



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103945867 B

(45)授权公告日 2018.01.02

(21)申请号 201280053174.3

(22)申请日 2012.10.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103945867 A

(43)申请公布日 2014.07.23

(30)优先权数据
61/552,337 2011.10.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.04.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/062124 2012.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/063395 EN 2013.05.02

(73)专利权人 NKT治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 阿列姆塞盖德·特鲁内
弗兰西斯·约瑟夫·卡尔
蒂莫西·戴维·琼斯
詹姆斯·P·格雷格森

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 沈锦华

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)

审查员 袁实

权利要求书1页 说明书31页
序列表17页 附图10页

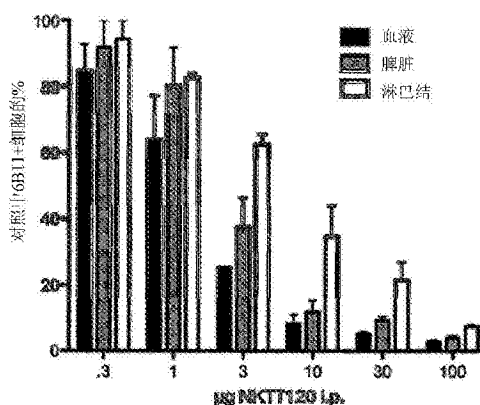
(54)发明名称

针对iNKT的人类化抗体

(57)摘要

本发明提供治疗以抑制免疫反应的方法。所述方法包含向需要治疗的个体以有效抑制所述个体的iNKT细胞功能的量投与选择性结合iNKT细胞的裸阻断抗体。还提供组合物,其包含选择性结合iNKT细胞的经分离人类化抗体。

血液、脾脏和淋巴结中的iNKT细胞通过NKTT120的耗尽



向Vα24转基因Jα18缺乏小鼠腹腔内给予NKTT120(每剂量n=2),并且四十八小时之后将其杀死。将血液、脾脏和淋巴结淋巴细胞分离,并且接着通过流式细胞测量术测定iNKT细胞数目。

1. 一种组合物,其包含选择性结合iNKT细胞上的表位的经分离人类化抗体,其中
 - (i) 所述抗体具有具备SEQ ID No.27的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链,或者
 - (ii) 所述抗体具有具备SEQ ID No.28的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗体具有具备SEQ ID No.27的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗体具有具备SEQ ID No.28的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链。
4. 一种抗体在制造用于治疗气道高反应性病症的药剂中的用途,其中所述抗体具有具备SEQ ID No.27的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链。
5. 一种抗体在制造用于治疗COPD的药剂中的用途,其中所述抗体具有具备SEQ ID No.27的序列的重链和具备SEQ ID No.29的序列的轻链。

针对iNKT的人类化抗体

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案根据35U.S.C. §119 (e) 主张2011年10月27日申请的美国临时申请案第61/552,337号的权益,所述申请案的内容以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 哮喘是一种世界范围内相对常见的疾病。在2009年,疾病控制中心(Centers for Disease Control)估计在美国哮喘的发病率是8.2%的人口或2460万人。世界范围内哮喘的负担较大,估计发病率超过3亿例,并且预期此数目到2025年会增长超过1亿。

[0004] 哮喘是我国代价最高的疾病之一。估计每年美国关于归因于哮喘的健康和生产丧失的花费超过200亿美元。在2006年和2007年,每年在美国有约3500例哮喘相关的死亡并且在世界范围内有超过250,000例死亡。

[0005] 哮喘严重程度根据症状或“发作”的频率和严重程度、肺功能测试的结果和获得症状控制所需的药物水平来分类(NIH,“哮喘诊断与处理指南(Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma),2007”)。约30%的哮喘患者具有轻度间歇性哮喘症状,肺功能测试正常。另外30%的哮喘患者具有轻度持续性症状(每周有两次或两次以上发作),肺功能测试正常。40%的哮喘患者具有中度到中重度持续性每天或连续哮喘症状,肺功能测试异常。据估计,超过80%的哮喘相关的卫生保健成本归因于20%的患有中度到中重度持续性和/或较轻度难治性哮喘的个体。因此,难治性哮喘保持为未得到充分满足的医学需要。

[0006] 已经实行介导免疫系统作为一种治疗哮喘以及多种包括(但不限于)以下的其它疾病和病症的合乎需要的方法:自体免疫疾病、感染、过敏、发炎性病况、自然流产、怀孕、移植植物抗宿主疾病和癌症。T细胞已经成为所述介导的标靶。T细胞是参与多种免疫系统功能的淋巴细胞。T细胞的子集(例如辅助T细胞、细胞毒性T细胞和抑制性T细胞)介导不同免疫功能。自然杀伤T(NKT)细胞是与常规T细胞和自然杀伤(NK)细胞共有表面标记和功能特征的T淋巴细胞子集。不同于T细胞,其识别糖脂抗原而非肽抗原。

[0007] NKT细胞可以分成三个子集:1型,其表达不变T细胞受体并且是CD1d限制的(iNKT);2型(NKT),其表达变化的T细胞受体但是CD1d限制的;和3型,其表达变化的T细胞受体并且不是CD1d限制的(NKT样)。1型iNKT细胞表达独特地重排的、高度保守的半不变TCR- α 链(人类中的Va24-J α 18和小鼠中的Va14-J α 18),所述链优先与特异性TCR- β 链(人类中的VB11或小鼠中的VB8.2、VB7和VB2)配对。其在整个动物系统发生中是高度保守的。这与大多数T细胞亚群形成对照,所述亚群对于其T细胞受体(TCR)具有多样的序列。iNKT细胞的不变TCR与抗原呈现细胞表面上的MHC-I样蛋白CD1d上呈现的糖脂抗原反应。iNKT细胞的标志是其快速产生包括IL-4和IFN γ 的细胞因子混合物的能力,所述细胞因子分别是否由T辅助型I(Th1)和Th2细胞产生的特征细胞因子。不变NKT细胞有时被称为“经典NKT细胞”。

[0008] iNKT细胞的一独特特征在于,其识别CD1d上呈现的海绵衍生的糖脂 α -半乳糖基-神经酰胺(α -GalCer)。这已经被用以通过流动式细胞测量术通过使用负载 α -GalCer的CD1d

四聚体监测小鼠、非人类灵长类动物 (NHP) 和人类 iNKT 细胞。结合到人类 iTCR 的不变环的小鼠单克隆抗体 6B11 也已经被用以监测人类和 NHP iNKT 细胞。

[0009] iNKT 细胞代表了人类和非人类周边血液中的总 T 细胞群体中的极小子集。其相对数目在正常个体之间可以有超过一百倍的变化,代表着人类中 CD3⁺ 细胞的从 0.01% 到超过 1% 的任何值,其中范围的下限代表大多数人类。

[0010] 常规 T 细胞需要暴露于外来抗原以便成熟并且获取记忆表型。通过病理性事件或通过药物介入而耗尽的无性系扩增的常规记忆 T 细胞群体仅可以当具有相同重排的 TCR 的新胸腺移出细胞暴露于与初始损伤类似或相同的外来或病原性抗原时恢复。T 细胞的所述耗尽可以在既定个体的免疫组库内产生“孔洞”。不同于常规 T 细胞, iNKT 细胞具有连续再生能力。在人类中,研究骨髓移植之后的 iNKT 细胞再生。在用于消融疗法的周边血液干细胞移植救护之后一个月已经观测到 iNKT 细胞数目完全恢复到基线。因此, iNKT 细胞耗尽疗法可能比耗尽其它 T 细胞的风险更小。

[0011] 类似于其它 T 细胞, iNKT 细胞在胸腺中发育。对小鼠的研究显示,不同于常规 T 细胞, iNKT 细胞在其自然发育期间通过识别 CD1d 分子上呈现的迄今未知的内源性抗原并且不需要事先暴露于外来或病原性抗原而获取记忆表型。归因于其记忆表型,其可以在周边免疫区室内响应于暴露于由抗原呈现细胞 (APC) 呈现的外来或内源性糖脂抗原而快速活化并且扩增。

[0012] iNKT 细胞共有免疫系统的先天性和应变性组的特征,并且因此通过调节 T 和 B 细胞反应以及先天性免疫性而起独特作用 (1)。iNKT 细胞是快速出现的,这是先天性免疫系统的特征。其还展示应变性免疫系统的特征,因为其共有其它 T 细胞的性质,例如抗原特异性反应。因此,其充当两种系统之间的桥梁,其中其可以起促发炎和免疫调节作用以分别增强或减弱出现免疫反应 (2)。

[0013] iNKT 细胞的性质已经引起对操纵 iNKT 细胞功能作为疾病治疗的研究 (3、4、5、6)。众多研究已经显示, iNKT 细胞可以调节 Th1 与 Th2 反应之间的平衡。假定这些细胞在对病原体的反应、对癌症的免疫监督和对自体免疫性的调节中起一定作用。对于大多数这些病况来说, iNKT 细胞缺陷仅已经得到部分表征,并且在一些情况下,已经通过矛盾研究而有争议。人类研究尤其受两种重要限制因素约束。首先,大多数人类研究已经使用鉴别 iNKT 细胞的次最优方法。第二,大多数人类研究仅是定性的,并且存在极少关于调节 iNKT 细胞数目、比率或功能的功能结果的人类数据。

[0014] iNKT 细胞功能关于其对哮喘的潜在作用已经受到大量关注。通过基因消融 iNKT 细胞或通过药物阻断来抑制 iNKT 细胞功能阻断了小鼠的气道高反应性 (AHR) 出现 (7、8)。这在卵白蛋白和臭氧诱发的 AHR 的情况下都可见 (9)。iNKT 细胞在暴露于卵白蛋白或臭氧之后在野生型小鼠的肺中有所增加。在通过基因剔除编码不变 T 细胞受体的一部分的基因而基因不含 iNKT 细胞功能的小鼠中,授受性转移 iNKT 细胞恢复了过敏原诱发 AHR 的能力 (9)。相反地,用强力 iNKT 细胞激动剂 α -GalCer 活化气道中的 iNKT 细胞在小鼠和非人类灵长类动物中都诱发了不可与 AHR 区分的反应 (10、11)。基因不含 iNKT 细胞的小鼠还对在 COPD 的慢性仙台病毒 (Sendai virus) 模型中的气道中出现病理性变化具有抗性 (12)。类似于来自鼠类模型的结果,在人类中, iNKT 细胞不存在于健康个体的肺中,但其存在于患有轻度到中度哮喘的患者的肺中,并且其在过敏原或病毒挑战之后进一步增加 (3、13、14)。iNKT 细胞水平在患有

哮喘的患者的BAL液与周边血液之间似乎存在极少或不存在相关性。现有技术尚未确定iNKT细胞是否与哮喘有因果关联或是哮喘的结果,或旨在阻断iNKT细胞功能的疗法是否可以用于哮喘的治疗。

[0015] 识别人类不变T细胞受体的小鼠单克隆抗体6B11是美国公开申请案第2007/0160600号的标的。此抗体选择性结合人类iNKT细胞,能够将iNKT细胞与其它淋巴细胞和其它人类组织类型区分。所述申请案提供了关于6B11抗体将会增强还是会抑制免疫反应的冲突陈述。所述申请案在一个方面指示,所述抗体刺激iNKT细胞增殖,表明所述抗体是iNKT细胞的激动剂。所述申请案在另一方面显示,iNKT活性增加可以导致抑制免疫反应。在另一方面,所述申请案指示,干扰iNKT活性将抑制免疫反应。具体来说,所述申请案显示,抗体应偶合到毒素以耗尽iNKT细胞以便抑制免疫反应。因此,本申请案未澄清6B11抗体的使用是合乎需要的医学情况。

发明内容

[0016] 已经出人意料地发现,某些选择性结合到iNKT的裸抗体将在体内低剂量下瞬时耗尽iNKT细胞。此外已经发现,某些选择性结合到iNKT的抗体将活化iNKT细胞。还已经发现以意外地高的亲和力选择性结合人类iNKT细胞的人类化抗体。基于这些发现,据相信,可以治疗气道高反应性病症(例如哮喘(包括(但不限于)过敏性哮喘)和慢性阻塞性肺病(COPD))。此外相信,可以治疗多种其它iNKT细胞介导的病症,例如过敏、自体免疫疾病、除过敏以外的发炎性病症、局部缺血再灌注损伤、镰状细胞贫血、血管炎性疾病、移植排斥反应、感染性疾病和癌症。

[0017] 根据本发明的一个方面,提供一种治疗以抑制iNKT细胞功能的方法。根据本发明的一个方面,提供一种治疗以抑制免疫反应的方法。各方法涉及向需要治疗的个体以有效抑制iNKT细胞功能的量投与选择性结合iNKT细胞的裸抗体。在一些实施例中,所述抗体是耗尽抗体,并且所述量有效耗尽iNKT细胞。

[0018] 前述方法可以用以治疗多种病症。在一个方面,抑制所述个体对抗原的免疫反应。所述抗原可以是例如过敏原、自体抗原或移植抗原。在本发明的一个方面,所述个体患有哮喘,并且所述治疗抑制所述个体中哮喘的一或多种症状。在一些实施例中,所述哮喘是过敏性哮喘。在一些实施例中,所述个体具有(i)轻度持续性哮喘症状(每周有两次或两次以上发作),肺功能测试正常;(ii)中度到重度持续性每天或连续哮喘症状,肺功能测试异常;或(iii)难治性哮喘。在一个方面,所述方法抑制所述个体的气道重塑。在本发明的另一方面,所述个体患有COPD,并且所述治疗抑制所述个体中COPD的一或多种症状。在一个方面,所述治疗抑制所述患有COPD的个体的气道重塑。在一个方面,所述治疗减缓所述个体的疾病进展。在另一方面,所述个体患有过敏、自体免疫疾病、除过敏以外的发炎性病症、局部缺血再灌注损伤、镰状细胞贫血或血管炎性疾病,并且所述治疗抑制所述个体中所述疾病的一或多种症状。在另一方面,所述个体已经接受了移植或是接受移植的候选者,并且所述治疗抑制移植排斥反应的一或多种症状。在另一方面,所述个体患有感染,并且所述治疗减缓所涉及的感染因子的生长、中断所涉及的感染因子的生长或杀死所涉及的感染因子或抑制所述个体中所述感染的一或多种症状。在另一方面,所述个体患有癌症,并且所述治疗减缓所述癌症的生长、中断所述癌症的生长或杀死所述癌症或抑制所述个体中所述癌症的一或

多种症状。在前述方面和实施例中任一者中,所述个体可以是人类,并且所述抗体可以是人类化抗体。在前述方面和实施例中任一者中,所述个体可以是人类,并且所述抗体可以是完全人类抗体。完全人类抗体是仅由人类氨基酸序列组成的抗体。在一些实施例中,所述完全人类抗体是来自不同人类抗体的人类氨基酸序列片段的复合物。

[0019] 本发明涉及使用抗体,所述抗体的性质在下文进行详细描述。在一些实施例中,所述抗体是人类化抗体。在一些实施例中,所述抗体是整体完全人类抗体。在一些实施例中,所述抗体可以是整体完全人类复合抗体。在一些实施例中,所述抗体可以具有三个轻链CDR和三个重链CDR区,并且其中所述三个轻链CDR和三个重链CDR区中的每一者是人类序列的复合物。

[0020] 本发明在另一方面涉及以至少一定亲和力结合到iNKT细胞的人类化抗体。在一些实施例中,所述抗体以关于结合到重组可溶人类iTCR小于1.0 μ g/ml的IC₅₀结合iNKT细胞。在一些实施例中,所述人类化抗体的重链可变区和轻链可变区由人类序列组成。

[0021] 在一些实施例中,所述抗体结合由SEQ ID No.1定义的表位。在一些实施例中,所述抗体结合由SEQ ID No.2定义的表位。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.24、25和26的轻链可变区。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.24、25和26的轻链可变区,并且还在位置85处具有亮氨酸。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.21、22和23的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.21、22和23的重链可变区,并且还在位置23处具有缬氨酸和/或在位置93处具有苏氨酸。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.15、16、17、18、19或20的轻链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.15、16、17、18、19或20的轻链可变区和选自SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.10和18。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.27。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.28。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.29。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.27和29。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.28和29。

[0022] 根据本发明的另一方面,提供一种经分离人类化抗体。所述抗体选择性结合iNKT细胞,其中所述抗体关于结合到重组可溶人类iTCR的IC₅₀小于0.9 μ g/ml。在一些实施例中,所述IC₅₀小于0.8 μ g/ml、小于0.5 μ g/ml和甚至小于0.3 μ g/ml。在一些实施例中,所述IC₅₀在0.1与0.9 μ g/ml之间。在一些实施例中,所述IC₅₀在0.1与0.5 μ g/ml之间。

[0023] 在一些实施例中,所述抗体结合由SEQ ID No.1定义的表位。在其它实施例中,所述抗体结合由SEQ ID No.2定义的表位。在一些实施例中,所述抗体具有三个轻链CDR区和三个重链CDR区,并且其中所述三个轻链和三个重链CDR区中的每一者是人类序列的复合物。

[0024] 在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.24、25和26的轻链可变区。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.24、25和26的轻链可变区,并且还在位置85处具有亮氨酸。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.21、22和23的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体具有包含SEQ ID No.21、22和23的重链可变区,并且还在位置23处具有缬氨酸和/或在位置93处具有苏氨酸。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.15、16、

17、18、19或20的轻链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含选自SEQ ID No.15、16、17、18、19或20的轻链可变区和选自SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14的重链可变区。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.10和18。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.27。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.28。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.29。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.27和29。在一些实施例中,所述抗体包含SEQ ID No.28和29。

[0025] 在一些实施例中,所述抗体结合区与所有人类单倍型的人类周边血液单核细胞是非反应性的。

[0026] 在前述实施例中任一者中,所述人类化抗体可以是耗尽抗体。在前述实施例中任一者中,所述人类化抗体可以是活化抗体。在前述实施例中任一者中,所述抗体可能具有在向个体投与之后不诱发一或多种血清细胞因子水平显著变化的性质。

