



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105188749 B

(45)授权公告日 2017.12.19

(21)申请号 201380073489.9

(22)申请日 2013.12.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105188749 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(30)优先权数据
61/745,239 2012.12.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/077264 2013.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/100740 EN 2014.06.26

(73)专利权人 西雅图基因公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 T·刘易斯 C-L·劳

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 余颖 杨昀

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件

US 20110171204 A1,2011.07.14,说明书第0012-0024段和序列表.

US 20110171204 A1,2011.07.14,全文.

Wouter Korver等.The lymphoid cell surface receptor NTB-A: a novel monoclonal antibody target for leukaemia and lymphoma therapeutics.《British Journal of Haematology》.Blackwell Publishing Ltd,2007,第137卷307-318.

Patricia A. Valdez等.NTB-A, a New Activating Receptor in T Cells That Regulates Autoimmune Disease.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.,2004,第279卷(第18期),18662-18669.

审查员 朱晓乐

权利要求书1页 说明书30页

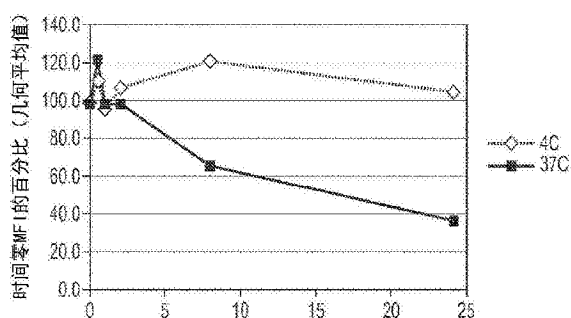
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

抗NTB-A抗体及相关组合物和方法

(57)摘要

公开了特异性结合NTB-A的抗体,包括抗体药物偶联物。还公开了使用抗NTB-A抗体检测或调节表达NTB-A的细胞的活性(如抑制其增殖)的方法,以及诊断或治疗与表达NTB-A的细胞相关的疾病或病症(如癌症)的方法。还公开了使用抗NTB-A抗体药物偶联物治疗多发性骨髓瘤的方法,所述抗体药物偶联物任选地包含本文所述的抗NTB-A抗体。



1. 一种分离的抗体,所述抗体特异性结合人NTB-A,所述抗体包含
SEQ ID NO:5所示CDR-H1氨基酸序列;
SEQ ID NO:6所示CDR-H2氨基酸序列;
SEQ ID NO:7所示CDR-H3氨基酸序列;
SEQ ID NO:8所示CDR-L1氨基酸序列;
SEQ ID NO:9所示CDR-L2氨基酸序列;以及
SEQ ID NO:10所示CDR-L3氨基酸序列。
2. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体是人源化抗体,所述人源化抗体包含
衍生自SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列构成的VH结构域的人源化VH结构域;以及
衍生自SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列构成的VL结构域的人源化VL结构域。
3. 一种分离的鼠单克隆抗体或其嵌合形式,所述抗体的VH和VL结构域分别由SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列构成。
4. 如权利要求3所述分离的鼠单克隆抗体或其嵌合形式,所述嵌合形式为人源化形式。
5. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体还包含免疫球蛋白重链恒定区的至少一部分。
6. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体包含含有VH结构域的第一多肽链和含有VL结构域的第二多肽链。
7. 如权利要求6所述的抗体,所述第一多肽链还包含与所述VH结构域融合的免疫球蛋白重链恒定区的至少一部分,且所述第二多肽链还包含与所述VL结构域融合的免疫球蛋白轻链恒定区的至少一部分。
8. 如权利要求5所述的抗体,所述重链恒定区是天然人恒定区的突变形式,其相对于所述天然人恒定区与Fc γ 受体的结合降低。
9. 如权利要求7所述的抗体,所述重链恒定区是天然人恒定区的突变形式,其相对于所述天然人恒定区与Fc γ 受体的结合降低。
10. 如权利要求5、7、8或9所述的抗体,所述重链恒定区属于选自下组的同种型:人同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。
11. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,所述抗体与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联。
12. 如权利要求10所述的抗体,所述抗体与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联。
13. 一种药物组合物,所述组合物包含:
权利要求1-12中任一项所述的抗体;以及
药学上相容的成分。
14. 权利要求1-12中任一项所述抗体用于制备药剂的用途,所述药剂用于治疗患有以NTB-A表达为特征的癌症的患者。
15. 如权利要求14所述的用途,所述癌症选自多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)和T或B细胞淋巴瘤。
16. 如权利要求15所述的用途,所述B细胞淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

抗NTB-A抗体及相关组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是非临时申请并要求2012年12月21日提交的US 61/745,239的权益,其通过引用全文纳入本文用于所有目的。

[0003] 序列表

[0004] 创建于2013年12月18日的8千字节的名称为NTBA-0011 1PC-ST25.txt的序列表通过引用纳入。

背景技术

[0005] NTB-A,一种也称为SLAMF6的单次跨膜I型膜糖蛋白,是免疫球蛋白超家族(Ig-SF)成员,属于CD2/SLAM亚家族。参见例如,Bottino等,J.Exp.Med.194:235-246,2001。在NTB-A的胞外部分中,通过N末端V型结构域以及随后的C2型结构域对其进行表征,而胞质内部分含有三个基于酪氨酸的基序:两个基于免疫受体酪氨酸的转换基序(ITSM;TxYxxV/I)和一个经典的基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM;I/V/L/SxYxxL)。参见id。通过其ITSM基序,NTB-A与SLAM相关蛋白SH2D1A的SH2结构域和相关尤因肉瘤激活转录本(EAT)2相连。参见Bottino等,同上;Falco等,Eur.J.Immunol 34:1663-1672,2004;Haig等,J.Immunol 172:6524-6527,2004。

[0006] NTB-A在自然杀伤(NK)细胞、NK样T细胞、T细胞、单核细胞、树突细胞、B细胞和嗜酸性粒细胞上表达。参见Salort JD.等,Immunology Letters 129-136,2011;Matesanz-Isabel等,Immunology Letters 104-112,2011;Munitz等,Journal of Immunology 174:110-118,2005;Bottino等,Journal of Experimental Medicine 194(3):235-246;2001。NTB-A可通过同质相互作用(即作为自身配体(self-ligand))起作用,且已证明其经由信号转导、诱导NK细胞细胞毒性作为NK细胞功能的正调节因子起作用。参见例如Bottino等,同上;Falco等,同上;Flaig等,同上。还证明NTB-A在来自慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和B细胞淋巴瘤患者的B细胞上表达。参见Korver等,British Journal of Haematology 137:307-318,2007。

发明内容

[0007] 在一个方面中,本发明提供了一种分离的抗体,其与包含VH和VL结构域的单克隆抗体(mAb)竞争特异性结合人NTB-A,所述VH和VL结构域分别具有SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列。

[0008] 在另一个方面中,本发明提供了一种分离的鼠抗体或其嵌合或人源化形式,该鼠抗体特异性结合人NTB-A且包含VH和VL结构域,所述VH和VL结构域分别具有SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列。

[0009] 在另一个方面中,本发明提供了一种分离的抗体,其结合与包含VH和VL结构域的mAb相同的人NTB-A上的表位,所述VH和VL结构域分别具有(i) SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列,或(ii) SEQ ID NO:3的残基20-137和SEQ ID

NO:4的残基21-128所示氨基酸序列。

[0010] 在另一个方面中,本发明提供了一种分离的抗体,其特异性结合人NTB-A且(a)该抗体的VH结构域包含与SEQ ID NO:1的残基20-135具有至少80%序列相同性的氨基酸序列且该抗体的VL结构域包含与SEQ ID NO:2的残基21-140具有至少80%序列相同性的氨基酸序列,或(b)该抗体的VH结构域包含与SEQ ID NO:3的残基20-137具有至少80%序列相同性的氨基酸序列且该抗体的VL结构域包含与SEQ ID NO:4的残基21-128具有至少80%序列相同性的氨基酸序列。在一些方面中,这类抗体与参考序列具有80%的相同性且包含与参考序列相同的CDR。

[0011] 在另一个方面中,本发明提供了一种分离的抗体,其特异性结合人NTB-A且其VH和VL结构域分别衍生自:(a)具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域,或(b)具有SEQ ID NO:3的残基20-137所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VL结构域。

[0012] 在一些实施方式中,本发明的抗体特异性结合人NTB-A且其CDR与分别具有SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VH/VL结构域相同。例如,在某些实施方式中,该抗体包含分别由SEQ ID NO:5-10所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。在其他实施方式中,该抗体的与分别具有SEQ ID NO:3的残基20-137和SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VH/VL结构域相同。在一些这类变化中,该抗体包含分别由SEQ ID NO:11-16所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。

[0013] 在其他实施方式中,本发明的抗体特异性结合人NTB-A且包含一组CDR(CDR CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),所述一组CDR相对于第二组CDR具有三个或更少个氨基酸取代(优先保守性取代),其中第二组CDR来自具有分别由(i) SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140或(ii) SEQ ID NO:3的残基20-137和SEQ ID NO:4的残基21-128所示的氨基酸序列的VH/VL结构域。在特定变化形式中,该第二组CDR包含分别由SEQ ID NO:5-10或SEQ ID NO:11-16所示CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。在一些方面中,该抗体与包含分别具有SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VH和VL结构域的单克隆抗体(mAb)竞争特异性结合人NTB-A。

[0014] 在某些变化形式中,本发明的抗体特异性结合人NTB-A并且是包含人源化VH和VL结构域的人源化抗体。例如,该人源化VH/VL结构域可分别衍生自(i)具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域,或分别衍生自(ii)具有SEQ ID NO:3的残基20-137所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VL结构域。在一些这类实施方式中,该人源化抗体包含与上述VH/VL结构域相同的CDR。在具体变化形式中,衍生自上文(i)所述VH和VL结构域的人源化抗体包含分别有SEQ ID NO:5-10所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列;或衍生自上文(ii)所述VH和VL结构域的人源化抗体包含分别有SEQ ID NO:11-16所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列。在其他实施方式中,该人源化抗体(i)特异性结合人NTB-A,(ii)包含一组CDR(CDR CDR-

H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),所述一组CDR相对于第二组CDR具有三个或更少个氨基酸取代(优先保守性取代),其中第二组CDR如上文所述(即该第二组CDR包含分别由SEQ ID NO:5-10和/或SEQ ID NO:11-16所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3氨基酸序列),以及(iii)与VH和VL结构域分别具有SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的单克隆抗体(mAb)竞争特异性结合人NTB-A。

[0015] 在一些实施方式中,上述抗体还包含免疫球蛋白重链恒定区的至少一部分。该免疫球蛋白重链恒定区可以是天然人恒定区或其遗传工程改造的变体,例如相对于天然人恒定区与Fc γ 受体的结合降低的天然人恒定区的突变形式(例如具有取代E233P、L234V和L235A和/或N297D的变体(根据Kabat所述EU指数编码))。合适的重链恒定区包括人同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的那些。

[0016] 在一些实施方式中,上述抗体包含含有VH结构域的第一多肽链和含有VL结构域的第二多肽链。在一些这类变化形式中,该第一多肽链还包含与VH结构域融合的免疫球蛋白重链恒定区的至少一部分,且该第二多肽链还包含与VL结构域融合的免疫球蛋白轻链恒定区的至少一部分。该重链恒定区可以是天然人恒定区或其遗传工程改造的变体,例如相对于天然人恒定区与Fc γ 受体的结合降低的天然人恒定区的突变形式。合适的重链恒定区包括人同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的那些。

[0017] 在某些变化形式中,上述抗体与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联。

[0018] 在另一个方面中,本发明提供了一种分离的核酸,其编码上文所定义的VH结构域和/或VL结构域。本发明还提供了一种包含上述多核苷酸的表达载体,以及包含这类表达载体并可用于生产本发明的抗体的方法的宿主细胞。这类生产本发明的抗体的方法通常包括在表达抗体的条件下培养宿主细胞并从宿主细胞中分离抗体。

[0019] 在另一个方面中,本发明提供了一种药物组合物,其包含上述抗体和药学上相容的成分。

[0020] 在另一个方面中,本发明提供了一种治疗患有癌症的患者的方法,所述癌症的特征是NTB-A表达。该治疗方法通常包括给予患者有效的上述抗体的治疗方案。在某些方面中,该抗体与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联。在一些实施方式中,该癌症选自多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)和B细胞淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤(NHL))。

[0021] 在另一个方面中,本发明提供了一种治疗患有多发性骨髓瘤的患者的方法。该治疗方法通常包括给予患者特异性结合人NTB-A的抗体的有效方案,其中该抗体与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联。在一些变化形式中,该抗NTB-A抗体是上文所述的抗体。

[0022] 本发明的这些和其它方面通过参照本发明以下具体说明和附图而更为清晰。

[0023] 附图简要说明

[0024] 图1显示对U-266多发性骨髓瘤细胞系使用抗NTB-A抗体11A1的内化试验的结果。

[0025] 图2显示使用抗NTB-A抗体11A1和26B7的抗体竞争试验的结果。

[0026] 定义

[0027] 除非另有限定,在此使用的所有技术和科学术语均与本领域普通技术人员相对于所述方法和组合物的通常理解一致。本文所用的以下术语和短语具有属于它们自身的涵义,除非另有说明。

[0028] “抗体-药物偶联物”指与细胞毒剂或细胞生长抑制剂偶联的抗体。通常,抗体-药物偶联物结合细胞表面上的目标抗原(如NTB-A),随后该抗体-药物偶联物内化至细胞内并释放该药物。

[0029] “多肽”或“多肽链”是氨基酸残基通过肽键接合而成的聚合物,可为天然或合成产生。少于约10个氨基酸残基的多肽通常称作“肽”。

[0030] “蛋白”是包含一条或多条多肽链的大分子。蛋白还可包含非肽组分,如碳水化合物基团。碳水化合物和其它非肽取代基可由产生蛋白的细胞加入到蛋白中,其会随细胞类型而变化。本文在其氨基酸主链结构方面限定蛋白;取代基(例如碳水化合物基团)通常未指定,但是可以存在。

[0031] 本文使用的术语“氨基末端”和“羧基末端”指多肽中的位置。上下文允许时,这些术语根据多肽特定序列或部分使用以表示附近或相对位点。例如,多肽中相对参照序列位于羧基末端的某些序列位于参照序列的羧基末端附近,但并不必需在完整多肽的羧基末端。

