体及其与抗原的复合物假定的特定3D结构。此类方法包括但不限于X射线结晶学(Engstrom (1974) *Biochem.Exp.Biol.*,11:7-13)和目前公开的抗体的虚拟表示的计算机建模(Fletterick等人,(1986) *Computer Graphics and Molecular Modeling,in Current Communications in Molecular Biology,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.*)。

#### [0129] 抗体变体

[0130] 本公开还提供了用于获得KLRG1特异性抗体的方法。此类抗体中的互补决定区(CDR)不限于在下面的工作实施例中鉴定的VH和VL的特定序列,并且可包括这些序列的变体,所述变体保持了特异性结合KLRG1的能力,与此同时不干扰KLRG1和E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白的结合。此类变体可以由技术人员使用本领域中众所周知的技术从工作实施例中列出的序列获得。例如,氨基酸取代、缺失或添加可以在构架区域(FR)和/或CDR中进行。虽然FR的变化通常可以设计成提高抗体的稳定性和免疫原性,但是CDR的变化通常可以设计成增加抗体对其靶标的亲和力。



[0131] 对FR的改变包括但不限于非人类来源的FR进行人源化或工程化某些对抗原接触或稳定化结合位点很重要的构架残基,例如改变恒定区的种类或亚类、改变可能改变效应子功能诸如Fc受体结合的特定氨基酸残基,例如如在美国专利号5,624,821和5,648,260和Lund等人(1991) *J. Immunol.* 147:2657-2662和Morgan等人(1995) *Immunology* 86:319-324中所述,或改变恒定区来源于的物种。

[0132] FR的变体还包括天然存在的免疫球蛋白同种异型。此类亲和力增加的变化可以通过常规技术凭经验确定,所述常规技术包括改变CDR和测试抗体对其靶标的亲和力。例如,保守氨基酸替换可以在所公开的CDR中的任何一个CDR中进行。可以根据例如在Antibody Engineering,第2版,Oxford University Press,Borrebaeck编著,1995所描述的方法进行各种改变。这些包括但不限于核苷酸序列,所述核苷酸序列通过取代编码序列内的功能等同的氨基酸残基的不同密码子而改变,从而产生“沉默”变化。例如,非极性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。序列内氨基酸的替代物可选自所述氨基酸所属类别的其他成员(参见表6)。此外,多肽中的任何天然残基也可以被丙氨酸取代(参见例如MacLennan等人(1998) *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67;Sasaki等人(1998) *Adv. Biophys.* 35:1-24)。

[0133] 短语“基本上如所阐述的”意味着本公开的相关CDR、VH或VL结构域将与所阐述的序列相同,或者在来自所述序列的指定区域(例如,CDR)中仅具有非实质性差异。非实质性差异包括微小的氨基酸变化,诸如指定区域的序列中任何五(5)个氨基酸中的一(1)个或两(2)个氨基酸的取代。

[0134] 术语“KLRG1活性”是指与KLRG1相关联的一种或多种淋巴细胞共抑制活性。例如,KLRG1活性可意味着细胞毒性T细胞和NK细胞激活的调节。

[0135] 术语“调节”及其同源词是指由于与抗KLRG1抗体的相互作用而导致的与T细胞和NK细胞激活相关联的KLRG1活性的降低或增加,其中该降低或增加是相对于不存在相同抗体时KLRG1的活性而言的。活性的降低或增加优选为至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多。当KLRG1活性降低时,术语“调节”可与术语“抑制”互换。当KLRG1活性增加时,术语“调节”可与术语“激活”互换。

[0136] 包括在本公开的范围内的抗体片段包括例如:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;结构域抗体,双体抗体;疫苗体,线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。此类片段可以通过已知技术产生。例如,F(ab')<sub>2</sub>片段可以通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生,并且Fab片段可以通过减少F(ab')<sub>2</sub>片段的二硫键而产生。或者,可以构建Fab表达文库以允许快速和容易地鉴定具有所需特异性的单克隆Fab片段(参见Huse等人,*Science*, 1989年12月8日;246(4935):1275-1281)。

[0137] 本公开的抗体可以被改变或突变以与产生所述抗体的物种以外的物种相容。例如,抗体可以是人源化的或驼化的。非人(例如,鼠)抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、其免疫球蛋白链或片段(诸如Fv、Fab、Fab<sub>1</sub>、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其他抗原结合子序列),所述人源化形式包含源自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠

或兔的CDR的具有所需的特异性、亲和力和能力的残基所替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架残基可以被对应的非人残基取代。人源化抗体也可包含既不在受体抗体中也不在导入的CDR或构架序列中存在的残基。一般而言,人源化抗体可包含基本上所有的至少一个并且通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区,并且所有或基本上所有的构架(FR)区(即,CDR区之间的序列)是人类免疫球蛋白共有序列的那些FR区。人源化抗体最佳地还可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0138] 在某些实施方案中,VH和/或VL结构域可以是种系化的,即这些结构域的构架区(FR)是使用常规分子生物学技术进行突变以与种系细胞所产生的那些FR区相匹配。在其他实施方案中,构架序列保持偏离共有种系序列。

[0139] 人源化非人抗体的方法在本领域中是众所周知的。本公开和本文提供的任何发明不限于任何特定的来源、来源物种或生产方法。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入”残基,所述残基通常取自“导入”可变结构域。人源化可基本上遵循Winter和同事的方法(Jones等人,Nature 321:522 (1986);Riechmann等人,Nature 332:323 (1988);Verhoeyen等人,Science 239:1534 (1988)),通过用啮齿动物的CDR或CDR序列取代人抗体的对应序列来执行。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的对应序列取代。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基(例如,所有的CDR或其一部分)和可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0140] 也可以使用本领域中已知的各种技术产生人抗体,所述各种技术包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381 (1991);Marks等人,J.Mol Biol 222:581 (1991))。Cole等人 and Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985)和Boerner等人,J.Immunol.147:86 (1991))。类似地,通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠,可以制备人抗体。在攻击时,观察到了人抗体产生,所述人抗体在所有方面都与在人类中看到的非常相似,包括基因重排、装配和抗体库。例如,在美国专利号9,434,782、9,253,965、5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016,以及下列科学出版物中描述了该方法:Lee,E-Chiang等人,“Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery”Nature Biotechnology,第32卷,第356-363页(2014);Marks等人,Bio/Technology 10:779 (1992);Lonberg等人,Nature 368:856 (1994);Morrison,Nature 368:812 (1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:M5 (1996);Neuberger,Nature Biotechnol 14:826 (1996);Lonberg和Huszar,Intern,Rev.Immunol 13:65 (1995)。

[0141] 根据Kohler和Milstein,Nature 265:495 (1975)的技术,可以在杂交瘤细胞系中产生用于实行本公开的单克隆抗体。例如,可以将含有适当抗原的溶液注射到小鼠体内,并在足够长的时间后,处死小鼠并获得脾细胞。然后,可以通过通常在聚乙二醇存在下将脾细胞例如与骨髓瘤细胞或淋巴瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞,来使脾细胞永生化。然后,杂交

瘤细胞可以在合适的培养基中生长,并且上清液可以筛选出具有所需特异性的单克隆抗体。单克隆Fab片段可以通过本领域技术人员已知的重组技术在大肠杆菌中产生。特异于靶多肽的抗体也可以通过本领域中已知的噬菌体展示技术获得。

[0142] 各种免疫测定可用于筛选以鉴定对KLRG1的细胞外结构域具有所需特异性的抗体。使用具有确定的特异性的单克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射测定的许多方案在本领域中是众所周知的。此类免疫测定通常涉及测量抗原与其特异性抗体之间的复合物形成(例如,抗原/抗体复合物形成)。可以使用双位点、基于单克隆的免疫测定以及竞争性结合测定,所述双位点、基于单克隆的免疫测定利用对本公开的多肽或肽上的两个非干扰表位有反应的单克隆抗体。

[0143] 除了上述缀合物之外,根据已知技术,本文所述的抗KLRG1抗体可以缀合至固体支持物(例如,珠粒、板、载玻片或由诸如胶乳或聚苯乙烯的材料形成的孔)。根据已知技术,本文所述的抗KLRG1抗体同样可以缀合至可检测基团,诸如放射性标记(例如,<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I或<sup>99m</sup>Tc,其也可以使用常规化学法附接至抗体)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)和荧光标记(例如,荧光素)。可检测标记还包括化学部分,诸如生物素,所述化学部分可以通过结合特定的同源可检测部分(例如,标记的亲合素)来检测。在本公开的方法中,抗体/抗原复合物形成的确定可以通过检测例如沉淀、凝集、絮凝、放射性、显色或颜色变化、荧光、发光等来进行,并且在本领域中是众所周知的。

[0144] 如上所述,本文所述的抗KLRG1抗体可以连接至另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(白蛋白、另一种抗体等)、毒素、放射性同位素、细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。例如,抗体可以通过化学交联或通过重组方法连接。抗体也可以以美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192和4,179,337中所述的方式连接到多种非蛋白质聚合物中的一者,例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。例如,抗体可以通过共价缀合至聚合物进行化学修饰,以增加所述抗体的循环半衰期。美国专利号4,766,106、4,179,337、4,495,285和4,609,546中也显示了示例性聚合物和附接它们的方法。

[0145] 本文所述的抗KLRG1抗体也可被改变成具有不同于天然模式的糖基化模式。例如,一个或多个碳水化合物部分可以被缺失和/或可以将一个或多个糖基化位点添加到原始抗体。向目前公开的抗体中添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列以包含本领域中已知的糖基化位点共有序列来实现。另一种增加抗体上碳水化合物部分的数量是通过糖苷与抗体的氨基酸残基的化学或酶偶联。此类方法描述于国际专利申请公开号W0 87/05330和Aplin等人(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.,22:259-306中。从抗体中去除任何碳水化合物部分可以化学或酶促地完成,例如如由Hakimuddin等人(1987)Arch.Biochem.Biophys.,259:52;和Edge等人(1981)Anal.Biochem.,118:131和由Thotakura等人所述。

#### [0146] 进一步的实施方案

[0147] 在某些实施方案中,单克隆抗体或其片段可以是嵌合抗体或人源化抗体。在另外的实施方案中,嵌合或人源化抗体包含单克隆抗体的CDR的至少一部分。如本文所用,CDR的“一部分”被定义为来自组成CDR的轻链和重链中的每一者的三个环中的一个或多个环(例如,来自CDR的1-6个),或包含、基本上由或由至少三个连续氨基酸组成的环的一个或多个部分。例如,嵌合或人源化抗体可包含1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR环,1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR环的部分,或它们的混合物的任何组合。

[0148] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14中任一者的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一,例如至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14中任一者的氨基酸序列的至少50个连续氨基酸,或与该至少50个连续氨基酸大约至少90%同一的序列,例如至少约100个或约150个或约200个或更多个连续氨基酸。

[0149] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15中任一者的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列大约至少90%同一,例如至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15中任一者的氨基酸序列的至少50个连续氨基酸,或与该至少50个连续氨基酸大约至少90%同一的序列,例如至少约100个或约150个或约200个或更多个连续氨基酸。

