(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118871465 A
(43)申请公布日 2024.10.29

(21)申请号 202380023757.X
(22)申请日 2023.01.29
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/075109 2022.01.29 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/073699 2023.01.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/143564 EN 2023.08.03
(71)申请人 高诚生物医药公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 李菊影 章乾 沈冰清
F·艾德里安 L·施维泽
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 袁泉
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书37页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

针对BTLA的抗体及其用途

(57)摘要

提供了对BTLA具有特异性的单克隆抗体和其抗原结合片段,及使用所述单克隆抗体和其抗原结合片段治疗自身免疫病症的方法,包括组合疗法。

CN 118871465 A

1.分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子)具有特异性且活化人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子),并且任选地与食蟹猴BTLA具有交叉反应性,并且其中所述单克隆抗体包含:

(1a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:1的HCVRCDR1序列、SEQ ID NO:2的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:3的HCVR CDR3序列;和

(1b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:4的LCVRCDR1序列、SEQ ID NO:5的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:6的LCVR CDR3序列;

或

(2a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:61的HCVRCDR1序列、SEQ ID NO:62的HCVR CDR2序列和SEQID NO:63的HCVR CDR3序列;和

(2b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:64的LCVRCDR1序列、SEQ ID NO:65的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:66的LCVR CDR3序列;

任选地,所述单克隆抗体不是天然存在的。

2.权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

(1A)HCVR序列是SEQ ID NO:(7+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和

(1B)LCVR序列是SEQ ID NO:(8+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代),

其中n为1、0和2-24中的任一个;或

(2A)HCVR序列是SEQ ID NO:(67+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和

(2B)LCVR序列是SEQ ID NO:(68+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代),

其中n为0-24中的任一个。

3.根据权利要求1或2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是IgG1抗体。

5.根据权利要求4所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG1抗体包含SEQ ID NO:57的重链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体,和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述

单克隆抗体是包含重链恒定区中的突变的IgG1抗体,其:

(1)调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)(例如,F243L、

G236A、S239D/I332E、S239D/A330L/I332E、

S298A/E333A/K334A、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L,

或通过增加与Fc γ RIIIa的结合而具有增强的ADCC的无岩藻糖基化(非岩藻糖基化)抗体(例如,Fc区处的无岩藻糖基化N297);和/或

(2)增强血清半衰期(例如T250Q/M428L、

M252Y/S254T/T256E)。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其为小鼠抗体、人-小鼠嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR-移植抗体或表面重塑抗体。

8.根据权利要求7所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其是人源化抗体。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体的或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、内抗体、$IgG\Delta CH_2$、微抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

10.权利要求1-9中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段与食蟹猴/恒河猴BTLA交叉反应,但基本上不与小鼠BTLA交叉反应。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或更小的K_D结合人BTLA。

12.权利要求1-11中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其是人BTLA的激动剂且在与BTLA结合时活化来自BTLA的下游信号传导。

13.权利要求12所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述来自BTLA的下游信号传导抑制B细胞增殖,和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)和/或浆细胞活化。

14.权利要求1-13中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其不阻断/干扰/消除BTLA与HVEM的结合。

15.权利要求1-14中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,当以10mg/kg BIW*6的剂量施用(例如,i.p.至小鼠)(例如,持续21天)时,其不导致显著的体重减轻。

16.权利要求1-15中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,当体内施用(例如,以10mg/kg BIW*6的剂量i.p.至小鼠持续14天)时,其显著减少$CD45^+$T细胞。

17.权利要求1-16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,与同种型匹配的对照Ab相比,其显著降低GvHD或其动物模型中的疾病严重性(例如,在3周时平均总疾病评分小于3)和/或总体存活率(例如,在4周时总体存活率为至少80%)。

18.分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与权利要求1-17中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人BTLA。

19.权利要求18所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其在与BTLA结合时,抑制

B细胞增殖和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)活化。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:

(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或

(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

21.分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含以下/基本上由以下组成/由以下组成:

(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或

(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

22.多核苷酸,其编码权利要求1-21中任一项所述的重链或轻链或其抗原结合部分。

23.权利要求22所述的多核苷酸,其经密码子优化用于在人细胞中表达。

24.载体,其包含如权利要求22或23所述的多核苷酸。

25.权利要求24所述的载体,其是表达载体(例如,哺乳动物、酵母、昆虫或细菌表达载体)。

26.药物组合物,其包含根据权利要求1-21中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、权利要求22或23所述的多核苷酸或者权利要求24或25所述的载体。

27.权利要求26所述的药物组合物,其被配制用于静脉内(i.v.)输注或施用,或用于皮下(s.c.)施用。

28.在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者治疗自身免疫病症的方法,所述方法包括向患者施用有效量的权利要求1至21中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、权利要求22或23所述的多核苷酸、权利要求24或25所述的载体或者权利要求26或27所述的药物组合物。

29.权利要求28所述的方法,其用于治疗自身免疫病症。

30.权利要求29所述的方法,其中自身免疫病症是系统性红斑狼疮(SLE);溃疡性结肠炎(UC),包括小儿溃疡性结肠炎;类风湿性关节炎(RA);银屑病(Ps),包括慢性斑块状银屑病;银屑病关节炎(PsA);克罗恩病(CD),包括小儿克罗恩病;炎性肠病(IBD);强直性脊柱炎;幼年特发性关节炎(JIA),包括多关节幼年特发性关节炎;化脓性汗腺炎;非感染性中间、后部和全葡萄膜炎;自身免疫性肝炎样疾病;实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE);MHC不匹配的心脏同种异体移植物;急性气道过敏中的肺部炎症;移植物抗宿主病(GvHD);或同种异体造血干细胞移植(aHSCT)。

31.权利要求28-30中任一项所述的方法,其还包括向患者施用有效治疗自身免疫病症的另外的试剂。

32.权利要求31所述的方法,其中自身免疫病症是狼疮。

33.权利要求1至21中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、权利要求22或23所述的多核苷酸、权利要求24或25所述的载体或者权利要求26或27所述的药物组合物在制备用于在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症的药物中的用途。

34.组合物,其包含权利要求1-21中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片

段、权利要求22或23所述的多核苷酸、权利要求24或25所述的载体或者权利要求26或27所述的药物组合物,用于下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症。

针对BTLA的抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年1月29日提交的PCT/CN2022/075109的申请日的优先权和权益,将其全部内容(包括任何附图和序列表)通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表XML文件,其以XML格式电子提交且将其全部内容通过引用并入本文。所述XML副本创建于2023年1月23日,命名为131206-01219_SL_XML.xml,并且大小为170,638个字节。

[0005] 发明背景

[0006] B和T淋巴细胞衰减子(BTLA;也称为CD272)是CD28受体家族的抑制性成员,所述CD28受体家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和PD-1(Watanabe et al.,Nat Immunol.4:670-679,2003)。BTLA在整个免疫系统中在骨髓细胞和淋巴细胞上广泛表达(Han et al.,J Immunol.172:5931-9,2004)。在通过其配体疱疹病毒进入介体(HVEM)的接合之后,BTLA将磷酸酶SHP-1和SHP-2募集至其细胞质结构域(Sedy et al.,Nat Immunol.6:90-8,2005),其进而抑制活化受体的信号级联。

[0007] 缺乏完整BTLA基因的BTLA敲除小鼠在体外显示过度增殖性B和T细胞应答,免疫接种后对DNP-KLH的滴度更高和对EAE的敏感性增加(Watanabe et al.,Nat.Immunol.4:670-679,2003)。如果一直观察到老年,BTLA敲除小鼠自发地产生自身抗体(一种自身免疫性肝炎样疾病)和多个器官中的炎性细胞浸润(Oya et al.,Arthritis Rheum.58:2498-2510,2008)。因此,似乎BTLA抑制性受体在维持免疫稳态和抑制自身免疫中起关键作用。此外,HVEM-BTLA信号传导参与粘膜炎症和感染免疫的调节(Shui et al.,J Leukoc Biol.89:517-523,2011)。

[0008] 与小鼠BTLA结合的单克隆抗体可以充当激动剂,通过受体诱导信号传导以抑制免疫细胞应答。在激动剂抗BTLA抗体(mAh)的存在下,抗-CD3和抗-CD28活化的T细胞显示IL-2产生和增殖减少(Kreig et al.,J.Immunol.175,6420-6472,2005)。已经显示抗小鼠BTLA激动剂抗体改善移植物抗宿主病的鼠模型中的疾病(Sakoda et al.,Blood117:2506-2514;Albring et al.,J Exp Med.207:2551-9,2010)。已经显示靶向人BTLA受体的BTLA激动剂抗体抑制离体T细胞应答(Otsuki et al.,Biochem Biophys Res Commun 344:1121-7,2006;和WO2011/014438),但这样的抗体尚未被批准用于治疗任何疾病。

[0009] 因此,需要开发能够调节BTLA功能以在自身免疫病症的情况下抑制自身反应性淋巴细胞的治疗性试剂。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明的一个方面提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子)具有特异性且活化人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子),并且任选地与食蟹猴BTLA交叉反应,并且其中所述单克隆抗体包含:(1a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:1的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:2的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:3的HCVR CDR3序列;和(1b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:4的LCVR

CDR1序列、SEQ ID NO:5的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:6的LCVR CDR3序列;或(2a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:61的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:62的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:63的HCVR CDR3序列;和(2b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:64的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:65的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:66的LCVR CDR3序列;任选地,所述单克隆抗体不是天然存在的。

[0012] 在某些实施方案中,在本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,(1A)HCVR序列是SEQ ID NO:(7+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和(1B)LCVR序列是SEQ ID NO:(8+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代),其中n为1、0和2-24中的任一个;或(2A)HCVR序列是SEQ ID NO:(67+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和(2B)LCVR序列是SEQ ID NO:(68+2n),或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代),其中n为0-24中的任一个。

[0013] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。

[0014] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体是IgG1抗体。

[0015] 在某些实施方案中,IgG1抗体包含SEQ ID NO:57的重链恒定区序列或其变体,所述变体与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如插入、缺失和/或取代),和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列或其变体,所述变体与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如插入、缺失和/或取代)。

[0016] 在某些实施方案中,单克隆抗体是包含重链恒定区中的突变的IgG1抗体,其:(1)调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)(例如F243L、G236A、S239D/I332E、S239D/A330L/I332E、S298A/E333A/K334A、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L,或通过增加与Fc γ RIIIa的结合而具有增强的ADCC的去岩藻糖基化(非岩藻糖基化)抗体(例如,在Fc区处的去岩藻糖基化N297));和/或(2)增强血清半衰期(例如T250Q/M428L、M252Y/S254T/T256E)。

[0017] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是小鼠抗体、人-小鼠嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR-移植抗体或表面重塑抗体。

[0018] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是人源化抗体。

[0019] 在某些实施方案中,其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域,IgNar、内抗体、$IgG\Delta CH_2$、微抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

[0020] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与食蟹猴/恒河猴BTLA

交叉反应,但基本上不与小鼠BTLA交叉反应。

[0021] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、2nM、1nM、0.5nM或更小的K_D结合人BTLA。

[0022] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是人BTLA的激动剂,并且在结合BTLA时活化来自BTLA的下游信号传导。例如,在某些实施方案中,来自BTLA的下游信号传导抑制B细胞增殖,和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)和/或浆细胞活化。

[0023] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段不阻断/干扰/消除BTLA与HVEM的结合。

[0024] 在某些实施方案中,当以10mg/kg BIW*6的剂量施用(例如,i.p.至小鼠)(例如,持续21天)时,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段不导致显著的体重减轻。

[0025] 在某些实施方案中,当体内施用(例如,以10mg/kg BIW*6的剂量i.p.至小鼠持续14天)时,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段显著减少$CD45^+$T细胞。

[0026] 在某些实施方案中,例如,当体内施用单克隆抗体或其抗原结合片段(例如,以10mg/kg BIW*6的剂量i.p.至小鼠持续14天)时,与同种型匹配的对照Ab相比,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段显著降低GvHD或其动物模型中的疾病严重性(例如,在3周时平均总疾病评分小于3)和/或总体存活率(例如,在4周时总体存活率为至少80%)。

[0027] 本发明的另一个方面提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人BTLA。

[0028] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段在与BTLA结合时,抑制B细胞增殖和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)活化。

[0029] 在某些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

[0030] 本发明的另一个方面提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含以下序列/基本上由以下序列组成/由以下序列组成:(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

[0031] 本发明的另一个方面提供编码本发明的重链或轻链或其抗原结合部分的多核苷酸。

[0032] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸经密码子优化以在人细胞中表达。

[0033] 本发明的另一个方面提供包含本发明的多核苷酸的载体。

[0034] 在某些实施方案中,载体是表达载体(例如,哺乳动物、酵母、昆虫或细菌表达载体)。

[0035] 本发明的另一个方面提供药物组合物,其包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸或本发明的载体。

[0036] 在某些实施方案中,药物组合物被配制用于静脉内(i.v.)输注或施用,或用于皮下(s.c.)施用。

[0037] 本发明的另一个方面提供在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者治疗自身免疫病症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物。

[0038] 在某些实施方案中,所述方法用于治疗自身免疫病症。

[0039] 在某些实施方案中,自身免疫病症是系统性红斑狼疮(SLE);溃疡性结肠炎(UC),包括小儿溃疡性结肠炎;类风湿性关节炎(RA);银屑病(Ps),包括慢性斑块状银屑病;银屑病关节炎(PsA);克罗恩病(CD),包括小儿克罗恩病;炎性肠病(IBD);强直性脊柱炎;幼年特发性关节炎(JIA),包括多关节幼年特发性关节炎;化脓性汗腺炎;非感染性中间、后部和全葡萄膜炎(Non-Infectious Intermediate,Posterior and Panuveitis);自身免疫性肝炎样疾病;实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE);MHC不匹配的心脏同种异体移植物;急性气道过敏中的肺部炎症;移植物抗宿主病(GvHD);或同种异体造血干细胞移植(aHSCT)。

[0040] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括向患者施用有效治疗自身免疫病症的另外的试剂。

[0041] 本发明的另一个方面提供本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物在制备用于在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症的药物中的用途。

[0042] 本发明的另一个方面提供包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物的组合物,其用于下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症。

[0043] 应当理解,本文所述的本发明的任一个实施方案,包括仅在实施例或权利要求中描述的那些,可以与本发明的任何其他一个或多个实施方案组合,除非该组合被明确否认或是不适宜的。

[0044] 附图简述

[0045] 图1显示抗BTLA抗体与过表达人BTLA的HEK293细胞(HEK293.hBTLA)或过表达食蟹猴BTLA的Expi293细胞(HEK293.cynoBTLA)的结合。通过流式细胞术(读取:平均荧光强度,MFI),用AF647缀合的抗人IgG Fc二级抗体来定量抗BTLA抗体与靶细胞的结合。

[0046] 图2A显示对照和候选抗BTLA抗体在抗IgM刺激后4天对原代B细胞增殖的抑制。基于其以与基准22B3相似或更大的程度抑制抗IgM介导的B细胞增殖的能力,选择了HFB6-4和HFB6-5。B细胞增殖通过CFSE稀释度(%CFSElo),相对于未刺激的B细胞来定量,并显示为分裂的%。

[0047] 图2B显示当与BTLA结合时,HFB6-4和HFB6-5不能取代HVEM,HVEM的天然配体。上图是示例性方案,其显示CHO细胞系被工程化以表达TCR活化剂(TCRα)和HVEM(BTLA的配体),与表达由NFAT结合启动子驱动的荧光素酶报告子和BTLA的Jurkat报告子细胞系共培养。阳性对照抗BTLA阻断性抗体JS004和许多其他测试的抗BTLA抗体(参见下图)可以剂量依赖性方式逆转HVEM介导的T细胞抑制。但是HFB6-4和HFB-5逆转HVEM介导的T细胞抑制的能力基本上被消除(参见下图)。

[0048] 图3显示与基准抗体22B3相比,HFB6-4和HFB6-5对TCR信号传导的抑制。左图描绘了测定法:首先,在具有或不具有抗CD3抗体的情况下,将在细胞表面上表达Fc γ RIIb的CHO

细胞与抗BTLA抗体、同种型对照MGO或基准抗体22B3一起孵育。然后,将抗体覆盖的CHO细胞与表达表面TCR和BTLA的Jurkat报告子细胞一起孵育。在TCR信号传导下游的NFAT启动子的转录控制下,经由荧光素酶报告子基因的活性在报告子细胞中测量TCR信号传导。右图显示了在测定法中测试不同抗体的发光读取。

[0049] 图4显示同种型对照(MGO53)、基准抗体22B3、HFB6-4和HFB6-5抗体在抗IgM刺激(10μg/ml)之后对原代B细胞增殖的抑制。在来自3个不同供体(左图)和以不同浓度(0.41-100nM)(右图)的原代B细胞上测试抗体的作用。

[0050] 图5显示HFB6-4和HFB6-5抗体的人源化变体与过表达人BTLA的HEK293细胞(HEK293.HBTLA)或过表达食蟹猴BTLA的Expi293细胞(HEK293.cynobtla)的结合。通过流式细胞术(读取:平均荧光强度,MFI),用AF647缀合的抗人IgG Fc二级抗体来定量抗BTLA抗体与靶细胞的结合。

