



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115087672 A

(43) 申请公布日 2022.09.20

(21) 申请号 202080096588.9

(22) 申请日 2020.12.24

(30) 优先权数据

19219684.8 2019.12.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2020/050817 2020.12.24

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/133170 EN 2021.07.01

(71) 申请人 JJP佰优罗机克斯有限公司

地址 波兰华沙

(72) 发明人 路易·波恩

彼得勒斯·约翰内斯·西蒙斯

马赛尔·特奥多鲁斯·邓·哈托格

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

专利代理师 李杰

(51) Int.Cl.

*G07K 16/28* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

权利要求书2页 说明书66页 附图18页

(54) 发明名称

抗人HVEM (TNFRSF14) 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种结合人HVEM表达细胞上的人HVEM胞外部分的抗体,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,其阻止BTLA与HVEM的结合,其中所述抗体置换与所述HVEM胞外部分结合的BTLA。本发明还公开了这种抗体在对抗某些疾病中的用途。

1. 一种抗体,其结合疱疹病毒进入介体(HVEM)表达细胞上HVEM的胞外富含半胱氨酸的结构域-1(CRD1),并当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时阻止B-和T-淋巴细胞衰减因子(BTLA)与HVEM的结合,并且置换与所述HVEM胞外部分结合的BTLA。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,所述抗体不置换与所述HVEM胞外部分结合的LIGHT。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,所述抗体部分阻止CD160与HVEM的结合,并且部分置换与所述HVEM胞外部分结合的CD160。

4. 根据权利要求1-3所述的抗体,其结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:26-28的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:29-31的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

5. 根据权利要求1-4所述的抗体,其结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区。

6. 一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:42-44的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:45-47的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

7. 一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链可变区。

8. 一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:18-20的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:21-23的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

9. 一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区。

10. 根据权利要求1-3、6、7所述的抗体,其中当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,所述抗体不阻止LIGHT与所述HVEM胞外部分的结合。

11. 根据权利要求1-10所述的抗体,其中所述抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、及其抗原结合片段。

12. 一种或多种核酸分子,其包含编码根据权利要求4-10和11中任一项所述的抗体的核苷酸序列。

13. 一种细胞,其包含根据权利要求12所述的一种或多种核酸,其中所述一种或多种核酸能够装配成根据权利要求1-11中任一项所述的抗体。

14. 一种根据权利要求1-11中任一项所述的抗体,其用于治疗疾病。

15. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或核酸分子,以及药学上可接受的载体和/或稀释剂。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其用于预防或治疗癌症和/或免疫相关病症。

17. 一种用于调节HVEM信号传导活性的方法,其包括:将HVEM表达细胞与根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或核酸分子接触。

18. 一种用于治疗患有医学适应症的人或动物的方法,所述方法包括:向所述人或动物施用治疗有效量的根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或核酸分子。

19. 一种用于减少受试者中肿瘤生长的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或核酸分子。

## 抗人HVEM (TNFRSF 14) 抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域和此类抗体的用途。本发明特别提供了结合HVEM的抗体。本发明还提供了包含抗HVEM抗体的试剂盒和组合物,以及使用如本文所述抗体的治疗方法。

### 背景技术

[0002] T细胞的激活需要至少两种信号的伴随激活:T细胞受体的接合和由共刺激分子递送的另外的信号。一些共刺激分子属于B7/CD28和TNF/TNFR家族,并且在调节免疫应答和提高抗肿瘤免疫方面起着至关重要的作用。肿瘤可以通过产生免疫抑制微环境来逃避免疫监视,在所述微环境中,抗肿瘤T细胞应答因癌细胞表面上缺乏共刺激分子和/或共抑制分子如PD-L1/L2的过表达而减弱。靶向共刺激和共抑制途径代表了在几种人癌症中增强抗肿瘤免疫的有吸引力的一种治疗策略。靶向共抑制Ig分子CTLA-4和PD-1的临床试验已经在患有黑色素瘤、肾细胞癌和前列腺癌以及非霍奇金淋巴瘤的患者中取得了有前途的结果,并导致如Yervoy®和Opdivo®的药物批准。

[0003] 人们有兴趣评估其他共刺激和共抑制受体/配体相互作用的潜在作用。一种这样的分子是疱疹病毒进入介体 (HVEM/CD270/TNFRSF14) 及其配体。HVEM与其配体之间的相互作用比例如PD-1/PD-L1更复杂,因为有双向信号传导的证据。HVEM在与其配体相互作用时是刺激和抑制信号传导之间的分子开关,所述配体包括BTLA (B-和T-淋巴细胞衰减因子)、CD160、LIGHT (淋巴毒素样,表现出可诱导的表达,并与单纯疱疹病毒糖蛋白D竞争HVEM,这是一种由T淋巴细胞表达的受体) 和TNF $\beta$ /LT $\alpha$  (肿瘤坏死因子 $\beta$ /淋巴毒素 $\alpha$ )。HVEM及其配体在免疫调节的生理病理学方面起作用。在本发明中,表明此网络的失调导致各种疾病。

[0004] 最初发现HVEM是单纯疱疹病毒1型糖蛋白D的共受体,从而允许病毒进入细胞。发现HVEM在组织中广泛表达,其中在肺、肾和肝中表达水平最高。还发现HVEM在T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞上表达。值得注意的是,HVEM表达在几种癌症中上调。已知HVEM与BTLA、CD160、LIGHT和TNF $\beta$ 相互作用。大多数配体,以及HVEM本身可以在免疫突触的任一侧上表达:发现CD160在NK细胞、NKT细胞和T细胞中表达,BTLA在激活的T细胞和静息的B细胞中高表达,并且在幼稚的T细胞、NK细胞、树突细胞(DC)和巨噬细胞中表达较少。发现LIGHT由未成熟的DC、粒细胞、单核细胞和激活的T细胞表达,并且TNF $\beta$ 在B细胞和T细胞以及NK细胞中表达。

[0005] 不受理论的束缚,据信BTLA和CD160通过HVEM在T淋巴细胞上的接合通过BTLA和CD160向T淋巴细胞提供了共抑制信号,HVEM通过LIGHT和TNF $\beta$ 在T淋巴细胞上的连接通过HVEM递送了共刺激信号。这些相互作用是双向的:HVEM在与T细胞上的BTLA和CD160相互作用后,在T细胞中诱导抑制信号,而BTLA和CD160二者都作为HVEM的激活配体,从而导致NF $\kappa$ B激活。此外,LIGHT在与T细胞上表达的HVEM相互作用时将共刺激信号递送至T细胞,并且HVEM也被认为在与T细胞表达的LIGHT相互作用时将共刺激信号传递至T细胞。然而,LIGHT不包含明显的信号传导基序,并且其用于信号传导的机制也不完全确定。

[0006] 当LIGHT和/或TNF $\beta$ 、BTLA和/或CD160同时与HVEM相互作用时,净效应是针对T细胞

激活的抑制信号。许多肿瘤(例如,黑色素瘤、食管鳞状细胞癌、肝细胞癌和结肠直肠癌)过度表达HVEM。因此,治疗性阻断癌细胞上的HVEM与T细胞上的BTLA/CD160之间的抑制相互作用,同时使表达HVEM的T细胞中LIGHT介导的信号传导保持完整,可以增强抗肿瘤T细胞应答。已经描述了可以干扰BTLA与HVEM结合的抗体(WO2014184360A1)。在一个实施方式中,本发明提供了一种抗体,其可以阻断BTLA与HVEM的结合,并置换与HVEM结合的BTLA。这些和其他抗体是本发明公开内容的主题。

## 发明内容

[0007] 在一个方面,本公开提供了一种抗体,当所述抗体与疱疹病毒进入介体(HVEM)胞外部分结合时,其结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分,并且阻止B-和T-淋巴细胞衰减因子(BTLA)与HVEM结合。在一个方面,所述抗体可以置换与所述HVEM胞外部分结合的BTLA。

[0008] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:26-28的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:29-31的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0009] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区。

[0010] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:42-44的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:45-47的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0011] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链可变区。

[0012] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:18-20的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:21-23的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0013] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区。

[0014] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:34-36的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:37-39的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0015] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:32的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区。

[0016] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:50-52的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:53-55的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0017] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:49的氨基酸序列的轻链可变区。

[0018] 在一个方面,本公开提供了编码如本文公开的抗体或如本文公开的其抗原结合片段的一种或多种核酸分子。还提供了一种编码如本文公开的可变区的核酸。

[0019] 在一个方面,本公开提供了一种载体,其包含如本文所述的核酸分子。在一个方面,本公开提供了一种细胞,其包含如本文公开的抗体、一种或多种核酸分子和/或载体。优选地,宿主细胞是哺乳动物、昆虫、植物、细菌或酵母细胞。更优选地,所述细胞是人细胞。优选地,宿主细胞是杂交瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO细胞或PER-C6<sup>TM</sup>细胞。

[0020] 在一个方面,本公开提供了一种产生如本文公开的抗体的方法。所述方法包括收获所述抗体。优选地,所述抗体使用细胞产生,并从所述细胞收获。优选地,所述细胞是杂交瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO细胞或PER-C6<sup>TM</sup>细胞。优选地,所述抗体是合成产生的。

[0021] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含如所公开的抗体或其抗原结合片段、核酸和/或细胞。优选地,如本文公开的组合物或抗体或其抗原结合片段用于制造药物。优选地,所述药物用于治疗 and/或预防癌症和免疫相关病症。

[0022] 在一个方面,本公开提供了一种用于治疗受试者中的癌症和免疫相关病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体。

[0023] 在一个方面,本公开提供了一种用于治疗癌症和免疫相关病症的抗体或其抗原结合片段。

[0024] 在一个方面,本公开提供了一种用于调节HVEM信号传导活性的方法,所述方法包括将HVEM表达细胞与如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体接触。

[0025] 在一个方面,本公开提供了一种用于增加受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体。

[0026] 在一个方面,本公开提供了一种用于减少受试者中肿瘤生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体。

## 具体实施方式

[0027] 本公开描述了结合HVEM表达细胞上的人HVEM的胞外部分和可溶性HVEM的抗体。当如本文所述的抗体与所述人HVEM胞外部分结合时,所述抗体可用于阻止BTLA和CD160与HVEM结合。已经产生了几种与HVEM结合的抗体。特异性结合HVEM的抗体是本领域已知的。例如,抗体eBio HVEM-122 (eBiosciences) 是可商购获得的,并在实施例2中提及。已经描述了可以干扰BTLA与HVEM结合的抗体 (WO2014184360A1)。本发明提供了阻断BTLA与HVEM结合并置换曾经与HVEM结合的BTLA的抗体。

[0028] 在一个方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体;当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,阻止BTLA与HVEM结合;并且置换曾经与所述HVEM胞外部分结合的BTLA。

[0029] 术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链构成的免疫球蛋白分子,每对多肽链具有一条“重”(H)链和一条“轻”(L)链。人轻链被分类为卡帕( $\kappa$ )和拉姆达( $\lambda$ )。重链被分类为 $\mu$  (mu)、 $\delta$  (delta)、 $\gamma$  (gamma)、 $\alpha$  (alpha)或 $\epsilon$  (epsilon),并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。各重链由重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区构成。IgD、IgG和IgA的重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成,并且IgM和IgE的重链恒定区由四个结构域CH1、CH2、CH3和CH4构成。各轻链由轻链可变区(本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞))的结合。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其间穿插有称为框架区(FR)的较保守区。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链和重链的可变区一起形成抗体结合位点,并定义表位的特异性。本领域已知多种方法将氨基酸分配给抗体中的区域或结构域。熟知方法包括Kabat方法和Chothia方法(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1987和1991); Chothia等人, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions in Nature, 1989; 342 (6252): 877-83)。本公开的每个区域或结构域的氨基酸分配与Kabat的定义一致。

[0030] 术语“抗体”包括鼠抗体、人源化抗体、去免疫化人抗体和嵌合抗体,以及为抗体的多聚体形式(如单体抗体的二聚体、三聚体或更高级多聚体)的抗体。抗体还包括单特异性、双特异性或多特异性抗体,以及包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰构型。它还包括与非抗体部分连接或附接的抗体。此外,术语“抗体”不受产生所述抗体的任何特定方法的限制。例如,它包括单克隆抗体、重组抗体和多克隆抗体。本发明提供了如本文所述的抗体。此外,本发明提供了如本文公开的抗体的一部分、衍生物和/或类似物。所述部分、衍生物和/或类似物在种类上而不一定在数量上保留了所述抗体的抗原结合特性。一部分和/或衍生物的非限制性例子包括抗体的一部分是抗原结合部分,并且通常含有所述抗体的一个或多个可变结构域。非限制性例子是各种Fab片段。一部分还可以是所谓的单结构域抗体片段。单结构域抗体片段(sdAb, 开发者Ablynx称之为纳米抗体)是具有单个单体可变抗体结构域的抗体片段。像完整的抗体一样,它能够选择性地结合特定抗原。单结构域抗体片段的分子量仅为12-15kDa,远小于由两条重蛋白链和两条轻链构成的普通抗体(150-160kDa),并且甚至小于Fab片段(约50kDa,一条轻链和半条重链)和

单链可变片段(约25kDa,两个可变区,一个来自轻链且一个来自重链)。单结构域抗体本身并不比普通抗体小很多(通常为90-100kDa)。单结构域抗体片段大多是从骆驼中发现的重链抗体工程化而来;这些被称为VHH碎片(Nanobodies®)。一些鱼类也仅具有重链抗体(IgNAR,“免疫球蛋白新抗原受体”),从中可以获得称为VNAR片段的单结构域抗体片段。可替代方法是将来自人或小鼠的普通免疫球蛋白G(IgG)的二聚体可变区分裂成单体。尽管对单结构域抗体的大多数研究目前都是基于重链可变结构域,但衍生自轻链的纳米抗体也显示出与靶表位特异性结合。抗体部分的非限制性例子含有抗体或其等效物的重链和/或轻链的可变结构域。此类部分的非限制性例子是VHH、人结构域抗体(dAb)和单抗体(Unibodies)。优选的抗体部分或衍生物至少具有如本文所述抗体的重链和轻链的可变结构域。衍生物或一部分的非限制性例子是F(ab)片段和单链Fv片段。双特异性抗体的功能部分包含双特异性抗体的抗原结合部分,或结合部分的衍生物和/或类似物。

[0031] “单链抗体”(scFv)具有包含与VH结构域连接的VL结构域的单多肽链,其中VL结构域和VH结构域配对形成单价分子。单链抗体可以根据本领域已知的方法制备(参见例如,Bird等人,(1988)Science 242:423-426和Huston等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。“双抗体”具有两条链,每条链包含重链可变区,所述重链可变区与通过短肽接头连接的另一多肽链上的轻链可变区相连,其中同一链上的两个区域彼此不配对,而是与另一条链上的互补结构域配对,以形成双特异性分子。制备双抗体的方法是本领域已知的(参见例如,Holliger P.等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448,和Poljak R.J.等人,(1994)Structure 2:1121-1123)。结构域抗体(dAb)是抗体的小功能结合单位,对应于抗体重链或轻链的可变区。结构域抗体在细菌、酵母和哺乳动物细胞系统中表达良好。结构域抗体及其生产方法的更多细节是本领域已知的(参见例如,美国专利号6,291,158;6,582,915;6,593,081;W004/003019和W003/002609)。纳米抗体衍生自抗体的重链。纳米抗体通常包含单个可变结构域和两个恒定结构域(CH2和CH3),并保留原始抗体的抗原结合能力。纳米抗体可以通过本领域已知的方法制备(参见例如,美国专利号6,765,087、美国专利号6,838,254、W0 06/079372)。单抗体具有IgG4抗体的一条轻链和一条重链。单抗体可以通过去除IgG4抗体的铰链区来制备。单抗体及其制备方法的更多细节可以在W02007/059782中找到。抗体类似物的清单每年都在增加。利用可变结构域的序列和目前对许多不同抗体的3D结构的广泛知识,技术人员可以将本发明的抗体转化为一种或另一种抗体类似物、部分或衍生物。

[0032] 除了结合分子外,本发明的分子还可以包含用于增加分子体内半衰期的部分,如但不限于聚乙二醇(PEG)、人血清白蛋白、糖基化基团、脂肪酸和葡聚糖。此类另外的部分可以使用本领域熟知的方法与结合部分缀合或以其他方式组合。还提供了包含如本文所述抗体的可变结构域的嵌合抗原受体(CAR)。CAR是工程化受体,其将新特异性(通常是抗体或其衍生物的抗原结合部分)与免疫细胞结合到靶细胞。所述受体被称为嵌合体,因为它们由不同来源的部分融合而成(T淋巴细胞经遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR;参见例如,Eshhar,美国专利号7,741,465;Eshhar,美国专利申请公开号2012/0093842)。在一些实施方式中,如本文公开的抗体可以与活性化合物例如毒素偶联。此外,如所公开的抗体或抗原结合片段可以与标记(例如,荧光蛋白、化学标记、有机染料、有色颗粒或酶)偶联。如本文公开的抗体可以与药物偶联,以形成抗体-药物缀合物(ADC)。本发明提供了抗体类似物、

抗体部分和抗体衍生物,当这些分子与其他分子偶联或掺入时也是如此。

[0033] 在一些实施方式中,如本文公开的抗体是嵌合抗体。术语“嵌合抗体”是指包含衍生自两个不同物种(如人和小鼠)的氨基酸序列的抗体,通常是小鼠可变(来自重链和轻链)区和人恒定(重链和轻链)区的组合。在工作实施例(例如,实施例5)中描述了产生这种嵌合抗体的非限制性例子。在这种嵌合抗体中,小鼠IgG1/ $\kappa$ 恒定区被替换为人IgG/ $\kappa$ 恒定区。在一些实施方式中,如本文公开的抗体是人源化抗体。术语“人源化抗体”是指含有来自非人动物抗体的一些或全部CDR的抗体,而所述抗体的框架和恒定区含有衍生自人抗体序列的氨基酸残基。人源化抗体通常通过将来自小鼠抗体的CDR移植到人框架序列中,随后用某些人框架残基回代来自源抗体的对应小鼠残基来产生。术语“去免疫化抗体”也指非人来源的抗体,其中通常在一个或多个可变区中,一个或多个表位已被去除,其具有构成人T细胞和/或B细胞表位的高倾向,目的是降低免疫原性。表位的氨基酸序列可以全部或部分去除。然而,通常通过用一个或多个其他氨基酸取代一个或多个构成表位的氨基酸来改变氨基酸序列,从而将氨基酸序列改变成不构成人T细胞和/或B细胞表位的序列。视情况而定,氨基酸被存在于对应的人可变重链或可变轻链中的一个或多个对应位置处的氨基酸取代。在一些实施方式中,如本文公开的抗体是人抗体。术语“人抗体”是指仅由人免疫球蛋白序列的氨基酸序列组成的抗体。如果在小鼠、小鼠细胞或来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生,则人抗体可以含有鼠糖链。人抗体可以以本领域已知的多种方式制备。嵌合抗体、人源化抗体、去免疫化抗体和人抗体都在本发明的范围内。

[0034] 结合人HVEM的抗体在通常用于抗体结合的条件下与HVEM结合。当抗体和人HVEM在适用于抗体结合的条件下相互接触时,所述抗体将与人HVEM结合。所述抗体与HEK293F细胞上表达的膜结合人HVEM结合,而所述抗体不与不在其细胞膜上表达人HVEM的HEK293F细胞显著结合。所述抗体与表达人HVEM的细胞的结合可以通过本领域技术人员已知的方法来检测。例如,通过使用携带荧光标记的第二抗体,并使用流式细胞术(FACS)测量经标记的细胞。

[0035] HVEM,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14)和CD270,是TNF受体(肿瘤坏死因子)超家族的人细胞表面受体。在人类中,所述蛋白质由TNFRSF14基因编码。HVEM可以接合至少四种不同的配体,TNFSF成员LIGHT(TNFSF14)和TNF $\beta$ /LT $\alpha$ (肿瘤坏死因子 $\beta$ /淋巴毒素 $\alpha$ )和免疫球蛋白超家族成员B-和T-淋巴细胞衰减因子(BTLA)和CD160。对于人HVEM的参考序列,我们参考SEQ ID NO.:1(Swiss-Prot号Q92956.3;aa1-283)。所述参考仅用于鉴定HVEM基因/蛋白质。这并不旨在将如本文所述的HVEM限于数据库条目的特定序列。可以结合BTLA、CD160、LIGHT和TNF $\beta$ 并且可以被如本文所述抗体结合的HVEM的天然变体在本发明的范围内。如果重组人HVEM可以结合BTLA、CD160、LIGHT和TNF $\beta$ ,并且可以结合如本文所述的抗体,则它也在本发明的范围内。

[0036] HVEM在组织中广泛表达,其中在肺、肾和肝中表达水平最高,并且被发现在T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞上表达。发现HVEM的表达在几种癌症中上调。术语“HVEM表达细胞”是指HVEM表达细胞。示例性细胞是T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞。BTLA和/或CD160与HVEM的结合可能具有抑制作用,LIGHT和/或TNF $\beta$ 与HVEM的结合可能具有刺激作用。

[0037] 术语“胞外”的字面意思是细胞外。术语“胞外部分”是指在细胞膜外部的分子的一部分。分子的这部分可以与细胞外的其他分子相互作用。HVEM具有由富含半胱氨酸的标志

定义的胞外部分。HVEM的胞外结构域含有四个富含半胱氨酸的结构域,即CRD1-CRD4,和一个接头。不受理论的束缚,据信BTLA和CD160与HVEM之间的相互作用经由HVEM的CRD1发生,而LIGHT和TNF $\beta$ 与HVEM之间的相互作用经由HVEM的CRD2和CRD3发生。

[0038] 在一个实施方式中,本发明的抗体结合HVEM的CRD1。

[0039] HVEM存在于大多数造血细胞谱系的细胞表面上,其中包括T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞。发现HVEM的表达在T细胞和B细胞激活后下调,并且在一些癌症中上调。非限制性例子是:黑色素瘤、食管鳞状细胞癌、肝细胞癌和结肠直肠癌。术语“表达人HVEM的细胞”是指表达人HVEM的细胞。示例性细胞是T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞。

[0040] 术语“阻止结合”是指当蛋白质被抗体结合时,所述抗体或其抗原结合片段阻止配体与所述蛋白质结合的能力。当提到“阻止结合”时,这也可以解释为“阻断”。如果与不存在抗体时的配体结合相比,配体的结合被阻止大于(>)70%,则称所述配体的结合被阻止。如果与不存在抗体时的配体结合相比,配体的结合被阻止大于或等于( $\geq$ )30%但小于或等于( $\leq$ )70%,则称所述配体的结合被部分阻止。当与不存在抗体时配体的结合相比,配体的结合被阻止小于(<)30%时,称配体的结合不受影响。如果与不存在抗体时的配体结合相比,配体的结合被增加大于(>)30%,则称所述配体的结合被增强。

[0041] 当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗体或抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0042] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止或部分阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0043] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且部分阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0044] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:11H7。

[0045] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且部分阻止CD160与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0046] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,部分阻止CD160和LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0047] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,部分阻止CD160与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。示例性抗体是:11H7。

[0048] 通常,如上所述的抗HVEM抗体或其抗原结合片段结合HVEM蛋白的CRD1结构域。

[0049] BTLA、CD160和LIGHT与HVEM的结合优选地用实施例中描述的方法测量。例如,在实施例6b中描述了示例性方法,其结果在图6A-D中描绘。优选地使用用全长HVEM转染的HEK293F细胞。优选地,所述细胞在质膜上稳定表达全长HVEM。使用表达HVEM的HEK293F细胞检查测试抗体。将细胞与感兴趣的抗HVEM抗体一起孵育。在洗涤后,将细胞与生物素标记或his标记的人BTLA、CD160或LIGHT一起孵育。在洗涤后,用荧光标记的链霉亲和素或抗his抗体检测标记或标签。可以通过使用流式细胞仪(FACS)检测荧光来测量BTLA、CD160或LIGHT与细胞上表达的HVEM的结合。然后通过比较在抗HVEM抗体存在下BTLA、CD160或LIGHT与HVEM结合的百分比与在不结合HVEM的对照抗体存在下结合的百分比来确定阻止结合的能力。BTLA、CD160或LIGHT与HVEM的结合越少,表明所述抗体的阻断能力越强。

[0050] 术语“置换”是指第一实体将第二实体从其位置移走的能力,由此第二实体被第一实体替换。如果与不存在抗体时配体的存在相比,大于(>)70%与HVEM胞外部分结合的配体被置换,则称所述配体被置换。如果与不存在抗体时配体的存在相比,大于或等于( $\geq$ )30%但小于或等于( $\leq$ )70%与HVEM胞外部分结合的配体被置换,则称所述配体被部分置换。如果与不存在抗体时配体的存在相比,小于(<)30%与HVEM胞外部分结合的配体被置换,则称配体没有被置换。如果与不存在抗体时的配体存在相比,配体的结合被增加大于(>)30%,则所述配体的结合被增强。

[0051] 如本文公开的抗体或抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。所述抗体优选地置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0052] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止或部分阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0053] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且部分阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0054] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:11H7。

[0055] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且部分阻止CD160与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160。示例性抗体

是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0056] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且部分阻止CD160和LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0057] 在另一个实施方式中,当所述抗体与所述HVEM胞外部分结合时,如本文公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段阻止BTLA与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,部分阻止CD160与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:11H7。

[0058] 通常,如上所述的抗HVEM抗体或其抗原结合片段结合HVEM蛋白的CRD1结构域。

[0059] 为了分析如本文公开的抗HVEM抗体是否具有置换与HVEM胞外部分结合的配体的能力,技术人员可以使用许多已知的合适的测定。在实施例部分中公开了一种合适的方法。在例如实施例6c中详细描述了所述测定。优选地使用用全长HVEM转染的HEK293F细胞。优选地,所述细胞在质膜上稳定表达全长HVEM。将细胞与可溶性配体(例如,生物素标记或his标记的BTLA、CD160或LIGHT)一起孵育。随后,将细胞与结合HVEM胞外部分的本发明抗体一起孵育。在洗涤后,使用荧光标记的链霉亲和素或抗his抗体检测与细胞结合的配体。在洗涤后,可以使用流式细胞仪(FACS)检测与配体结合的抗体的荧光信号。与HVEM胞外部分结合的配体的量表明了抗HVEM抗体替换与所述抗体的HVEM胞外部分结合的配体的能力。配体的荧光信号越低,表明替换抗HVEM抗体的能力越强。在实施例中描述了优选的方法,其结果例如在图7A-D中描绘。在其他方面相同的情况下,置换的百分比通常以与非特异性抗体存在下配体与HVEM的结合相比的百分比给出。可以使用代谢活跃的细胞(例如在37°C下孵育过夜)或使用代谢不活跃的细胞(例如在叠氮化钠存在下在4°C下孵育)来测量置换。

[0060] 不受理论的束缚,据信即使在LIGHT和/或TNF $\beta$ 存在下,T细胞的激活在BTLA和/或CD160与HVEM相互作用时被抑制。如本文公开的抗体可用于靶向HVEM表达细胞。如本文公开的抗体的结合置换BTLA,并且优选地至少部分置换与HVEM胞外部分结合的CD160,但不置换与HVEM胞外部分结合的LIGHT。结果,由于阻止BTLA和CD160结合的能力以及置换BTLA和优选地部分置换CD160的能力,BTLA和CD160对T细胞激活的抑制作用被抑制。结合如本文公开的抗体的细胞可对其他刺激(如LIGHT或TNF $\beta$ 与HVEM的结合)产生反应。