[0027] 本发明在另一方面是一种方法。所述方法涉及使个体的iNKT细胞与选择性结合iNKT细胞的经分离人类化抗体以有效阻断所述iNKT细胞的活性或耗尽所述iNKT细胞的量接触。在一个实施例中,所述细胞在体外进行接触。在一个实施例中,所述细胞在体内进行接触,并且所述量是足以抑制所述个体的免疫反应的量。在一个实施例中,所述抗体是耗尽抗体,并且所述量足以耗尽所述个体中的iNKT细胞。在这些实施例中,所述抗体是如上文所述的人类化抗体中除了活化抗体之外的任一者。

[0028] 本发明在另一方面是一种方法。所述方法涉及使个体的iNKT细胞与选择性结合并且活化iNKT细胞的经分离人类化抗体以有效活化所述iNKT细胞的量接触。在一个实施例中,所述细胞在体外进行接触。在一个实施例中,所述细胞在体内进行接触,并且所述量是足以增强所述个体的免疫反应的量。在这些实施例中,所述抗体是如上文所述的人类化抗体中除了阻断iNKT细胞功能或耗尽iNKT细胞的抗体之外的任一者。

附图说明

[0029] 图1展示NKTT120与人类周边血液iNKT细胞的结合。将来自三个供体(26027、26028、26031)的人类全血用负载 α -GalCer的CD1d四聚体、6B11-FITC或NKTT120-FITC结合抗CD3和抗Va24mAb染色。接着将红血球溶解并且通过流动式细胞测量术进行细胞分析。所示细胞对CD3+淋巴细胞设门。

[0030] 图2展示CD1d四聚体与iNKT细胞的结合通过NKTT120的阻断。A) 将人类PBMC在存在或不存在30 μ g/ml NKTT120下孵育30分钟,并且然后在不洗涤的情况下,用CD3和负载 α -GalCer的CD1d四聚体染色。抗体的存在阻断四聚体染色。

[0031] B) 将人类iTTCR转染子(表达人类iTTCR的Va24-Ja18和V β 11链)在存在或不存在30 μ g/ml NKTT120下孵育30分钟,并且然后在不洗涤的情况下用负载 α -GalCer的CD1d四聚体染色。NKTT120的存在阻断负载 α -GalCer的CD1d四聚体的结合。

[0032] 图3展示血液、脾脏和淋巴结中的iNKT细胞通过NKTT120的耗尽。向Va24转基因Ja18缺乏小鼠腹膜内给予NKTT120(每剂量n=2),并且四十八小时之后将其杀死。将血液、脾脏和淋巴结淋巴细胞分离,并且接着通过流动式细胞测量术测定iNKT细胞数目。

[0033] 图4展示Va24转基因小鼠中iNKT细胞通过NKTT120耗尽的时间过程。A) 向Va24转基因小鼠(每组n=2)腹膜内注射100 μ g NKTT120,并且在指定时间点将其杀死。对脾脏CD3+

NK1.1+iNKT细胞设门,评估6B11结合细胞的百分比。

[0034] B) 向Vα24转基因小鼠 (每组n=2) 注射100μg NKTT120。对照组不接受NKTT120。四十八小时之后,向单独的NKTT120处理小鼠和对照小鼠注射2μgα-GalCer。在α-GalCer注射之后两小时,将小鼠杀死,并且通过流动式细胞测量术分析脾脏CD3+NK1.1+iNKT细胞的细胞内IFN γ。

[0035] 图5显示,Vα24转基因小鼠中iNKT细胞的药物耗尽消除α-GalCer介导的iNKT细胞依赖性AHR。向回交到BALB/c的Vα24转基因小鼠n=6 (每组n=3) 腹膜内注射100μg NKTT103或利妥昔单抗(Rituximab)。四十八小时之后,将小鼠用1μgα-GalCer攻击。在另外24小时之后,将小鼠用乙酰甲胆碱(methacoline)攻击,并且评估肺阻力(RL)和动态柔量(Cdyn,未图示)。将利妥昔单抗用作阴性同型对照。

[0036] 图6展示人类与食蟹猕猴(Cynomolgus Monkey) iNKT细胞频率的比较。iNKT细胞在周边血液中的如通过CD3、抗Vα24(无性系C15)和6B11结合测定的食蟹猕猴频率范围与见于人类个体中的频率范围惊人地相当。

[0037] 图7展示与人类和食蟹猕猴iNKT细胞的饱和结合的比较。食蟹猕猴(NHP)和人类iNKT细胞在直接竞争性结合分析中展现类似的NKTT120饱和结合。将食蟹猕猴或人类全血与指定浓度的NKTT120一起孵育,并且然后用荧光染料标记的6B11染色以评估iNKT细胞的饱和结合。人类样品购自研究血液组分公司(Research Blood Components, Inc.)。

[0038] 图8展示在给药之后24小时iNKT细胞通过NKTT120的耗尽。将动物用单一剂量的NKTT120处理并且监测七天。数据显示,在处理(每剂量n=1)之后24小时iNKT细胞的剂量依赖性降低。此群动物的处理前基线iNKT水平在0.12%-1.13%的CD3+细胞的范围内。在以0.03mg/kg剂量给药之后24小时可见iNKT细胞的完全耗尽。

[0039] 图9展示食蟹猕猴中iNKT细胞通过NKTT120的耗尽。食蟹猕猴中iNKT细胞耗尽的NKTT120剂量反应。

[0040] 图10展示NKTT120对iNKT、B和T细胞的作用。NKTT120(0.03mg/kg)处理对B细胞和其它T细胞不具有显著作用。

[0041] 图11展示人类全血中的NKTT120细胞因子水平的作用。来自健康供体(n=4)的未经处理的、经NKTT120处理的和经抗CD3处理的全血样品中的细胞因子水平。仅显示不同于对照水平的结果。来自健康供体的血液样品购自研究血液组分公司。

[0042] 图12展示iNKT细胞通过具有降低的Fc效应功能的抗iNKT mAb的活化。

具体实施方式

[0043] 借助于说明本发明的某些方面来进行以下详细描述。应理解,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,涵盖并且可以进行其它方面。因此,以下详细描述不应视为具限制意义。除非另外说明,否则本文所用的科学和技术术语具有通常用于本领域中的含义。本文所提供的定义有助于理解本文中频繁使用的某些术语并且不意欲限制本发明的范围。除非内容另外明确指示,否则单数形式“一(a,an)”和“所述(the)”涵盖复数。除非内容另外明确指示,否则术语“或”一般以其包括“和/或”的意义使用。

[0044] 本发明在一个方面是如本文所述的抗体,其适用于多种目的。所述抗体可以用以鉴别生物样品中iNKT细胞的存在。其可以用以向iNKT细胞体外或体内递送连接到所述抗体

的媒介物。所述媒介物可以共价或非共价连接,并且包括例如标记、毒素、共刺激分子等。所述抗体可以用以干扰或阻断iNKT细胞活性。耗尽抗体可以用以体外或体内从细胞群体耗尽iNKT细胞。活化抗体可以用以体外或体内活化iNKT细胞。所述抗体还可以用以治疗多种医学病况、特别是人类的医学病况。在阻断或耗尽抗体的情况下,据相信,所述抗体可以用以治疗哮喘、COPD、过敏、除过敏以外的炎性病况、移植排斥反应、局部缺血再灌注损伤、镰状细胞疾病和自体免疫疾病。在活化抗体的情况下,据相信,所述抗体可以用以例如治疗癌症和感染性疾病。

[0045] “活化抗体”是当其体内结合到iNKT细胞时导致刺激所述iNKT细胞产生干扰素 γ 、IL 4、IL10或IL 13抗阻断所述iNKT细胞的活性或耗尽所述iNKT细胞的抗体。活化抗体通常不具有Fc部分或具有不结合Fc γ RI和C1q的Fc部分。在一个实施例中,活化抗体的Fc部分不结合Fc γ RI、C1q或Fc γ RIII。具有所述功能的抗体通常是已知的。存在天然的所述抗体,例如具有IgG4Fc区的抗体。还存在具有经基因或化学改变以消除抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)功能的Fc部分的抗体。

[0046] “过敏”是指对物质(过敏原或环境抗原)的异常免疫反应。过敏通常是与抗体由一类具体免疫球蛋白IgE针对过敏原的产生相关的间歇性病况。过敏性反应的症状取决于身体内IgE与抗原反应所处的位置而不同。如果反应沿着呼吸上皮进行,那么症状一般是打喷嚏、咳嗽和哮喘反应。

[0047] “过敏原”意指可以在易受影响的个体中诱发过敏性或哮喘反应的物质。过敏原的清单是庞大的,并且可以包括花粉、植物、昆虫(包括毒液)、动物(包括动物皮屑)、真菌孢子和药物以及环境抗原或刺激物(例如烟尘、烟雾、臭氧、烃、粉尘、寒冷)。

[0048] “哮喘”是指呼吸系统的特征为气道发炎和变窄和气道对所吸入的媒介物的反应性增加的病症。哮喘时常(但并非排他性地)与特应性或过敏性病况相关。哮喘的症状包括由气流阻塞造成的喘鸣、呼吸困难、胸闷和咳嗽的反复发作。与哮喘相关的气道发炎可以通过观测多种例如以下的生理变化来检测:气道上皮剥脱、基膜下胶原蛋白沉积、水肿、肥大细胞活化、炎性细胞(包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)浸润。作为气道发炎的结果,哮喘患者往往会经历气道高反应性(AHR)、气流限制、呼吸道症状和疾病持久性。气流限制包括急性支气管收缩、气道水肿、粘液栓塞形成和气道重塑,往往会导致支气管阻塞的特征。

[0049] “阻断抗体”是当其体内结合到iNKT细胞时导致阻止或减轻所述iNKT细胞产生干扰素 γ 、IL 4、IL10和IL 13的能力的抗体。阻断抗体包括耗尽抗体。

[0050] “复合抗体”是含有来自不同抗体的序列片段的抗体。

[0051] “耗尽抗体”是当其体内结合到iNKT细胞时导致消除iNKT细胞的抗体。消除不需要是完全消除。实际上,消除包括iNKT细胞的可检测的减少。减少可以是例如iNKT细胞减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、75%或75%以上。耗尽抗体通常具有结合Fc γ RI和/或C1q的Fc部分。在一个实施例中,耗尽抗体的Fc部分结合Fc γ RI、C1q和Fc γ RIII。具有所述功能的抗体通常是已知的。存在天然的所述抗体,例如具有IgG1Fc区的抗体。还存在具有经基因或化学改变以增强ADCC和/或CDC功能的Fc部分的抗体。

[0052] “增强免疫反应”通常意指增加干扰素 γ 、IL4、IL10或IL13通过iNKT细胞的产生;增加趋化因子受体的表面表达;或导致iNKT细胞增殖。关于具体疾病或病况,“增强免疫反

应”意指中断所述疾病或病况的一或多种症状(例如癌症或感染性疾病的一或多种症状)的发展、抑制其进展、逆转其发展、或另外减少或改善其。

[0053] 在抗体(或编码抗体的核酸分子)的情形下,“经分离的”意指抗体(或核酸)已经从其自然环境移出或已经由其自然状态改变。因此,“经分离的”未必反映抗体或核酸分子已经从其自然环境移出或已经由其自然状态改变的程度。然而,应理解,已经在一定程度上被纯化的抗体或核酸分子是“经分离的”。

[0054] “个体”意指哺乳动物,例如人类、非人类灵长类动物、狗、猫、绵羊、马、牛、猪或山羊。在一重要实施例中,哺乳动物是人类。

[0055] “抑制iNKT细胞功能”通常意指通过抑制iNKT细胞的活性或耗尽iNKT细胞来降低iNKT细胞的活性。关于具体疾病或病况,“抑制iNKT细胞功能”意指中断所述疾病或病况的一或多种症状(例如哮喘(包括过敏性哮喘)、COPD、过敏、除过敏以外的发炎性疾病、移植宿主疾病、移植排斥反应、局部缺血再灌注损伤和自体免疫疾病的一或多种症状)的发展、抑制其进展、逆转其发展或另外减少或改善其。

[0056] 本文中的方法利用抗体。所述抗体选择性结合iNKT细胞。选择性结合iNKT细胞的抗体意指其具有用以体外或体内结合到物种的iNKT细胞并且将所述iNKT细胞与所述物种的其它组织类型(包括其它NKT类型、其它淋巴细胞类型和在使用抗体的条件下(例如在生理条件下)的所有其它组织类型)区分的能力。在一实施例中,所述抗体选择性结合人类iNKT细胞。在一实施例中,所述抗体结合到iNKT细胞的CDR3环。在一实施例中,所述抗体选择性结合由SEQ ID No.1定义的表位。在其它实施例中,所述抗体选择性结合由SEQ ID No.1和2定义的表位。

[0057] 在一些实施例中,所述抗体是裸抗体。“裸抗体”意指包括抗原结合片段但不具有单独效应分子(例如毒素)连接到其的抗体。在一些实施例中,裸抗体是整体单克隆抗体。在一些实施例中,裸抗体是人类化单克隆抗体。在一些实施例中,裸抗体是完全人类单克隆抗体。裸抗体的Fc区可以经修饰例如以使得抗体具有经改进的半衰期或经改进的介导ADCC的能力。在一些实施例中,裸抗体的Fc区可以经修饰例如以使得抗体具有降低的介导ADCC的能力。裸抗体可以在哺乳动物或非哺乳动物细胞中产生,并且因此可以具有各种糖基化模式。

[0058] 术语“抗体”以最广泛意义使用,并且具体来说包括例如单一单克隆抗体、具有多表位特异性的抗体组合物、单链抗体和抗体的抗原结合片段。抗体可以包括来自任何免疫球蛋白(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA(包括IgA1和IgA2)、IgE、IgD或IgM)的免疫球蛋白恒定域。在一些实施例中,恒定域是介导抗原依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的恒定域。

[0059] 如本文所用,“抗原结合片段”意指完整抗体的结合抗原的一部分。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双功能抗体;线性抗体(萨帕塔(Zapata)等人,蛋白质工程(Protein Eng.)8(10):1057-1062[1995]);和单链抗体分子。

[0060] “Fv”是含有完整抗原识别结合位点的最小抗体片段。此区由一个重链和一个轻链可变域紧密非共价缔合的二聚体组成。在此配置中,各可变域的三个CDR相互作用以界定V_H-V_L二聚体表面上的抗原结合位点。六个CDR共同地赋予所述抗体以抗原结合特异性。

[0061] Fab片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab片段与Fab'片段不

同之处在于,在包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸的重链CH1域的羧基末端处添加几个残基。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初产生为在其之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对。抗体片段的其它化学偶合也是已知的。

[0062] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以基于其恒定域的氨基酸序列而分配到两种称为 κ 和 λ 的明显不同的类型之一。

[0063] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包括抗体的 V_H 和 V_L 域,其中这些域存在于单一多肽链中。优选地,Fv多肽进一步在 V_H 与 V_L 域之间包含多肽连接子,其使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参看普鲁克通(Pluckthun),单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies),第113卷,罗森堡(Rosenburg)和穆尔(Moore)编,施普林格(Springer-Verlag),纽约(New York),第269-315页(1994)。

[0064] 术语融合瘤描述可以识别具体抗原的B细胞与无限生长以使得融合瘤细胞成为一种永久产生单克隆抗体的工厂的骨髓瘤细胞的组合。所述抗体由动物细胞、通常小鼠产生。如果使用小鼠单克隆抗体来治疗不同物种(例如人类),那么人类的免疫系统会将小鼠抗体识别为‘外来的’并且对其发动免疫反应。为避开此免疫反应,可用来自人类抗体的部分以遗传方式置换小鼠抗体中被人类免疫系统识别的部分。此小鼠-人类抗体基因的产物称为“人类化”单克隆抗体。此产物看起来足够像正常人类抗体以避免被患者自身的免疫系统识别和破坏。如果讲所述抗体治疗性用于人类中,那么此避免引发可能有害的免疫反应。

[0065] 在一些实施例中,当向人类投与所述抗体时不引发免疫反应。以此方式,可以将其投与一次以上,在一些实施例中每年投与更多次,而不产生将会干扰后续投药的不希望的免疫反应。如本文结合人类化抗体所用的“不引发免疫反应”意指当与代表人类单倍型多样性的人类PBMC组接触时不产生高于背景的细胞因子反应。所述测试详述于以下实例中。

[0066] 则非人类(例如鼠类)抗体的人类化形式是含有衍生自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、scFv或抗体的其它抗原结合子序列)。人类化抗体通常包括人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基经来自非人类物种(供体抗体,例如小鼠、大鼠或兔)的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR的残基置换。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv构架残基经相应非人类残基置换。人类化抗体还可以包含在受体抗体中和在所导入的CDR或构架序列中都不存在的残基。一般来说,人类化抗体将包含实质上所有的至少一个并且通常两个可变域,其中所有或实质上所有的CDR区对应于非人类免疫球蛋白的CDR区并且所有或实质上所有的FR区是人类免疫球蛋白共有序列的FR区。人类化抗体最佳还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc,通常是人类免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分(琼斯(Jones)等人,自然(Nature),321:522-525(1986);莱克曼(Riechmann)等人,自然,332:323-327(1988);和普雷斯塔(Presta),现代结构生物学评论(Curr.Op.Struct.Biol.),2:593-596(1992))。

[0067] 人类化非人类抗体的方法在本领域中是熟知的。一般来说,人类化抗体具有一或多个从非人类来源引入到其中的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基往往称为“导入”残基,其通常从“导入”可变域获取。人类化可以按照温特(Winter)和合作者的方法通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代相应人类抗体序列来进行(琼斯等人,自然,321:522-525(1986);莱克曼等人,自然,332:323-327(1988);韦荷恩(Verhoeyen)等人,科学(Science),239:1534-1536(1988))。因此,所述“人类化”抗体是嵌合抗体(美国专利第4,816,567号),其中

实质上少于完整人类可变域已经被来自非人类物种的相应序列取代。实际上,人类化抗体通常是一些CDR残基和可能一些FR残基经来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代的人类抗体。