[0051] 图6A显示以1和10μg/ml浓度的同种型对照抗体(MGO53)、基准抗体22B3以及HFB6-4和HFB6-5的人源化变体对抗IgM诱导的原代B细胞增殖的抑制。通过CFSE稀释度(%CFSElo),相对于未刺激的B细胞来定量B细胞增殖,并显示为分裂的%。

[0052] 图6B显示通过由Jurkat报告子细胞中发光报告子基因的活性产生的发光信号(RLU:相对光单位)测量的,同种型对照抗体(MGO53)、基准抗体22B3以及HFB6-4和HFB6-5的人源化变体对抗CD3诱导的Jurkat细胞活化的抑制。

[0053] 图7显示在静脉内注射10mg/kg剂量之后,C57BL6小鼠中HFB6-4和HFB6-5的人源化变体的药代动力学特征。在注射后1、24和72小时采集血液。

[0054] 图8A-8G显示在急性移植物抗宿主病(GvHD)的NSG小鼠模型中接种人外周血单核细胞(hPBMC)之后,目标抗体抑制免疫反应的治疗功效。图8A显示实验的示意图。图8B显示详细的实验设计和实验的读取。图8C-8G显示在接种后长达14-21天的初步结果,包括总疾病评分(图8C)、RCBW的百分比(图8D)、淋巴细胞群下hCD45+细胞的百分比(图8E)和存活百分比(图8F和8G)。

[0055] 发明详述

[0056] 1.概述

[0057] 本文所述的发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其对人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子)具有特异性且活化人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子),即BTLA激动剂抗体。本发明的BTLA激动剂抗体任选地与非人灵长类动物BTLA例如猴(例如,恒河猴和/或食蟹猴)BTLA交叉反应,但可能不与啮齿动物(例如,小鼠或大鼠BTLA)交叉反应。

[0058] 根据本文所述的发明,最初通过用人BTLA的重组细胞外结构域(ECD)免疫小鼠以产生一系列不同的抗体来获得本发明的某些BTLA激动剂抗体,随后对其结合、交叉反应性、选择性和/或其他功能活性进行表征。然后,就其抑制IgM诱导的原代B细胞和/或T细胞增殖的能力,选择某些这样的抗体。功能上选择的抗体还可显示出针对人BTLA的非人灵长类动物(例如猴)直系同源物的交叉反应性,这可能是对于人治疗性试剂在非人宿主(例如,非人灵长类动物或NHP)动物中的毒性研究的有益特征。

[0059] 最初鉴定了对人BTLA具有亚纳摩尔(sub-nanomolar)或个位数纳摩尔结合亲和力的两种示例性小鼠抗体,在本文中称为HFB6-4和HFB6-5,用于进一步表征和人源化。

[0060] 与IgG1同种型一样产生这些小鼠抗体的几种人源化变体,包括HFB6-4hz1-hG1,并

且保留其各自的小鼠-人嵌合亲本抗体的结合和交叉反应性特征,以及对免疫细胞(包括B细胞、T细胞和/或浆细胞)的抑制作用。

[0061] 在小鼠免疫病症模型中对这些抗体进行了初步体外和体内功效评估,以及初始毒性和可开发性分析。初步数据显示,主题单克隆抗体作为BTLA激动剂比某些基准抗体更有效,并且更有效地抑制B细胞和T细胞。

[0062] 这些抗体的功能特征以及其有利的可开发性和药代动力学特征支持它们作为用于治疗免疫病症的新治疗剂的开发,所述免疫病症例如各种自身免疫疾病(例如,移植物抗宿主病或GvHD)。

[0063] 因此,本发明的一个方面提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子)具有特异性且活化人BTLA(B和T淋巴细胞衰减子),并且任选地与食蟹猴BTLA交叉反应,并且其中所述单克隆抗体包含:(1a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:1的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:2的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:3的HCVR CDR3序列;和(1b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:4的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:5的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:6的LCVR CDR3序列;或(2a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:61的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:62的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:63的HCVR CDR3序列;和(2b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:64的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:65的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:66的LCVR CDR3序列;任选地,所述单克隆抗体不是天然存在的。

[0064] 在某些实施方案中,CDR区序列是基于IMGT编号方案。对应于其他编号方案例如Kabat、Chothia或Martin(增强的Chothia)方案的CDR序列可以通过抗体序列比对而容易地得到。

[0065] 在一个相关方面,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含以下/基本上由以下组成/由以下组成:(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

[0066] 在一个相关方面,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与具有如本文所定义的CDR和/或VH/VL区序列的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人BTLA(例如,SEQ ID NO:121)。

[0067] 本发明的另一个方面提供了多核苷酸,其编码如本文所述的任何单克隆抗体或其抗原结合片段的重链或轻链或其抗原结合部分。在一个相关方面,本发明还提供了多核苷酸,其在严格条件下与多核苷酸或与多核苷酸的互补体杂交。

[0068] 本发明的另一个方面提供了载体,其包含如本文所述的本发明的多核苷酸。

[0069] 本发明的另一个方面提供了药物组合物,其包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸或本发明的载体。

[0070] 本发明的另一个方面提供了在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物。

[0071] 本发明的另一个方面提供了本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发

明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物在制备用于在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症的药物中的用途。

[0072] 本发明的另一个方面提供了包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物的组合物,其用于下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症。

[0073] 在以下各个部分中进一步且单独描述本发明的详细方面。然而,应当理解,本发明的任何一个实施方案,包括仅在实施例或附图中描述的实施方案,以及仅在以下一个部分下描述的实施方案,可以与本发明的任何其他实施方案相组合。

[0074] 2.定义

[0075] 术语“抗体”在最广泛的意义上涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。术语“抗体”还可以广泛地指包含重链的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3以及轻链的CDR1、CDR2和CDR3的分子,其中所述分子能够结合抗原。术语“抗体”还包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、人抗体和各种物种例如小鼠、人、食蟹猴等的抗体。

[0076] 然而,在较窄的意义上,“抗体”指各种单克隆抗体,包括嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体和人单克隆抗体,特别是本发明的人源化单克隆抗体。

[0077] 在一些实施方案中,抗体包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)。在一些实施方案中,抗体包含至少一条重链(HC),其包含重链可变区和重链恒定区的至少一部分,和至少一条轻链(LC),其包含轻链可变区和轻链恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,抗体包含两条重链和两条轻链,其中每条重链包含重链可变区和重链恒定区的至一部分,并且其中每条轻链包含轻链可变区和轻链恒定区的至少一部分。

[0078] 如本文使用的单链Fv(scFv)或包含例如包含所有六个CDR(三个重链CDR和三个轻链CDR)的单个多肽链的任何其他抗体被认为具有重链和轻链。在一些这样的实施方案中,重链是抗体的包含三个重链CDR的区域,并且轻链是抗体的包含三个轻链CDR的区域。

[0079] 如本文使用的术语“重链可变区(HCVR)”指至少包含重链CDR1(CDR-H1)、框架2(HFR2)、CDR2(CDR-H2)、FR3(HFR3)和CDR3(CDR-H3)的区域。在一些实施方案中,重链可变区还包含其在CDR-H1的N末端的FR1(HFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或其在CDR-H3的C末端的FR4(HFR4)的至少一部分(例如,全部)。

[0080] 如本文使用的术语“重链恒定区”指包含至少三个重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的区域。非限制性示例性重链恒定区包括γ、δ和α。非限制性示例性重链恒定区还包括ε和μ。每个重链恒定区对应于抗体同种型。例如,包含γ恒定区的抗体是IgG抗体,包含δ恒定区的抗体是IgD抗体,包含α恒定区的抗体是IgA抗体,包含ε恒定区的抗体是IgE抗体,并且包含μ恒定区的抗体是IgM抗体。

[0081] 某些同种型可以进一步细分为亚类。例如,IgG抗体包括但不限于IgG1(包含γ1恒定区)、IgG2(包含γ2恒定区)、IgG3(包含γ3恒定区)和IgG4(包含γ4恒定区)抗体;IgA抗体包括但不限于IgA1(包含α1恒定区)和IgA2(包含α2恒定区)抗体;以及IgM1抗体包括但不限于IgM1(包含μ1恒定区)和IgM2(包含μ2恒定区)。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的抗体是IgG1抗体。

[0083] 如本文使用的术语“重链”指包含至少重链可变区的多肽,其具有或不具有前导序

列。在一些实施方案中,重链包含重链恒定区的至少一部分。如本文使用的术语“全长重链”指包含重链可变区和重链恒定区的多肽,其具有或不具有前导序列,且具有或不具有C-末端赖氨酸。

[0084] 如本文使用的术语“轻链可变区(LCVR)”指包含轻链CDR1(CDR-L1)、框架(FR)2(LFR2)、CDR2(CDR-L2)、FR3(LFR3)和CDR3(CDR-L3)的区域。在一些实施方案中,轻链可变区还包含FR1(LFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或FR4(LFR4)的至少一部分(例如,全部)。如本文使用的术语“轻链恒定区”指包含轻链恒定结构域C_L的区域。非限制性示例性轻链恒定区包括λ和κ。

[0085] 如本文使用的术语“轻链”指包含至少轻链可变区的多肽,其具有或不具有前导序列。在一些实施方案中,轻链包含轻链恒定区的至少一部分。如本文使用的术语“全长轻链”指包含轻链可变区和轻链恒定区的多肽,其具有或不具有前导序列。术语(抗体的)“抗体片段”、“抗原结合部分”或“抗原结合片段”包括但不限于能够结合抗原的片段,例如Fv、单链Fv(scFv)、Fab、Fab’和$(Fab')_2$。在某些实施方案中,抗体片段包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv,二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、内抗体、$IgG\Delta CH_2$、微抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

[0086] 术语“Fab”指分子量为约50,000道尔顿并且具有与抗原结合的活性的抗体片段。其包含通过二硫桥连接的大约一半的重链N端侧和整个轻链。可以特别地通过用蛋白酶木瓜蛋白酶处理免疫球蛋白来获得Fab。

[0087] 术语“$F(ab')_2$”表示具有约100,000道尔顿和与抗原结合的活性的片段。该片段略大于经由铰链区中的二硫桥连接的两个Fab片段。通过用蛋白酶胃蛋白酶处理免疫球蛋白来获得这些片段。可以通过切割铰链区的二硫桥从F(ab')2片段获得Fab片段。

[0088] 单Fv链“scFv”对应于使用编码VL和VH结构域的基因和编码旨在结合这些结构域的肽的序列而合成的VH:VL多肽。根据本发明的scFv包括维持适当构象的CDR,例如使用遗传重组技术。

[0089] “scFv”的二聚体对应于通过肽键连接在一起的两个scFv分子。该Fv链通常是融合基因表达的结果,所述融合基因包括通过编码肽的接头序列连接的编码VH和VL的基因。人scFv片段可以包括维持适当构象的CDR区,优选通过使用遗传重组技术。

[0090] “dsFv”片段是通过二硫桥稳定的VH-VL异二聚体;其可以是二价的($dsFV_2$)。二价$Sc(Fv)_2$的片段或多价抗体可以通过单价scFv的缔合而自发形成,或者通过肽结合序列连接scFv片段来产生。

[0091] Fc片段支持抗体的生物学特性,尤其是其被免疫效应物识别或活化补体的能力。其由铰链区之外的重链恒定片段组成。

[0092] 术语“双抗体”表示具有两个抗原固定位点的小抗体片段。这些片段在同一VH-VL多肽链中包含与可变轻链结构域VL连接的可变重链结构域VH。使用太短以致同一链的两个结构域无法匹配的结合序列,必然发生与另一条链的两个互补结构域的匹配,并因此产生两个抗原固定位点。

[0093] “结合相同表位的抗体”或“与(另一种)抗体竞争结合的抗体”指可以通过抗体竞争测定法确定的抗体。其指在竞争测定法中阻断参考抗体与其抗原的结合50%或更多的抗体,并且反之,参考抗体在竞争测定法中阻断抗体与其抗原的结合50%或更多。当在竞争相

同表位的抗体的上下文中使用时,术语“竞争”指抗体之间的竞争是通过其中所测试的抗体阻止或抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合的测定法来确定的。

[0094] 可以使用许多类型的竞争性结合测定法,例如:固相直接或间接放射免疫测定法(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定法(EIA)、夹心竞争测定法(参见,例如Stahli et al.,1983,Methods in Enzymology9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如Kirkland et al.,1986,J.Immunol.137:3614-3619);固相直接标记测定法;固相直接标记夹心测定法(参见,例如Harlow和Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用^{125}I标记的固相直接标记RIA(参见,例如Morel et al.,1988,Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如Cheung,et al.,1990,Virology 176:546-552);和直接标记RIA(Moldenhauer et al.,1990,Scand.J.Immunol.)。

[0095] 通常,这种测定法涉及使用与携带这些(未标记的测试抗原结合蛋白和标记的参考抗体)中的任一种的固体表面或细胞结合的纯化抗原。通过确定在测试抗体存在下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗体以过量存在。通过竞争测定法鉴定的抗体(竞争性抗体)包括与参考抗体结合相同表位的抗体和结合足够接近由参考抗体所结合的表位的相邻表位以发生空间位阻的抗体。在一些实施方案中,当竞争性抗体以过量存在时,其将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%或97%,或更多。

[0096] 术语“抗原”指能够被选择性结合剂(例如,抗体或其免疫功能片段)结合且另外能够用于哺乳动物中以产生能够结合该抗原的抗体的分子或分子的一部分。抗原可具有一个或多个能够与抗体相互作用的表位。

[0097] 术语“表位”是抗原分子中被选择性结合剂(例如抗体或其片段)结合的部分。该术语包括能够特异性结合抗体的任何决定簇。表位可以是连续的或非连续的(例如,在多肽中,在多肽序列中彼此不连续但在分子的背景下被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基)。在一些实施方案中,表位可以是模拟物,因为其包含与用于产生抗体的表位相似的三维结构,但不包含在用于产生抗体的表位中发现的氨基酸残基或仅包含其中的一些。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团,例如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基,并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。

[0098] 在一些实施方案中,“表位”由用于确定它的方法定义。例如,在一些实施方案中,如果通过氢-氘交换(HDX)确定抗体与参考抗体结合抗原的同一区域,则抗体与参考抗体结合相同的表位。

[0099] 在某些实施方案中,如果通过X-射线晶体衍射确定抗体与参考抗体结合抗原的同一区域,则抗体与参考抗体结合相同的表位。

[0100] 如本文使用的“嵌合抗体”指包含来自第一物种(例如小鼠、大鼠、食蟹猴等)的至少一个可变区和来自第二物种(例如人、食蟹猴、鸡等)的至少一个恒定区的抗体。在一些实施方案中,嵌合抗体包含至少一个小鼠可变区和至少一个人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体的所有可变区来自第一物种,并且嵌合抗体的所有恒定区来自第二物种。

[0101] 如本文使用的“人源化抗体”指其中非人可变区(例如小鼠、大鼠、食蟹猴、鸡等)的

框架区中的至少一个氨基酸已经被来自人可变区的相应氨基酸替换的抗体。在一些实施方案中,人源化抗体包含至少一个人恒定区或其片段。在一些实施方案中,人源化抗体片段是Fab、scFv、$(Fab')_2$等。

[0102] 如本文使用的“CDR移植抗体”指其中第一(非人)物种的一个或多个互补决定区(CR)已经移植到第二(人)物种的框架区(FR)上的人源化抗体。

[0103] 如本文使用的“人抗体”指在人中产生的抗体,在包含人免疫球蛋白基因的非人动物中产生的抗体,例如XenoMouse®,和使用体外方法(例如噬菌体展示)选择的抗体,其中抗体库(antibody repertoire)是基于人免疫球蛋白序列。

[0104] “宿主细胞”指可以是或已经是载体或分离的多核苷酸的接受者的细胞。宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。示例性的真核细胞包括哺乳动物细胞,例如灵长类动物或非灵长类动物细胞;真菌细胞,例如酵母;植物细胞;和昆虫细胞。非限制性示例性的哺乳动物细胞包括但不限于NSO细胞、PER.C6®细胞(Crucell)及293和CHO细胞,及其衍生物,分别例如293-6E和DG44细胞。

[0105] 如本文使用的术语“分离的”指已经与其通常在自然界中发现在一起的组分中的至少一些分开的,或已经与其通常产生在一起组分中的至少一些分开的分子。例如,当多肽与产生其的细胞的至少一些组分分开时,其被称为“分离的”。当多肽在表达后由细胞分泌时,将含有多肽的上清液与产生其的细胞物理分开被认为是对多肽“进行分离”。类似地,当多核苷酸不是通常在自然界中发现其的较大多核苷酸(例如,在DNA多核苷酸的情况下,基因组DNA或线粒体DNA)的一部分时,或者与产生其的细胞的组分中的至少一些分开时,例如,在RNA多核苷酸的情况下,多核苷酸被称为“分离的”。因此,包含在宿主细胞内的载体中的DNA多核苷酸可以被称为“分离的”,只要该多核苷酸在自然界中未在该载体中发现。

[0106] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,指哺乳动物,例如人。在一些实施方案中,还提供了治疗其他非人哺乳动物的方法,所述其他非人哺乳动物包括但不限于啮齿动物、猿猴、猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物、猪科动物、绵羊科动物、山羊科动物、哺乳动物实验室动物、哺乳动物农场动物、哺乳动物运动动物和哺乳动物宠物。在一些情况下,“受试者”或“患者”指需要治疗疾病或病症的(人)受试者或患者。