[0061] 全长食蟹猴(*Macaca fascicularis*)HVEM蛋白(Met1-Ser280;NCBI参考序列:XP\_005545061.1,参见SEQ ID NO.5)具有与人HVEM相似的氨基酸序列,并表现出与人HVEM蛋白(Met1-His283;Swiss-Prot号Q92956.3,参见SEQ ID NO.1)的82%同源性。食蟹猴HVEM(即,Leu39-Val203;NCBI参考序列:XP\_005545061.1)胞外结构域的预测氨基酸序列显示与人HVEM蛋白胞外结构域的氨基酸序列(即,Leu 39-Val202;Swiss-Prot号Q92956.3)的87%同源性。用食蟹猴HVEM的对应氨基酸取代人HVEM的氨基酸可以用于测试所述抗体的特异性和交叉特异性。在一个实施方式中,本发明的抗体结合人HVEM,并且对食蟹猴(*Macaca*

fascicularis) HVEM具有交叉特异性。示例性抗体是：45H6、11H7、48H6和49G4。不受理论的束缚，据信此类抗体特别适用于与携带突变的人HVEM结合。此外，此类抗体适用于毒性测试。

[0062] 本公开的一个方面提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:26-28的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区，和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:29-31的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。优选地，结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:26-28的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:29-31的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0063] 在另一方面，本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变区，和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区。在优选的实施方式中，0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加位于轻链和/或重链可变区的框架区。优选地，结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区。具有这些特征的示例性抗体是45H6。

[0064] 本公开的一个方面提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:42-44的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区，和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:45-47的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。优选地，结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:42-44的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:45-47的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0065] 在另一方面，本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链可变区，和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链可变区。在优选的实施方式中，0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加位于轻链和/或重链可变区的框架区。优选地，结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链可变区。具有这些特征的示例性抗体是11H7。

[0066] 本公开的一个方面提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:18-20的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区，和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:21-23的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。优选地，结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:18-20的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:21-23的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0067] 在另一方面，本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体，所述抗体包含：具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID

NO:16的氨基酸序列的重链可变区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区。在优选的实施方式中,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加位于轻链和/或重链可变区的框架区。优选地,结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区。具有这些特征的示例性抗体是36H12。

[0068] 本公开的一个方面提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:34-36的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:37-39的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。优选地,结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:34-36的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:37-39的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0069] 在另一方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:32的氨基酸序列的重链可变区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区。在优选的实施方式中,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加位于轻链和/或重链可变区的框架区。优选地,结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区。具有这些特征的示例性抗体是48H6。

[0070] 本公开的一个方面提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:50-52的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区,和具有含0、1或2个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:53-55的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。优选地,结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:50-52的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:53-55的CDR1、CDR2、CDR3序列的轻链可变区。

[0071] 在另一方面,本公开提供了一种结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体,所述抗体包含:具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链可变区,和具有含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加的SEQ ID NO:49的氨基酸序列的轻链可变区。在优选的实施方式中,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、取代或添加位于轻链和/或重链可变区的框架区。优选地,结合HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分的抗体包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的轻链可变区。具有这些特征的示例性抗体是49G4。

[0072] 在一个方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0073] 在另一方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部

分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合,并且部分阻止LIGHT与所述HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0074] 在另一方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与所述HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:11H7。

[0075] 在另一方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合,并且部分阻止CD160与所述HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,并且部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160。示例性抗体是:45H6、11H7、36H12、48H6和49G4。

[0076] 在另一方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合,并且部分阻止CD160和LIGHT与所述HVEM胞外部分结合。优选地,所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:45H6、36H12、48H6和49G4。

[0077] 在另一方面,当本文通过序列提及的抗HVEM抗体与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合时,所述抗体或抗原结合片段阻止BTLA与所述HVEM胞外部分结合,部分阻止CD160与所述HVEM胞外部分结合,并且不阻止LIGHT与所述HVEM胞外部分结合,其中所述抗体置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的BTLA,部分置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的CD160,并且不置换与HVEM表达细胞上的HVEM胞外部分结合的LIGHT。示例性抗体是:11H7。

[0078] 通常,本文通过序列提及的抗HVEM抗体或其抗原结合片段结合HVEM蛋白的CRD1结构域。

[0079] 本公开的抗HVEM抗体或其抗原结合片段优选地包含如本文所述的重链可变区和轻链可变区。这种抗体具有良好特征。当然有可能通过修饰其中的一个或多个氨基酸来产生这种原始抗体的变体。当与所述原始的相比时,许多此类变体将表现出或多或少的相似。此类变体也包括在本公开的范围內。

[0080] 相对于原始抗体的序列,变体可以具有氨基酸取代、插入、缺失或添加。氨基酸取代是用另一种氨基酸替换一种氨基酸。优选地,所述氨基酸被具有相似化学特性的氨基酸预先替换,这通常被称为保守取代。氨基酸缺失导致序列中一个或多个氨基酸的缺失。氨基酸插入导致在序列中出现一个或多个另外的氨基酸。氨基酸添加导致在氨基酸序列的起始或末端处出现一个或多个氨基酸。

[0081] 这种修饰的非限制性例子是包含焦谷氨酸盐而不是谷氨酸盐的抗体。此类修饰的其他非限制性例子是与所述原始抗体相比时,一个或多个氨基酸的插入、缺失、倒位和/或取代。优选地,氨基酸取代、插入、缺失或添加在可变结构域的CDR之外。优选地,氨基酸取

代、插入、缺失或添加位于所述抗体可变区的框架区内和/或恒定区内。可以如本文所述地测试变体的HVEM结合。

[0082] 在一些实施方式中,本发明抗体的恒定区是IgG、IgA、IgD、IgE或IgM抗体(如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体)的恒定区。恒定区可以包含修饰(如氨基酸取代),以赋予恒定区特定的特性。例如,IgG4铰链区的突变使得所述抗体对半分子的交换更加稳定。其他修饰影响所述抗体的半衰期、添加或去除糖基化位点、提高产量、提高在大规模发酵罐中生产的抗体产物的均一性等。

[0083] 本发明的抗体优选地是鼠IgG1、在恒定区中突变以减少或阻止补体激活或Fc受体相互作用的人IgG1、或人IgG4、或突变以阻止半分子与其他IgG4分子交换的人IgG4。

[0084] 如本文公开的抗体的CDR(CDR1-CDR2-CDR3)中的一些变异是允许的。通常,一个CDR中允许约0-2个氨基酸的取代、插入、缺失或添加。通常允许多于2个的氨基酸变化。

[0085] 本发明的抗体可以具有重链CDR1、CDR2或CDR3,其相对于天然存在的重链CDR1、CDR2或CDR3具有0-5个、优选0-2个、更优选2、1或0个氨基酸取代、插入、缺失或添加。

[0086] 这种抗体可以具有轻链CDR1、CDR2或CDR3,其相对于天然存在的轻链CDR1、CDR2或CDR3具有0-5个、优选0-2个、更优选0-1个、更优选0个氨基酸取代、插入、缺失或添加。

[0087] 如本文公开的抗体的可变区中的一些变异是允许的。通常,可变链中允许约0-10个氨基酸取代。通常允许多于10个的氨基酸变化。

[0088] 本发明的抗体可以具有重链可变区,其相对于天然存在的可变重链,具有0-15个、优选0-10个、更优选0-5个、更优选5、4、3、2、1或0个氨基酸取代、插入、缺失或添加。

[0089] 这种抗体可以具有轻链可变区,其相对于天然存在的轻链可变区,具有0-15个、优选0-10个、更优选0-5个、更优选5、4、3、2、1或0个氨基酸取代、插入、缺失或添加。

[0090] 如本文公开的抗体的恒定区中的一些变异是允许的。通常,恒定区中允许约0-10个氨基酸取代。通常允许多于10个的氨基酸变化。本发明的抗体可以具有重链恒定区(CH1-CH2-CH3),其相对于天然存在的重链恒定区(H1-CH2-CH3),具有0-15个、优选0-10个、更优选0-5个、更优选5、4、3、2、1或0个氨基酸取代。这种抗体可以具有轻链恒定区,其相对于天然存在的轻链恒定区,具有0-5个,优选5、4、3、2、1或0个氨基酸取代。

[0091] IgG4中的一些变异在自然界中发生和/或在不改变所得抗体的免疫学特性的情况下被允许。具有IgG4恒定区或突变的IgG1恒定区的抗体至少具有抗体的大部分药理学特性,但不结合补体,并且因此将不在体内诱导与其结合的细胞的耗竭。优选地,所述恒定区是人抗体(嵌合)的恒定区。

[0092] 优选地,所述恒定区是在补体激活方面有缺陷的区域,优选人IgG<sub>4</sub>恒定区或突变的人IgG<sub>1</sub>恒定区。

[0093] 本文公开的抗体及其抗原结合片段的HVEM结合可以在技术人员已知的许多合适的测定中得到证实。此类测定包括例如,亲和力测定,例如蛋白质印迹、放射免疫测定、FACS和ELISA(酶联免疫吸附测定)。实施例(例如,实施例2c和6a)详细描述了可以用于测量HVEM结合的许多测定中的一些,以及确定抗体对人HVEM的相对结合亲和力的方法。

[0094] 在另一方面,本公开提供了编码如本文公开的抗体或如本文公开的其抗原结合片段的一种或多种核酸分子。还提供了一种分子编码如本文公开的可变区的核酸分子。如本公开所用的核酸通常但不排他地是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。基于遗传密码,

技术人员可以确定编码如本文公开的抗体变体的核酸序列。基于遗传密码的简并性,64个密码子可以用于编码20个氨基酸和翻译末端信号。如技术人员已知的,不同生物体中的密码子使用偏好可能影响基因表达水平。技术人员可以利用各种计算工具来优化密码子的使用,这取决于所需核酸将被表达的生物体。

[0095] 在另一方面,本公开提供了一种载体,其包含如本文所述的核酸序列分子。如本文所用的术语“载体”是指能够将异源核酸序列引入宿主细胞中的核酸分子,如质粒、噬菌体或动物病毒。根据本发明的载体允许在宿主细胞中表达或产生由异源核酸序列编码的本发明的抗体。根据本发明使用的载体例如来源于动物病毒,其例子包括但不限于痘苗病毒(包括减毒衍生物,如改良的痘苗病毒Ankara, MVA)、新城疫病毒(NDV)、腺病毒或逆转录病毒。根据本发明的载体优选地包含表达盒,所述表达盒包含适用于在所选择宿主细胞中启动转录根据本发明抗体的启动子。用于在真核宿主细胞中表达根据本发明的多肽的合适启动子的例子包括但不限于: $\beta$ -肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、5S RNA启动子或病毒衍生启动子,如用于哺乳动物宿主的巨细胞病毒(CMV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和猿猴病毒40(SV40)启动子。

[0096] 当如本文公开的一种或多种核酸分子在细胞中表达时,所述细胞可以产生根据本公开的抗体。因此,在一个实施方式中,提供了一种包含根据本公开的抗体、一种或多种核酸分子和/或载体的细胞。宿主细胞可以是哺乳动物、昆虫、植物、细菌或酵母细胞。所述细胞优选地是动物细胞,优选哺乳动物细胞,最优选人细胞。适合作为宿主细胞的哺乳动物细胞系的例子包括杂交瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO细胞或PER-C6<sup>TM</sup>细胞。出于本公开的目的,合适的细胞是能够包含并且优选产生所述抗体和/或所述核酸的任何细胞。本公开还包括包含所述细胞的细胞培养物。

[0097] 术语“宿主细胞”是指已经引入了表达载体的细胞。所述术语不仅包括特定的受试者细胞,还包括这种细胞的子代。因为后代中可能由于环境影响或突变而发生某些修饰,所以这种子代可能与亲代细胞不同,但仍包括在术语“宿主细胞”的范围内。

[0098] 如本文公开的抗体可以通过技术人员已知的任何方法产生。在优选的实施方式中,使用细胞产生所述抗体,优选地其中所述细胞是杂交瘤细胞、CHO细胞、NSO细胞或PER-C6<sup>TM</sup>细胞。在特别优选的实施方式中,所述细胞是CHO细胞,优选地所述细胞在无血清培养基中培养。这包括从所述培养物中收获所述抗体。所述抗体优选地从培养基中纯化,优选地所述抗体是亲和纯化的。可替代地,所述抗体可以合成产生。

[0099] 各种机构和公司已经开发了用于大规模生产抗体的细胞系,例如用于临床使用。这些细胞也用于其他目的,如生产蛋白质。为蛋白质和抗体的工业规模生产而开发的细胞系在本文中进一步称为工业细胞系。因此,本公开的优选实施方式提供了为大规模生产所述抗体而开发的细胞系的用途。

[0100] 根据本发明的抗体表现出多种活性,所述活性可以有利地用于治疗和非治疗用途。特别地,根据本发明的抗体可用于个体的治疗。优选地,根据本发明的抗体可用于治疗免疫相关疾病或预防免疫相关疾病。在优选的实施方式中,根据本发明的抗体可用于治疗癌症。在一些实施方式中,根据本发明的抗体优选地用于疗法,优选人疗法。在一些实施方式中,如本文公开的抗体可以用于研究目的。例如,在体外实验、细胞培养、器官型培养和体内模型中。

[0101] 还描述了用于治疗癌症的方法。癌症的例子是例如：黑色素瘤、食管鳞状细胞癌、肝细胞癌和结肠直肠癌。

[0102] 本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如本文公开的抗体。还提供了一种制备用于治疗患有癌症的受试者的药物的方法。本公开描述了用于通过阻止BTLA与HVEM以及CD160与HVEM结合来阻止抑制T细胞激活的方法。

[0103] 本发明提供了一种用于治疗患有炎症疾病的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如本文公开的抗体。还提供了一种制备用于治疗患有炎症疾病的受试者的药物的方法。本公开描述了用于通过阻止BTLA与HVEM以及CD160与HVEM结合来阻止抑制T细胞激活的方法。

[0104] 本公开还包括一种药物组合物，其包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段，或编码其的核酸，或包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段，或编码其的核酸的细胞。提供了药物组合物，其包含根据本发明的多肽或其药学上可接受的盐，以及至少一种药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。此类组合物特别适合用作药物。所述组合物可以呈任何合适的形式，如液体、半固体和固体剂型。所选择的配制品的剂量和时间表可以通过技术人员熟知的标准程序来确定。此类程序包括从动物模型中推断和估计给药时间表，然后在人类临床剂量范围研究中确定最佳剂量。药物组合物中的剂量将取决于许多因素而变化，如所需的释放和药效学特征。

[0105] 本公开的一个实施方式提供了一种如本文所述的药物组合物，其用于预防或治疗癌症和/或免疫相关病症。

[0106] 还提供了调节HVEM信号传导活性的方法。术语“调节”是指调整系统输出信号的活动。输出信号或输出可以以抑制输出信号变成刺激输出信号的方式进行调整，反之亦然。本发明提供了一种调节HVEM信号传导的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如本文公开的抗体。不受理论的束缚，据信HVEM向表达BTLA或CD160的T细胞递送共抑制信号。另一方面，当LIGHT和TNFB与T细胞上表达的HVEM相互作用时，它们向T细胞递送共刺激信号。当LIGHT和/或TNFB、BTLA和/或CD160同时与HVEM相互作用时，净结果是针对T细胞激活的抑制信号。这种相互作用是双向的：HVEM在与T细胞上的BTLA和CD160相互作用后，在T细胞中诱导抑制信号，而BTLA和CD160二者都作为HVEM的激活配体，从而导致NF $\kappa$ B激活。此外，LIGHT在与T细胞上表达的HVEM相互作用时将共刺激信号递送至T细胞，并且HVEM也被认为在与T细胞表达的LIGHT相互作用时将共刺激信号传递至T细胞。然而，LIGHT不包含明显的信号传导基序，并且其用于信号传导的机制也不完全确定。

[0107] 由HVEM和BTLA在T细胞中传递的共刺激和共抑制信号传导可以NF $\kappa$ B或NFAT的水平，以及IL-2、TNF $\alpha$ 和IFN $\gamma$ 的释放来测量。测量NFAT水平的方法是本领域已知的。例如，在实施例3c中描述了示例性方法，其结果在图4A-B中描绘。测量NF $\kappa$ B水平的方法是本领域已知的。例如，在实施例6f中描述了示例性方法，其结果在图8A-C中描绘。测量IL-2、TNF $\alpha$ 和IFN $\gamma$ 水平的方法是本领域已知的。例如，在实施例6k中描述了示例性方法，其结果在图11A-C中描绘。

[0108] 在一个方面，本公开提供了一种用于调节HVEM信号传导活性的方法，所述方法包括将HVEM表达细胞与如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体接触。在一个

方面,本公开提供了一种用于增加受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体。

[0109] 在一个方面,本公开提供了一种用于减少受试者中肿瘤生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如本文公开的抗体或其抗原结合片段、核酸分子或载体。

[0110] 如本文所用,“受试者”是人或动物。受试者包括但不限于哺乳动物,如人、猪、雪貂、海豹、兔、猫、狗、牛和马,以及鸟类,如鸡、鸭、鹅和火鸡。在本发明的优选实施方式中,受试者是哺乳动物。在特别优选的实施方式中,受试者是人。

[0111] 术语抗体的“抗原结合片段”是指全长抗体的一个或多个部分,其保留了与所述抗体所结合的共同抗原(即,人HVEM)结合的能力。术语“抗原结合片段”还包括抗体的一部分,其是通过非共价或共价缔合形成的较大分子的一部分,或者是抗体部分与一个或多个另外的分子实体的一部分。另外的分子实体的例子包括氨基酸、肽或蛋白质,如链霉亲和素核心区,其可以用于制备四聚体scFv分子(Kipriyanov等人Hum Antibodies Hybridomas 1995; 6(3):93-101)。示例性抗原结合片段是抗体的VH和/或VL。抗原结合片段包括Fab、F(ab')<sub>2</sub>、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、二价单链抗体和其他抗原识别免疫球蛋白片段。在一些情况下,如本文所用的术语“抗体”可以理解为也包括其抗原结合片段。

[0112] 术语“人抗体”是指仅由人免疫球蛋白序列的氨基酸序列组成的抗体。如果在小鼠、小鼠细胞或来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生,则人抗体可以含有鼠糖链。人抗体可以以本领域已知的多种方式制备。

[0113] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体或T细胞受体或以其他方式与分子相互作用的抗原部分。“表位”在本领域中也称为“抗原决定簇”。表位通常由分子的化学活性表面分组组成,如氨基酸或碳水化合物或糖侧链。表位可以是“线性的”或“非线性/构象的”。一旦确定了所需的表位(例如,通过表位作图),则可以产生针对所述表位的抗体。抗体的产生和表征也可以提供关于所需表位的信息。从此信息,然后可以筛选与相同表位结合的抗体,例如通过进行交叉竞争研究来发现相互竞争结合的抗体,即抗体竞争与抗原的结合。

[0114] 如本文所用,“包括”及其变形以其非限制性的意义使用,意指包括所述词后面的项目,但不排除没有具体提到的项目。另外,动词“由……组成”可以由“基本上由……组成”替换,这意味着如本文定义的化合物或附属化合物可以包含除了具体鉴定的那些之外的一种或多种另外的组分,所述一种或多种另外的组分不改变本发明的独特特征。

[0115] 如本文所用的冠词“一个”和“一种”是指一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)所述冠词的语法宾语。通过举例的方式,“元件”意指一个元件或多于一个元件。

[0116] 词语“大约”或“约”当与数值(大约10,约10)结合使用时优选地意指所述值可以是给定值10的所述值的±1%。

[0117] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指逆转、减轻、延迟疾病或障碍的发作或抑制其进展,或其一种或多种症状,如本文所述。在一些实施方式中,可以在一种或多种症状出现后施用治疗。在其他实施方式中,可以在不存在症状的情况下施用治疗。例如,可以在症状发作之前向易感个体给予治疗(如,根据症状史和/或根据遗传因素或其他易感性因素)。治疗也可以在症状已经消退之后继续进行,例如,

以预防或延迟其复发。

[0118] 出于清楚和简明描述的目的, 本文将特征描述为相同或单独实施方式的一部分。然而, 将理解, 本发明的范围可以包括具有所描述特征中的全部或一些的组合的实施方式。

[0119] 在本申请中引用的全部专利和文献参考文件通过引用以其全部内容特此并入。

[0120] 在以下实施例中进一步解释本发明。这些实施例不限制本发明的范围, 而仅用于阐明本发明。

## 附图说明

[0121] 图1. 小鼠抗人HVEM抗体与HEK293F细胞上的膜结合全长人HVEM、缺失CRD1的膜结合人HVEM、或膜结合全长食蟹猴HVEM的流式细胞术结合特征。虚线代表背景(即, 无小鼠抗人HVEM抗体结合)。

[0122] 图2. 小鼠抗人HVEM抗体对(A)可溶性人BTLA和(B)可溶性人LIGHT与HEK293F细胞上的膜结合全长人HVEM结合的作用。虚线代表阴性对照(即, 不添加小鼠抗人抗体或添加小鼠IgG1阴性同种型对照的配体/受体结合=配体与HVEM受体100%结合)。

[0123] 图3. (A)小鼠抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中NF $\kappa$ B信号传导的作用。可溶性人LIGHT配体被包括作为参考。(B)小鼠抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT( $\approx$ EC80)诱导的NF $\kappa$ B信号传导的作用。示出了平均值 $\pm$ SD(n=2)。

[0124] 图4. (A)NFAT应答元件-荧光素酶(RE-luc)人BTLA/HVEM阻断生物测定的测定原理: 将(1)表达膜人HVEM和专有膜人T细胞受体(TCR)激活物的CHO-K1激活细胞(即, 人工抗原呈递细胞(aAPC))和(2)表达膜人BTLA和膜人TCR复合物的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞的组合用于检查小鼠抗人HVEM抗体阻断TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制的能力。(B)小鼠抗人HVEM抗体对表达膜结合人BTLA/人TCR的Jurkat效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜结合人BTLA/人HVEM介导的抑制的作用。示出了平均值 $\pm$ SD(n=2)。

[0125] 图5. 纯化的BTLA/HVEM阻断小鼠相比于嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体与HEK293F细胞上的膜结合(全长)人HVEM的流式细胞术结合特征。示出了平均值 $\pm$ SD(n=2)。

[0126] 图6. 纯化的BTLA/HVEM阻断小鼠相比于嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对(A)可溶性人BTLA、(B)可溶性人CD160、(C)可溶性人LIGHT和(D)可溶性人TNF $\beta$ 与HEK293F细胞上的膜结合全长人HVEM结合的作用。虚线代表阴性对照(即, 添加小鼠IgG1或人IgG4阴性同种型对照的配体/受体结合=配体与HVEM受体100%结合)。示出的平均值 $\pm$ SD(n=2-3)来自一个(D)、两个(A和B)或三个(C)独立进行的实验。

[0127] 图7. 纯化的BTLA/HVEM嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对预先结合的(A)可溶性人BTLA、(B)可溶性人CD160、(C)可溶性人LIGHT和(D)可溶性人TNF $\beta$ 从HEK293F细胞上的膜结合全长人HVEM置换的作用。虚线代表阴性对照(即, 添加人IgG4阴性同种型对照的配体/受体结合=配体与HVEM受体100%结合)。示出了平均值 $\pm$ SD(n=2)。

[0128] 图8. (A)纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中NF $\kappa$ B信号传导的作用。可溶性人LIGHT配体被包括作为参考。(B)非交联相比于交联纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中NF $\kappa$ B信号传导的作用。可溶性人LIGHT配体被包括作为参考。(C)纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT( $\approx$ EC80)诱导的NF $\kappa$ B信号传导

的作用。示出的平均值±SD (n=2) 来自一个 (B) 或两个 (A和C) 独立进行的实验。

[0129] 图9. (A) 可溶性人TNFβ配体对表达膜结合人HVEM的细胞中NFκB信号传导的作用。(B) 纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜结合人HVEM的细胞中可溶性人TNFβ(≈EC80) 诱导的NFκB信号传导的作用。示出了平均值±SD (n=3)。

[0130] 图10. 纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜结合人BTLA/人TCR的Jurkat效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜结合人BTLA/人HVEM介导的抑制的作用。示出的平均值±SD (n=2) 来自两个独立进行的实验。

[0131] 图11. 纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对从6名健康供体(供体A、C、D、G、H和K) 富集的表达膜结合人BTLA/人TCR的原代幼稚人T细胞释放TCR诱导的(图上行) 和TCR/CD28诱导的(图下行) IL-2 (A)、TNFα (B) 或IFNγ (C) 的膜结合人BTLA/人HVEM介导的抑制的作用。虚线代表基础细胞因子释放(即,暴露于人IgG4/κ阴性同种型对照)。示出了平均值±SD (n=5)。

[0132] 实施例

[0133] 实施例1. 小鼠抗人HVEM单克隆抗体的产生

[0134] (a). 表达表面人HVEM的Sf9昆虫细胞和HEK293F细胞的产生

[0135] 将编码人HVEM蛋白的cDNA (Swiss-Prot号Q92956.3; 参见SEQ ID NO.1) 优化用于哺乳动物表达,并由德国雷根斯堡(Regensburg, Germany)的GENEART合成(参见SEQ ID NO.2)。将此cDNA亚克隆到杆状病毒转移质粒pVL1393 (BD转染试剂盒目录号560129; BD生物科学公司(BD Biosciences))中。随后,使用baculoCOMPLETE一体化试剂盒(Oxford Expression Technologies公司),用含有编码人HVEM的cDNA的转移质粒pVL1393转染Sf9昆虫细胞(草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)),然后在27℃下孵育4-5天。在此转染步骤后,收集上清液并储存在4℃下,并且用于感染更多Sf9昆虫细胞以进行病毒扩增。出于此目的,用扩增的重组杆状病毒转染Sf9昆虫细胞,然后在27℃下孵育3-5天。收获这些Sf9昆虫细胞,用无菌PBS洗涤,并在PBS中以 $20.0 \times 10^6$ 个细胞/mL等分,并且储存在-80℃下以获得细胞裂解物。在储存之前,使用1:20稀释的藻红蛋白(PE)缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122; eBioscience)和流式细胞术来证实转染的Sf9昆虫细胞上的人HVEM表面表达。

[0136] 将编码人HVEM蛋白的cDNA (Swiss-Prot号Q92956.3; 参见SEQ ID NO.1) 优化用于哺乳动物表达,并由德国雷根斯堡的GENEART合成(参见SEQ ID NO.2)。将此cDNA亚克隆到pcDNA3.1衍生的表达质粒中。使用FreeStyle™ 293表达系统(Life Technologies公司),将此全长人HVEM质粒转染到FreeStyle™293F细胞(Life Technologies公司)中。使用125μg/mL G418 (Gibco) 选择稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)。收获这些HEK293F细胞,用无菌PBS洗涤,并在PBS中以 $19.0 \times 10^6$ 个细胞/mL等分,并且储存在-80℃下以获得细胞裂解物。在储存之前,使用1:20稀释的藻红蛋白(PE)缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122; eBioscience)和流式细胞术来证实转染的HEK293F细胞上的人HVEM表面表达。

[0137] (b). 小鼠抗人HVEM单克隆抗体的免疫和产生

[0138] 应用了两种免疫方案:

[0139] 在第一种免疫方案期间,在第0天对BALB/c小鼠(雌性,6-8周龄; Charles River实

验室)皮下注射约500 $\mu$ L在油包水乳化完全弗氏佐剂(CFA;西格玛公司)或水包油乳化Sigma佐剂系统®(SAS;西格玛公司)中的可溶性重组C-末端多组氨酸标记的人胞外HVEM结构域(NCBI参考SEQ NP\_003811.2;Sino Biological公司);对每只小鼠注射在与250 $\mu$ L CFA或SAS混合的250 $\mu$ L PBS中的25 $\mu$ g重组人HVEM。在第21天,通过皮下注射在不完全弗氏佐剂(IFA;西格玛公司)或SAS中的重组人HVEM来增强抗体应答;对每只小鼠注射在与250 $\mu$ L IFA或SAS混合的250 $\mu$ L PBS中的25 $\mu$ g重组人HVEM。在第42天和第87天,通过皮下注射在IFA或SAS中的重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物再次增强小鼠;对每只小鼠注射在与250 $\mu$ L IFA或SAS混合的250 $\mu$ L PBS中的25 $\mu$ g重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物(由 $1.8 \times 10^6$ 个活的和表达膜结合HVEM的细胞制备)。最后,在第98天和第99天对小鼠腹膜内注射不含佐剂的重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物;对每只小鼠注射在250 $\mu$ L PBS中的25 $\mu$ g重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物(由 $1.8 \times 10^6$ 个活的和表达膜结合HVEM的细胞制备)。在第102天,使用如下所述最初由Köhler和Milstein(Nature 1975, 256:495)描述的标准杂交瘤技术,将来自免疫小鼠的脾细胞与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞(DSMZ)融合。