[0150] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14中任一者的氨基酸序列或与该氨基酸序列大约至少90%同一,例如至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15中任一者的氨基酸序列或与该氨基酸序列大约至少90%同一,例如至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14中任一者的氨基酸序列的至少50个连续氨基酸,或与该至少50个连续氨基酸大约至少90%同一的序列,例如至少约100个或约150个或约200个或更多个连续氨基酸,该轻链可变区包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15的氨基酸序列的至少50个连续氨基酸,或与该至少50个连续氨基酸大约至少90%同一的序列,例如至少约100个或约150个或约200个或更多个连续氨基酸。

[0151] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区,该重链可变区包含来自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14的氨基酸序列的至少一个CDR(例如,1个、2个或3个)或其一部分,或与该至少一个CDR或其一部分大约至少90%同一,例如与该至少一个CDR或其一部分至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列。本领域技术人员理解,CDR在结合特异性中起作用,并且序列取代(例如,用于小鼠抗体的人源化)通常在CDR外部进行,并且最小改变通常在CDR内进行。因此,在一些实施方案中,与所公开的序列大约至少90%同一的序列不包含对CDR的改变,或者仅包含最小数量的改变。

[0152] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含轻链可变区,该轻链可变区包含来自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15的氨基酸序列的至少一个CDR(例如,1个、2个或3个CDR)或其一部分,或与该至少一个CDR或其一部分大约至少90%同一,例如与该至少一个CDR或其一部分至少约95%、约96%、约97%、约

98%或约99%同一的序列。

[0153] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含来自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14的氨基酸序列的至少一个CDR(例如,1个、2个或3个CDR)或其一部分,或与该至少一个CDR或其一部分大约至少90%同一,例如与该至少一个CDR或其一部分至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列,该轻链可变区包含来自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15的氨基酸序列的至少一个CDR(例如,1个、2个或3个CDR)或其一部分,或与该至少一个CDR或其一部分大约至少90%同一,例如与该至少一个CDR或其一部分至少约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一的序列。

[0154] 在进一步的实施方案中,抗体可以是单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段竞争结合由单克隆抗体ABC\_G1D01或ABC\_G1D02或ABC\_G1D03或ABC\_G1D04或ABC\_G1D05或ABC\_G1D06特异性结合的共同表位。在其他实施方案中,抗体可以是单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段特异性结合由单克隆抗体ABC\_G1D01或ABC\_G1D02或ABC\_G1D03或ABC\_G1D04或ABC\_G1D05或ABC\_G1D06特异性结合的共同表位。在某些实施方案中,单克隆抗体或其片段可以是嵌合抗体或人源化抗体。在一些实施方案中,嵌合或人源化抗体可包括单克隆抗体ABC\_G1D01或ABC\_G1D02或ABC\_G1D03或ABC\_G1D04或ABC\_G1D05或ABC\_G1D06中的一者的CDR的至少一部分。

#### [0155] 核酸、克隆和表达系统

[0156] 本公开进一步提供了编码所公开的抗体的分离的核酸。所述核酸可包含DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成或重组的。除非上下文另有要求,对本文所述的核苷酸序列的提及涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有指定序列的RNA分子,其中U取代了T。

[0157] 本文提供的核酸可包含本文所公开的CDR、VH结构域和/或VL结构域的编码序列。本公开还提供了质粒、载体、噬菌粒、转录或表达盒形式的构建体,所述构建体可包含至少一种编码本文公开的CDR、VH结构域和/或VL结构域的核酸。本公开进一步提供了可包含一种或多种如上所述的构建体的宿主细胞。

[0158] 还提供了编码任何CDR(H1、H2、H3、L1、L2、或L3)、VH或VL结构域的核酸,以及制备编码产物的方法。该方法可包括从编码核酸表达编码产物。表达可以例如通过在合适的条件下培养含有所述核酸的重组宿主细胞来实现。在通过表达产生之后,VH或VL结构域或特异性结合成员可以使用任何合适的技术分离和/或纯化,然后根据需要同和本领域技术人员的理解使用。

[0159] 抗原结合片段、VH和/或VL结构域以及编码核酸分子和载体可以基本上是纯的或均质的形式从它们的自然环境中分离和/或纯化,或者在核酸的情况下,除了编码具有所需功能的多肽的序列之外,不含或基本上不含核酸或起源基因。

[0160] 用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统在本领域中是众所周知的。对于适用于产生抗体的细胞,参见Gene Expression Systems,Academic Press,Fernandez等人编著,1999。简而言之,合适的宿主细胞包括细菌、植物细胞、哺乳动物细胞以及酵母和杆状病毒系统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NS0小鼠骨髓瘤细胞和许多其他细胞。常见的细菌宿主是大肠杆

菌。任何与本公开相容的蛋白质表达系统都可以用于产生公开的抗体。合适的表达系统包括Gene Expression Systems, Academic Press, Fernandez等人编著, 1999中描述的转基因动物。

[0161] 可以选择或构建合适的载体, 使得它们包含合适的调节序列, 视情况而定包括启动子序列、终止子序列、多腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他序列。载体可以视情况而定是质粒或病毒, 例如噬菌体或噬菌粒。更多细节参见例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。例如在核酸构建体的制备、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达、以及蛋白质分析方面的许多已知的核酸操纵技术和方案详细描述于*Current Protocols in Molecular Biology*, 第2版, Ausubel等人编著, John Wiley&Sons, 1992中。

[0162] 本公开的其他方面提供了一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含如本文所公开的核酸, 或可从本公开以其他方式衍生的核酸。本公开的其他方面提供了包括将此类核酸引入宿主细胞的方法。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞, 合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染, 以及使用逆转录病毒或其他病毒(例如, 牛痘病毒, 或者对于昆虫细胞, 杆状病毒)的转导。对于细菌细胞, 合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体转染。将核酸引入细胞之后可以是引起或允许从核酸表达, 例如通过在用于基因表达的条件下培养宿主细胞。

#### [0163] 药物组合物和施用方法

[0164] 本公开提供了包含KLRG1耗竭剂、抗KLRG1抗体和/或其片段和/或其缀合物和融合蛋白的组合物。本公开的组合物可任选地包含医药试剂、药剂、载体、药学上可接受的载体、佐剂、分散剂、稀释剂等。此类组合物可适用于药物用途和施用于患者。“药学上可接受的”是指不是生物学上或在其他方面非期望的物质, 即该物质可以施用于受试者而不会引起任何非期望的生物学效应, 诸如毒性。该组合物通常包含一种或多种本公开的抗体和药学上可接受的赋形剂。短语“药学上可接受的赋形剂”包括任何和所有与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域中众所周知的。所述组合物还可包含提供补充的、附加的或增强的治疗功能的其他活性化合物。药物组合物也可以与施用说明一起包含在容器、包装或分配器中。

[0165] 本公开的组合物可以根据已知技术配制以用于在药物载体中施用。在根据本公开的药物制剂的制造中, 化合物(包括其生理上可接受的盐)通常尤其可以与可接受的载体掺混。载体可以是固体或液体, 或两者, 并且可以与化合物一起配制成单位剂量制剂, 例如片剂, 所述单位剂量制剂可含有约0.01重量%或约0.5重量%至约95重量%或约99重量%的化合物。一种或多种化合物可以掺入本公开的制剂中, 所述制剂可以通过本领域技术人员已知的任何制药技术来制备。

[0166] 本公开的药物组合物可以配制成与其预期施用途径相容。完成施用的方法是本领域技术人员已知的。施用可以例如是静脉内、腹膜内、肌内、腔内、皮下和/或经皮的。还可能获得可以以其他方式(包括局部或口服)施用或者可以能够跨粘膜传播的组合物。

[0167] 用于皮内或皮下应用的溶液或悬浮液通常包括以下组分中的一者或多者: 无菌稀释剂(诸如注射用水)、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂; 抗细菌剂,

诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，诸如乙二胺四乙酸；缓冲剂，诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；和用于调节张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱（诸如盐酸或氢氧化钠）调节pH。此类制备物可以封闭在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中，所述安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶可以由例如玻璃或塑料制成。

[0168] 适用于注射的药物组合物包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。通常，所述组合物应该是无菌的，并且应该是存在容易可注射性程度的流体。所述组合物应在制造和存储条件下是稳定的，并且应该被防腐以防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。预防微生物的作用可以例如通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现，所述各种抗菌剂和抗真菌剂包括对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，将优选的是在组合物中包含等渗剂，例如糖和/或多元醇，诸如甘露醇、山梨糖醇和氯化钠。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）以及它们的合适混合物的溶剂或分散介质。例如，通过使用诸如卵磷脂的涂层，通过在分散的情况下保持所需的粒度和/或通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0169] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。在一些情况下，它们可以封闭在明胶胶囊中或压制成片剂。对于口服施用，抗体可以与赋形剂组合，并以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。药物相容的结合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分被包含。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有任何以下成分或具有类似性质的化合物：粘合剂，诸如微晶纤维素、黄耆胶或明胶；赋形剂，诸如淀粉或乳糖；崩解剂，诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉；润滑剂，诸如硬脂酸镁或甾醇酯 (Sterote)；助流剂，诸如胶体二氧化硅；甜味剂，诸如蔗糖或糖精；或调味剂，诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。

[0170] 全身施用也可以通过经粘膜或经皮手段。对于经皮或经皮施用，制剂中可以使用适合于待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是在本领域中已知的，并且包括例如洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以例如通过使用锭剂、鼻喷雾剂、吸入剂或栓剂来实现。例如，在抗体包含Fc部分的情况下，组合物可以能够跨肠、口或肺中的粘膜传播（例如，通过如在美国专利号6,030,613中描述的FcRn受体介导的途径）。对于经皮施用，活性化合物可以配制成例如本领域中通常已知的软膏剂、油膏、凝胶或霜剂。对于通过吸入施用，抗体可以例如以气溶胶喷雾的形式从加压容器或分配器中递送，所述容器或分配器可包含合适的推进剂，例如气体诸如二氧化碳或喷雾器。

[0171] 在某些实施方案中，目前公开的抗体可以用载体制备，所述载体被配置成保护化合物不从体内快速消除，诸如控释制剂，包括植入物和微囊递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和/或聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对本领域技术人员来说将是显而易见的。含有目前公开的抗体的脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知，例如如美国专利号4,522,811中所述的方法制备。

[0172] 以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物以便于施用和剂量均匀性可为有利的。

如本文所用的术语“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位；每个单位含有预定量的活性化合物，所述预定量经计算以与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。

[0173] 本公开的组合物的毒性功效和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的例如用于确定LD50 (对群体的约50%致死的剂量) 和ED50 (对群体的约50%治疗有效的剂量) 标准制药工序来确定。毒性效应与治疗效应之间的剂量比是治疗指数，并且该剂量比可以表示为LD50/ED50比率。表现出大治疗指数的组合物通常是优选的。