[0068] 欲用于制造人类化抗体的人类可变域(轻和重)的选择可以降低抗原性。根据“最佳拟合”方法,针对已知人类可变域序列的整个库来筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。最接近于啮齿动物的序列的人类序列或序列组合则可接受为人类化抗体的人类构架(FR)(辛斯(Sims)等人,免疫学杂志(J.Immunol.),151:2296(1993);科西亚(Chothia)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),196:901(1987))。另一方法使用衍生自轻或重链的具体子组的所有人类抗体的共有序列的具体构架。相同构架可以用于几种不同人类化抗体(卡特(Carter)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),89:4285(1992);普雷斯塔(Presta)等人,免疫学杂志,151:2623(1993))。

[0069] 在一实施例中,如以下实例中所述,CDR区由重叠人类序列的复合物制成,CDR的一个片段见于一个人类序列中并且同一CDR的另一片段见于另一人类序列中,两个序列中的每一者在片段会合的重叠区处具有共同序列。在一实施例中,复合人类序列不含已知T细胞表位。在一实施例中,如以下实例中所述,复合人类序列不引发人类中的免疫反应。

[0070] 此外重要的是,抗体经人类化而保持对于抗原的高亲和力和其它有利生物性质。在这点上,在CDR外可以存在氨基酸,其促成抗体的亲和力,并且包括这些残基对于具有可接受亲和力的抗体可以是重要的。如本文所用,可变区的共有序列是可变区的包括CDR和某些其它‘构架’残基(据相信对于赋予抗原结合特异性是重要的并且欲包括于人类化抗体中)的那个部分。不包括于共有序列中的残基更可能可取代而不实质性降低抗体对于iNKT细胞的亲和力。共有序列使用例如亲本和人类化序列的三维模型来进行选择。说明和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构形结构的计算机程序也是可用的。检查这些显示器允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的潜在作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。

[0071] 同样可以使用在免疫时能够在无内源性免疫球蛋白产生存在下产生完全人类抗体组库的转基因动物(例如小鼠)。举例来说,已经描述,嵌合和生殖系突变小鼠中抗体重链接合区(J(H))基因的同型接合缺失导致完全抑制内源性抗体产生。所述生殖系突变小鼠中人类生殖系免疫球蛋白基因阵列的转移将在抗原攻击时导致产生人类抗体(参看例如雅各博维奇(Jakobovits)等人,美国国家科学院院刊,90:2551-255(1993);雅各博维奇等人,自然,362:255-258(1993);布吕格曼(Bruggemann)等人,免疫学年鉴(Year in Immunol.),7:33(1993))。人类抗体还可以在噬菌体呈现库中产生(霍根布姆(Hoogenboom)等人,分子生物学杂志,227:381(1991);马克斯(Marks)等人,分子生物学杂志,222:581(1991))。科特(Cote)等人和博尔纳(Boerner)等人的技术也可用于制备人类单克隆抗体(科尔(Cole)等人,单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),阿兰R.丽丝(Alan R.Liss),第77页(1985)0;博尔纳等人,免疫学杂志,147(1):86-95(1991))。

[0072] 在不希望受本发明的任何理论束缚的情况下,据相信,本发明的裸阻断抗体当投与时不仅干扰iNKT细胞的活性,而且实际上导致iNKT细胞的耗尽。还相信,此耗尽是短暂性的,iNKT细胞群体随时间推移而恢复。据相信,iNKT细胞的耗尽由ADCC介导。以此方式,出人意料地,裸抗体可以用以抑制由iNKT细胞介导的免疫反应。据相信,所述免疫反应包括哮喘

(包括过敏性哮喘)、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏、自体免疫疾病、除过敏以外的炎症性病症、局部缺血再灌注损伤、血管炎症性疾病和移植排斥反应。

[0073] 在一个实施例中,抗体在CHO细胞中产生。已经发现,尽管CHO细胞不视为具有关于ADCC的最佳糖基化模式,但CHO细胞中产生的裸抗体有效耗尽iNKT细胞。尽管缺乏对增加ADCC介导的耗尽的Fc区的任何增强,但这些抗体还有效耗尽iNKT细胞。这些抗体在无所述增强的情况下如此有效是出人意料的。

[0074] 在一些实施例中,耗尽抗体在向个体投与之后不诱发一或多种血清细胞因子水平显著变化。“无显著变化”意指在投与耗尽抗体之后个体中一或多种血清细胞因子水平的变化少于25%、少于20%、少于15%、少于10%或少于5%。在一些实施例中,血清细胞因子水平显示在投与耗尽抗体之后高达2小时、4小时、8小时、16小时或24小时无显著变化。血清细胞因子的实例包括(但不限于)表8中所示的血清细胞因子。在一些实施例中,耗尽抗体不诱发表8中所示的一或多种血清细胞因子水平显著变化。在一些实施例中,耗尽抗体不诱发表8中所示的所有血清细胞因子水平显著变化。在一些实施例中,耗尽抗体不诱发表8中所示的血清细胞因子中任2、3、4、5或6者水平显著变化。在一些实施例中,耗尽抗体不诱发任一或多种(包括所有)血清IFN γ 、IL-4、IL-10、IL-17、TNF- α 、IL-2、IL-5、IL-8、IL-1RA和MIP-1 β 水平显著变化。

[0075] 如上文所提及,存在熟知的用于增强抗体有效性的策略。这些改变中的一些是通过Fc区的改变进行的。一些涉及对可变区的改变。在后一情况下,对构架区的改变可以增强抗体结合其标靶的能力。另外,已经显示,对可变区的改变可以延长抗体的半衰期。参看例如“通过工程化可变区减少IgG抗体的消除(Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region)”,哈托利(Hattori)等人,蛋白质工程化、设计与选择(Protein Engineering, Design and Selection),第23卷第5期,第385-392页,2010。

[0076] 一般来说,IgG1已经成为将通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和补体活化而介导细胞杀伤的抗体的普遍选择。很少使用IgG3,这可能是由于其在某种程度上更短的半衰期和广泛异型多形现象。IgG1已经被修饰以增强其细胞杀伤效应功能。例如参看美国公开的申请案2008/008018344。所述修饰的一种具体方法描述于“具有增强的效应功能的工程化抗体Fc变体(Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function)”,达希亚特(Dahiyat)等人,PNAS,第103卷,第11期,4005-4010,2006年3月14日中。另一方面,IgG4已经由于其对于Fc γ RI具有低亲和力而用作活化抗体。IgG4已经被修饰以减少其Fc效应功能,使其更适合作为活化抗体。举例来说,经两个单一残基取代修饰的Fc区描述于“消除针对人类CD4的经修饰的IgG单克隆抗体的Fc受体依赖性效应功能(Elimination of Fc Receptor-dependent Effector Function of a Modified IgG Monoclonal Antibody to Human CD4)”,特鲁纳(Truneh)等人,免疫学杂志(The Journal of Immunology),1925-1933,2000中。还进行对Fc区的糖基化的改变以改进基于抗体的疗法。参看例如“糖基化作为改进基于抗体的疗法的策略(Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics)”,杰弗里斯R.(Jefferis,R.),自然综述(Nature Reviews),第8卷,2009年3月,226-234。所有如上文所述的所述修饰都在本发明的范围内。

[0077] 一般来说,宿主细胞可以经克隆载体或表达载体转染或转型用于人类化抗体产生,并且适当时培养于经修饰的常规营养培养基中用于诱发启动子、选择转型体或扩增编

码所需序列的基因。培养条件(例如培养基、温度、pH等)可以由熟练技术人员在不过度实验的情况下进行选择。一般来说,用于最大化细胞培养物的生产力的原理、方案和实用技术可以见于哺乳动物细胞生物技术:一种实用方法(Mammalian Cell Biotechnology:a Practical Approach),M.布特勒(M.Butler)编(IRL出版社(IRL Press),1991)和分子克隆实验室手册(Molecular Cloning,A Laboratory Manual),第3版,第1-3卷,萨姆布鲁克(Sambrook)和拉塞尔(Rusell)编(2001)冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)中。

[0078] 真核细胞转染和原核细胞转型的方法对本领域普通技术人员来说是已知的,并且包括例如CaCl₂、CaPO₄、脂质体介导法和电穿孔。取决于所用宿主细胞,转型是使用对于所述细胞适当的标准技术进行的。举例来说,如分子克隆实验室手册,第3版,第1-3卷,萨姆布鲁克和拉塞尔编(2001)冷泉港实验室出版社所述的采用氯化钙的钙处理;或电穿孔可以用于原核生物。对于不含有细胞壁的哺乳动物细胞来说,可以使用格雷安(Graham)和范德阿博(van der Eb),病毒学(Virology),52:456-457(1978)的磷酸钙沉淀方法。哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面已经描述于例如美国专利第4,399,216号中。转型到酵母中通常根据范索林根(Van Solingen)等人,细菌学杂志(J.Bact.),130:946(1977)或肖(Hsiao)等人,美国国家科学院院刊,76:3829(1979)的方法来进行。然而,还可以使用其它将DNA引入到细胞中的方法,例如通过细胞核微注射、电穿孔、与完整细胞的细菌原生质体融合或聚阳离子(例如凝聚胺、聚鸟氨酸)。对于各种用于转型哺乳动物细胞的技术,参看基翁(Keown)等人,酶学方法(Methods in Enzymology),185:527-537(1990)和曼苏尔(Mansour)等人,自然,336:348-352(1988)。

[0079] 适用于在本文中载体中克隆DNA的宿主细胞包括原核生物、酵母或更高级真核生物细胞。适合的原核生物包括真细菌,例如革兰氏阴性(Gram-negative)或革兰氏阳性(Gram-positive)生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),例如大肠杆菌(E.coli)。各种大肠杆菌菌株是可公开获得的,例如大肠杆菌K12菌株MM294(ATCC 31,446);大肠杆菌X1776(ATCC 31,537);大肠杆菌菌株W3110(ATCC 27,325)和K5 772(ATCC 53,635)。其它适合的原核宿主细胞包括肠杆菌科,例如埃希氏菌属(Escherichia),例如大肠杆菌;肠杆菌属(Enterobacter);欧文菌属(Erwinia);克雷伯氏菌属(Klebsiella);变形菌属(Proteus);沙门氏菌属(Salmonella),例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium);沙雷氏菌属(Serratia),例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans);和志贺氏菌属(Shigella);以及杆菌(Bacilli),例如枯草杆菌(B.subtilis)和地衣杆菌(B.licheniformis)(例如1989年4月12日公开的DD 266,710中揭示的地衣杆菌41P);假单胞菌属(Pseudomonas),例如铜绿假单胞菌(P.aeruginosa);和链霉菌属(Streptomyces)。或者或另外,体外克隆方法(例如PCR或其它核酸聚合酶反应)是适合的。

[0080] 适用于表达糖基化人类化抗体的宿主细胞包括衍生自多细胞生物体的细胞。无脊椎动物细胞的实例包括昆虫细胞,例如果蝇S2(Drosophila S2)和夜蛾Sf9(Spodoptera Sf9);以及植物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)和COS细胞。更具体实例包括经SV40转型的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(经亚克隆用于生长于悬浮培养物中的293或293细胞,格雷安等人,普通病毒学杂志(J.Gen Virol.),36:59(1977));中国仓鼠卵巢细胞/-DHFP(CHO,乌尔劳布

(Urlaub) 和蔡辛 (Chasin), 美国国家科学院院刊, 77:4216 (1980)); 小鼠塞尔托利氏细胞 (sertoli cell) (TM4, 马瑟 (Mather), 繁殖生物学 (Biol.Reprod.), 23:243-251 (1980)); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 和小鼠乳房肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51)。适当宿主细胞的选择在本领域中的常规能力技术内。

[0081] 编码人类化抗体 (或其部分) 的核酸 (例如cDNA或基因组DNA) 可以插入到可复制载体中用于克隆 (扩增DNA) 或用于表达。各种载体是可公开获得的。载体可以例如呈质体/粘质体、病毒颗粒或噬菌体形式。适当核酸序列可以通过多种程序而插入到载体中。一般来说, DNA使用本领域中已知的技术插入到适当限制性核酸内切酶位点中。载体组分一般包括 (但不限于) 以下中的一或多者: 信号序列、复制起点、一或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。含有这些组分中的一或多者的适合载体的构筑使用为本领域技术人员已知的标准接合技术。

[0082] 人类化抗体 (或其部分) 可以不仅直接重组地产生, 而且以与异源多肽的融合多肽形式产生, 所述异源多肽可以是信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N-末端处具有特异性裂解位点的其它多肽。一般来说, 信号序列可以是载体的组分, 或其可以是编码插入到载体中的DNA的人类化抗体 (或其部分) 的一部分。

[0083] 表达载体或克隆载体可以包括使得载体能够在一或多种所选宿主细胞中复制的核酸序列。所述序列对于多种细菌、酵母和病毒来说是熟知的。来自质体pBR322的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 质体起点适用于酵母, 并且各种病毒来源 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV) 适用于哺乳动物细胞中的克隆载体。

[0084] 表达和克隆载体可以含有也称为可选择标记的选择基因。典型选择基因编码如下蛋白质: (a) 赋予对抗生素或其它毒素 (例如氨苄西林 (ampicillin)、新霉素 (neomycin)、甲氨蝶呤 (methotrexate) 或四环素 (tetracycline)) 的抗性; (b) 补充营养缺陷型缺乏; 或 (c) 供应不可获自复合培养基的关键营养素, 例如编码用于杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0085] 表达和克隆载体通常含有可操作地连接于如下人类化抗体 (或其部分) 的启动子: 编码核酸序列以引导mRNA合成。由多种潜在宿主细胞识别的启动子是熟知的。适用于原核宿主情况的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统 [常 (Chang) 等人, 自然, 275:615 (1978); 戈德尔 (Goeddel) 等人, 自然, 281:544 (1979)]、碱性磷酸酶 (一种色氨酸 (trp) 启动子系统) [戈德尔, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.), 8:4057 (1980); EP 36,776] 和混合启动子 (例如tac启动子) [德波尔 (deBoer) 等人, 美国国家科学院院刊, 80:21-25 (1983)]。适用于细菌系统中的启动子还将含有可操作地连接于编码HCN或Kir2.1通道的DNA的夏因-达尔加莫 (Shine-Dalgarno, S.D.) 序列。

[0086] 从哺乳动物宿主细胞中的载体进行的人类化抗体 (或其部分) 转录例如通过由病毒 (例如多瘤病毒、禽痘病毒 (1989年7月5日公开的UK 2,211,504)、腺病毒 (例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、B型肝炎病毒和猴病毒40 (SV40)) 基因组、异源哺乳动物启动子 (例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子) 和热休克启动子获得的启动子而控制, 限制条件为所述启动子与宿主细胞系统相容。

[0087] 编码人类化抗体的DNA由高级真核生物的转录可以通过插入增强子序列到载体中而增加。增强子是DNA的顺式作用元件, 通常约具有10到300个bp, 其作用于启动子上以增加其转录。许多增强子序列现从哺乳动物基因已知 (球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白和

胰岛素)。然而,我们通常将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起点的后侧(bp 100-270)上的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点的后侧上的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。增强子可以在人类化抗体(或其部分)编码序列的5'或3'位处剪接到载体中,但优选地位于从启动子起的5'位点处。

[0088] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类或来自其它多细胞生物体的有核细胞)中的表达载体还将含有终止转录和稳定化mRNA所需的序列。所述序列通常可获自真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶尔3'非翻译区。这些区含有转录为编码人类化抗体(或其部分)的mRNA的非翻译部分中的聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。

[0089] 举例来说,病毒载体(例如腺相关病毒(AAV)载体)可以可操作地连接控制元件的组分。举例来说,典型载体包括转录起始区、欲表达的蛋白质的核苷酸序列和转录终止区。通常,这种可操作地连接之构筑体将在其5和3区处与AAV ITR序列侧接,所述序列是病毒顺式元件。控制序列往往可以由衍生自病毒(例如多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猴病毒40)的启动子提供。病毒调节序列可以经选择以达到在多种细胞中的高表达水平。或者,遍在表达启动子(例如早期巨细胞病毒启动子)可以用以实现在任何细胞类型中的表达。第三替代方案是使用驱动组织特异性表达的启动子。此方法在所需蛋白质在非靶组织中的表达可能会具有有害作用时特别适用。因此,根据各种实施例,载体含有充当心脏特异性启动子的近端人脑利尿钠肽(hBNP)启动子。关于这种载体的构筑的细节,参看拉普安特(LaPointe)等人,“通过腺病毒载体中的人类BNP启动子左心室靶向体内报告基因表达(Left Ventricular Targeting of Reporter Gene Expression In Vivo by Human BNP Promoter in an Adenoviral Vector)”,美国生理学杂志心脏与循环生理学(Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.),283:H1439-45(2002)。

[0090] 在各种实施例中,人类化抗体包括具有共有序列的重链可变区。共有序列基于6B11而产生,并且包括所有的6B11重链CDR区、一或多个构架残基,并且对于剩余氨基酸来说,在一个实施例中,抗体包括来自人类抗体的任何序列或序列复合物。在一个实施例中,轻链共有序列包含SEQ ID No.24、25和26,并且还在位置85处包含亮氨酸。在一些实施例中,重链共有序列包含SEQ ID No.21、22和23,并且还在位置23处具有缬氨酸和/或在位置93处具有苏氨酸。其它合乎需要的构架残基于表1中进行突出。

[0091] 在各种实施例中,人类化抗体包括重链可变区,其具有SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14的氨基酸序列或与SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14具有90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上或99%或99%以上序列一致性的氨基酸序列;但始终包括SEQ ID No.24、25和26的共有序列并且还在位置85处包括亮氨酸。在一些实施例中,其中抗体包括重链可变区,其具有与SEQ ID No.7、8、9、10、11、12、13或14具有90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上或99%或99%以上序列一致性的氨基酸序列,氨基酸差异中的一或多者或全部是保守取代。在一些实施例中,取代仅是存在于人类抗体中的取代。人类化抗体可以进一步包括轻链可变区,其具有SEQ ID No.15、16、17、18、19、20或21的氨基酸序列或与SEQ ID No.15、16、17、18、19或20具有90%或90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上或99%或99%以上序列一致性的氨基酸序列;但始终包括SEQ ID No.21、22和23的共有序列并且还在位置23处包括缬氨酸和/或在位置93处包括苏氨酸。在一些实施例中,其中抗体包括轻链可变区,其具有与SEQ ID No.15、16、17、18、19或20具有90%或