[0107] 如本文使用的术语“样品”或“患者样品”指从目标受试者获得或衍生的材料,其含有例如基于物理、生物化学、化学和/或生理特征待表征和/或鉴定的细胞和/或其他分子实体。例如,短语“疾病样品”及其变体指从目标受试者获得的任何样品,其预期或已知含有待表征的细胞和/或分子实体。

[0108] “组织或细胞样品”意指从受试者或患者的组织获得的类似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是来自新鲜、冷冻和/或保藏的器官或组织样品或活组织检查或抽吸物的实体组织;血液或任何血液成分;体液,例如痰、脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液;来自受试者妊娠或发育的任何时间的细胞。组织样品也可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地,组织或细胞样品是从疾病组织/器官获得。组织样品可以含有不与自然界中的组织天然混合的化合物,例如防腐剂、抗凝血剂、缓冲剂、固定剂、营养素、抗生素等。

[0109] 如本文使用的“参考样品”、“参考细胞”或“参考组织”指从已知或据信没有遭受使用本发明的方法或组合物来鉴定的疾病或病况的来源获得的样品、细胞或组织。在一个实施方案中,参考样品、参考细胞或参考组织是从正在使用本发明的组合物或方法鉴定疾病

或病况的同一受试者或患者的身体的健康部分获得的。在一个实施方案中,参考样品、参考细胞或参考组织从至少一个个体的身体的健康部分获得的,所述个体不是正在使用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病况的受试者或患者。在一些实施方案中,参考样品、参考细胞或参考组织是先前从在发展疾病或病况之前或在疾病或病况的早期阶段的患者获得的。

[0110] “病症”或“疾病”是将受益于用本发明的一种或多种BTLA激动剂治疗的任何病况。这包括慢性和急性病症或疾病,包括使哺乳动物易患所讨论的病症的那些病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性实例包括自身免疫病症。

[0111] “过度活跃免疫病症”指其中免疫系统不期望地攻击受试者中的细胞、器官或移植物,或其中免疫系统的细胞不受控制地增殖的任何疾病。常见的过度活跃免疫病症包括自身免疫病症和同种异体移植物的排斥,例如移植物抗宿主病。

[0112] “治疗”指治疗性处理,例如,其中目的是减缓(减轻)靶向的病理状况或病症,以及例如,其中目的是抑制病况或病症的复发。“治疗”涵盖用于哺乳动物(包括人)的疾病(在本文中也称为“病症”或“病况”)的治疗剂的任何施用或应用,并且包括抑制疾病或疾病进展,抑制或减缓疾病或其进展,阻止其发展,部分或完全缓解疾病,部分或完全缓解疾病的一种或多种症状,或者恢复或修复丧失的、缺失的或有缺陷的功能;或者刺激低效的过程。术语“治疗”还包括降低任何表型特征的严重程度和/或降低表型特征的发生率、程度或可能性。需要治疗的那些包括已经患有该病症的那些以及处于该病症复发风险的那些或其中要预防或减缓该病症复发的那些。

[0113] 术语“有效量”或“治疗有效量”指有效治疗受试者的疾病或病症的药物的量。在一些实施方案中,有效量指在必需用药量和时间段内有效实现期望的治疗或预防结果的量。本发明的抗体的治疗有效量可以根据多种因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及拮抗剂在个体中引发期望应答的能力而变化。治疗有效量涵盖其中治疗有益效果超过主题抗体的任何毒性或有害作用的量。

[0114] “预防有效量”指在必需的用药量和时间段内有效实现期望的预防结果的量。通常但不一定,由于预防剂量在疾病之前或在疾病的早期阶段用于受试者,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0115] “可药用运载体”指与共同构成用于向受试者施用的“药物组合物”的治疗剂一起使用的本领域常规的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料、制剂助剂或运载体。可药用运载体在所用用药量和浓度下对接受者无毒,并且与制剂的其他成分相容。可药用运载体适合于所采用的制剂。例如,如果治疗剂待口服施用,则运载体可以是凝胶胶囊。如果治疗剂待皮下施用,则运载体理想地不刺激皮肤且不引起注射部位反应。

[0116] “制品”是包含至少一种试剂(例如,用于治疗疾病或病症的药物,或用于特异性检测本文所述的生物标志物的探针)的任何制造物(例如,包装或容器)或试剂盒。在一些实施方案中,所述制造物或试剂盒作为用于进行本文所述方法的单元的推广、分配或销售。

[0117] 3.治疗过度活跃免疫病症的方法

[0118] 本文所述的发明提供了用于治疗人和其他非人哺乳动物的方法中的抗BTLA抗体。

[0119] 在病理情况下,免疫系统可能过度活跃并攻击正常和健康的组织,导致自身免疫疾病。在其他病理情况下,免疫系统的细胞可能过度增殖,例如淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤)。在其他情况下,免疫系统按预期攻击外来实体,但接受同种异体实体是期望的结果,例如在

同种异体移植的情况下。

[0120] 因此,在一些非限制性实施方案中,本发明的抗BTLA激动剂抗体或其抗原结合片段可用于将受益于减弱免疫应答的治疗的受试者,例如患有自身免疫疾病的受试者或接受同种异体移植物的受试者。本发明的抗BTLA抗体通过例如抑制T细胞和/或B细胞和浆细胞的增殖和/或活性而产生对免疫应答的抑制。

[0121] 也就是说,本文描述的发明提供了在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者治疗自身免疫病症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物。

[0122] 一个相关方面提供了本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物在制备用于在有此需要的患者中下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症的药物中的用途。

[0123] 另一个相关方面提供了包含本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、本发明的多核苷酸、本发明的载体或本发明的药物组合物的组合物,其用于下调B细胞介导的或T细胞介导的免疫应答或者用于治疗自身免疫病症。

[0124] 在一些实施方案中,提供了用于治疗或预防过度活跃免疫病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的受试者施用有效量的任何的主题抗BTLA抗体或其抗原结合片段。

[0125] 在一些实施方案中,提供了用于治疗过度活跃免疫病症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的任何的主题抗BTLA激动剂抗体或其抗原结合片段,所述有此需要的受试者为例如,被诊断患有过度活跃免疫病症(例如,自身免疫疾病)、具有患有过度活跃免疫病症(例如,自身免疫疾病)的高风险或表现出患有过度活跃免疫病症(例如,自身免疫疾病)的症状的受试者。

[0126] 本文提供了可以用主题抗BTLA抗体或其抗原结合片段治疗的非限制性示例性过度活跃免疫病症,例如自身免疫疾病,包括系统性红斑狼疮(SLE);溃疡性结肠炎(UC),包括小儿溃疡性结肠炎;类风湿性关节炎(RA);银屑病(Ps),包括慢性斑块状银屑病;银屑病关节炎(PsA);克罗恩病(CD),包括小儿克罗恩病;炎性肠病(IBD);强直性脊柱炎;幼年特发性关节炎(JIA),包括多关节幼年特发性关节炎;化脓性汗腺炎;非感染性中间、后部和全葡萄膜炎;自身免疫性肝炎样疾病;实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE);MHC不匹配的心脏同种异体移植物;急性气道过敏中的肺部炎症;移植物抗宿主病(GvHD);或同种异体造血干细胞移植(aHSCT)。

[0127] 在某些实施方案中,过度活跃免疫病症是系统性红斑狼疮(SLE或狼疮)。狼疮的特征在于由B和T细胞免疫失调引起的针对核、细胞质和/或细胞表面分子的致病性自身抗体的病理性形成。循环抗原抗体免疫复合物的局部形成和/或沉积引发炎性应答,其导致一系列全身和器官特异性临床表现,特征在于缓解和恶化,导致多器官系统损伤和潜在的终末器官衰竭。狼疮是一种特征在于致残症状和进行性器官损伤的多方面的自身免疫疾病。

[0128] 在某些实施方案中,过度活跃免疫病症是炎性肠病(IBD)。IBD涵盖两种病况:克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),其特征在于慢性炎症导致对胃肠道(GI)的损伤。IBD的一些常见症状是持续性腹泻、腹痛、直肠出血/血便、体重减轻和疲劳。

[0129] 在某些实施方案中,过度活跃免疫病症是受试者的免疫系统攻击从供体获得的同

种异体移植物的病况,例如移植物抗宿主病(GvHD)。GvHD可以在移植后的任何时间发生,并且可以是急性的或慢性的。在骨髓移植中,GvHD更常发生在骨髓开始制备细胞之后。症状根据某人患有该病况多长时间而变化,但可包括口腔溃疡、腹痛和皮疹。

[0130] 在一些实施方案中,提供了用于预防过度活跃免疫病症的方法,其包括向处于发展过度活跃免疫相关病症的症状的风险中的受试者预防性地施用有效量的任何的主题抗BTLA抗体或其抗原结合片段。例如,可以在接受同种异体移植之前向受试者施用主题抗BTLA抗体或其抗原结合片段。

[0131] 在一些实施方案中,本发明的抗BTLA抗体或其抗原结合片段可以单独使用,或者可替代地与已知能够治疗疾病或适应症的任何其他合适的化合物组合使用。

[0132] 因此,根据本发明的一个特定实施方案,如之前定义的针对BLTA并抑制T和/或B细胞和浆细胞的抗体与第二治疗剂组合使用,用于治疗与过度活跃免疫系统相关的疾病,例如自身免疫疾病,例如狼疮。

[0133] 在这样的组合疗法中,本发明的抗体可以在第二治疗剂之前、之后或同时使用。关于组合疗法参见下文其他部分。

[0134] 4.施用途径和运载体

[0135] 在多个实施方案中,主题激动剂抗BTLA单克隆抗体可以皮下或静脉内施用。为简单起见,“主题抗BTLA单克隆抗体”指本发明的小鼠-人嵌合抗BTLA抗体,以及其人源化变体。

[0136] 在一些实施方案中,主题抗BTLA单克隆抗体可以通过各种途径体内施用,包括但不限于口服、动脉内、肠胃外、鼻内、肌内、心内、心室内、气管内、口腔、直肠、腹膜内、静脉内和皮下施用,通过吸入、皮内、局部、透皮和鞘内,或以其他方式,例如通过植入。

[0137] 在一些实施方案中,主题抗BTLA单克隆抗体可以通过静脉内(i.v.)或皮下(s.c.)施用来进行施用。

[0138] 主题抗体组合物可以配制成固体,半固体、液体或气体形式的制备物;包括但不限于片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、栓剂、灌肠剂、注射剂、吸入剂和气溶胶。

[0139] 在多个实施方案中,包含主题抗BTLA单克隆抗体的组合物以具有多种可药用运载体的制剂提供(参见,例如Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,20th ed.(2003);Ansel et al.,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,7th ed.,Lippencott Williams and Wilkins(2004);Kibbe et al.,Handbook of Pharmaceutical Excipients,3rd ed.,Pharmaceutical Press(2000))。包括媒介物、佐剂和稀释剂的各种可药用运载体是可用的。此外,各种可药用辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等也是可用的。非限制性示例性的运载体包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。

[0140] 在各个实施方案中,包含主题抗BTLA单克隆抗体的组合物可以通过将其溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂(例如植物油或其他油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸的酯或丙二醇)中;并且如果期望,与常规添加剂(例如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂)一起配制用于注射,包括皮下施用。

[0141] 在多个实施方案中,组合物可以配制用于吸入,例如,使用加压的可接受的推进

剂,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0142] 在多个实施方案中,组合物还可以配制成例如含有可生物降解或不可生物降解的聚合物的持续释放微胶囊。非限制性示例性的可生物降解制剂包括聚乳酸-乙醇酸(PLGA)聚合物。非限制性示例性的不可生物降解的制剂包括聚甘油脂肪酸酯。制备这样的制剂的某些方法描述在例如EP 1125584 A1中。

[0143] 还提供了包含一个或多个容器的药物用药量包装,每个容器含有一个或多个剂量的主题抗BTLA单克隆抗体。在一些实施方案中,提供单位用药量,其中单位用药量含有预定量的组合物,所述组合物包含主题抗BTLA单克隆抗体,具有或不具有一种或多种另外的试剂。在一些实施方案中,这样的单位用药量以一次性预填充注射器提供用于注射。在多种实施方案中,单位用药量中包含的组合物可包含盐水、蔗糖等;缓冲剂,例如磷酸盐等;和/或在稳定且有效的pH范围内配制。可替代地,在一些实施方案中,组合物可以作为冻干粉末提供,其可以在加入适当的液体(例如无菌水)时重构。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种抑制蛋白质聚集的物质,包括但不限于蔗糖和精氨酸。在一些实施方案中,本发明的组合物包含肝素和/或蛋白多糖。

[0144] 药物组合物以有效治疗或预防特定适应症的量施用。治疗有效量通常取决于所治疗的受试者的体重、他或她的身体或健康状况、待治疗的病况的广泛性或治疗的受试者的年龄。

[0145] 5.组合疗法

[0146] 本发明的主题抗BTLA单克隆抗体,包括其功能性片段,可以与其他生物活性物质或其他治疗程序相组合而施用于有此需要的受试者来治疗疾病。例如,主题抗BTLA单克隆抗体可以单独施用或与其他治疗模式一起施用。其可以在其他治疗模式(例如免疫抑制药物)之前、基本上同时或之后提供。

[0147] 为了治疗过度活跃免疫病症,主题抗BTLA单克隆抗体可以与一种或多种免疫抑制剂联合施用,所述免疫抑制剂例如皮质类固醇、Janus激酶抑制剂、钙调神经磷酸酶抑制剂、mTOR抑制剂、IMDH抑制剂和其他免疫抑制剂。

[0148] 在某些实施方案中,将主题抗BTLA单克隆抗体与另一种治疗同时或连续地施用于受试者,例如患有自身免疫病症的受试者。例如,主题抗BTLA单克隆抗体可以与一种或多种免疫抑制剂一起施用。

[0149] 在某些实施方案中,治疗患有过度活跃免疫病症的受试者的方法包括向受试者施用本发明的抗BTLA单克隆抗体和一种或多种免疫抑制剂,例如皮质类固醇,例如类固醇。

[0150] 可以与主题抗-BTLA单克隆抗体组合施用的免疫抑制剂包括但不限于:非甾体抗炎药(NSAID),例如布洛芬、萘普生、双氯芬酸、塞来昔布、甲芬那酸、依托昔布、吲哚美辛和高剂量阿司匹林;抗疟药,例如羟氯喹和磷酸氯喹;皮质类固醇,例如泼尼松、布地奈德和泼尼松龙;Janus激酶抑制剂,例如托法替尼;钙调神经磷酸酶抑制剂,例如环孢菌素和他克莫司;mTOR抑制剂,例如西罗莫司和依维莫司;和IMDH抑制剂,例如硫唑嘌呤、来氟米特和霉酚酸酯。6.示例性的抗BTLA单克隆抗体

[0151] 本文所述的发明提供了对BTLA具有特异性的激动剂单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0152] 因此,本发明的一个方面提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其与本文所

述的任何分离的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合由HFB6-4或HFB6-5结合的表位。

[0153] 本发明的另一个相关方面提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA具有特异性,并且其中所述单克隆抗体包含:(1a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:1的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:2的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:3的HCVR CDR3序列;和(1b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:4的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:5的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:6的LCVR CDR3序列;或(2a)重链可变区(HCVR),其包含SEQ ID NO:61的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:62的HCVR CDR2序列和SEQ ID NO:63的HCVR CDR3序列;和(2b)轻链可变区(LCVR),其包含SEQ ID NO:64的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:65的LCVR CDR2序列和SEQ ID NO:66的LCVR CDR3序列。

[0154] 在某些实施方案中,本文所述的CDR区序列是基于IMGT编号方案。对应于其他编号方案,例如Kabat、Chothia或Martin(增强的Chothia)方案的CDR序列可以通过抗体序列比对容易地得到。

[0155] 对于上述本发明的任何方面,在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中:(1A)HCVR序列是SEQ ID NO:7;和/或(1B)LCVR序列是SEQ ID NO:8,或(2A)HCVR序列是SEQ ID NO:67;和/或(2B)LCVR序列是SEQ ID NO:68。

[0156] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:7或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:8或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0157] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:9或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:10或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0158] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:11或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:12或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0159] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:13或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸

变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:14或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0160] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:15或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:16或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0161] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:17或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:18或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0162] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:19或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:20或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0163] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:21或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:22或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0164] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:23或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:24或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0165] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:25或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:26或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0166] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:27或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:28或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0167] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:29或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:30或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0168] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:31或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:32或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0169] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:33或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:34或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0170] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:35或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:36或与其具有至少90%、

91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0171] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:37或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:38或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0172] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:39或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:40或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0173] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:41或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:42或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0174] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:43或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:44或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0175] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:45或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:46或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0176] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ

ID NO:47或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:48或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0177] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:49或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:50或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0178] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:51或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:52或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0179] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:53或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:54或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0180] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:55或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:56或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0181] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:67或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:68或与其具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％序列同一性且包含以下/基本上由以下

组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0182] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:69或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:70或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0183] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:71或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:72或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0184] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:73或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:74或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0185] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:75或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:76或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0186] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:77或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:78或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0187] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:79或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同

一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:80或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0188] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:81或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:82或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0189] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:83或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:84或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0190] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:85或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:86或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0191] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:87或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:88或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0192] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:89或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:90或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取