[0174] 对于本公开中使用的或可从本公开得到的任何组合物，治疗有效剂量最初可从细胞培养测定估计。合适的生物测定的示例包括但不限于DNA复制测定、细胞因子释放测定、基于转录的测定、KLRG1/钙粘蛋白结合测定、免疫学测定和其他测定，诸如下面实施例中描述的那些测定。从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制一系列用于人类的剂量。剂量可以在动物模型中配制以达到包括IC50的循环血浆浓度范围(即，实现症状的半最大抑制的抗体浓度)。血浆中的循环水平可以例如通过高效液相色谱法来测量。任何特定剂量的效应都可以通过适当的生物测定来监测。剂量优选在具有低毒性或无毒性的循环浓度范围内。剂量可以至少部分取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而变化。或者，可以以局部而非全身的方式，例如以贮库或缓释制剂的形式，施用本文所公开的抗体或可从本公开得到的抗体。

[0175] 本公开的另一个方面涉及用于本文提供的方法的试剂盒，或者根据本公开可以其他方式得到的试剂盒。试剂盒可包含一种或多种本公开的抗体，和/或一种或多种可从本公开得到的抗体，所述抗体的形式适用于施用于受试者，和/或所述抗体的形式适用于配混成制剂。所述试剂盒还可包含其他组分，诸如治疗剂、载体、缓冲剂、容器、施用装置等。所述试剂盒可被设计用于治疗用途、诊断用途和/或研究用途，并且附加组分可以是适用于预期用途的那些组分。本领域技术人员将认识到适合包含在这种性质的试剂盒中的各种此类组分。所述试剂盒还可以包含标签和/或使用说明，例如用于治疗疾患的标签和/或使用说明。此类标记和/或使用说明可以包括例如关于抗体的量、频率和施用方法的信息。鉴于本公开，本领域技术人员将理解所述类型的使用说明可以作为试剂盒的一部分一起被包含。所述使用说明在本文中提供，或者可以由本领域技术人员以其他方式根据本公开得到。

[0176] 以下工作实施例不以任何方式限制本公开的范围，以及本文提供的一种或多种任何发明。本领域的普通技术人员将认识到，在不改变本公开的精神或范围的情况下，可以进行许多修改和变化。此类修改和变化包含在本公开的范围之内。贯穿本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0177] 如本文所用的短语“与KLRG1相关联的疾患”是指KLRG1在疾病、疾患或病症的原因、副作用、症状或其他方面起作用的任何疾病、疾患或病症。此类疾病的示例包括但不限于自身免疫和移植疾患以及癌症。

[0178] 工作实施例

[0179] 实施例1：产生抗KLRG1抗体

[0180] 重组抗原和蛋白质的生产：

[0181] 通过标准的分子克隆和表达方案生产重组蛋白。人KLRG1 ECD (SEQ ID NO:1)、食蟹猴KLRG1 ECD (SEQ ID NO:2) 和人E-钙粘蛋白ECD (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列在表1中说



明。

[0182] 表1:人KLRG1 ECD (SEQ ID NO:1)、食蟹猴KLRG1 ECD (SEQ ID NO:2) 和人E-钙粘蛋白ECD (SEQ ID NO:3)、人KLRG1细胞外结构域 (ECD) (SEQ.ID NO:1) 的氨基酸序列

人 KLRG1 细胞外结构域 (ECD) (SEQ ID NO:1),	LCQGSNYSTCASCPCPDRWMKYGNHCYYFSVEEKDWNS SLEFCLARDSHLLVITDNQEMSLQVFLSEAFWIGLRNNS GWRWEDGSPLNFSRISNSFVQTCGAINKNGLQASSCEVPL HWVCKKVRL
食蟹猴 KLRG1 细胞外结构域 (ECD) (SEQ ID NO:2),	LCQGSKYSTCASCPCPDHWMKYGNHCYYFSVEKGDWIS SLEFCLARDSHLLMITDKQEMSLQDFLSEAFHWVGLRNN SGWRWEDGSPLNFSRIYSNSLVQTCGAINKNSLQASSCEVS LQWVCKKVSP
人 E-钙粘蛋白全长 (SEQ ID NO:3)	DWVIPPISCPENEKGFPPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQ GADTPPVGVFIIERETGWLKVTEPLDRERIAATYTLFSAVSS NGNAVEDPMEIUTVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEGALP GTSVMEVTATDADDDVNTYNAIAIYILSQDPELDPKDNMF TINRNTGVISVVTGLDRESFPTYTLVVQAADLQGEGLSTT ATAVITVTDNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANVVITTLKVT DADAPNTPAWEAVYTILNDDGGQFVVTNPNVNDGILKT AKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSLTTSTATVTVDVL DVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYTAQEPDTFMEQ KITYRIWRDTANWLEINPDTGAISTRAELDREDFEHVKNST YTALIIATDNGSPVATGTGTLILLSDVNDNAPIPEPRTIFFC ERNPKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELTHGASANWTIQYNDP TQESIILKPKMALEVGDYKINLKLMDNQNKDQVTTLEVS CDCEGAAGVCRKAQPVEAGLQIPAILGILGGILALLLILLLL LLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDF DLSQLHRGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPRYLPRPANPDEI GNFIDENLKAADTDPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAASLSSL NSSESDKDQDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD

[0183] [0184] 通过将相应的cDNA克隆到pCDNA4载体 (Invitrogen) 中并在哺乳动物HEK293细胞中瞬时转染,重组蛋白作为FC融合体或作为HIS标记的形式产生。表达蛋白的纯化是通过色谱法,对于FC融合体使用蛋白质A亲和树脂和对于HIS标记蛋白使用Nickel-NTA树脂进行的。所有纯化的蛋白质通过SDS-PAGE电泳进行表征,以验证纯度和分子量。

[0185] 稳定的细胞系被开发用作免疫抗原,以测试抗体与全长抗原的结合,并在功能性T细胞测定中用作靶细胞。所开发的细胞系包括表达全长人KLRG1的CHO细胞和表达全长食蟹猴KLRG1的CHO细胞。通过用编码感兴趣的蛋白质的pCDNA4质粒转染CHO细胞获得稳定的细胞系。在转染后,将细胞暴露于约500ug/ml的G418以选择稳定整合的质粒。用FACS进一步表征细胞系的表达,并进行分选以选择均质和稳定的表达。

[0186] 通过用人和食蟹猴KLRG1对雌性BALB/c小鼠和SJL小鼠进行标准免疫,并随后进行杂交瘤筛选,来产生抗人KLRG1的单克隆抗体 (MAB)。采用了几种免疫策略来产生不同数量的抗体命中。简而言之,用编码感兴趣的抗原的cDNA、重组抗原或表达感兴趣的抗原的CHO细胞重复免疫SJL和Ba1b/c小鼠。通过ELISA定期监测抗原特异性抗体滴度,并且当达到通常在约1:1000与约1:10000稀释因子之间的合适滴度时,处死动物。将来自牺牲小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞,随后培养并亚克隆成单一细胞。扩大稳定克

隆的规模,收获条件培养基,并通过ELISA和FACS测试抗KLRG1抗体的表达。

[0187] 实施例2:抗KLRG1抗体的选择

[0188] 筛选杂交瘤产生的抗体与人KLRG1 ECD和食蟹猴KRG1 ECD的结合。选择在两种抗原之间具有交叉反应性的抗体以进行下一阶段的筛选,以确定所述抗体阻断KLRG1与E-钙粘蛋白之间的相互作用的能力。抗体根据所述抗体与人和食蟹猴KLRG1的结合EC50进行排名,并且如果所述抗体在竞争测定中不干扰E-钙粘蛋白结合,则所述抗体被进一步选择为命中。根据这些标准选择了总共35种抗体,并且其中六(6)种抗体被优先用于基于细胞的测定中的功能表征。

[0189] 下面提供了与人KLRG1结合的六种选定抗体的序列信息:ABC\_G1D01、ABC\_G1D02、ABC\_G1D03、ABC\_G1D04、ABC\_G1D05和ABC\_G1D06。

[0190] 表2汇总了与人KLRG1结合的六种选定小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列,并且表3显示了每种抗体的CDR区。

[0191] 表2:每种小鼠抗KLRG1抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列

[0192]

ABC_G1D01-VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNHWVK QSHGKSLEWIGFFNPKNGVTINNQNFKGKAALTVNKSSS TAYMELRRLTSEDSAVYYCARDYYGTAWFAYWGQGL VTVSA (SEQ ID NO:4)
ABC_G1D01-VK	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQFYSYP TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)
ABC_G1D02-VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYFIEWIKQ RPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYFCTRPGHFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:5)
ABC_G1D02-VK	EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKP GFSPKLUYKTSNLAGVPPRFS GSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGNSIPRTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO:7)
ABC_G1D03-VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTDHNMHWLK QSHGKGLEWFGFINPNTGVT RYNQKFNGKATLTINKSSSTAYLDLRLTSEDSAVYYCTR DYYGSAWFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:8)
ABC_G1D03-VK	DIVMSQSPASQTVSVGEKVTMSCKSSQTLTYSSDQKNYL AWYQQKPGQSPKLUYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYN YPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:9)
ABCG1D04-VH	EVQLQQSGPELVKPGSSLMMSCKSSGYTFTDYNHWVKQ SHGKRLEWIGFIDPKNGGTLY SEKFKDKATLTINKSSSTAYMELRSLTSEDSAVFYCAPDY YGSAWFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:10)
ABC_G1D04-VK	DIVMSQSPSSLTVSVGENVTMSCKSSQNLLYTSNQKNYL AWYQQKPGHSPKLLISWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKAEDLAVFYCQQYYHY PTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:11)
ABC_G1D05-VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTTHGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSSGSTDY NAAFISRLSIRKDNSKSQVFFKMNSLQTNDAIYYCARLR LPAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:12)
ABC_G1D05-VK	QIVLTQSPTIMSASLGERVTMTCTASSSVSSTYLHWYQQK PGSSPKLWIYSTSNLAGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPLSFGAG TKLELK (SEQ ID NO:13)
ABC_G1D06-VH	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYKFSDEIHWVKQ TPVYGLEWIGALEPATGGTAY NPNFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSMH LAVYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:14)

[0193]

ABC_G1D06-VK	DVVMQTPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTSPRT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:15)
--------------	--

[0194] 表3: 选定抗体的CDR序列:

[0195]