[0032] 本文所用术语“抗体”指因抗原存在产生应答而由身体生产且结合该抗原的免疫球蛋白,以及其抗原结合片段和经工程改造的变体。因此,术语“抗体”包括例如完整的单克隆抗体(如使用杂交瘤技术生产的抗体)和抗原结合的抗体片段(如F(ab')₂和Fab片段)。还包括遗传工程改造的完整抗体和片段,如嵌合抗体、人源化抗体、单链Fv片段、单链抗体、双抗体、小抗体、线性抗体、多价或多特异性(如双特异性)杂交抗体等。因此,术语“抗体”广义地用于包括含有抗体的抗原结合位点且能够特异性结合其抗原的任何蛋白。术语“抗体”还包括抗体本身(“裸抗体”)或与细胞生长抑制性药物或细胞毒性药物偶联的抗体。

[0033] 术语“遗传工程改造的抗体”指其中氨基酸序列不同于天然抗体的抗体。由于抗体生成中重组DNA技术的相关性,无需限制于天然抗体中发现的氨基酸的序列;可以重新设计抗体以获得所需的特性。可能的变化形式有很多且范围为从改变仅一个或一些氨基酸到完全重新设计例如可变区或恒定区。通常进行恒定区中的变化以改进或改变诸如补体固定、与细胞相互作用和其他效应功能的特性。通常,进行可变区中的变化以改进抗原结合特性、改进可变区稳定性或降低免疫原性的风险。

[0034] “抗体的抗原结合位点”是足以结合其抗原的抗体的一部分。最小的这类区域通常是可变结构域或其遗传改造的变体。单结构域结合位点可来自驼科动物抗体(参见Muyldermans和Lauwereys, J. Mol. Recog. 12:131-140, 1999; Nguyen等, EMBO J. 19:921-930, 2000)或来自其他物种的VH结构域以生成单结构域抗体(“dAb”;参见Ward等, Nature 341:544-546, 1989; Winter等的US专利号6,248,516)。在某些变化形式中,抗原结合位点是具有天然或非天然(如诱变)产生的重链可变结构域或轻链可变结构域或其组合的仅2个互补决定区(CDR)的多肽区域(参见例如Pessi等, Nature 362:367-369, 1993; Qiu等, Nature Biotechnol. 25:921-929, 2007)。更常见的,抗体的抗原结合位点包含与共同表位结合的重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域。在本发明的上下文内,抗体除抗原结合位点外还可包含一种或多种组分,例如抗体的第二抗原结合位点(其可结合相同或不同的表位或者相同或不同的抗原)、肽接头、免疫球蛋白恒定区、免疫球蛋白铰链、两亲螺旋(参见Pack和Pluckthun, Biochem. 31:1579-1584, 1992)、非肽接头、寡核苷酸(参见Chaudri等, FEBS Letters 450:23-26, 1999)、细胞生长抑制性药物或细胞毒性药物等,且可以是单亚基或多

亚基蛋白。包含抗体的抗原结合位点的分子的示例是本领域已知的且包括例如Fv、单链Fv(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、双抗体、dAbs,小抗体、纳米抗体、Fab-scFv融合体、双特异性(scFv)₄-IgG和双特异性(scFv)₂-Fab(参见例如Hu等,Cancer Res.56:3055-3061,1996;Atwell等,Molecular Immunology 33:1301-1312,1996;Carter和Merchant,Curr.Opin.Biotechnol.8:449-454,1997;Zuo等,Protein Engineering 13:361-367,2000;以及Lu等,J.Immunol.Methods 267:213-226,2002)。

[0035] 本文所用术语“免疫球蛋白”指由一种或多种多肽组成的蛋白,所述一种或多种多肽基本由免疫球蛋白基因编码。免疫球蛋白的一种形式构成了脊椎动物中天然(即自然)抗体的基本结构单元。该形式是四聚体且由两个相同的免疫球蛋白链的对组成,各对具有一条轻链和一条重链。在各对中,轻链和重链可变区(VL和VH)共同主要负责结合抗原,且恒定区主要负责抗体效应功能。在较高等的脊椎动物中已鉴定到了五种类别的免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM、IgD和IgE)。IgG包括主要类别;其通常以血浆中发现的第二丰富蛋白的形式存在。人中,IgG由四个称为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类组成。IgG类的重链恒定区被鉴定为希腊字母 γ 。例如,IgG1亚类的免疫球蛋白含有 γ 1重链恒定区。各免疫球蛋白重链都具有由恒定区蛋白结构域(CH1、铰链、CH2和CH3;IgG3还含有CH4结构域)组成的恒定区,所述恒定区蛋白结构域对于某物种中给定的亚类而言基本不变。编码人和非人免疫球蛋白链的DNA序列为本领域熟知(参见例如Ellison等,DNA 1:11-18,1981;Ellison等,Nucleic Acids Res.10:4071-4079,1982;Kenten等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:6661-6665,1982;Seno等,Nuc.Acids Res.11:719-726,1983;Riechmann等,Nature 332:323-327,1988;Amster等,Nuc.Acids Res.8:2055-2065,1980;Rusconi和Kohler,Nature 314:330-334,1985;Boss等,Nuc.Acids Res.12:3791-3806,1984;Bothwell等,Nature 298:380-382,1982;van der Loo等,Immunogenetics 42:333-341,1995;Karlin等,J.Mol.Evol.22:195-208,1985;Kindsvogel等,DNA 1:335-343,1982;Breiner等,Gene 18:165-174,1982;Kondo等,Eur.J.Immunol.23:245-249,1993;以及GenBank登录号J00228)。对于免疫球蛋白结构和功能的综述,参见Putnam,The Plasma Proteins(《血浆蛋白质》),卷V,学术出版社公司(Academic Press,Inc.),49-140,1987;以及Padlan,Mol.Immunol.31:169-217,1994。术语“免疫球蛋白”在本文中以其常用含义使用,指完整的抗体、其组成链或链的片段(取决于上下文)。

[0036] 全长免疫球蛋白“轻链”(约25kDa或214个氨基酸)在氨基末端处由可变区基因编码(编码约110个氨基酸)且在羧基末端处由 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约50kDa或446个氨基酸)由可变区基因(编码约116个氨基酸)和 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 恒定区基因(编码约330个氨基酸)编码,后者分别将抗体的同种型限定为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12或更多个氨基酸的“J”区接合,其中重链还包含约10或更多个氨基酸的“D”区(通常参见Fundamental Immunology(《基础免疫学》)(Paul编,雷文出版社(Raven Press),纽约,第2版,1989)第7章)。

[0037] 免疫球蛋白轻链或重链可变区(在本文中也分别称为“轻链可变区结构域”(“VL结构域”)或“重链可变区结构域”(“VH结构域”))由被三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)间断的“框架”区组成。框架区的功能是将用于特异性结合的CDR与抗原的表位对齐。因此,术语“高变区”或“CDR”指主要负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。从氨基末端至羧基

末端,VL和VH结构域都包含以下框架区(FR)和CDR区:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各结构域氨基酸的分配与Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (《免疫学感兴趣蛋白的序列》)(马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院(National Institutes of Health)(1987和1991))或Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917 (1987);Chothia等,Nature 342:878-883 (1989)的定义一致。Kabat还提供了广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中为不同重链之间或不同轻链之间相应的残基分配了相同的编号。VL结构域的CDR1、2和3在本文中分别称作CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3;VH结构域的CDR1、2和3在本文中分别称作CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0038] 除非上下文另有说明,否则本文所用术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”指衍生自单个克隆(包括真核、原核或噬菌体克隆)的抗体,并不限定其产生方法。

[0039] 免疫球蛋白VH或VL结构域“衍生自”参考可变结构域表示包含一些或全部CDR的遗传工程改造的VH或VL结构域完全或基本来自该参考可变结构域。在一些变化形式中,衍生的可变结构域是人源化VH或VL结构域。包含“衍生自”参考可变结构域的VH或VL结构域的抗体通常保留包含该参考可变结构域的抗体的结合特性。

[0040] 术语“人源化VH结构域”或“人源化VL结构域”指包含完全或基本来自非人供体免疫球蛋白(如小鼠或大鼠)的一些或全部CDR和完全或基本来自人免疫球蛋白序列的可变区框架序列的免疫球蛋白VH或VL结构域。提供CDR的非人免疫球蛋白称作“供体”且提供框架区的人免疫球蛋白称作“接受体”。在一些情况下,人源化抗体会保留人可变结构域框架区内的一些非人残基以增强适当的结合特性(例如,当抗体是人源化的时候,需要框架区中的突变以保留结合亲和力)。

[0041] “人源化抗体”是包含人源化VH结构域和人源化VL结构域之一或全部两个的抗体。无需存在免疫球蛋白恒定区,但如果存在,其完全或基本来自于人免疫球蛋白恒定区。

[0042] 人源化抗体中CDR“基本来自”非人抗体中相应CDR的前提是至少60%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的相应残基(由Kabat所定义)在各CDR之间相同。在其中CDR基本来自非人免疫球蛋白的人源化VH或VL结构域的特定变化形式中,相对于相应非人VH或VL CDR,人源化VH或VL结构域的CDR在全部三个CDR中具有不超过六个(例如不超过六个、不超过五个、不超过四个、不超过三个、不超过两个或不超过一个)氨基酸取代(优选保守性取代)。抗体VH或VL结构域的可变区框架序列或免疫球蛋白恒定区的序列(如果存在)分别“基本来自”人VH或VL框架区序列或人恒定区的前提是至少约80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的相应残基(由Kabat所定义)是相同的。因此,除CDR外,人源化抗体的所有部分都全部或基本来自天然人免疫球蛋白序列的各部分。

[0043] 抗体通常以分离的形式提供。这表示抗体对于生产或纯化过程中产生的干扰蛋白和其他污染物通常是至少50%w/w纯的,但不排除该抗体与过量的药学上可接受的运载体或旨在促进其使用的其他载剂混合。有时,抗体对于生产或纯化过程中产生的干扰蛋白和污染物是至少60%、70%、80%、90%、95或99%w/w纯的。

[0044] 抗体与其目标抗原的特异性结合指亲和力为至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 $10^{10}M^{-1}$ 。特异性结合在幅度上可检测地高于与至少一个不相关靶标之间的非特异性结合并可与之区分。特异性结合可以是特定空间拟合(如锁和钥匙类型)或特定官能团之间键形成的结果,而非

特异性结合通常是范德华力的结果。

[0045] 术语“表位”是指抗原上抗体与之结合的位点。表位能够由连续的氨基酸来形成或由于一个或多个蛋白三级折叠而并列的不连续的氨基酸来形成。当接触变性溶剂时,由连续氨基酸形成的表位通常保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含在独特空间构象中的至少3个或更常见的至少5个或8-10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如X-射线晶体法和二维核磁共振。参见,例如Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology (《表位作图方案》, 刊于《分子生物学方法》), 卷66, Glenn E. Morris编(1996)。

[0046] 可以在简单的免疫实验中鉴定识别相同表位或重叠的抗体, 显示一种抗体与另一种抗体竞争结合目标抗原的能力。也可通过对与抗原结合的抗体进行X射线结晶以鉴定接触残基, 从而定义抗体的表位。或者, 如果抗原中导致一个抗体的结合能力减弱或消失的所有氨基酸突变导致另一个抗体的结合能力减弱或消失, 则说明这两个抗体拥有相同的表位(前提是这类突变不产生抗原结构的全局性变化)。如果一些导致一个抗体的结合能力减弱或消失的氨基酸突变导致另一个抗体的结合能力减弱或消失, 则说明这两个抗体拥有重叠的表位。

[0047] 可通过试验确定抗体之间的竞争, 其中一个受测试的抗体抑制了参考抗体与共同抗原的特异性结合(参见例如Junghans等, Cancer Res. 50:1495, 1990)。如果在竞争性结合试验中, 过量的测试抗体(例如至少2x、5x、10x、20x或100x)抑制了参考抗体至少55%(优选75%、90%或99%)的结合, 则说明测试抗体与参考抗体之间产生竞争。竞争试验鉴定到的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合同一表位的抗体和所结合的表位与参考抗体结合的表位距离足够靠近而产生位阻的抗体。通过竞争试验鉴定的抗体还包括与参考抗体间接竞争的那些抗体, 具体方法为在目标蛋白中导致构象变化, 从而阻止参考抗体与不同于测试抗体结合的表位的结合。

[0048] 术语“表达单元”和“表达盒”在本文中可互换使用并表示编码感兴趣多肽的核酸区段且能提供该核酸区段在宿主细胞中的表达。表达单元通常包括所有可操作构型的转录启动子, 编码感兴趣多肽的开放阅读框和转录终止子。除转录启动子和终止子以外, 表达单元还可包括其它核酸区段例如增强子或聚腺苷酸信号。

[0049] 本文使用的术语“表达载体”指包括一个或多个表达单元的线性或环状核酸分子。除了一个或多个表达单元以外, 表达载体还可包括其它核酸区段, 例如一个或多个复制起点或者一个或多个选择标记。表达载体通常来源于质粒或病毒DNA, 或者可含有上述两者的元件。

[0050] 关于本文所述的蛋白, 与SEQ ID NO所指定氨基酸残基对应的氨基酸残基包括这类残基的翻译后修饰。

[0051] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物对象。

[0052] 在通过给予本文所述抗NTB-A抗体治疗表达NTB-A的疾病的上下文中, 术语“治疗有效量”指足以抑制表达NTB-A的疾病的一种或多种症状的发生或使其缓解的这类抗体的量。在“有效方案”中根据本发明的方法给予有效量的抗体。术语“有效方案”指适于实现对疾病的预防性或治疗性治疗的剂量频率和给予的抗体量的组合。

[0053] 出于将氨基酸取代分为保守性或非保守性的目的, 以下氨基酸取代被认为是保守

性取代:苏氨酸、丙氨酸或天冬酰胺取代丝氨酸;脯氨酸或丝氨酸取代苏氨酸;天冬氨酸、组氨酸或丝氨酸取代天冬酰胺;谷氨酸或天冬酰胺取代天冬氨酸;谷氨酰胺、赖氨酸或天冬氨酸取代谷氨酸;精氨酸、赖氨酸或谷氨酸取代谷氨酰胺;酪氨酸或天冬酰胺取代组氨酸;赖氨酸或谷氨酰胺取代精氨酸;异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸取代甲硫氨酸;亮氨酸、缬氨酸或甲硫氨酸取代异亮氨酸;缬氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代亮氨酸;酪氨酸或色氨酸取代苯丙氨酸;色氨酸、组氨酸或苯丙氨酸取代酪氨酸;苏氨酸取代脯氨酸;丝氨酸取代丙氨酸;谷氨酸、谷氨酰胺或精氨酸取代赖氨酸;甲硫氨酸、异亮氨酸或亮氨酸取代缬氨酸;以及苯丙氨酸或酪氨酸取代色氨酸。保守性取代还可指相同类别的氨基酸之间的取代。各类别如下:组I(疏水性侧链):met、ala、val、leu、ile;组II(中性亲水性侧链):cys、ser、thr;组III(酸性侧链):asp、glu;组IV(碱性侧链):asn、gin、his、lys、arg;组V(影响链取向的残基):gly、pro;以及组VI(芳族侧链):trp、tyr、phe。