代)。

[0193] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:91或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:92或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0194] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:93或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:94或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0195] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:95或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:96或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0196] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:97或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:98或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0197] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:99或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:100或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0198] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:101或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基

酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:102或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0199] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:103或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:104或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0200] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:105或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:106或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0201] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:107或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:108或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0202] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:109或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:110或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0203] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:111或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:112或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0204] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:113或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:114或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0205] 在一些实施方案中,在分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中,HCVR序列是SEQ ID NO:115或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:重链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代);和/或,LCVR序列是SEQ ID NO:116或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含以下/基本上由以下组成/由以下组成的变体:轻链框架区中的至少一个氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)。

[0206] 在一些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段具有:(1a)SEQ ID NO:117的重链序列;和/或SEQ ID NO:118的轻链序列,或(2a)SEQ ID NO:119的重链序列;和/或(2b)SEQ ID NO:120的轻链序列。

[0207] 下文提供了本发明抗体的一些序列。

[0208] HFB6-4-hG1(人-小鼠嵌合单克隆抗体)

[0209] CDR-H1:CTTSGFNIKDTYIHW(SEQ ID NO:1)

[0210] CDR-H2:GRNDPANGNTKYD(SEQ ID NO:2)

[0211] CDR-H3:CASYEGYYERFGYW(SEQ ID NO:3)

[0212] CDR-L1:CKSSQSLLDRDGKTYLNW(SEQ ID NO:4)

[0213] CDR-L2:LVSKLDS(SEQ ID NO:5)

[0214] CDR-L3:CWQDTHFPYTF(SEQ ID NO:6)

[0215] HCVR:

[0216] EVQLQQSGAELVNPGASVKLSCTTSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRNDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSSTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYEGYYERFGYWGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:7)

[0217] LCVR:

[0218] DVVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDRDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:8)

[0219] HC:

[0220] EVQLQQSGAELVNPGASVKLSCTTSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRNDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSSTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYEGYYERFGYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:117)

[0221] LC:

[0222] DVVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDRDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQDTHFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:118)

[0223] HFB6-5-hG1(人-小鼠嵌合单克隆抗体)

[0224] CDR-H1:CTASGVNIKDTYMYW(SEQ ID NO:61)

[0225] CDR-H2:GRIDPANGYTRYD(SEQ ID NO:62)

[0226] CDR-H3:CAVYDGYYESFDVW(SEQ ID NO:63)

[0227] CDR-L1:CKSSQSLLDSDGKTYLNW(SEQ ID NO:64)

[0228] CDR-L2:LVSKLDS(SEQ ID NO:65)

[0229] CDR-L3:CWQGTLFPRTF(SEQ ID NO:66)

[0230] HCVR:

[0231] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGVNIKDTYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTRYDPKFQGKATITADTSSNTAHLQLSSLTSEDAAVYYCAVYDGYYESFDVWGAGTTVTVSS(SEQ ID NO:67)

[0232] LCVR:

[0233] DVVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTLFPRTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:68)

[0234] HC:

[0235] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGVNIKDTYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTRYDPKFQGKATITADTSSNTAHLQLSSLTSEDAAVYYCAVYDGYYESFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:119)

[0236] LC:

[0237] DVVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCWQGTLFPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:120)

[0238] 表1:HFB6-4的人源化变体(序列参见序列表)

[0239]

抗体	VH	VL
HFB6-4hz1-hG1	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
HFB6-4hz2-hG1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
HFB6-4hz3-hG1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
HFB6-4hz4-hG1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
HFB6-4hz5-hG1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
HFB6-4hz6-hG1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
HFB6-4hz7-hG1	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
HFB6-4hz8-hG1	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24

[0240]

HFB6-4hz9-hG1	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
HFB6-4hz10-hG1	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
HFB6-4hz11-hG1	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
HFB6-4hz12-hG1	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
HFB6-4hz13-hG1	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
HFB6-4hz14-hG1	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
HFB6-4hz15-hG1	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
HFB6-4hz16-hG1	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
HFB6-4hz17-hG1	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
HFB6-4hz18-hG1	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44
HFB6-4hz19-hG1	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
HFB6-4hz20-hG1	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
HFB6-4hz21-hG1	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50
HFB6-4hz22-hG1	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52
HFB6-4hz23-hG1	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54
HFB6-4hz24-hG1	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56

[0241] 表2:HFB6-5的人源化变体(序列参见序列表)

[0242]

抗体	VH	VL
HFB6-5hz1-hG1	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70
HFB6-5hz2-hG1	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72
HFB6-5hz3-hG1	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74
HFB6-5hz4-hG1	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
HFB6-5hz5-hG1	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
HFB6-5hz6-hG1	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
HFB6-5hz7-hG1	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
HFB6-5hz8-hG1	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
HFB6-5hz9-hG1	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
HFB6-5hz10-hG1	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88

[0243]

HFB6-5hz11-hG1	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90
HFB6-5hz12-hG1	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92
HFB6-5hz13-hG1	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 94
HFB6-5hz14-hG1	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96
HFB6-5hz15-hG1	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98
HFB6-5hz16-hG1	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 100
HFB6-5hz17-hG1	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102
HFB6-5hz18-hG1	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104
HFB6-5hz19-hG1	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106
HFB6-5hz20-hG1	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
HFB6-5hz21-hG1	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110
HFB6-5hz22-hG1	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 112
HFB6-5hz23-hG1	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 114
HFB6-5hz24-hG1	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 116

[0244] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段是人-小鼠嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR移植抗体或表面重塑抗体。

[0245] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体、IgG2抗体、

IgG3抗体或IgG4抗体。

[0246] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体。

[0247] 在一些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体,其包含SEQ ID NO:57的重链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体,和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体。

[0248] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是包含重链恒定区中的突变的IgG1抗体,其:(1)调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)(例如,F243L、G236A、S239D/I332E、S239D/A330L/I332E、S298A/E333A/K334A、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L,或通过增加与Fc γ RIIIa的结合而具有增强的ADCC的无岩藻糖基化(非岩藻糖基化)抗体(例如,Fc区处的无岩藻糖基化N297));和/或(2)增加血清半衰期(例如T250Q/M428L、M252Y/S254T/T256E)。

[0249] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是小鼠抗体、人-小鼠嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR-移植抗体或表面重塑抗体。

[0250] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是人源化抗体。

[0251] 在一些实施方案中,其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、内抗体、IgGΔCH_2、微抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

[0252] 在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA具有特异性,例如基本上不与小鼠BTLA交叉反应。

[0253] 在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与非人原发性BTLA,例如猴BTLA(例如,食蟹猴或恒河猴BTLA,如SEQ ID NO:122)交叉反应。在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段不与啮齿动物BTLA(例如小鼠BTLA(如SEQ ID NO:123))交叉反应。下文列出了人、猴和小鼠BTLA的本领域已知的示例性的氨基酸序列。

[0254]

	BTLA 序列
人 BTLA(登录号 NP_861445.3)	MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSE HSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSW KEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDV KSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQ

[0255]

	GKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYD NDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLA RNVKEAPTEYASICVRS（SEQ ID NO: 121）
食蟹猴或恒河猴BTLA（登录号XP_001104281.1）	MKTLPAMLGSGRLFWVVFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSY HSIFAGDPFKLECPVKYCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSW KQEKNLSFFILHFEPVLPSDNGSYRCSANFLSAIIESHSTTLYVTDV KSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCFLRRHQ GKQNELSDTTGREITLVDVPFKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDN EPDFCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIIYASLNHSIIALNSRQARN VKEAPTEYASICVRS（SEQ ID NO: 122）
小鼠BTLA（登录号NP_001032808.2）	MKTVPAMLGTPRLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDEECPVQLTI TRNSKQSARTGELFKIQCPVKYCVHRPNVTWCKHNGTICVPLEVS PQLYTSWEENQSVPVFVLHFKPIHLSDNGSYSCSTNFNSQVINSHS VTIHVTERTQNSSEHPLITVSDIPDATNASGPSTMEERPGRTWLLY TLLPLGALLLLLACVCLLCFLKRIQGKEKKPSDLAGRDTNLVDIPA SSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSERNNQGIVY ASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS（SEQ ID NO: 123）

[0256] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段对人BTLA的解离常数(K_D)为≤1μM、≤100nM、≤50nM、≤25nM、≤20nM、≤15nM、≤10nM、≤5nM、≤2nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)。

[0257] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段结合被HFB6-4结合的表位。在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段结合被HFB6-5结合的表位。

[0258] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段是人BTLA的激动剂且在与BTLA结合时活化来自BTLA的下游信号传导。

[0259] 在一些实施方案中,来自BTLA的下游信号传导抑制B细胞增殖,和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)和/或浆细胞活化。在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段不阻断/干扰/消除BTLA与HVEM的结合。

[0260] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段在与BTLA结合时抑制B细胞增殖和/或抑制T细胞(例如,CD4、CD8、Th1、TFH、αβ或γδT细胞)活化。

[0261] 在某些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

[0262] 在一个相关方面,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含以下/基本上由以下组成/由以下组成:(1)SEQ ID NO:9的HCVR序列、SEQ ID NO:57的重链恒定区序列、SEQ ID NO:10的LCVR序列和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列;或(2)SEQ ID NO:59的重链氨基酸序列,和SEQ ID NO:60的轻链氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括人源化单克隆抗体或其抗原结合片段,具有好的可开发性特征,包括在高温(例如,在25℃或40℃储存稳定)、低pH条件(例如,在室温附近的pH3.5)和/或在几轮冷冻/解冻循环后稳定。

[0264] 在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段,包括人源化单克隆抗体或其抗原结合片段,包括在氨基酸序列中被设计成改善抗体的可开发性的一个或多个点突变。例如,Raybould et al.(Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling,PNAS116(10):4025-4030,2019)描述了治疗性抗体特征谱仪(Therapeutic Antibody Profiler(TAP)),一种构建可变结构域序列的可下载同源性模型、针对五个可开发性指南对其进行测试且报告潜在序列不稳定性和规范形式的计算工具。作者还提供了可在opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/TAP.php上自由获取的TAP。

[0265] 除了实现对抗原的期望亲和力之外,治疗性mAb开发还存在许多障碍。这些包括内在免疫原性、化学和构象不稳定性,自缔合,高粘度,多特异性和表达差。例如,高水平的疏水性,特别是在高度可变的互补决定区(CDR)中,已经反复涉及聚集、粘度和多特异性。重链和轻链可变结构域的净电荷的不对称性也与在高浓度的自缔合和粘度相关。CDR中的正电荷和负电荷补丁与高清除率和差表达水平相关。产物异质性(例如,通过氧化、异构化或糖基化)通常由易于翻译后修饰或共翻译修饰的特定序列基序引起。计算工具可用于促进序列不稳定性的鉴定。Warszawski et al.(Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces.PLoS Comput Biol 15(8):e1007207.https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207)还描述了通过自动设计可变轻-重链界面来优化抗体亲和力和稳定性的方法。另外的方法可用于鉴定候选抗体的潜在可开发性问题,并且在本发明的优选实施方案中,可以通过常规方法将一个或多个点突变引入候选抗体以解决这些问题,从而产生本发明的优化的治疗性抗体。

[0266] 7.人源化抗体

[0267] 在一些实施方案中,本发明的抗体是人源化抗体。人源化抗体可用作治疗性分子,因为人源化抗体减少或消除对非人抗体的人免疫应答(例如,人抗小鼠抗体(HAMA)应答),其可产生对抗体治疗剂的免疫应答,并降低治疗剂的有效性。抗体可以通过任何标准方法进行人源化。人源化的非限制性示例性方法包括描述在例如美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;6,180,370;Jones et al.,Nature321:522-525(1986);Riechmann et al,Nature 332:323-27(1988);Verhoeyen et al,Science 239:1534-36(1988);和美国公开号US 2009/0136500中的。将其全部通过引用并入。

[0268] 人源化抗体是其中非人可变区的框架区中的至少一个氨基酸已经被来自人框架区中相应位置的氨基酸取代的抗体。在一些实施方案中,非人可变区的框架区中的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少10个、至

少11个、至少12个、至少15个或至少20个氨基酸被来自一个或多个人框架区中的一个或多个相应位置的氨基酸取代。

[0269] 在一些实施方案中,用于取代的一些相应的人氨基酸来自不同的人免疫球蛋白基因的框架区。也就是说,在一些这样的实施方案中,一个或多个非人氨基酸可以用来自第一人抗体的人框架区的相应氨基酸取代或由第一人免疫球蛋白基因编码,一个或多个非人氨基酸可以用来自第二人抗体的人框架区的相应氨基酸取代或由第二人免疫球蛋白基因编码,一个或多个非人氨基酸可以用来自第三人抗体的人框架区的相应氨基酸取代或由第三人免疫球蛋白基因编码。此外,在一些实施方案中,在单个框架区(例如FR2)中用于取代的所有相应人氨基酸都不需要来自相同的人框架。然而,在一些实施方案中,用于取代的所有相应的人氨基酸都来自相同的人抗体或由相同的人免疫球蛋白基因编码。

[0270] 在一些实施方案中,抗体是通过用相应的人框架区替代一个或多个完整框架区进行人源化。在一些实施方案中,选择与被替代的非人框架区具有最高同源性水平的人框架区。在一些实施方案中,这样的人源化抗体是CDR移植抗体。

[0271] 在一些实施方案中,在CDR移植之后,将一个或多个框架氨基酸变回到小鼠框架区中的相应氨基酸。在一些实施方案中,进行这样的“回复突变”以保留一个或多个小鼠框架氨基酸,其似乎有助于一个或多个CDR的结构和/或可能参与抗原接触和/或似乎参与抗体的总体结构完整性。在一些实施方案中,在CDR移植之后,对抗体的框架区制造十个或更少、九个或更少、八个或更少、七个或更少、六个或更少、五个或更少、四个或更少、三个或更少、两个或更少、一个或零个回复突变。

[0272] 在一些实施方案中,人源化抗体还包含人重链恒定区和/或人轻链恒定区。

[0273] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗BTLA抗体或其抗原结合片段是表1-2和随附序列表(作为说明书的一部分并入本文)中列出的抗体之一。

[0274] 8.人抗体

[0275] 在一些实施方案中,本发明的抗体是人抗体。人抗体可以通过任何合适的方法制备。非限制性示例性的方法包括在包含人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人抗体。参见,例如Jakobovits et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551-55(1993);Jakobovits et al,Nature 362:255-8(1993);onberg et al,Nature 368:856-9(1994);及美国专利号5,545,807;6,713,610;6,673,986;6,162,963;5,545,807;6,300,129;6,255,458;5,877,397;5,874,299;和5,545,806。

[0276] 非限制性示例性的方法还包括使用噬菌体展示文库来制备人抗体。参见,例如Hoogenboom et al.,J.Mol.Biol.227:381-8(1992);Marks et al,J.Mol.Biol.222:581-97(1991);和PCT公开号WO 99/10494。

[0277] 抗体恒定区

[0278] 在一些实施方案中,本文所述的人源化、嵌合或人抗体包含一个或多个人恒定区。在一些实施方案中,人重链恒定区具有选自IgA、IgG和IgD的同种型。在一些实施方案中,人轻链恒定区具有选自κ和λ的同种型。在一些实施方案中,本文所述的抗体包含人IgG恒定区,例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,抗体或Fc融合配偶体包含C237S突变,例如在IgG1恒定区中。在一些实施方案中,本文所述的抗体包含人IgG2重链恒定区。在一些这样的实施方案中,IgG2恒定区包含P331S突变,如美国专利号6,900,292中描述的。在

一些实施方案中,本文所述的抗体包含人IgG4重链恒定区。在一些这样的实施方案中,本文所述的抗体包含人IgG4恒定区中的S241P突变。参见,例如,Angal et al.Mol.Immunol.30(1):105-108(1993)。在一些实施方案中,本文所述的抗体包含人IgG4恒定区和人κ轻链。

[0279] 在一些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含人IgG1恒定区,其包含SEQ ID NO:57的重链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体,和SEQ ID NO:58的轻链恒定区序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性且包含其中的氨基酸变化(例如,插入、缺失和/或取代)的变体。

[0280] 重链恒定区的选择可以确定抗体是否将在体内具有效应子功能。在一些实施方案中,这样的效应子功能包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),并且可导致杀死抗体所结合的细胞。通常,包含人IgG1或IgG3重链的抗体具有效应子功能。

[0281] 在一些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是包含重链恒定区中的突变的IgG1抗体,其调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)(例如F243L、G236A、S239D/I332E、S239D/A330L/I332E、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L、S298A/E333A/K334A,或通过增加与Fcγ RIIIa的结合而具有增强的ADCC的无岩藻糖基化(非岩藻糖基化)抗体(例如,Fc区处的无岩藻糖基化N297))。

[0282] 在一些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段是包含重链恒定区中的突变的IgG1抗体,所述突变增加血清半衰期(例如T250Q/M428L、和M252Y/S254T/T256E)。

[0283] 在一些实施方案中,效应子功能是不期望的。例如,在一些实施方案中,效应子功能在炎性病况和/或自身免疫病症的治疗中可能不是期望的。在一些这样的实施方案中,选择或工程化人IgG4或IgG2重链恒定区。在一些实施方案中,IgG4恒定区包含S241P突变。

[0284] 本文所述的任何抗体可以通过任何合适的方法纯化。这样的方法包括但不限于使用亲和基质或疏水相互作用色谱。合适的亲和配体包括抗体结合的抗原和/或表位,以及结合抗体恒定区的配体。例如,蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和柱可用于结合恒定区并纯化抗体。