[0140] 在第二种免疫方案期间,在第0天对BALB/c小鼠(雌性,6-8周龄;Charles River实验室)皮下注射约500 $\mu$ L在CFA或SAS中或不含佐剂的可溶性重组C-末端多组氨酸标记的人胞外HVEM结构域(NCBI参考SEQ NP\_003811.2;Sino Biological公司)和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物或人HVEM转染的HEK293F细胞裂解物;对每只小鼠注射在与或不与250 $\mu$ L CFA或SAS混合的250 $\mu$ L PBS中的10-20 $\mu$ g重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞或HEK293F细胞裂解物(二者均由 $5.0 \times 10^6$ 个活的和表达膜结合HVEM的细胞制备)。在第21天和第42天,通过皮下注射在IFA或SAS中或不含佐剂的重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物或人HVEM转染的HEK293F细胞裂解物来增强抗体应答;对每只小鼠注射在与或不与250 $\mu$ L IFA或SAS混合的250 $\mu$ L PBS中的10-20 $\mu$ g重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞或HEK293F细胞裂解物(二者均由 $5.0 \times 10^6$ 个活的和表达膜结合HVEM的细胞制备)。最后,在第59天和第64天对小鼠腹膜内注射不含佐剂的重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞裂解物或人HVEM转染的HEK293F细胞裂解物;对每只小鼠注射在250 $\mu$ L PBS中的10-20 $\mu$ g重组人HVEM和人HVEM转染的Sf9昆虫细胞或HEK293F细胞裂解物(二者均由 $5.0 \times 10^6$ 个活的和表达膜结合HVEM的细胞制备)。在第67天,使用最初由Köhler和Milstein(Nature 1975, 256:495)描述的标准杂交瘤技术,将来自免疫小鼠的脾细胞与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞(DSMZ)融合。简而言之,将免疫的小鼠处死。从脾中挑取脾细胞,并在含GlutaMax培养基(SF培养基;英杰公司(Invitrogen))的无血清opti-MEM® I中洗涤。将对数生长的SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞在SF培养基中洗涤,并添加到脾细胞中,从而产生5:1比率的脾细胞与骨髓瘤细胞。然后沉淀细胞,并去除上清液。然后在60秒内滴加1ml 37% (v/v)的聚乙二醇4000(默克公司(Merck))溶液,之后将细胞在37°C下再孵育60秒。然后在温和搅拌下缓慢添加8ml SF培养基,随后是5ml opti-MEM® I和GlutaMax/10% (v/v)胎牛血清(FCS;Bodinco公司)。在室温(RT)下30分钟后,将细胞沉淀,在含有GlutaMax/10%FCS的opti-MEM® I中洗涤以除去残留的聚乙二醇,并最终将细胞以 $0.1 \times 10^6$ 个细胞/200 $\mu$ L/孔的浓度铺在氨基蝶呤选择培养基(即, opti-MEM® I,其含有补充有50x Hybri-Max™氨基蝶呤(从头DNA合成抑制剂;西格玛公司)的GlutaMax/10%FCS)中。从第7天开始,每2-3天将氨基蝶呤选择培养基重新装满,并且在

第13-14天,用含有GlutaMax/10%FCS的opti-MEM I替换氨基蝶呤选择培养基。

[0141] (c).筛选存在小鼠抗人HVEM单克隆抗体

[0142] 从融合后第13天开始,使用以可溶性重组C-末端多组氨酸标记的人HVEM (rhuHVEM;Sino Biological公司)作为靶蛋白的ELISA,筛选生长中杂交瘤的上清液中是否存在小鼠抗人HVEM抗体(即,“高亲和力”IgG,与“低亲和力”IgM相反)。为此,在4-8°C下在16-24小时期间,使用半面积平底96孔EIA板(康宁公司(Corning)),以1 $\mu$ g/mL将rhuHVEM包被于PBS(50ng/50 $\mu$ L/孔)。在用PBS/0.05%、w/v、Tween 20充分洗涤后,将板用PBS/0.05% Tween 20/1%、w/v、牛血清白蛋白(BSA;罗氏公司(Roche))在RT下封闭1小时。随后,将板与50 $\mu$ L未稀释的杂交瘤上清液/孔在RT下孵育1小时。在PBS/0.05% Tween20中充分洗涤后,在RT下用1:5000稀释的辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)测定抗体的结合1小时,随后用TMB底物的即用型溶液(英杰公司)进行比色检测。在添加1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>后,使用微板读数器(iMark型号;BioRad公司)在450nm波长(参考波长为655nm)下测量抗体结合。

[0143] 从融合后第13天开始,还使用以膜结合人HVEM作为靶蛋白的基于细胞的ELISA,筛选并证实来自生长中杂交瘤的上清液的小鼠抗人HVEM抗体(即,“高亲和力”IgG,与“低亲和力”IgM相反)产生。为此,在4-8°C下在16-24小时期间,使用半面积平底96孔EIA板(康宁公司),以2 $\times$ 10<sup>6</sup>个活细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128;参见以上实施例1a)包被在PBS中(0.1 $\times$ 10<sup>6</sup>个活细胞/50 $\mu$ L/孔)。平行运行未转染(即,膜结合人HVEM表达为阴性)的野生型(WT)HEK293F包被的细胞作为阴性对照。在用PBS/0.05%、w/v、Tween 20充分洗涤后,将板用PBS/0.05% Tween 20/1%、w/v、BSA(罗氏公司)在RT下封闭1小时。随后,将板与50 $\mu$ L未稀释的杂交瘤上清液/孔在RT下孵育1小时。在PBS/0.05% Tween 20中充分洗涤后,在RT下用1:5000稀释的辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)测定抗体的结合1小时,随后用TMB底物的即用型溶液(英杰公司)进行比色检测。在添加1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>后,使用微板读数器(iMark型号;BioRad公司)在450nm波长(参考波长为655nm)下测量抗体结合。

[0144] 从融合后第13天开始,还使用以膜结合人HVEM作为靶蛋白的FACS,筛选并证实来自生长中杂交瘤的上清液的小鼠抗人HVEM抗体(即,“高亲和力”IgG,与“低亲和力”IgM相反)产生。为此,在4°C下以10 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128;参见以上实施例1a)置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10分钟,所述盐水含有0.1%BSA(西格玛公司)/0.05%NaN<sub>3</sub>(PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>),补充有50 $\mu$ g/mL人IgG(阻断可能的Fc $\gamma$ 受体;西格玛公司)。然后,将10 $\mu$ L/管(即,0.1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞)的这些细胞与100 $\mu$ L未稀释杂交瘤上清液/管在4°C下孵育30分钟。平行运行未转染(即,膜结合人HVEM表达为阴性)的WT HEK293F细胞作为阴性对照,以确定抗体特异性。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,随后在4°C下将细胞与1:200稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4°C下将细胞在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中的2%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量抗体结合。

[0145] 扩增并冷冻保存三重HVEM阳性(即,ELISA中的rhuHVEM+、ELISA中的膜HVEM+ HEK293F细胞,以及FACS中的膜HVEM+HEK293F细胞)杂交瘤。来自这些三重HVEM阳性杂交瘤的上清液显示与未转染(即,膜结合人HVEM表达为阴性)的WT HEK293F细胞无反应性。使用

这种方法产生了18个产生抗人HVEM特异性抗体的杂交瘤。使用蛋白G柱(通用电气医疗公司(GE Healthcare))从这些产生抗人HVEM特异性抗体的杂交瘤上清液中纯化小鼠抗体。使用IsoStrip™小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(罗氏公司)对重链和轻链进行同种型类别分型。随后,如实施例2中所述,测试来自这些产生抗人HVEM特异性抗体的杂交瘤的上清液和/或纯化抗体对与膜结合人HVEM结合的人HVEM配体(即,人BTLA和人LIGHT)的作用、与缺失富含半胱氨酸的结构域1(CRD1)的膜结合人HVEM的结合,以及与膜结合食蟹猴HVEM的交叉反应性。另外,如实施例3中所述,测试从这些产生抗人HVEM特异性抗体的杂交瘤中选择的这些纯化抗体对表达膜人HVEM的细胞中NFκB信号传导、对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT诱导的NFκB信号传导,以及对表达膜人BTLA/人TCR的细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/人HVEM介导的抑制的作用。

[0146] 实施例2. 小鼠抗人HVEM单克隆抗体的流式细胞术表征

[0147] (a). 小鼠抗人HVEM抗体与膜结合全长人HVEM和缺失CRD1的膜结合人HVEM的结合

[0148] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体的良好特异性,通过结构域作图确定由产生的小鼠抗人HVEM抗体识别的一个或多个表位的位置。通过FACS分析测定小鼠抗人HVEM抗体与(HEK衍生的)293F细胞表面上表达的CRD1截短的人HVEM结合的能力。

[0149] 基于文献(Swiss-Prot号Q92956.3;Montgomery等人,Cell 1996;87:427-436;Hsu等人,J Biochem Chem 1997;272:13471-13474;Naismith等,Trends Biochem Sci 1998;23:74-79;Carfi等人Molecul Cell 2001;8:169-179;Bodmer等人,Trends Biochem Sci 2002;27:19-26;Compaan等人,J Biochem Chem 2005;280:39553-39561),鉴定了人HVEM胞外区中富含半胱氨酸的结构域(CRD),并编码为CRD1、CRD2、CRD3和(截短的)CRD4。CRD含有拓扑上不同类型的模块,称为A模块和B模块。A模块是C型结构,并且B模块是S型结构。典型的CRD通常由具有6个保守半胱氨酸残基的A1-B2模块或A2-B1模块(或者,不太常见的,不同的一对模块,如A1-B1)构成,其中数字表示每个模块内二硫键的数量。人HVEM-CRD1包含A1-B2-模块(42-75,参见SEQ ID NO.1),人HVEM-CRD2包含A1-B2-模块(78-119,参见SEQ ID NO.1),人HVEM-CRD3包含A2-模块和非典型(使人想起B1-模块)B0-模块(121-162,参见SEQ ID NO.1),并且人截短的HVEM-CRD4仅包含A1-模块(165-179,参见SEQ ID NO.1)。产生并表达了两种不同的人HVEM构建体:(1)全长人HVEM构建体,其起始于N-末端CRD1(即,CRD1 A1-B2模块覆盖氨基酸42-75,参见SEQ ID NO.1),并且因此称为“全长”,并包含氨基酸1-283(参见SEQ ID NO.1),和(2)“CRD1截短的”构建体,其起始于N-末端CRD2(即,CRD2 A1-B2模块覆盖氨基酸22-63,参见SEQ ID NO.3),并包含与小鼠Ig信号肽氨基酸1-19连接的氨基酸20-227(参见SEQ ID NO.3)。将编码CRD1截短的人HVEM蛋白的cDNA(Swiss-Prot号Q92956.3)优化用于哺乳动物表达,并由德国雷根斯堡的GENEART合成(参见SEQ ID NO.4)。将此cDNA亚克隆到pcDNA3.1衍生的表达质粒中。

[0150] 实施例1a中描述了人“全长”HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)的产生。使用FreeStyle™ 293表达系统(英杰公司),用人HVEM的“CRD1截短”变体瞬时转染FreeStyle™ 293F细胞(英杰公司)。在72小时后,通过FACS分析来分析转染细胞上的表面人HVEM表达。为此,在4°C下以 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞和瞬时人“CRD1截短的”HVEM转染的HEK293F细胞置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10分钟,所述盐水含有0.1% BSA(西格玛公司)/0.05%NaN<sub>3</sub>(PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>),补充有50μg/mL人IgG(阻断可能的Fcγ受体;

西格玛公司)。然后,将10 $\mu$ L/管(即,0.1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞)的这些细胞与100 $\mu$ L未稀释杂交瘤上清液/管在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。以1:20运行藻红蛋白(PE)缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122;eBioscience公司)作为阳性对照抗体。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,随后在4 $^{\circ}$ C下将细胞与1:200稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下将细胞在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中的2%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量抗体结合。

[0151] 如图1所示,所有18个检查的小鼠抗人HVEM抗体均识别转染的HEK293F细胞上的全长人HVEM,而这些小鼠抗人HVEM抗体中的大多数(15/18)没有显示与转染的HEK293F细胞上的“CRD1截短的”人HVEM结合。相比之下,小鼠抗人HVEM抗体编号38G10、39B9和47E10识别转染的HEK293F细胞上的“CRD1截短的”人HVEM。

[0152] 这些结果表明,小鼠抗人HVEM抗体编号38G10、39B9和47E10似乎识别人HVEM胞外结构域的CRD2、CRD3、CRD4和/或“接头”片段(aa序列124-146,参见SEQ ID NO.3)中的线性和/或非线性/构象表位,而所有其他产生的小鼠抗人HVEM抗体(15/18)似乎识别人HVEM胞外结构域的CRD1中的线性和/或非线性/构象表位。

[0153] (b). 小鼠抗人HVEM抗体与膜结合食蟹猴HVEM的结合

[0154] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体的多物种交叉反应性,通过FACS分析测定小鼠抗人HVEM抗体与(HEK衍生的)293F细胞表面上表达的食蟹猴HVEM结合的能力。

[0155] 将编码食蟹猴HVEM蛋白的cDNA(参见SEQ ID NO.5;NCBI参考序列XP\_005545061.1)优化用于哺乳动物表达,并由德国雷根斯堡的GENEART合成(参见SEQ ID NO.6)。将此cDNA亚克隆到pcDNA3.1衍生的表达质粒中。

[0156] 实施例1a中描述了人“全长”HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)的产生。使用FreeStyle™ 293表达系统(英杰公司),用食蟹猴(全长)HVEM瞬时转染FreeStyle™ 293F细胞(英杰公司)。在72小时后,通过FACS分析来分析转染细胞上的表面食蟹猴HVEM表达。为此,在4 $^{\circ}$ C下以10 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞和瞬时食蟹猴全长HVEM转染的HEK293F细胞置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10分钟,所述盐水含有0.1%BSA(西格玛公司)/0.05%NaN<sub>3</sub>(PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>),补充有50 $\mu$ g/mL人IgG(阻断可能的Fc $\gamma$ 受体;西格玛公司)。然后,将10 $\mu$ L/管(即,0.1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞)的这些细胞与100 $\mu$ L未稀释杂交瘤上清液/管在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。以1:20运行藻红蛋白(PE)缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122;eBioscience公司)作为阳性对照抗体。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,随后在4 $^{\circ}$ C下将细胞与1:200稀释的PE缀合的山羊抗小鼠IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下将细胞在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中的2%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量抗体结合。

[0157] 如图1所示,所有18个检查的小鼠抗人HVEM抗体均识别转染的HEK293F细胞上的全长人HVEM,并且这些小鼠抗人HVEM抗体中的大多数(14/18)显示出与转染的HEK293F细胞上的食蟹猴全长HVEM的交叉反应性(程度可变)。相比之下,小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、37D11、41F11和49A11不识别转染的HEK293F细胞上的食蟹猴全长HVEM。

[0158] 这些结果表明,产生的小鼠抗人HVEM抗体中的大多数(14/18)似乎识别食蟹猴全

长HVEM胞外结构域的CRD1、CRD2、CRD3、CRD4和/或“接头”片段(aa序列180-203,参见SEQ ID NO.5)中的线性和/或非线性/构象表位。

[0159] 全长食蟹猴HVEM蛋白(Met1-Ser280;NCBI参考序列:XP\_005545061.1)的预测氨基酸序列显示与人HVEM蛋白(Met1-His283;Swiss-Prot号Q92956.3)的氨基酸序列的82%同源性,并且食蟹猴HVEM(即,Leu39-Val203;NCBI参考序列:XP\_005545061.1)胞外区的预测氨基酸序列显示与人HVEM蛋白胞外区(即,Leu39-Val202;Swiss-Prot号Q92956.3)的氨基酸序列的87%同源性。这些结果表明,产生的小鼠抗人HVEM单克隆抗体中的大多数(14/18)与转染的HEK293F细胞上的同源食蟹猴HVEM交叉反应。

[0160] (c). 小鼠抗人HVEM抗体对人BTLA和人LIGHT与膜结合人HVEM结合的作用

[0161] 胞外HVEM具有两个空间配体结合区域(Cai等人Immunol Rev 2009;229:244-258;Steinberg等人Immunol Rev 2011;244:169-187;Pasero等人Curr Opin Pharmacol 2012;12:478-485),一个区域用于典型配体,其属于TNF超家族(即,LIGHT和TNF $\beta$ ),并且另一个区域用于非典型配体,其属于Ig超家族(即,BTLA和CD160)。突变分析和分子建模揭示BTLA和CD160与CRD1相互作用,而LIGHT和TNF $\beta$ 结合位于HVEM对面的CRD2和CRD3中。

[0162] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体对人BTLA和人LIGHT与膜结合人HVEM结合的作用,通过FACS分析测定小鼠抗人HVEM抗体在空间上阻碍人BTLA和人LIGHT在(HEK衍生的)293F细胞表面上表达的人全长HVEM上相互作用的能力。

[0163] 实施例1a中描述了人“全长”HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)的产生。通过FACS分析分析可溶性人BTLA、可溶性人CD160和可溶性人LIGHT在表面人HVEM转染的细胞上的结合。为此,在4 $^{\circ}$ C下以 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10min,所述盐水含0.1%BSA(西格玛公司)/0.05%Na $_3$ N(PBS/BSA/Na $_3$ N),补充有50 $\mu$ g/mL人IgG(阻断可能的Fc $\gamma$ 受体;西格玛公司)。然后,将10 $\mu$ L/管(即,0.1 $\times 10^6$ 个细胞)的这些细胞与或不与10 $\mu$ g/mL/管的100 $\mu$ L蛋白G纯化的小鼠抗HVEM抗体或10 $\mu$ g/mL/管的阴性对照小鼠IgG1(BD Biosciences公司)在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。此之后(即,不洗涤),随后在4 $^{\circ}$ C下将细胞与在PBS/BSA/Na $_3$ N中的1 $\mu$ g/mL可溶性人BTLA-人Fc $\gamma$ 融合蛋白(Sino Biological公司)或0.1 $\mu$ g/mL可溶性his标记的人LIGHT(R&D Systems公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/Na $_3$ N中充分洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下以10 $\mu$ g/mL将细胞与生物素化的小鼠抗人IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(检测BTLA;Southern Biotech公司)或以5 $\mu$ g/mL与生物素化的小鼠抗his抗体(检测LIGHT;R&D Systems公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/Na $_3$ N中充分洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/Na $_3$ N中充分洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下将细胞在PBS/BSA/Na $_3$ N中的2%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量配体BTLA和LIGHT在膜人HVEM上的结合。

[0164] 如图2和表1所示,发现了四种类型的小鼠抗人HVEM抗体:(1型抗体;6/18)非阻断BTLA/HVEM和LIGHT/HVEM相互作用,(2型抗体;3/18)阻断BTLA/HVEM相互作用和非阻断LIGHT/HVEM相互作用,(3型抗体;4/18)非阻断BTLA/HVEM相互作用和阻断LIGHT/HVEM相互作用,和(4型抗体;5/18)阻断BTLA/HVEM和LIGHT/HVEM相互作用。

[0165] 表1. 小鼠抗人HVEM抗体对与人HVEM膜受体(mHVEM)结合的可溶性人BTLA(sBTLA)配体、可溶性人CD160(sCD160)和可溶性人LIGHT(sLIGHT)配体的阻断作用汇总。

[0166]	阻断配体-mHVEM 相互作用			与 CRD1 截短的 HVEM 结合	
	抗 HVEM Ab	sBTLA	sCD160		sLIGHT
	8H5	+++	++	+	-
	29C2	-	-*	++	-
	36H12	+++	+++	+++	-
	37D11	-	-	-	-
	38B12	-	-	+	-
	38G10	-	-	-	-/+
	39B9	-	-	-	+
	41D7	-	-	-	-
	43E10	-	-	-	-
[0167]	45C6	-*	-	+	-
	45H6	+++	+++	+++	-
	47E10	-	-	-	-/+
	48H6	+++	+++	++	-
	11H7	+++	+++	-	-
	41F11	++	++	-/+	-
	49A11	++	++	-	-
	49G4	+++	+++	+++	-
	52D3	-*	-*	++	-

[0168] - = 不阻断配体-受体相互作用 (-\* = 增强配体与人HVEM的结合), + = 弱阻断配体-受体相互作用, ++ = 中等阻断配体-受体相互作用, +++ = 强阻断配体-受体相互作用; 与CRD1截短的人HVEM结合的最后列。所有抗体都与全长人HVEM结合。

[0169] 这些结果表明,产生了一组具有多种特征的人配体阻断和配体非阻断小鼠抗人HVEM抗体(即,1-4型小鼠抗人HVEM抗体(参见上文))。值得注意的是,结合CRD1样(36H12、45H6)的抗体可能或可能不(52D3)阻断sBTLA或sCD160的结合。CRD1抗体52D3确实似乎增强了一种或多种配体的结合。另外,它清楚地显示了CRD1靶向抗体的不同功能活性。

[0170] 实施例3. 小鼠抗人HVEM单克隆抗体的生物学表征

[0171] (a). 小鼠抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中NF $\kappa$ B信号传导的作用

[0172] HVEM信号传导可以诱导来自免疫系统的多种HVEM表达细胞(如T和B淋巴细胞以及树突细胞)中的NF $\kappa$ B激活,从而开启对其细胞功能重要的几个基因。通过LIGHT将HVEM连接在T淋巴细胞上提供了阳性共刺激信号,这导致T淋巴细胞的存活、增殖和分化以及IFN $\gamma$ 分泌(Del Rio等人,Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。通过LIGHT将HVEM连接

在B淋巴细胞上共刺激CD40L介导的增殖和抗体分泌,从而增强体液应答(DeI Rio等人, Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。通过LIGHT将HVEM连接在未成熟树突细胞上共刺激CD40L介导的成熟、细胞因子分泌(IL-12、IL-6和TNF- $\alpha$ ),以及特异性抗肿瘤CTL的引发及其IFN- $\gamma$ 的产生(DeI Rio等人, Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。

[0173] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体对膜结合人HVEM介导的NF $\kappa$ B信号传导的作用,将NF $\kappa$ B应答元件-荧光素酶(RE-luc)人HVEM生物测定报告细胞(HEK293;普洛麦格公司)用于检查小鼠抗人HVEM抗体激活HVEM介导的NF $\kappa$ B信号传导的能力。

[0174] 简而言之,将表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞以35000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.0015-10 $\mu$ g/mL(3倍稀释步骤)小鼠抗人HVEM抗体一起孵育。平行运行滴定(即,0、0.0015-10 $\mu$ g/mL(3倍稀释步骤))的可溶性his标记的人LIGHT(R&D Systems公司)用于参考目的。在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NF $\kappa$ B-NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0175] 如图3A和表2所示,几种经检查的(7/12)小鼠抗人HVEM抗体在表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中诱导剂量依赖性NF $\kappa$ B激活(即,与可溶性LIGHT介导的NF $\kappa$ B诱导相比)至不同程度(排名顺序;编号48H6>36H12>29C2>8H5=45H6=49G4>52D3),证明了它们的激动活性。在这些表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中,对照可溶性人LIGHT也显示出剂量依赖性NF $\kappa$ B激活。相比之下,小鼠抗人HVEM抗体编号11H7、41F11、43E10、47E10和49A11在表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中没有显示激动活性(即,与可溶性LIGHT介导的NF $\kappa$ B诱导相比)。有趣的是,在这些经检查的小鼠抗人HVEM抗体空间阻断可溶性人LIGHT/人HVEM相互作用的能力(参见实施例2c)和它们对表达膜人HVEM的细胞的激动活性(即,NF $\kappa$ B诱导)之间似乎存在关系(参见表2)。

[0176] 表2. 小鼠抗人HVEM抗体对与人HVEM膜受体(mHVEM;参见实施例2c)结合的可溶性人LIGHT(sLIGHT)配体的阻断作用和它们对表达膜人HVEM的细胞的激动活性(即,与sLIGHT介导的NF $\kappa$ B诱导相比)的关系。

抗 HVEM Ab	NFκB 诱导	阻断相互作用 sLIGHT/mHVEM
8H5	+	+
29C2	+ / ++	++
36H12	++ / +++	+++
43E10	-	-
45H6	+	+++
[0177] 47E10	-	-
48H6	+++	++
11H7	-	-
41F11	-	- / +
49A11	-	-
49G4	+	+++
52D3	- / +	++

[0178] - = 不阻断LIGHT/HVEM相互作用或激动活性, + = 弱阻断LIGHT/HVEM相互作用或激动活性, ++ = 中度阻断LIGHT/HVEM相互作用或激动活性, +++ = 强阻断LIGHT/HVEM相互作用或激动活性。

[0179] 这些结果表明, 阻断人LIGHT/人HVEM相互作用(参见实施例2c)的小鼠抗人HVEM抗体能够模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导。值得注意的是, 对于激活细胞上表达的人HVEM, 可溶性人LIGHT已被证明远不如表达膜结合LIGHT的细胞有效(Cheung等人, PNAS 2009; 106:6244-6249)。

[0180] (b). 小鼠抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT诱导的NFκB信号传导的作用

[0181] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT诱导的NFκB信号传导的作用, 将NFκB-RE-luc人HVEM生物测定报告细胞(HEK293; 普洛麦格公司)用于检查小鼠抗人HVEM抗体干扰(例如, 阻断、加性或协同效应)可溶性LIGHT/膜HVEM介导的NFκB信号传导的能力。

[0182] 简而言之, 将表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞以35000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中, 并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天, 洗涤这些细胞, 并且随后与或不与0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤)小鼠抗人HVEM抗体以及0.3μg/mL的可溶性his标记的人LIGHT(R&D系统公司)一起孵育(EC80; 参见实施例2a和图3A)。≈在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后, 在光度计中使用Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NFκB-NFκB-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0183] 如图3B和表3所示, 非常弱的激动剂但中等LIGHT/HVEM相互作用阻断剂(参见表2)小鼠抗人HVEM抗体编号52D3能够微弱但剂量依赖性地抑制表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中的可溶性人LIGHT介导的NFκB激活。令人惊讶的是, 非激动剂和LIGHT/HVEM相互作用非阻

断剂(参见表2)小鼠抗人HVEM抗体编号49A11号也能够微弱但剂量依赖性地抑制表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中的可溶性人LIGHT介导的NF $\kappa$ B激活。另外,非激动剂和LIGHT/HVEM相互作用非阻断剂(参见表2)小鼠抗人HVEM抗体编号11H7、41F11、43E10和47E10显示对表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中的可溶性人LIGHT介导的NF $\kappa$ B激活没有影响,而弱/中等/强激动剂和弱/中等/强LIGHT/HVEM相互作用阻断剂(参见表2)小鼠抗人HVEM抗体编号8H5、29C2、36H12、45H6、48H6和49G4显示对表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中的可溶性人LIGHT介导的NF $\kappa$ B激活可能有加性效应但没有协同效应。

[0184] 表3.小鼠抗人HVEM抗体对与人HVEM膜受体(mHVEM;参见实施例2c)结合的可溶性人LIGHT(sLIGHT)配体的作用和它们对表达膜人HVEM的细胞上可溶性人LIGHT诱导的激动活性(即,NF $\kappa$ B诱导)的作用汇总

[0185]

抗 HVEM Ab	阻断 sLIGHT NF $\kappa$ B 诱导	阻断相互作用 sLIGHT/mHVEM
8H5	-*	+
29C2	-*	++
36H12	-*	+++
43E10	-	-
45H6	-*	+++
47E10	-	-
48H6	-*	++
11H7	-	-
41F11	-	-/+
49A11	+	-
49G4	-*	+++
52D3	+	++

[0186] - = 不阻断LIGHT/HVEM相互作用或LIGHT诱导的激动活性, + = 弱阻断LIGHT/HVEM相互作用或LIGHT诱导的激动活性, ++ = 中度阻断LIGHT/HVEM相互作用或LIGHT诱导的激动活性, +++ = 强阻断LIGHT/HVEM相互作用或LIGHT诱导的激动活性。\* = LIGHT和/或小鼠抗人HVEM抗体的激动作用。