90%以上、95%或95%以上、98%或98%以上或99%或99%以上序列一致性的氨基酸序列，氨基酸差异中的一或多者或全部是保守取代；但始终包括SEQ ID No. 21、22和23的共有序列并且还在位置23处包括缬氨酸和/或在位置93处包括苏氨酸。涵盖所述重链和轻链氨基酸序列的任何组合。在一些实施例中，人类化抗体包括 (i) 具有SEQ ID No. 7、8、9、10、11、12、13或14中任一者的氨基酸序列的重链可变区；和 (ii) 具有SEQ ID No. 15、16、17、18、19或20中任一者的氨基酸序列的轻链可变区。

[0092] 在各种实施例中，人类化抗体包括 (i) 包含SEQ ID NO 27或28的氨基酸序列的可变重链区；和 (ii) 包含SEQ ID NO 29的氨基酸序列的可变轻链区。

[0093] “保守氨基酸取代”是指用多肽的氨基酸取代另一功能上类似的氨基酸。所述保守氨基酸可以根据熟知技术在多肽中取代彼此以对多肽的结构或功能的干扰最小。以下五组各自含有可以保守取代彼此的氨基酸：脂肪族：甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)；芳香族：苯丙氨酸(F)、酪氨酸(T)、色氨酸(W)；含硫：甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)；碱性：精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)；酸性：天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)。

[0094] 制造、克隆、表达单克隆抗体(包括相关载体和细胞系)的方法为本领域普通技术人员所熟知。(参看例如美国公开案第2009/0175923号，其揭示内容特此以全文引用的方式并入本文中。)

[0095] 人类化抗体可以按医药组合物形式投与以便治疗各种病症。所述组合物包括抗体和一或多种其它医药学上可接受的组分。参看雷明顿氏医药科学(Remington's Pharmaceutical Science)(第15版，马克出版公司(Mack Publishing Company)，伊斯顿(Easton)，宾夕法尼亚州(Pa.) (1980))。优选形式取决于预期投药模式和治疗应用。组合物还可以取决于所需调配物而包括医药学上可接受的无毒性载剂或稀释剂，其定义为通常用以调配用于动物或人类投药的医药组合物的媒剂。稀释剂经选择以免不利地影响抗体的生物活性。所述稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和汉克氏溶液(Hank's solution)。另外，医药组合物或调配物还可以包括其它载剂或无毒性非治疗性非免疫原性稳定剂等。

[0096] 医药组合物还可以包括较大缓慢代谢大分子，例如蛋白质、多糖(例如壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(例如乳胶官能化SEPHAROSE.TM. (通用电气医疗生物科学有限公司(GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.))、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(例如小油滴或脂质体)。

[0097] 医药组合物可以是可注射组合物。可注射组合物包括溶液、悬浮液、分散液等。可注射溶液、悬浮液、分散液等可以根据本领域中熟知的技术(参看例如雷明顿氏医药科学，第43章，第14版，马克出版公司，伊斯顿，宾夕法尼亚州)使用适合分散剂或润湿剂和悬浮剂(例如无菌油剂，包括合成单或二酸甘油酯和包括油酸的脂肪酸)来调配。

[0098] 包括本发明的抗体的可注射组合物可以在水、盐水、等张盐水、磷酸盐缓冲盐水、柠檬酸盐缓冲盐水等中制备，并且可以任选地与无毒性表面活性剂混合。分散液还可以在甘油、液体聚乙烯、二醇、DNA、植物油、三醋精等和其混合物中制备。在一般储存和使用条件下，这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物生长。适用于注射或输注的医药剂型包括包含活性成分的无菌水溶液或分散液或无菌粉剂，所述粉剂适合于临时制备无菌可注射或可输

注溶液或分散液。优选地,最终剂型是无菌流体并且在制造和储存条件下稳定。溶液、悬浮液或分散液的液体载剂或媒剂可以是溶剂或液体分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇或液体聚乙二醇等)、植物油、无毒性甘油酯和其适合混合物。溶液、悬浮液或分散液的适当流动性可以例如通过形成脂质体、在分散液的情况下通过维持所需粒度或通过使用无毒性表面活性剂而维持。微生物作用的预防可以通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来实现。可以包括等张剂,例如糖、缓冲液或氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝水凝胶和明胶)来实现。可以添加溶解性增强剂。

[0099] 无菌可注射组合物可以通过以下方式来制备:将所需量的抗体在适当溶剂中与各种例如如上文列举的其它成分结合和随后必要时通过例如过滤灭菌来灭菌。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分加任何其它存在于预先经无菌过滤的溶液中的所需成分的粉末。可以使用任何适合灭菌工艺,例如过滤灭菌(例如0.22微米过滤或纳米过滤)、 γ 或电子束灭菌或脉冲白光。其它适合灭菌工艺包括UtiSter(珀伽索斯生物制品(Pegasus Biologics)),欧文(Irvine)加利福尼亚州(Calif.)和例如美国专利第6,946,098号和美国专利第5,730,933号中所述的工艺。

[0100] 在各种实施例中,最终溶液经调节以具有约4与约9之间、约5与约7之间、约5.5与约6.5之间或约6的pH。组合物的pH可以用药理学上可接受的酸、碱或缓冲液进行调节。盐酸是适合酸的一实例,并且氢氧化钠是适合碱的一实例。盐酸或氢氧化钠可以呈任何适合形式,例如1N溶液。

[0101] 所得可注射溶液优选地含有有效治疗疾病的量的一或多种抗体。在各种实施例中,抗体以约0.0001mg/ml与约50mg/ml之间的浓度存在于可注射组合物中。在各种实施例中,抗体以约0.01mg/mL与约10mg/mL之间的浓度存在于可注射组合物中。

[0102] 抗体还可以通过本领域中已知用于投与抗体的其它投药模式投与。所述投药模式包括吸入、摄入和局部施用。

[0103] 实例

[0104] 实例1.从6B11鼠类抗体产生复合人类化抗体。

[0105] 简单来说,已经测定抗iNKT受体抗体无性系6B11的重链和轻链V区(VH和Vk)序列(15)。基于这些序列,产生Composite Human Antibodies™(安提托普有限公司(Antitope Ltd),剑桥(Cambridge),英国(UK))。Composite Human Antibodies™具有由人类序列片段组成的可变区,所述可变区具有与小鼠抗体无性系6B11序列一致的CDR。用于构筑Composite Human Antibodies™的人类V区序列的片段来源于无关人类抗体序列数据库。针对结合到MHC II类的潜力,使用iTOPE™分析测试每个所选序列片段以及由接合片段形成的接合处,并且将所有最终Composite Human Antibody™序列变异体设计以避免T细胞表位。使用编码人类序列片段组合的合成寡核苷酸产生Composite Human Antibody™ V区基因。然后将这些基因克隆到含有人类恒定区的载体中,并且产生抗体,并且通过竞争性ELISA相比于嵌合参照单克隆测试其向靶抗原的结合。

[0106] 更具体来说,小鼠CDR内含有的残基(使用卡巴特(Kabat)和科西亚(Chothia)定义)以及多种小鼠构架残基维持于Composite Human Antibodies™中。为选择重要构架残

基,使用Swiss PDB产生鼠类6B11抗体V区的结构模型,并且进行分析以便鉴别V区中对于抗体的结合性质可能重要的限制性氨基酸。

[0107] 根据以上分析,我们确定,可以将来自几种不同人类抗体的人类序列片段的复合物组合以形成维持6B11鼠类序列的CDR和所选构架残基的抗体。在CDR外可以存在宽泛的替代性人类片段,但在CDR内仅可以存在窄少的可能人类片段。Composite Human AntibodyTM变异体中的所有CDR区都包含一个以上无关人类序列片段(来源于人类序列数据库)。

[0108] 选择一大初步组可以用以产生6B11Composite Human Antibody变异体的序列片段,并且使用iTopeTM(安提托普(Antitope))技术进行分析以便计算机模拟分析向人类MHC II类等位基因的肽结合,和使用TCEDTM(安提托普)(已知抗体序列相关T细胞表位的数据库)进行分析。将鉴别为与人类MHC II类的显著非人类生殖系结合剂或针对TCEDTM评估为显著命中的序列片段丢弃。此产生一减小组的序列片段,并且再次分析这些序列片段的组合以确保片段之间的接合处不含有潜在T细胞表位。然后将所选片段组合以产生重链和轻链可变区序列用于合成。最初设计并且构筑五个重链和四个轻链。另外,基于如下先前观测结果设计其它链以试图增加人类化抗体对于其标靶抗原的亲和力:构架片段选择中的变化可能对总体亲和力具有作用。对于初始VH设计来说,大多数序列片段与人类子组3抗体构架相关,并且对于其它设计来说,优先包括子组1、2和4相关片段。对于初始Vk设计来说,大多数序列片段与人类子组4抗体构架相关,对于其它设计来说,优先包括子组1和2相关片段。总计,如表1中详述,对于序列,构筑八个VH和六个Vk链。将所有VH链与所有Vk链组合测试,得到总共48种抗体。

[0109] 表1

[0110]

NKT01序列比对:

NKT重链:

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH2: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH3: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH4: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH5: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH6: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH7: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	
VH8: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	LTQASQTFSTSR	AVRQAPGKGLINVA	IRLRSMTATVAZSVT	CEPTYSK	SSATVILQNSLRAEDT	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS	

NKT轻链:

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VK1: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS
VK2: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS
VK3: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS
VK4: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS
VK5: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS
VK6: DIQMTQSPDSLSASVGRVTIT	CSASQNTNVA	TIQCKPQAPRLLIY	ASTTRGYP	DS	SGSCPDFTLTISSLQ	EDFA	AVYIC	QKNTVDAAMAI	ACQET	TTVSS

限制性残基以反白形式突出。

[0111] 表1续表

[0112]

前导与鼠类序列的NK-T01比较

前导重链:

KURINE: EVKLEPSGGGLVQPGSSMKLSCTVASCSTSSNYMAMVYKQSPFAGLEWYAFIRLSSNMYATYVARSVKGRFTISRDPSSSVYIQANILRAEDKGIYCTHRKSNYVYANDYKSCQCHSTVTS
 VH2: EVYLIRESGGGVQPGSGEELACTASGFTTSKYNMNTVRAEKGLEWPAEIRLSSNMYATYVARSVKGRFTISRDPSSSVYIQANILRAEDKGIYCTHRKSNYVYANDYKSCQCHSTVTS
 VH4: EVYLIRESGGGVQPGSGEELSCVASSSTTSNINMNTVRAEKGLEWPAEIRLSSNMYATYVARSVKGRFTISRDPSSSVYIQANILRAEDKGIYCTHRKSNYVYANDYKSCQCHSTVTS
 VH7: EVYLIRESGSEWNEPCGSMKLSCTVASCSTTSNINMNTVRAEKGLEWPAEIRLSSNMYATYVARSVKGRFTISRDPSSSVYIQANILRAEDKGIYCTHRKSNYVYANDYKSCQCHSTVTS

前导轻链:

KORINE: DIVATQSHFNSTSVYDRYSITCTASQDVSTAVAYKSGKGGKLLIKASTHTGTPTERTSSSGSTVYNTIISYQAEILALIKCOOHYSTPTWTFSTKLEIK
 VL1: DIVATQSHFNSTSVYDRYSITCTASQDVSTAVAYKSGKGGKLLIKASTHTGTPTERTSSSGSTVYNTIISYQAEILALIKCOOHYSTPTWTFSTKLEIK
 VL2: DIVATQSHFNSTSVYDRYSITCTASQDVSTAVAYKSGKGGKLLIKASTHTGTPTERTSSSGSTVYNTIISYQAEILALIKCOOHYSTPTWTFSTKLEIK
 VL6: DIVATQSHFNSTSVYDRYSITCTASQDVSTAVAYKSGKGGKLLIKASTHTGTPTERTSSSGSTVYNTIISYQAEILALIKCOOHYSTPTWTFSTKLEIK

与鼠类的差异以反白形式突出

[0113] 使用一系列经退火、接合和PCR扩增以得到全长合成V区的重叠寡核苷酸合成6B11的所有变异Composite Human Antibodies™ VH和Vκ区基因。然后将经组装的变异体直接克隆到安提托普的pANT表达载体系统中。使用两种重链载体:IgG4PE (S228P,L235E) 用于构筑体VH1到VH5,并且IgG1用于所有构筑体(VH1到VH8),即将VH1到VH5制造为IgG4PE和IgG1。

[0114] 最初,将复合重链和轻链的所有组合(与Vκ1到Vκ4组合的VH1到VH5)制造为具有IgG4PE和IgG1恒定区(即总共40种抗体)。将编码40种抗体的载体通过电穿孔稳定转染到N50细胞中,并且使用200nM甲氨蝶呤(西格马(Sigma)目录第M8407号)进行选择。使用IgG1

和IgG4ELISA测试每一构筑体的几种甲氨蝶呤抗性群落的IgG表达水平,并且选择最佳表达系并且将其在液氮下冷冻。将IgG1表达细胞系扩增用于抗体产生和测试。接着,将三种其它VH区(VH6到VH 8)和两种其它Vk区(Vk5和Vk6)仅与IgG1恒定区构筑在一起。如上所述对于其它V区的所有组合且与初始V区组合制造稳定细胞系(即28种其它抗体)。所有变异体都实现成功转染和无性系选择,但由于生长极其缓慢且表达水平低,在合理时间尺度内不可能使一种变异体VH 6/Vk2到达蛋白质纯化阶段。

[0115] 将6B11的47种IgG1变异体在蛋白A琼脂糖凝胶柱(通用电气医疗目录第110034-93号)上从NS0细胞培养上清液纯化,并且基于预测氨基酸序列通过OD280nm使用消光系数 ϵ (0.1%)进行定量。含有VH 6或VH 8变异重链的变异体的 ϵ (0.1%)是1.58。所有其它变异体的 ϵ (0.1%)是1.60。将约1mg每一抗体变异体纯化,并且通过还原SDS-PAGE分析前导抗体(参看以下)。观测到对应于预测重链和轻链大小的频带,不存在任何污染的证据。

[0116] 通过竞争性ELISA评估47种NS0衍生的6B11Composite Human AntibodyTM变异体与重组TCR异二聚体(Precision AntibodyTM)的结合。简单来说,将HIS-SelectTM高灵敏度(HS)镍涂布板96孔透明条带孔板(西格马目录第55688号)在4℃下用5 μ g/ml于PBS中的纯化TCR异二聚体涂布1小时。将抗iNKT受体Composite Human AntibodyTM变异体中的每一者的稀释系列(50-0.39 μ g/ml)与恒定浓度的生物素化抗iNKT受体嵌合参照抗体(3 μ g/ml)在0.05%BSA/PBS中预混合。将经涂布的ELISA板用PBS/0.05%Tween 20洗涤,并且添加100 μ l预混合抗体到每一孔中。将板在室温下孵育1小时。使用抗生物素蛋白链菌素-HRP(西格马目录第00S5512号)和TMB单溶液底物(英杰(Invitrogen)目录第00-2323号)检测生物素化抗iNKT受体嵌合抗体与纯化TCR异二聚体的结合。在用3M HCl使反应停止之后,在450nm下在丹尼克斯技术(Dynex Technologies)MRX TC II读板仪上测量吸光度,并且将测试抗体的结合曲线针对每一板上包括的抗iNKT受体嵌合参照抗体标准物进行比较。为允许在实验内和实验之间进行比较,将变异体的IC₅₀值针对每一板上包括的参照抗体进行规范化。

[0117] 所有所测试的Composite Human AntibodyTM变异体与嵌合参照抗体标准物(6B11IgG1)相比的相对IC₅₀值展示在表2中。

[0118] 表2

[0119]

	VK1	VK2	VK3	VK4	VK5	VK6
VH 1	0.477	0.421	0.273	0.258	0.832	0.372
VH 2	0.376	0.347			0.791	0.424
VH 3	0.583	0.410			0.990	0.696
VH 4	0.435	0.291			0.617	0.486
VH 5	1.188	0.757	0.475	0.525	1.599	1.206
VH 6	0.945		0.466	0.505	1.596	0.550
VH 7	1.550	1.357	0.889	0.877	2.190	1.344
VH 8	0.365	0.286			1.471	0.674

[0120] 表2:所有Composite Human AntibodyTM变异体与嵌合6B11IgG1相比的相对IC₅₀值。值通过用测试抗体的IC₅₀除以参照抗体的IC₅₀来计算,并且代表两个实验。

[0121] 在竞争性ELISA中进一步测试八种具有最低相对IC₅₀值的变异体以允许进行更直

接的比较(表3)。此证实,所选变异体与6B11嵌合参照抗体相比具有经改善的结合概况,并且相对IC₅₀值与来自第一实验的相对IC₅₀值相当。

[0122] 表3

[0123]

	相对IC ₅₀
VH 3/VK3	0.342
VH 2/VK4	0.199
VH 3/VK3	0.354
VH 3/VK4	0.320
VH 4/VK3	0.282
VH 4/VK4	0.212
VH 8/VK3	0.293
VH 8/VK4	0.293

[0124] 表3:八种前导Composite Human AntibodyTM变异体与嵌合6B11IgG1相比的相对IC₅₀值。值通过用测试抗体的IC₅₀除以参照抗体的IC₅₀来计算,并且代表两个实验。

[0125] 应注意,虽然在一些变异体中可能预期相较于对照抗体的结合有适度改善,但具有有所观测程度的结合改善是完全出人意料的。具体来说,结合相较于对照抗体被改善2倍以上、3倍以上、4倍以上和甚至5倍以上。

[0126] 通过SEC评估Composite Human AntibodyTM变异体形成蛋白质聚集体的倾向。简单来说,选择四种具有最低相对IC₅₀值的变异体用于分析:即VH 2/VK4、VH 4/VK3、VH4/VK4和VH 8/VK4。将50μl每一变异体负载到SuperdexTM 200 5/150GL凝胶过滤柱(通用电气医疗编号28-9065-61)上,并且使用AKTA纯化器通过柱泵吸。捕捉SEC迹线。VH 2/VK4、VH 4/VK3和VH 4/VK4Composite Human AntibodyTM变异体未显示形成蛋白质聚集体的证据。然而,VH 8/VK4变异体的迹线似乎显示在1A3洗提份中有少量聚集。