[0285] 在一些实施方案中,疏水相互作用色谱(HIC),例如丁基或苯基柱,也用于纯化一些多肽。许多纯化多肽的方法是本领域已知的。

[0286] 可替代地,在一些实施方案中,本文所述的抗体在无细胞系统中产生。非限制性示例性的无细胞系统描述在例如Sitaraman et al.,Methods Mol.Biol.498:229-44(2009);Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45(2004);Endo et al,Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)。

[0287] 9.编码本发明抗体的核酸分子

[0288] 本发明还提供了包含编码本文所述抗体的一条或多条链的多核苷酸的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子包含编码本文所述抗体的重链或轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,核酸分子包含编码本文所述抗体的重链的多核苷酸和编码本文所述抗体的轻链

的多核苷酸两者。在一些实施方案中,第一核酸分子包含编码重链的第一多核苷酸,并且第二核酸分子包含编码轻链的第二多核苷酸。

[0289] 在一些这样的实施方案中,重链和轻链从一个核酸分子或从两个单独的核酸分子表达为两个单独的多肽。在一些实施方案中,例如当抗体是scFv时,单一多核苷酸编码包含连接在一起的重链和轻链两者的单一多肽。

[0290] 在一些实施方案中,编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸包含编码前导序列的核苷酸序列,所述前导序列在翻译时位于重链或轻链的N末端。如上所述,前导序列可以是天然重链或轻链前导序列,或者可以是另一种异源前导序列。

[0291] 可以使用本领域常规的重组DNA技术构建核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是适于在选择的宿主细胞(例如哺乳动物细胞)中表达的表达载体。

[0292] 在一些实施方案中,编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸经密码子优化以在人细胞中表达。

[0293] 10.载体

[0294] 提供了包含编码本文所述抗体的重链和/或轻链的多核苷酸的载体。这样的载体包括但不限于DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方案中,载体包含编码重链的第一多核苷酸序列和编码轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施方案中,重链和轻链由载体表达为两个单独的多肽。在一些实施方案中,重链和轻链表达为单一多肽的一部分,例如当抗体是scFv时。

[0295] 在一些实施方案中,包含编码本文所述抗体的重链和/或轻链的多核苷酸的载体是表达载体(例如,哺乳动物、酵母、昆虫或细菌表达载体)。

[0296] 在一些实施方案中,第一载体包含编码重链的多核苷酸,并且第二载体包含编码轻链的多核苷酸。在一些实施方案中,将第一载体和第二载体以相似的量(例如,相似的摩尔量或相似的质量量)转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,将摩尔比或质量比在5:1至1:5之间的第一载体和第二载体转染到宿主细胞中。在一些实施方案中,使用质量比在1:1至1:5之间的编码重链的载体和编码轻链的载体。在一些实施方案中,使用质量比为1:2的的编码重链的载体和编码轻链的载体。

[0297] 在一些实施方案中,选择经优化用于在CHO或CHO衍生细胞或者NSO细胞中表达多肽的载体。示例性的这样的载体描述在例如Running Deer et al.,Biotechnol.Prog.20:880-889(2004)中。在一些实施方案中,选择载体用于在动物(包括人)中体内表达主题抗体。在一些这样的实施方案中,在以组织特异性方式起作用的一种或多种启动子的控制下表达一种或多种多肽。例如,肝特异性启动子描述在例如PCT公开号WO 2006/076288中。

[0298] 11.宿主细胞

[0299] 在多个实施方案中,本文所述的抗体的重链和/或轻链可以在原核细胞,例如细菌细胞中;或在真核细胞,例如真菌细胞(如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞中表达。这种表达可以例如根据本领域已知的程序进行。可用于表达多肽的示例性的真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PER.C6®细胞(Crucell);和NSO细胞。在一些实施方案中,本文所述抗体的重链和/或轻链可以在酵母中表达。参见例如美国公开号US2006/0270045 A1。在一些实施方案中,基于其对抗BTLA抗体的重链和/或轻链进行期望翻译后修饰的能力来选择特定真核

宿主细胞。例如,在一些实施方案中,CHO细胞产生多肽,其具有比在293细胞中产生的相同多肽更高的唾液酸化水平。

[0300] 将一种或多种核酸引入期望宿主细胞可以通过任何方法完成,包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性示例性的方法描述在例如Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,3rd ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)中。可以根据任何合适的方法在期望的宿主细胞中瞬时或稳定转染核酸。

[0301] 在一些实施方案中,可以根据任何合适的方法,在已经用编码多肽的一种或多种核酸分子进行工程化或转染的动物中体内产生一种或多种多肽。

实施例

[0302] 实施例1与食蟹猴BTLA交叉反应的人BTLA激动剂抗体的鉴定

[0303] 本实施例描述了两种小鼠前导抗体候选物-HFB6-4和HFB6-5的鉴定—基于其以与基准BTLA激动剂抗体(本文称为22B3)相似或更大的程度抑制抗IgM介导的B细胞增殖的能力(图2A),以及其不能逆转HVEM介导的T细胞抑制(图2B)。因此,这些小鼠抗体有时被称为“激动剂非阻断剂”,因为它们能够结合BTLA并启动BTLA下游的免疫抑制功能,以及当与BTLA结合时它们不能取代BTLA的天然配体(即HVEM)。

[0304] 在图1中,将过表达人BTLA的HEK293细胞和过表达食蟹猴BTLA的Expi293细胞与不同浓度的抗BTLA亲本抗体一起孵育。通过流式细胞术,用AF647缀合的抗人IgG Fc二级抗体定量结合靶细胞的抗BTLA抗体。发现HFB6-4和HFB6-5亲本抗体以个位数nM亲和力结合人BTLA和食蟹猴BTLA。

[0305] 在图2A中,使用EasySep™人B细胞分离试剂盒从健康供体PBMC分离原代B细胞,并用CFSE进行标记。在100nM抗BTLA抗体或对照抗体的存在下,用10μg/mL的抗IgM刺激B细胞。在4天之后,通过CFSE稀释(%CFSE1o),相对于未刺激的B细胞来定量B细胞增殖。

[0306] 在HVEM-BTLA阻断报告子测定法中,将被工程化以表达TCR活化剂(TCRα)和BTLA配体HVEM的CHO细胞系与表达由NFAT结合启动子驱动的荧光素酶报告子和BTLA的Jurkat报告子细胞系共培养。应用基准抗BTLA阻断性抗体(在本文中称为JS004)可以逆转HVEM介导的T细胞抑制,但不能逆转HFB6-4和HFB6-5(图2B)。

[0307] 基于分选实验(binning experiments),进一步证实HFB6-4和22B3表位在BTLA/HVEM结合界面处重叠。因此,特别令人惊讶的是,尽管结合明显地相同或基本上重叠的表位,但是不同的抗体似乎具有基本上不同的生物活性。

[0308] 特别地,在ELISA分选实验中,用5μg/mL的每种捕获抗体(HFB6-4或22B3)或配体(重组Fc标签化的HVEM)涂布ELISA板。在封闭之后,将重组his-标签化的BTLA(BTLA-his)与溶液中过量(30μg/mL)的竞争抗体或同种型对照抗体(MGO53)一起施用。用HRP缀合的抗his二级抗体检测捕获的BTLA-his。相对于使用MGO53作为竞争抗体,定量BTLA-his捕获抑制的百分比(参见下表)。

[0309]

		捕获抗体/配体（5μg/ml）		
		HFB6-4	22B3	HVEM-Fc
抗体溶液（30μg/ml）	HFB6-4	102	67	84
	22B3	104	87	93
	MGO53（C-）	0	0	0

[0310] 数据显示HFB6-4阻止重组BTLA(BTLA-his)与固定化的22B3结合,反之亦然,并且阻止与重组HVEM(HVEM-Fc)结合。这些数据表明HFB6-4和22B3表位在BTLA/HVEM结合界面处重叠。

[0311] 实施例2hBTLA激动剂抗体HFB6-4和HFB6-5抑制T细胞活化

[0312] 该实验证实分离的HFB6-4和HFB-6-5抗体是功能性hBTLA激动剂,如通过其抑制T细胞活化的能力所证明的。在该测定法中,首先,在具有或不具有抗-CD3抗体的情况下,将在细胞表面上表达Fcγ RIIb的CHO细胞与测试抗体(例如,HFB6-4或HFB6-5(或阳性对照或阴性对照抗体))一起孵育,使得测试抗体(和抗CD3抗体,如果加入的话)经由Fc区与表面Fcγ RIIb结合。

[0313] 然后,将测试抗体覆盖的CHO细胞与表达表面TCR和BTLA的Jurkat报告子细胞一起孵育。当抗CD3抗体也存在于CHO细胞上时,在TCR被抗CD3抗体活化之后,BTLA激动剂抗体(例如HFB6-4和HFB6-5)接合BTLA并刺激下游BTLA信号传导,从而抑制TCR信号传导,以通过在报告子细胞中在TCR-下游NFAT启动子的转录控制下由荧光素酶报告子基因测量的。

[0314] 当没有加入抗CD3抗体以刺激TCR活化时,在阴性对照中未检测到荧光素酶活性。在不结合BTLA的对照抗体MGO的存在下,荧光素酶活性未减弱。

[0315] 相比之下,基准BTLA激动剂抗体22B3以剂量依赖性方式降低/抑制TCR介导的荧光素酶活性。HFB6-4和HFB6-5两者以及另一种BTLA激动剂抗体H6S8-9A10A抑制TCR介导的荧光素酶活性至比基准抗体22B3更大的程度。参见图3。

[0316] 数据表明,HFB6-4、HFB6-5和H6S8-9A10A在抑制TCR信号传导方面与基准激动剂抗体22B3至少同样良好(如果不是更好)。

[0317] 实施例3 hBTLA激动剂抗体HFB6-4/HFB6-5抑制B细胞增殖

[0318] 本实施例证实在所有测试供体中,BTLA激动剂抗体HFB6-4和HFB6-5抑制原代B细胞增殖的程度与基准激动剂抗体22B3相当。

[0319] 使用EasySep™人B细胞分离试剂盒从健康供体PBMC分离原代B细胞,并用CFSE进行标记。在抗BTLA抗体或对照抗体的存在下,用10μg/mL的抗IgM刺激B细胞。在4天之后,通过通过CFSE稀释(%CFSE1o),相对于未刺激的B细胞来定量B细胞增殖。

[0320] HFB6-4和HFB6-5将来自3个不同供体的原代B细胞的增殖抑制至与基准22B3抗体相似的水平(供体015和供体017)或更好(供体019)(图4,左图)。增加HFB6-4和HFB6-5的浓度也导致对原代B细胞增殖的抑制增加(图4,右图)。

[0321] 实施例4人源化HFB6-4/HFB6-5变体的结合和交叉反应性

[0322] 该实验证实,HFB6-4和HFB6-5的人源化变体都与hBTLA结合,并与食蟹猴BTLA以高

亲和力交叉反应,如同亲本HFB6-4和HFB6-5抗体。

[0323] 简言之,基于标准人源化方案,产生了HFB6-4和HFB6-5的24种各自人源化变体(例如,HFB6-4-hz1至hz24和HFB6-5-hz1至hz24),并测试所得的人源化变体以鉴定hBTLA和cynoBTLA的高亲和力结合物。

[0324] 将过表达人BTLA的HEK293细胞和过表达食蟹猴BTLA的Expi293细胞与不同浓度的人源化抗BTLA抗体一起孵育。通过流式细胞术,用AF647缀合的抗人IgG Fc二级抗体来定量结合靶细胞的抗BTLA抗体。参见图5。

[0325] 结果表明,HFB6-4和HFB6-5人源化变体以个位数nM亲和力结合人和食蟹猴BTLA。

[0326] 实施例5HFB6-4和HFB6-5人源化变体抑制B细胞增殖和T细胞报告子活性

[0327] 将选择的HFB6-4和HFB6-5人源化变体在抑制B细胞增殖和T细胞报告子活性中的能力与亲本抗体和基准对照进行比较。

[0328] 在B细胞增殖抑制测定法中,使用EasySep™人B细胞分离试剂盒从来自健康供体PBMC中分离原代B细胞,并用CFSE进行标记。在1μg/mL和10μg/mL抗BTLA抗体或对照抗体存在下,用10μg/mL的抗IgM刺激B细胞。在4天之后,通过CFSE稀释(%CFSE1o),相对于未刺激的B细胞来定量B细胞增殖。

[0329] 在T细胞抑制报告子测定法中,使用工程化以表达Fc γ RIIb的CHO细胞系来交联抗CD3和抗BTLA抗体。在Fc受体交叉之后,抗BTLA激动剂抗体可以抑制在表达BTLA和NFAT荧光素酶报告子的Jurkat报告子细胞系中由TCR-NFAT途径活化驱动的荧光素酶报告子信号。

[0330] 结果显示,选择的HFB6-4和HFB6-5人源化变体在抑制B细胞增殖(图6A)和T细胞报告子活性(图6B)方面维持亲本HFB6-4和HFB6-5活性。

[0331] 实施例6所选择的HFB6-4和HFB6-5人源化变体在野生型C57BL/6小鼠中的期望的PK特征

[0332] 为了检查HFB6-4和HFB6-5人源化变体的药代动力学特征,将单剂量(10mg/kg)的选择的变体静脉内注射到野生型C57BL/6小鼠中。在1小时、24小时和72小时,抽取血液,并通过ELISA测量所选择的抗体的血浆浓度。

[0333] 数据显示,当以10mg/kg单剂量施用时,所选择的人源化变体,例如HFB6-4人源化变体HFB6-4hz1-hG1、HFB6-4hz6-hG1和HFB6-5人源化变体HFB6-5hz12-hG1、HFB6-5hz19-hG1和HFB6-5hz24-hG1在小鼠中显示出延长的暴露。

[0334] 实施例7所选择的人源化变体的良好可开发性

[0335] 检查所选择的HFB6-4和HFB6-5的人源化变体的可开发性,并且变体在多种测定法中显示出良好的可开发性特征,例如熔融温度测定法、在4℃和37℃的稳定性以及在低pH(例如pH3.8)的稳定性。

[0336] 实施例8在hPBMC-NSG急性GvHD模型中的治疗功效

[0337] 该实施例证实,主题BTLA激动剂抗体可有效抑制急性GvHD(移植物抗宿主病)的NSG小鼠模型中的免疫反应。

[0338] 在该实验中,在急性移植物抗宿主病(GvHD)的异种人源化小鼠模型中评估主题BTLA激动剂抗体的体内功效。该小鼠模型是一种由亚致死照射的NSG小鼠中人PBMC的接合所诱导的T细胞介导的疾病。实验方案的示意图图示在图8A中。

[0339] 图8B显示了更详细的实验设计,包括每个处理组的剂量和待测量的读取。4个治疗

组各具有8只小鼠。其包括PBS阴性对照组(G1)、IgG1同种型匹配的对照组(MGO53-hG1、G2)、BTLA激动剂抗体(HFB6-4-hz1-hG1)组(G3)和22B3基准对照组(G4)。

[0340] 初步数据显示,在hPBMC接种后第14天,与同种型匹配的对照组G2相比,用主题BTLA激动剂抗体HFB6-4-hz1-hG1处理的G3小鼠显示出hCD45+免疫细胞百分比的统计学显著降低。同时,基准组G4在同一时间点似乎没有统计学上显著的差异(如果确实存在任何差异的话)。参见图8E。

[0341] 此外,图8F中的Kaplan-Meier存活曲线显示,在第28天的实验结束时,超过85%的用主题BTLA激动剂抗体HFB6-4-hz1-hG1处理的G3小鼠存活。这在统计学上显著高于PBS对照组(G1)和同种型匹配的MGO53-hG1对照组(G2)的<20%存活率。

[0342] 同时,在通过22B3基准抗体处理的G4对照处理组中,存活率在第15天之后稳定下降,使得少于40%的经处理的小鼠存活。G3和G4组之间的存活率差异也是统计学显著的。

[0343] 此外,与PBS对照组G1、同种型匹配的对照组G2和22B3基准组G4相比,HFB6-4hz1-hG1治疗组(G3)显示出显著降低的总疾病评分(参见图8C)和相对对照体重(RCBD)减轻(图8D)。

[0344] 与更高剂量的对照抗体22B3相比,在更小剂量的HFB6-4hz1-hG1下,在相同的hPBMC-NSG急性GvHD模型中也评估了HFB6-4hz1-hG1的剂量应答功效(图8G)。特别地,用1、3、10mg/kg的HFB6-4hz1-hG1的处理均导致比10mg/kg的22B3-hG4和10mg/kg的HFB6-4hz1(HFB6-4hz1-hG4P)的IgG4形式更大的存活益处。即使以IgG4形式,在10mg/kg下,HFB6-4hz1-hG4P也优于22B3-hG4P。此外,HFB6-4hz1-hG1(10mg/kg)处理证实相比于阿巴西普(一种对于人急性GvHD的批准预防剂)(6.13mg/kg,摩尔等量于10mg/kg抗体)的长期存活益处。这些数据显示,在实验条件下,在这种急性GvHD小鼠模型中,主题BTLA激动剂抗体HFB6-4-hz1-hG1优于基准22B3激动剂抗体,至少在整个处理过程中具有更好的治疗功效、总体延长和更好的存活率以及降低的毒性。