[0054] 如果在最大对应性进行比对时两种氨基酸序列的氨基酸残基是相同的,则这两种氨基酸序列具有“100%氨基酸序列相同性”。可使用标准软件程序(如DNASTAR公司(威斯康星州麦迪逊)生产的LASERGENE生物信息学计算套件中包括的那些)来进行序列比较。用于通过确定最佳比来比较两种核苷酸或氨基酸序列的其他方法是本领域技术人员熟知的。(参见例如Peruski和Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (《因特网和新生物学:用于基因组和分子研究的工具》)(ASM出版社公司,1997);Wu等(编), *Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins* (《核酸和蛋白质的信息超高速公路和计算机数据库》)刊于 *Methods in Gene Biotechnology* (《基因生物技术方法》) 123-151 (CRC出版社公司,1997);Bishop(编), *Guide to Human Genome Computing* (《人基因组计算指南》)(第2版,学术出版社公司,1998)。)如果两条氨基酸序列相对彼此具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列相同性,则认为这两条序列具有“大体序列相同性”。

[0055] 通过Kabat编号惯例对抗体序列进行最大程度的比对以确定序列相同性百分比。比对后,如果比较的是对象抗体区域(如重链或轻链的整个可变结构域)与参考抗体的相同区域,则对象和参考抗体区域之间的序列相同性百分比为对象和参考抗体区域中被相同氨基酸所占据的位置数目除以两个区域经排列位置的总数,不计算缺口,乘以100以转化为百分数。

[0056] “包含”一种或多种所列元素的组合物或方法可包含未特别列出的其他元素。例如,包含抗体的组合物可含有单独的抗体或与其他成分联用。

[0057] 数值范围的指定包括范围内或限定该范围的所有整数。

[0058] 抗体效应功能指由Ig的Fc区所贡献的功能。这类功能可以是例如抗体依赖的细胞毒性、抗体依赖的细胞吞噬作用或补体依赖的细胞毒性。发挥这类功能的方式可以是例如Fc区与带有吞噬或裂解活性的免疫细胞上的Fc受体结合,或Fc区与补体系统的组分结合。通常,由Fc结合细胞或补体组分介导的结果导致NTB-A靶向细胞的抑制和/或消耗。抗体的Fc区可招募表达Fc受体(FcR)的细胞并使其与抗体包被的目标细胞并列。表达IgG的表面FcR的细胞包括Fc γ RIII(CD16)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RI(CD64),其能够作为效应细胞破坏IgG包被的细胞。这类效应细胞包括单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞活性、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。Fc γ R通过IgG的参与激活了抗体依赖的细胞毒性(ADCC)或抗体依

赖的细胞吞噬作用(ADCP)。ADCC由CD16⁺效应细胞通过分泌膜孔形成蛋白和蛋白酶介导,而吞噬作用由CD32⁺和CD64⁺效应细胞介导(参见Fundamental Immunology(《基础免疫学》),第4版,Paul编,林普科特瑞文出版社(Lippincott-Raven),纽约,1997,第3、17和30章;Uchida等,2004,J.Exp.Med.199:1659-69;Akewanlop等,Cancer Res.61:4061-65,2001;Watanabe等,Breast Cancer Res.Treat.53:199-207,1999)。除ADCC和ADCP外,细胞结合抗体的Fc区也可以激活补体经典通路以引发补体依赖的细胞毒性(CDC)。当补体系统的C1q与抗原形成复合物时,其结合抗体的Fc区。C1q与细胞结合抗体的结合能够起始涉及C4和C2蛋白水解激活的多个事件以生成C3转化酶。由C3转化酶将C3切割为C3b的过程激活了包括C5b、C6、C7、C8和C9的终端补体组分。总体来说,这些蛋白在抗体包被的细胞上形成了膜攻击复合物孔。这些孔破坏了细胞膜的完整性,从而杀死目标细胞(参见Immunobiology(《免疫学》),第6版,Janeway等,加兰德科学出版社(Garland Science),纽约,2005,第2章)。

[0059] 术语“抗体依赖的细胞毒性”或“ADCC”指一种诱导细胞死亡的机制,该机制依赖抗体包被的目标细胞与带有裂解活性的免疫细胞(也称为效应细胞)之间的相互作用。这类效应细胞包括自然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。效应细胞通过其抗原结合位点与结合在目标细胞上的Ig的Fc区连接。抗体包被的目标细胞的死亡是效应细胞活性的结果。

[0060] 术语“抗体依赖的细胞吞噬作用”或“ADCP”指由与Ig的Fc区结合的吞噬免疫细胞(如巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞)将抗体包被的细胞全部或部分内化的过程。

[0061] 术语“补体依赖的细胞毒性”或“CDC”指一种诱导细胞死亡的机制,其中结合目标的抗体的Fc区激活了一系列酶促反应,最终使得目标细胞的细胞膜上出现穿孔。通常,抗原-抗体复合物(如在抗体包被的目标细胞上的复合物)结合并激活补体组分C1q,C1q转而激活补体级联反应导致目标细胞死亡。补体的激活还会导致补体组分在目标细胞表面的沉积,通过结合白细胞上的补体受体(如CR3)促进ADCC。

[0062] “细胞毒性效果”指目标细胞的缺失、消除和/或死亡。“细胞毒剂”指对细胞有细胞毒性效果的试剂。细胞毒剂可与抗体偶联或与抗体共同给予。

[0063] “细胞生长抑制效果”指对细胞增殖的抑制。“细胞生长抑制剂”指对细胞具有细胞生长抑制效果,从而抑制细胞的特定子集生长和/或扩增的试剂。细胞生长抑制剂可与抗体偶联或与抗体共同给予。

[0064] 术语“药学上可接受的”指被联邦或州政府管理机构批准或可被批准,或美国药典或其它通常接受的药典所列的用于动物,更具体是用于人的。术语“药学上相容的成分”指与抗NTB-A抗体共同配制的药学上可接受的稀释剂、辅料、赋形剂或载剂。

[0065] 短语“药学上可接受的盐”指抗NTB-A抗体或其偶联物或与抗NTB-A抗体共同给药试剂的药学上可接受的有机或无机盐。示例性盐包括:硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、延胡索酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和扑酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基3-萘甲酸盐))盐。药学上可接受盐可以包含例如乙酸根离子、琥珀酸根离子、或其他抗衡离子的另一个分子。该抗衡离子可以是稳定母体化合物上电荷的任何有机或无机部分。另

外,药学上可接受盐的结构可具有超过一个的带电原子。多个带电原子是药学上可接受盐一部分的示例能有多于一个抗衡离子。因此,药学上可接受盐能有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0066] 除非上下文中另有明确说明,当某一数值表达为“约”X或“大约”X时,所示X的数值应理解为精确至 $\pm 10\%$ 。

[0067] 糖基化依赖于用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达作为潜在治疗剂的重组抗体的细胞类型在天然细胞中很少,在非天然细胞中重组表达的抗体与其天然细胞中表达的相同的主要重链和轻链序列之间可存在抗体糖基化模式的显著差异。啮齿动物来源的哺乳动物细胞系(如SP2/0、CHO或BHK)能够赋予与人糖基化具有一定程度类似性的糖基化。然而,可能缺失一些人组分(如2,6-连接的唾液酸化)且可能存在通常不在人中发现的多种其他组分,如通常不在人细胞中存在的末端唾液酸(例如NeuGc)或以通常在人细胞中缺失的方式与另一半乳糖连接的末端半乳糖(Gal-Gal结构)。与小鼠骨髓瘤细胞中表达的重组免疫球蛋白相比,CHO细胞中表达的重组IgG通常具有较少糖基化。因此,与小鼠骨髓瘤细胞系中生产的rIgG相比,CHO细胞中生产的重组IgG可含有较高水平的G0聚糖。

[0068] 抗体的糖基化结构可采用常规的糖分析技术分析,包括凝集素层析、NMR、质谱、HPLC、凝胶渗透色谱、单糖成分分析、连续酶消化,和高效阴离子交换色谱和脉冲电流分析检测,其采用高pH阴离子交换层析基于电荷分离寡糖。释放寡糖用于分析目的的方法包括酶处理(通常使用肽-N-葡萄糖苷酶F/内切- β -半乳糖苷酶)、使用苛刻碱性环境以主要释放O-连接的结构消除,和使用无水肼以释放N-和O-连接的寡糖的化学方法。

[0069] 因此,重组表达的抗体的糖基化模式可以是其中进行表达的细胞类型(如CHO)的特征且通过上述技术中任一种可区分地不同于其他细胞类型(特别是其他物种(如小鼠和人)的细胞)。

[0070] 发明详述

[0071] I. 概述

[0072] 本发明提供了特异性结合NTB-A的抗体。该抗体可用于例如治疗和诊断多种表达NTB-A的癌症,以及检测NTB-A(例如检测细胞上的NTB-A表达)。还提供了用于这类治疗、诊断和使用本发明的抗体进行NTB-A检测的方法。

[0073] 本发明还提供了一种使用特异性结合NTB-A的抗体-药物偶联物(ADC)治疗多发性骨髓瘤的方法。人们认为,本发明的发明人首先显示使用抗NTB-A ADC杀死多发性骨髓瘤细胞。用于治疗多发性骨髓瘤的抗NTB-A ADC可包括例如包含上文所述抗NTB-A抗体的ADC。在一个方面中,该方法包括给予有此需要的患者特异性结合人NTB-A的抗体,其中该抗体与细胞毒剂偶联。

[0074] II. 目标分子

[0075] 除非另有说明,NTB-A指人NTB-A。示例性人序列对应UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q96DU3。已知四种剪接变体同种型。成熟的胞外域由Q96DU3的残基22-226连接。

[0076] 除非上下文中另有明确说明,提及NTB-A时指至少蛋白的胞外结构域且通常指除可切割的信号肽(Q96DU3的氨基酸1-21)以外的完整蛋白。

[0077] III. 本发明的抗体

[0078] 在一个方面中,本发明提供了分离的抗NTBA抗体,其特异性结合成熟的NTB-A胞外

域的表位(例如位于UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q96DU3的氨基酸残基22-226内的表位)。在某些实施方式中,本发明所述的抗NTB-A抗体能够与具有与本发明发明人鉴定并分离的抗NTB-A mAb相同的VH/VL结构域的单克隆抗体竞争结合人NTB-A。在某些方面中,本发明所述的抗NTB-A抗体是本发明鉴定的鼠抗体或其嵌合或人源化形式。

[0079] 一种测量抗体与其目标抗原的亲和力的方法是测定抗体的表观解离常数。在一些方面中,本文所述抗体对NTB-A的表观解离常数(kd)为0.1nM至10nM,优选0.1nM至5nM,更优选0.1nM至2nM或0.1nM至1nM。

[0080] 鉴定并表征了小鼠抗NTB-A单克隆抗体(命名为mAb 11A1)。鼠11A1抗体是IgG1抗体。发现鼠11A1以0.13nM的kd结合NTB-A的全长胞外区(UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q96DU3的残基22-226)但不结合NTB-A同种型4(缺失登录号Q96DU3的残基18-128)。还鉴定并表征了第二抗体(命名为mAb 26B7)。发现mAb 26B7在竞争性结合试验中与mAb 11A1竞争结合人NTB-A(参见实施例5)并以0.16nM的kd结合NTB-A。确定了鼠mAb 11A1和26B7中每一个的VH、VL和VH/VL Kabat CDR氨基酸序列并在下文中描述于表1和2。11A1和26B7抗体不结合短尾猴NTB-A。

[0081] 表1:抗NTB-A mAb可变区氨基酸序列

mAb (VH/VL)	氨基酸序列†‡	SEQ ID NO:
11A1 (VH)	<u>mhcswlifflmavrlgynpsevhlgqsgaeelykpgaevklsctaaqfni</u> <u>kdyyvhwvkrteqqllewiqkldpedqelkyspkfqqeatitadtssn</u> <u>taylqlscitseedtevyycaryatyfdyweqggttlrtas</u>	1
11A1 (VL)	<u>maentllilwvlllkrsgatgdiivitaspaslaevalgckatlsckaskk</u> <u>vtifgsisahlwyyqqkpggpkliynqsklesgveerfedegqgrsq</u> <u>fgqisltitldpveaddasttyclqnkvepytfgggtklelkr</u>	2
26B7 (VH)	<u>mqswyillflvatatgvsqgqligqgaevkpgtavkleckaaqynf</u> <u>tiywinvklrpgqqllewiqdihpgrgntnlnekfkktkatitvdtss</u> <u>teymqlnsiafedesalyccarededwyfdvsgagttvtss</u>	3
26B7 (VL)	<u>mhllscililgillifcfsqyrgdiqnnqspeslaaslgdtititcrasqg</u> <u>iswfnwyqqhggqnpklllyktnlnlhtgvpprfegqegqtdftitla</u> <u>algpeditatyyclqsgsypytfgggtklelkr</u>	4

[0083] †所示氨基酸序列包括N末端信号肽(下划线)。本文中提及的这些mAb的VH和VL结构域是成熟的多肽(且不包括信号肽),除非另有明确说明。

[0084] ‡Kabat CDR以粗体显示。

[0085] 因此,在某些实施方式中,本发明提供了一种分离的鼠抗体或其嵌合或人源化形式,该抗体包含(i)具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和(ii)具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域。如同鼠抗体那样,其嵌合和人源化形式结合人NTB-A,但不结合短尾猴NTB-A。

[0086] 在某些实施方式中,本发明提供了一种分离的抗体,其与包含(i)具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和(ii)具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域的单克隆抗体(mAb)竞争特异性结合人NTB-A。

[0087] 本发明还提供了一种分离的抗体,其特异性结合与某一mAb相同的人NTB-A的表位,该mAb包含(a)具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域,或(b)具有SEQ ID NO:3的残基20-137所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VL结构