[0127] 基于Composite Human AntibodiesTM的结合数据、V区序列和SEC分析,进一步测试以下抗体:NKT T103(6B11嵌合IgG1对照抗体-SEQ ID No.30和31)、NKTT120(SEQ ID No.27和29)、NKTT219(SEQ ID No.27和17)和NKTT320(SEQ ID No.28和29)。NKTT120包含VK4轻链和VH4轻链的轻和重序列。NKTT219包含VK3和VH4的轻和重序列。NKTT219具有与NKTT120相同的IgG1恒定域。然而,NKTT219的恒定域区具有与NKTT120(通过设计)相比不同的糖基化模式,因为其表达于具有岩藻糖基转移酶缺失的细胞系中。此在分子的Fc部分中产生非岩藻糖基化(或无岩藻糖基化)碳水化合物模式,其增强其结合Fc-γ-R111的能力,因此增强其ADCC能力(5×-10×)。(参看参考文献18-22)。此已经在体外结合实验(高达100倍改善)中和在转基因小鼠和猴子中的体内NKT细胞耗尽实验(5×-10×改善)中得到证实。

[0128] 实例2.NKTT120的表征

[0129] 使用重组人类不变TCR和细胞进行NKTT120的结合亲和力测量和功能表征,并且在转基因小鼠和食蟹猕猴中测试体内功能。数据显示,NKTT120对于呈纯化可溶形式或iNKT细胞上的膜蛋白质形式的人类不变T细胞受体(iTCR)具有高选择性和特异性。当结合到细胞上的iTCR时,NKTT120介导那些细胞的耗尽。在Fc功能方面,其它研究显示,NKTT120结合到人类FcγRI、C1q和FcγRI11。最终,NKTT120介导的iNKT细胞耗尽在体外人类全血样品中或

食蟹猕猴体内不诱发细胞因子反应。

[0130] NKTT120结合到Hu-siTCR(人类可溶iTCR)

[0131] 通过ELISA和SPR使用重组可溶人类iTCR(Hu-siTCR)评估NKTT120和其它抗iNKT TCR mAb的结合。在使用Hu-siTCR的ELISA中,与IC₅₀是1.0μg/ml的嵌合6B11mAb相比,NKTT120展示0.2μg/ml的IC₅₀值。后续通过SPR(BIAcore™)的分析显示,对于Hu-siTCR,NKTT120具有约60nM K_D。

[0132] NKTT120与人类iNKT细胞的结合

[0133] 如同负载α-GalCer的CD1d四聚体和小鼠抗人类iTCR mAb 6B11,人类化NKTT120特异性结合人类iNKT细胞。为比较负载α-GalCer的CD1d四聚体、6B11和NKTT120与人类iNKT细胞的结合,将来自健康供体的全血(购自研究血液组分)分别用每一媒介物结合CD3和抗Vα 24mAb染色。明显地,NKTT120与iNKT细胞的结合特异性与6B11和负载α-GalCer的CD1d四聚体一样。(图1)

[0134] NKTT120识别iNKT TCR上的重叠表位和α-GalCer结合位点

[0135] NKTT120表位,不变CDR3环,存在于iTCR的结合到CD1d的区中。为研究NKTT120表位,将人类PBMC或表达人类iTCR的转染子在存在或不存在NKTT120下孵育,随后用负载α-GalCer的CD1d四聚体染色。NKTT120的存在完全消除四聚体结合。(图2)

[0136] 与其它人类细胞系的非反应性

[0137] 为显示NKTT120对人类iNKT细胞的特异性,将NKTT120与体外扩增的人类iNKT细胞的结合跟与淋巴和非淋巴谱系的一组所选人类细胞系的结合相比(表4)。

[0138] 表4

[0139]

细胞系	谱系	NKTT120	MHC I
Jurkat	T淋巴细胞	-	+
Raji	B淋巴细胞	-	+
THP-1	单核-巨噬细胞	-	+
U937	前髓-单核细胞性	-	+
K562*	红白血病	-	-
HEK-293	胚肾上皮	-	+
HeLa	宫颈癌	-	+
FO-1*	黑色素瘤	-	-
LNCaP	前列腺癌	-	+

[0140] 使用流动式细胞测量术测试一组人类细胞系的NKTT120结合。

[0141] -无结合;+结合;*已知不表达MHC I的细胞

[0142] MHC I染色充当阳性对照,而纯化人类IgG充当阴性对照。NKTT120不与所测试细胞系中任一者交叉反应,而其结合到体外扩增的人类iNKT细胞。九种所测试细胞系中有七种识别抗MHC I类阳性对照mAb。如先前已经描述,MHC I类表达不存在于K562和FO-1细胞上,因此如所预期,在当前研究中抗MHC I类对照mAb不结合到这些细胞。

[0143] NKTT120的Fc功能分析

[0144] NKTT120是人类化IgG1mAb,并且因此预期其结合到人类Fc γ RI和C1q。作为其IgG-

Fc性质的表征的一部分,将其在ELISA中评估与Fc γ RI和Fc γ RIII和补体组分C1q的反应性。将以下三种对照抗体用于NKTT120的表征研究中:(i)NKTT103,一种嵌合6B11mAb,其与NKTT120共有相同IgG-Fc域但具有亲本鼠类V域区;(ii)NKTT219,一种人类化mAb,其与NKTT120具有相同可变区但具有抗体依赖性细胞介导毒性(ADCC)增强的人类化IgG1;和(iii)NKTT320,一种人类化mAb,其与NKTT120具有相同可变区但具有经修饰的IgG4同型。所有三种抗体(NKTT120、NKTT219和NKTT320)以类似特异性和亲和力结合到相同iTCR表位。

[0145] NKTT120结合到Fc γ RI和Fc γ RIII。表达于NK细胞上的Fc γ RI是治疗性IgG1mAb体内介导ADCC的主要机制。NKTT120还结合到C1q,其是补体膜攻击复合物的第一子组分,其识别并且结合到IgG的重链,并且起始经典补体路径,导致补体依赖性细胞毒性(CDC)。嵌合6B11mAb展示与NKTT120类似的Fc结合性质。在后续BIAcore™分析中,发现NKTT120结合Fc γ RI以及Fc γ RIII并且结合到C1q。经设计具有增强的Fc效应功能的NKTT219结合到Fc γ RI以及Fc γ RIII两者,并且结合到C1q,并且因此预期具有经改善的耗尽iNKT细胞的能力。相比之下,Fc效应功能经消除的NKTT320不识别Fc γ RI、Fc γ RIII或C1q,并且因此预期不导致iNKT细胞耗尽。

[0146] Va24转基因小鼠中的iNKT细胞耗尽

[0147] 使用表达人类(Va24-Ja18)不变TCR α 链转基因的小鼠。这些小鼠缺乏鼠类Ja18区,并且因此不能够产生Va14-Ja18⁺鼠类不变NKT细胞。所有存在于小鼠中的iNKT细胞仅能够表达转基因人类不变TCR α 链并且因此都携带NKTT120表位。这些CD3+NK1.1+典型iNKT细胞的比例与野生型小鼠中的比例(全部CD3+T细胞的约2%)非常相当。然而,虽然所有iNKT细胞都由于转基因的随机整合性质而表达含有NKTT120表位的人类不变TCR α 域,但大比例的常规(非iNKT)T细胞同样表达其。此外,人类Va24 α 链与各种内源性小鼠TCR β 链配对。这些Va24 α 链-小鼠 β 链对中的一些似乎削弱6B11结合,以使得大多数但不是所有Va24表达T细胞还结合6B11(和NKTT120)。此有效产生NKTT120的“凹陷(sink)”,并且可能影响研究结果的解释。因此,虽然这些转基因小鼠非常适用于研究iNKT细胞耗尽,但其作为用于研究NKTT120的生理作用的模型受到限制。

[0148] 综合来说,在这些小鼠中,大多数CD3+T细胞(约65%)表达转基因人类Va24 α 链并且可以使用商用抗Va24mAb(C15)来染色。CD3+T细胞中约30%结合6B11和NKTT120。CD3+T细胞中仅2%共同表达NK标记NK1.1(将其鉴别为典型iNKT细胞)并且结合6B11(和NKTT120)。重要的是记住,在这些小鼠中,仅少数6B11结合CD3+T细胞事实上是iNKT细胞。另外,秉承的是,所有iNKT细胞都表达人类iTCR α 链并且因此结合6B11和NKTT120。在下文描述的耗尽实验中,主要焦点在于CD3+NK1.1+典型iNKT细胞群体。

[0149] NKTT120快速、选择性并且有效地耗尽Va24转基因小鼠中的iNKT细胞

[0150] 为确立周边血液、脾脏和淋巴结中的iNKT细胞通过NKTT120的耗尽的剂量反应,向Va24转基因Ja18缺乏小鼠腹膜内给予指定剂量的NKTT120(图3)。在给药之后四十八小时,将小鼠杀死,并且分离血液、脾脏和淋巴结淋巴细胞。通过流动式细胞测量术(CD3+NK1.1+6B11+细胞)测定iNKT细胞数目。iNKT细胞的耗尽在周边血液中最有效,继而是脾脏和淋巴结。在淋巴结中达到与血液相当的耗尽需要10倍更高剂量:30 μ g耗尽淋巴结中的iNKT细胞达到在血液中通过3 μ g剂量达到的水平,并且当分别比较100 μ g和10 μ g剂量时,可见淋巴结与血液中的耗尽程度类似。

[0151] 此外,为确立NKTT120介导的iNKT细胞耗尽的动力学的时间过程,向Vα24转基因Ja18缺乏小鼠腹膜内给予100μg NKTT120 (每剂量n=2)。在指定时间点将小鼠杀死,分离脾脏细胞,并且通过流动式细胞测量术测定iNKT细胞数目。iNKT细胞数目在给药之后两小时实质上减小,到给药之后六小时几乎完全耗尽。(图4,图片A)。为进一步证实功能iNKT细胞通过NKTT120给药完全耗尽,向Vα24转基因Ja18缺乏小鼠腹膜内给予100μg NKTT120。四十八小时之后,向小鼠静脉内注射2μg iNKT细胞超激动剂αGalCer。在此αGalCer攻击之后两小时,将小鼠杀死,收集脾脏细胞,并且通过流动式细胞测量术(对CD3+NK1.1+细胞设门)分析细胞内IFN γ。将数据与来自不注射NKTT120的对照小鼠的数据相比。虽然在未经处理的小鼠中检测到稳固IFN γ反应,但用NKTT120预处理消除对α-GalCer的任何反应(图4,图片B)。

[0152] iNKT细胞的药物耗尽消除α-GalCer引起的AHR

[0153] 已经显示,通过鼻内α-GalCer攻击募集到肺的iNKT细胞足以在小鼠和猴中诱发AHR(10、11)。在使用6B11嵌合抗体(NKTT103)和回交到BALB/c背景六代的Vα24转基因小鼠(BALB/c小鼠一般更易为Th2倾向的哮喘模型)的初步实验中,据显示,iNKT细胞的药物耗尽可以实质上改善鼻内α-GalCer攻击的作用。

[0154] 图4:Vα24转基因小鼠中iNKT细胞通过NKTT120的耗尽的时间过程

[0155] A.向Vα24转基因小鼠(每组n=2)腹膜内注射100μg NKTT120,并且在指定时间点将其杀死。对脾脏CD3+NK1.1+iNKT细胞设门,评估6B11结合细胞的百分比。

[0156] B.向Vα24转基因小鼠(每组n=2)注射100μg NKTT120。对照组不接受NKTT120。四十八小时之后,向单独的NKTT120处理小鼠和对照小鼠注射2μgα-GalCer。在α-GalCer注射之后两小时,将小鼠杀死,并且通过流动式细胞测量术分析脾脏CD3+NK1.1+iNKT细胞的细胞内IFN γ。

[0157] 图5显示,iNKT细胞的药物耗尽消除鼻内投与的α-GalCer诱发的AHR。

[0158] 数据表明,iNKT细胞耗尽的机制不是通过边缘化,而是通过ADCC和/或CDC。

[0159] 食蟹猕猴中的NKTT120的初步非GLP PK/PD研究

[0160] 在两个非GLP研究中使用食蟹猕猴测试NKTT120。在第一研究中,探索NKTT120的iNKT细胞耗尽剂量反应,以便确定NKTT120耗尽iNKT细胞的剂量和帮助引导用于更广泛PK/PD研究的剂量选择。由于以下因素选择食蟹猕猴用于这些初步非GLP药物学和PK/PD研究:(i)人类与食蟹猕猴中的NKTT120结合表位(iTCR的CDR3α环)之间的序列一致性;(ii)体外数据,其指示NKTT120阳性并且相当结合到食蟹猕猴与人类iNKT细胞,但NKTT120不显著结合到啮齿动物和其它物种的iNKT细胞;(iii)NKTT120对食蟹猕猴iNKT细胞的所显示反应性和特异性;(iv)iNKT细胞计数分布在人类与食蟹猕猴周边血液之间的类似性。

[0161] 与人类NKTT120抗原表位的物种序列同源性

[0162] 人类与食蟹猕猴之间的iTCR氨基酸序列类似,靶NKTT120结合区仅有一个氨基酸不同(表5)。尽管整体Vα24-J18区在灵长类动物和非灵长类动物物种中高度保守,但啮齿动物和人类中的相关NKTT120结合表位区有三个氨基酸不同,这足以消除抗体的结合。因此,NKTT120结合到来自人类和食蟹猕猴和恒河猴(rhesus monkey)的iNKT细胞,但不结合到来自松鼠猴(squirrel monkey)或啮齿动物的细胞。其还结合到表达人类Vα24-Jα18iTCR-α链转基因的小鼠。

[0163] 表5:

[0164]

人类	CVVSDRGSTLGRLY
食蟹猕猴	CVVSDRGSTLGKLY
恒河猴	CVVSDRGSTLGKLY
小鼠	CVVGDRGSALGRLH
大鼠	CVVADRGSA LGKLY
猪	CVVGDRGSRLGRLY

[0165] 人类和食蟹猕猴中的iNKT细胞频率

[0166] 为了比较人类和食蟹猕猴中的iNKT细胞频率,通过流动式细胞测量术评估来自人类健康供体的全血(血液样品购自研究血液组分公司)和食蟹猕猴中的iNKT细胞数目。数据显示人类与食蟹猕猴中iNKT细胞频率相当。(图6)。

[0167] NKTT120在人类与食蟹猕猴iNKT细胞中展示类似饱和结合概况

[0168] 为测量NKTT120与iNKT细胞的饱和结合,将人类全血样品(购自研究血液组分公司)或食蟹猕猴全血与不同浓度的NKTT120一起在冰上孵育30分钟,并且接着用荧光染料标记的6B11染色。滴定曲线显示人类与食蟹猕猴iNKT细胞具有类似饱和结合(如通过6B11染色的阻断所测定)。累积来说,数据证实,食蟹猕猴是用于NKTT120的非临床毒物学研究的最相关动物。(图7)

[0169] 食蟹猕猴中的剂量范围获得iNKT细胞耗尽研究

[0170] 在剂量范围获得药效学研究中,测试六个剂量:0.0005、0.001、0.002、0.003、0.01和0.03mg/kg(每剂量n=1)。在给药之后追踪动物持续七天,在所述时间期间通过流动式细胞测量术测量iNKT细胞;将数据表达为总T细胞的百分比。还通过流动式细胞测量术监测T和B淋巴细胞、CD4+T细胞和NK细胞。进行临床化学和血液学评估;测量急性期蛋白质C-反应性蛋白和结合球蛋白,并且测量所选细胞因子GM-CSF、IL-4、IL-6、TNF α 和IFN γ 。

[0171] NKTT120产生周边血液iNKT细胞的剂量依赖性减少(图8),完全耗尽在0.03mg/kg剂量下24小时内观测到并且持续7天监测时间段。部分耗尽在较低剂量下观测到并且似乎可逆。在0.003mg/kg或0.003mg/kg以下的剂量下,未观测到对iNKT细胞的作用。投药后未注意到明显毒性。除对iNKT细胞的预期作用以外,在此研究中未注意到其它视为测试物相关的作用。

[0172] 食蟹猕猴中的PK/PD研究

[0173] 基于剂量范围获得研究的结果,选择三个NKTT120剂量(0.003、0.03和0.3mg/kg;每剂量n=3)以用于药效学/药物动力学(PK/PD)研究中,所述研究监测淋巴细胞持续相对于先前研究的时间段延长的时间段(即28天相较于七天)。流动式细胞测量术将iNKT细胞测量为总T细胞的百分比,并且还用以测量T和B淋巴细胞、CD4+T细胞和NK细胞。除了剂量范围获得研究中测量的那些参数之外,还测试血清中抗NKTT120抗体的存在。

[0174] 投药后未注意到明显毒性。两个最高剂量完全耗尽iNKT细胞持续研究的持续时间,而低剂量将iNKT细胞减少到基线的约50%并且到第四天返回到基线的约80%(图9)。在T和B细胞中未注意到其它测试物相关的变化(图10)。未检测到抗NKTT120抗体。

[0175] 尽管剂量范围获得研究显示,iNKT细胞快速耗尽,并且血清细胞因子水平因此不增加,但存在以下理论可能性:细胞因子可以作为NKTT120在iNKT细胞耗尽之前结合到iNKT

细胞的结果而释放,因此测量所选细胞因子(GM-CSF、IL-4、IL-6、TNF α 和IFN γ)以证实先前结果。对细胞因子没有作用。

[0176] 总的来说,结论是,NKTT120投与以可逆并且剂量依赖性的方式、在对其它血液、生物化学或免疫学参数不存在显著作用的情况下导致周边iNKT细胞的特异性耗尽。