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
ABC_G1 D01	GYTFTD Y (SEQ ID NO:16)	NPKNGV (SEQ ID NO:17)	DYYGTAWF AY (SEQ ID NO:18)	RSSQSLLYS SNQKNYLA (SEQ ID NO:19)	WASTRES (SEQ ID NO:20)	QQFSYPT (SEQ ID NO:21)
ABC_G1 D02	GYAFTN Y (SEQ ID NO:22)	NPGSGG (SEQ ID NO:23)	PGHFDY (SEQ ID NO:24)	SASSSISSNY LH (SEQ ID NO:25)	KTSNLAS (SEQ ID NO:26)	QQGNSIPRT (SEQ ID NO:27)
ABC_G1 D03	GYTFTD H (SEQ ID NO:28)	NPNTGV (SEQ ID NO:29)	DYYGSAWF AY (SEQ ID NO:30)	KSSQTLLYS SDQKNYLA (SEQ ID NO:31)	WASTRES (SEQ ID NO:32)	QQYYNYPT (SEQ ID NO:33)
ABC_G1 D04	GYTFTD Y (SEQ ID NO:34)	DPKNGG (SEQ ID NO:35)	DYYGSAWF AY (SEQ ID NO:36)	KSSQNLLYT SNQKNYLA (SEQ ID NO:37)	WASTRES (SEQ ID NO:38)	QQYYHYPT (SEQ ID NO:39)
ABC_G1 D05	GFSLTTH (SEQ ID NO:40)	IWSGGS (SEQ ID NO:41)	LRLPAMDY (SEQ ID NO:42)	TASSSVSST YLH (SEQ ID NO:43)	STSNLAS (SEQ ID NO:44)	HQYHRSP S (SEQ ID NO:45)
ABC_G1 D06	GYKFS Y (SEQ ID NO:46)	LEPATG G (SEQ ID NO:47)	HLAVY (SEQ ID NO:48)	KSSQSLLYS NGKTYLN (SEQ ID NO:49)	LVSKLDSG (SEQ ID NO:50)	VQGTSPR T (SEQ ID NO:51)

[0196] 根据序列倾向基序的存在对抗体进行进一步排序,并汇总在表4中。

[0197] 表4: 用于筛选抗体的潜在可制造性问题的序列倾向基序:

[0198]

倾向	基序	结果
未配对的半胱氨酸	C	加合物形成、活性损失、置 乱、聚集、过程不一致性
脱酰胺	NG	活性损失、聚集、过程不一 致性
N-糖基化	NXS/T, X 不是 P	如果严重唾液酸化则对 PK
酪氨酸硫酸化	Neg-Neg-Y-Neg-Neg	活性损失、过程不一致性
水解 Asp-Pro	DP	片段化、稳定性
甲硫氨酸氧化	M	活性损失、聚集

[0199]	色氨酸氧化	W	光敏性、活性损失
	脱酰胺	NS、QG、NN	活性损失、聚集、过程不一致性
	天冬氨酸盐异构化	DG、DS、DQ、DK	活性损失、聚集

[0200] 表5显示了ABC\_HG1D01、ABC\_HG1D02、ABC\_HG1D03的人源化构建体的示例。通过将小鼠抗体的CDR移植到具有最高序列同源性的人构架序列上来进行人源化。

[0201] 表5:人源化后选定抗体的可变区的氨基酸序列:

[0202]	ABC_HG1D02-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTNYF IEWVRQRPQGQGLEWMGVINPGSGGT NYNEKFKGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARPGHFHDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:52)
	ABC_HG1D02-VK	EIVLTQSPPTLSLSPGERATLSCSASSSISNYLHW YQQKPGFAPRLLIYKTSNLAGIPPRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGNSIPRTFG QGTKVEIKRTV (SEQ ID NO:53)
	ABC_HG1D03-VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHN MHWVKQATGQGLEWFGFINPNTGVT RYNQKFQGRVTLTINKAISTAYLELSSLRSEDTA VYYCARDYYGSAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:54)
	ABC_HG1D03-VK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLYSSDQ KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYNYPTFGGGTKV (SEQ ID NO:55)

[0203] 可以在人源化构建体中引入反突变以提高亲和力。此外,可以对CDR区域进行保守突变以提高亲和力、效力或生物物理特性。

[0204] 表6汇总了可以对CDR区域进行的保守突变的列表。

[0205] 表6:示例性保守取代:

	保守的		保守的
残基	取代	残基	取代
Ala (A)	Ser (S)	Leu (L)	Ile (I) 、Val (V)
Arg (R)	Lys (K)	Lys (K)	Arg (R) 、Gln (Q)
Asn (N)	Gln (Q) ;His (H)	Met (M)	Leu (L) 、Ile (I)
Asp (D)	Glu (E)	Phe (F)	Met (M) 、Leu (L) 、Tyr (Y)
Cys (C)	Ser (S)	Ser (S)	Thr (T) ;Gly (G)

Gln (Q)	Asn (N)	Thr (T)	Ser (S) 、Val (V)
Glu (E)	Asp (D)	Trp (W)	Tyr (Y)
Gly (G)	Pro (P)	Tyr (Y)	Trp (W) 、Phe (F)
His (H)	Asn (N) 、Gln (Q)	Val (V)	Ile (I) 、Leu (L)
Ile (I)	Leu (L) 、Val (V)	Pro (P)	—

[0207] 通过将小鼠可变区克隆到人IgG恒定构架上产生作为嵌合体的抗体,并在功能测定中对所述抗体进行测试以确定所述抗体对人T细胞的功能活性,如本文所述。

[0208] 实施例3:通过表位作图表征抗体结合位点

[0209] 当根据单克隆抗体与彼此竞争的能力进行分箱时,发现所述单克隆抗体都与相同的表位结合。通过肽图谱进一步分析ABC-G1D03的结合位点以鉴定特异性结合表位,并且发现其结合具有以下氨基酸序列的肽:“PLNFSRI”(SEQ ID NO:56)。该图谱如图1所示。

[0210] 该序列可以作图到蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/structure/3FF7>)中保藏的KLRG1的三维晶体结构上以揭示结合位点。图2汇总了表位图谱结果,并高亮显示了抗体结合位点不同于已知的配体结合位点。具体地,图2示出了KLRG1(20)与源自PDB晶体结构3ff7的E-钙粘蛋白(30)结合的三维表示。图2中高亮显示的KLRG1的不同区域(40)对应于由KLRG1上的氨基酸“PLNFSRI”(SEQ ID NO:56)定义的ABC\_G1D03的结合位点。图2中高亮显示的第二区域(50)对应于KLRG1与E-钙粘蛋白之间的结合界面。

[0211] 实施例4:通过FACS测量与表达KLRG1的细胞结合的抗体

[0212] 通过FACS进行抗KLRG1单克隆抗体与表达人和食蟹猴KLRG1的细胞的结合。稳定转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞以表达全长人KLRG1(CHO-人-KLRG1)和食蟹猴KLRG1(CHO-食蟹猴-KLRG1)。通过以下方式测定EC50值:孵育在约1nM至约100nM的浓度范围内的不同浓度的抗KLRG1单克隆抗体,以及使用直接与荧光探针缀合的抗小鼠检测抗体测量标记细胞的荧光。表7汇总了针对选定抗体测量的EC50结合数据。

[0213] 表7:FACS测量的MAB的结合EC50:

SEQ ID	FACS 结合 EC50 (nM)	
	人 EC50	食蟹猴 EC50
ABC_G1D01	4.87	3.44
ABC_G1D02	9.11	10.1
ABC_G1D03	6.3	8.63
ABC_G1D04	212.9	7.2
ABC_G1D05	5.15	5.93
ABC_G1D06	72.5	3.4

[0215] 实施例5:结合动力学的测量

[0216] 通过Octet® Systems (ForteBio)测定人源化抗体对人和食蟹猴KLRG1的结合动力学。Octet®平台包括用于分析96孔和384孔微孔板中的生物分子相互作用的仪器、生物传感器、试剂和测定试剂盒,以用于实时、无标记分析来确定亲和力、动力学和浓度。实验设置包括将生物素化的重组抗原(人KLRG-ECD或食蟹猴-KLRG1-ECD)固定在链霉亲和素Octet®传感器上,以产生负载抗原的传感器。然后可使装载的传感器暴露于OCET®仪器中约

100nM至约0.1nM的不同浓度的每种人源化抗体,并且收集数据大约600秒以测量抗体/抗原复合物的缔合动力学(Kon)。此后,可将传感器暴露于不含抗体的1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液中约600秒,以观察解离动力学(kdis)。然后,可以使用例如ForteBio分析软件将所得数据与1:1结合动力学模型拟合以计算KD。由该方法导出的三种人源化抗体的动力学结合参数汇总在表8中。

[0217] 表8:通过OCTET测量的选定MAB的结合亲和力:

抗原	抗体	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)
人 KLRG1	ABC_HG1D 02	5.41E+5	3.07E-5	5.67E-11
	ABC_HG1D 03	3.80E+5	5.91E-5	1.56E-10
	ABC_HG1D 04	5.05E+5	1.25E-4	2.48E-10
食蟹猴 KLRG1	ABC_HG1D 02	3.67E+5	1.42E-4	3.88E-10
	ABC_HG1D 03	6.27E+5	3.82E-5	6.09E-11
	ABC_HG1D 04	5.85E+5	4.74E-5	8.10E-11

[0219] 实施例6:用于KLRG1结合抗体的ADCC活性的表征

[0220] 该实施例证明针对KLRG1的非阻断抗体对T细胞活性没有影响,因此在功能上不同于阻断抗体,所述阻断抗体干扰KLRG1与其配体之间的相互作用,并且导致对人CD8+T细胞的激活效应,如通过干扰素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )的产生测量的。

[0221] 本文KLRG1阻断抗体被定义为与KLRG1细胞外结构域结合,并与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白有效竞争结合KLRG1。相反,非阻断抗体被定义为结合KLRG1的细胞外结构域但不与E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白或R-钙粘蛋白竞争结合KLRG1的抗体。

[0222] 为了证明KLRG1阻断对免疫系统的细胞的不同功能效应,从健康供体中分离CD8+T细胞,并在与共表达CD3激动剂和E-钙粘蛋白(eAPC)的CHO细胞系的共培养中进行测试。该测定通过向T细胞提供两个(2)个竞争信号来工作,其中CD3刺激被E-钙粘蛋白的抑制效应抵消。当KLRG1信号传导被抗KLRG1抗体阻断时,抑制信号被破坏,并且T细胞根据其与细胞表面上表达的CD3激动剂的相互作用而被激活。通过ELISA测量干扰素 $\gamma$ 分泌,并且结果汇总在图3中。该数据表明E-钙粘蛋白对人T细胞有抑制效应,所述抑制效应可以通过用阻断抗体阻断KLRG1信号传导来逆转。也说明非阻断抗体没有刺激效应。

[0223] 实施例7:在非人灵长类动物中使用非阻断抗KLRG1抗体选择性体内耗竭KLRG1阳性T细胞

[0224] 该实施例证明了非阻断抗KLRG1抗体可用于选择性耗竭KLRG1阳性T细胞,与此同时节约正常免疫功能所必需的其他淋巴细胞,诸如调节性T细胞和初始T细胞。在本实施例中,以葡糖基化形式产生抗体ABC-HG1D03,并通过皮下施用途径施用于食蟹猴。

[0225] 表9汇总了研究设计,包括每个同期群的动物数量、投配量和投配方案:

	组别	测试材料	剂量水平		主要研究(28天)	
			(mg/kg/天)	(天数)	男性	女性
[0226]	1	对照	0	1、8、15、22	5	5
	2	ABC-HG1D03	0.1	1、8	3	3
	3	ABC-HG1D03	0.3	1、8	3	3
	4	ABC-HG1D03	10	1、8、15、22	3	3
	5	ABC-HG1D03	30	1、8、15、22	5	5

[0227] 为了监测岩藻糖基化ABC-HG1D03对不同免疫细胞的效应,使用流式细胞术对食蟹猴全血中的循环淋巴细胞进行免疫表型分型。

[0228] 图4高亮显示了KLRG1阳性细胞的鉴定方案以及T细胞作为原始细胞(CCR7+)或效应细胞(CCR7-)的分类。如已发表数据(Koch等人,2008,Legat等人,2013)中所确定的,图4的流式细胞术数据显示KLRG1主要在CCR7效应T细胞的亚群上表达。图4的流式细胞仪数据还显示,与初始T细胞(TN和TCM)(其是CCR7+)相比,KLRG1在效应T细胞(TEM和TEMRA)上差异表达,所述效应T细胞是CCR7-。本领域技术人员将认识到,中枢记忆T细胞(TCM)表达CCR7,而效应记忆(TEM)T细胞缺乏CCR7的表达。在人类中,但不在小鼠中,有第三个T细胞记忆子集TEMRA,其包括表达CD45RA但缺乏CCR7表达的细胞。<sup>2</sup>

[0229] 图5的流式细胞术数据通过将对照动物与以30mg/kg投配的动物进行比较,例示了对食蟹猴体内施用ABC-HG1D03的耗竭效应。该数据显示与对照相比在投配ABC-HG1D03的动物中耗竭了KLRG1+细胞,证明了效应T细胞,而不是初始T细胞的选择性耗竭。对来自非人灵长类全血的CD8<sup>+</sup>T细胞的流式细胞术分析突出显示了ABC-HG1D03对KLRG1+T细胞的耗竭效应。值得注意的是,KLRG1阳性细胞对应于效应子表型,并且施用ABC-HG1D03导致该隔室的完全但选择性的耗竭。

[0230] 所有投配的动物中KLRG1+CD8<sup>+</sup>T细胞的平均%在图6中绘制成曲线。如图所示,ABC-HG1D03对KLRG1+CD8<sup>+</sup>T细胞的耗竭有剂量依赖性效应。

[0231] 图7例示了来自向食蟹猴施用ABC-HG1D03的调节性T细胞节约效应。该数据显示对于所测试的投配组,在28天的时段内KLRG1耗竭治疗对调节性T细胞没有影响。Treg可被视为CD4<sup>+</sup>T细胞的另一个亚群,其作用是调节和抑制,而不是诱导和促进免疫应答。

[0232] 本领域技术人员将基于上述实施方案理解本公开的进一步特征和优点。因此,除了由所附权利要求指出的以外,本公开不受已经具体示出和描述的内容的限制。本文引用的所有出版物和参考文献的全文都以引用方式明确并入本文。引用参考文献并不意味着承认这些参考文献是本公开的现有技术。

<sup>2</sup> (Willinger, T.等人, Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8<sup>+</sup>T Cell Subsets. J Immunol 2005; 175:5895-5903; doi: 10.4049/jimmunol.175.9.5895  
http://www.jimmunol.org/content/175/9/5895

[0233]

[0234] 参考文献



- [0235] 1.Akbar AN,Henson SM.Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity?Nat Rev Immunol.2011;11(4):289-95.
- [0236] 2,Amemiya K,Granger RP,Dalakas MC.Clonal restriction of T-cell receptor expression by infiltrating lymphocytes in inclusion body myositis persists over time.Studies in repeated muscle biopsies.Brain:a journal of neurology.2000;123(Pt 10):2030-9.
- [0237] 3.Apetoh L,Smyth MJ,Drake CG,Abastado JP,Apte RN,Ayyoub M,et al.Consensus nomenclature for CD8 T cell phenotypes in cancer.Oncoimmunology.2015;4(4):e998538.
- [0238] 4.Arahata K,Engel AG.Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies.I:Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells.Ann Neurol.1984;16(2):193-208.
- [0239] 5.Arahata K,Engel AG.Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies.III:Immunoelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury.Ann Neurol.1986;19(2):112-25.
- [0240] 6.Arahata K,Engel AG.Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies.IV:Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis.Ann Neurol.1988;23(2):168-73.
- [0241] 7.Attig S,Hennenlotter J,Pawelec G,Klein G,Koch SD,Pircher H,et al.Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas.Cancer Res.2009;69(21):8412-9.
- [0242] 8.Betjes MG,Meijers RW,de Wit EA,Weimar W,Litjens NH.Terminally differentiated CD8+T<sub>H</sub>1 cells are associated with the risk for acute kidney allograft rejection.Transplantation.2012;94(1):63-9.
- [0243] 9.Bisping G,Lugering N,Lutke-Brintrup S,Pauels HG,Schurmann G,Domschke W,et al.Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells.Clinical and experimental immunology.2001;123(1):15-22
- [0244] 10.Blanco P,Viallard JF,Pellegrin JL,Moreau JF.Cytotoxic T lymphocytes and autoimmunity.Current opinion in rheumatology.2005;17(6):731-4.
- [0245] 11.Brunner SM,Rubner C,Kesselring R,Martin M,Griesshammer E,Ruemmele P,et al.Tumor-infiltrating,interleukin-33-producing effector-memory CD8(+) T cells in resected hepatocellular carcinoma prolong patient survival.Hepatology.2015;61(6):1957-67.
- [0246] 12.Bueno V,Pestana JO.The role of CD8+T cells during allograft rejection.Brazilian journal of medical and biological research=Revista

brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica[et al].2002;35(11):1247-58.

[0247] 13.Carvalho H,Duarte C,Silva-Cardoso S,daSilva JA,Souto-Carneiro MM.CD8 T cell profiles in patients with rheumatoid arthritis and their relationship to disease activity.Arthritis&rheumatology.2014;37(2):363-71.

[0248] 14.D'Asaro M,Dieli F,Caccamo N,Musso M,Porretto F,Salemo A.Increase of CCR7-CD45RA+CD8 T cells(T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease.Leukemia.2006;20(3):545-7.

[0249] 15.Faustman DL,Davis M.The primacy of CD8 T lymphocytes in type 1 diabetes and implications for therapies.Journal of molecular medicine.2009;87(12):1173-8.

[0250] 16.Friese MA,Fugger L.Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis.Ann Neurol.2009;66(2):132-41.

[0251] 17.Greenberg SA,Pinkus JL,Amato AA,Kristensen T,Dorfman DM.Association of inclusion body myositis with T cell large granular lymphocytic leukaemia.Brain:a journal of neurology.2016;139:1348-1360.

[0252] 18.Guthmann MD,Tal M,Pecht I.A new member of the C-type lectin family is a modulator of the mast cell secretory response.Int Arch Allergy Immunol.1995;107(1-3):82-6.

[0253] 19.Hijnen D,Knol EF,Gent YY,Giovannone B,Beijn SJ,Kupper TS,et al.CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma,IL-13,IL-17,and IL-22.J Invest Dermatol.2013;133(4):973-9.

[0254] 20.Hofmann M,Schweier O,Pircher H.Different inhibitory capacities of human and mouse KLRG1 are linked to distinct disulfide-mediated oligomerizations.Eur J Immunol.2012;42(9):2484-90.

[0255] 21.Kita H.Autoreactive CD8-specific T-cell response in primary biliary cirrhosis.Hepatology research:the official journal of the Japan Society of Hepatology.2007;37Suppl 3:S402-5.

[0256] 22.Koch S,Larbi A,Derhovanessian E,Ozcelik D,Naumova E,Pawelec G.Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people.Immun Ageing.2008;5:6.

[0257] 23.Lamy T,Loughran TP,Jr.How I treat LGL leukemia.Blood.2011;117(10):2764-74.

[0258] 24.Legat A,Speiser DE,Pircher H,Zehn D,Fuertes Marraco SA.Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells.Front Immunol.2013;4:455.

[0259] 25.Melis L, Van Praet L, Pircher H, Venken K, Elewaut D. Senescence marker killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) contributes to TNF-alpha production

by interaction with its soluble E-cadherin ligand in chronically inflamed joints. *Ann Rheum Dis*.2014;73 (6) :1223-31.

[0260] 26.Muller S,Lory J,Corazza N,Griffiths GM,Z'Graggen K,Mazzucchelli L, et al.Activated CD4+and CD8+cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *The American journal of pathology*.1998;152 (1) :261-8.

[0261] 27.Okajima M,Wada T,Nishida M,Yokoyama T,Nakayama Y,Hashida Y, et al.Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clinical and experimental immunology*.2009;155 (2) :166-72

[0262] 28.Schirmer M,Goldberger C,Wurzner R,Duftner C,Pfeiffer KP,Clausen J, et al.Circulating cytotoxic CD8 (+) CD28 (-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis research*.2002;4 (1) :71-6.

[0263] 29.Takata K,Hong ME,Sitthinamsuwan P,Loong F,Tan SY,Liau JY, et al.Primary cutaneous NK/T-cell lymphoma,nasal type and CD56-positive peripheral T-cell lymphoma:a cellular lineage and clinicopathologic study of 60 patients from Asia. *The American journal of surgical pathology*.2015;39 (1) :1-12.

[0264] 30.Tessmer MS,Fugere C,Stevenaert F,Naidenko OV,Chong HJ,Leclercq G, et al.KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *International immunology*.2007;19 (4) :391-400

[0265] 31.Trevini MA,Teixeiro E,Bragado R.CD8+T cells oligoclonally expanded in synovial fluid at onset of spondyloarthritis selectively proliferate in response to self-antigens:characterization of cell specificities in nonclonal populations. *The Journal of rheumatology*.2004;31 (10) :1962-72.

[0266] 32.Voehringer D,Koschella M,Pircher H.Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood*.2002;100 (10) :3698-702.

[0267] 33.Xing L,Dai Z,Jabbari A,Cerise JE,Higgins CA,Gong W, et al.Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med*.2014;20 (9) :1043-9.

[0268] 34.Willinger T, et al.Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *J Immunol* 2005;175:5895-5903; doi:10.4049/jimmunol.175.9.5895 <http://www.jimmunol.org/content/175/9/5895>.

[0269] 35.Yamauchi C,Fujii S,Kimura T,Kuwata T,Wada N,Mukai H,Matsumoto N, Fukayama M,Ochiai A.E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through killer cell lectin-like receptor G1 on natural killer cells. *Int J Cancer*.2011;128 (9) :2125-37.

[0270] 36. Yu HG, Lee DS, Seo JM, Ahn JK, Yu YS, Lee WJ, et al. The number of CD8+ T cells and NKT cells increases in the aqueous humor of patients with Behcet's uveitis. *Clinical and experimental immunology*. 2004;137(2):437-43.

[0271] 37. Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, et al. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2004;172(8):5120-7.