域。在某些变化形式中,该抗体与前述mAb结合相同的NTB-A表位,其通过选自下组的表位作图方法确定:(i) X射线共结晶、(ii) 基于阵列的寡肽扫描(有时也称作重叠肽扫描或肽扫描分析)、(iii) 定点诱变(如丙氨酸扫描诱变),以及(iv) H/D交换质谱。这些表位作图方法是本领域熟知的并可根据本发明容易地使用。

[0088] 本发明还提供了一种分离的抗体,其特异性结合人NTB-A且包含:(i) 包含与SEQ ID NO:1的残基20-135或SEQ ID NO:3的残基20-137具有至少80%序列相同性的氨基酸序列的VH结构域;和/或(ii) 包含与SEQ ID NO:2的残基21-140或SEQ ID NO:4的残基21-128具有至少80%序列相同性的氨基酸序列的VL结构域。通常,当抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域时,VH和VL结构域对应于来自表1的相同的参考抗体(即,VH和VL结构域分别与SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140,或者分别与SEQ ID NO:3的残基20-137和SEQ ID NO:4的残基21-128具有特定的序列相同性)。

[0089] 本发明还提供了一种分离的抗体,其特异性结合人NTB-A且:(i) 其VH结构域衍生自具有SEQ ID NO:1的残基20-135或SEQ ID NO:3的残基20-137所示氨基酸序列的VH结构域;和/或(ii) 其VL结构域衍生自具有SEQ ID NO:2的残基21-140或SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VL结构域。例如,该VH和/或VL结构域可分别衍生自(a) 具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和/或具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域,或(b) 具有SEQ ID NO:3的残基20-137所示氨基酸序列的VH结构域和/或具有SEQ ID NO:4的残基21-128所示氨基酸序列的VL结构域。衍生的VH或VL结构域的可变结构域框架序列可以完全或基本来自不同于参考序列(例如来自不同物种(如人)的免疫球蛋白序列)的免疫球蛋白序列。因此,在某些实施方式中,本发明提供了一种人源化抗体,其包含人源化VH结构域和人源化VL结构域之一或两者,所述人源化VH结构域和人源化VL结构域衍生自上文(a) 或(b) 中列举的VH和VL结构域中的一种或全部两种,如本文中进一步描述的那样。通常,但并非总是,人源化抗体将在人可变结构域框架区内保留一些来自供体物种的非人残基。

[0090] 本发明还提供了一种单克隆抗体,其特异性结合NTB-A且包含SEQ ID NO:5 (CDR1)、SEQ ID NO:6 (CDR2) 和SEQ ID NO:7 (CDR3) 所列的互补决定区(CDR) 序列和SEQ ID NO:8 (CDR4)、SEQ ID NO:9 (CDR5) 和SEQ ID NO:10 (CDR6) 所列的轻链CDR序列,且在各CDR中具有0、1、2或3个保守性氨基酸取代。在一些方面中,该抗体是人源化单克隆抗体。在一些方面中,各CDR中具有0或1个保守性氨基酸取代。这类抗体可以是例如小鼠、嵌合、人源化或镶嵌的(veneered)。

[0091] 本发明还提供了一种单克隆抗体,其特异性结合NTB-A且包含SEQ ID NO:11 (CDR1)、SEQ ID NO:12 (CDR2) 和SEQ ID NO:13 (CDR3) 所列的互补决定区(CDR) 序列和SEQ ID NO:14 (CDR4)、SEQ ID NO:15 (CDR5) 和SEQ ID NO:16 (CDR6) 所列的轻链CDR序列,且在各CDR中具有0、1、2或3个保守性氨基酸取代。在一些方面中,该抗体是人源化单克隆抗体。这类抗体可以是例如小鼠、嵌合、人源化或镶嵌的。

[0092] 可通过本领域已知的任何方法测试本发明的抗体的特异性结合。可以使用的免疫试验包括但不限于使用诸如以下技术的试验系统:western印迹、放射性免疫试验、ELISA、“夹心”免疫试验、免疫沉淀试验、沉淀素试验、凝胶扩散沉淀素试验、免疫放射测定试验、荧光免疫试验、蛋白A免疫试验和补体固定试验。此类实验是常规且为本领域熟知的(参见例

如,Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验方法》),第1卷,纽约约翰韦利森出版公司(John Wiley&Sons, NY)。还可进行诸如Antibodies, A Laboratory Manual(《抗体,实验室手册》)(冷泉港实验室,Ed Harlow和David Lane,1988)中描述的那些常规试验。此外,BIACORE®(GE医疗保健公司(GE Healthcare),新泽西州皮斯卡特维)是仅有的常规用于单克隆抗体的结合分析的表面等离子共振试验形式。其他参考文献(例如The Epitope Mapping Protocols(《表位作图方案》),Methods in Molecular Biology(《分子生物学方法》),卷66(Glenn Morris编,胡马纳出版社(Humana Press),1996))描述了可用于结合抗体并预测提供关于抗体与NTB-A的结合特异性的可比信息的替代性方法。

[0093] 为评估抗体是否与包含11A1 mAb的VH和VL结构域(即具有SEQ ID NO:1的残基20-135所示氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:2的残基21-140所示氨基酸序列的VL结构域)的mAb竞争特异性结合人NTB-A,使用了以下竞争性结合试验。

[0094] 该试验利用包括11A1鼠IgG1抗体(即天然抗体二价结构中的11A1VH和VL结构域)的“参考抗体”。将NTB-A阳性Ramos细胞以 2×10^5 个细胞/孔接种于96孔V形底板(纽约州罗切斯特的赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))中。在含有2X恒定浓度的AF647标记的11A1鼠抗体(2X其 $0.0188 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的Kd值($0.0376 \mu\text{g}/\text{mL}$))的FACs缓冲液(PBS+2%胎牛血清+0.02%叠氮化钠)中制备2X浓缩的抗体($20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 是未标记的样品抗体的2X起始浓度)的五倍连续稀释物。将抗体溶液与细胞在冰上孵育1小时,避光。使用FACs缓冲液对细胞清洗两次并在LSRII流式细胞仪(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司(BD Biosciences))上分析。数据表示为最大结合的百分比。如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的45%以下(即0-45%),则该样品抗体与标记的参考抗体“竞争”特异性结合NTB-A。在一些方面中,如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的30%以下,则该抗体竞争结合。在一些方面中,如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的20%以下,则该抗体竞争结合。在一些方面中,如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的10%以下,则该抗体竞争结合。在一些方面中,如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的5%以下,则该抗体竞争结合。在一些方面中,如果样品抗体在未标记的样品抗体浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时使参考抗体与NTB-A的结合水平下降至最大结合的2%以下或1%以下,则该抗体竞争结合。如图2所示,鼠11A1抗体与其本身并与26B7抗体竞争结合。其不与NT-7抗体竞争结合。

[0095] 在一些实施方式中,抗NTBA抗体包含与表1所列抗体的重链和/或轻链可变结构域基本相同的重链可变结构域和/或轻链可变结构域。

[0096] 因此,在某些实施方式中,抗NTB-A抗体具有(a)与表1所列VH结构域的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同性的重链可变结构域和/或(b)与表1所列VL结构域的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同性的轻链可变结构域。在特定的变化形式中,该抗NTB-A抗体包含(a)具有表1所列VH结构域的氨基酸序列的重链可变结构域和/或(b)具有表1所列VL结构域的氨基酸序列

的轻链可变结构域。在一些实施方式中,当抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域时,该重链和轻链可变结构域对应于来自表1的相同参考抗体。例如,在更具体的变化形式中,抗NTB-A抗体包含轻链和重链可变结构域,其具有选自以下VH/VL序列对各VH和VL氨基酸序列:(I) SEQ ID NO:1的残基20-135和SEQ ID NO:2的残基21-140;以及(II) SEQ ID NO:3的残基20-137和SEQ ID NO:4的残基21-128。

[0097] 在一些实施方式中,本发明的抗NTB-A抗体包含表1所列抗NTB-A抗体的一个或多个CDR。来自表1的VH和VL结构域的Kabat CDR还列于下文表2中。

[0098] 表2:抗NTB-A抗体VH和VL结构域的CDR序列

[0099]

mAb	CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
11A1	CDR-H1	gyyvh	5
	CDR-H2	kldpedgeikhyapkfgg	6
	CDR-H3	yetyfdy	7
	CDR-L1	kaakkytlfgaiaah	8
	CDR-L2	ngakles	9
	CDR-L3	lqskvpyt	10
26H7	CDR-H1	lywin	11
	CDR-H2	dihpggrgntalnckfkt	12
	CDR-H3	ededvyfdv	13
	CDR-L1	rasqgisawfn	14
	CDR-L2	xtanlht	15
	CDR-L3	lqasvpyt	16

[0100] 例如,在某些变化形式中,该抗体包含表1所列抗体的重链CDR (CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3区中的至少一个) 和/或相应轻链CDR (CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3区中的至少一个)。在典型的实施方式中,该抗NTB-A抗体具有表1所列抗体的两个或三个重链CDR和/或两个或三个轻链CDR。在一些变化形式中,当抗NTB-A抗体具有表1所列抗体的至少一个重链CDR时,该抗体还包含至少一个相应的轻链CDR。

[0101] 在一些变化形式中,抗NTB-A抗体包含重链和/或轻链可变结构域,该重链或轻链可变结构域具有 (a) 对应于表1所列抗体所示重链或轻链CDR的一组三个CDR,和 (b) 一组四个框架区。例如,抗NTB-A抗体可包含重链和/或轻链可变结构域,该重链或轻链可变结构域具有 (a) 一组三个CDR,该组CDR来自于表1所列抗体,和 (b) 一组四个框架区,该组框架区与表1所列相同抗体的框架区组相同或不同 (例如不同于人框架区)。

[0102] 在某些变化形式中,抗NTB-A抗体包含 (I) 重链可变结构域和 (II) 轻链可变结构域,该重链可变结构域具有 (a) 对应于表1所列抗体所示重链CDR的一组三个CDR,和 (b) 一组四个框架区,该轻链可变结构域具有 (a) 对应于表1所列抗体所示轻链CDR的一组三个CDR,和 (b) 一组四个框架区。在典型的实施方式中,重链和轻链CDR都来自表1所列的相同抗体。

[0103] 在一些实施方式中,本发明所述抗NTB-A抗体包含重链和/或轻链可变区,该重链和/或轻链可变区包含相对于表1所列VL或VH结构域的CDR具有0、1、2、3或4个氨基酸取代 (优选保守性取代) 的至少一个CDR。例如,在某些变化形式中,本发明所述抗NTB-A抗体包含重链CDR CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,其中CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3中的至少一种相对于表1所列VH结构域包含0、1、2、3或4个氨基酸取代 (优选保守性取代)。在其他变化形式中,本发明所述抗NTB-A抗体包含轻链CDR CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3

中的至少一种相对于表1所列VL结构域包含0、1、2、3或4个氨基酸取代(优选保守性取代)。在某些实施方式中,抗NTB-A抗体包含全部两组上述重链和轻链CDR。特别适合的抗NTB-A抗体包含含有CDR1-L1、CDR2-L2和CDR3-L3的轻链可变结构域和含有CDR1-H1、CDR2-H2和CDR3-H3的重链可变结构域,所述重链和轻链CDR的组相对于来自表1所列VH结构域和VL结构域的CDR具有六个或更少、通常五个或更少、更通常四个或更少且最通常三个或更少的氨基酸取代(优选保守性取代);在一些这类变化形式中,该六个或更少的氨基酸取代是相对于来自表1所列相同抗体的VH结构域和VL结构域的CDR。

[0104] 在某些实施方式中,本发明的抗NTB-A抗体包含分别衍生自表1所列的VH和/或VL结构域的人源化VH结构域和/或人源化VL结构域。在特定的变化形式中,该抗NTB-A抗体包含分别衍生自表1所列VH结构域和VL结构域的人源化VH结构域和人源化VL结构域。通常,该人源化VH和VL结构域衍生自表1所列相同抗体。

[0105] 人源化抗体是遗传工程改造的抗体,其中来自非人“供体”抗体的CDR被移植至人“受体”抗体序列(参见例如Queen,US 5,530,101和5,585,089;Winter,US 5,225,539;Carter,US 6,407,213;Adair,US 5,859,205;以及Foote,US 6,881,557)。受体抗体序列可以是例如成熟的人抗体序列、这类序列的复合体、人抗体序列的共有序列或种系区(germline region)序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本来自供体抗体的一些或全部CDR以及完全或基本来自人抗体序列的恒定区(如果存在)和可变区框架序列的抗体。类似地,人源化VH结构域具有至少一个、两个和通常全部三个完全或基本来自供体抗体VH结构域的CDR,以及完全或基本来自人抗体VH结构域的可变区框架序列;这类人源化VH结构域可连接于(通常氨基末端连接于)完全或基本来自人重链恒定区序列的免疫球蛋白重链恒定区。类似地,人源化VL结构域具有至少一个、两个和通常全部三个完全或基本来自供体抗体VL结构域的CDR,以及完全或基本来自人抗体VL结构域的可变区框架序列;这类人源化VL结构域可连接于(通常氨基末端连接于)完全或基本来自人轻链恒定区序列的免疫球蛋白轻链恒定区。通常,人源化抗体包含人源化VH结构域和人源化VL结构域。通常,但并非总是,人源化抗体会保留人可变结构域框架区内的一些非人残基以增强适当的结合特性(例如,当抗体是人源化的时候,需要框架区中的突变以保留结合亲和力)。

[0106] 虽然人源化抗体常包含来自于非人抗体的所有六种CDR(优选由Kabat定义),但也可不使用所有来自于非人抗体的CDR(如使用至少3种、4种或5种)构建人源化抗体(例如Pascalis等,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等,Journal of Molecular Biology,320:415-428,2002;Iwahashi等,Mol.Immunol.36:1079-1091,1999;Tamura等,J.Immunol,164:1432-1441,2000)。在一些方面中,该人源化抗体将包含全部六种CDR但在一种或多种CDR中具有0、1、2或3个保守性取代。

[0107] 基于对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响,可以选择来自于人可变区框架残基的某些氨基酸进行取代。这类可能影响的研究方法为建模、研究特定位点氨基酸的特性或对特定氨基酸取代或突变所产生影响的经验性观察。