[0187] 这些结果表明,阻断人LIGHT/人HVEM相互作用(除了LIGHT/HVEM相互作用非阻断小鼠抗人HVEM抗体编号49A11;也参见实施例2c)的小鼠抗人HVEM抗体能够阻断或模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NF $\kappa$ B信号传导。

[0188] (c).小鼠抗人HVEM抗体对表达膜人BTLA/膜人TCR的T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用

[0189] 如上所述,通过LIGHT将HVEM连接在T淋巴细胞上通过HVEM递送阳性共刺激信号,而通过HVEM将BTLA接合在T淋巴细胞上经由BTLA向T淋巴细胞提供阴性共抑制信号(De1 Rio等人Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。这种BTLA/HVEM途径下调CD4和

CD8 T淋巴细胞二者中TCR介导的信号传导,并导致T淋巴细胞增殖和细胞因子产生减少。通过HVEM将BTLA接合在B淋巴细胞上减少了BCR下游的信号传导分子的激活,并减弱了B细胞增殖(Vendel等人Journal Immunology 2009;182:1509-1517)。与PD-1和CTLA4不同,BTLA不在调节T(Treg)淋巴细胞上表达(DeI Rio等人Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。

[0190] 为了分析小鼠抗人HVEM抗体对膜人TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用,将NFAT应答元件-荧光素酶(RE-luc)人BTLA/HVEM阻断生物测定(含有(1)表达膜人HVEM和专有膜人TCR激活物的CHO-K1激活细胞(人工抗原呈递细胞),和(2)表达膜人BTLA和膜人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞(普洛麦格公司)的组合)用于检查小鼠抗人HVEM抗体阻断TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制的能力。

[0191] 在这种BTLA/HVEM阻断生物测定中,将表达膜人BTLA和膜人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞用作效应细胞,并且将表达膜人HVEM和专有膜人TCR激活物的CHO-K1激活细胞用作人工抗原呈递细胞。当这两种细胞共培养时,效应细胞上的TCR复合物被表达TCR激活物的人工抗原呈递细胞激活,从而导致NFAT荧光素酶报告子的表达。然而,BTLA和HVEM连接阻止了TCR激活并抑制了NFAT反应性荧光素酶活性。这种抑制可以通过暴露于阻断抗HVEM抗体而特异性逆转。中和抗HVEM抗体阻断BTLA/HVEM相互作用,并促进T细胞激活(即“释放刹车”),从而导致NFAT反应性荧光素酶报告子的再激活(参见图4A)。

[0192] 简而言之,将表达人HVEM和专有人TCR激活物的CHO-K1激活细胞以40000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤)小鼠抗人HVEM抗体一起孵育。然后,以50000个细胞/孔添加表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞中的荧光素酶产生。

[0193] 如图4B和表4所示,几种经检查的(8/12)小鼠抗人HVEM抗体剂量依赖性地将表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制阻断至不同程度(排名顺序;编号45H6>49G4>36H12>11H7>8H5=41F11=48H6=49A11)。相比之下,小鼠抗人HVEM抗体编号29C2、43E10、47E10和52D3显示对表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制没有影响。有趣的是,在NFAT-RE-luc人BTLA/HVEM阻断生物测定中,在这些经检查的小鼠抗人HVEM抗体空间阻断可溶性人BTLA/人HVEM相互作用的能力(参见实施例2c)和它们的阻断能力(即,取消TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制)之间似乎存在关系(参见表4)。

[0194] 表4. 小鼠抗人HVEM抗体对与人HVEM膜受体(mHVEM;参见实施例2c)结合的可溶性人BTLA(sBTLA)配体的阻断作用和它们对表达膜人BTLA/TCR的效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/膜人HVEM诱导的(mBTLA/mHVEM)抑制的阻断作用的关系。

[0195]

抗 HVEM Ab	阻断 mBTLA/mHVEM TCR-NFAT 抑制	阻断相互作用 sBTLA/mHVEM
8H5	+	+++
29C2	-	-
36H12	++	+++
43E10	-	-
45H6	+++	+++
47E10	-	-
48H6	+	+++
11H7	+ / ++	+++
41F11	+	++
49A11	+	++
49G4	++ / +++	+++
52D3	-	-*

[0196] - = 不阻断BTLA/HVEM相互作用或BTLA/HVEM诱导的TCR-NFAT抑制, + = 弱阻断BTLA/HVEM相互作用或BTLA/HVEM诱导的TCR-NFAT抑制, ++ = 中度阻断BTLA/HVEM相互作用或BTLA/HVEM诱导的TCR-NFAT抑制, +++ = 强阻断BTLA/HVEM相互作用或BTLA/HVEM诱导的TCR-NFAT抑制。\* = 增强BTLA与人HVEM的结合。

[0197] 这些结果表明, 阻断人BTLA/人HVEM相互作用(参见实施例2c)的小鼠抗人HVEM抗体能够阻断TCR诱导的NFAT信号传导的人BTLA/人HVEM介导的抑制。

[0198] 实施例4: BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM单克隆抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的分子遗传特征

[0199] 将产生BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的杂交瘤细胞用PBS洗涤, 并等分在含有 $5 \times 10^6$ 个细胞的微管中, 并且作为沉淀储存在 $-80^\circ\text{C}$ 下。通过使用RNeasy Mini分离试剂盒(凯杰公司(QIAGEN)), 将这些细胞沉淀用于分离RNA。测定RNA浓度(A260nm), 并将RNA储存在 $-80^\circ\text{C}$ 下。通过逆转录酶, 使用RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA合成试剂盒(富酶泰斯公司(Fermentas))从 $1\mu\text{g}$  RNA合成cDNA, 并储存在 $-80^\circ\text{C}$ 下。基于同种型小鼠IgG1/ $\kappa$ , 设计了如表5所示的引物来扩增BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的可变(V)区。

[0200] 表5. 用于扩增BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的cDNA的PCR引物。

编号*	序列	s/as	基因
383	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG (SEQ ID NO. 7)	s	VL
387	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC (SEQ ID NO. 8)	s	VL
[0201] 389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA (SEQ ID NO. 9)	s	VL
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO.10)	as	Ck
404	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC (SEQ ID NO. 11)	s	VH
407	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRITTT (SEQ ID NO. 12)	s	VH
408	ATGGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT (SEQ ID NO. 13)	s	VH
[0202] 409	ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTTCTGC (SEQ ID NO. 14)	s	VH
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG (SEQ ID NO. 15)	as	CH

[0203] s=有义;as=反义;VL=可变轻链区;VH=可变重链区;Ck=恒定小鼠卡帕( $\kappa$ )轻链区;CH=恒定小鼠IgG1重链区;\*根据Bioceros BV内部编码系统进行编号;简并引物:K=G或T,S=G或C,R=A或G,M=A或C,W=A或T,Y=C或T,H=A或C或T,并且N=任何碱基。

[0204] 引物383、387和389是设计用于与小鼠抗体轻链的信号肽退火的有义引物;引物394是与小鼠 $\kappa$ 轻链的恒定区退火的反义引物。引物404、407、408和409是与小鼠抗体重链的信号肽退火的有义引物;引物416是设计用于与小鼠IgG1重链的恒定区退火的反义引物。使用表5所示的引物组合进行各种PCR。将产生的PCR产物亚克隆到pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO®载体中。随后,对克隆的插入物进行测序。

[0205] 从重链和轻链序列反应,分别获得小鼠抗人HVEM抗体36H12的氨基酸序列的总共8和4个信息序列。基于此信息,确定了小鼠抗人HVEM抗体36H12的VH和VL区的共有氨基酸序列,并分别在SEQ ID NO.16和17中列出。小鼠抗人HVEM抗体36H12的VH和VL区的CDR的氨基酸序列分别在SEQ ID NO.18-20和21-23中列出。

[0206] 从重链和轻链序列反应二者,获得小鼠抗人HVEM抗体45H6的总共4个信息序列。基于此信息,确定了小鼠抗人HVEM抗体45H6的VH和VL区的共有氨基酸序列,并分别在SEQ ID NO.24和25中列出。小鼠抗人HVEM抗体45H6的VH和VL区的CDR的氨基酸序列分别在SEQ ID NO.26-28和29-31中列出。

[0207] 从重链和轻链序列反应,分别获得小鼠抗人HVEM抗体48H6的总共5和4个信息序

列。基于此信息,确定了小鼠抗人HVEM抗体48H6的VH和VL区的共有氨基酸序列,并分别在SEQ ID NO.32和33中列出。小鼠抗人HVEM抗体48H6的VH和VL区的CDR的氨基酸序列分别在SEQ ID NO.34-36和37-39中列出。

[0208] 从重链和轻链序列反应,分别获得小鼠抗人HVEM抗体11H7的总共9和3个信息序列。基于此信息,确定了小鼠抗人HVEM抗体11H7的VH和VL区的共有氨基酸序列,并分别在SEQ ID NO.40和41中列出。小鼠抗人HVEM抗体11H7的VH和VL区的CDR的氨基酸序列分别在SEQ ID NO.42-44和45-47中列出。

[0209] 从重链和轻链序列反应,分别获得小鼠抗人HVEM抗体49G4的总共5和3个信息序列。基于此信息,确定了小鼠抗人HVEM抗体49G4的VH和VL区的共有氨基酸序列,并分别在SEQ ID NO.48和49中列出。小鼠抗人HVEM抗体49G4的VH和VL区的CDR的氨基酸序列分别在SEQ ID NO.50-52和53-55中列出。

[0210] 实施例5.BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人IgG4/ $\kappa$ (即,将小鼠恒定IgG1/ $\kappa$ 区交换为人恒定IgG4/ $\kappa$ 区)抗人HVEM单克隆抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的产生

[0211] 基于测定的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体的小鼠V区(参见以上实施例4),设计产生嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体版本。为此,对于哺乳动物表达优化的cDNA序列,在GENEART(德国雷根斯堡(Regensburg,Germany))订购SEQ ID NO.56(编码嵌合小鼠/人重IgG4链36H12)、NO.57(编码嵌合小鼠/人重IgG4链45H6)、NO.58(编码嵌合小鼠/人重IgG4链48H6)、NO.59(编码嵌合小鼠/人重IgG4链11H7)和NO.60(编码嵌合小鼠/人重IgG4链49G4)和SEQ ID NO.61(编码嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链36H12)、NO.62(编码嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链45H6)、NO.63(编码嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链48H6)、NO.64(编码嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链11H7)和NO.65(编码嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链49G4),其编码人信号肽,随后是与人稳定的IgG4恒定区连接的小鼠VH链(即,S239P;根据Angal等人在Mol.Immunol.,第30卷,第1期,第105-108页,1993中),或随后是与人 $\kappa$ 恒定区连接的小鼠VL链。使用合适的限制性酶,将产生的cDNA亚克隆到pcDNA3.1衍生的表达质粒中。随后,使用FreeStyle™ 293表达系统(英杰公司),在293-F细胞(英杰公司)中瞬时表达嵌合抗体。使用常规亲和色谱法蛋白A柱,从上清液中纯化表达的嵌合抗人HVEM抗体。此后,使用LAL显色终点测定法(Hycult Biotech公司)测定LPS水平,并且所有我们纯化的嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体(即,36H12、45H6、48H6、11H7和49G4)都含有 $<0.0005\text{EU LPS}/\mu\text{g}$ 嵌合IgG。

[0212] 对于嵌合氨基酸序列,参见SEQ ID NO.66(嵌合小鼠/人重IgG4链36H12)、NO.67(嵌合小鼠/人重IgG4链45H6)、NO.68(嵌合小鼠/人重IgG4链48H6)、NO.69(嵌合小鼠/人重IgG4链11H7)、和NO.70(嵌合小鼠/人重IgG4链49G4)、和SEQ ID NO.71(嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链36H12)、NO.72(嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链45H6)、NO.73(嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链48H6)、NO.74(嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链11H7)、和NO.75(嵌合小鼠/人轻 $\kappa$ 链49G4)。

[0213] 实施例6.BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的结合和生物学特征

[0214] (a).BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对膜结合人HVEM的相对结合亲和力

[0215] 为了确定纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对人HVEM的相对结合亲和力,使用FACS分析。

[0216] 为此,在4℃下以 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染HEK293F细胞(克隆号128;参见以上实施例1(a))置于冰冷的PBS中10分钟,所述PBS含有0.1%BSA(西格玛公司)/0.05% $\text{NaN}_3$ (PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ ),补充有50 $\mu\text{g}$ /mL人IgG(阻断可能的Fc $\gamma$ 受体;西格玛公司)。然后,将10 $\mu\text{L}$ /管(即, $0.1 \times 10^6$ 个细胞)的这些细胞与或不与100 $\mu\text{L}$ 滴定的(在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中)纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体/管在4℃下孵育30分钟。在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中充分洗涤后,随后在4℃下将细胞与1:200稀释的PE缀合的山羊抗人IgG Fc $\gamma$ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中充分洗涤后,在4℃下将细胞在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中的4%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(FACSCalibur;BD生物科学公司)测量嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4在膜人HVEM上的结合(几何平均荧光强度)。为了比较,平行运行纯化的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4,并如实施例2(a)中所述监测它们的结合。

[0217] 如图5所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4与膜人HVEM剂量依赖地结合。基于它们的结合概况,发现了以下相对亲和力排名(从高到低亲和力):45H6=49G4>36H12=48H6>11H7。为了比较,它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4也显示与膜人HVEM的剂量依赖性结合,并表现出非常相似的相对亲和力排名,即45H6=49G4>36H12=48H6>11H7。更具体地,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号45H6、49G4、36H12、48H6和11H7分别导致306、312、433、472和630ng/mL的以下相对亲和力(即,半最大结合EC50),而对应的小鼠抗人HVEM抗体编号45H6、49G4、36H12、48H6和11H7分别导致260、266、430、356和532ng/mL的相对亲和力,这表明BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对膜结合HVEM的结合亲和力在嵌合过程中似乎保持不变。

[0218] b).BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ 与膜结合人HVEM结合的作用

[0219] 胞外HVEM具有两个空间配体结合区域(Cai等人Immunol Rev 2009;229:244-258;Steinberg等人Immunol Rev 2011;244:169-187;Pasero等人Curr Opin Pharmacol 2012;12:478-485),一个区域用于典型配体,其属于TNF超家族(即,LIGHT和TNF $\beta$ ),并且另一个区域用于非典型配体,其属于Ig超家族(即,BTLA和CD160)。突变分析和分子建模揭示BTLA和CD160与CRD1相互作用,而LIGHT和TNF $\beta$ 结合位于HVEM对面的CRD2和CRD3中。

[0220] 为了分析纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ 与膜结合人HVEM结合的作用,通过FACS分析测定嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体在空间上阻碍人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ (或也称为LT $\alpha$ ) 在(HEK衍生的)293F细胞表面上表达的人全长HVEM上相互作用的能力。

[0221] 实施例1a中描述了人“全长”HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)的产生。通过FACS分析分析可溶性人BTLA、可溶性人CD160、可溶性人LIGHT和可溶性人TNF $\beta$ 在表面人HVEM转染的细胞上的结合。为此,在4℃下以 $10 \times 10^6$ 个细胞/mL将稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10分钟,所述盐水含有0.1%BSA(西格玛公司)/0.05% $\text{NaN}_3$ (PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ ),补充有50 $\mu\text{g}$ /mL人IgG(阻断可能的Fc $\gamma$ 受体;西格玛公司)。然后,将10 $\mu\text{L}$ /管(即, $0.1 \times 10^6$ 个细胞)的这些细胞与或不与10 $\mu\text{g}$ /mL/管的100 $\mu\text{L}$ 纯化的嵌合小鼠/人抗HVEM抗体或10 $\mu\text{g}$ /mL/管的人IgG4/ $\kappa$ (西格玛公司)阴性同种型对照在4℃下孵育30

分钟。在此之后(即,不洗涤),随后在4℃下将细胞与在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中的 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 可溶性生物素化的人BTLA(Sino Biological公司)、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 可溶性his标记的人CD160(Sino Biological公司)、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 可溶性his标记的人LIGHT(Sino Biological公司)或 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 可溶性生物素化的人TNF $\beta$ (Sino Biological公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中充分洗涤后,在4℃下以 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(检测BTLA和TNF $\beta$ ; Jackson ImmunoResearch公司)或生物素化的小鼠抗his抗体(检测CD160和LIGHT;R&D Systems公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中充分洗涤后,在4℃下将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(检测CD160和LIGHT;Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中充分洗涤后,在4℃下将细胞在PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$ 中的4%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量配体BTLA、CD160、LIGHT和TNF $\beta$ 在膜人HVEM上的结合。为了比较,平行运行 $10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{管}$ 的纯化的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4和 $10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{管}$ 的小鼠IgG1(BD生物科学公司)阴性同种型对照。

[0222] 如图6A所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4阻止(即, $>95\%$ 阻断)与膜人HVEM结合的人BTLA,这与它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(即, $>95\%$ 阻断)相当。

[0223] 如图6B示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4部分阻止(即, $\approx 60-65\%$ 阻断)与膜人HVEM结合的人CD160,这与它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(即, $\approx 45-55\%$ 阻断)相当。

[0224] 如图6C所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4部分阻止(即, $\approx 30-50\%$ 阻断)与膜人HVEM结合的人LIGHT,这与它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6和49G4(即, $\approx 40-50\%$ 阻断)相当。相比之下,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号11H7没有阻止,但令人惊讶地似乎增强或稳定了(即,增强 $\approx 20\%$ )与膜人HVEM结合的人LIGHT,这与它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号11H7(即,增强 $\approx 10\%$ )相当。

[0225] 如图6D所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(部分)阻止与膜人HVEM结合的人TNF $\beta$ 至不同程度(顺序;编号36H12=45H6=48H6(即, $>94\%$ 阻断) $>49G4$ (即, $>80\%$ 阻断) $>11H7$ (即, $>55\%$ 阻断)),这与它们的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(排名顺序;编号36H12=45H6=48H6(即, $>95\%$ 阻断) $>49G4$ (即, $>85\%$ 阻断) $>11H7$ (即, $>60\%$ 阻断))相当。

[0226] c).BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对从膜结合人HVEM置换预先结合的人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ 的作用

[0227] 为了分析纯化的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4是否能够从膜结合人HVEM置换预先结合的人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ ,通过FACS分析测定嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对在(HEK衍生的)293F细胞表面上表达的人全长HVEM置换人BTLA、人CD160、人LIGHT和人TNF $\beta$ (或也称为LT $\alpha$ )的作用。

[0228] 实施例1a中描述了人“全长”HVEM转染的HEK293F细胞(克隆号128)的产生。通过FACS分析分析预先结合的可溶性人BTLA、可溶性人CD160、可溶性人LIGHT和可溶性人TNF $\beta$ 从表面人HVEM转染的细胞的置换。为此,在4℃下以 $10 \times 10^6$ 个细胞/ $\text{mL}$ 将稳定的人全长HVEM

转染的HEK293F细胞置于冰冷的磷酸盐缓冲盐水中10分钟,所述盐水含有0.1%BSA(西格玛公司)/0.05%NaN<sub>3</sub>(PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>),补充有50μg/mL人IgG(阻断可能的Fcγ受体;西格玛公司)。然后,将10μL/管(即,0.1x10<sup>6</sup>个细胞)的这些细胞不与或与在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中的2μg/mL/管的50μL可溶性生物素化人BTLA-人Fcγ融合蛋白(Sino Biological公司)、20μg/mL/管的可溶性his标记的人CD160(Sino Biological公司)、2μg/mL/管的可溶性his标记的人LIGHT(Sino Biological公司)或0.2μg/mL/管的可溶性生物素化人TNFβ(Sino Biological公司)在4℃下孵育30分钟。在此之后(即,不洗涤),随后将细胞与20μg/mL/管的50μL纯化的嵌合小鼠/人抗HVEM抗体或20μg/mL/管的人IgG4/κ(西格玛公司)阴性同种型对照在4℃下孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4℃下以10μg/mL将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(检测BTLA和TNFβ;Jackson ImmunoResearch公司)或生物素化的小鼠抗his抗体(检测CD160和LIGHT;R&D Systems公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4℃下以10μg/mL将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(检测BTLA和TNFβ;Jackson ImmunoResearch公司)或生物素化的小鼠抗his抗体(检测CD160和LIGHT;R&D Systems公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4℃下将细胞与1:200稀释的PE缀合的链霉亲和素(检测CD160和LIGHT;Jackson ImmunoResearch公司)孵育30分钟。在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中充分洗涤后,在4℃下将细胞在PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>中的4%甲醛中固定30分钟。使用流式细胞仪(型号FACSCalibur;BD生物科学公司)测量配体BTLA、CD160、LIGHT和TNFβ在膜人HVEM上的残留结合。为了比较,平行运行10μg/mL/管的纯化的BTLA/HVEM阻断小鼠抗人HVEM抗体对应物编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4和10μg/mL/管的小鼠IgG1(BD生物科学公司)阴性同种型对照。

[0229] 如图7A所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4从膜人HVEM置换了(即,>95%置换)预先结合的人BTLA。

[0230] 如图7B所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4从膜人HVEM部分置换了(即,≈50-60%置换)预先结合的人CD160。

[0231] 如图7C所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4没有从膜人HVEM置换(即,<20%置换)预先结合的人LIGHT。相比之下,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号11H7没有从膜人HVEM置换预先结合的人LIGHT,但令人惊讶地似乎增强或稳定了与膜人HVEM预先结合的(即,增强≈30%)人LIGHT。

[0232] 如图7D所示,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4从膜人HVEM(部分)置换预先结合的人TNFβ至不同程度(排名顺序;编号36H12=45H6=48H6(即,>90%置换)>49G4(即,>55%置换))。相比之下,BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号11H7似乎没有从膜人HVEM置换预先结合的人TNFβ(即,<20%置换)。

[0233] (d).BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中NFκB信号传导的作用

[0234] 为了分析嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对膜结合人HVEM介导的NFκB信号传导的作用,将NFκB应答元件-荧光素酶(RE-luc)人HVEM生物测定报告细胞(HEK293;普洛麦格公司)用于检查小鼠抗人HVEM抗体激活HVEM介导的NFκB信号传导的能力。

[0235] 简而言之,将表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞以35000个细胞/孔铺在平底TC处理

的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4一起孵育。平行运行滴定(即,0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤))的可溶性his标记的人LIGHT(R&D Systems公司)用于参考目的。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo™荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NFκB-NFκB-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0236] 如图8A所示,仅嵌合小鼠/人小鼠抗人HVEM抗体编号48H6在表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中诱导了弱的剂量依赖性NFκB激活(即,与可溶性LIGHT介导的NFκB诱导相比),而嵌合小鼠/人小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、11H7和49G4在表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中没有显示或显示非常弱的激动活性(即,与可溶性LIGHT介导的NFκB诱导相比)。在这些表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中,对照可溶性人LIGHT也显示出剂量依赖性NFκB激活。值得注意的是,对于激活细胞上表达的人HVEM,可溶性人LIGHT已被证明远不如表达膜结合LIGHT的细胞有效(Cheung等人PNAS2009;106:6244-6249)。

[0237] 尽管BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对膜结合HVEM的结合亲和力在嵌合过程中似乎保持不变(参见实施例6a),但令人惊讶的是BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4及其人恒定IgG 4Fc-尾不能或仅能微弱地模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导,这与它们的小鼠抗人HVEM抗体IgG1对应物相反,所述对应物清楚地显示了NFκB信号传导活性(参见实施例3a)。

[0238] (e). 交联的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中NFκB信号传导的作用

[0239] 熟知的是,针对人CD40和OX40/CD134(二者都是TNF受体超家族的成员,如人HVEM/CD270)的抗体的交联可以在与表达膜结合CD40和OX40的细胞结合时增强其激动活性(即,分别模拟CO40L和OX40L介导的作用)(Xu等人,Cancer Cell 2018;33:664-675;Zhang等人,J Biol Chem 2016;291:27134-27146)。由于BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4的上述令人惊讶的结果(即,不能或微弱地模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导,这与它们的小鼠抗人HVEM抗体对应物相反,所述对应物清楚地显示了NFκB信号传导活性(分别参见实施例6b和3a)),因此使用尺寸排阻色谱分析确定了(1)嵌合小鼠/人和(2)完全小鼠版本的抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的抗体聚集程度,并证实了以下情况:(1)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的聚集率分别为2.3%、0.7%、1.2%、1.6%和9.4%,和(2)完全小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4的聚集率分别为36.3%、25.8%、19.9%、12.4%和14.8%。小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4制备物中的这种相对高程度的抗体聚集强烈表明,小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6和49G4在NFκB应答元件-荧光素酶(RE-luc)人HVEM生物测定报告细胞中的激动活性是由抗体聚集引起的人为效应(即,模拟抗体交联效应)。为了证实这一假设,使用NFκB应答元件-荧光素酶(RE-luc)人HVEM生物测定报告细胞检查非交联和交联的BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(具有相对低程度的抗体聚集)。

[0240] 简而言之,将表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞以35000个细胞/孔铺在平底TC处理

的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.016-10μg/mL(5倍稀释步骤)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(在RT下用或不用10μg/mL交联山羊抗人IgG Fcγ特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)预处理15-30分钟)一起孵育。平行运行滴定(即,0、0.016-10μg/mL(5倍稀释步骤))的可溶性his标记的人LIGHT(Sino Biological公司)用于参考目的。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo™荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NFκB-NFκB-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0241] 如图8B所示,仅非交联的嵌合小鼠/人小鼠抗人HVEM抗体编号48H6在表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中诱导了弱的剂量依赖性NFκB激活(即,与可溶性LIGHT介导的NFκB诱导相比),而非交联的嵌合小鼠/人小鼠抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、11H7和49G4在表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中没有显示或显示非常弱的激动活性(即,与可溶性LIGHT介导的NFκB诱导相比)。相比之下,所有经检查的交联嵌合小鼠/人小鼠抗人HVEM抗体均在表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中诱导剂量依赖性NFκB激活(即,与可溶性LIGHT介导的NFκB诱导相比)。在这些表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中,对照可溶性人LIGHT也显示出剂量依赖性NFκB激活。值得注意的是,对于激活细胞上表达的人HVEM,可溶性人LIGHT已被证明远不如表达膜结合LIGHT的细胞有效(Cheung等人,PNAS 2009;106:6244-6249)。

[0242] 这些结果表明,非交联的嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4(具有相对低程度的抗体聚集)不能或仅能微弱地模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导,而在交联后,这些嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4能够模拟可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导。值得注意的是,对于激活细胞上表达的人HVEM,可溶性人LIGHT已被证明远不如表达膜结合LIGHT的细胞有效(Cheung等人,PNAS 2009;106:6244-6249)。

[0243] (f). BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT诱导的NFκB信号传导的作用

[0244] 为了分析嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人LIGHT诱导的NFκB信号传导的作用,将NFκB-RE-luc人HVEM生物测定报告细胞(HEK293;普洛麦格公司)用于检查小鼠抗人HVEM抗体干扰(例如,阻断、加性或协同效应)可溶性LIGHT/膜HVEM介导的NFκB信号传导的能力。

[0245] 简而言之,将表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞以35000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4以及0.3μg/mL的可溶性his标记的人LIGHT(Sino Biological公司)一起孵育(EC80;参见实施例2a和图3A)。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo™荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NFκB-NFκB-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0246] 如图8C所示,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4显示对表达人HVEM的NFκB-RE-luc细胞中可溶性人LIGHT介导的NFκB激活没有影响。

[0247] 这些结果表明,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4不能影响可溶性人LIGHT/人HVEM介导的NFκB信号传导。

[0248] (g). BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人TNF $\beta$ 诱导的NF $\kappa$ B信号传导的作用

[0249] 据报道, TNF $\beta$ /LT $\alpha$ 与HVEM的结合较弱, 并且其在HVEM途径中的确切功能作用尚不清楚(Cai等人*Immunol Rev* 2009;229:244-258), 尽管普遍观点认为TNF $\beta$ /HVEM途径(与LIGHT/HVEM途径一样)提供了共刺激信号, 这导致增强的免疫应答(Cai等人*Immunol Rev* 2009;229:244-258;Steinberg等人*Immunol Rev* 2011;244:169-187;Pasero等人*Curr Opin Pharmacol* 2012;12:478-485;Del Rio等人*Am J Transplant* 2013;13:541-551;Schaer等人*J Immunother Cancer* 2014;2:7)。