[0345] 总体而言,上述数据证实,主题BTLA激动剂抗体,例如HFB6-4和HFB6-5及其衍生的人源化变体,对人和cynoBTLA具有个位数结合亲和力;这些抗体的多种人源化变体(例如HFB6-4hz1-hG1)在B细胞增殖抑制和T细胞报告子测定法中保留亲本抗体功能;所述抗体在野生型小鼠中显示出良好的的PK特征,支持q3d或更低频率施用以进行功效评估。此外,在急性GvHD的体内hPBMC-NSG小鼠模型中,主题人源化变体HFB6-4hz1-hG1被证明比基准激动剂抗体22B3更有效且毒性更低,即使在对照抗体的剂量的十分之一(1/10)或三分之一(1/3)。

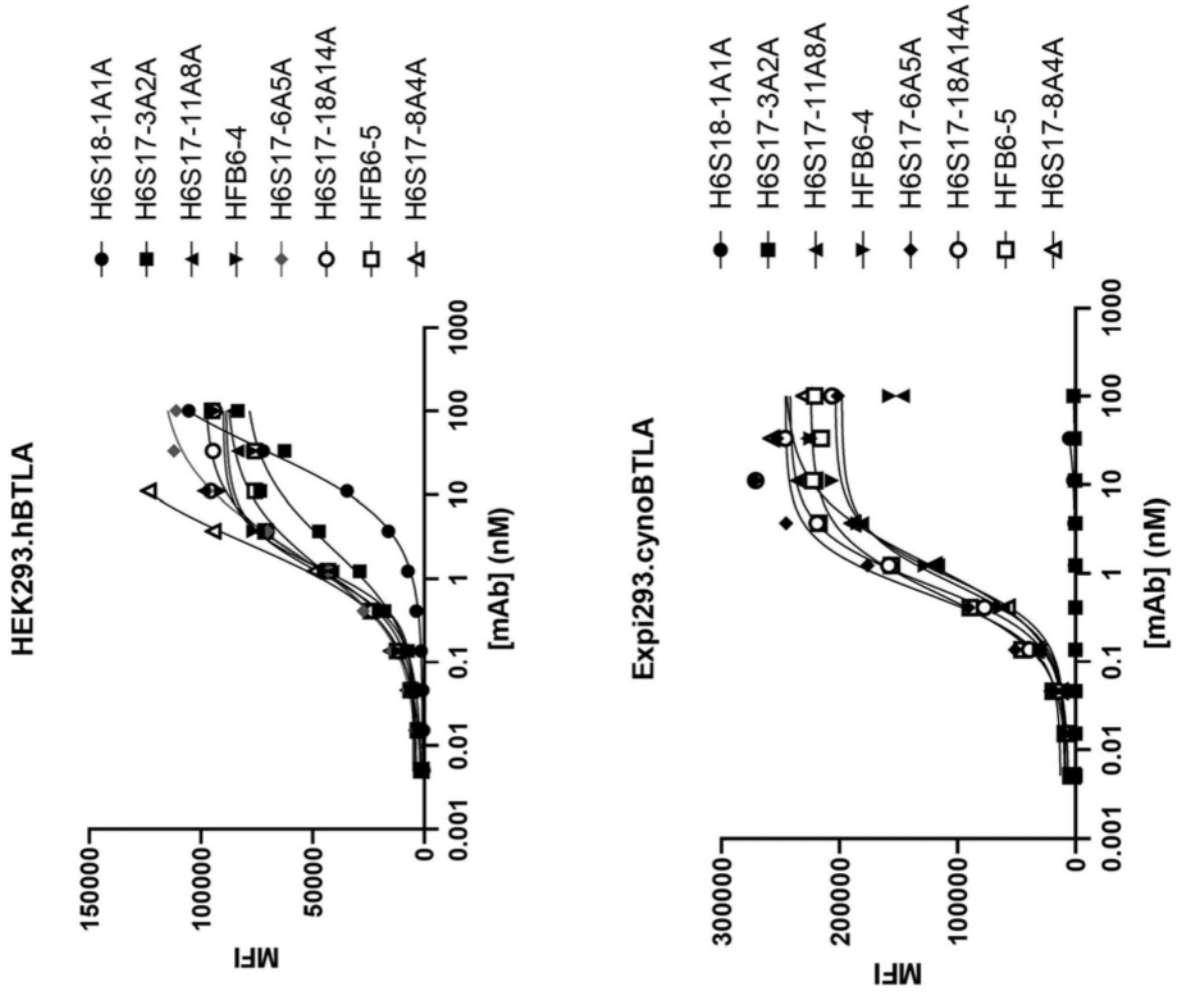

HEK293.hBTLA
H6S18-1A1A
H6S17-3A2A
H6S17-11A8A
HFB6-4
H6S17-6A5A
H6S17-18A14A
HFB6-5
H6S17-8A4A
MFI
150000
100000
50000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[mAb] (nM)
Expi293.cynoBTLA
H6S18-1A1A
H6S17-3A2A
H6S17-11A8A
HFB6-4
H6S17-6A5A
H6S17-18A14A
HFB6-5
H6S17-8A4A
MFI
300000
200000
100000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[mAb] (nM)

图1

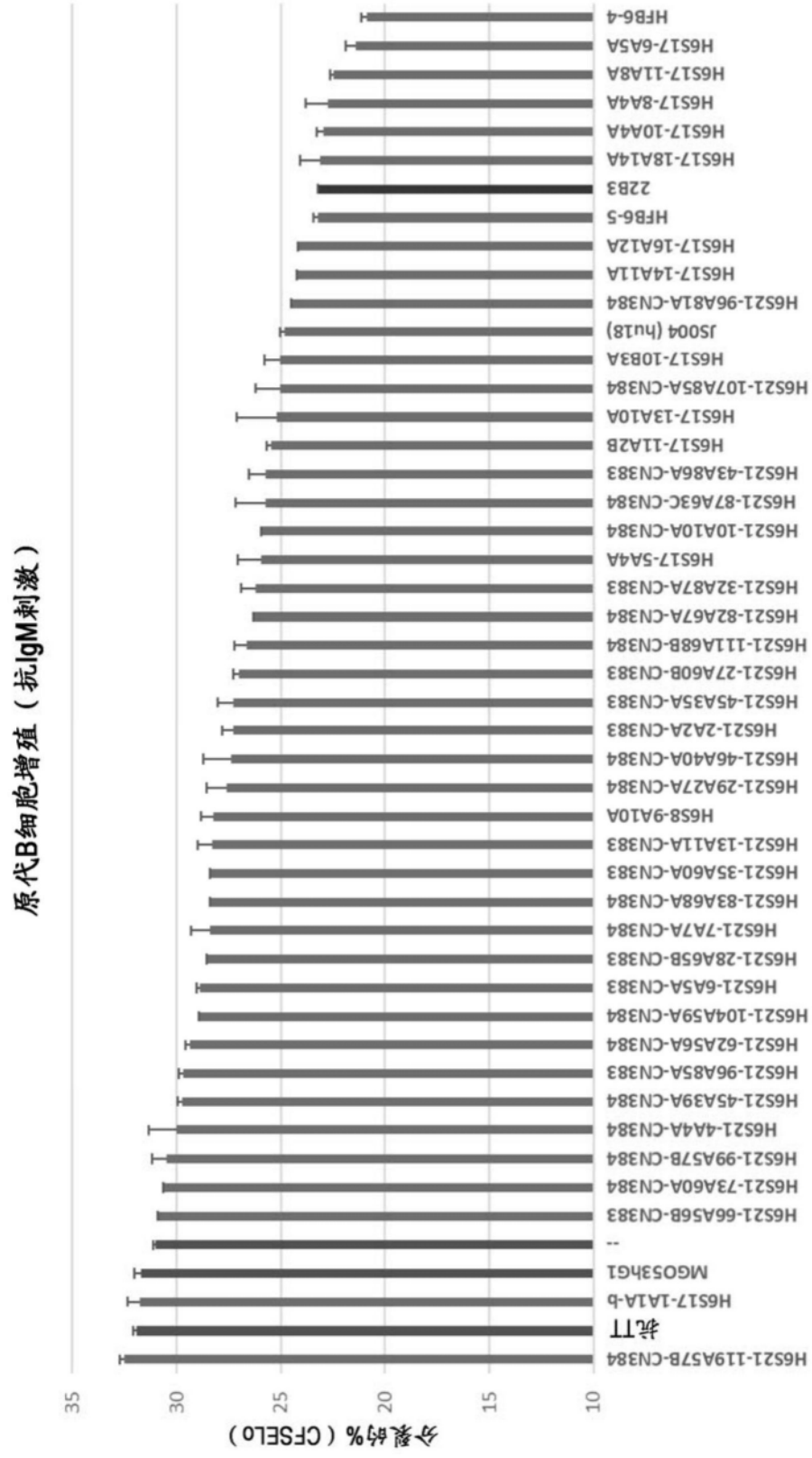

原代B细胞增殖（抗IgM刺激）
分裂的%（CFSElo）
35
30
25
20
15
10
H6S21-119A57B-CN384
抗TT
H6S17-1A1A-b
MGOS3hG1
--
H6S21-66A56B-CN383
H6S21-73A60A-CN384
H6S21-99A57B-CN384
H6S21-4A4A-CN384
H6S21-45A39A-CN384
H6S21-96A85A-CN383
H6S21-62A56A-CN384
H6S21-104A59A-CN384
H6S21-6A5A-CN383
H6S21-28A65B-CN383
H6S21-7A7A-CN384
H6S21-83A68A-CN384
H6S21-35A60A-CN383
H6S21-13A11A-CN383
H6S8-9A10A
H6S21-29A27A-CN384
H6S21-46A40A-CN384
H6S21-2A2A-CN383
H6S21-45A35A-CN383
H6S21-27A60B-CN383
H6S21-111A68B-CN384
H6S21-82A67A-CN384
H6S21-32A87A-CN383
H6S17-5A4A
H6S21-10A10A-CN384
H6S21-87A63C-CN384
H6S21-43A86A-CN383
H6S17-11A2B
H6S17-13A10A
H6S21-107A85A-CN384
H6S17-10B3A
J5004 (hu18)
H6S21-96A81A-CN384
H6S17-14A11A
H6S17-16A12A
HFB6-5
228B3
H6S17-18A14A
H6S17-10A4A
H6S17-8A4A
H6S17-11A8A
H6S17-6A5A
HFB6-4

图2A

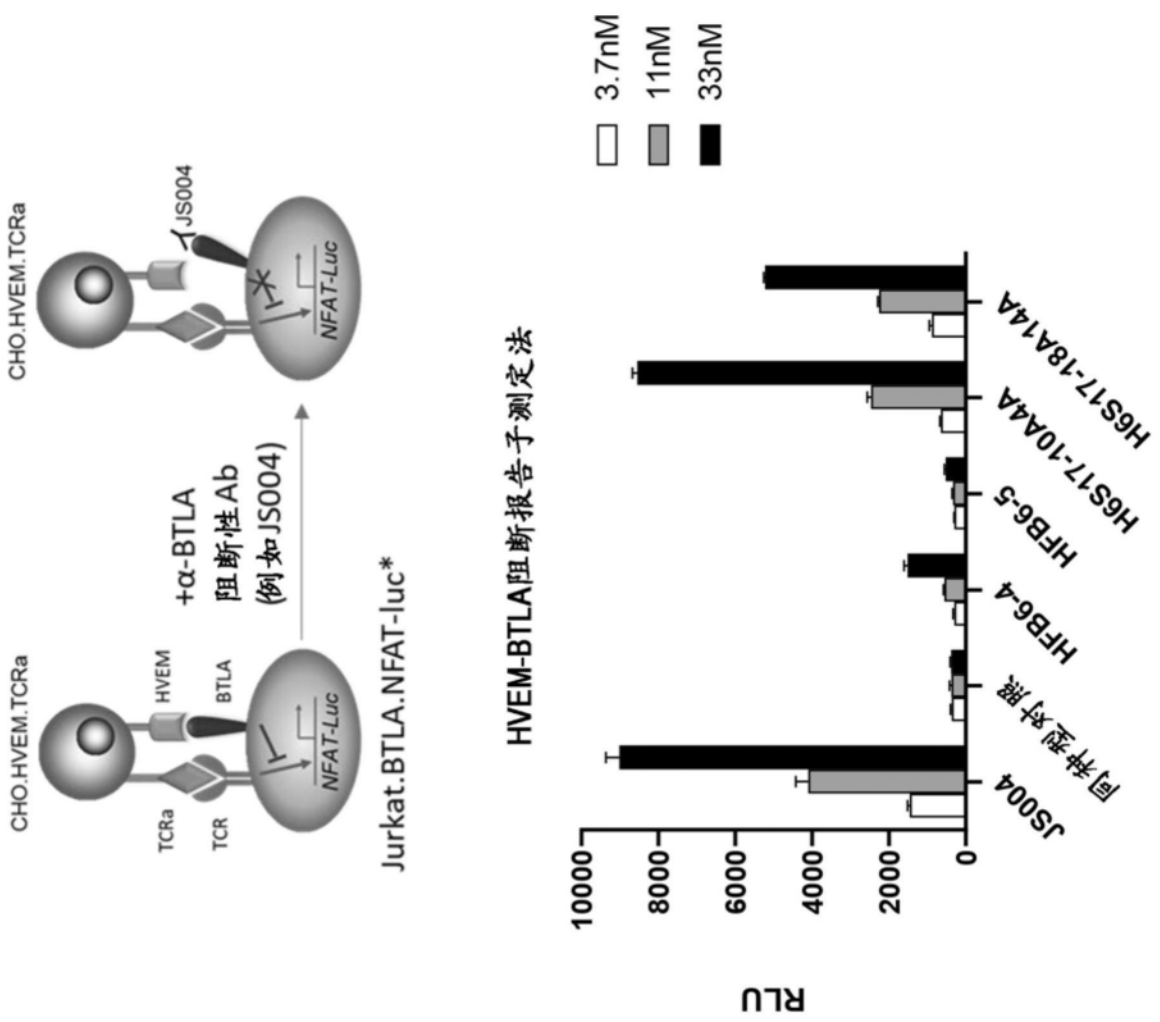

CHO.HVEM.TCRa
JS004
NFAT-Luc
+α-BTLA
阻断性Ab
(例如JS004)
CHO.HVEM.TCRa
HVEM
BTLA
TCRa
TCR
NFAT-Luc
Jurkat.BTLA.NFAT-luc*
HVEM-BTLA阻断报告子测定法
3.7nM
11nM
33nM
RLU
10000
8000
6000
4000
2000
0
JS004
同种型对照
HFB6-4
HFB6-5
H6S17-10A4A
H6S17-18A14A

图2B

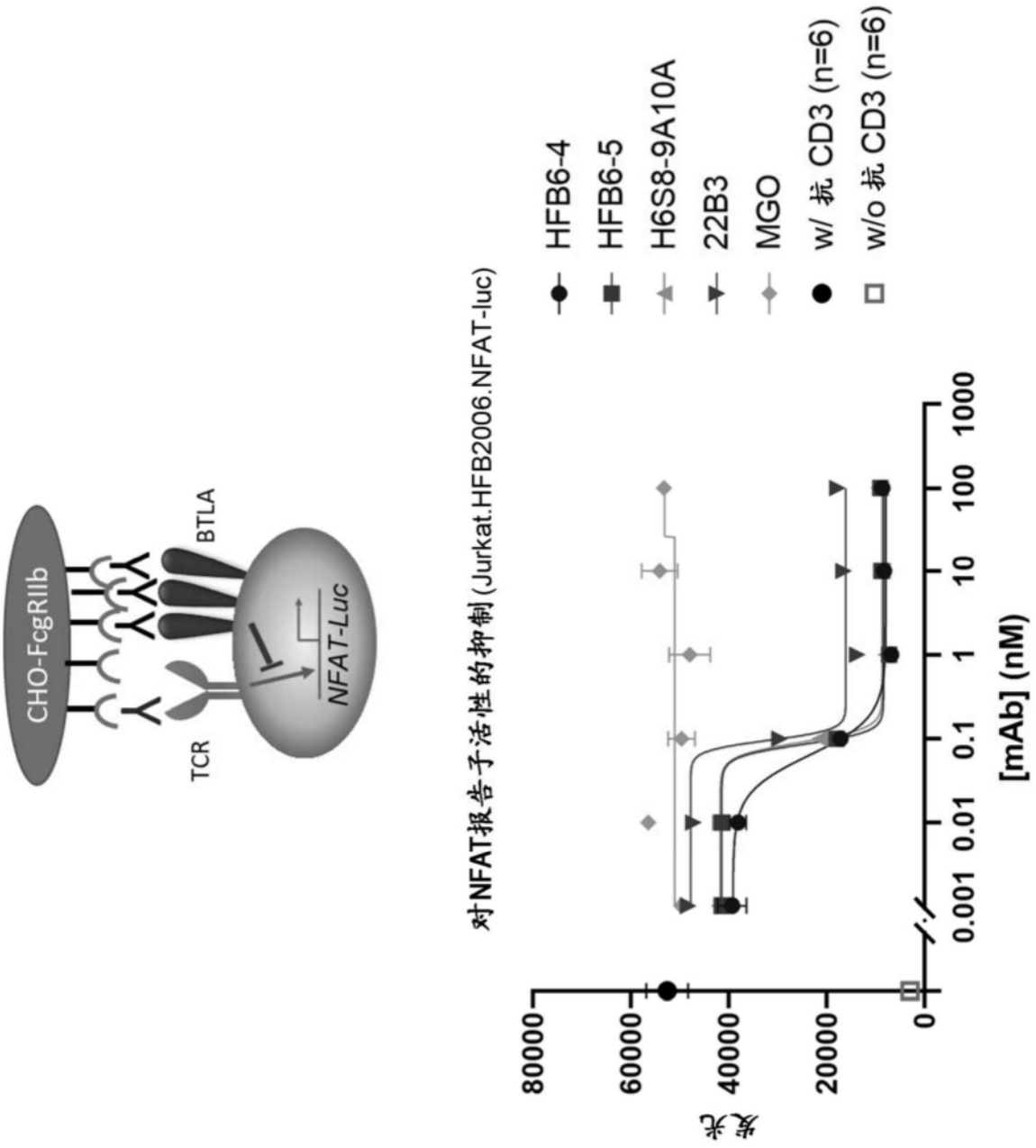

CHO-FcgRIIb
BTLA
TCR
NFAT-Luc
对NFAT报告子活性的抑制(Jurkat.HFB2006.NFAT-luc)
HFB6-4
HFB6-5
H6S8-9A10A
22B3
MGO
w/ 抗 CD3 (n=6)
w/o 抗 CD3 (n=6)
80000
60000
40000
20000
0
发光
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
[mAb] (nM)