[0108] 例如,当鼠可变区框架残基和选择的人可变区框架残基之间存在一个不同的氨基酸时,人框架氨基酸可被来自于小鼠抗体的相应框架氨基酸所取代,条件是合理预期该氨基酸:

[0109] (1) 非共价直接结合抗原,

[0110] (2) 与CDR区相邻,

[0111] (3) 否则与CDR区相互作用(如在CDR区的约6 Å内);或

[0112] (4) 介导重链和轻链之间的相互作用。

[0113] 另一个可能的变化是使用人CDR序列中相应的残基取代小鼠抗体的CDR中的特定残基,通常使用用于设计示例性人源化抗体的人受体序列的CDR。在一些实施方式中,人源化抗体中只有部分CDR(即结合所需的CDR残基子集,称作SDR)需要保持结合。通过分子建模和/或经验或Gonzales等,Mol. Immunol. 41:863 (2004) 中所述,可从位于Chothia高变环外的Kabat CDR区中,基于先前研究鉴定出不接触抗原且不在SDR中的CDR残基(例如CDR H2中的残基H60-H65通常不需要)。在这类人源化抗体的一个或多个供体CDR残基缺失或整个供体CDR省略的位置上,占据该位置的氨基酸可以是占据受体抗体序列中相应位置(通过Kabat编号)的氨基酸。CDR中所包括的这类受体对供体的取代数目反映了竞争因素的平衡。这类取代可能有利于减少人源化抗体中小鼠氨基酸的数目并继而降低潜在的免疫原性。然而,取代还可导致亲和力改变,且优选避免亲和力的显著下降。在其他变化形式中,人源化抗NTB-A抗体的CDR(其否则将与表1所列抗体的CDR相同)中的一个或多个残基可以被来自表1所列不同抗体的CDR的相应残基所替代。也可根据经验选择CDR中用于取代的位置和取代的氨基酸。

[0114] 虽然并非优选,但可进行其他氨基酸取代,例如在不与CDR接触的框架区残基中,或者甚至在CDR内的一些潜在的CDR接触残基或氨基酸中。对于替换的氨基酸,通常在变体人源化序列中进行的替换是保守性的。优选地,这类替换(无论是否保守)对于结合亲和力或人源化抗体的效力(即其结合人NTB-A或抑制癌细胞生长的能力)没有显著影响。

[0115] 优选的抗NTB-A抗体或其偶联形式(如抗体-药物偶联物)抑制癌症(例如细胞生长、转移和/或对生物体的致死性),如培养物中、动物模型中或临床试验中增殖的癌细胞上所所示那样。可通过将表达NTB-A的人肿瘤细胞系植入适当的免疫缺陷啮齿类动物系(如无胸腺裸小鼠或SCID小鼠)以建立动物模型。可通过皮下注射以固体肿瘤的形式或通过静脉注射以侵染肿瘤的形式在免疫缺陷的啮齿类宿主中建立这些肿瘤细胞系。一旦在宿主中建立,即可运用这些肿瘤模型以评估抗NTB-A抗体或其偶联形式的治疗效果。

[0116] 在某些变化形式中,本发明的抗NTBA抗体包含与免疫球蛋白恒定区(如人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分相连的VH和/或VL结构域。例如,在一些实施方式中,该抗NTB-A抗体包含第一和第二多肽链,其中该第一多肽链包含与免疫球蛋白重链恒定区的至少一部分相连的上述VH结构域,且该第二多肽链包含与免疫球蛋白轻链恒定区的至少一部分相连的上述VL结构域。通常,该VH或VL结构域氨基末端连接于免疫球蛋白恒定区或其部分。在包含第一和第二多肽链的抗体的具体变化形式中,该第一和第二多肽链具有对应于完整天然抗体的重链和轻链的结构域结构,例如第一多肽链(重链)具有VH-CH1-铰链-CH2-CH3的氨基末端至羧基末端结构域结构且第二多肽链(轻链)具有VL-CL的氨基末端至羧基末端结构域结构。

[0117] 在其他实施方式中,该抗NTB-A抗体是单链抗体,其包含在单多肽链内连接的免疫球蛋白恒定区的至少一部分(如缺少CH1结构域的重链恒定区)、VH结构域和VL结构域。例如,该VH和VL结构域可构建为VH/VL或VL/VH(氨基末端/羧基末端)取向的单链Fv(scFv),其中scFv与重链恒定区相连(通常氨基末端),例如包含CH2和CH3结构域但缺少CH1结构域的

恒定区。该scFv通常经由接头(如衍生自免疫球蛋白铰链区的接头)与恒定区相连。

[0118] 恒定区的选择部分依赖于是否需要抗体依赖的细胞介导细胞毒性、抗体依赖的细胞吞噬作用和/或补体依赖的细胞毒性。例如,人同种型IgG1和IgG3有强烈的补体依赖的细胞毒性,人同种型IgG2有微弱的补体依赖的细胞毒性而人IgG4缺乏补体依赖的细胞毒性。人IgG1和IgG3还能比人IgG2和IgG4诱导更强的细胞介导效应功能。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。可以以包含两条轻链和两条重链的四聚体形式、以独立的重链、轻链形式、以Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv形式、或以重链和轻链可变区通过间隔区相连的单链抗体形式表达抗体。此外,需要时可对恒定区进行突变。在一些方面中,相对于天然人恒定区,天然人恒定区的突变形式与Fc γ 受体的结合减低。

[0119] 人恒定区在不同个体间呈现异型差异和同种异型差异,即不同个体中的恒定区可以在一个或多个多态性位置上存在差异。同种异型和异型的差别在于识别一种同种异型的血清结合一种或多种其他同种型的非多态性区域。

[0120] 轻链和/或重链的氨基或羧基端的一个或几个氨基酸(如重链C端的赖氨酸)可在部分或所有分子中缺失或衍生化。在恒定区中可进行取代以减弱或增强效应功能(如补体介导的细胞毒性或ADCC)(参见例如Winter等,美国专利号5,624,821;Tso等,美国专利号5,834,597;以及Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:4005,2006)或延长人中的半衰期(参见例如Hinton等,J.Biol.Chem.279:6213,2004)。

[0121] 示例性取代包括在人类IgG1同种型中第234、235、237、239、267、298、299、326、330或332位处的天然氨基酸被取代为半胱氨酸残基,优选为S239C突变(US 20100158909)。在一些方面中,额外的半胱氨酸残基的存在允许链间二硫键的形成。这类链间二硫键的形成会导致位阻,从而降低Fc区-Fc γ R结合相互作用的亲和力。被引入或靠近IgG恒定区的Fc区的半胱氨酸残基也可作为偶联治疗剂的位点(即使用硫醇特异性试剂(如药物的马来酰亚胺衍生物)偶联细胞毒性药物)。治疗剂的存在会导致位阻,从而进一步降低Fc区-Fc γ R结合相互作用的亲和力。在234、235、236和/或237位中任意位置发生的其他取代会降低Fc γ 受体,尤其是Fc γ RI受体的亲和力(参见例如US 6,624,821、US 5,624,821)。

[0122] 抗体的体内半衰期也会影响其效应功能。可提高或降低抗体的半衰期以改变其治疗活性。FcRn是一种结构上与MHC I类抗原类似的受体,与 β 2-微球蛋白非共价相连。FcRn调控IgG的分解代谢及其跨组织的转胞吞作用(Ghetie和Ward,2000,Annu.Rev.Immunol.18:739-766;Ghetie和Ward,2002,Immunol.Res.25:97-113,2002)。IgG-FcRn在pH 6.0(胞内囊泡的pH)时发生相互作用,但在pH 7.4(血液的pH)时不发生;这一相互作用使得IgG重新进入循环(Ghetie和Ward,2000,同上;Ghetie和Ward,2002,同上)。已经对涉及FcRn结合的人IgG1区域进行了定位(Shields等,2001,J.Biol.Chem.276:6591-604,2001)。人IgG1Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382或Asn434位的丙氨酸取代增强了FcRn结合(Shields等,同上)。存在这些取代的IgG1分子有更长的血清半衰期。因此,相比于未经修饰的IgG1分子,这些经修饰的IgG1分子能够在更长的一段时间内发挥其功能,从产生治疗效果。其他增强对FcRn结合的示例性取代包括第250位的Gln和/或第428位的Leu。EU编号用于恒定区内的所有位点。

[0123] 共价连接于保守的Asn297上的寡糖涉及IgG的Fc区结合Fc γ R的能力(Lund等,J.Immunol.157:4963-69,1996;Wright和Morrison,Trends Biotechnol.15:26-31,1997)。

对IgG上该糖形的工程改造能够显著增强IgG介导的ADCC。在该糖形上添加截开型N-乙酰基葡萄糖胺修饰 (Umana等, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies等, 2001, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94) 和从该糖形上移除岩藻糖 (Shields等, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40, 2002; Shinkawa等, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604, 2003; Niwa等, *Cancer Res.* 64:2127-33, 2004) 是两种对IgG Fc进行的工程改造示例, 其改进IgG Fc与Fc γ R之间结合能力从而增强Ig介导的ADCC活性。

[0124] 对人IgG1Fc区暴露于溶剂的氨基酸的全局性取代生成了Fc γ R结合亲和力改变的IgG变体 (Shields等, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604, 2001)。与亲本IgG1相比, 这些涉及使用Ala取代Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334或Ser298/Glu333/Lys334位点的变体的子集表现出对Fc γ R的结合亲和力升高和ADCC活性的提高 (Shields等, 2001, 同上; Okazaki等, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49, 2004)。

[0125] Lys326和Glu333位点的取代可以改进抗体的补体固定活性 (C1q结合和CDC活性) (Idusogie等, *J. Immunol.* 166:2571-2575, 2001)。人IgG2主链上的同一取代能够将与C1q结合较弱且补体激活活性严重不足的一种抗体同种型转变为能够结合C1q和介导CDC的同种型 (Idusogie等, 同上)。几种其他方法也可用于改进抗体的补体固定活性。例如, 将IgM 18个氨基酸的羧基端尾部片段连接至IgG的羧基端能够显著增强其CDC活性。这甚至可以在通常没有可检测的CDC活性的IgG4中观察到 (Smith等, *J. Immunol.* 154:2226-36, 1995)。另外, 使用Cys取代靠近IgG1重链羧基端的Ser444能够诱导IgG1尾部与尾部之间的二聚体化, 其CDC活性比单聚体IgG1增加了200倍 (Shopes等, *J. Immunol.* 148:2918-22, 1992)。此外, 对C1q特异的双特异性双抗体构建也能够赋予CDC活性 (Kontermann等, *Nat. Biotech.* 15:629-31, 1997)。

[0126] 通过将重链的第318、320和322位氨基酸残基中的至少一个突变为带有不同侧链的残基 (如Ala), 能够降低补体活性。在这三个残基中的任意一个位置出现其他烷基取代的非离子型残基 (如Gly、Ile、Leu或Val) 或者芳香族非极性残基 (如Phe、Tyr、Trp和Pro) 也会降低或破坏C1q结合。可在第320和322位但不是318位使用Ser、Thr、Cys和Met以降低或破坏C1q结合。使用一个极性残基取代第318位的 (Glu) 残基会改变但不会破坏C1q结合活性。使用Ala取代第297位的 (Asn) 残基会导致裂解活性消失但仅微弱降低 (约降低三倍) 对C1q的亲和力。这些改变破坏了糖基化位点和补体激活所需的甘露醇的存在。该位点的任意其他取代也会破坏糖基化位点。以下突变及其任意组合也会降低C1q结合: D270A、K322A、P329A和P311S (参见WO 06/036291)。

[0127] 提及人恒定区时其包括带有任意天然异型或占据天然异型中多态性位点的任意残基排列的恒定区。另外, 相对于天然人恒定区存在最多1、2、5或10个突变 (如上文所述突变) 以降低Fc γ 受体结合或提高对FcRn的结合。

[0128] IV. 核酸及其生产方法

[0129] 本发明还提供了编码上述VH和/或VL结构域中任一种 (包括含有与其他多肽区段 (例如对应于免疫球蛋白恒定区的多肽区段) 相连的VH和/或VL结构域的多肽) 的核酸。通常, 该核酸还编码与包含VH和/或VL结构域的成熟多肽氨基末端融合的信号肽。核酸上的编码序列可以与调控序列可操作连接以确保编码序列的表达, 例如启动子、增强子、核糖体结合位点、转录终止信号等。该核酸可以分离的形式存在或可被克隆至一个或多个载体中。可

通过例如重叠寡核苷酸的PCR或固相合成来合成核酸。编码VH结构域和VL结构域的核酸(例如在包含单独的重链和轻链的抗体中)可被接合为连续的核酸(例如在表达载体中),或者其可以是单独的(例如各自克隆至其各自的表达载体中)。

[0130] 抗NTB-A抗体通常通过重组表达编码一个或多个抗体链的一个或多个核酸来生产。重组多核苷酸构建体通常包含与包含VH和/或VL结构域的一个或多个多肽链的编码序列可操作地连接的表达控制序列,包括天然相关的或异源的启动子区域。优选地,表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核细胞启动子系统。一旦载体整合到合适宿主中,即将宿主维持在适于核苷酸序列的高水平表达的条件下,并收集和纯化交叉反应性抗体。

[0131] 在包含第一和第二多肽链(如重链和轻链)的抗体的表达的某些实施方式中,在用于表达整个抗体分子的宿主细胞中,从单独的载体共同表达两条多肽链。在双链抗体表达的其他实施方式中,在用于表达整个抗体分子的宿主细胞中的相同载体中,从单独的表达单元共同表达两条多肽链。

[0132] 哺乳动物细胞是优选宿主,用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸片段。参见Winnacker, *From Genes to Clones* (《从基因到克隆》), (VCH出版社 (VCH Publishers), 纽约, 1987)。本领域中已开发了许多能够分泌完整异源蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系(如DG44)、多种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞和不产生抗体的骨髓瘤(包括Sp2/0和NS0)。优选地,该细胞为非人细胞。这些细胞的表达载体能包含表达对照序列,例如复制起点、启动子、增强子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), 和需要的处理信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多聚腺苷酸化位点和转录终止序列。优选的表达控制序列为来源于内源性基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等, *J. Immunol.* 148:1149, 1992。

[0133] 一旦表达,即可根据本领域中标准方法纯化抗体,包括HPLC纯化、柱层析、凝胶电泳等(通常参见Scopes, *Protein Purification* (《蛋白质纯化》)(施普林格弗莱格公司 (Springer-Verlag), 纽约, 1982))。