## 序列表

- <110> 阿波科有限责任公司 (Abcuro, Inc.)  
 <120> 杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1 (KLRG1)  
 耗竭抗体  
 <130> 117872-6  
 <150> 62/831,713  
 <151> 2019-04-09  
 <160> 86  
 <170> PatentIn第3.5版  
 <210> 1  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> KLRG1细胞外结构域  
 <400> 1

```

Leu Cys Gln Gly Ser Asn Tyr Ser Thr Cys Ala Ser Cys Pro Ser Cys
1           5           10           15
Pro Asp Arg Trp Met Lys Tyr Gly Asn His Cys Tyr Tyr Phe Ser Val
           20           25           30
Glu Glu Lys Asp Trp Asn Ser Ser Leu Glu Phe Cys Leu Ala Arg Asp
           35           40           45
Ser His Leu Leu Val Ile Thr Asp Asn Gln Glu Met Ser Leu Leu Gln
           50           55           60
Val Phe Leu Ser Glu Ala Phe Cys Trp Ile Gly Leu Arg Asn Asn Ser
65           70           75           80
Gly Trp Arg Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Asn Phe Ser Arg Ile Ser
           85           90           95
Ser Asn Ser Phe Val Gln Thr Cys Gly Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu
           100          105          110
Gln Ala Ser Ser Cys Glu Val Pro Leu His Trp Val Cys Lys Lys Val
           115          120          125
Arg Leu
           130
<210> 2
<211> 130
<212> PRT
  
```

<213> 食蟹猴 (CYNOMOLGUS MONKEY)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> KLRG1细胞外结构域

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 728

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> E-钙粘蛋白全长

<400> 3

```

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

```

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

370	375	380
Thr Gly Ala Ile Ser	Thr Arg Ala Glu Leu Asp	Arg Glu Asp Phe Glu
385	390	395
His Val Lys Asn Ser	Thr Tyr Thr Ala Leu Ile	Ile Ala Thr Asp Asn
	405	410
Gly Ser Pro Val Ala	Thr Gly Thr Gly Thr	Leu Leu Leu Ile Leu Ser
	420	425
Asp Val Asn Asp Asn	Ala Pro Ile Pro Glu Pro	Arg Thr Ile Phe Phe
	435	440
Cys Glu Arg Asn Pro	Lys Pro Gln Val Ile	Asn Ile Ile Asp Ala Asp
	450	455
Leu Pro Pro Asn Thr	Ser Pro Phe Thr Ala	Glu Leu Thr His Gly Ala
	465	470
Ser Ala Asn Trp Thr	Ile Gln Tyr Asn Asp	Pro Thr Gln Glu Ser Ile
	485	490
Ile Leu Lys Pro Lys	Met Ala Leu Glu Val	Gly Asp Tyr Lys Ile Asn
	500	505
Leu Lys Leu Met Asp	Asn Gln Asn Lys Asp	Gln Val Thr Thr Leu Glu
	515	520
Val Ser Val Cys Asp	Cys Glu Gly Ala Ala	Gly Val Cys Arg Lys Ala
	530	535
Gln Pro Val Glu Ala	Gly Leu Gln Ile Pro	Ala Ile Leu Gly Ile Leu
	545	550
Gly Gly Ile Leu Ala	Leu Leu Ile Leu Ile	Leu Leu Leu Leu Leu Phe
	565	570
Leu Arg Arg Arg Ala	Val Val Lys Glu Pro	Leu Leu Pro Pro Glu Asp
	580	585
Asp Thr Arg Asp Asn	Val Tyr Tyr Tyr Asp	Glu Glu Gly Gly Gly Glu
	595	600
Glu Asp Gln Asp Phe	Asp Leu Ser Gln Leu	His Arg Gly Leu Asp Ala
	610	615
Arg Pro Glu Val Thr	Arg Asn Asp Val Ala	Pro Thr Leu Met Ser Val
	625	630
Pro Arg Tyr Leu Pro	Arg Pro Ala Asn Pro	Asp Glu Ile Gly Asn Phe
	645	650
Ile Asp Glu Asn Leu	Lys Ala Ala Asp Thr	Asp Pro Thr Ala Pro Pro
	660	665
Tyr Asp Ser Leu Leu	Val Phe Asp Tyr Glu	Gly Ser Gly Ser Glu Ala
	675	680
		685



Ala Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Glu Ser Asp Lys Asp Gln Asp  
 690 695 700  
 Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Asn Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp  
 705 710 715 720  
 Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp  
 725

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D01-VH

<400> 4

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

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D01-VK

<400> 5

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

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser			
	20	25	30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	85	90	95
Phe Tyr Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
<210>	6		
<211>	115		
<212>	PRT		
<213>	小鼠(Mouse)		
<220>			
<221>	MISC_特征		
<223>	ABC_G1D02-VH		
<400>	6		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30
Phe Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Thr Arg Pro Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser			
	115		
<210>	7		
<211>	108		

<212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D02-VK  
 <400> 7  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu  
                   35                   40                   45  
 Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser  
                   50                   55                   60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu  
 65                   70                   75                   80  
 Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Ile Pro  
                   85                   90                   95  
 Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                   105

<210> 8  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D03-VH  
 <400> 8  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His  
                   20                   25                   30  
 Asn Met His Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Phe  
                   35                   40                   45  
 Gly Phe Ile Asn Pro Asn Thr Gly Val Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Asn Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

	85		90		95
Thr Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly					
	100		105		110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala					
	115				
<210>	9				
<211>	112				
<212>	PRT				
<213>	小鼠(Mouse)				
<220>					
<221>	MISC_特征				
<223>	ABC_G1D03-VK				
<400>	9				
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Gln Thr Val Ser Val Gly					
1	5		10		15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser					
	20		25		30
Ser Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln					
	35		40		45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val					
	50		55		60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr					
65	70		75		80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln					
	85		90		95
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110
<210>	10				
<211>	119				
<212>	PRT				
<213>	小鼠(Mouse)				
<220>					
<221>	MISC_特征				
<223>	ABC_G1D04-VH				
<400>	10				
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser					
1	5		10		15
Ser Leu Met Met Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					
	20		25		30

Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Phe Ile Asp Pro Lys Asn Gly Gly Thr Leu Tyr Ser Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115  
 <210> 11  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D04-VK  
 <400> 11  
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr His Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 12  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D05-VH

<400> 12

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

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D05-VK

<400> 13

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

Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06-VH

<400> 14

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

Ser Ala

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06-VK

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D01的CDR-H1序列

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D01的CDR-H2序列

<400> 17

Asn Pro Lys Asn Gly Val  
 1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D01的CDR-H3序列

<400> 18

Asp Tyr Tyr Gly Thr Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 19



<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D01的CDR-L1序列  
 <400> 19  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ala  
 <210> 20  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D01的CDR-L2序列  
 <400> 20  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1                    5  
 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D01的CDR-L3  
 <400> 21  
 Gln Gln Phe Ser Tyr Pro Thr  
 1                    5  
 <210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D02的CDR-H1序列  
 <400> 22  
 Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

1 5  
<210> 23  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D02的CDR-H2序列  
<400> 23  
Asn Pro Gly Ser Gly Gly  
1 5  
<210> 24  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D02的CDR-H3序列  
<400> 24  
Pro Gly His Phe Asp Tyr  
1 5  
<210> 25  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D02的CDR-L1序列  
<400> 25  
Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His  
1 5 10  
<210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D02的CDR-L2序列  
<400> 26

Lys Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D02的CDR-L3序列

<400> 27

Gln Gln Gly Asn Ser Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-H1序列

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-H2序列

<400> 29

Asn Pro Asn Thr Gly Val

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-H3序列

<400> 30

Asp Tyr Tyr Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-L1序列

<400> 31

Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser Ser Asp Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-L2序列

<400> 32

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D03的CDR-L3序列

<400> 33

Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Thr

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D04的CDR-H1序列

<400> 34

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D04的CDR-H2序列

<400> 35

Asp Pro Lys Asn Gly Gly

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D04的CDR-H3序列

<400> 36

Asp Tyr Tyr Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D04的CDR-L1序列

<400> 37

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Thr Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D04的CDR-L2序列  
<400> 38  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5  
<210> 39  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小鼠 (Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D04的CDR-L3序列  
<400> 39  
Gln Gln Tyr Tyr His Tyr Pro Thr  
1 5  
<210> 40  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小鼠 (Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-H1序列  
<400> 40  
Gly Phe Ser Leu Thr Thr His  
1 5  
<210> 41  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小鼠 (Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-H2序列  
<400> 41  
Ile Trp Ser Gly Gly Ser  
1 5  
<210> 42  
<211> 8

<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-H3序列  
<400> 42  
Leu Arg Leu Pro Ala Met Asp Tyr  
1 5  
<210> 43  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-L1序列  
<400> 43  
Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu His  
1 5 10  
<210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-L2序列  
<400> 44  
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小鼠(Mouse)  
<220>  
<221> MISC\_特征  
<223> ABC\_G1D05的CDR-L3序列  
<400> 45  
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Leu Ser  
1 5  
<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06的CDR-H1序列

<400> 46

Gly Tyr Lys Phe Ser Asp Tyr

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06的CDR-H2序列

<400> 47

Leu Glu Pro Ala Thr Gly Gly

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06的CDR-H3序列

<400> 48

His Leu Ala Val Tyr

1 5

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠(Mouse)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> ABC\_G1D06的CDR-L1序列

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15



<210> 50  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D06的CDR-L2序列  
 <400> 50  
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly  
 1 5  
 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mouse)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> ABC\_G1D06的CDR-L3序列  
 <400> 51  
 Val Gln Gly Thr His Ser Pro Arg Thr  
 1 5  
 <210> 52  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工(artificial)  
 <220>  
 <223> ABC\_HG1D02-VH的人源化合成序列  
 <400> 52  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Phe Ile Glu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 53

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<223> ABC\_HG1D02-VK的人源化合物合成序列

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Ile Pro  
 85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val  
 100 105 110

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<223> ABC\_HG1D03-VH的人源化合物合成序列

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His  
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Phe  
 35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Asn Thr Gly Val Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe



<400> 56  
 Pro Leu Asn Phe Ser Arg Ile  
 1 5  
 <210> 57  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 57  
 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Asp Arg Trp  
 1 5 10  
 <210> 58  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 58  
 Gly Ser Gly Ser Cys Pro Asp Arg Trp Met Lys Tyr Gly  
 1 5 10  
 <210> 59  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 59  
 Cys Pro Asp Arg Trp Met Lys Tyr Gly Asn His Cys  
 1 5 10  
 <210> 60  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征

<223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 60  
 Trp Met Lys Tyr Gly Asn His Cys Tyr Tyr Phe Ser Val  
 1                   5                   10  
 <210> 61  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 61  
 Gly Asn His Cys Tyr Tyr Phe Ser Val Glu Glu Lys Asp  
 1                   5                   10  
 <210> 62  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 62  
 Tyr Tyr Phe Ser Val Glu Glu Lys Asp Trp Asn Ser Ser Leu Glu  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 63  
 Val Glu Glu Lys Asp Trp Asn Ser Ser Leu Glu Phe Cys Leu Ala  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 64  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>