图3

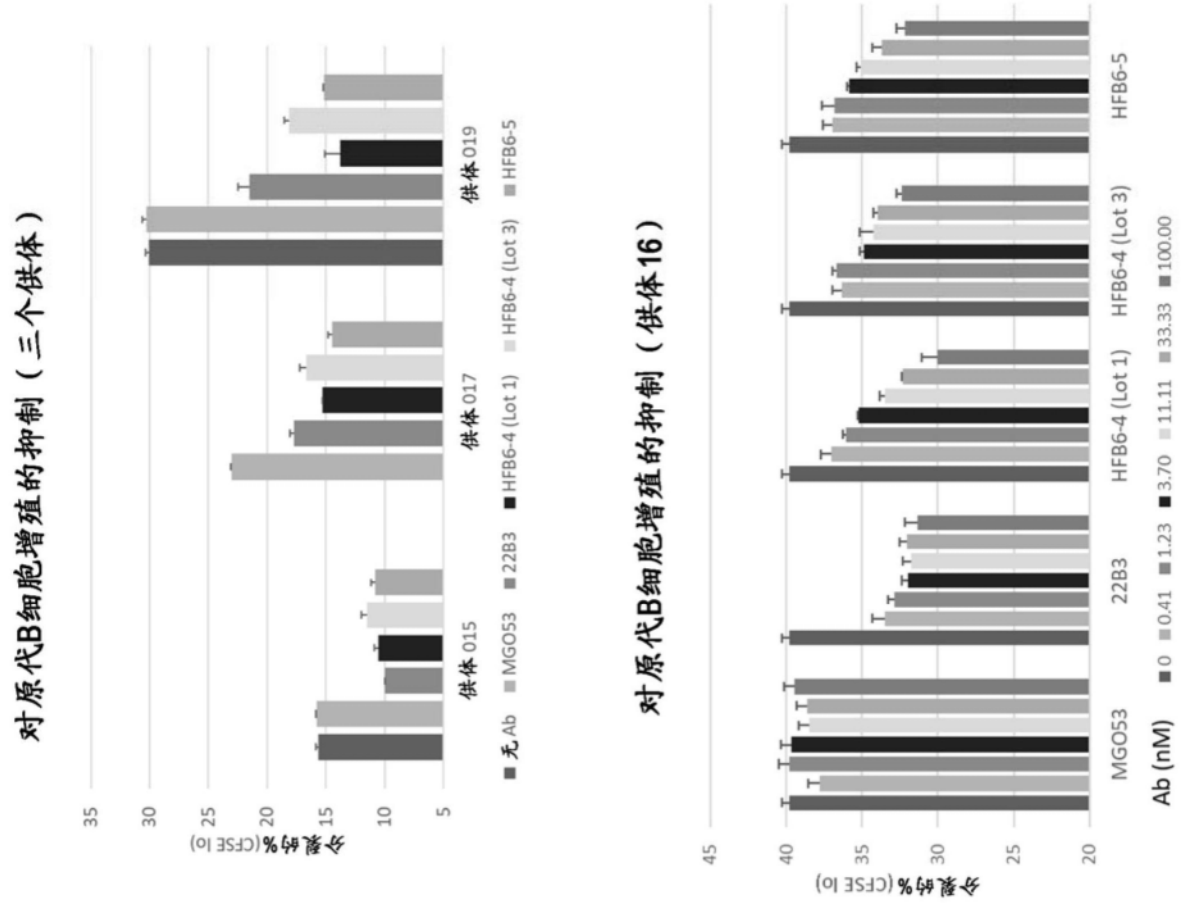

对原代B细胞增殖的抑制（三个供体）
分裂的%(CFSE lo)
35
30
25
20
15
10
5
供体 015
供体 017
供体 019
无Ab
MGO53
22B3
HFB6-4 (Lot 1)
HFB6-4 (Lot 3)
HFB6-5
对原代B细胞增殖的抑制（供体16）
分裂的%(CFSE lo)
45
40
35
30
25
20
MGO53
22B3
HFB6-4 (Lot 1)
HFB6-4 (Lot 3)
HFB6-5
Ab (nM)
0
0.41
1.23
3.70
11.11
33.33
100.00

图4

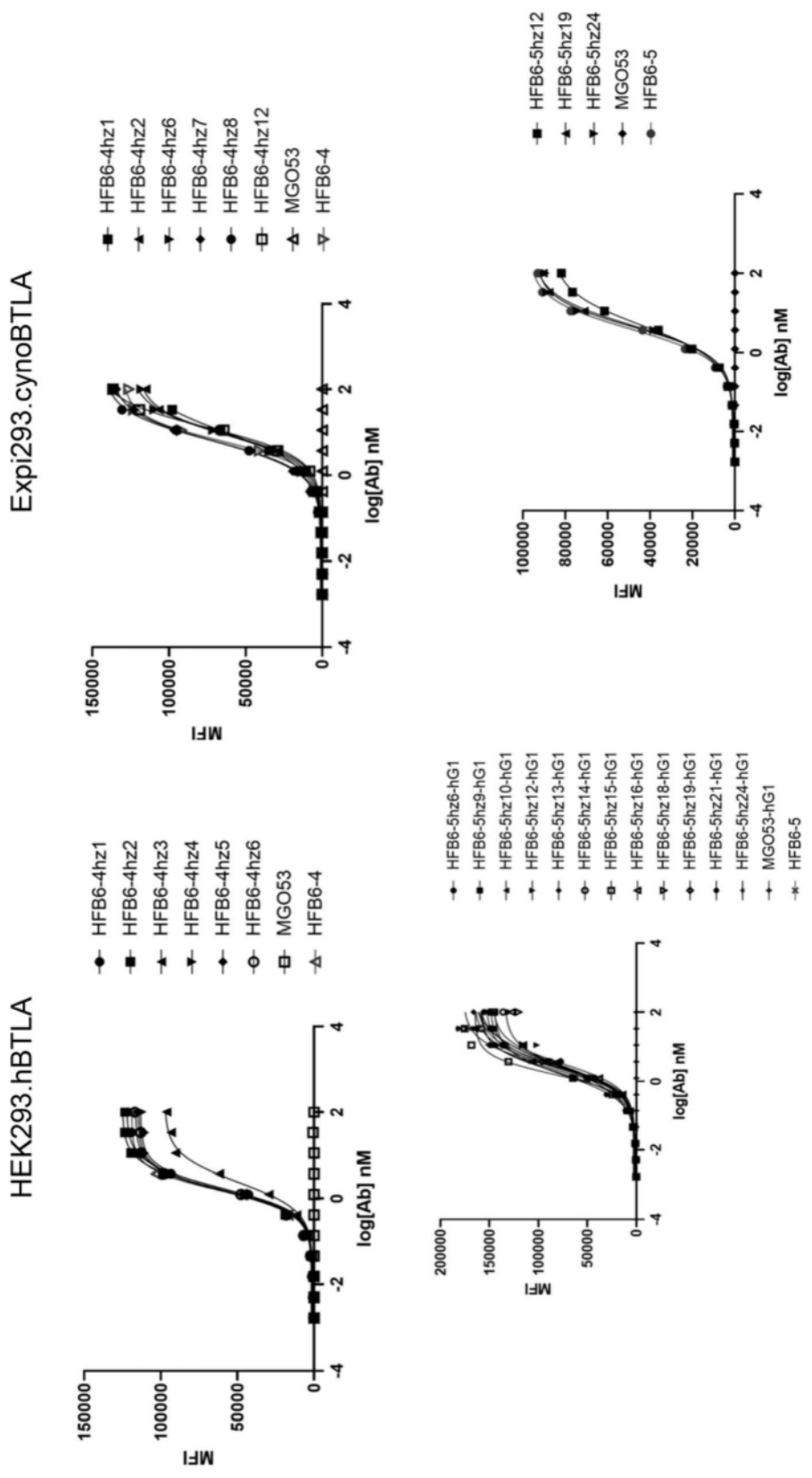

Expi293.cynoBTLA
HFB6-4hz1
HFB6-4hz2
HFB6-4hz6
HFB6-4hz7
HFB6-4hz8
HFB6-4hz12
MGO53
HFB6-4
MFI
log[Ab] nM
HFB6-5hz12
HFB6-5hz19
HFB6-5hz24
MGO53
HFB6-5
HEK293.hBTLA
HFB6-4hz1
HFB6-4hz2
HFB6-4hz3
HFB6-4hz4
HFB6-4hz5
HFB6-4hz6
MGO53
HFB6-4
HFB6-5hz6-hG1
HFB6-5hz9-hG1
HFB6-5hz10-hG1
HFB6-5hz12-hG1
HFB6-5hz13-hG1
HFB6-5hz14-hG1
HFB6-5hz15-hG1
HFB6-5hz16-hG1
HFB6-5hz18-hG1
HFB6-5hz19-hG1
HFB6-5hz21-hG1
HFB6-5hz24-hG1
MGO53-hG1
HFB6-5

图5

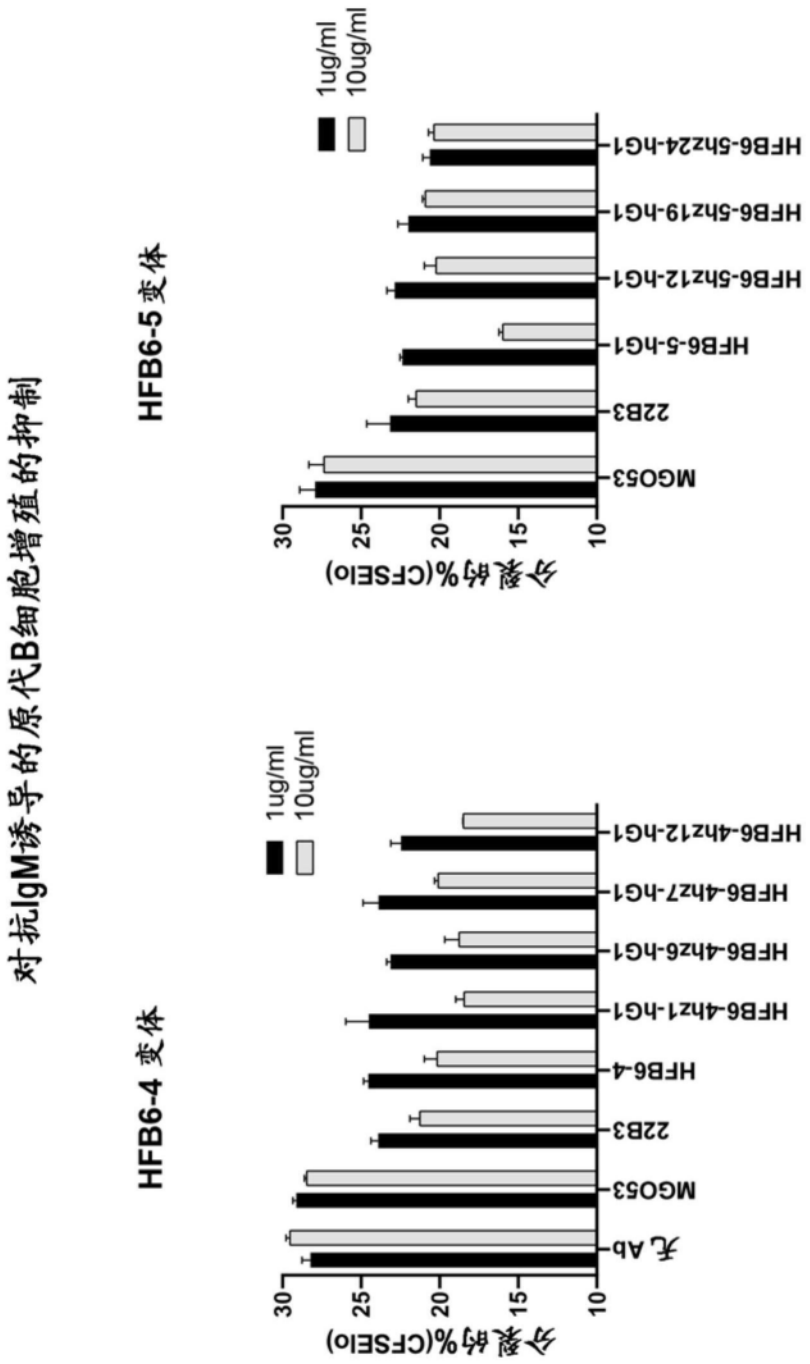

对抗IgM诱导的原代B细胞增殖的抑制
HFB6-4 变体
HFB6-5 变体
1ug/ml
10ug/ml
分裂的%(CFSElo)
30
25
20
15
10
无 Ab
MGO53
22B3
HFB6-4
HFB6-4hz1-hG1
HFB6-4hz6-hG1
HFB6-4hz7-hG1
HFB6-4hz12-hG1
HFB6-5-hG1
HFB6-5hz12-hG1
HFB6-5hz19-hG1
HFB6-5hz24-hG1

图6A

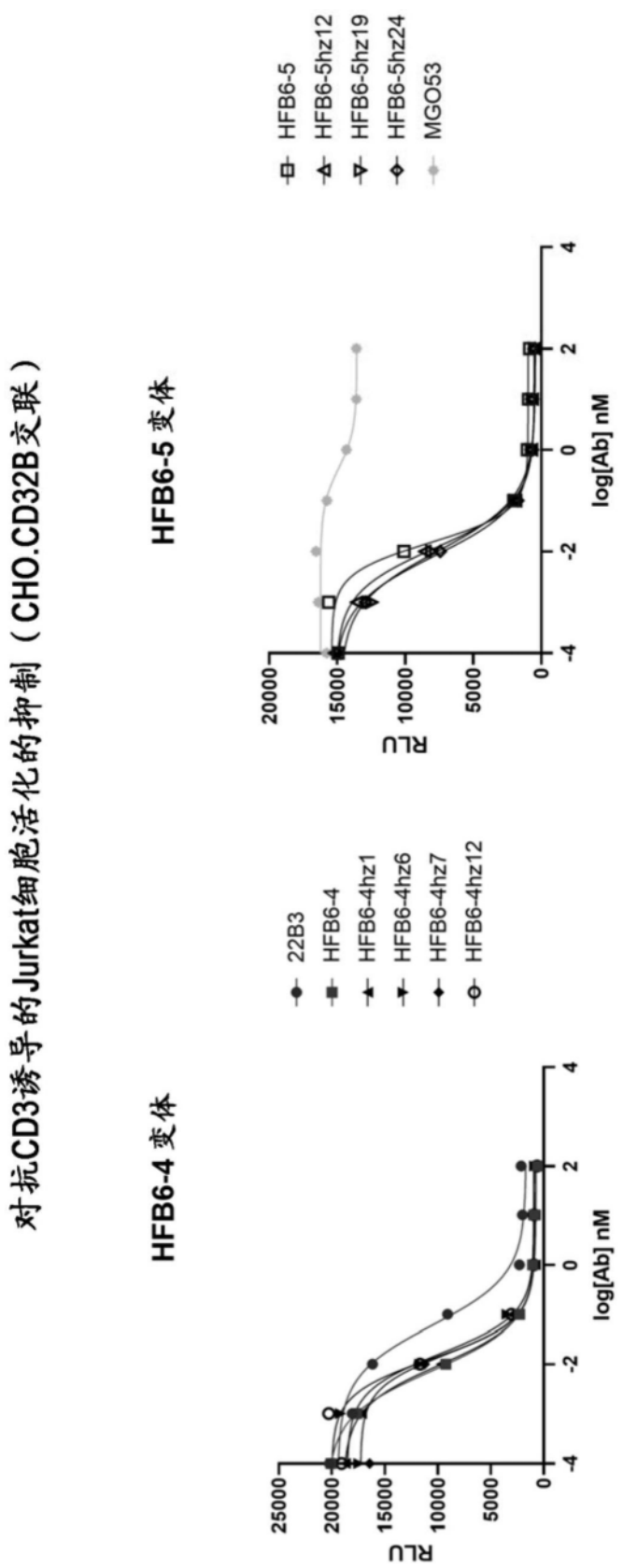

对抗CD3诱导的Jurkat细胞活化的抑制（CHO.CD32B交联）
HFB6-4 变体
22B3
HFB6-4
HFB6-4hz1
HFB6-4hz6
HFB6-4hz7
HFB6-4hz12
RLU
log[Ab] nM
HFB6-5 变体
HFB6-5
HFB6-5hz12
HFB6-5hz19
HFB6-5hz24
MGO53
RLU
log[Ab] nM