[0134] V. 抗体药物偶联物

[0135] 抗NTB-A抗体可与细胞毒性或细胞生长抑制性部分(包括其药学上可兼容的盐)偶联以形成抗体药物偶联物(ADC)。特别适用于与抗体偶联的部分是细胞毒剂(如化疗剂)、前药转化酶、放射性同位素或化合物或者毒素(这些部分统称为治疗剂)。例如,抗NTB-A抗体可与细胞毒剂(如化疗剂)或毒素(如细胞生长抑制剂或杀细胞剂,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉类毒素)偶联。有用的细胞毒剂类型的示例包括例如DNA小沟结合物、DNA烷化剂和微管蛋白抑制剂。示例性细胞毒剂包括例如耳他汀、喜树碱、卡奇霉素、多卡米星、依托泊苷、类美坦西醇(如DM1、DM2、DM3、DM4)、紫杉烷、苯并二氮(如吡咯并[1,4]苯并二氮、吡啶并二氮和恶唑烷酮苯并二氮)以及长春花生物碱。

[0136] 抗NTB-A抗体可与前药转化酶偶联。可使用已知方法将前药转化酶与抗体重组融合或与其化学偶联。示例性前药转化酶是羧肽酶G2、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、青霉素-V-酰胺酶、青霉素-G-酰胺酶、 β -内酰胺酶、 β -葡糖苷酶、硝基还原酶和羧肽酶A。

[0137] 将治疗剂与蛋白(尤其是抗体)偶联的技术是熟知的。(参见例如Alley等, *Current Opinion in Chemical Biology* 201014:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14 (3):154-169)。

除非从抗体上切除(例如通过水解、通过蛋白酶降解或通过切割剂),否则可通过降低活性的方式偶联治疗剂。在一些方面中,该治疗剂可以通过一段可切割的接头与抗体相连,该接头对表达NTB-A的癌细胞胞内环境的切割敏感但对胞外环境基本不敏感,使得表达NTB-A的癌细胞内化偶联物后对其进行切割(例如在内体中,或者例如凭借pH敏感性或蛋白酶敏感性,在溶酶体环境中或在胞膜窖环境中)。在一些方面中,该治疗剂也可通过不可切割的接头与抗体相连。

[0138] 通常该ADC包含一段位于治疗剂和抗NTB-A抗体之间的接头。如上文所述,通常,该接头在胞内环境下是可切割的,胞内环境中对接头的切割从抗体上释放出治疗剂(例如在溶酶体或内体或胞膜窖中)。该接头可以是例如被胞内肽酶或蛋白酶(包括溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽酰接头。切割剂可包括组织蛋白酶B和D和纤溶酶(参见例如Dubowchik和Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999)。最常见的是可由表达NTB-A的细胞内存在的酶切割的肽酰接头。例如,可使用可由癌组织中高表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽酰接头(如包含Phe-Leu或Val-Cit肽的接头)。

[0139] 该可切割接头可以是pH敏感型的,即在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感型接头可在酸性条件下水解。例如,能使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(如脞、缩氨基脒、缩氨基硫脒、顺式-乌头酰胺(cis-aconitic amide)、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999;Neville等, *Biol. Chem.* 264:14653-14661, 1989。)这类接头在中性pH条件下(例如在血液中)相对稳定,但在5.5或5.0的低pH条件(接近溶酶体的pH)下不稳定。

[0140] 其他接头在还原条件下是可切割的(如二硫化物接头)。二硫化物接头包括可用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫)甲苯)、SPDB和SMPT形成的接头。(参见例如Thorpe等, *Cancer Res.* 47:5924-5931, 1987;Wawrzynczak等, 刊于 *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (《免疫偶联物:放射成像和癌症治疗中的抗体偶联物》)(C.W.Vogel编,牛津大学出版社(Oxford U.Press), 1987。也参见美国专利号4,880,935。)

[0141] 该接头还可以是丙二酸接头(Johnson等, *Anticancer Res.* 15:1387-93, 1995)、马来酰亚胺苯甲酰接头(Lau等, *Bioorg-Med-Chem.* 3:1299-1304, 1995)或3'-N-酰胺类似物(Lau等, *Bioorg-Med-Chem.* 3:1305-12, 1995)。

[0142] 该接头还可以是不可切割的接头,例如与治疗剂直接连接并通过抗体的蛋白酶降解释放的马来酰亚胺-亚烷基或马来酰亚胺-芳基接头。

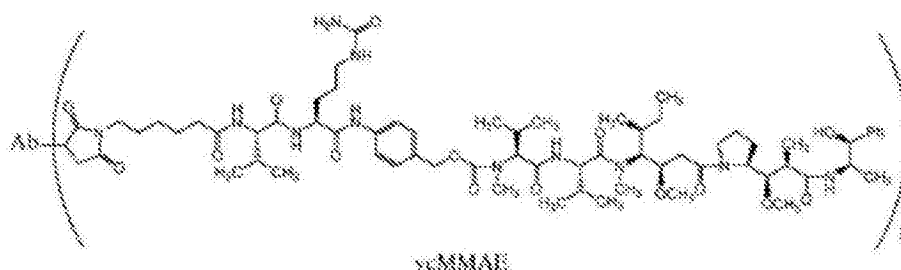
[0143] 通常,接头对胞外环境基本不敏感指当ADC出现在胞外环境中(如血浆中)时,ADC的样品中不超过约20%,通常不超过约15%,更通常不超过约10%,甚至更通常不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%的接头被切割。确定接头是否对胞外环境基本不敏感的方法可以是例如将(a)ADC("ADC样品")和(b)等摩尔量未偶联的抗体或治疗剂("对照样品")独立地与血浆孵育一段预定时间(如2、4、8、16或24个小时),然后比较ADC样品和对照样品中存在的未偶联的抗体或治疗剂,可通过例如高效液相色谱进行测量。

[0144] 该接头还可促进细胞内化。该接头在与治疗剂偶联时促进细胞内化(即,在本文所

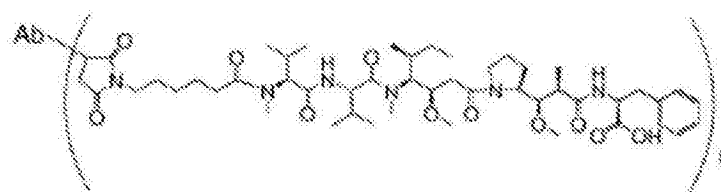
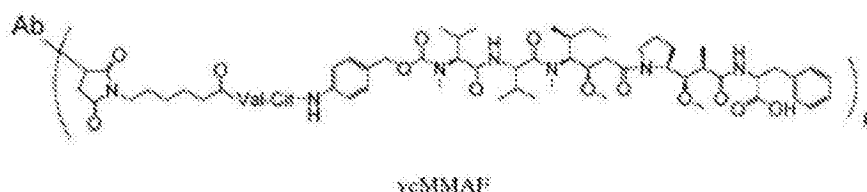
述的ADC或ADC衍生物的接头-治疗剂部分的情况下)。或者,该接头可在同时与治疗剂和抗NTB-A抗体偶联时促进细胞内化(即,在本文所述ADC的环境中)。

[0145] 示例性抗体-药物偶联物包括基于耳他汀的抗体-药物偶联物(即该药物组分是一种耳他汀药物)。耳他汀结合微管蛋白,其干扰微管动力学以及细胞核和细胞分裂并具有抗癌活性。通常,基于耳他汀的抗体-药物偶联化合物在耳他汀化合物和抗NTB-A抗体之间包含接头区。该接头可以是例如可切割接头(如肽酰接头)或不可切割接头(如由抗体降解释放的接头)。该耳他汀可以是耳他汀E或其衍生物。例如,该耳他汀可以是耳他汀E和酮酸间形成的酯。例如,耳他汀E可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其它典型的耳他汀包括MMAF和MMAE。示例性耳他汀的合成和结构描述于美国公开号7,659,241、7,498,298、2009-0111756、2009-0018086和7,968,687,其各自通过引用全文纳入本文并用于所有目的。

[0146] 示例性基于耳他汀的抗体药物偶联物包括vcMMAE、vcMMAF和mcMMAF抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐,如下文所述,其中Ab是一种本文所述抗体,val-cit代表缬氨酸-瓜氨酸二肽:



[0147]



[0148] p代表药物载量,即每个抗体中药物-接头分子的数量。根据上下文,p可代表每个抗体中药物-接头分子的平均数量,也称作平均药物加载。p的范围为1至20,优选为1至8。在一些优选实施方式中,当p表示平均药物加载时,p的范围为约2至约5。在一些实施方式中,p为约2、约3、约4或约5。可通过常规方法如质谱、HIC、ELISA实验和HPLC鉴定偶联反应确定制剂中每种抗体的平均药物数量。在一些方面,抗NTBA抗体通过抗体的半胱氨酸残基与药物-接头相连。在一些方面中,该半胱氨酸残基是被工程改造到抗体中的。在其他方面中,该半胱氨酸残基是一种链内二硫化半胱氨酸残基。

[0149] VI. 应用

[0150] 在另一个方面中,本发明提供了使用本文所述抗NTBA抗体来调节表达NTB-A的细胞(包括自然杀伤(NK)细胞、NK样T细胞、T细胞、单核细胞、树突细胞、B细胞和嗜酸性粒细胞)的生物学活性的方法。这类方法包括例如抑制表达NTB-A的细胞的活性(例如抑制细胞增殖)的方法。这类方法还包括例如治疗与表达NTB-A的细胞相关的疾病或病症的方法。

[0151] 例如,本发明的抗NTBA抗体(作为裸抗体或作为其抗体药物偶联物)可用于治疗表达NTB-A的癌症。一些这类癌症在蛋白(如使用示例性抗体中的一个进行免疫测定)或mRNA水平上均显示出可检测的NTB-A水平。相对于相同类型的非癌组织,一些这类癌症中的NTB-A水平升高,优选来自于同一患者。可进行治疗的癌症细胞上NTB-A的示例性水平为每个细胞5000-150000个NTB-A分子,但更高或更低的水平也能治疗。任选地,在进行治疗前测量癌症中的NTB-A水平。

[0152] NTB-A表达相关且适用于治疗的癌症示例包括血液恶性肿瘤,包括B细胞、T细胞和NK细胞恶性肿瘤。在一些实施方式中,该癌症是多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、或T细胞或B细胞淋巴瘤(如非霍奇金淋巴瘤(NHL))。可对有这类原发性或转移性肿瘤的患者进行治疗。该治疗还可应用于常规方法难以治疗的患者或在对这类治疗产生应答后复发的患者。

[0153] 在一个相关的方面中,本发明提供了一种使用包含特异性结合NTB-A的抗体的抗体-药物偶联物(ADC)治疗多发性骨髓瘤的方法。在该方面的某些变化形式中,用于治疗多发性骨髓瘤的抗-NTB-A ADC包含本文所述的抗-NTB-A抗体(例如,包含分别来自具有SEQ ID NO:1的残基20-135中所示的氨基酸序列的VH结构域和具有SEQ ID NO:2的残基21-140中所示的氨基酸序列的VL结构域的VH和VL结构域的人源化抗体)。在其他方面,用于治疗多发性骨髓瘤的抗-NTB-A ADC包含于本文所述的抗体不同的另一种抗体,该抗体特异性结合NTB-A的胞外结构域。抗-NTB-A抗体的集合是本领域已知的。其他抗NTB-A的抗体可例如通过使用NTB-A或一种或多种其胞外结构域免疫的方法重新制备。这类免疫原可以从天然来源,通过肽合成或通过重组表达获得。可通过本领域已知的多种技术提供针对NTB-A的人抗体。

[0154] 本发明的抗NTBA抗体(作为裸抗体或作为其抗体药物偶联物)可用于治疗B细胞相关的疾病或病症,例如以B细胞数目过多、过于活跃的B细胞或功能异常的B细胞为特征的那些疾病。这些疾病包括炎症性疾病和自身免疫疾病。可通过本发明方法治疗的示例性疾病包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、炎症肠病、哮喘、过敏、乳糜泻、移植物抗宿主病和移植排斥。

[0155] 本发明包括以单一疗法方式或与其他疗法(例如用于治疗这类疾病或病症的护理标准)联用来治疗本文所述疾病和病症的方法。因此,治疗癌症的方法包括给予有此需要的患者有效量的本发明的抗体或抗体药物偶联物以及其他抗癌剂或缓解癌症症状的其他试剂。治疗自身免疫疾病的方法包括给予有此需要的患者有效量的本发明的抗体或抗体药物偶联物以及用于治疗自身免疫疾病的其他治疗剂。治疗炎症性疾病的方法包括给予有此需要的患者有效量的本发明的抗体或抗体药物偶联物以及用于治疗炎症性疾病的其他治疗剂。

[0156] 以有效的方案单独或以偶联物形式给予抗NTB-A抗体,所述有效的方案的含义是一种剂量、给药方式和给药频率,其能够延缓癌症发生、降低严重程度、抑制进一步恶化和/或改善至少一种迹象或症状。在一些情况中,可在单个患者中相对于历史对照或同一患者

过去的经历观察治疗有效性。在其他情况中,治疗有效性表现为临床前或临床试验中治疗后患者的群体相对于未治疗对照群体的状况。

[0157] 抗NTB-A抗体的示例性剂量是0.1mg/kg至50mg/kg患者体重,更典型地是1mg/kg至30mg/kg、1mg/kg至20mg/kg、1mg/kg至15mg/kg、1mg/kg至12mg/kg或1mg/kg至10mg/kg,或2mg/kg至30mg/kg、2mg/kg至20mg/kg、2mg/kg至15mg/kg、2mg/kg至12mg/kg或2mg/kg至10mg/kg,或3mg/kg至30mg/kg、3mg/kg至20mg/kg、3mg/kg至15mg/kg、3mg/kg至12mg/kg或3mg/kg至10mg/kg。单克隆抗体或其抗体药物偶联物的示例性剂量是0.1mg/kg至7.5mg/kg、0.2mg/kg至7.5mg/kg、0.5mg/kg至7.5mg/kg、1mg/kg至7.5mg/kg或2mg/kg至7.5mg/kg或3mg/kg至7.5mg/kg对象体重,或0.1-20或0.5-5mg/kg体重(如0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg)或10-1500或200-1500mg作为固定剂量。在一些方法中,给予患者至少0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、至少2mg/kg或至少3mg/kg的剂量,每三周或更久给药一次。剂量取决于给药频率、患者的状况和对先前治疗的反应(如果有的话),无论该治疗是预防性的还是治疗性的且无论该疾病是急性的还是慢性的等。