[0250] 为了分析嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对表达膜人HVEM的细胞中可溶性人TNF $\beta$ 诱导的NF $\kappa$ B信号传导的作用, 将NF $\kappa$ B-RE-luc人HVEM生物测定报告细胞(HEK293; 普洛麦格公司)用于检查小鼠抗人HVEM抗体干扰(例如, 阻断、加性或协同效应)可溶性TNF $\beta$ /膜HVEM介导的NF $\kappa$ B信号传导的能力。

[0251] 简而言之, 将表达人HVEM的NF $\kappa$ B-RE-luc细胞以32000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中, 并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天, 洗涤这些细胞, 并且随后与或不与0.0015-10 $\mu$ g/mL(3倍稀释步骤)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4以及0.05 $\mu$ g/mL的可溶性重组人TNF $\beta$ (Sino Biological公司)一起孵育(EC80, 参见图9A)。≈平行运行滴定(即, 0.000026-2 $\mu$ g/mL(5倍稀释步骤))的可溶性重组人TNF $\beta$ 用于参考目的。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后, 在光度计中使用Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人HVEM的NF $\kappa$ B-NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中的荧光素酶产生。

[0252] 如图9B所示, 嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4显示对NF $\kappa$ B-RE-luc细胞中可溶性人TNF $\beta$ 介导的NF $\kappa$ B激活没有影响, 所述NF $\kappa$ B-RE-luc细胞表达相对低水平的膜结合人HVEM(即, 以1:20使用PE缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122; eBioscience公司), 信噪比<5的信号)。这一观察是令人惊讶的, 因为嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4阻止可溶性人TNF $\beta$ 与HEK293F细胞克隆编号128结合和/或从其置换预先结合的可溶性人TNF $\beta$ (分别参见实施例5(b)和实施例5(c)), 所述HEK293F细胞克隆编号128表达相对高水平的膜结合人HVEM(即, 过表达; 以1:20使用PE缀合的小鼠抗人HVEM抗体(克隆eBioHVEM-122; eBioscience公司), 信噪比为1000的信号; 参见图1)。≈然而, 据报道, 人TNF $\beta$ 对人TNFR1/CD120a和人TNFR2/CD120b具有高亲和力结合(Medvedev等人*J Biol Chem* 1996;16:9778-9784)。有趣的是, HEK293细胞内源性表达低水平的人TNFR1/CD120a(Murphy等人*Cell Death Differ.* 1998;5:497-505;McFarlane等人*FEBS Letters* 2002;515:119-126;Razonable等人*Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1617-1621)。最有可能的是, 人TNF $\beta$ 优先与这些低共表达HVEM+/TNFR1+的细胞上的这些“高亲和力”人TNFR1(与“低/弱亲和力”人HVEM相反)结合, 从而优先触发可溶性人TNF $\beta$ /人TNFR1介导的(与可溶性人TNF $\beta$ /人HVEM介导的相反)NF $\kappa$ B激活。在这种情况下, 嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体将无效。

[0253] 这些结果表明, 当膜结合人HVEM和膜结合人TNFR1在细胞上以相对低的水平共表达时, 嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4不能影响可溶性人TNF $\beta$ 介导的NF $\kappa$ B信号传导。

[0254] (h) .BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对表达膜人BTLA/膜人TCR的T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用

[0255] 为了分析嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对膜人TCR诱导的NFAT信号传导的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用,将NFAT应答元件-荧光素酶(RE-luc)人BTLA/HVEM阻断生物测定(参见以上实施例3(c))用于检查小鼠抗人HVEM抗体阻断TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制的能力。

[0256] 简而言之,将表达人HVEM和专有人TCR激活物的CHO-K1激活细胞以40000个细胞/孔铺在平底TC处理的白色固体96孔板(康宁公司)中,并在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。第二天,洗涤这些细胞,并且随后与或不与0.0015-10μg/mL(3倍稀释步骤)嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4一起孵育。然后,以50000个细胞/孔添加表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞。在37°C/5%CO<sub>2</sub>下孵育6小时后,在光度计中使用Bio-Glo<sup>TM</sup>荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)测量表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞中的荧光素酶产生。

[0257] 如图10所示,所有经检查的嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体剂量依赖性地将表达人BTLA和人TCR的NFAT-RE-luc Jurkat效应T细胞中TCR诱导的NFAT信号传导的BTLA/HVEM介导的抑制阻断至不同程度(以此顺序;编号45H6>49G4>11H7>36H12>>48H6)。

[0258] 这些结果表明,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4能够阻断TCR诱导的NFAT信号传导的人BTLA/人HVEM介导的抑制。

[0259] (k) .BTLA/HVEM阻断嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体对从表达膜人BTLA/膜人TCR的原代幼稚人T细胞释放TCR诱导的细胞因子的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用

[0260] 如上所述,通过LIGHT将HVEM连接在T淋巴细胞上通过HVEM递送阳性共刺激信号,而通过HVEM将BTLA接合在T淋巴细胞上经由BTLA向T淋巴细胞提供阴性共抑制信号(De1 Rio等人Journal Leukocyte Biology 2010;87:223-235)。这种BTLA/HVEM途径下调CD4和CD8 T淋巴细胞二者中TCR介导的信号传导,并导致T淋巴细胞增殖和细胞因子产生减少。

[0261] 为了分析嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4对膜人TCR诱导的细胞因子释放的膜人BTLA/膜人HVEM介导的抑制的作用,将(1)稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞(克隆编号128;参见以上实施例1a),在稍作修改的情况下如先前所述(Chen等人Front Immunol2017;8:793;人工抗原呈递细胞)将其用膜结合抗人CD3(OKT3)单链可变片段(scFv)TCR激活物瞬时转染,和(2)表达膜人BTLA和膜人TCR复合物的原代人幼稚T细胞(反应细胞)的共培养用于检查小鼠抗人HVEM抗体减弱/逆转TCR诱导的细胞因子释放的BTLA/HVEM介导的抑制的能力(对于测定原理,还参见图4A,除了表达人HVEM的CHO-K1人工抗原呈递细胞和表达人BTLA的Jurkat效应T细胞分别被交换为表达人HVEM的HEK293F人工抗原呈递细胞和表达人BTLA的原代人幼稚T细胞)。

[0262] 简而言之,将编码膜结合抗人CD3(OKT3)scFv TCR激活蛋白(SEQ ID NO.76)的cDNA优化用于哺乳动物表达,并由德国雷根斯堡的GENEART合成(参见SEQ ID NO.77)。将此cDNA亚克隆到pcDNA3.1衍生的表达质粒中。使用FreeStyle<sup>TM</sup> 293表达系统(Life Technologies公司),将此抗人CD3(OKT3)scFv TCR激活蛋白质粒转染到稳定的人全长HVEM转染的HEK293F细胞(克隆编号128;参见以上实施例1a)中。在2天后,收获这些HEK293F细胞,并以1.0x10<sup>6</sup>个细胞/mL重悬于含有10%胎牛血清(Capricorn公司)和50μg/mL庆大霉素

(Gibco)的RPMI-1640培养基(Gibco)中。在共培养之前,使用1:200稀释的PE缀合的山羊抗人IgG fcy特异性抗体(Jackson ImmunoResearch公司)和流式细胞术,证实了瞬时转染的表达人HVEM的HEK293F细胞(即,用作人工抗原呈递细胞)上的抗人CD3(OKT3) scFv TCR激活蛋白表面表达。

[0263] 通过以Lymphoprep™(1.077g/mL;奈科明公司(Nycomed))进行密度离心分离来自健康供体(知情同意)的人外周血单核细胞(PBMC)。随后,使用Dynabeads™ Untouched™人T细胞试剂盒(英杰公司)从此PBMC级分富集人T淋巴细胞(即,CD4和CD8),并以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL重悬于含有10%胎牛血清(Capricorn公司)和50μg/mL庆大霉素(Gibco)的RPMI-1640培养基(Gibco)中。在共培养之前,使用1:20稀释的PE缀合的小鼠抗人BTLA特异性抗体(BD生物科学公司)和流式细胞术来确认富集的人幼稚T淋巴细胞(即,用作应答细胞)上的人BTLA表面表达。

[0264] 在RT下,用40μg/mL嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL预处理表达人HVEM的人工抗原呈递HEK293F细胞15-30分钟。平行地,运行40μg/mL人IgG4/κ(西格玛公司)作为阴性同种型对照。在此之后(即,不洗涤),在20μg/mL嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、48H6、11H7和49G4或20μg/mL人IgG4/κ(西格玛公司)阴性同种型对照的存在下,以1:1比率(即,50000个T细胞/50000个人工抗原呈递细胞/200μL/孔),将这些嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体预处理的人工抗原呈递HEK293F细胞和富集的人幼稚T淋巴细胞与和不与0.5μg/mL共刺激小鼠抗人CD28抗体(克隆CD28;BD Biosciences公司)一起在平底TC处理的透明96孔板(康宁公司)中在37°C/5%CO<sub>2</sub>下共培养2天。在培养2天后,收获上清液并在-80°C下冷冻直至使用。

[0265] 使用内部开发的常规夹心ELISA(即(I)对于IL-2ELISA,使用大鼠抗人IL-2单克隆包被抗体(克隆MQ1-17H12;eBioscience公司)、滴定的rhuIL-2标准品(派普泰克公司(PeproTech))和生物素化兔抗人IL-2多克隆检测抗体(eBioscience公司)的组合,(II)对于TNFαELISA,使用小鼠抗人TNFα单克隆包被抗体(克隆MAb11;Biolegend公司)、滴定的rhuTNFα标准品(派普泰克公司)和生物素化小鼠抗人TNFα单克隆检测抗体(克隆MAb11;Biolegend公司)的组合,以及(III)对于IFNγELISA,使用小鼠抗人IFNγ单克隆包被抗体(克隆NIB42;eBioscience公司)、滴定的rhuIFNγ标准品(派普泰克公司)和生物素化小鼠抗人IFNγ单克隆检测抗体(克隆4S.B3;eBioscience公司)的组合),在这些上清液中测定原代人幼稚T淋巴细胞释放的人IL-2、人TNFα和人IFNγ。

[0266] 来自人工抗原呈递HEK293F细胞或富集的人幼稚T淋巴细胞(没有进行共培养,而是单独培养2天(即,50000个人工抗原呈递细胞/200μL/孔或50000个T细胞/200μL/孔))的上清液未显示可测量的人IL-2、人TNFα或人IFNγ水平。

[0267] 如图11A所示,所有经检查的嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体将对从所有6名健康供体富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR/CD28诱导的IL-2的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6>11H7>36H12>49G4>>48H6)。另外,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6、11H7和49G4将对从2/6名健康供体(即,供体A和H)富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR诱导的IL-2(如果有的话)的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6>11H7>36H12>49G4)。

[0268] 如图11B所示,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7将对从所有6名健康供体富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR/CD28诱导的TNF $\alpha$ 的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6>11H7>36H12)。另外,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7将对从4/6名健康供体(即,供体A、D、H和K)富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR诱导的TNF $\alpha$ (如果有的话)的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6>11H7=36H12)。

[0269] 如图11C所示,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7将对从所有6名健康供体富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR/CD28诱导的IFN $\gamma$ 的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6>11H7>36H12)。另外,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7将对从4/6名健康供体(即,供体A、D、H和K)富集的表达共培养的人BTLA的原代人幼稚T淋巴细胞释放TCR诱导的IFN $\gamma$ (如果有的话)的BTLA/HVEM介导的抑制减弱/逆转至不同程度(排名顺序;编号45H6=11H7>36H12)。

[0270] 这些结果表明,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7能够减弱/逆转对从表达人BTLA的原代幼稚人T细胞释放TCR/CD28诱导的IL-2、TNF $\alpha$ 和IFN $\gamma$ 的人BTLA/人HVEM介导的抑制。另外,这些结果表明,嵌合小鼠/人抗人HVEM抗体编号36H12、45H6和11H7能够减弱/逆转对从表达人BTLA的原代幼稚人T细胞释放TCR诱导的IL-2、TNF $\alpha$ 和IFN $\gamma$ (如果有的话)的人BTLA/人HVEM介导的抑制。

[0271] 序列说明

[0272] SEQ ID NO.1

[0273] 氨基酸序列人HVEM(Swiss-Prot号Q92956.3;aa 1-283)

```

1  MEPPGDWGP  PWRSTPKTDV  LRLVLYLTF  L  GAPCYAPALP  SCKEDEYPVG
   SECCPKCSPG

61  YRVKEACGEL  TGTVCEPCPP  GTYIAHLNGL  SKCLQCQMCD  PAMGLRASRN
   CSRTENAVCG

[0274] 121  CSPGHFCIVQ  DGDHCAACRA  YATSSPGQRV  QKGGTESQDT  LCQNCPPGTF
   SPNGTLEECQ

181  HQTKCSWLVT  KAGAGTSSSH  WWWWFLSGSL  VIVIVCSTVG  LIICVKRRKP
   RGDVVKVIVS

241  VQRKRQEAEG  EATVIEALQA  PPDVTTVAVE  ETIPSFTGRS  PNH

```

[0275] 信号肽(aa序列1-38)、胞外结构域(aa序列39-202,包括CRD1(aa序列42-75)、CRD2(aa序列78-119)、CRD3(aa序列121-162)和截短的CRD4(aa序列165-179)、“接头”(aa序列180-202))、跨膜结构域(aa序列203-223)和胞质结构域(aa序列224-283)

[0276] SEQ ID NO.2

[0277] 编码人HVEM蛋白的cDNA序列(优化用于哺乳动物表达)

1 ATGGAGCCCC CTGGCGATTG GGGACCTCCA CCTGGAGAA GCACCCCAA  
GACCGACGTG

61 CTGCGGCTGG TGCTGTACCT GACCTTTCTG GGCCTCCCT GTTACGCCCC  
TGCCCTGCCT

121 AGCTGCAAAG AGGACGAGTA CCCTGTGGGC AGCGAGTGCT GCCCTAAGTG  
CAGCCCTGGC

181 TACAGAGTGA AAGAGGCCTG CGGCGAGCTG ACCGGCACCG TGTGTGAACC  
TTGTCCCCCT

241 GGCACCTATA TCGCCACCT GAACGGCCTG AGCAAGTGCC TGCAGTGCCA  
GATGTGCGAC

301 CCCGCTATGG GCCTGAGAGC CAGCAGAAAC TGCAGCCGGA CCGAGAATGC  
CGTGTGCGGC

361 TGTTCTCCTG GCCACTTCTG CATCGTGACG GACGGCGATC ACTGCGCCGC  
CTGTAGAGCC

[0278] 421 TACGCCACAT CTAGCCCAGG CCAGAGAGTG CAGAAGGGCG GCACCGAGAG  
CCAGGATACC

481 CTGTGCCAGA ATTGCCCTCC CGGCACCTTC AGCCCAACG GCACACTGGA  
AGAGTGCCAG

541 CACCAGACCA AGTGCAGCTG GCTCGTGACC AAAGCCGGCG CTGGCACAAG  
CAGCTCTCAC

601 TGGGTGTGGT GGTTTCTGAG CGGCAGCCTC GTGATCGTGA TTGTGTGCAG  
CACCGTGGGC

661 CTGATCATCT GCGTGAAGCG GAGAAAGCCC AGAGGCGACG TCGTGAAAGT  
GATCGTGTCC

721 GTGCAGCGGA AGCGGCAGGA AGCCGAAGGC GAGGCCACAG TGATTGAGGC  
CCTGCAGGCT

781 CCCCCTGACG TGACAACAGT GGCCGTGGAA GAGACAATCC CCAGCTTCAC  
CGGCAGATCC

841 CCCAACCAC

[0279] SEQ ID NO.3

[0280] 氨基酸序列CRD1截短的人HVEM

1 MEWSGVFMFL LSVTAGVHSE PCPPGTIAH LNGLSKCLQC QMCDPAMGLR  
ASRNCSTEN

61 AVCGCSPGHF CIVQDGDHCA ACRAYATSSP GQRVQKGGTE SQDTLCQNCP  
PGTFSPNGTL

[0281] 121 EECQHQTACS WLVTKAGAGT SSSHWVWWFL SGSLVIVIVC STVGLIICVK  
RRKPRGDVVK

181 VIVSVQRKRQ EAEGEATVIE ALQAPPDVTT VAVEETIPSF TGRSPNH

[0282] 小鼠Ig信号肽(aa序列1-19)、胞外结构域(aa序列20-146,包括CRD2(aa序列22-63)、CRD3(aa序列65-106)和截短的CRD4(aa序列109-123)、“接头”片段(aa序列124-146))、

跨膜结构域(aa序列147-167)和胞质结构域(aa序列168-227)

[0283] SEQ ID NO.4

[0284] 编码CRD1截短的人HVEM蛋白的cDNA序列(优化用于哺乳动物表达)

```

1  ATGGAGTGGA  GCGGCGTGTT  CATGTTCTG  CTGAGCGTGA  CAGCCGGCGT
   GCACAGCGAA

61  CCTTGTCCCC  CTGGCACCTA  TATCGCCCAC  CTGAACGGCC  TGAGCAAGTG
   CCTGCAGTGC

121  CAGATGTGCG  ACCCCGCTAT  GGGCCTGAGA  GCCAGCAGAA  ACTGCAGCCG
   GACCGAGAAT

181  GCCGTGTGCG  GCTGTTCTCC  TGGCCACTTC  TGCATCGTGC  AGGACGGCGA
   TCACTGCGCC

```

[0285] 241 GCCTGTAGAG CCTACGCCAC ATCTAGCCCT GGCCAGAGAG TGCAGAAGGG  
CGGCACCGAG

```

301  AGCCAGGATA  CCCTGTGCCA  GAATTGCCCT  CCCGGCACCT  TCAGCCCCAA
   CGGCACACTG

```

```

361  GAAGAGTGCC  AGCACCAGAC  CAAGTGCAGC  TGGCTCGTGA  CCAAAGCCGG
   CGCTGGCACA

```

```

421  AGCAGCTCTC  ACTGGGTGTG  GTGGTTTCTG  AGCGGCAGCC  TCGTGATCGT
   GATTGTGTGC

```

```

481  AGCACCGTGG  GCCTGATCAT  CTGCGTGAAG  CGGAGAAAGC  CCAGAGGCGA
   CGTCGTGAAA

```

```

541  GTGATCGTGT  CCGTGCAGCG  GAAGCGGCAG  GAAGCCGAAG  GCGAGGCCAC
   AGTGATTGAG

```

[0286]

```

601  GCCCTGCAGG  CTCCCCCTGA  CGTGACAACA  GTGGCCGTGG  AAGAGACAAT
   CCCCAGCTTC

```

```

661  ACCGGCAGAT  CCCCCAACCA  C

```

[0287] SEQ ID NO.5

[0288] 氨基酸序列食蟹猴HVEM(NCBI参考序列:XP\_005545061.1;aa 1-280)

```

1  MEPPGGWVSP  PRRPAPKADI  LTLVLYLFL  GSPCYAPALP  SCKEDEYPVG
   SECCPKCGPG

```

```

61  FHVRQACGEQ  TGTVCEPCSP  GTYIAHFNGL  SKCLQCQMCD  PAMGLRTSRN
   CSTTANALCG

```

[0289] 121 CSPGHFCHQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF  
SSNGTLEECQ

```

181  HGTKCSKWL  V  TEAGPGTSSF  RWVWWLLSGT  LIVIIVGLIL  GLIYVKRRKS
   RGDVVKVIVS

```

```

241  VQRKRQEAEG  EAIVTEALQA  PPDITTVAVE  ETEPAFTGRS

```

[0290] SEQ ID NO.6

[0291] 编码食蟹猴HVEM蛋白的cDNA序列(优化用于哺乳动物表达)

- 1 ATGGAGCCTC CAGGCGGATG GGGATCTCCC CCAAGAAGGC CTGCCCCCAA  
GGCCGATATC
- 61 CTGACCCTGG TGCTGTACCT GACCTTCCTG GGCAGCCCTT GTTACGCCCC  
TGCCCTGCCT
- 121 AGCTGCAAAG AGGACGAGTA CCCTGTGGGC AGCGAGTGCT GCCCTAAGTG  
CGGCCCTGGA
- [0292] 181 TTTCATGTGC GGCAGGCTG TGGCGAGCAG ACCGGCACAG TGTGCGAGCC  
TTGTAGCCCC
- 241 GGCACCTATA TCGCCCACTT CAACGGCCTG AGCAAGTGCC TGCAGTGCCA  
GATGTGCGAC
- 301 CCCGCTATGG GCCTGCGGAC CAGCAGAAAT TGCAGCACCA CCGCCAATGC  
CCTGTGCGGC
- 361 TGTTCTCCTG GCCACTTCTG CATTATTCAG GACGGCGACC ACTGCGCCGC  
CTGCAGAGCC
- 421 TATGCCACAT CTAGCCCTGG CCAGCGGGTG CAGAAGGGCG GAACAGAGTC  
TCAGGACACC
- 481 CTGTGCCAGA ACTGCCCCC TGGCACCTTC AGCAGCAACG GCACCCTGGA  
AGAGTGCCAG
- 541 CACGGCACCA AGTGCAGCAA GTGGCTCGTG ACAGAGGCCG GACCTGGCAC  
CAGCAGCTTC
- [0293] 601 AGATGGGTGT GGTGGCTGCT GAGCGGCACA CTGATCGTGA TCATCGTGGG  
CCTGATCCTG
- 661 GGA CTGATCT ACGTGAAGCG GCGGAAGTCC AGAGGCGACG TCGTGAAAGT  
GATCGTGTCC
- 721 GTGCAGCGGA AGAGACAGGA AGCCGAGGGC GAGGCCATTG TGACCGAAGC  
CCTGCAGGCC
- 781 CCTCCCGACA TTACAACCGT GGCCGTGGAA GAAACCGAGC CCGCCTTTAC  
CGGCAGATCC
- [0294] SEQ ID NO.7
- [0295] PCR引物
- [0296] ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
- [0297] SEQ ID NO.8
- [0298] PCR引物
- [0299] ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
- [0300] SEQ ID NO.9
- [0301] PCR引物
- [0302] ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA
- [0303] SEQ ID NO.10
- [0304] PCR引物
- [0305] ACTGGATGGTGGGAAGATGG

- [0306] SEQ ID NO.11
- [0307] PCR引物
- [0308] ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
- [0309] SEQ ID NO.12
- [0310] PCR引物
- [0311] ATGRACCTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
- [0312] SEQ ID NO.13
- [0313] PCR引物
- [0314] ATGGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
- [0315] SEQ ID NO.14
- [0316] PCR引物
- [0317] ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTTCTGC
- [0318] SEQ ID NO.15
- [0319] PCR引物
- [0320] CAGTGGATAGACAGATGGGGG
- [0321] SEQ ID NO.16
- [0322] 小鼠抗人HVEM抗体36H12的重链可变区的共有氨基酸序列  
1 EVQLQSGAG LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTVMHWVRQR PEQGLEWIGR  
IDPATANTKY
- [0323] 61 DPKFQGKATL TDTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCVTYG YDVSWFAYWG  
LGALVTVSA
- [0324] SEQ ID NO.17
- [0325] 小鼠抗人HVEM抗体36H12的轻链可变区的共有氨基酸序列  
1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGITYLEW YLQKPGQSPK  
LLIYKVSNRF
- [0326] 61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV LTFGAGTKLE LK
- [0327] 小鼠抗人HVEM抗体36H12的互补决定区(CDR):SEQ ID NO.18-23
- [0328] SEQ ID NO.18
- [0329] 36H12的氨基酸序列重链CDR1
- [0330] DTYMH
- [0331] SEQ ID NO.19
- [0332] 36H12的氨基酸序列重链CDR2
- [0333] RIDPATANTKYDPKFQG
- [0334] SEQ ID NO.20
- [0335] 36H12的氨基酸序列重链CDR3
- [0336] YGYDVSWFAY
- [0337] SEQ ID NO.21
- [0338] 36H12的氨基酸序列轻链CDR1
- [0339] RSSQSIVHSNGITYLE

- [0340] SEQ ID NO.22
- [0341] 36H12的氨基酸序列轻链CDR2
- [0342] KVSNRFS
- [0343] SEQ ID NO.23
- [0344] 36H12的氨基酸序列轻链CDR3
- [0345] FQGSHVPLT
- [0346] SEQ ID NO.24
- [0347] 小鼠抗人HVEM抗体45H6的重链可变区的共有氨基酸序列  
1 DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGNSNIYY
- [0348] 61 VDTVKGFRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYYCARKR AYGDYSGFSM  
DYWGQGTSVT  
121 VSS
- [0349] SEQ ID NO.25
- [0350] 小鼠抗人HVEM抗体45H6的轻链可变区的共有氨基酸序列
- [0351] 1 DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKP GQSPKALIYS  
ASYRYSGVPD
- [0352] 61 RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNKFPLTFGG GTKLEIK
- [0353] 小鼠抗人HVEM抗体45H6的互补决定区 (CDR) :
- [0354] SEQ ID NO.26-31
- [0355] SEQ ID NO.26
- [0356] 45H6的氨基酸序列重链CDR1
- [0357] SFGMH
- [0358] SEQ ID NO.27
- [0359] 45H6的氨基酸序列重链CDR2
- [0360] YISSGNSNIYYVDTVKG
- [0361] SEQ ID NO.28
- [0362] 45H6的氨基酸序列重链CDR3
- [0363] KRAYGDYSGFSMDY
- [0364] SEQ ID NO.29
- [0365] 45H6的氨基酸序列轻链CDR1
- [0366] KASQNVDTNVA
- [0367] SEQ ID NO.30
- [0368] 45H6的氨基酸序列轻链CDR2
- [0369] SASYRYS
- [0370] SEQ ID NO.31
- [0371] 45H6的氨基酸序列轻链CDR3
- [0372] QQYNKFPLT
- [0373] SEQ ID NO.32
- [0374] 小鼠抗人HVEM抗体48H6的重链可变区的共有氨基酸序列

- [0375] 1 EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS GYAMSWVRQT PEKRLEWVAS  
ISSGGSTYYP
- 61 DSVKGRFTIP RDDARNILYL QMSSLRSED T AIYYCARGGH GSSYVYWGQG  
[0376] TTLTVSS
- [0377] SEQ ID NO.33
- [0378] 小鼠抗人HVEM抗体48H6的轻链可变区的共有氨基酸序列
- 1 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSL L YSSNQKNYLA WYQQKPGQSP  
[0379] KLLIWASTR
- 61 ESGVPDRFTG SGS GTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCHQYYSY PLTFGAGTKL ELN
- [0380] 小鼠抗人HVEM抗体48H6的互补决定区 (CDR) :
- [0381] SEQ ID NO.34-39
- [0382] SEQ ID NO.34
- [0383] 48H6的氨基酸序列重链CDR1
- [0384] GYAMS
- [0385] SEQ ID NO.35
- [0386] 48H6的氨基酸序列重链CDR2
- [0387] SISSGGSTYYPDSVKG
- [0388] SEQ ID NO.36
- [0389] 48H6的氨基酸序列重链CDR3
- [0390] GGHGSSYVY
- [0391] SEQ ID NO.37
- [0392] 48H6的氨基酸序列轻链CDR1
- [0393] KSSQSLLYSSNQKNYLA
- [0394] SEQ ID NO.38
- [0395] 48H6的氨基酸序列轻链CDR2
- [0396] WASTRES
- [0397] SEQ ID NO.39
- [0398] 48H6的氨基酸序列轻链CDR3
- [0399] HQYYSYPLT
- [0400] SEQ ID NO.40
- [0401] 小鼠抗人HVEM抗体11H7的重链可变区的共有氨基酸序列
- 1 QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT IYGVHWVRQS PGKGLEWLGV  
IWSGGSTDYN
- [0402] 61 AAFISRLSIS KDNSKSQVFF KMNSLQANDT AIYYCARRDY GSRSFYYAMD  
YWGQGTSTVTV
- 121 SS
- [0403] SEQ ID NO:41
- [0404] 小鼠抗人HVEM抗体11H7的轻链可变区的共有氨基酸序列