<221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 64  
 Asp Trp Asn Ser Ser Leu Glu Phe Cys Leu Ala Arg Asp Ser His  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 65  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 65  
 Ser Leu Glu Phe Cys Leu Ala Arg Asp Ser His Leu Leu Val Ile  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 66  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 66  
 Cys Leu Ala Arg Asp Ser His Leu Leu Val Ile Thr Asp Asn Gln  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 67  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 67  
 Asp Ser His Leu Leu Val Ile Thr Asp Asn Gln Glu Met Ser Leu  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 68  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> 人KLGR1的肽片段

<400> 68

Leu Val Ile Thr Asp Asn Gln Glu Met Ser Leu Leu Gln Val Phe  
1                   5                   10                   15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> 人KLGR1的肽片段

<400> 69

Asp Asn Gln Glu Met Ser Leu Leu Gln Val Phe Leu Ser Glu Ala  
1                   5                   10                   15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> 人KLGR1的肽片段

<400> 70

Met Ser Leu Leu Gln Val Phe Leu Ser Glu Ala Phe Cys Trp Ile  
1                   5                   10                   15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> MISC\_特征

<223> 人KLGR1的肽片段

<400> 71

Gln Val Phe Leu Ser Glu Ala Phe Cys Trp Ile Gly Leu Arg Asn  
1                   5                   10                   15

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 72  
 Ser Glu Ala Phe Cys Trp Ile Phe Leu Arg Asn Asn Ser Gly  
 1 5 10  
 <210> 73  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 73  
 Cys Trp Ile Gly Leu Arg Asn Asn Ser Gly Trp Arg  
 1 5 10  
 <210> 74  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 74  
 Leu Arg Asn Asn Ser Gly Trp Arg Trp Glu Asp Gly  
 1 5 10  
 <210> 75  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 75  
 Ser Gly Trp Arg Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Asn Phe  
 1 5 10  
 <210> 76  
 <211> 15



<212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 76  
 Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Asn Phe Ser Arg Ile Ser Ser Asn  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 77  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 77  
 Ser Pro Leu Asn Phe Ser Arg Ile Ser Ser Asn Ser Phe Val Gln  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 78  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 78  
 Phe Ser Arg Ile Ser Ser Asn Ser Phe Val Gln Thr Cys Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 79  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGR1的肽片段  
 <400> 79  
 Ser Ser Asn Ser Phe Val Gln Thr Cys Gly Ala Ile Asn Lys Asn  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 80

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 80  
 Phe Val Gln Thr Cys Gly Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ala  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 81  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 81  
 Cys Gly Ala Ile Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ala Ser Ser Cys Glu  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 82  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 82  
 Asn Lys Asn Gly Leu Gln Ala Ser Ser Cys Glu Val Pro Leu His  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 83  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <220>  
 <221> MISC\_特征  
 <223> 人KLGRI的肽片段  
 <400> 83  
 Leu Gln Ala Ser Ser Cys Glu Val Pro Leu His Trp Val Cys Lys  
 1                   5                   10                   15



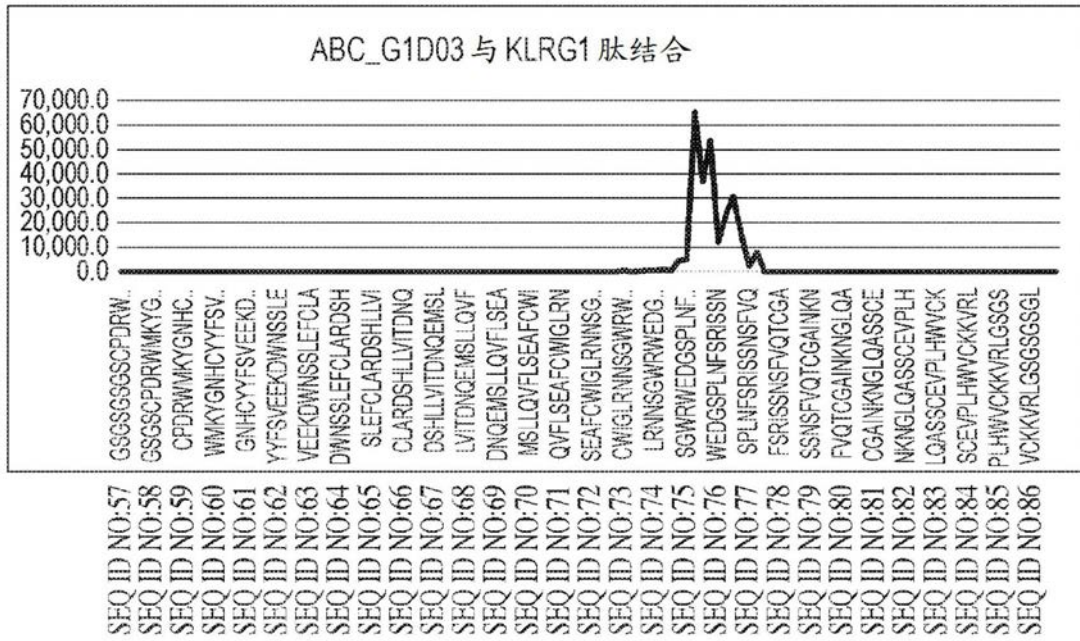


图1

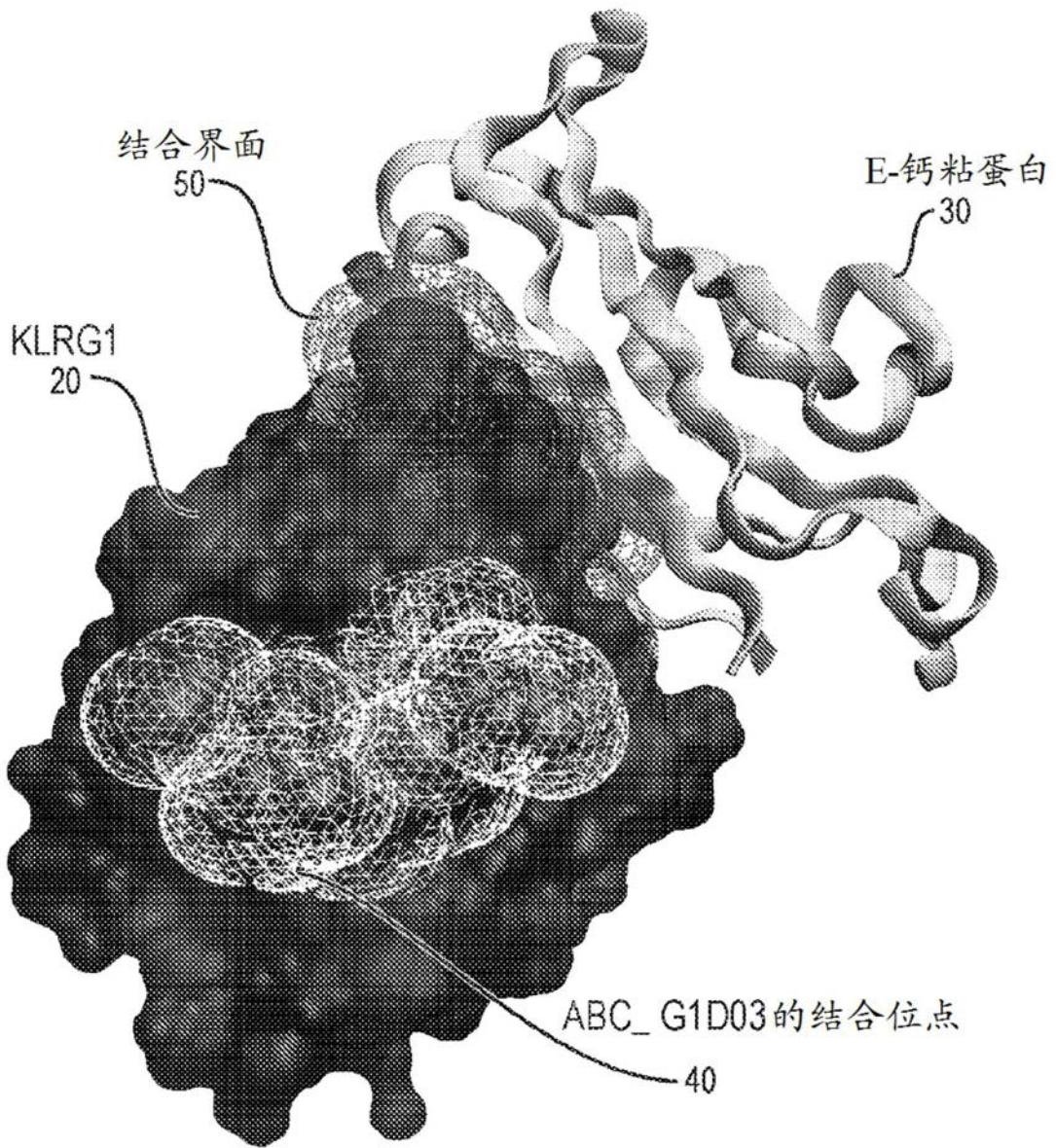


图2

样本名称	IFN $\gamma$ (pg/ml), 平行测定编号1	IFN $\gamma$ (pg/ml), 平行测定编号2
CD8 阳性对照	1624.09	1401.42
同种型	390.02	355.94
mAb023	1579.71	1389.6
ABC_G1D01	NA	NA
ABC_G1D02	763.71	628.25
ABC_G1D03	919.95	772.32
ABC_G1D04	NA	NA
ABC_G1D05	804.64	793.9
ABC_G1D06	656.08	758.43