[0158] 通常通过胃肠道给药。还可使给药直接定位于肿瘤内。优选通过静脉或皮下给药对全身循环进行给药。静脉内给药可以是例如输注一段时间(如30-90分钟)或单次推注注射。

[0159] 给药频率取决于抗体或偶联物在循环中的半衰期、患者病症和给药途径等因素。该频率可以是按照患者病症的变化或所治疗癌症的进展进行每天、每周、每月、每季度或不规则间隔给药。在一段持续治疗过程中,静脉内给药的一个示例性频率为介于一周两次和每季度一次之间,但也可采用更高或更低频率的剂量。在一段持续治疗过程中,静脉内给药的其他示例性频率为介于每周一次或每四周三次之间,但也可采用更高或更低频率的剂量。对于皮下给药,示例性剂量频率为每天至每月,但也可采用更高或更低频率的剂量。

[0160] 所给予的剂量次数取决于癌症的性质(例如是否存在急性或慢性症状)和疾病对治疗的反应。对于急性病症或慢性病症的急性恶化,1次至10次之间的剂量通常是足够的。对于急性病症或慢性病症的急性恶化,有时单次推注剂量(任选以分开的形式)是足够的。对于急性病症或急性恶化的复发,可重复治疗。对于慢性病症,可以规律间隔给予抗体,例如每周、隔周、每月、每季度、每六个月,持续至少1、5或10年,或患者终身。

[0161] 用于胃肠道外给药的药物组合物优选为无菌且基本等渗且在GMP条件下制造。可以单位剂量形式(即单次给药的剂量)提供药物组合物。可使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂制备药物组合物。制剂取决于所选择的给药途径。就注射而言,抗体可配制在水性溶液中,优选生理相容性缓冲液,如汉克斯(Hank's)溶液、林格(Ringer's)溶液或生理盐水缓冲液或醋酸缓冲液(以减少注射位点的不舒适性)。该溶液可包含配制剂,如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体可以是使用前用合适的载剂(如无菌无热原的水)进行重建的冻干形式。液体制剂中抗体的浓度可以是例如1-100mg/ml,如10mg/ml。

[0162] 使用本发明的抗体进行治疗可与化疗、放疗、干细胞治疗、手术和其他对所治疗病症有效的疗法联用。可与抗NTB-A抗体一起给予的有用的其他试剂的类别包括,例如,针对癌细胞上表达的其他受体的抗体、抗微管蛋白药剂(如耳他汀)、DNA小沟结合物、DNA复制抑制剂、烷化剂(如铂络合物,如顺铂、单铂、二铂和三核-铂络合物和卡铂)、蒽环类抗生素、

抗生素、抗叶酸剂、抗代谢物、化疗增敏剂、多卡米星、依托泊甙、氟化嘧啶、离子载体、脂肪酸释放激素、亚硝基脲、顺铂、预形成化合物、嘌呤抗代谢剂、嘌呤霉素、放疗增敏剂、类固醇、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

[0163] 与相同治疗(如化疗)但不使用单独的或偶联物形式的抗NTB-A抗体相比,使用抗NTB-A抗体的治疗(任选与单独的上述其他试剂或方案中任一种联用或以抗体药物偶联物的形式使用)可使表达NTB-A的癌症(如多发性骨髓瘤、AML、NHL)的患者的中值无进展存活或总存活时间(特别是复发或难治时)提高至少30%或40%(但优选50%、60%至70%或甚至100%或更长)。此外或或者,与相同治疗(如化疗)但不使用抗NTB-A抗体相比,包括单独的或偶联物形式的抗NTB-A抗体的治疗(如标准化疗)可使表达NTB-A的癌症患者的完全应答率、部分应答率或客观应答率(完全+部分)提高至少30%或40%(但优选50%、60%至70%或甚至100%或更长)。

[0164] 通常,相对于接受单独的标准治疗(或加安慰剂)的患者的对照组相比,在临床试验(如II期、II/III期或III期试验)中,前述使用标准治疗加抗NTB-A抗体治疗的患者的中值无进展存活和/或应答率的提高是统计学上显著的,例如处于 $p=0.05$ 或 0.01 或甚至 0.001 水平。通过癌症的临床试验中常规使用的客观标准测定完全和部分应答率,例如国家癌症研究所和/或食品药品监督管理局接受或列出的那些。

[0165] 在其他应用中,本发明的抗NTB-A抗体可用于检测临床诊断或治疗或研究中的NTB-A。癌症中NTB-A的表达说明该癌症是可以被本发明的抗体治疗的。也可将所述抗体作为实验室研究所用的研究试剂出售,用于检测带有NTB-A的细胞及其对多种刺激物的反应。在这类用途中,可使用荧光分子、自旋标记分子、酶或放射性同位素标记抗NTB-A抗体,且可连同所有必需试剂以试剂盒的形式提供抗体以进行NTB-A的测定。还可使用这些抗体纯化NTB-A,如通过亲和层析。

[0166] 上文和下文提到的所有专利申请、其他出版物、登录号等均通过引用全文纳入本文以用于所有目的,就好像各项均特定和单独表示通过引用纳入本文。如果不同版本的序列在不同的时间与一个登录号相关,则表示在本申请的有效申请日与该登录号相关的版本。有效申请日表示早于实际申请日或关于该登录号的一项优选权申请的申请日(如果适用)。类似地,如果不同版本的出版物在不同时间公开,除非另有说明,则表示与本申请的有效申请日最接近时间公开的版本。除非另有特定说明,本发明中的任意特征、步骤、元件、实施方式或方面均可与任意其他的联用。虽然出于方便和理解的目的,通过阐述和举例的方式详细描述了本发明,但可明显看出,某些改变和修改应属于所附权利要求书的范围。

实施例

[0167] 实施例1:多发性骨髓瘤细胞系上NTB-A的表达

[0168] 在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 下培养Amo-1、JJN-3、Karpas-620、KMS-12-BM、MOLP-8、OPM-2(DSMZ;RPMI 1640+20%FBS)、L-363(DSMZ;RPMI 1640+15%FBS)、LP-1、SK-MM-2(DSMZ;RPMI 1640+10%FBS)、EJM(DSMZ;EMEM+20%FBS)、MM.1R、MM.1S、NCI-H929、RPMI-8226(ATCC;RPMI 1640+10%FBS)、和U-266(ATCC;RPMI 1640+15%FBS)细胞系。使用抗NTB-A抗体NT-7和11A1在冰上在FACs缓冲液(PBS+3%FBS+0.02%叠氮化钠)中对500000个细胞染色45分钟。使用PE偶联的二抗进行检测。使用FACSCalibur流式细胞仪(BD公司)分析染色的细胞。

[0169] 显示NTB-A表达于15种多发性骨髓瘤细胞系中的5种上：Karpas-620、EJM、MM.1R、MM.1S和U-266。

[0170] 实施例2：多发性骨髓瘤患者样品上NTB-A的表达

[0171] 冷冻的人多发性骨髓瘤患者骨髓抽吸样品 (500-1000万个细胞) 购自生物服务公司 (BioServe) (马里兰州贝兹维尔)、全细胞公司 (AllCells) (加利福尼亚州埃默里维尔)、精通医疗系统公司 (Conversant Healthcare Systems) (阿拉巴马汉茨维尔) 和PG公司 (ProteoGenex) (加利福尼亚州卡尔弗城)。将MM患者骨髓细胞在37℃下解冻、转移至预热的RPMI 1640培养基中并使用DNase 1 (0.05mg/mL) 在室温下处理10分钟以最小化细胞聚集。随后对细胞进行离心 (1400rpm; 5分钟), 重悬于RPMI 1640+10%FBS并通过台盼蓝排除法测量细胞数目/活力。随后, 对患者细胞进行离心, 在冰上重悬于FACs缓冲液 (PBS+3%FBS, +0.02%叠氮化钠)、通过100μm细胞滤器过滤以除去任何碎片, 并将100μL细胞悬液分配至V形底96孔板的孔中进行染色 (1.2×10^5 - 1.0×10^6 个活细胞/孔)。使用抗hCD38-FITC、抗hCD45-APC和PE偶联的抗NTB-A (克隆: NT-7) 或同种型对照IgG对患者骨髓抽吸细胞进行三重染色 (冰上30分钟)。对染色的细胞在FACs缓冲液中清洗两次并使用FACsCalibur流式细胞仪通过流式细胞术分析。对于多发性骨髓瘤细胞CD38+/CD45-门选的亚群体定量NTB-A的细胞表面表达。还测量了CD138 (克隆: 1D4) 阳性对照多发性骨髓瘤抗原的表达。

[0172] 证明NTB-A在15个患者样品中13个的表面上表达。参见下文表3:

[0173] 表3: 人多发性骨髓瘤患者血浆细胞上NTB-A表达的结果总结

[0174]

多发性骨髓瘤患者	治疗历史	NTB-A 表达 (克隆: NT-7)	CD138 表达 (克隆: 1D4)
1	阶段 III; 复发	2.37	1.51
2	新诊断	15.4	7.99
3	新诊断	79.8	143
4	VAD 化疗; 自体	25.0	745

[0175]		移植		
	5	VAD 化疗	14.0	12.8
	6	骨髓移植; 硼替佐米	1.16	1.65
	7	新诊断	18.2	1.45
	8	新诊断	87.3	46.6
	9	新诊断	85.7	17.3
	10	VAD 化疗; 自体移植	1.22	106
	11	美法仑, 来那度胺	5.09	2.20
	12	来那度胺, 环磷酰胺, 萨力多胺	7.56	3.25
	13	硼替佐米	17.3	4.55
	14	VAD 化疗; 来那度胺, 硼替佐米	17.8	74.33
	15	新诊断	12.7	11.45

[0176] 超过同种型对照抗体的抗原表达 (平均荧光强度) 的倍数增加

[0177] 实施例3: 抗体选择

[0178] 将收获自生产NTB-A抗体的小鼠的脾和淋巴结的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合。融合的细胞在杂交瘤生长培养基中恢复过夜。恢复后, 对细胞进行离心并随后置于半固体培养基中。孵育杂交瘤并挑取生产IgG的杂交瘤克隆。筛选杂交瘤培养物上清液并通过测量NTB-A阳性细胞表面上的荧光信号发现478个杂交瘤克隆中的313个特异性结合NTB-A胞外结构域。使用2.0 μ g/ml浓度的一组表达NTB-A的多发性骨髓瘤细胞通过流式细胞术 (BD生物科学公司FACSCalibur) 确认了荧光标记的ADC与胞外结构域NTB-A的特异性结合。对结合NTB-A的313个杂交瘤进行扩增以使用国际申请号WO 2011/109308中所述方法与vc-MMAE直接偶联。在结合和细胞毒性试验中测试直接偶联的抗体组。使用多发性骨髓瘤细胞系筛选313个NTBA-A结合的ADC的细胞毒性。在合适生长培养基中通过每孔接种15,000个多发性骨髓瘤细胞完成细胞毒性研究。对于基于细胞的结合试验, 在细胞上以12.5、50.0和200ng/mL的终浓度对抗NTB-A vcMMAE 4加载的抗体药物偶联物进行测试并在37 $^{\circ}$ C下孵育总共96小时。使用Cell Titer Glo (普洛麦格公司 (Promega)) 发光试验测量细胞活力并基于相对于未处理对照细胞的活力百分比评估ADC的效力。从使用Prism软件 (GraphPad公司) 生成的剂量曲线得到IC₅₀值。细胞毒性截留值设置为IC₅₀小于或等于50ng/ml。69个最强力的作为ADC的抗NTBA单克隆抗体前移。69个最强力的ADC中只有6个显示IC₅₀值小于12.5ng/ml。对一小

组高细胞毒性抗NTB-A ADC通过流式细胞术测定饱和结合曲线和Kd值。具有11A1和26B7抗体的抗NTB-A ADC被测定为细胞毒性最高。

[0179] 实施例4:抗NTB-A内化试验

[0180] 评估鼠11A1抗体mcMMAF偶联物在NTB-A⁺细胞系U-266中内化的能力(图1)。

[0181] 将U-266抗原阳性细胞与5μg/mL抗人NTB-A抗体药物偶联物11A1-mcMMAF(通过马来酰亚胺己酰基(mc)接头偶联的抗有丝分裂剂单甲基耳他汀F至通过半胱氨酸连接每个抗体4个药物的化学计量比)在4℃下在振荡器上孵育30分钟。对细胞使用RPMI 1640培养基+10%胎牛血清清洗三次并随后取出以5×10⁵个细胞/100μL/孔置于两个相同的96孔U形底板(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)中。将一块板置于37℃下且另一块置于4℃下。对一个样品立即清洗并染色(时间零)。在0.5、1、2、8和24小时时间点收集来自两个板的细胞,使用冰冷的清洗缓冲液(PBS+2.5%胎牛血清)清洗两次,并使用10μg/mL山羊抗小鼠IgG-PE(宾夕法尼亚州西格鲁甫的杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch))染色30分钟,在冰上操作并避光。对细胞使用清洗缓冲液再清洗两次并使用500μl PBS+1%多聚甲醛固定。一旦对所有样品完成收集和染色,立即在FACs Calibur流式细胞仪(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)上对其进行分析,且数据表示为时间零MFI的百分比。

[0182] 实施例5:ADC细胞毒性试验

[0183] 对鼠抗NTB-A单克隆抗体11A1和26B7制备抗体-药物偶联物(ADC)。通过组织蛋白酶可切割的缬氨酸-瓜氨酸(vc)接头偶联抗有丝分裂剂单甲基耳他汀E(MMAE)与抗NTB-A mAb并通过马来酰亚胺己酰基(mc)接头偶联单甲基耳他汀F(MMAF)至通过半胱氨酸连接每个抗体4个药物的化学计量比,如美国专利号7,659,241和7,498,298中所述。在培养基中对抗NTB-A-vc-MMAE(4)和-mc-MMAF(4) ADC连续稀释3倍以生成10点剂量曲线(1,000ng/mL-0.05081ng/mL)并应用于96孔试验板中培养的多发性骨髓瘤细胞。使用抗NTB-A ADC处理Karpas-620、EJM、MM.1R、MM.1S、U-266(NTB-A⁺)和L363(NTB-A⁻)多发性骨髓瘤细胞系(重复四次)并在37℃,5%CO₂下孵育96小时。使用Cell Titer Glo发光细胞毒性试验(普洛麦格公司)测定细胞活力并使用EnVision酶标仪(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer))收集数据。使用GraphPad Prism软件计算剂量效果曲线和IC50值。