- [0405] 1 EIVLTQSPAL MAASPGEKVT ITCSVSSSIS SSNLHWYQQK SETSPKPWIY  
GTSNLAGSVP  
61 VRFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAATYYCQ QWSSYPLTFG GGTKLEIK
- [0406] 小鼠抗人HVEM抗体11H7的互补决定区 (CDR) :
- [0407] SEQ ID NO.42-47
- [0408] SEQ ID NO.42
- [0409] 11H7的氨基酸序列重链CDR1
- [0410] IYGVH
- [0411] SEQ ID NO.43
- [0412] 11H7的氨基酸序列重链CDR2
- [0413] VIWSGGSTDYNAAFIS
- [0414] SEQ ID NO.44
- [0415] 11H7的氨基酸序列重链CDR3
- [0416] RDYGSRSFYAMDY
- [0417] SEQ ID NO.45
- [0418] 11H7的氨基酸序列轻链CDR1
- [0419] SVSSSISSNLH
- [0420] SEQ ID NO.46
- [0421] 11H7的氨基酸序列轻链CDR2
- [0422] GTSNLAGS
- [0423] SEQ ID NO.47
- [0424] 11H7的氨基酸序列轻链CDR3
- [0425] QQWSSYPLT
- [0426] SEQ ID NO.48
- [0427] 小鼠抗人HVEM抗体49G4的重链可变区的共有氨基酸序列
- 1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCRASGFNIK DTYMHVVKQR PEQGLEWIGR  
IDPARGNTKY
- [0428] 61 DPKFQ GKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCASAM DYWGQGTSVT VSS
- [0429] SEQ ID NO.49
- [0430] 小鼠抗人HVEM抗体49G4的轻链可变区的共有氨基酸序列
- 1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW FLQKPGQSPK  
LLIYKVS NRF
- [0431] 61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV LTFGAGTKLE LK
- [0432] 小鼠抗人HVEM抗体49G4的互补决定区 (CDR) :
- [0433] SEQ ID NO.50-55
- [0434] SEQ ID NO.50
- [0435] 49G4的氨基酸序列重链CDR1
- [0436] DTYMH
- [0437] SEQ ID NO.51

- [0438] 49G4的氨基酸序列重链CDR2  
[0439] RIDPARGNTKYDPKFQG  
[0440] SEQ ID NO.52  
[0441] 49G4的氨基酸序列重链CDR3  
[0442] AMDY  
[0443] SEQ ID NO.53  
[0444] 49G4的氨基酸序列轻链CDR1  
[0445] RSSQSIVHSNGNTYLE  
[0446] SEQ ID NO.54  
[0447] 49G4的氨基酸序列轻链CDR2  
[0448] KVSNRFS  
[0449] SEQ ID NO.55  
[0450] 49G4的氨基酸序列轻链CDR3  
[0451] FQGSHVPLT  
[0452] SEQ ID NO.56  
[0453] 编码嵌合小鼠VH 36H12和人恒定重IgG4链的cDNA序列  
1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT  
GCAGTGCGAA  
61 GTTCAGCTGC AGCAATCTGG CGCCGGACTG GTTAAGCCTG GCGCCTCTGT  
GAAGCTGAGC  
121 TGTACCGCCA GCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATGC ACTGGGTCCG  
ACAGAGGCCT  
181 GAGCAGGGAC TCGAATGGAT CGGCAGAATC GATCCCGCCA CCGCCAACAC  
CAAATACGAC  
241 CCCAAGTTCC AGGGCAAAGC CACTGACC ACCGACACCA GCAGCAACAC  
AGCCTACCTG  
[0454] 301 CAGCTGTCTA GCCTGACCAG CGAAGATACC GCCGTGTACT ACTGCGTGAC  
CTACGGCTAC  
361 GATGTGTCTT GTTTGCCTA CTGGGGACTG GCGCCCTGG TTACAGTTTC  
TGCCGCTCT  
421 ACAAAGGGCC CCAGCGTTTT CCCACTGGCT CCCTGTAGCA GAAGCACCAG  
CGAATCTACA 481 GCCGCTCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTTCCTGAGC  
CTGTGACCGT GTCCTGGAAC  
541 TCTGGCGCTC TGACATCTGG CGTGACACACC TTTCCAGCCG TGCTGCAAAG  
CAGCGGCCTG  
601 TACTCTCTGA GCAGCGTGGT CACAGTGCCT AGCTCTAGCC TGGGCACCAA

GACCTACACC

661 TGTAATGTGG ACCACAAGCC TAGCAACACC AAGGTGGACA AGCGCGTGGA  
ATCTAAGTAC

721 GGCCCTCCTT GTCCTCCATG TCCTGCACCT GAGTTTCTCG GCGGACCCTC  
CGTGTTCTG

781 TTTCTCCAA AGCCTAAGGA CACCCTGATG ATCAGCAGAA CCCCTGAAGT  
GACCTGCGTG

841 GTGGTGGACG TTTCCAAGA GGACCCTGAG GTGCAGTTCA ATTGGTACGT  
GGACGGCGTG

901 GAAGTGCACA ACGCCAAGAC CAAGCCTAGA GAGGAACAGT TCAACAGCAC  
CTACAGAGTG

961 GTGTCCGTGC TGACAGTGCT GCACCAGGAT TGGCTGAACG GCAAAGAGTA  
CAAGTGCAAG

[0455] 1021 GTGTCCAACA AGGGCCTGCC TAGCAGCATC GAGAAAACCA TCAGCAAGGC  
CAAGGGCCAG

1081 CCAAGAGAAC CCCAGGTGTA CACTGCCT CCAAGCCAAG AGGAAATGAC  
CAAGAACCAG

1141 GTGTCCCTGA CCTGCCTCGT GAAGGGCTTC TACCCTTCCG ATATCGCCGT  
GGAATGGGAG

1201 AGCAATGGCC AGCCTGAGAA CACTACAAG ACAACCCCTC CTGTGCTGGA  
CAGCGACGGC

1261 TCATTCTTCC TGTACAGCAG ACTGACCGTG GACAAGAGCA GATGGCAAGA  
GGGCAACGTG

1321 TTCTCCTGCA GCGTGATGCA CGAGGCCCTG CACAACCACT ACACCCAGAA  
GTCTCTGTCC

1381 CTGTCTCTGG GCAAG

[0456] SEQ ID NO.57

[0457] 编码嵌合小鼠VH 45H6和人恒定重IgG4链的cDNA序列

1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT  
GCAGTGTGAT

[0458] 61 GTGCAGCTGG TGGAATCTGG CGGAGGACTG GTTCAACCTG GCGGCAGCAG  
AAAGCTGTCT

121 TGTGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTCAGCAGC TTTGGAATGC ACTGGGTCCG  
ACAGGCCCT

181 GAGAAAGGCC TTGAGTGGGT CGCCTACATC AGCAGCGGCA ACAGCAACAT  
CTACTACGTG

241 GACACCGTGA AGGGCAGATT CACCATCTCC AGAGACAACC CCAAGAATAC  
CCTGTTCTG

301 CAGATGACCA GCCTGCGGAG CGAGGATACC GCCATGTACT ACTGCGCCCG  
GAAAAGAGCC

361 TACGGCGACT ACAGCGGCTT TAGCATGGAT TACTGGGGCC AGGGCACCAG  
CGTGACAGTG

421 TCTAGCGCCT CTACAAAGGG CCCTAGCGTG TTCCCTCTGG CTCCTTGTAG  
CAGAAGCACC

481 AGCGAGTCTA CAGCCGCTCT GGGCTGTCTG GTCAAGGACT ACTTTCCGA  
GCCTGTGACC

541 GTGTCTGGA ATTCTGGCGC TCTGACAAGC GGCCTGCACA CCTTTCCAGC  
TGTGCTGCAA

[0459] 601 AGCAGCGGCC TGTACTCTCT GAGCAGCGTG GTCACAGTGC CTAGCTCTAG  
CCTGGGCACC

661 AAGACCTACA CCTGTAATGT GGACCACAAG CCTAGCAACA CCAAGGTGGA  
CAAGCGCGTG

721 GAATCTAAGT ACGGCCCTCC TTGTCCTCCA TGTCCTGCTC CAGAGTTTCT  
CGGCGGACCC

781 TCCGTGTTCC TGTTTCCTCC AAAGCCTAAG GACACCCTGA TGATCAGCAG  
AACCCCTGAA

841 GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTTCCCAA GAGGACCCTG AGGTGCAGTT  
CAATTGGTAC

901 GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCTA GAGAGGAACA  
GTTCAACAGC

961 ACCTACAGAG TGGTGTCCGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ATTGGCTGAA  
CGGCAAAGAG

1021 TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCTAGCAGCA TCGAGAAAAC  
CATCAGCAAG

1081 GCCAAGGGCC AGCCAAGAGA ACCCCAGGTG TACACACTGC CTCCAAGCCA

AGAGGAAATG

1141 ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGCCTG GTTAAGGGCT TCTACCCCTC  
CGATATCGCC

1201 GTGGAATGGG AGAGCAATGG CCAGCCTGAG AACAACTACA AGACCACACC  
ACCTGTGCTG

[0460] 1261 GACAGCGACG GCTCATTCTT CCTGTACAGC AGACTGACCG TGGACAAGAG  
CAGATGGCAA

1321 GAGGGCAACG TG TTCAGCTG CAGCGTGATG CACGAGGCC TGCACAACCA  
CTACACCCAG

1381 AAGTCTCTGA GCCTGTCTCT GGGCAAG

[0461] SEQ ID NO.58

[0462] 编码嵌合小鼠VH 48H6和人恒定重IgG4链的cDNA序列

1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT  
GCAGTGCGAA

61 GTGAAGCTGG TGGAATCTGG CGGCGGACTG GTTAAGCCTG GCGGATCTCT  
GAAGCTGAGC

121 TGTGCCGCCA GCGGCTTTAC CTTTAGCGGC TACGCCATGA GCTGGGTCCG  
ACAGACACCC

181 GAGAAGAGAC TGGAATGGGT CGCCAGCATC AGCAGCGGCG GCAGCACATA  
TTACCCCGAC

241 TCTGTGAAGG GCCGCTTTAC AATCCCCAGA GATGACGCC GGAACATCCT  
GTACCTGCAG

[0463] 301 ATGAGCAGCC TGC GGAGCGA GGATACCGCC ATCTACTATT GTGCCAGAGG  
CGGCCACGGC

361 AGCAGCTATG TTTATTGGGG CCAGGGCACC AACTGACCG TGTCTAGCGC  
CTCTACAAAG

421 GGCCCTAGCG TGTTCCCTCT GGCTCCTTGT AGCAGAAGCA CCAGCGAGTC  
TACAGCCGCT

481 CTGGGCTGTC TGGTCAAGGA CTACTTTCCC GAGCCTGTGA CAGTGTCTCTG  
GAACTCTGGC

541 GCTCTGACAA GCGGCGTGCA CACATTTCCA GCCGTGCTGC AAAGCAGCGG  
CCTGTACTCT

601 CTGAGCAGCG TGGTCACAGT GCCTAGCTCT AGCCTGGGCA CCAAGACCTA  
CACCTGTAAT

661 GTGGACCACA AGCCTAGCAA CACCAAGGTG GACAAGCGCG TGGAATCTAA  
GTACGGCCCT

721 CCTTGTCTC CATGTCCTGC ACCTGAGTTT CTCGGCGGAC CCTCCGTGTT  
CCTGTTTCCT

781 CCAAAGCCTA AGGACACCCT GATGATCAGC AGAACCCTG AAGTGACCTG  
CGTGGTGGTG

841 GACGTTTCCC AAGAGGACCC TGAGGTGCAG TTCAATTGGT ACGTGGACGG  
CGTGGAAAGTG

901 CACAACGCCA AGACCAAGCC TAGAGAGGAA CAGTTCAACA GCACCTACAG  
AGTGGTGTCC

[0464] 961 GTGCTGACAG TGCTGCACCA GGATTGGCTG AACGGCAAAG AGTACAAGTG  
CAAGGTGTCC

1021 AACAAAGGGCC TGCCTAGCAG CATCGAGAAA ACCATCAGCA AGGCCAAGGG  
CCAGCCAAGA

1081 GAACCCAGG TGTACACACT GCCTCCAAGC CAAGAGGAAA TGACCAAGAA  
CCAGGTGTCC

1141 CTGACCTGCC TCGTGAAGGG CTTCTACCCT TCCGATATCG CCGTGGAAATG  
GGAGAGCAAT

1201 GGCCAGCCTG AGAACAACTA CAAGACAACC CCTCCTGTGC TGGACAGCGA  
CGGCTCATT

1261 TTCCTGTACA GCAGGCTGAC CGTGGACAAG AGCAGATGGC AAGAGGGCAA  
CGTGTTTCAGC

1321 TGCAGCGTGA TGCACGAGGC CCTGCACAAC CACTACACCC AGAAGTCTCT  
GAGCCTGTCT

1381 CTGGGCAAG

[0465] SEQ ID NO.59

[0466] 编码嵌合小鼠VH 11H7和人恒定重IgG4链的cDNA序列

1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT  
GCAGTGTCAG

[0467] 61 GTGCAGCTGA AGCAGTCTGG ACCTGGACTG GTGCAGCCTA GCCAGAGCCT  
GAGCATCACC

121 TGTACCGTGT CCGGCTTCAG CCTGACCATC TATGGCGTGC ACTGGGTCCG  
ACAGAGCCCT

181 GGCAAAGGAC TGGAATGGCT GGGAGTGATT TGGAGCGGCG GCAGCACCGA  
TTACAACGCC

241 GCCTTTATCA GCAGACTGAG CATCTCCAAG GACAACAGCA AGAGCCAGGT  
GTTCTTCAAG

301 ATGAACTCCC TGCAGGCCAA CGACACCGCC ATCTACTACT GCGCCAGAAG  
AGACTACGGC

361 AGCCGGTCCT TCTACTACGC TATGGACTAT TGGGGCCAGG GCACCAGCGT  
GACAGTGTCT

421 AGCGCCTCTA CAAAGGGCCC TAGCGTG TTCCTCTGGCTC CTTGTAGCAG  
AAGCACCAGC

481 GAGTCTACAG CCGCTCTGGG CTGTCTGGTC AAGGACTACT TTCCCGAGCC  
AGTGACCGTG

541 TCCTGGAATT CTGGCGCTCT GACAAGCGGC GTGCACACCT TTCCAGCTGT  
GCTGCAAAGC

[0468] 601 AGCGGCCTGT ACTCTCTGAG CAGCGTGGTC ACAGTGCCTA GCTCTAGCCT  
GGGCACCAAG

661 ACCTACACCT GTAATGTGGA CCACAAGCCT AGCAACACCA AGGTGGACAA  
GCGCGTGGAA

721 TCTAAGTACG GCCCTCCTTG TCCTCCATGT CCTGCTCCAG AGTTTCTCGG  
CGGACCCTCC

781 GTGTTCTGT TTCCTCCAAA GCCTAAGGAC ACCCTGATGA TCAGCAGAAC  
CCCTGAAGTG

841 ACCTGCGTGG TGGTGGACGT TTCCAAGAG GACCCTGAGG TGCAGTTCAA  
TTGGTACGTG

901 GACGGCGTGG AAGTGCACAA CGCCAAGACC AAGCCTAGAG AGGAACAGTT  
CAACAGCACC

961 TACAGAGTGG TGTCCGTGCT GACCGTGCTG CATCAGGATT GGCTGAACGG  
CAAAGAGTAC

1021 AAGTGCAAGG TGTCCAACAA GGGCCTGCCT AGCAGCATCG AGAAAACCAT  
CAGCAAGGCC

1081 AAGGGCCAGC CAAGAGAACC CCAGGTGTAC AACTGCCTC CAAGCCAAGA

GGAAATGACC

1141 AAGAATCAGG TGTCCCTGAC CTGCCTCGTG AAGGGCTTCT ACCCTTCCGA  
TATCGCCGTG

1201 GAATGGGAGA GCAATGGCCA GCCTGAGAAC AACTACAAGA CAACCCCTCC  
TGTGCTGGAC

[0469] 1261 AGCGACGGCT CATTCTTCTT GTACTCCAGA CTGACCGTGG ACAAGAGCAG  
ATGGCAAGAG

1321 GGCAACGTGT TCAGCTGCTC CGTGATGCAC GAGGCCCTGC ACAACCACTA  
CACCCAGAAG

1381 TCCCTGAGCC TGTCTCTGGG CAAA

[0470] SEQ ID NO.60

[0471] 编码嵌合小鼠VH 49G4和人恒定重IgG4链的cDNA序列

1 ATGGAGCTGG GCCTGAGCTG GATTTTTCTG CTGGCCATCC TGAAGGGCGT  
GCAGTGCGAA

61 GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG CGCCGAGCTT GTGAAACCTG GCGCCTCTGT  
GAAGCTGAGC

121 TGTAGAGCCA GCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATGC ACTGGGTCAA  
GCAGAGGCCT

181 GAGCAGGGCC TCGAATGGAT CGGCAGAATC GATCCCGCCA GAGGCAACAC  
CAAATACGAC

241 CCCAAGTTCC AGGGCAAAGC CACCATCACC GCCGACACCT CTAGCAACAC  
AGCCTACCTG

[0472] 301 CAGCTGTCCA GCCTGACCTC TGAAGATACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG  
CGCTATGGAT

361 TATTGGGGCC AGGGCACAAG CGTGACCGTG TCTAGCGCCT CTACAAAGGG  
CCCTAGCGTG

421 TTCCCACTGG CTCCCTGTAG CAGAAGCACC AGCGAATCTA CAGCCGCTCT  
GGGCTGCCTG

481 GTCAAGGACT ACTTTCCTGA GCCTGTGACA GTGTCCTGGA ACTCTGGCGC  
TCTGACAAGC

541 GGCGTGCACA CATTTCCAGC CGTGCTGCAA AGCAGCGGCC TGTACTCTCT  
GAGCAGCGTG

- 601 GTCACAGTGC CTAGCTCTAG CCTGGGCACC AAGACCTACA CCTGTAATGT  
GGACCACAAG
- 661 CCTTCCAACA CCAAGGTGGA CAAGCGCGTG GAATCTAAGT ACGGCCCTCC  
TTGTCCTCCA
- 721 TGTCTGCAC CTGAGTTTCT CGGCGGACCC TCCGTGTTCC TGTTTCCTCC  
AAAGCCTAAG
- 781 GACACCCTGA TGATCAGCAG AACCCCTGAA GTGACCTGCG TGGTGGTGGGA  
CGTTTCCCAA
- 841 GAGGACCCTG AGGTGCAGTT CAATTGGTAC GTGGACGGCG TGGAAGTGCA  
CAACGCCAAG
- 901 ACCAAGCCTA GAGAGGAACA GTTCAACAGC ACCTACAGAG TGGTGTCCGT  
GCTGACAGTG
- [0473] 961 CTGCACCAGG ATTGGCTGAA CGGCAAAGAG TACAAGTGCA AGGTGTCCAA  
CAAGGGCCTG
- 1021 CCTAGCAGCA TCGAGAAAAC CATCAGCAAG GCCAAGGGCC AGCCAAGAGA  
ACCCAGGTG
- 1081 TACACACTGC CTCCAAGCCA AGAGGAAATG ACCAAGAACC AGGTGTCCCT  
GACCTGCCTC
- 1141 GTGAAGGGCT TCTACCCTTC CGATATCGCC GTGGAATGGG AGAGCAATGG  
CCAGCCTGAG
- 1201 AACAACTACA AGACAACCCC TCCTGTGCTG GACTCCGACG GCTCATTCTT  
CCTGTACAGC
- 1261 AGACTGACCG TGGACAAGAG CAGATGGCAA GAGGGCAACG TGTTCTCCTG  
CAGCGTGATG
- 1321 CACGAAGCCC TGCACAACCA CTACACCCAG AAGTCTCTGT CCCTGTCTCT  
GGGCAAG
- [0474] SEQ ID NO.61
- [0475] 编码嵌合小鼠VL 36H12和人恒定轻κ链的cDNA序列
- 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGACTGCTGC TGCTTTGGTT  
TCCTGGCGCT
- [0476] 61 AGATGCGACG TGCTGATGAC CCAGACACCT CTGAGCCTGC CTGTGTCTCT  
GGGAGATCAG
- 121 GCCAGCATCA GCTGCAGATC CAGCCAGAGC ATCGTGCACA GCAACGGCAT

CACCTACCTG

181 GAATGGTATC TGCAGAAGCC CGGACAGAGC CCCAAGCTGC TGATCTACAA  
GGTGTCCAAC

241 CGG TTCAGCG GCGTGCCCGA TAGATTTTCT GGCAGCGGCT CTGGCACCGA  
CTTCACCCTG

301 AAGATCTCCA GAGTGGAAGC CGAGGACCTG GCGGTGTACT ACTGCTTCCA  
AGGCTCTCAC

361 GTGCCCCTGA CATTGGAGC CGGCACCAAG CTGGAAGTGA AGAGAACAGT  
GGCCGCTCCT

[0477] 421 AGCGTGTTCA TCTTCCCACC TTCCGACGAG CAGCTGAAAA GCGGCACAGC  
CTCTGTCTGTG

481 TGCCTGCTGA ACAACTTCTA CCCAGAGAA GCCAAGGTGC AGTGGAAGGT  
GGACAACGCC

541 CTGCAGAGCG GCAATAGCCA AGAGAGCGTG ACCGAGCAGG ACAGCAAGGA  
CTCTACCTAC

601 AGCCTGAGCA GCACCCTGAC ACTGAGCAAG GCCGACTACG AGAAGCACAA  
AGTGTACGCC

661 TGC GAAGTGA CCCACCAGGG CCTTTCTAGC CCTGTGACCA AGAGCTTCAA  
CCGGGGCGAA

721 TGT

[0478] SEQ ID NO.62

[0479] 编码嵌合小鼠VL 45H6和人恒定轻κ链的cDNA序列

1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT  
TCCTGGCGCT

61 AGATGCGACA TCGTGATGAC CCAGAGCCAG AAATTCATGA GCACCAGCGT  
GGGCGACAGA

[0480] 121 GTGTCCGTGA CATGTAAAGC CAGCCAGAAC GTGGACACCA ACGTGGCCTG  
GTATCAGCAG

181 AAGCCTGGAC AGAGCCCCAA GGCTCTGATC TACAGCGCCA GCTACAGATA  
CAGCGGCGTG

241 CCCGATAGAT TCACAGGCAG CGGCTCTGGC ACCGACTTCA CCCTGACAAT  
CAGCAACGTG

- 301 CAGAGCGAGG ACCTGGCCGA GTATTTCTGC CAGCAGTACA ACAAGTTCCC  
TCTGACCTTC
- 361 GCGGAGGCA CCAAGCTGGA AATCAAGAGA ACAGTGGCCG CTCCTAGCGT  
GTTCACTTC
- 421 CCACCTTCCG ACGAGCAGCT GAAAAGCGGC ACAGCCTCTG TCGTGTGCCT  
GCTGAACAAC
- [0481] 481 TTCTACCCCA GAGAAGCCAA GGTGCAGTGG AAGGTGGACA ACGCCCTGCA  
GAGCGGCAAT
- 541 AGCCAAGAGA GCGTGACCGA GCAGGACAGC AAGGACTCTA CCTACAGCCT  
GAGCAGCACA
- 601 CTGACCCTGA GCAAGGCCGA CTACGAGAAG CACAAAGTGT ACGCCTGCGA  
AGTGACCCAC
- 661 CAGGGCCTTT CTAGCCCTGT GACCAAGAGC TTCAACCGGG GCGAATGT
- [0482] SEQ ID NO.63
- [0483] 编码嵌合小鼠VL 48H6和人恒定轻κ链的cDNA序列
- 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT  
TCCTGGCGCT
- 61 AGATGCGACA TCGTGATGTC TCAGAGCCCT AGCAGCCTGG CCGTGTCTGT  
GGGAGAGAAA
- 121 GTGACCATGA GCTGCAAGAG CAGCCAGAGC CTGCTGTACT CCAGCAACCA  
GAAGAACTAC
- 181 CTGGCCTGGT ATCAGCAGAA GCCCGGACAG TCTCCCAAGC TGCTGATCTA  
CTGGGCCAGC
- [0484] 241 ACCAGAGAAA GCGGCGTGCC CGATAGATTC ACAGGCAGCG GCAGCGGAAC  
CGACTTCACC
- 301 CTGACAATCA GCAGCGTGAA GGCCGAGGAC CTGGCTGTGT ACTACTGCCA  
CCAGTATTAC
- 361 AGCTACCCTC TGACCTTCGG AGCCGGCACC AAGCTGGAAC TGAACAGAAC  
AGTGCCCGCT
- 421 CCTAGCGTGT TCATCTTCCC ACCTTCCGAC GAGCAGCTGA AGTCTGGCAC  
AGCCTCTGTC
- 481 GTGTGCCTGC TGAACA ACTT CTACCC CAGA GAAGCCAAGG TGCAGTGGAA  
GGTGGACAAC
- 541 GCCCTGCAGA GCGGCAATAG CCAAGAGAGC GTGACCGAGC AGGACAGCAA  
GGACTCTACC
- 601 TACAGCCTGA GCAGCACACT GACCCTGAGC AAGGCCGACT ACGAGAAGCA  
CAAAGTGTAC
- [0485] 661 GCCTGCGAAG TGACCCACCA GGGCCTTTCT AGCCCTGTGA CCAAGAGCTT  
CAACCGGGGC
- 721 GAATGT
- [0486] SEQ ID NO.64

[0487] 编码嵌合小鼠VL 11H7和人恒定轻κ链的cDNA序列

1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT  
TCCTGGCGCT

61 AGATGCGAGA TCGTGCTGAC ACAGAGCCCT GCTCTGATGG CTGCTTCCCC  
TGGCGAGAAA

121 GTGACCATCA CCTGTAGCGT GTCCAGCAGC ATCAGCAGCT CCAACCTGCA  
CTGGTATCAG

181 CAGAAGTCCG AGACAAGCCC CAAGCCTTGG ATCTACGGCA CCAGCAATCT  
GGCCAGCGGA

241 GTGCCTGTCA GATTTTCTGG CAGCGGCTCT GGCACCAGCT ACAGCCTGAC  
AATCAGCAGC

301 ATGGAAGCCG AGGATGCCGC CACCTACTAC TGCCAGCAGT GGTCTAGCTA  
CCCTCTGACC

[0488]