[0177] 食蟹猕猴中的NKTT120的药物动力学分析

[0178] 评估NKTT120的PK。PK分析显示,在对于单克隆抗体疗法相当典型的参数(包括约11天的半衰期)的情况下,NKTT120在所有剂量内具有一致PK概况。根据单一静脉内剂量投与到食蟹猕猴的NKTT120的药物动力学参数展示在表6和表7中。

[0179] 表6:食蟹猕猴中的NKTT120的药物动力学参数

[0180]

剂量 (mg/kg)	AUC _{0-∞} (hr·ng/mL)	AUC _{0-∞} /剂量 [(hr·ng/mL)/mg/kg]	AUC ₀₋₆₇₂ (hr·ng/mL)	AUC ₀₋₆₇₂ /剂量 [(hr·ng/mL)/mg/kg]
0.003	10500±2380	3510000±794000	8320±1250	2770000±416000
0.03	148000±23600	4950000±787000	124000±17500	4130000±583000
0.3	1620000±182000	5410000±608000	1370000±123000	4580000±411000

[0181] 表7:食蟹猕猴中的NKTT120的药物动力学参数

剂量(mg/kg)	Cl (mL/min/kg)	t _{1/2} (hr)	V _s (mL/kg)
0.003	0.00493±0.00118	306±61.2	117±0.494
0.03	0.00342±0.0005000	263±43.5	75.91±13.1
0.3	0.00311±0.000329	253±26.6	64.8±6/09

[0183] 具备具有ADCC增强的IgG-Fc效应功能的iNKT细胞抗体的食蟹猕猴中的PK/PD研究

[0184] 将NKTT120对iNKT细胞耗尽的作用与具有ADCC增强的IgG-Fc效应功能但相同抗原特异性和亲和力的抗体(NKTT219)相比。向食蟹猕猴静脉内投与各自0.003mg/kg的NKTT120和NKTT219,并且在28天内的时间点测量iNKT细胞。数据确定,与相同剂量下NKTT120介导的部分耗尽相比,iNKT细胞在0.003mg/kg剂量NKTT219下有完全耗尽。这些数据证实,iNKT细胞耗尽通过ADCC介导,因为在此研究中,在NKTT219的情况下预期并且观测到10倍增强活性。数据还证实以下概念,在0.003mg/kg低剂量NKTT120下观测到的短暂性iNKT细胞减少是由于部分耗尽,因为完全耗尽通过相同剂量的NKTT219(其具有增强的ADCC活性)达到。

[0185] 作为耗尽mAb(NKTT120和NKTT219)的阴性对照,在高于NKTT120的剂量高达30倍的剂量下测试不具有Fc效应功能的NKTT320,并且其不耗尽iNKT细胞。来自两种对照抗体(增强的耗尽抗体NKTT219和非耗尽抗体NKTT320)的数据证实,与遮蔽iTCR表位或螯合iNKT细胞相反,NKTT120的确耗尽iNKT细胞。

[0186] NKTT120不诱发体外人类全血中的细胞因子反应

[0187] 为确定人类中响应于NKTT120处理的细胞因子释放的可能性,我们在人类全血实验中评估NKTT120的作用。在通过流动式细胞测量术测量iNKT细胞数目之后,将全血在存在或不存在20 μ g/ml(此浓度高于1mg/kg剂量之后的预测血浆暴露)NKTT120下在TruCulture™管中孵育24小时。作为阳性对照,将全血在含抗CD3mAb的管中进行孵育。在24小时之后,将上清液收集、冷冻并且装运到循规医学(Rules-Based Medicine)(德克萨斯州(TX))用于多元细胞因子分析。所测试的分析物列举在表8中。

[0188] 表8

[0189]	α -1-抗胰蛋白酶(AAT)	介白素-1 受体拮抗剂(IL-1ra)
	β -2-微球蛋白(B2M)	介白素-2 (IL-2)
	脑衍生神经营养因子(BDNF)	介白素-23 (IL-23)
	补体 C3 (C3)	介白素-3 (IL-3)
	C-反应性蛋白(CRP)	介白素-4 (IL-4)
	嗜酸性粒细胞趋化因子-1	介白素-5 (IL-5)
	因子 VII	介白素-6 (IL-6)
	纤维蛋白原	介白素-7 (IL-7)
	铁蛋白(FRTN)	介白素-8 (IL-8)
	GM-CSF	单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)
	结合球蛋白	巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)
	细胞间粘附分子 1 (ICAM-1)	巨噬细胞炎症蛋白-1 β (MIP-1 β)
	干扰素 γ (IFN- γ)	基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)
	介白素-1 α (IL-1 α)	基质金属蛋白酶-3 (MMP-3)
	介白素-1 β (IL-1 β)	基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)
	介白素-10 (IL-10)	T 细胞特异性蛋白 RANTES (RANTES)
	介白素-12 次单元 p40 (IL-12p40)	干细胞因子(SCF)
	介白素-12 次单元 p70 (IL-12p70)	金属蛋白酶 1 组织抑制剂(TIMP-1)
	介白素-15 (IL-15)	肿瘤坏死因子 α (TNF- α)
	介白素-17 (IL-17)	肿瘤坏死因子 β (TNF- β)
	介白素-18 (IL-18)	肿瘤坏死因子受体 2 (TNFR2)
	血管内皮生长因子(VEGF)	血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1)
	血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)	维生素 D 结合蛋白(VDBP)

[0190] 多元细胞因子分析的结果展示在图11中(仅展示与未经处理的对照水平显示出变化的细胞因子的数据)。几种细胞因子(IFN γ 、IL-4、IL-10、IL-17、TNF- α 、IL-2、IL-5、IL-8、IL-1RA和MIP-1 β)的实质性升高在四个所测试的供体中的至少两者中通过抗CD3阳性对照诱发。然而,NKTT120在四个供体样品中任一者中都不诱发任何细胞因子反应。数据显示,NKTT120介导的iNKT细胞耗尽在体外人类全血环境中不具有可测量的细胞因子诱发作用。

[0191] iNKT细胞通过经设计以具有降低的Fc效应功能的人类化抗iNKT mAb的活化的证实

[0192] NKTT320是特异性识别人类iTcR的人类化mAb。其是在铰链区中引入两个氨基酸变化而经修饰的IgG4mAb,一者经设计以稳定化IgG4重链二聚体形成,并且第2者经设计以降低残余Fc γ R结合能力(纽曼(Newman)等人,临床免疫学(Clin Immunol) 98,164-174)。以下研究证实,NKTT320可以活化来自健康供体的人类全血中的人类iNKT细胞。

[0193] 将人类全血稀释于RPMI中,并且在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下与20 μ g/ml对照IgG或20 μ g/ml NKTT320一起孵育过夜。然后将样品用抗CD3、CD4、Va24、Vb11、CD25和CD69表面染色。将RBC溶解,并且将细胞固定、渗透并且对于细胞内IFN- γ 和IL-4染色,并且在BD LSR Fortessa上进行流动式细胞测量术分析。通过CD3/Va24和Vb11染色鉴别iNKT细胞。

[0194] 结果显示,NKTT320诱发细胞内IFN- γ 和IL-4在来自健康志愿者的人类全血中的表达(图12)。还观测到活化标记CD69和CD25的上调(数据未图示)。

[0195] 参考文献

[0196] 1.范卡尔L.(Van Kaer,L.)2007.NKT细胞:具有先天性效应功能的T淋巴细胞(NKT cells:T lymphocytes with innate effector functions).免疫学目前视点(Curr Opin Immunol)19:354-364。

[0197] 2.范卡尔L.(Van Kaer,L.),V.V.帕雷克尔(V.V.Parekh)和L.吴(L.Wu).2010.不变自然杀伤T细胞:桥接先天性与应变性免疫性(Invariant natural killer T cells:bridging innate and adaptive immunity).细胞与组织研究(Cell Tissue Res)343:43-55。

[0198] 3.梅津D.T.(Umetsu,D.T.)和R.H.德克吕夫(R.H.Dekruyff).2010.自然杀伤T细胞在哮喘的发病机制方面是重要的:哮喘的多种路径(Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma:the many pathways to asthma).过敏与临床免疫学杂志(J Allergy Clin Immunol)125:975-979。

[0199] 4.本德拉克A.(Bendelac,A.),P.B.萨维奇(P.B.Savage)和L.泰顿(L.Teyton).2007.NKT细胞生物学(The biology of NKT cells).免疫学年鉴(Annu Rev Immunol)25:297-336。

[0200] 5.松田J.L.(Matsuda,J.L.),T.马来瓦伊(T.Mallewaey),J.斯科特布朗(J.Scott-Browne)和L.加潘(L.Gapin).2008.CD1d限制性iNKT细胞,免疫系统的‘瑞士军刀’(CD1d-restricted iNKT cells,the‘Swiss-Army knife’of the immune system).免疫学目前视点(Curr Opin Immunol)20:358-368。

[0201] 6.吴L.(Wu,L.)和L.范卡尔(L.Van Kaer).2009.自然杀伤T细胞与自体免疫疾病(Natural killer T cells and autoimmune disease).当代分子医学(Curr Mol Med)9:4-14。

[0202] 7.里斯博纳M.(Lisbonne,M.),S.迪姆(S.Diem),A.德卡斯特罗凯勒(A.de Castro Keller),J.莱佛特(J.Lefort),L.M.阿劳约(L.M.Araujo),P.哈希姆(P.Hachem),J.M.富尔诺(J.M.Fourneau),S.西多布里(S.Sidobre),M.克罗嫩伯格(M.Kronenberg),M.谷口(M.Taniguchi),P.范恩德特(P.Van Endert),M.戴(M.Dy),P.阿斯肯纳瑟(P.Askenase),M.拉索(M.Russo),B.B.瓦尔加夫替格(B.B.Vargaftig),A.赫伯林(A.Herbelin)和M.C.雷特-德-莫赖斯(M.C.Leite-de-Moraes).2003.前沿:在实验哮喘模型中针对过敏原诱发的气道发炎和高反应性需要不变Va14NKT细胞(Cutting edge:invariant V alpha 14NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model).免疫学杂志(J Immunol)171:1637-1641。

[0203] 8.隆巴尔迪V.(Lombardi,V.),P.斯托克(P.Stock),A.K.辛格(A.K.Singh),J.克泽虎(J.Kerzerho),W.王(W.Yang),B.A.沙利文(B.A.Sullivan),X.李(X.Li),T.白土(T.Shiratsuchi),N.E.赫纳秋克(N.E.Hnatiuk),A.R.豪厄尔(A.R.Howell),K.O.于(K.O.Yu),S.A.波尔切利(S.A.Porcelli),M.辻(M.Tsuji),M.克罗嫩伯格(M.Kronenberg),S.B.威尔逊(S.B.Wilson)和O.阿克巴里(O.Akbari).2010.CD1d依赖性拮抗剂抑制不变NKT细胞的活化并且防止过敏原诱发的气道高反应性的发展(A CD1d-dependent antagonist

inhibits the activation of invariant NKT cells and prevents development of allergen-induced airway hyperreactivity).免疫学杂志(J Immunol)184:2107-2115。

[0204] 9.匹查范特M. (Pichavant,M.), S.戈雅(S.Goya), E.H.迈耶(E.H.Meyer), R.A.约翰斯顿(R.A.Johnston), H.Y.金姆(H.Y.Kim), P.马唐卡颂巴特(P.Matangkasombut), M.朱(M.Zhu), Y.岩仓(Y.Iwakura), P.B.萨维奇(P.B.Savage), R.H.德克吕夫(R.H.Dekruyff), S.A.肖尔(S.A.Shore)和D.T.梅津(D.T.Umetsu).2008.小鼠模型中的臭氧暴露诱发需要自然杀伤T细胞和IL-17存在的气道高反应性(Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17).实验医学杂志(J Exp Med)205:385-393。

[0205] 10.马唐卡颂巴特P. (Matangkasombut,P.), M.匹查范特(M.Pichavant), T.安见(T.Yasumi), C.亨德里克斯(C.Hendricks), P.B.萨维奇(P.B.Savage), R.H.德克吕夫(R.H.Dekruyff)和D.T.梅津(D.T.Umetsu).2008.直接活化天然杀伤T细胞诱发非人灵长类动物的气道高反应性(Direct activation of natural killer T cells induces airway hyperreactivity in nonhuman primates).过敏与临床免疫学杂志(J Allergy Clin Immunol)121:1287-1289。

[0206] 11.迈耶E.H. (Meyer,E.H.), S.戈雅(S.Goya), O.阿克巴里(O.Akbari), G.J.贝里(G.J.Berry), P.B.萨维奇(P.B.Savage), M.克罗嫩伯格(M.Kronenberg), T.中山(T.Nakayama), R.H.德克吕夫(R.H.Dekruyff)和D.T.梅津(D.T.Umetsu).2006.不变T细胞受体+NK T细胞的糖脂活化独立于常规CD4+T细胞足以诱发气道高反应性(Glycolipid activation of invariant T cell receptor+NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+T cells).美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)103:2782-2787。

[0207] 12.金姆E.Y. (Kim,E.Y.), J.T.巴塔耶(J.T.Battaile), A.C.帕特尔(A.C.Patel), Y.尤(Y.You), E.阿加波夫(E.Agapov), M.H.格雷森(M.H.Grayson), L.A.贝努瓦(L.A.Benoit), D.E.拜尔斯(D.E.Byers), Y.阿雷唯(Y.Alevy), J.塔克(J.Tucker), S.斯旺森(S.Swanson), R.蒂德韦尔(R.Tidwell), J.W.泰纳(J.W.Tyner), J.D.莫顿(J.D.Morton), M.卡斯特罗(M.Castro), D.波利内尼(D.Polineni), G.A.帕特森(G.A.Patterson), R.A.施文德纳(R.A.Schwendener), J.D.阿拉德(J.D.Allard), G.佩尔茨(G.Peltz)和M.J.霍尔茨曼(M.J.Holtzman).2008.先天性免疫反应的持续活化将呼吸道感染转化为慢性肺病(Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease).自然医学(Nat Med)14:633-640。

[0208] 13.马唐卡颂巴特P. (Matangkasombut,P.), G.马里高达(G.Marigowda), A.欧文(A.Ervine), L.伊德里斯(L.Idris), M.匹查范特(M.Pichavant), H.Y.金姆(H.Y.Kim), T.安见(T.Yasumi), S.B.威尔逊(S.B.Wilson), R.H.德克吕夫(R.H.Dekruyff), J.L.福尔(J.L.Faul), E.伊斯雷尔(E.Israel), O.阿克巴里(O.Akbari)和D.T.梅津(D.T.Umetsu).2009.哮喘患者肺部的自然杀伤T细胞(Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma).过敏与临床免疫学杂志(J Allergy Clin Immunol)123:1181-1185。

[0209] 14.雷诺兹C. (Reynolds,C.), J.巴尔坎斯(J.Barkans), P.克拉克(P.Clark), H.卡

里亚瓦萨姆(H.Kariyawasam),D.奥尔特曼(D.Altmann),B.凯(B.Kay)和R.博伊顿(R.Boyton).2009.来自过敏性哮喘的人类过敏原攻击模型的支气管活检中的自然杀伤T细胞(Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma).过敏与临床免疫学杂志(J Allergy Clin Immunol)124:860-862;作者回复862。

[0210] 15.埃克斯利M.A. (Exley,M.A.),R.侯(R.Hou),A.绍洛夫(A.Shaulov),E.通蒂(E.Tonti),P.德拉波纳(P.Dellabona),G.卡索拉蒂(G.Casorati),O.阿克巴里(O.Akbari),H.O.阿克曼(H.O.Akman),E.A.格林菲尔德(E.A.Greenfield),J.E.甘柏兹(J.E.Gumperz),J.E.博伊森(J.E.Boyson),S.P.巴尔克(S.P.Balk)和S.B.威尔逊(S.B.Wilson).2008.选择性活化、扩增和监测对于TCR α 链CDR3环具有单克隆抗体特异性的人类iNKT细胞(Selective activation,expansion,and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3loop).欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)38:1756-1766。

[0211] 16.孔斯R.D. (Kuns,R.D.),E.S.莫里斯(E.S.Morris),K.P.麦克唐纳(K.P.Macdonald),K.A.马基(K.A.Markey),H.M.莫里斯(H.M.Morris),N.C.拉费尔特(N.C.Raffelt),T.巴诺维奇(T.Banovic),A.L.顿(A.L.Don),V.罗(V.Rowe),A.C.伯尔曼(A.C.Burman),A.D.克劳斯顿(A.D.Clouston),C.法拉赫(C.Farah),G.S.贝思拉(G.S.Besra),P.A.伊拉里奥诺夫(P.A.Illarionov),M.J.史密斯(M.J.Smyth),S.A.波尔切利(S.A.Porcelli)和G.R.希尔(G.R.Hill).2009.不变自然杀伤T细胞-自然杀伤细胞相互作用决定 α -半乳糖神经酰胺投与后移植结果(Invariant natural killer T cell-natural killer cell interactions dictate transplantation outcome after alpha-galactosylceramide administration).血液(Blood)113:5999-6010。

[0212] 17.勒昂A. (Lehuen,A.),J.黛安娜(J.Diana),P.扎科内(P.Zacccone)和A.库克(A.Cooke).1型糖尿病中的免疫细胞串扰(Immune cell crosstalk in type 1diabetes).自然综述免疫学(Nat Rev Immunol)10:501-513。

[0213] 18.新川T. (Shinkawa,T.),K.中村(K.Nakamura),N.山根(N.Yamane),E.庄司-保坂(E.Shoji-Hosaka),Y.神田(Y.Kanda),M.樱田(M.Sakurada),K.内田(K.Uchida),H.穴泽(H.Anazawa),M.佐藤(M.Satoh),M.山崎(M.Yamasaki),N.花井(N.Hanai)和K.设乐(K.Shitara).2003.人IgG1复合型寡糖中岩藻糖的不存在而不是半乳糖或平分型N-乙酰葡萄糖胺的存在显示增强抗体依赖性细胞的细胞毒性的关键作用(The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity).生物化学杂志(J Biol Chem)278:3466-3473。