图6B

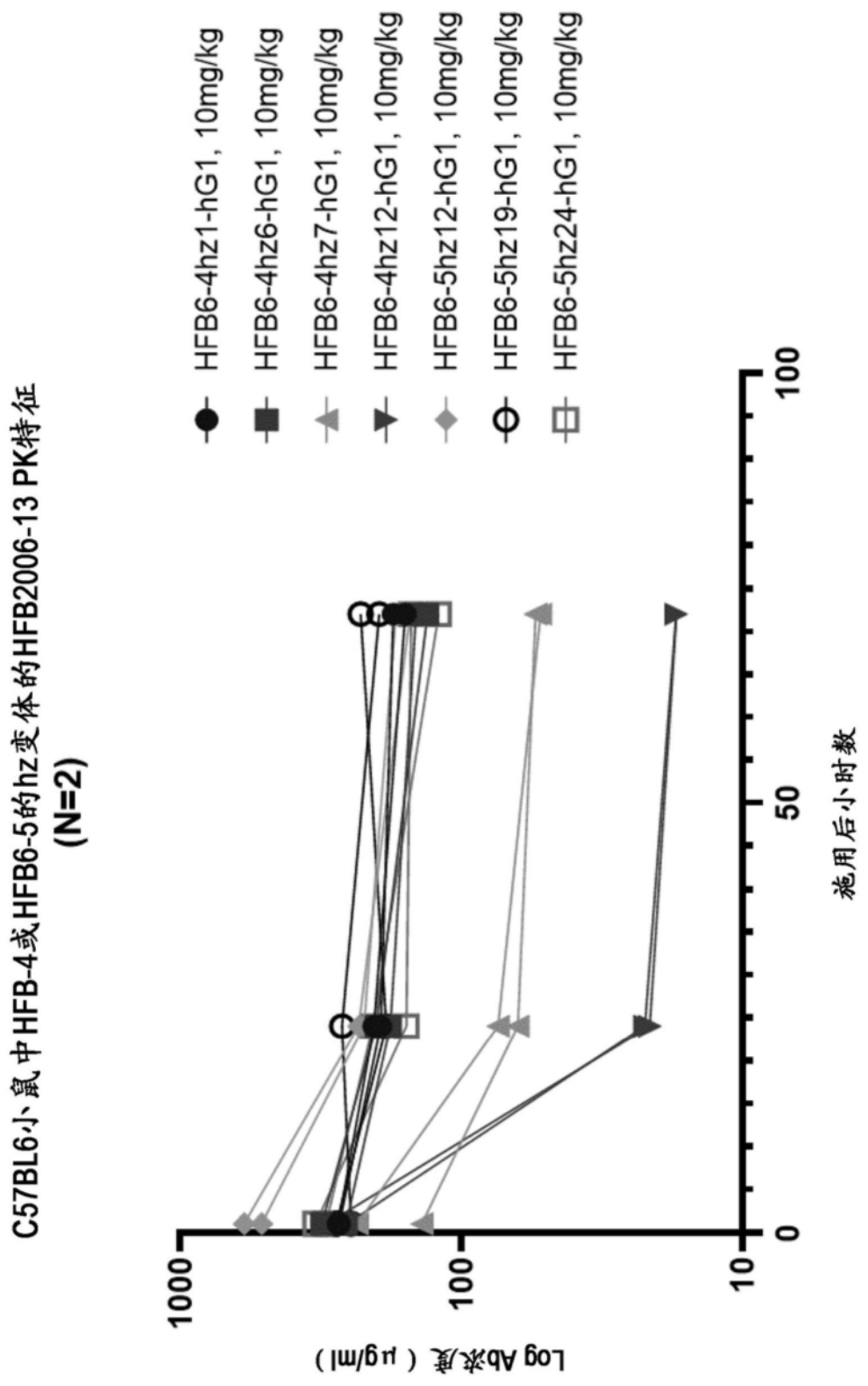

C57BL6小鼠中HFB-4或HFB6-5的hz变体的HFB2006-13 PK特征
(N=2)
HFB6-4hz1-hG1, 10mg/kg
HFB6-4hz6-hG1, 10mg/kg
HFB6-4hz7-hG1, 10mg/kg
HFB6-4hz12-hG1, 10mg/kg
HFB6-5hz12-hG1, 10mg/kg
HFB6-5hz19-hG1, 10mg/kg
HFB6-5hz24-hG1, 10mg/kg
Log Ab浓度 (μg/ml)
1000
100
10
0
50
100
施用后小时数

图7

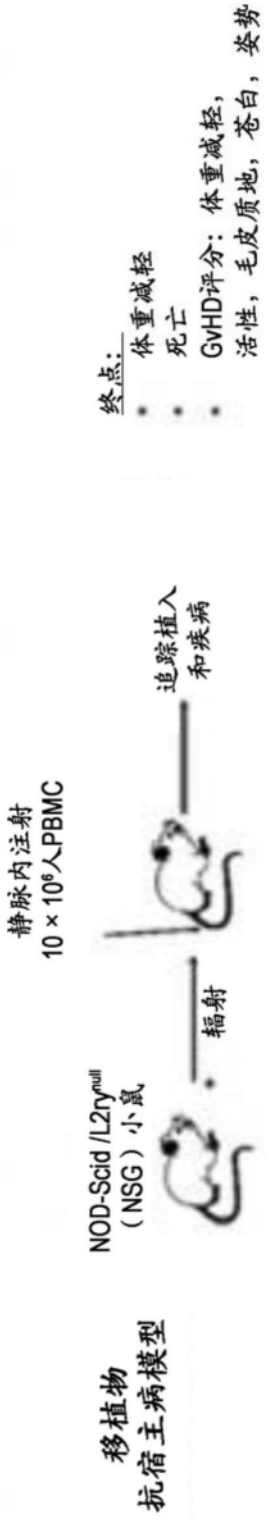

移植物
抗宿主病模型
NOD-Scid /IL2rγnull
（NSG）小鼠
辐射
静脉内注射
10 × 10⁶人PBMC
追踪植入
和疾病
终点：
体重减轻
死亡
GvHD评分：体重减轻，
活性，毛皮质地，苍白，姿势

图8A

4组，n=8/组，10 mg/kg, BIW*6
G1. PBS
G2. TT-hG1
G3. HFB6-4hz1-hG1
G4. 22B3
读取
1. 体重
2. 疾病评分
3. hPBMC接种后第14天和第28天淋巴细胞中的hCD45+细胞%
4. 存活率

图8B

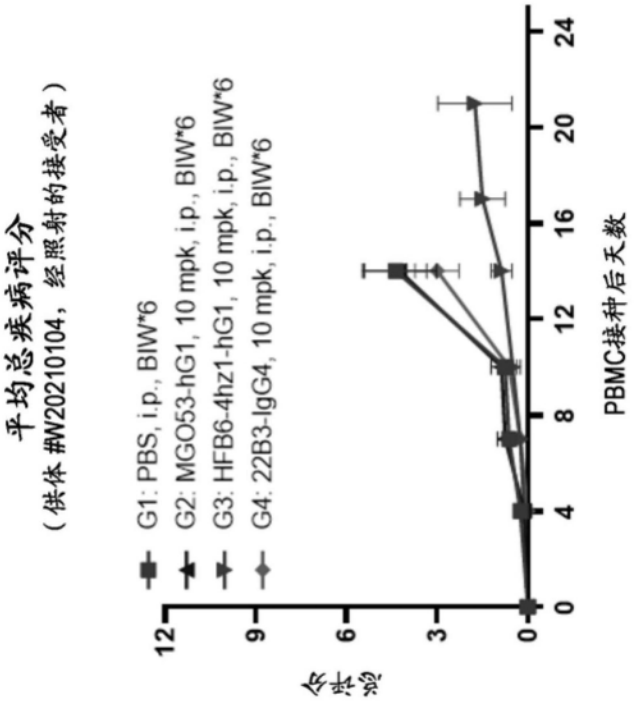

平均总疾病评分
（供体 #W20210104，经照射的接受者）
G1: PBS, i.p., BIW*6
G2: MGO53-hG1, 10 mpk, i.p., BIW*6
G3: HFB6-4hz1-hG1, 10 mpk, i.p., BIW*6
G4: 22B3-IgG4, 10 mpk, i.p., BIW*6
12
9
6
3
0
0
4
8
12
16
20
24
PBMC接种后天数

图8C

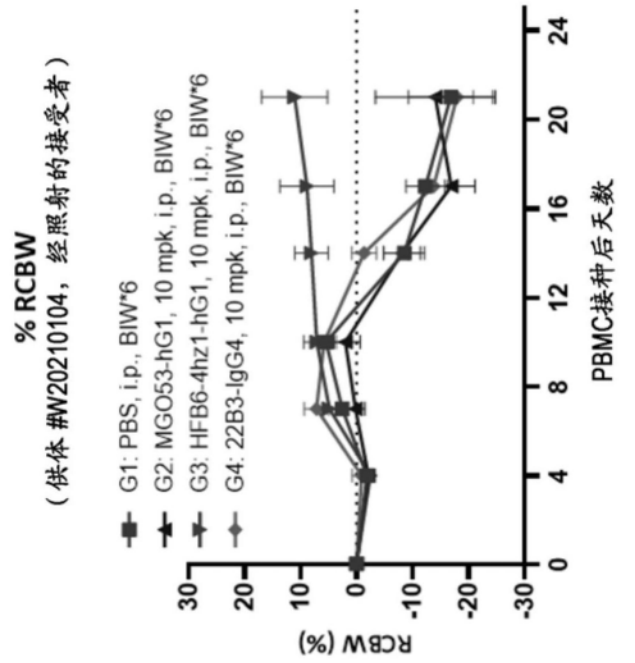

% RCBW
（供体 #W20210104，经照射的接受者）
G1: PBS, i.p., BIW*6
G2: MGO53-hG1, 10 mpk, i.p., BIW*6
G3: HFB6-4hz1-hG1, 10 mpk, i.p., BIW*6
G4: 22B3-IgG4, 10 mpk, i.p., BIW*6
RCBW (%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
0
4
8
12
16
20
24
PBMC接种后天数

图8D

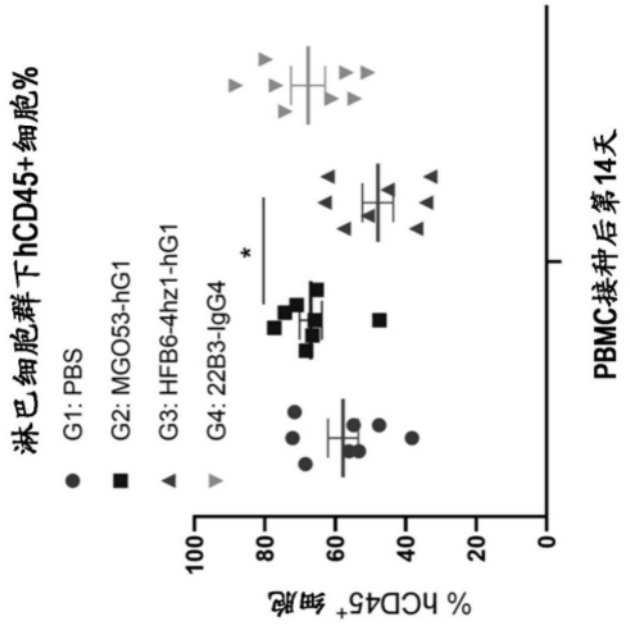

淋巴细胞群下hCD45+细胞%
G1: PBS
G2: MGO53-hG1
G3: HFB6-4hz1-hG1
G4: 22B3-IgG4
*
% hCD45+ 细胞
100
80
60
40
20
0
PBMC接种后第14天

图8E

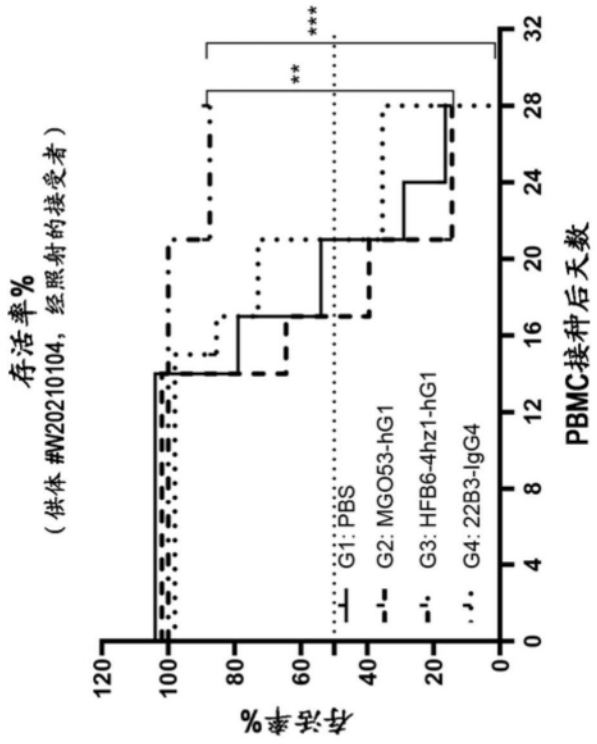

存活率%
（供体 #W20210104，经照射的接受者）
***
**
G1: PBS
G2: MGO53-hG1
G3: HFB6-4hz1-hG1
G4: 22B3-IgG4
存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
PBMC接种后天数

图8F

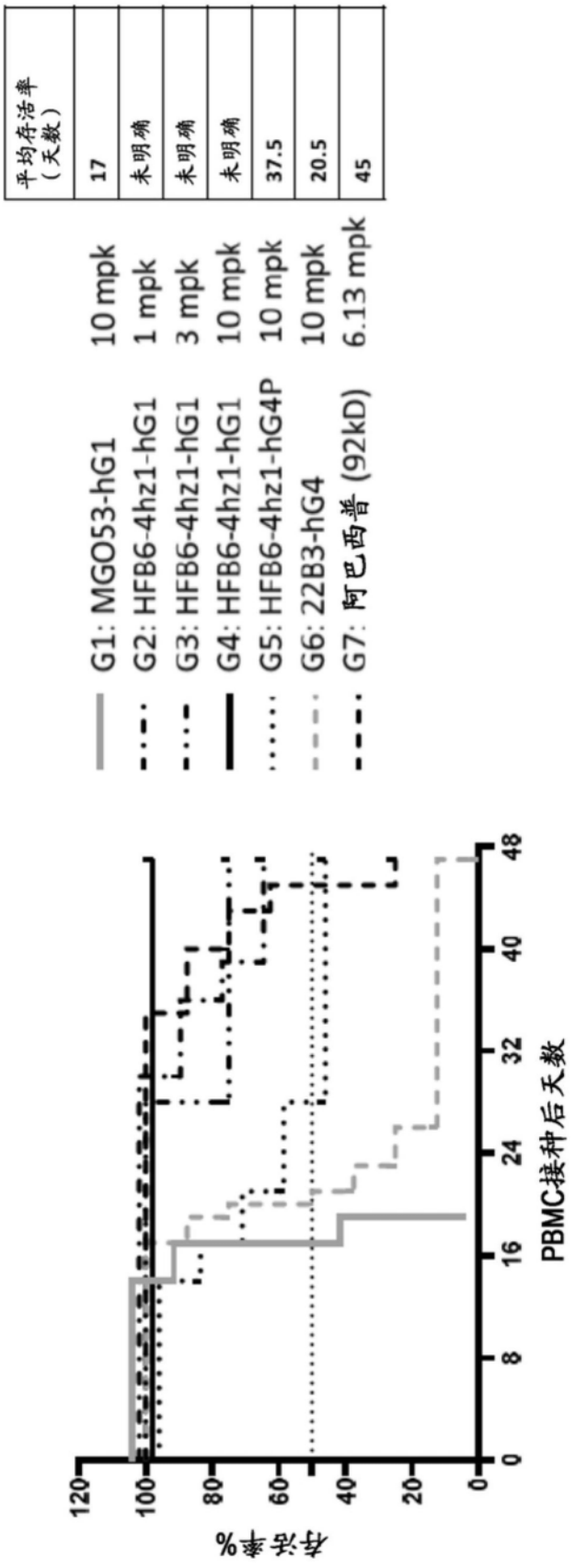

平均存活率（天数）
17
未明确
未明确
未明确
37.5
20.5
45
G1: MGO53-hG1 10 mpk
G2: HFB6-4hz1-hG1 1 mpk
G3: HFB6-4hz1-hG1 3 mpk
G4: HFB6-4hz1-hG1 10 mpk
G5: HFB6-4hz1-hG4P 10 mpk
G6: 22B3-hG4 10 mpk
G7: 阿巴西普 (92kD) 6.13 mpk
存活率%
120
100
80
60
40
20
0
0
8
16
24
32
40
48
PBMC接种后天数

图8G