[0184] 针对多发性骨髓瘤细胞系的ADC细胞毒性试验的结果总结

[0185]

Ab	药物	Karpas-620	EJM	MM.1S	U-266	MM.1R	同种型
11A1	vcMMAE	3.77	12.5	48.9	2.37	13.6	mIgG1
11A1	mcMMAF	0.648	2.48	3.10	0.877	2.52	mIgG1
26B7	vcMMAE	4.31	52.5	>1000	6.04	78.9	mIgG1
26B7	mcMMAF	2.61	6.07	3.99	1.72	5.86	mIgG1

[0186] 针对AML和NHL细胞系的ADC细胞毒性试验的结果总结

[0187]

Ab	药物	CA46 (NH ₂)	Ramos (NH ₂)	HN1-34 (AML)	HEL5217 (AML)	K562 (AML)	同种型
11A1	vcMMAR	8.91	3.77	1.38	>1000	14.0	mIgG1
11A1	mcMMAR	2.61	1.76	0.861	>1000	2.09	mIgG1
26B7	vcMMAR	13.8	6.83	3.26	>1000	178.2	mIgG1
26B7	mcMMAR	4.91	3.19	1.13	>1000	2.45	mIgG1

[0188] 实施例6: 竞争结合试验

[0189] 该实施例中描述的试验详述了用于评估样品抗体与11A1鼠抗体竞争结合的能力的方法。对于该特定研究,评估了26B7抗体和NT-7抗体(克隆:NT-7(白乐津公司(Biolegend) #317208))与11A1抗体竞争的能力。还评估了11A1抗体与其本身竞争的能力。该试验利用了包含鼠11A1 IgG1抗体的“参考抗体”(即天然(自然)抗体的二价结构中的VH和VL结构域,即由两个相同的免疫球蛋白链对组成的四聚体,各对具有一条轻链和一条重链)。

[0190] 收集每个细胞(如Ramos细胞)表达约24500个NTB-A表面分子的指数生长的NTB-A阳性细胞并在等张磷酸盐缓冲盐水(PBS)中清洗并在冰上储存。将该NTB-A阳性细胞分装至冰上的96孔V形底板中, 2×10^5 个细胞/孔, 100μL 体积/孔。

[0191] 在PBS/FBS(含有2%胎牛血清(FBS)/0.02叠氮化钠的PBS)中制备2X浓度的与荧光标签偶联的参考抗体,其中1X浓度等于0.0188μg/mL(11A1 mAb的Kd值浓度)。随后将该PBS/FBS/标记的Ab溶液分装至96孔稀释板的各孔中(200μL/孔)。留出各孔的A行用于PBS/FBS/标记的Ab溶液中未标记的样品抗体的2X混合物(参见下文第(4)项);还留出足够的孔作为对照。

[0192] 在PBS/FBS AF标记的Ab溶液中制备(待用于评估竞争结合)2X浓度的未标记的样品抗体(样品抗体为20μg/mL;因此1X浓度等于10μg/mL)。随后将该2X浓度的未标记样品抗体分装至96孔稀释板的第一栏的各孔中。随后以五倍稀释系列连续稀释样品(将来自初始样品稀释液的50μL加入下一行中的200μL PBS/FBS/标记的Ab溶液,逐行重复)。

[0193] 留出足够的孔(如孔A1至A6)用于流式细胞术设置和未染色的孔,仅添加PBS/FBS(无标记的参考抗体)。这些孔用作未染色的对照(0%染色)。留出足够的孔(如孔A7至A12)用作100%染色并容纳不含有未标记样品抗体的PBS/FBS/标记的Ab溶液。

[0194] 随后将来自稀释板的100μL稀释的样品一式两份转移至V形底板中相应细胞孔(100μL)中以生成1X浓度。随后将这些样品在冰上避光孵育一小时。

[0195] 随后使用PBS/FBS对细胞清洗两次。例如,对板以1000rpm离心5分钟并弃去上清液,涡旋板以分散细胞,并添加清洗缓冲液(PBS/FBS)(约200μL/孔/清洗);最后一次离心后,将板倒置并印迹(温和操作)。

[0196] 清洗后,将细胞团块重悬于250μL的PBS/FBS中并将细胞保持在2-8°C(避光)直至流式细胞仪上进行分析(例如LSRII流式细胞仪,加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)。

[0197] 一旦置于流式细胞仪上后,即通过在正向散射和侧向散射群体(FSC/SSC)上进行门选来分离感兴趣的细胞群体以生成群体点图(population plot),并获得针对荧光标签

的荧光信号。

[0198] 随后使用S形剂量应答分析(可变斜率)来分析流式细胞术数据。从拟合的曲线确定未标记抗体的IC₅₀(即标记的参考抗体显示最大结合的50%时未标记样品抗体的浓度)。

[0199] 11A1抗体与其本身和抗体26B7竞争,但不与抗体NT-7竞争。只有那些在未标记样品抗体浓度为10 μ g/ml时将11A1结合降低至最大结合的45%以下(优选20%以下或甚至10%以下)的那些抗体被认为与11A1竞争结合NTB-A。

[0200] 还使用美国专利号7,874,067所述的基于FACS的竞争试验来测试11A1和26B7抗体与480.12抗体的竞争。在这类试验中,11A1和26B7抗体不与480.12抗体竞争结合(数据未显示)。

[0201] 实施例7:mAb亲和力测量和结合特异性

[0202] 使用与Alexa Fluor 647偶联的鼠抗人NTB-A抗体(11A1和26B7)的剂量效价来生成饱和结合曲线。将抗原阳性Ramos细胞以1 $\times 10^5$ 个细胞/孔置于96孔V形底板(纽约州罗切斯特的赛默飞世尔科技公司)中。在FACS缓冲液(PBS+2%胎牛血清+0.02%叠氮化物)中制备2X浓缩的抗体的三倍连续稀释液并将其添加至细胞(一式两份)。将抗体溶液与细胞在冰上孵育1小时,避光。使用FACS缓冲液对细胞清洗两次并在LSRII流式细胞仪(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司)上分析。使用GraphPad Prism软件(加利福尼亚州拉由拉市)测定K_D值。

[0203] 测试鼠抗人NTB-A抗体11A1和26B7与U-266多发性骨髓瘤细胞和稳定的293-F17/hNTB-A同种型4和293-F17/猕猴-NTB-A的转染子的结合。将细胞以2.5 $\times 10^5$ 个细胞/孔置于FACS缓冲液(PBS+2%胎牛血清+0.02%叠氮化物)中并与2 μ g/mL抗体在冰上孵育45分钟。对细胞清洗两次并使用山羊抗小鼠IgG-PE(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch),宾夕法尼亚州西格鲁甫)染色30分钟,在冰上操作并避光。对细胞使用FACS缓冲液再清洗两次并使用500 μ l的1X PBS+1%多聚甲醛固定。在FACS Calibur流式细胞仪(BD生物科学公司,加利福尼亚州圣何塞)上分析染色的细胞。

[0204] 亲和力测量

[0205]	抗体	细胞系	K _d (nM) 人 NTB-A
	11A1 鼠 IgG1 抗体	Ramos	0.13
	26B7 鼠 IgG1 抗体	Ramos	0.16

[0206] 实施例8:体内MM移植研究

[0207] 使用NOD scid IL2受体 γ 链敲除(NSG)小鼠来开发多发性骨髓瘤的弥散性细胞系模型,其中肿瘤细胞定位于骨髓隔室(bone marrow compartment)。使用100万个MM.1R多发性骨髓瘤细胞或500万个U-266多发性骨髓瘤细胞植入小鼠,随后在肿瘤细胞植入后使用抗NTB-A抗体药物偶联物给药5天。将使用4个vcMMAE分子加载的vcMMAE抗NTB-A抗体药物偶联物通过腹膜内注射递送至小鼠,注射的单次剂量为1.0和3.0mg/kg。给予抗体药物偶联物后每2-3周,通过ELISA试验监测小鼠血清的循环 λ 轻链Ig(由多发性骨髓瘤肿瘤细胞分泌)的水平。对各研究组中的小鼠评估疾病进展迹象和死亡率,并在出现疾病晚期迹象后处死。生

成对照和治疗研究组的卡普兰-迈耶生存曲线,并进行统计学分析以测定各ADC剂量水平对比载剂对照或非结合对照ADC的观察到的抗肿瘤活性的显著性。

<110> 西雅图基因公司 (SEATTLE GENETICS, INC.)

<120> 抗NTB-A抗体及相关组合物和方法

<130> NTBA-0011IPC

<150> US 61/745,239

<151> 2012-12-21

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A mAb可变区11A1 (VH)

<400> 1

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Lys Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Ile Lys Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Glu Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A mAb可变区11A1 (VL)

<400> 2

Met Glu Ser Asn Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

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

[0001]

	20	25	30
	Val Ser Leu Gly Gln Lys Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Lys Lys		
	35	40	45
	Val Thr Ile Phe Gly Ser Ile Ser Ala Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys		
	50	55	60
	Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Lys Leu Glu Ser		
	65	70	75 80
	Gly Val Ser Ala Arg Phe Ser Asp Ser Gly Ser Gln Asn Arg Ser Gln		
	85	90	95
	Phe Gly Asn Gln Leu Ser Leu Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala		
	100	105	110
	Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Lys Glu Val Pro Tyr		
	115	120	125
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	130	135	140
	<210> 3		
	<211> 137		
	<212> PRT		
	<213> 人工		
[0002]	<220>		
	<223> 抗NTB-A mAb可变区26B7 (VH)		
	<400> 3		
	Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
	1	5	10 15
	Val His Ser Gln Val Gln Leu Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys		
	20	25	30
	Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe		
	35	40	45
	Thr Ile Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
	50	55	60
	Glu Trp Ile Gly Asp Ile His Pro Gly Arg Gly Asn Thr Asn Leu Asn		
	65	70	75 80
	Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Asp Ser Ala Leu		
	100	105	110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly		
	115	120	125
	Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	130	135	

<210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 抗NTB-A mAb可变区26B7 (VL)

 <400> 4
 Met Lys Leu Leu Ala Glu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Phe Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Arg Cys Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 35 40 45
 Ile Ser Ile Trp Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Asn Ile Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Pro
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Gln
 100 105 110

[0003]

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 5

Asp Tyr Tyr Val His
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 6

Lys Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Ile Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 7

Tyr Ser Thr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 8

Lys Ala Ser Lys Lys Val Thr Ile Phe Gly Ser Ile Ser Ala Leu His
1 5 10 15

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 9

[0004]

Asn Gly Ala Lys Leu Glu Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域11A1的CDR序列

<400> 10

Leu Gln Asn Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

<400> 11

Ile Tyr Trp Ile Asn
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

<400> 12

Asp Ile His Pro Gly Arg Gly Asn Thr Asn Leu Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

<400> 13

Glu Asp Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

[0005]

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Trp Phe Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

<400> 15

Lys Thr Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗NTB-A抗体VH和VL结构域26B7的CDR序列

<400> 16

Leu Gln Ser Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

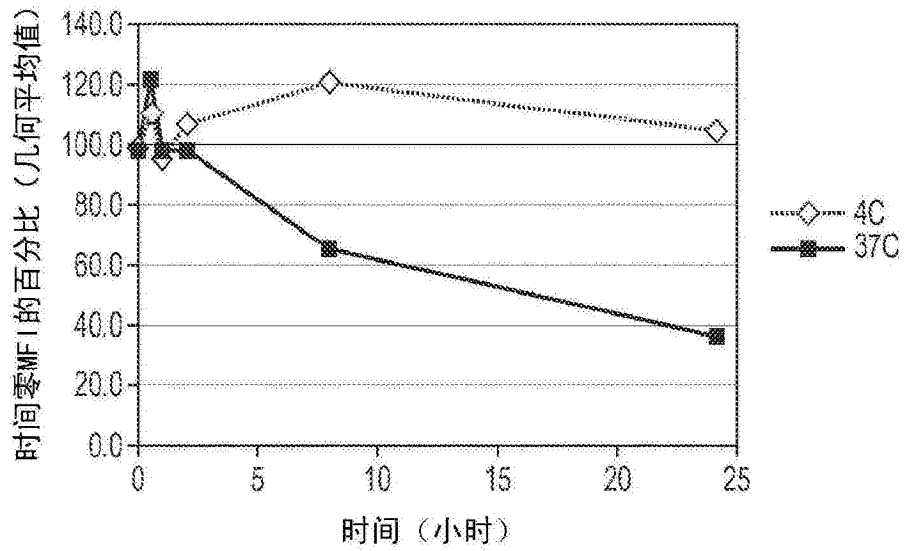


图1

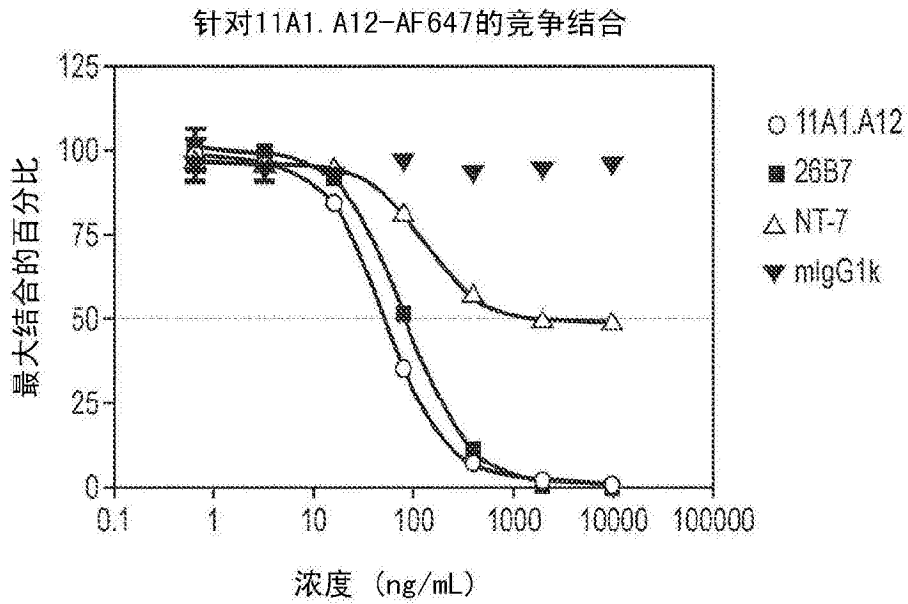


图2