[0214] 19.丹羽R. (Niwa,R.),E.庄司-保坂(E.Shoji-Hosaka),M.樱田(M.Sakurada),T.新川(T.Shinkawa),K.内田(K.Uchida),K.中村(K.Nakamura),K.松岛(K.Matsushima),R.上田(R.Ueda),N.花井(N.Hanai)和K.设乐(K.Shitara).2004.具有增强的抗体依赖性细胞的细胞毒性的去岩藻糖化嵌合抗CC趋化因子受体4IgG1对T细胞白血病和淋巴瘤展示强力治疗活性(Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4IgG1with enhanced

antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma).癌症研究(Cancer Res)64:2127-2133。

[0215] 20. 东条S. (Tojo, S.), A. 冈崎 (A. Okazaki), M. 胁谷 (M. Wakitani), T. 新川 (T. Shinkawa), K. 内田 (K. Uchida) 和 (T. Suzawa). 2009. 用于提升抗体复合物的抗体依赖性细胞的细胞毒性的色谱方法 (A chromatographic approach for elevating the antibody-dependent cellular cytotoxicity of antibody composites). 生物与医药公告 (Biol Pharm Bull) 32:1604-1608。

[0216] 21. 布塞W.W. (Busse, W.W.), R. 卡泰尔 (R. Katial), D. 戈西奇 (D. Gossage), S. 萨里 (S. Sari), B. 王 (B. Wang), R. 科尔贝克 (R. Kolbeck), A. J. 科伊尔 (A. J. Coyle), M. 小池 (M. Koike), G. L. 斯派泰尼 (G. L. Spitalny), P. A. 基纳 (P. A. Kiener), G. P. 加巴 (G. P. Geba) 和 N. A. 莫尔菲诺 (N. A. Molfino). 2010. MEDI-563 (一种抗IL-5受体 α 抗体) 在轻度哮喘个体的I期研究中的安全性概况、药物动力学和生物活性 (Safety profile, pharmacokinetics, and biologic activity of MEDI-563, an anti-IL-5 receptor α antibody, in a phase I study of subjects with mild asthma). 过敏与临床免疫学杂志 (J Allergy Clin Immunol) 125:1237-1244e1232。

[0217] 22. 云蒂拉T.T. (Junttila, T.T.), K. 帕森斯 (K. Parsons), C. 奥尔森 (C. Olsson), Y. 陆 (Y. Lu), Y. 辛 (Y. Xin), J. 塞瑞奥尔特 (J. Theriault), L. 克罗克 (L. Crocker), O. 帕博南 (O. Pabonan), T. 巴金斯基 (T. Baginski), G. 孟 (G. Meng), K. 托特帕尔 (K. Totpal), R. F. 凯利 (R. F. Kelley) 和 M. X. 司里克沃斯基 (M. X. Sliwowski). 2010. 无岩藻糖基化曲妥珠单抗在HER2扩增的乳腺癌的治疗中的优越体内功效 (Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer). 癌症研究 (Cancer Res) 70:4481-4489。

序列表

<110> NKT治疗公司

<120> 针对iNKT的人类化抗体

<130> N0516.70000W000

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> US 61/552,337

<151> 2011-10-27

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Cys Val Val Ser Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Arg Leu Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 食蟹猕猴

<400> 2

Cys Val Val Ser Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Lys Leu Tyr
1 5 10

[0001]

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 恒河猴

<400> 3

Cys Val Val Ser Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Lys Leu Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Cys Val Val Gly Asp Arg Gly Ser Ala Leu Gly Arg Leu His
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 黑鼠

<400> 5

Cys Val Val Ala Asp Arg Gly Ser Ala Leu Gly Lys Leu Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT
<213> 家猪

<400> 6

Cys Val Val Gly Asp Arg Gly Ser Arg Leu Gly Arg Leu Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体重链序列

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

[0002]

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体重链序列

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体重链序列

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0003]

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体重链序列

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

	20	25	30
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu		
	50	55	60
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
	65	70	80
	Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90	95
	Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
	100	105	110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 11		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> NKTT抗体重链序列		
	<400> 11		
[0004]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
	20	25	30
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu		
	50	55	60
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr		
	65	70	80
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90	95
	Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
	100	105	110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 12		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223> NKIT抗体重链序列

<400> 12

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

Thr Met Ser Leu Thr Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gln
65 70 75 80

Val Ser Leu Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0005]

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NKIT抗体重链序列

<400> 13

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asp Ser Thr Ser Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

	115	120	
<210>	14		
<211>	122		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	NKTT抗体重链序列		
<400>	14		
	Glu Val Lys Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln		
	1 5 10 15		
	Thr Met Thr Leu Thr Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
	20 25 30		
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu		
	50 55 60		
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Gln		
	65 70 75 80		
	Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Gly Thr Tyr		
	85 90 95		
[0006]	Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
	100 105 110		
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115 120		
<210>	15		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	NKTT抗体轻链序列		
<400>	15		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
	20 25 30		
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
	50 55 60		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala		
	65 70 75 80		

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体轻链序列

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0007]

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体轻链序列

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体轻链序列

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0008]

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体轻链序列

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT抗体轻链序列

<400> 20

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

[0009]

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

Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR H1

<400> 21

Asn Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR H2

<400> 22

Val Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala
1 5 10 15

Glu Ser Val Lys Gly
20

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR H3

<400> 23

Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR V1

<400> 24

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR V2

<400> 25

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR V3

<400> 26

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 27
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NKTT120重链序列(VH4-G1的翻译)

<400> 27

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

[0010]

[0011]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

[0012]

<210> 28
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> NKTT320重链序列(VH4-G4的翻译)
 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

[0013]

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NKTT120和NKTT320轻链序列(VK4-CK的翻译)

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

[0014]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 6B11嵌合IgG1重链

<400> 30

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

[0015]

Tyr Cys Thr Arg Asn Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

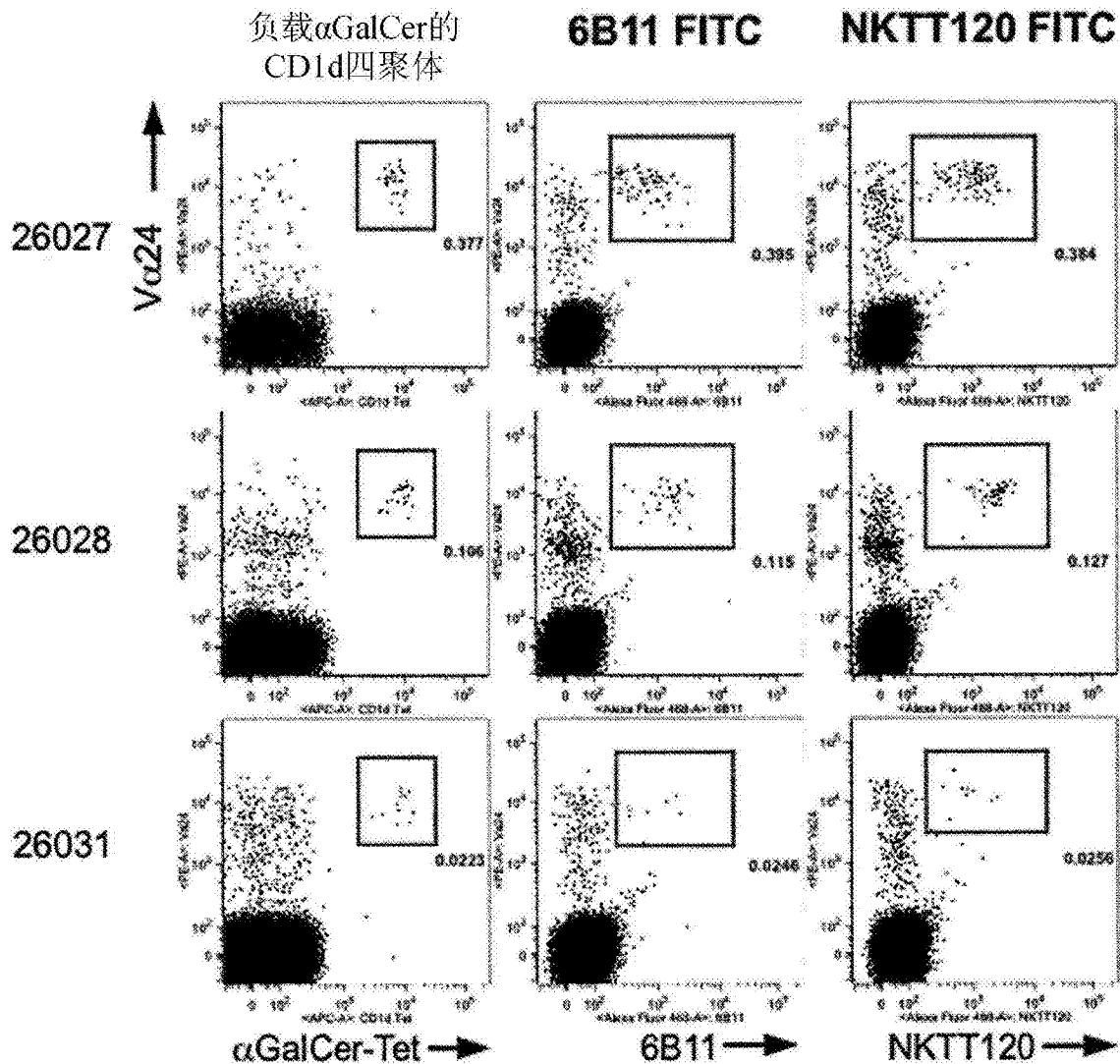
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

[0016]

	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	305	310	315
	320		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val	355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	385	390	395
	400		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	435	440	445
Ser Pro Gly Lys	450		
<210> 31			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 6B11嵌合Ck轻链			
<400> 31			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	1	5	10
	15		
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 [0017] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

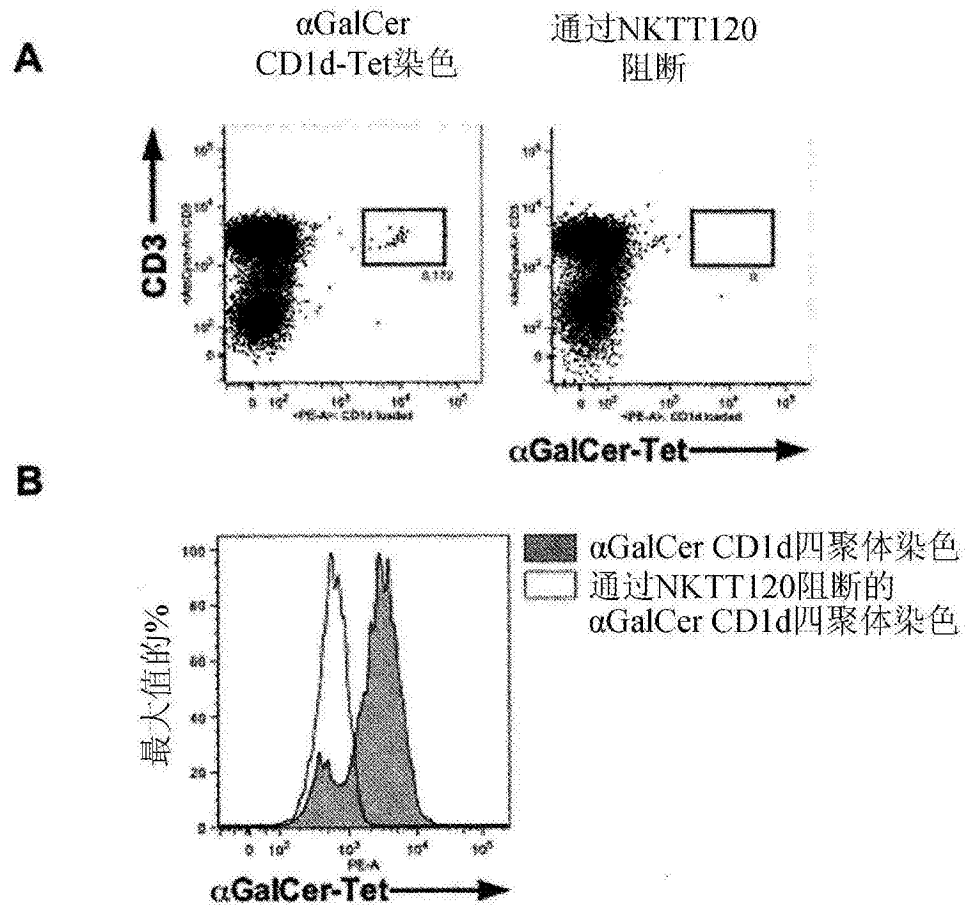
NKTT120与人类周边血液iNKT细胞的结合



将来自三个供体(26027、26028、26031)的人类全血用负载 α -GalCer的CD1d四聚体、6B11-FITC或NKTT120-FITC结合抗CD3和抗V α 24 mAb染色。接着将红血球溶解并且通过流动式细胞测量术进行细胞分析。所示细胞对CD3+淋巴细胞设门。

图1

CD1d四聚体与iNKT细胞的结合通过NKTT120的阻断

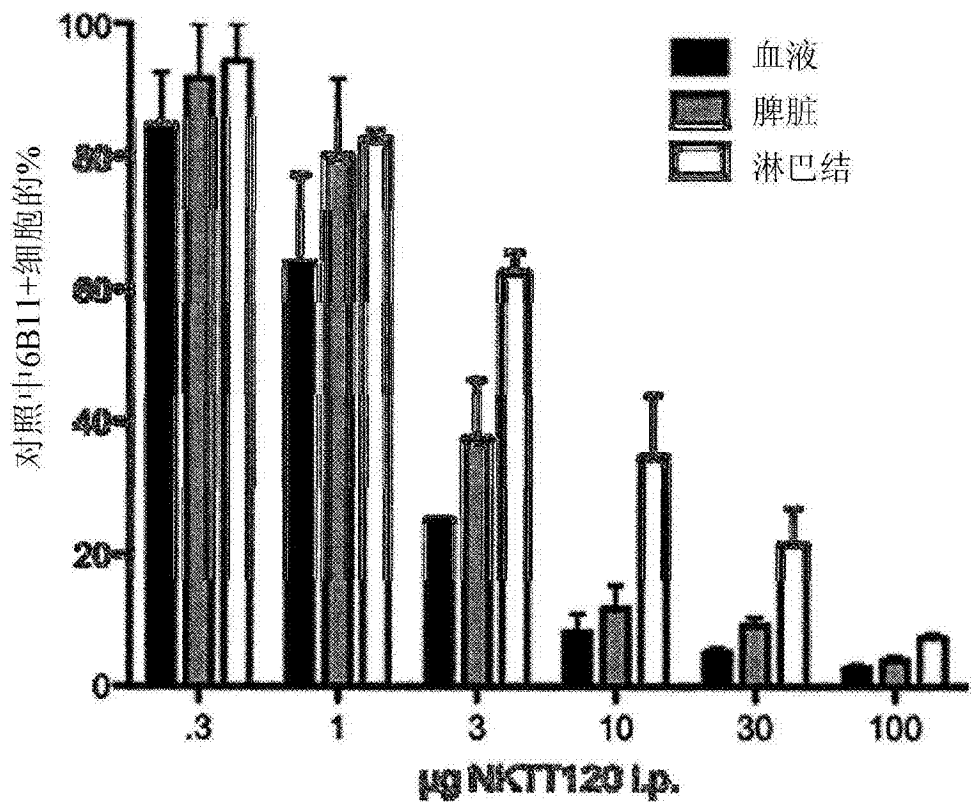


A)将人类PBMC在存在或不存在30 μ g/ml NKTT120下孵育30分钟，并且然后在不洗涤的情况下，用CD3和负载 α -GalCer的CD1d四聚体染色。抗体的存在阻断四聚体染色。

B)将人类iTCR转染子(表达人类iTCR的V α 24-J α 18和V β 11链)在存在或不存在30 μ g/ml NKTT120下孵育30分钟，并且然后在不洗涤的情况下用负载 α -GalCer的CD1d四聚体染色。NKTT120的存在阻断负载 α -GalCer的CD1d四聚体的结合。

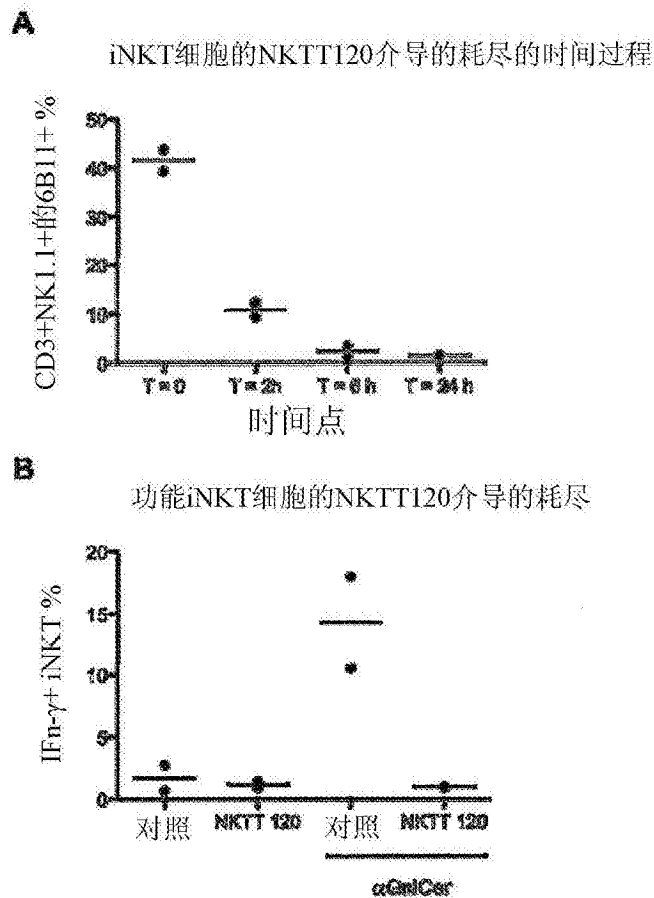
图2

血液、脾脏和淋巴结中的iNKT细胞通过NKTT120的耗尽



向Va24转基因Ja18缺乏小鼠腹膜内给予NKTT120(每剂量n=2), 并且四十八小时之后将其杀死。将血液、脾脏和淋巴结淋巴细胞分离, 并且接着通过流动式细胞测量术测定iNKT细胞数目。