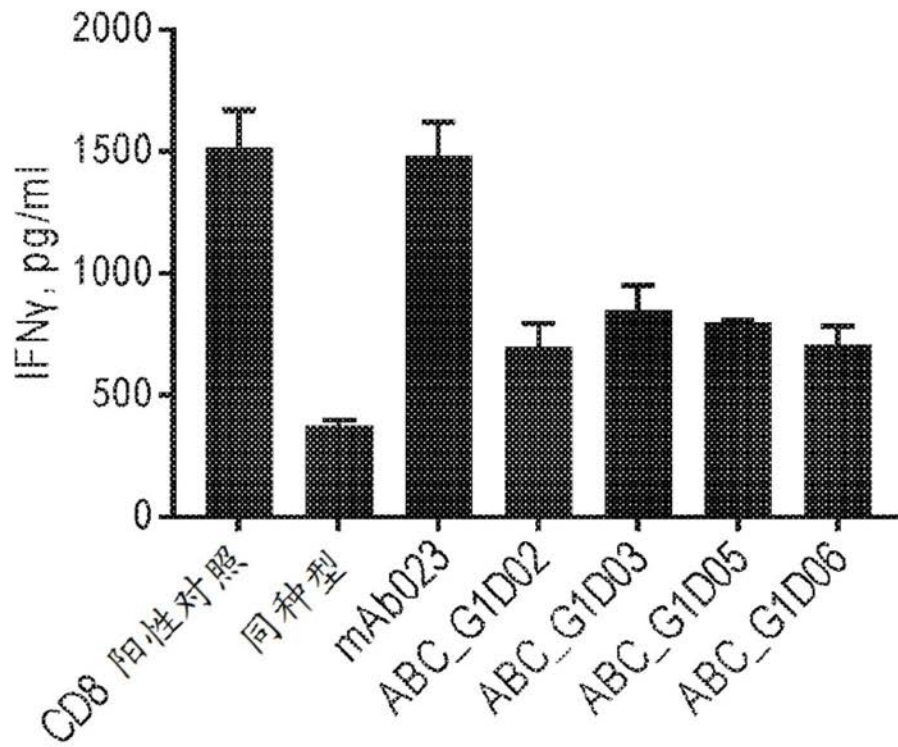


图3

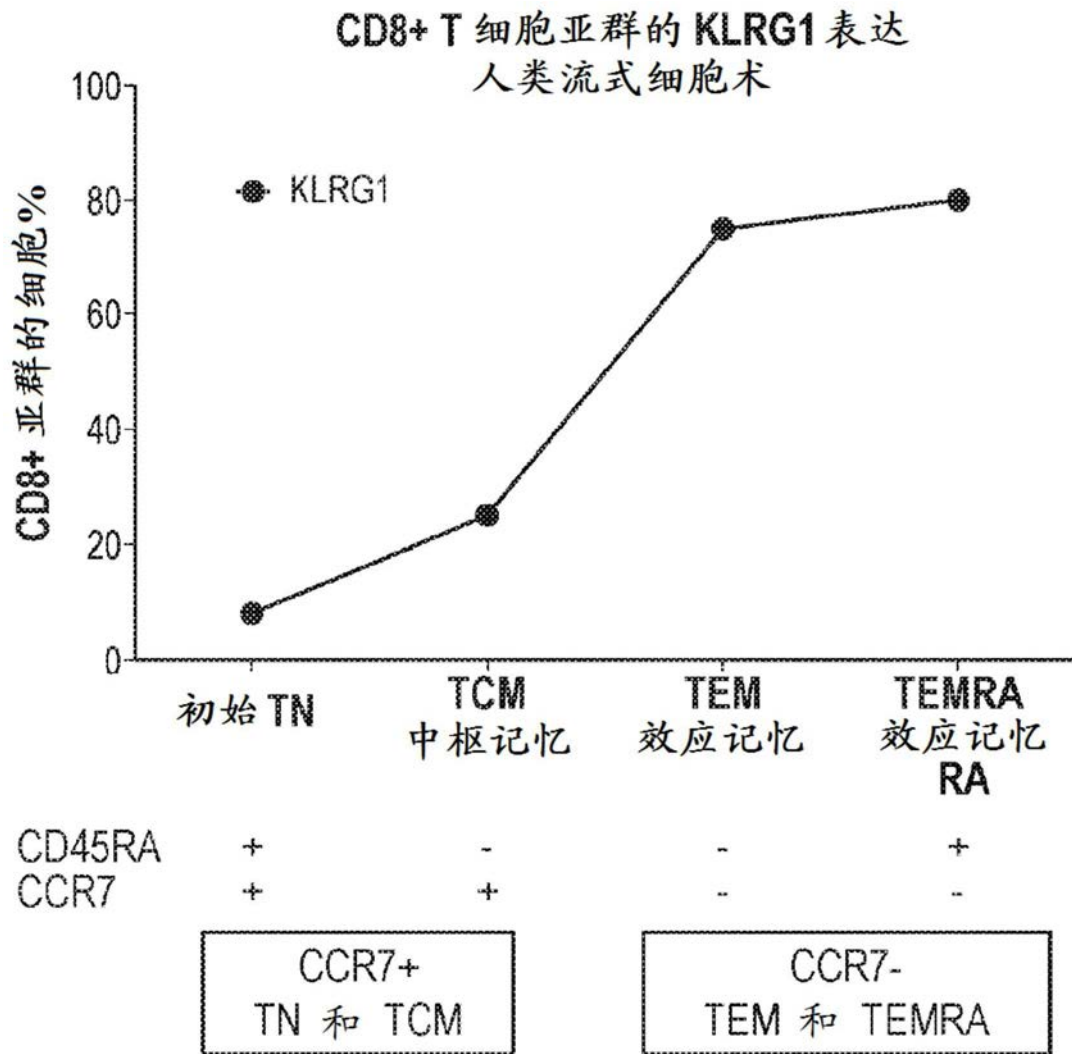


图4



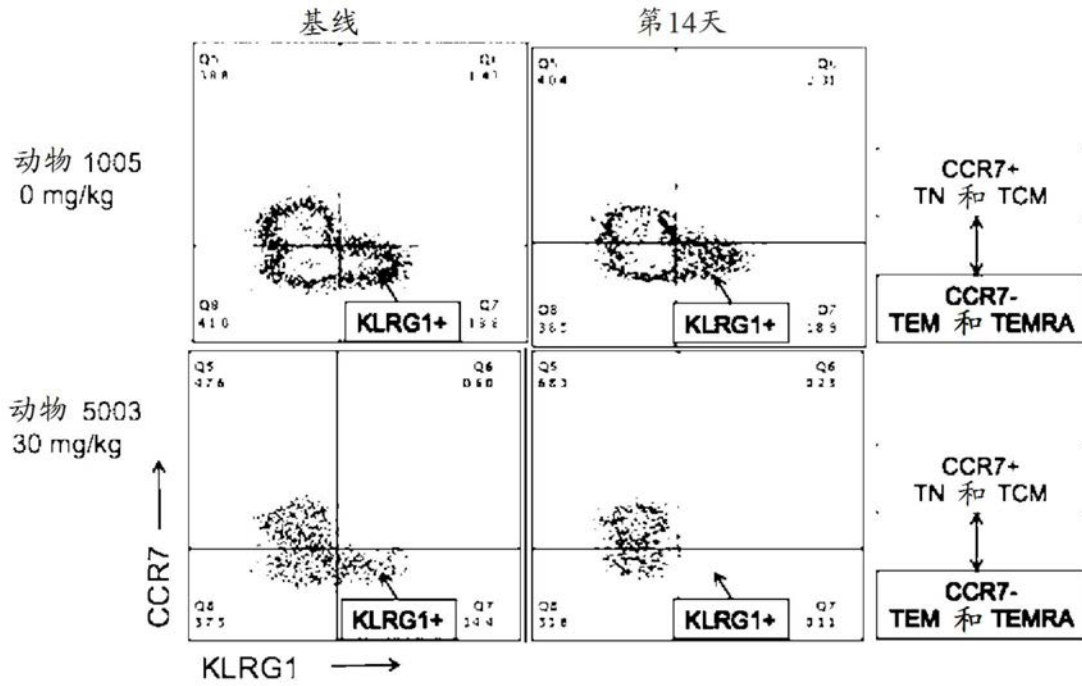


图5

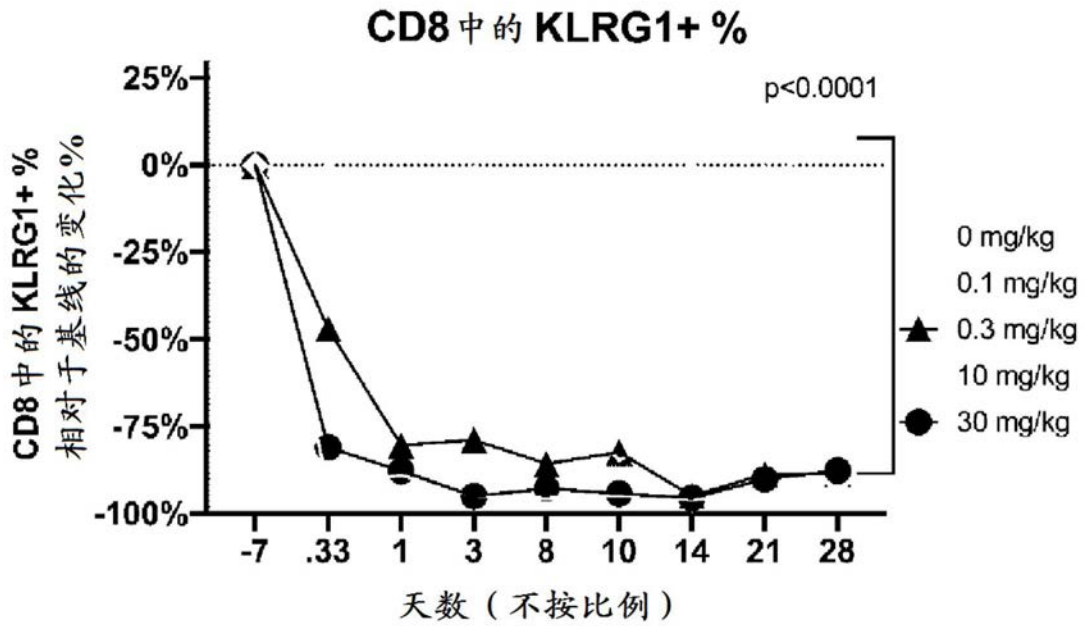


图6



4793786.1

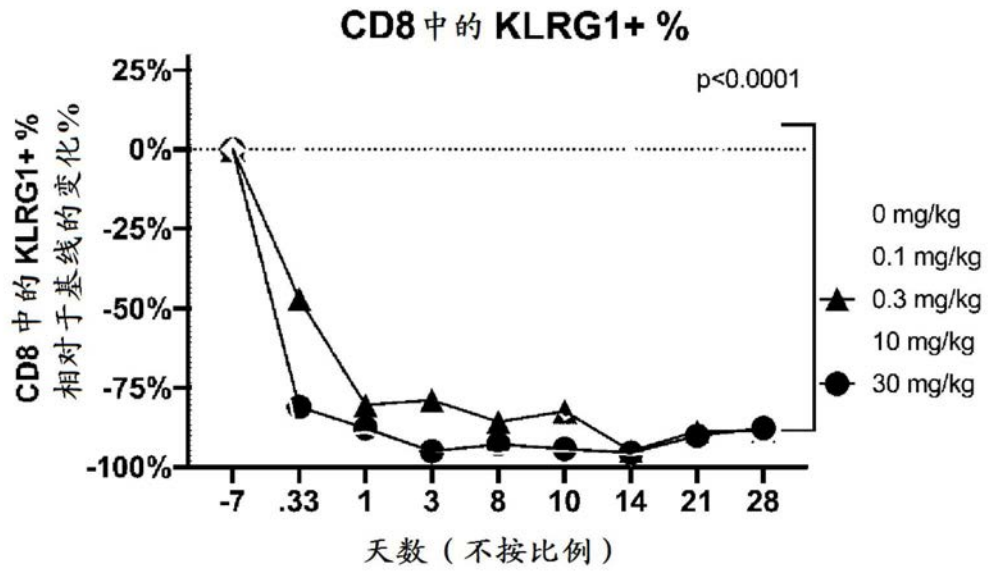


图7