361 TTTGGCGGAG GCACCAAGCT GGAAATCAAG CGGACAGTGG CCGCTCCTAG  
CGTGTTTCATC

421 TTTCCACCTA GCGACGAGCA GCTGAAGTCT GGCACAGCCT CTGTCGTGTG  
CCTGCTGAAC

481 AACTTCTACC CCAGAGAAGC CAAGGTGCAG TGGAAGGTGG ACAACGCCCT  
GCAGAGCGGC

541 AATAGCCAAG AGAGCGTGAC CGAGCAGGAC AGCAAGGACT CCACCTATAG  
CCTGAGCAGC

601 ACCCTGACAC TGAGCAAGGC CGACTACGAG AAGCACAAAG TGTACGCCTG  
CGAAGTGACC

661 CACCAGGGCC TTTCTAGCCC TGTGACCAAG AGCTTCAACC GGGGCGAATG T

[0489] SEQ ID NO.65

[0490] 编码嵌合小鼠VL和49G4人恒定轻κ链的cDNA序列

- 1 ATGGACATGA GAGTTCCCGC TCAGCTGCTG GGA CTGCTGC TGCTTTGGTT  
TCCTGGCGCT
- 61 AGATGCGACG TGCTGATGAC CCAGACACCT CTGAGCCTGC CTGTGTCTCT  
GGGAGATCAG
- 121 GCCAGCATCA GCTGCAGATC CAGCCAGAGC ATCGTGCACA GCAACGGCAA  
TACCTACCTG
- 181 GAATGGTTCC TGCAGAAGCC CGGACAGAGC CCCAAGCTGC TGATCTACAA  
GGTGTCCAAC
- 241 CGGTT CAGCG GCGTGCCCGA TAGATTTTCT GGCAGCGGCT CTGGCACCGA  
CTTACCCTG
- 301 AAGATCTCCA GAGTGGAAGC CGAGGACCTG GCGGTGTACT ACTGCTTCCA  
AGGCTCTCAC
- [0491] 361 GTGCCCTGA CATTGGAGC CGGCACCAAG CTGGAACTGA AGAGAACAGT  
GGCCGCTCCT
- 421 AGCGTGTTC A TCTTCCCACC TTCCGACGAG CAGCTGAAAA GCGGCACAGC  
CTCTGTCGTG
- 481 TGCCTGCTGA ACAACTTCTA CCCCAGAGAA GCCAAGGTGC AGTGGAAGGT  
GGACAACGCC
- 541 CTGCAGAGCG GCAATAGCCA AGAGAGCGTG ACCGAGCAGG ACAGCAAGGA  
CTCTACCTAC
- 601 AGCCTGAGCA GCACCCTGAC ACTGAGCAAG GCCGACTACG AGAAGCACAA  
AGTGTACGCC
- 661 TGCGAAGTGA CCCACCAGGG CCTTTCTAGC CCTGTGACCA AGAGCTTCAA  
CCGGGGCGAA
- 721 TGT
- [0492] SEQ ID NO.66
- [0493] 嵌合小鼠VH 36H12和人恒定重IgG4链的氨基酸序列
- 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VQLQSGAGL VKPGASVKLS CTASGFNIKD  
TYMHWVRQRP
- [0494] 61 EQGLEWIGRI DPATANTKYD PKFQ GKATLT TDTSSNTAYL QLSSLTSED T  
AVYYCVTYGY

- 121 DVSWFAYWGL GALVTVSAAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY  
FPEPVTVSWN
- 181 SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT  
KVDKRVESKY
- 241 GPPCPPCAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE  
[0495] VQFNWYVDGV
- 301 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI  
EKTISKAKGQ
- 361 PREPQVYTL PSEQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK  
TTPPVLDSDG
- 421 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK  
[0496] SEQ ID NO.67
- [0497] 嵌合小鼠VH 45H6和人恒定重IgG4链的氨基酸序列
- 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCD VQLVESGGGL VQPGGSRKLS CAASGFTFSS  
FGMHWVRQAP
- 61 EKGLEWVAYI SSGNSNIYYV DTVKGRFTIS RDNPKNTLFL QMTSLRSED  
AMYICARKRA
- 121 YGDYSGFSMD YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL  
VKDYFPEPVT
- 181 VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNV  
[0498] PSNTKVDKRV
- 241 ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ  
EDPEVQFNWY
- 301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL  
PSSIEKTISK
- 361 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE  
NNYKTTTPVL
- 421 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK  
[0499] SEQ ID NO.68
- [0500] 嵌合小鼠VH 48H6和人恒定重IgG4链的氨基酸序列
- 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VKLVESGGGL VKPGGSLKLS CAASGFTFSG  
YAMSWVRQTP

- 61 EKRLWVSI SSGGSTYYPD SVKGRFTIPR DDARNILYLQ MSSLRSEDTA  
IYYCARGGHG
- 121 SSVVYWGQGT TLTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP  
EPVTVSWNSG
- 181 ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGKTYTCN VDHKPSNTKV  
DKRVESKYGP
- [0501] 241 PCPPCAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ  
FNWYVDGVEV
- 301 HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK  
TISKAKGQPR
- 361 EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
PPVLDSGDSF
- 421 FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG LGK
- [0502] SEQ ID NO.69
- [0503] 嵌合小鼠VH 11H7和人恒定重IgG4链的氨基酸序列
- 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCQ VQLKQSGPGL VQPSQSL SIT CTVSGFSLTI  
YGVHWVRQSP
- 61 GKGLEWLGVI WSGGSTDYNA AFISRLSISK DNSKSQVFFK MNSLQANDTA  
IYYCARRDYG
- 121 SRSFYAMDY WGQGTSVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV  
KDYFPEPVTV
- 181 SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP  
SNTKVDKRVE
- [0504] 241 SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE  
DPEVQFNWYV
- 301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP  
SSIEKTISKA
- 361 KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN  
NYKTPPVLD
- 421 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGGK
- [0505] SEQ ID NO.70
- [0506] 嵌合小鼠VH 49G4和人恒定重IgG4链的氨基酸序列

- 1 MELGLSWIFL LAILKGVQCE VQLQQSGAEL VKPGASVKLS CRASGFNIKD  
TYMHWVKQRP
- 61 EQGLEWIGRI DPARGNTKYD PKFQ GKATIT ADTSSNTAYL QLSSLTSED  
AVYYCASAMD
- 121 YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT  
VSWNSGALTS
- [0507] 181 GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV  
ESKYGPPCPP
- 241 CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWY  
VDGVEVHNAK
- 301 TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK  
AKGQPREPQV
- 361 YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYS
- 421 RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
- [0508] SEQ ID NO.71
- [0509] 嵌合小鼠VL 36H12和人恒定轻κ链的氨基酸序列
- 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDVLMQTTP LSLPVSLGDQ ASISCRSSQS  
IVHSNGITYL
- 61 EWYLQKPGQS PKLLIYKVS N RFSGVPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEAEDL  
GVYYCFQGS
- [0510] 121 VPLTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNA
- 181 LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGE
- 241 C
- [0511] SEQ ID NO.72
- [0512] 嵌合小鼠VL 45H6和人恒定轻κ链的氨基酸序列
- 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDIVMTQSQ KFMSTSVGDR VSVTCKASQN  
VDTNVAWYQQ
- [0513] 61 KPGQSPKALI YSASYRYSV PDRFTGSGSG TDFTLTISNV QSEDLAEYFC  
QQYNKFPLTF
- 121 GGGTKLEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW  
KVDNALQSGN
- [0514] 181 SQESVTEQDS KDSTYSLSS LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS  
FNRGEC
- [0515] SEQ ID NO.73
- [0516] 嵌合小鼠VL 48H6和人恒定轻κ链的氨基酸序列

- 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDIVMSQSP SSLAVSVGEK VTMSCKSSQS  
LLYSSNQKNY
- 61 LAWYQKPGQ SPKLLIYWAS TRESGVPDRF TGSGSGTDFT LTISSVKAED  
LAVYYCHQYY
- [0517] 121 SYPLTFGAGT KLELNRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR  
EAKVQWKVDN
- 181 ALQSGNSQES VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRG
- 241 EC
- [0518] SEQ ID NO.74
- [0519] 嵌合小鼠VL 11H7和人恒定轻 $\kappa$ 链的氨基酸序列
- 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCEIVLTQSP ALMAASPGEK VTITCSVSSS  
ISSSNLHWYQ
- 61 QKSETSPKPW IYGTSNLASG VPVRFSGSGS GTSYSLTISS MEAEDAATYY  
CQQWSSYPLT
- [0520] 121 FGGGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ  
WKVDNALQSG
- 181 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
SFNRGEC
- [0521] SEQ ID NO.75
- [0522] 嵌合小鼠VL 49G4和人恒定轻 $\kappa$ 链的氨基酸序列
- 1 MDMRVPAQLL GLLLLWFPGA RCDVLMTQTP LSLPVSLGDQ ASISCRSSQS  
IVHSNGNTYL
- [0523] 61 EWFLQKPGQS PKLLIYKVSN RFSGVPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEAEDL  
GVYYCFQGS
- 121 VPLTFGAGTK LELKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV CLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNA
- [0524] 181 LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGE
- 241 C
- [0525] SEQ ID NO.76
- [0526] 膜结合抗人CD3 scFv的氨基酸序列(信号肽,随后是与人IgG1的CH2-CH3结构域和  
人CD80胞质尾连接的OKT3 scFv)

- 1 MKWVTFISLL FLSSAYSQV QLQQSGAELA RPGASVKMSC KASGYTFTRY  
TMHWVKQRPG
- 61 QGLEWIGYIN PSRGYTNYNQ KFKDKATLTT DKSSSTAYMQ LSSLTSEDSA  
VYYCARYYDD
- 121 HYCLDYWGQG TTLTVSSGGG GSGGGGSGGG GSQIVLTQSP AIMSASPGEK  
VTMTCSASS
- 181 VSYMNWYQQK SGTSPKRWIY DTSKLAGSVP AHFRGSGSGT SYSLTISGME  
AEDAATYYCQ
- [0527] 241 QWSSNPFTFG SGKLEINRA AAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKF
- 301 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
KALPAIEKT
- 361 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
QPENNYKTP
- 421 PVLDSGDGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP  
GWAITLISVN
- 481 GIFVICCLTY CFAPRCRERR RNERLRRESV RPV
- [0528] SEQ ID NO.77
- [0529] 编码膜结合抗人CD3 scFv的cDNA序列
- 1 ATGAAATGGG TCACCTTTAT CTCCTGCTG TTCCTGTTCT CCAGCGCCTA  
CTCTCAGGTC
- [0530] 61 CAGTTGCAGC AGTCTGGCGC CGAATTGGCT AGACCTGGCG CCTCCGTGAA  
GATGTCCTGC