图3

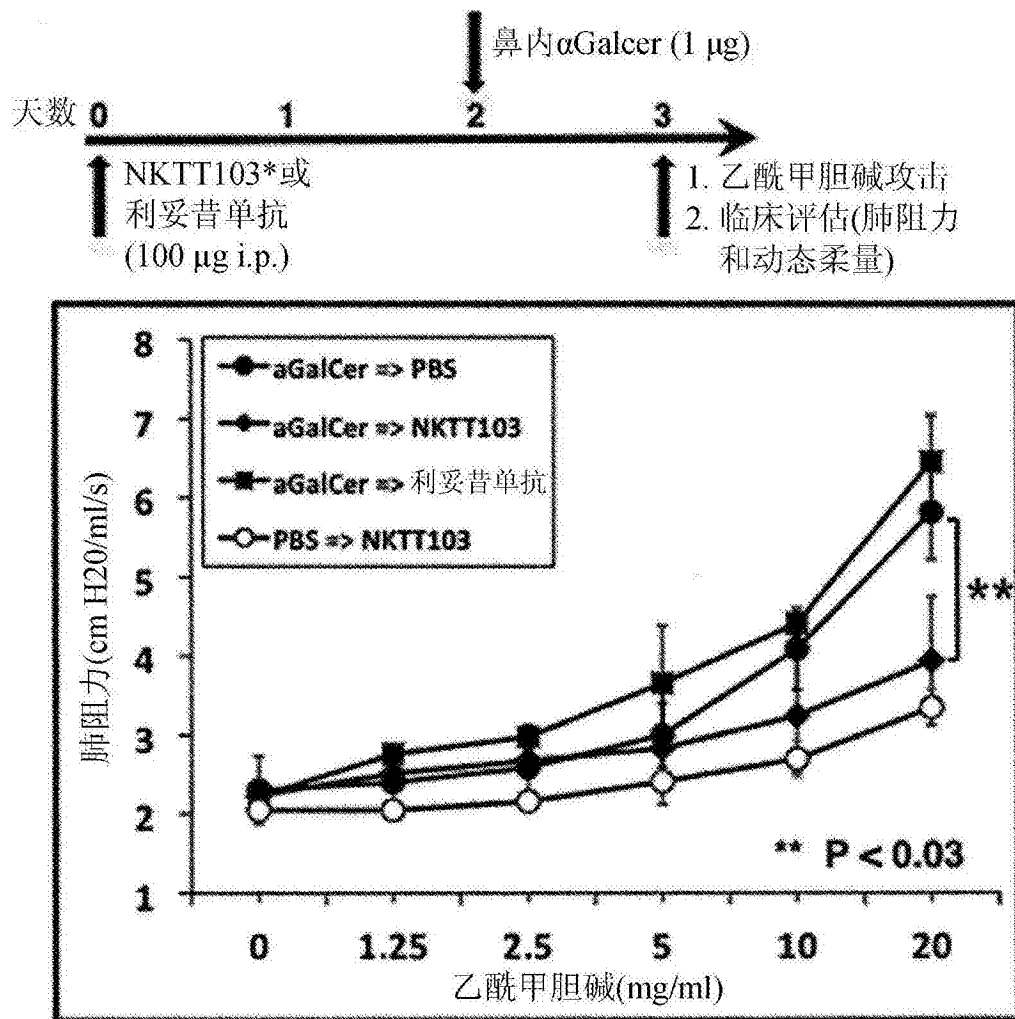
V α 24转基因小鼠中iNKT细胞通过NKTT120耗尽的时间过程

A. 向V α 24转基因小鼠(每组n=2)腹膜内注射100 μ g NKTT120, 并且在指定时间点将其杀死。对脾脏CD3+NK1.1+ iNKT细胞设门, 评估6B11结合细胞的百分比。

B. 向V α 24转基因小鼠(每组n=2)注射100 μ g NKTT120。对照组不接受NKTT120。四十八小时之后, 向单独的NKTT120处理小鼠和对照小鼠注射2 μ g α -GalCer。在 α -GalCer注射之后两小时, 将小鼠杀死, 并且通过流动式细胞测量术分析脾脏CD3+NK1.1+ iNKT细胞的细胞内IFN γ 。

图4

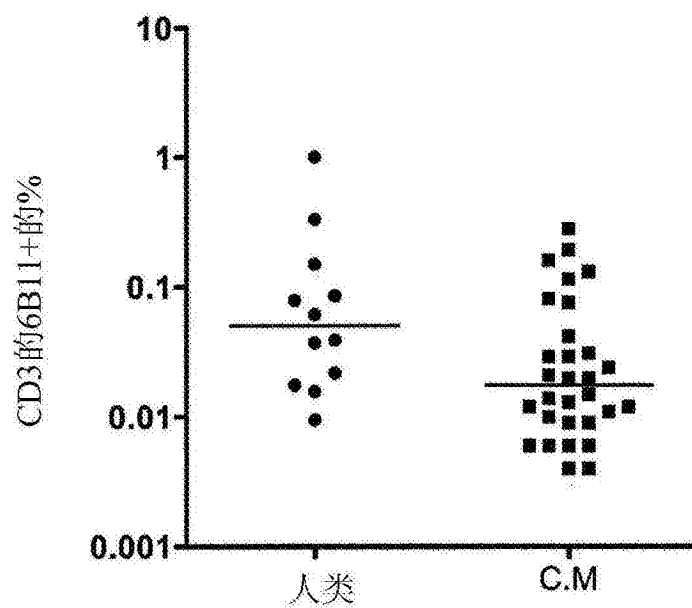
V α 24转基因小鼠中iNKT细胞的药物耗尽消除 α -GalCer介导的
iNKT细胞依赖性AHR



向回交到BALB/c的V α 24转基因小鼠n=6(每组n=3)腹膜内注射100 μ g NKTT103或利妥昔单抗。四十八小时之后，将小鼠用1 μ g α -GalCer攻击。在另外24小时之后，将小鼠用乙酰甲胆碱攻击，并且评估肺阻力(RL)和动态柔量(Cdyn，未图示)。将利妥昔单抗用作阴性同型对照。

图5

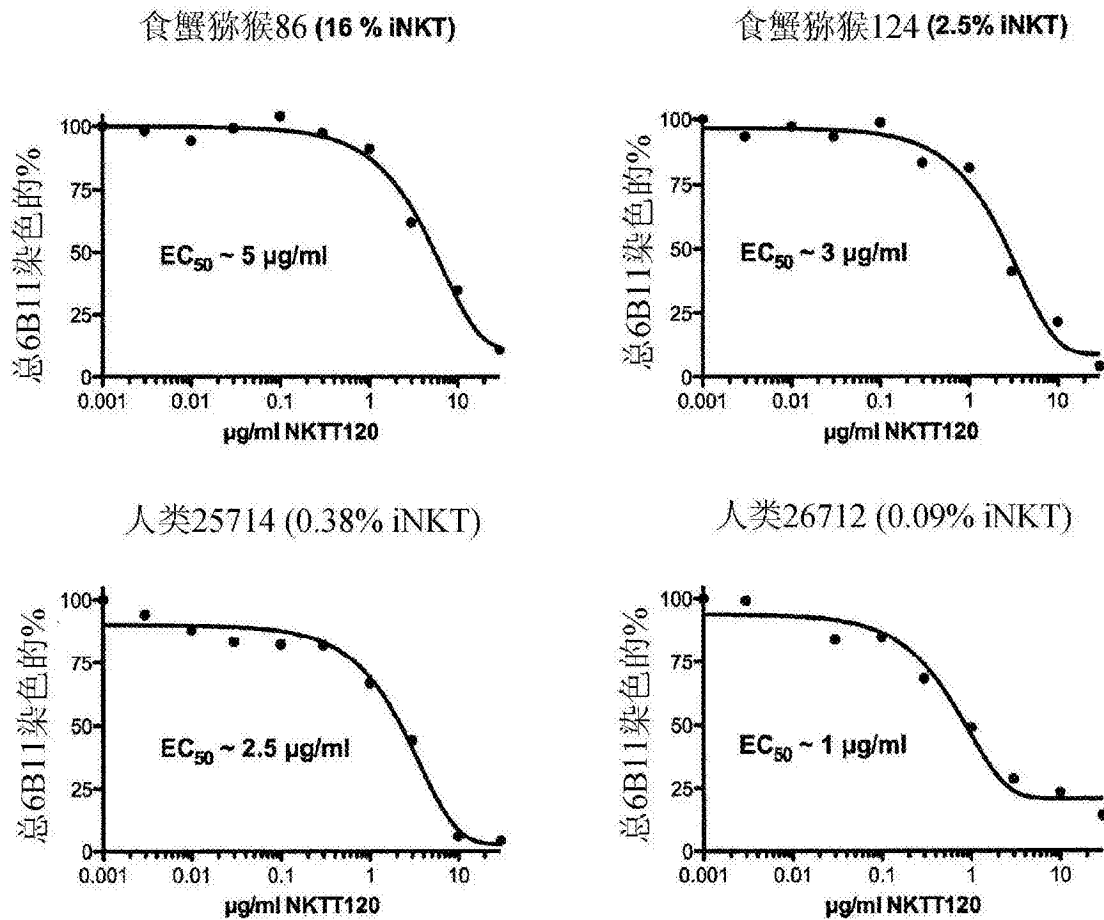
人类与食蟹猕猴iNKT细胞频率的比较



如在周边血液中通过CD3、抗V α 24(无性系C15)和6B11结合测定的食蟹猕猴的iNKT细胞频率范围与见于人类个体中的频率范围惊人地相当。

图6

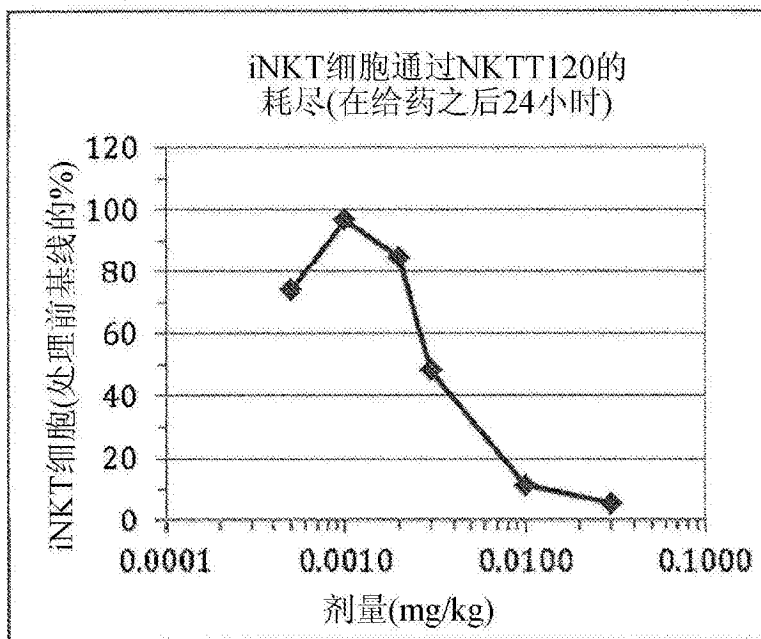
与人类和食蟹猕猴iNKT细胞的饱和结合的比较



食蟹猕猴(NHP)和人类iNKT细胞在直接竞争性结合分析中展现类似的NKTT120饱和结合。将食蟹猕猴或人类全血与指定浓度的NKTT120一起孵育，并且然后用荧光染料标记的6B11染色以评估iNKT细胞的饱和结合。人类样品购自研究血液组分公司。

图7

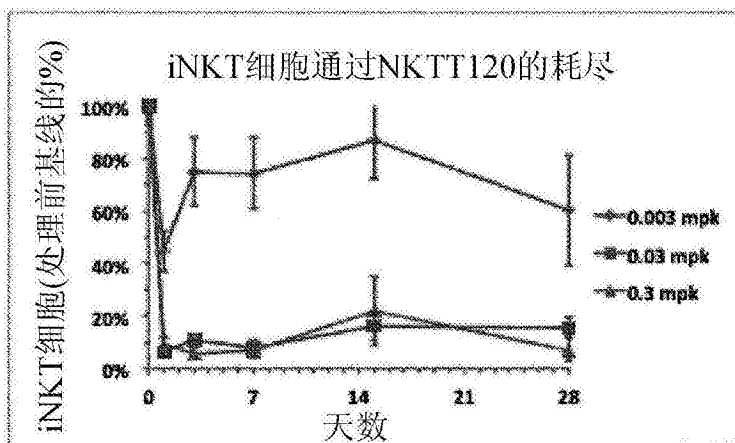
在给药之后24小时iNKT细胞通过NKTT120的耗尽



将动物用单一剂量的NKTT120处理并且监测七天。数据显示,在处理(每剂量n=1)之后24小时iNKT细胞的剂量依赖性降低。此群动物的处理前基线iNKT水平在0.12%-1.13%的CD3+细胞的范围内。在以0.03 mg/kg剂量给药之后24小时可见iNKT细胞的完全耗尽。

图8

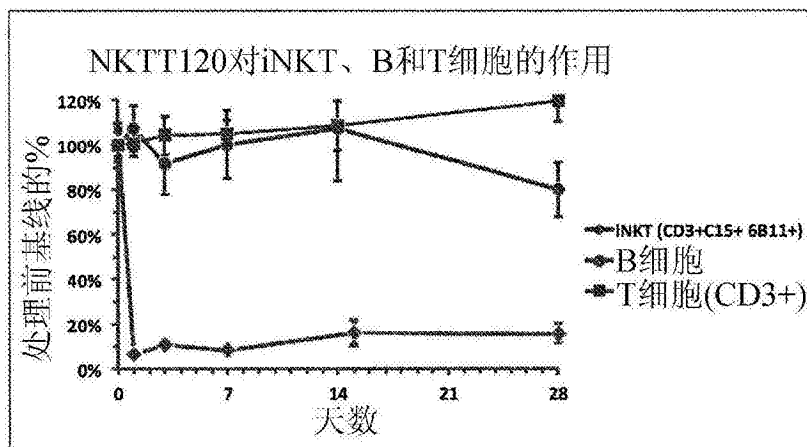
食蟹猕猴中iNKT细胞通过NKTT120的耗尽



食蟹猕猴中iNKT细胞耗尽的NKTT120剂量反应。

图9

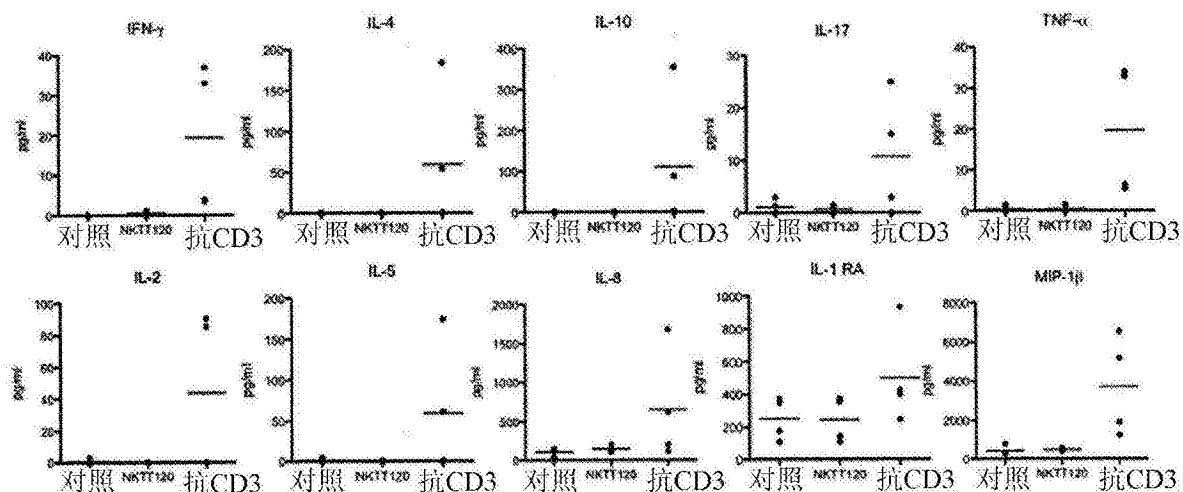
NKTT120对iNKT、B和T细胞的作用



NKTT120 (0.03 mg/kg)处理对B细胞和其它T细胞不具有显著作用。

图10

人类全血中的NKTT120细胞因子水平的作用



来自健康供体(n=4)的未经处理的、经NKTT120处理的和经抗CD3处理的全血样品中的细胞因子水平。仅显示不同于对照水平的结果。来自健康供体的血液样品购自研究血液组分公司。

图11

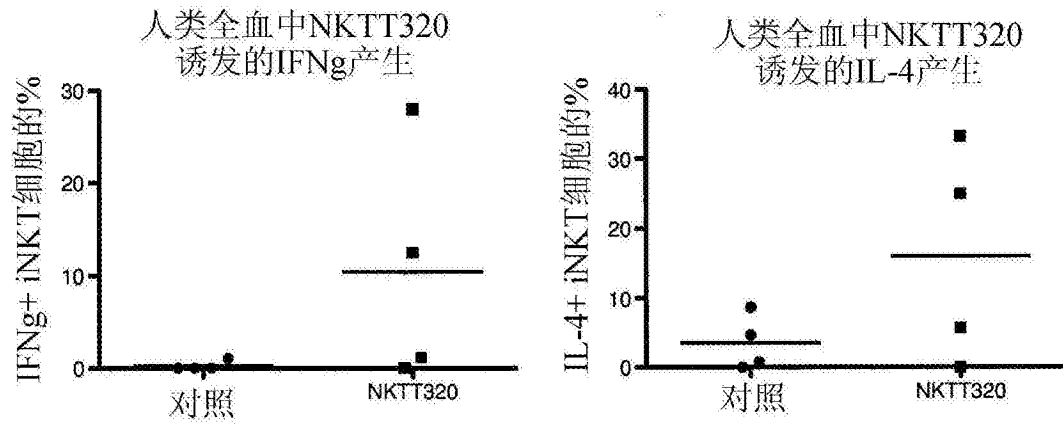


图12