121 AAGGCTCCG GCTACACCTT CACCAGATAC ACCATGCACT GGGTCAAGCA  
GAGGCCTGGA

181 CAGGGCCTTG AGTGGATCGG CTACATCAAC CCTTCTCGGG GCTACACCAA  
CTACAACCAG

241 AAGTTCAAGG ACAAGGCTAC CCTGACAACC GACAAGTCCT CCTCCACCGC  
CTACATGCAG

301 CTGTCCAGCC TGACCTCTGA GGACTCCGCC GTGTACTACT GTGCCCGGTA  
CTACGACGAC

361 CACTACTGCC TGGATTATTG GGGCCAGGGC ACCACACTGA CAGTGTCTAG  
CGGAGGCGGA

421 GGATCTGGTG GTGGTGGATC TGGCGGCGGA GGTTCTCAGA TTGTGCTGAC  
CCAGTCTCCT

481 GCCATCATGT CCGCTTCTCC CGGCGAGAAA GTGACAAATGA CCTGCTCCGC  
CTCTTCCTCC

541 GTGTCTACA TGAAGTGGTA TCAGCAGAAG TCCGGCACCT CTCCTAAGCG  
GTGGATCTAC

[0531] 601 GACACCTCCA AGCTGGCATC TGGCGTGCCC GCTCACTTTA GAGGCTCTGG  
CTCTGGCACC

661 AGCTACTCCC TGACCATCTC TGGCATGGAA GCCGAGGATG CCGCCACCTA  
CTATTGCCAG

721 CAGTGGTCTA GCAACCCCTT CACCTTCGGC TCCGGCACCA AGCTGGAAAT  
CAACAGAGCC

781 GCCGCTCCTT CCGTGTTTCT GTTCCCTCCA AAGCCTAAGG ACACCCTGAT  
GATCTCTCGG

841 ACCCCTGAAG TGACCTGCGT GGTGGTCGAT GTGTCTCACG AGGACCCAGA  
AGTGAAGTTC

901 AATTGGTACG TGGACGGCGT GGAAGTGCAC AACGCCAAGA CCAAGCCTAG  
AGAGGAACAG

961 TACAACCTCA CCTACAGAGT GGTGTCCGTG CTGACCGTGC TGCACCAGGA  
TTGGCTGAAC

1021 GGCAAAGAGT ACAAGTGCAA GGTGTCCAAC AAGGCTCTGC CCGCTCCTAT  
CGAAAAGACC

1081 ATCTCCAAGG CCAAGGGCCA GCCTAGGGAA CCCCAGGTTT ACACCCTGCC

TCCAAGCCGG

1141 GAAGAGATGA CCAAGAACCA GGTGTCCCTG ACCTGCCTGG TCAAGGGCTT  
CTACCCTTCC

1201 GATATCGCCG TGGAATGGGA GAGCAATGGC CAGCCTGAGA ACAACTACAA  
GACCACACCT

1261 CCTGTGCTGG ACTCCGACGG CTCATTCTTC CTGTACAGCA AGCTGACAGT  
GGACAAGTCC

[0532] 1321 AGATGGCAGC AGGGCAACGT GTTCTCCTGC TCCGTGATGC ACGAGGCCCT  
GCACAATCAC

1381 TACACACAGA AGTCCCTGTC TCTGTCCCCT GGCTGGGCTA TCACCCTGAT  
CTCTGTGAAC

1441 GGCATCTTCG TGATCTGCTG CCTGACCTAC TGCTTCGCCC CTAGATGCAG  
AGAGCGGCGG

1501 AGAAACGAAC GGCTGCGGAG AGAATCTGTC CGGCCTGTG

。

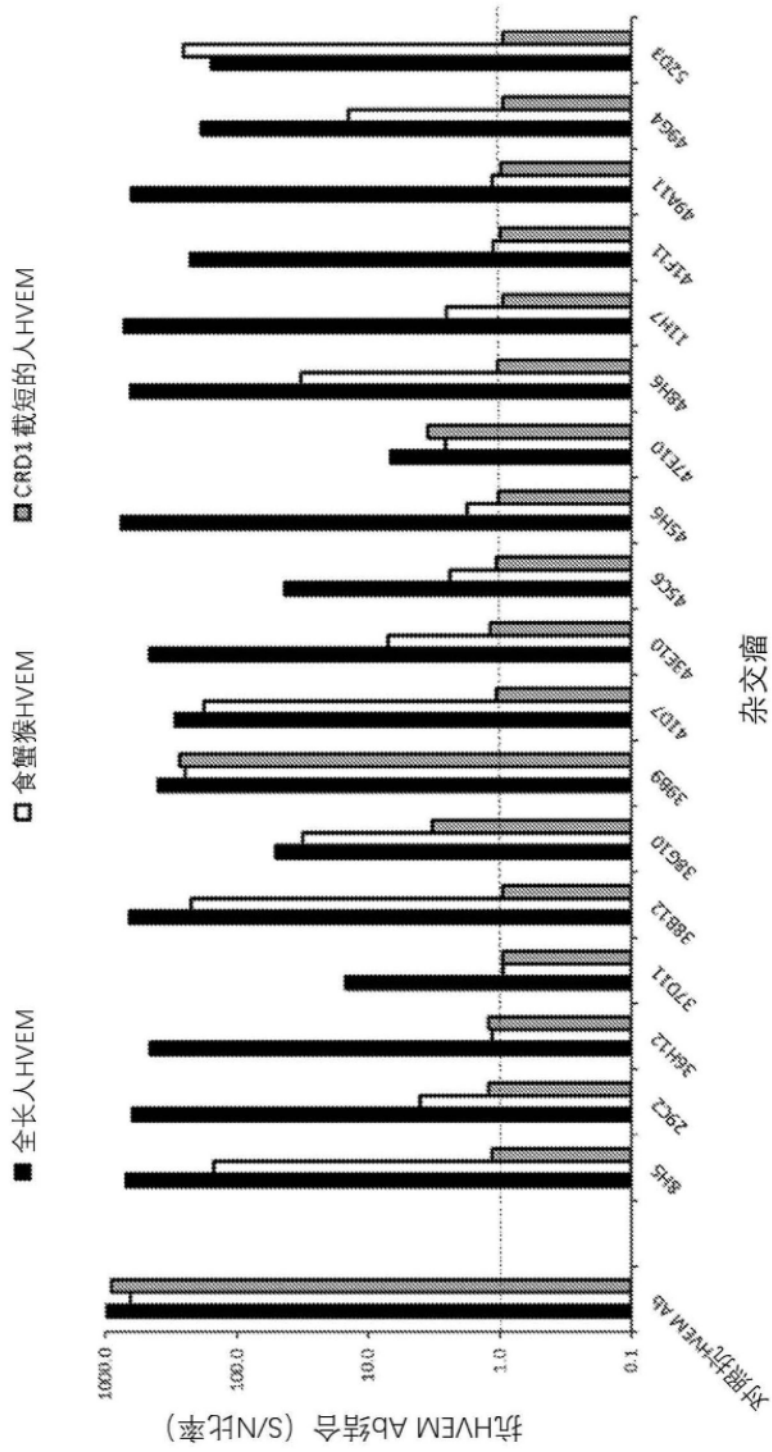


图1

### BTLA/HVEM相互作用

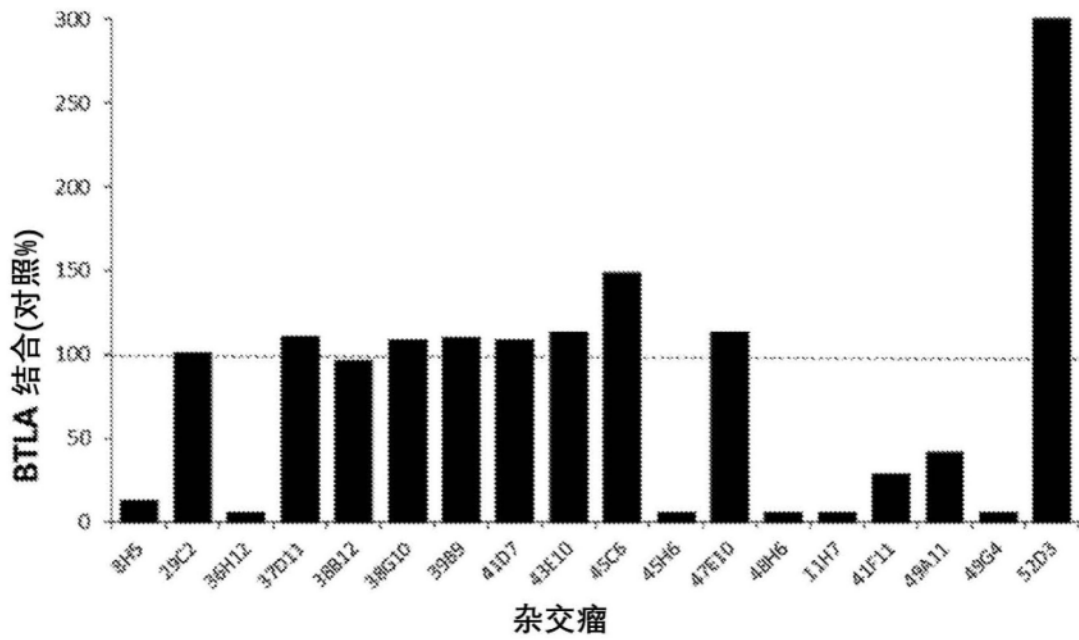


图2A

### LIGHT/HVEM相互作用

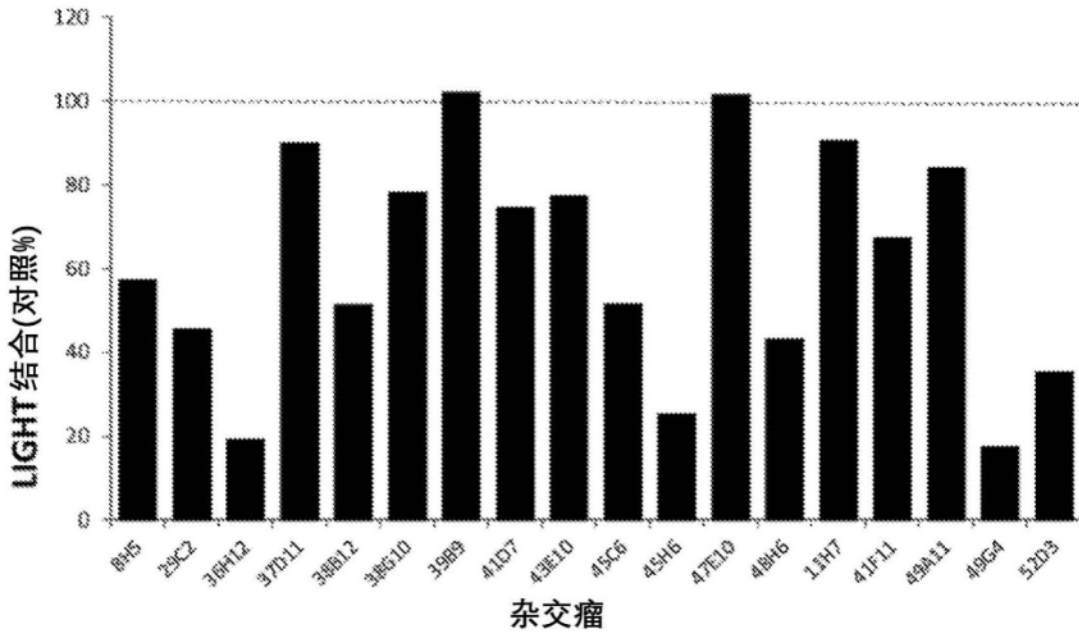


图2B

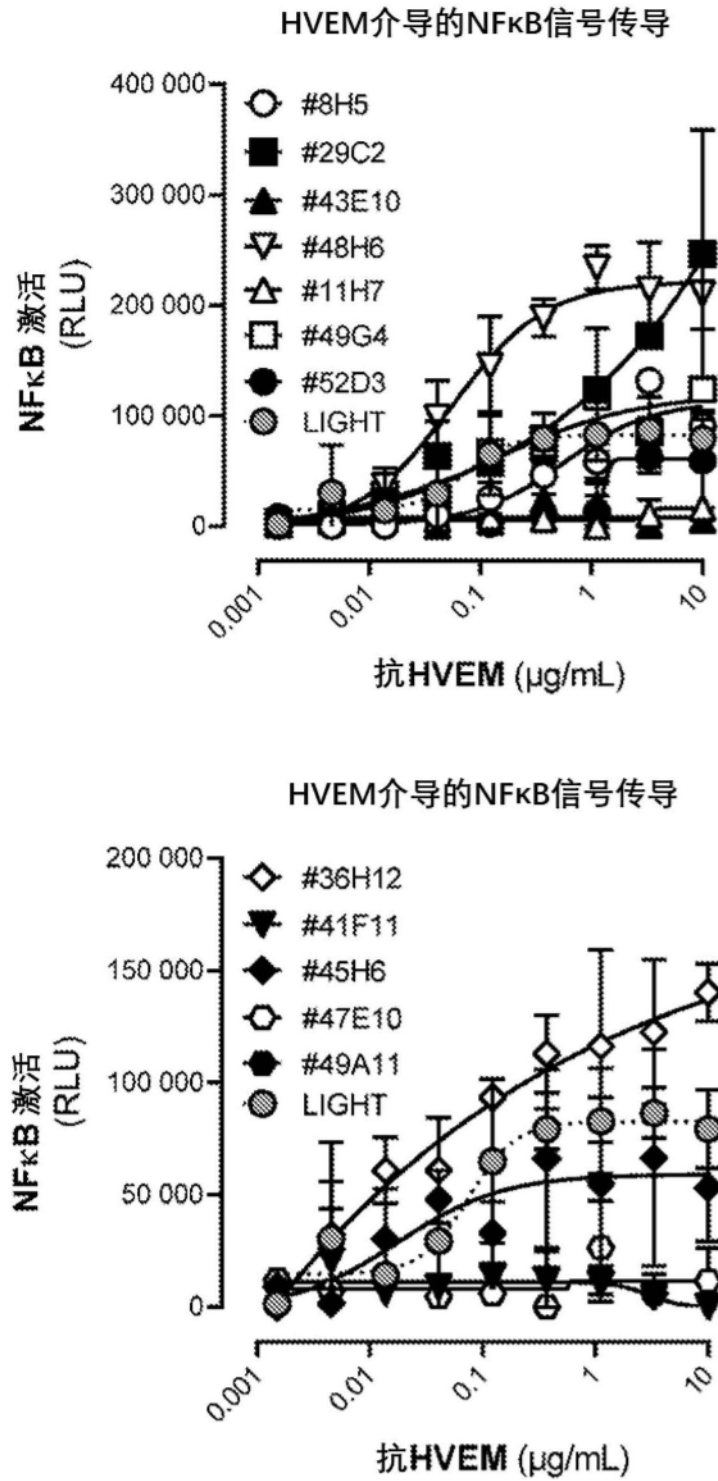


图3A

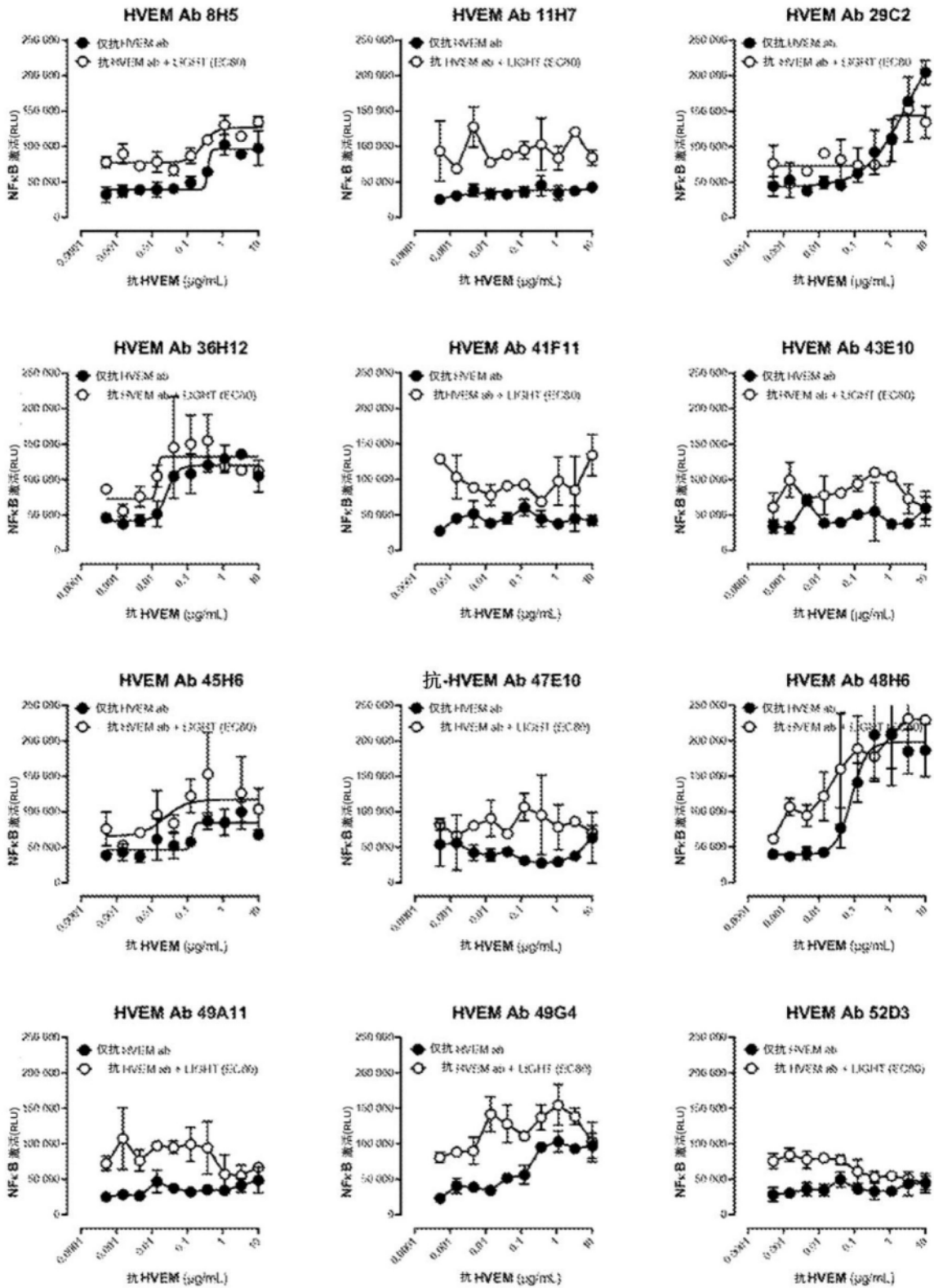


图3B

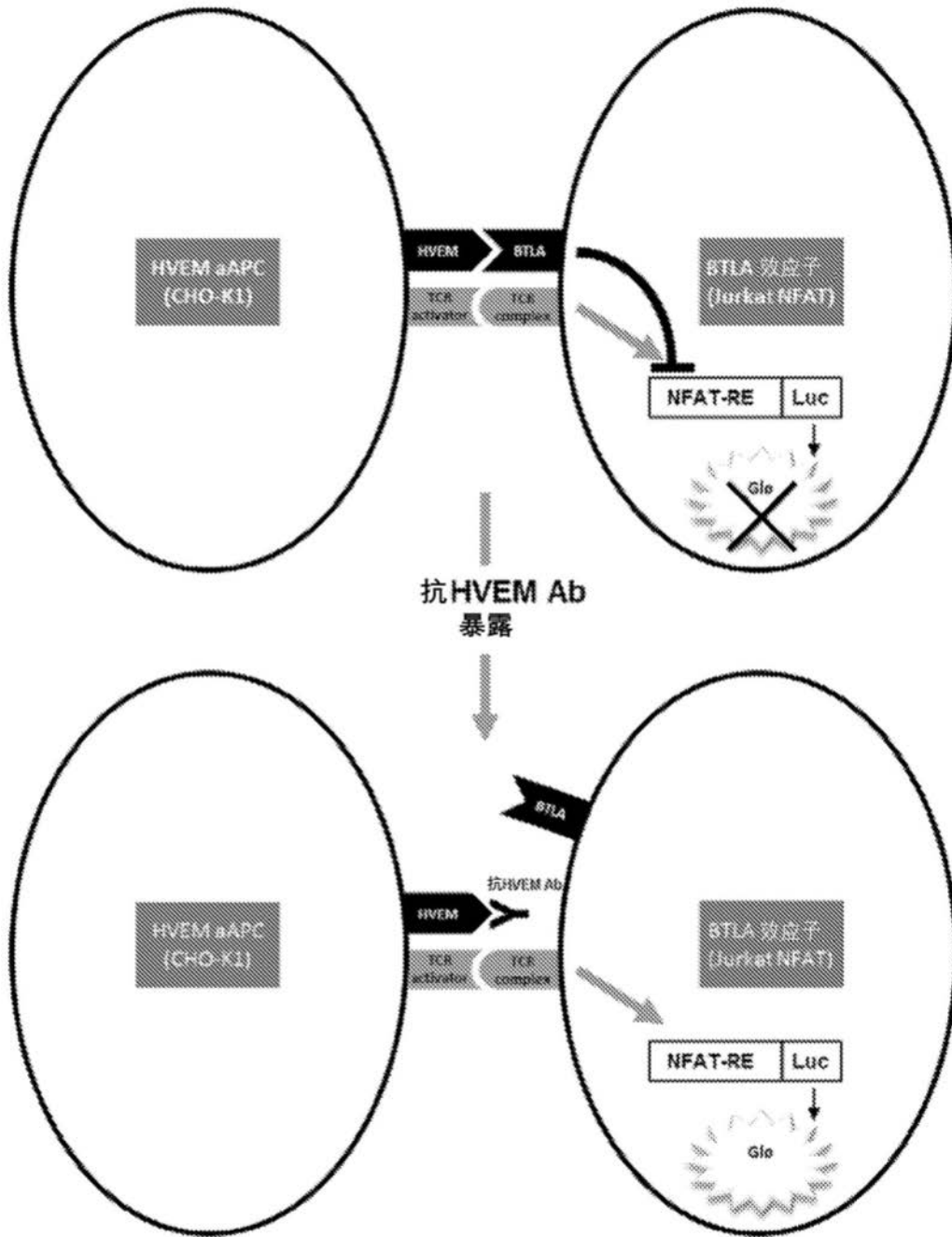


图4A

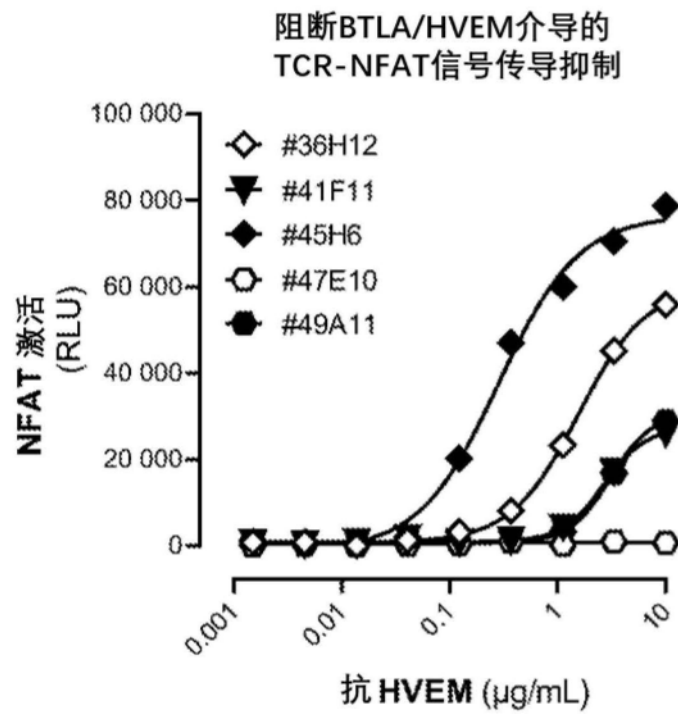
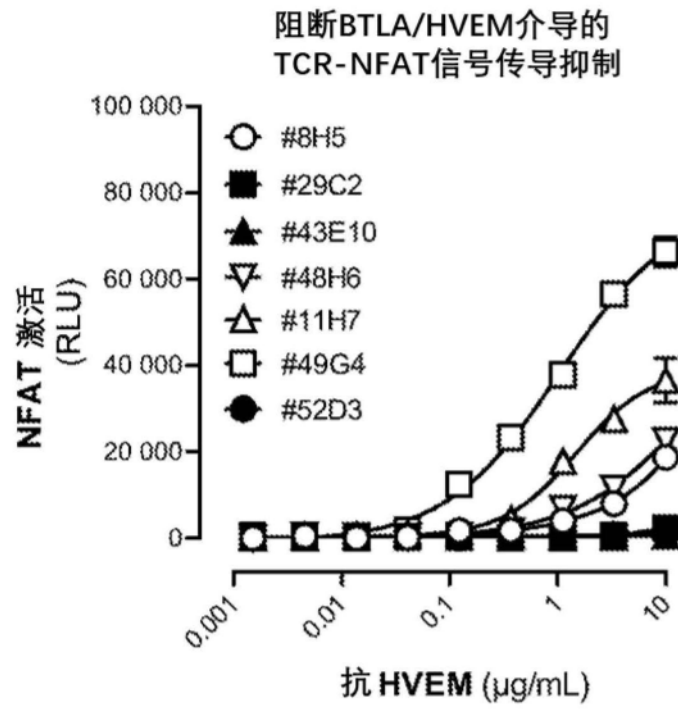


图4B

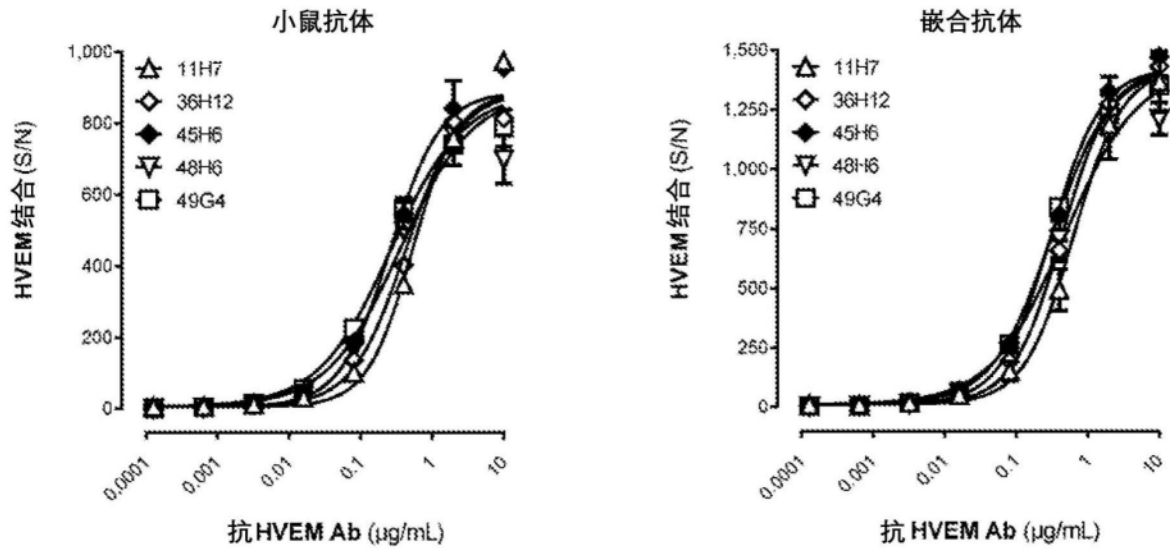
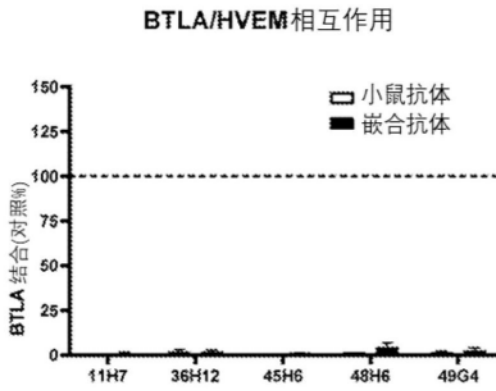
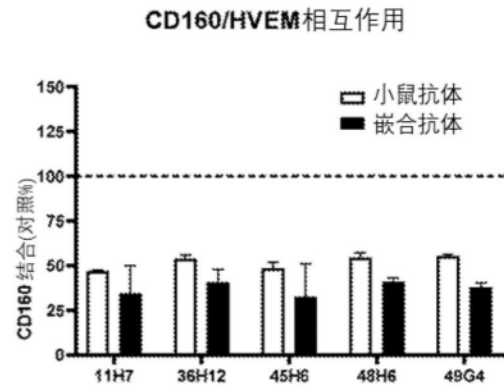


图5

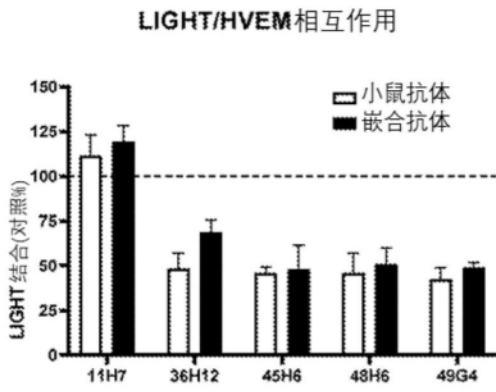
A



B



C



D

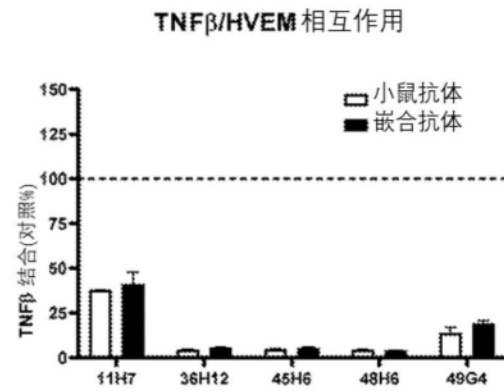
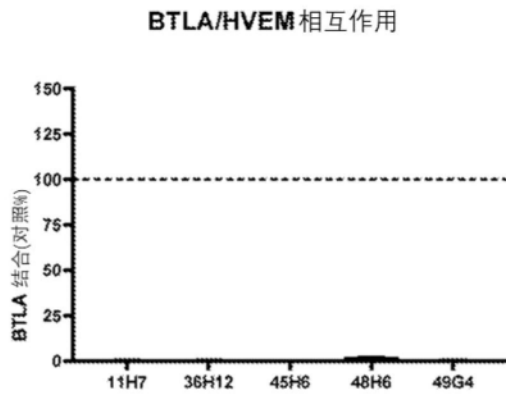
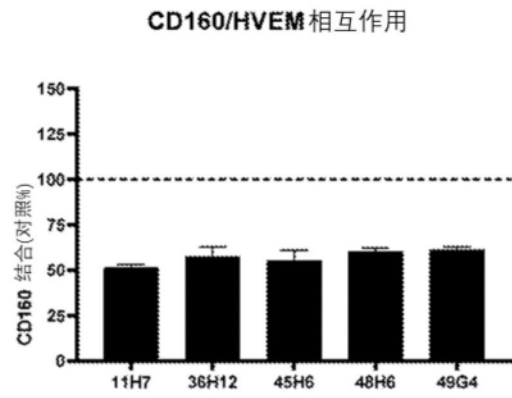


图6

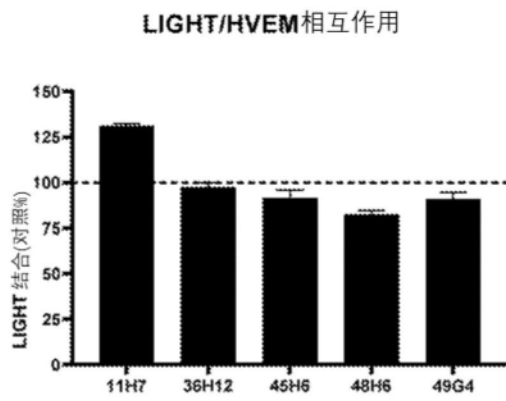
A



B



C



D

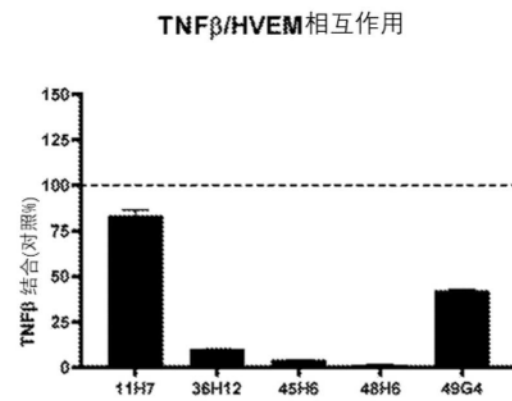


图7

(实验1和2)

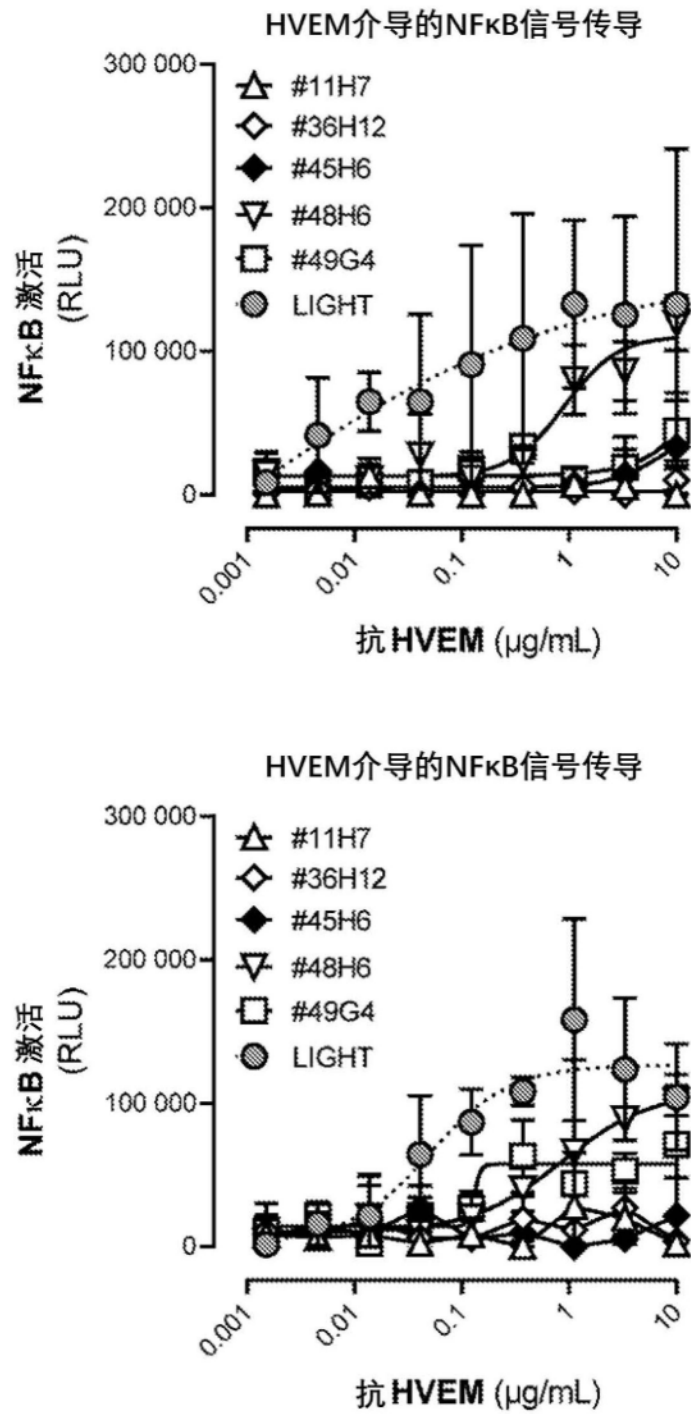


图8A

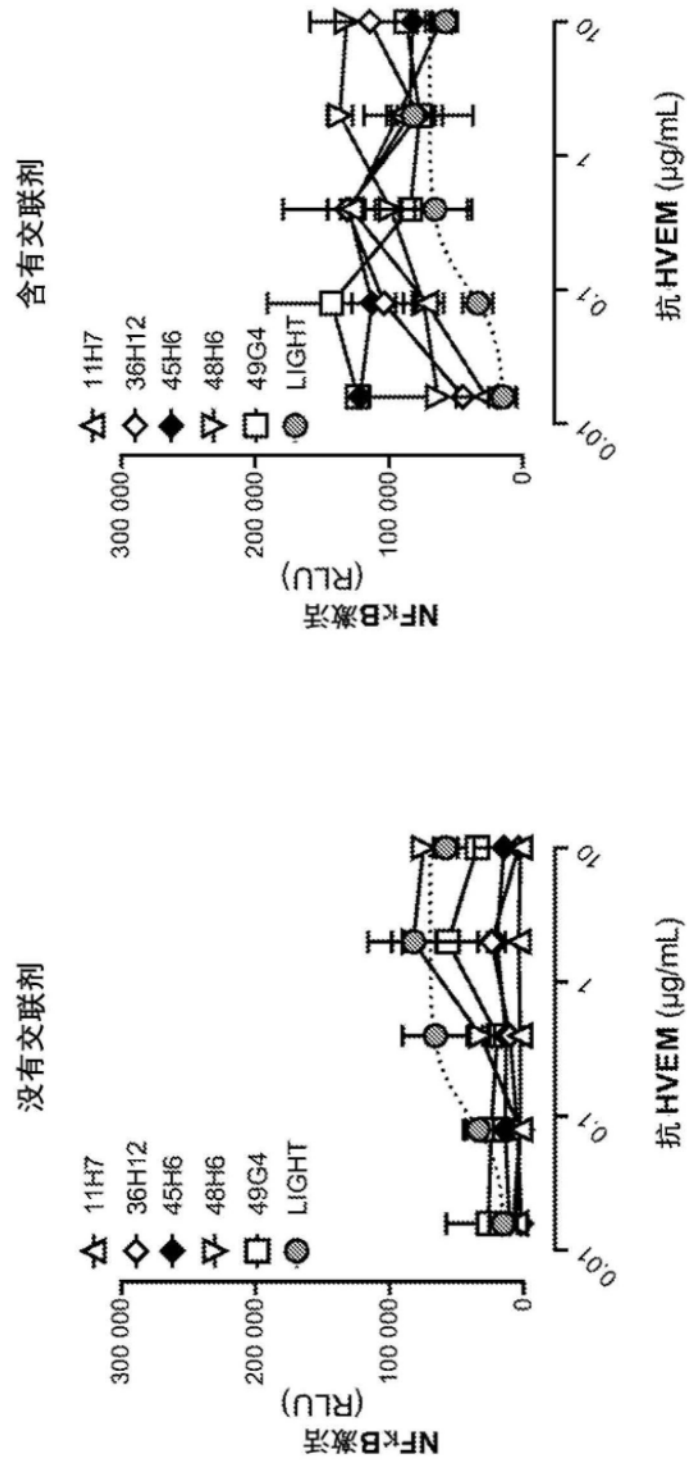


图8B

(实验1)

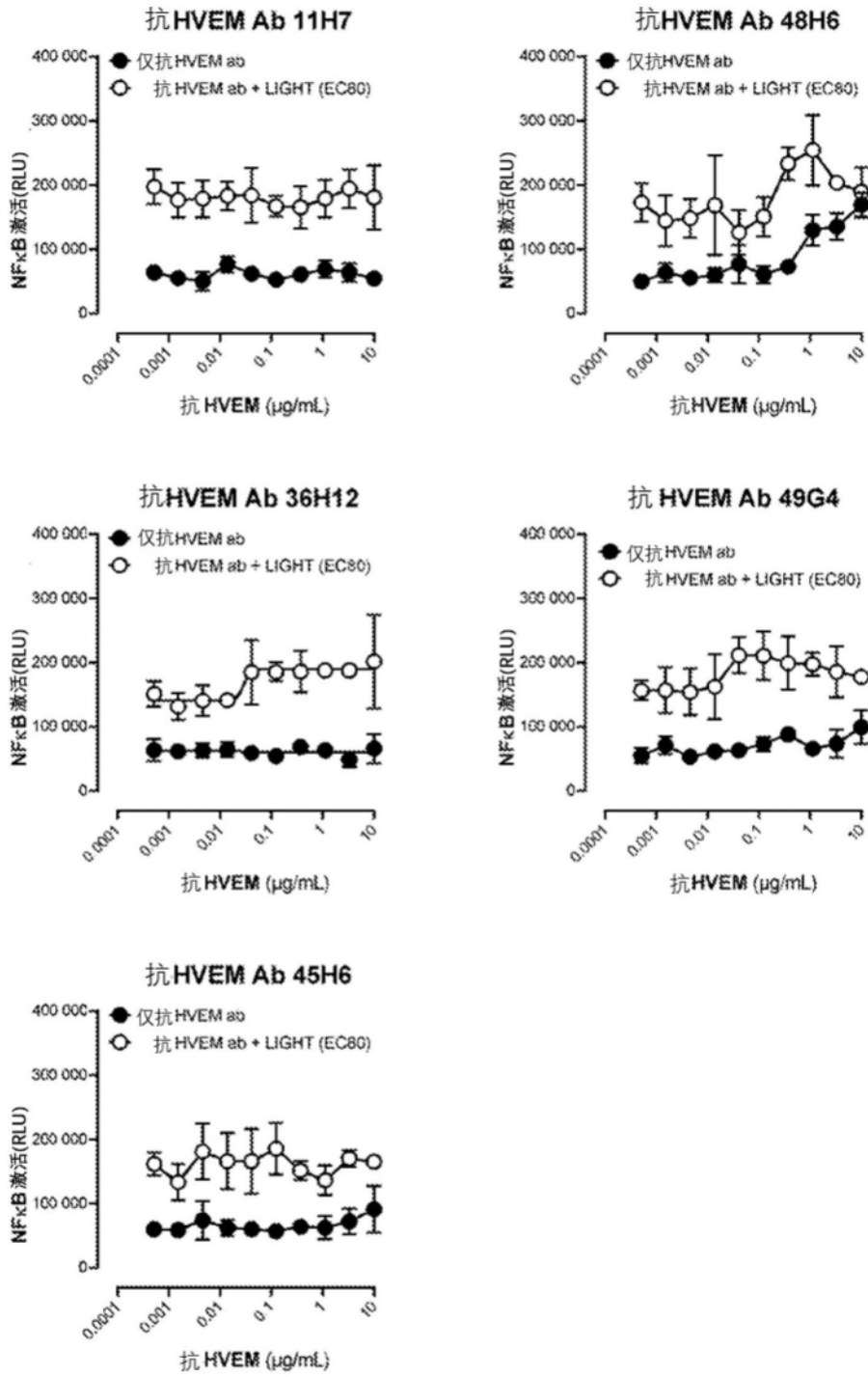


图8C

(实验2)

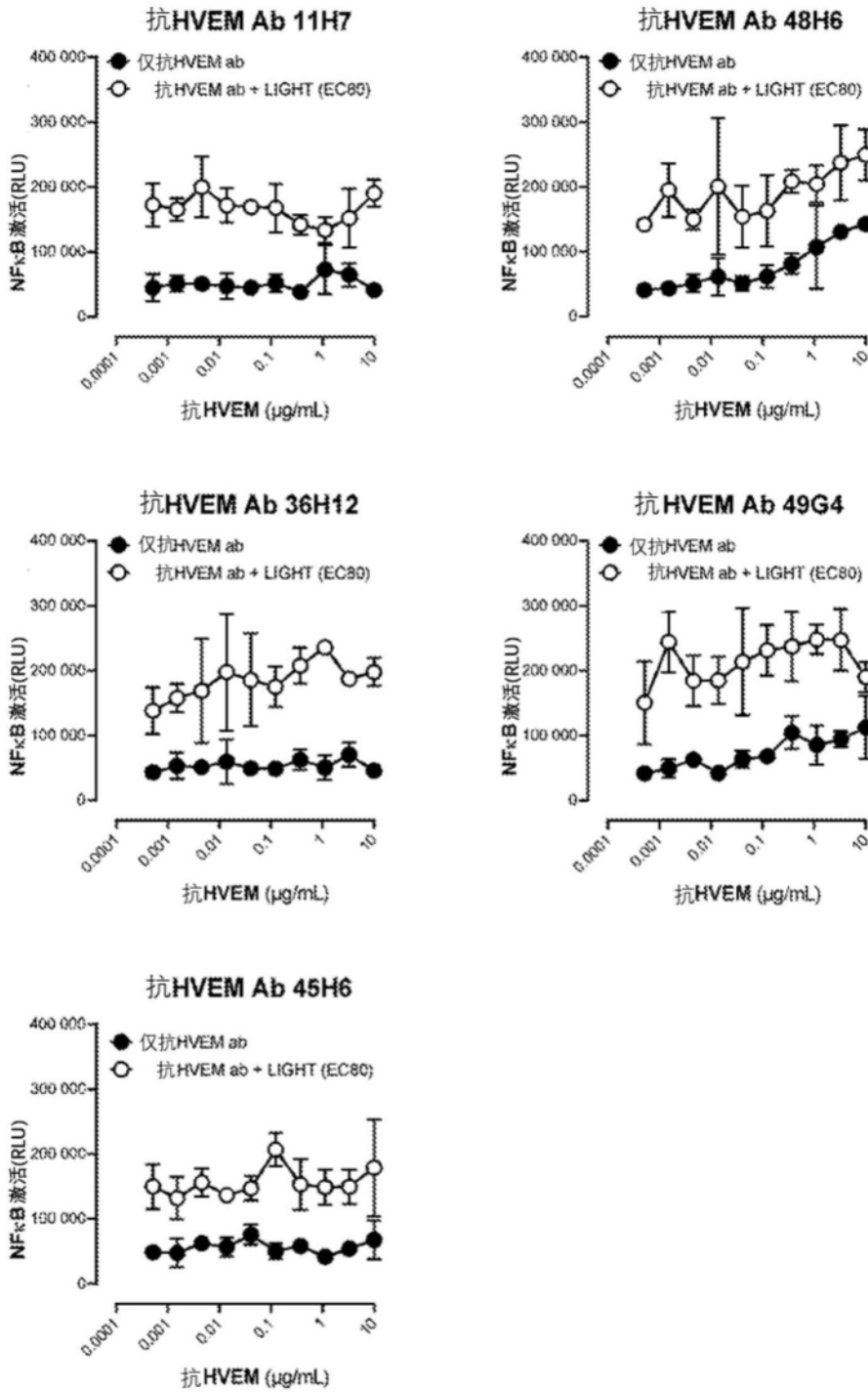
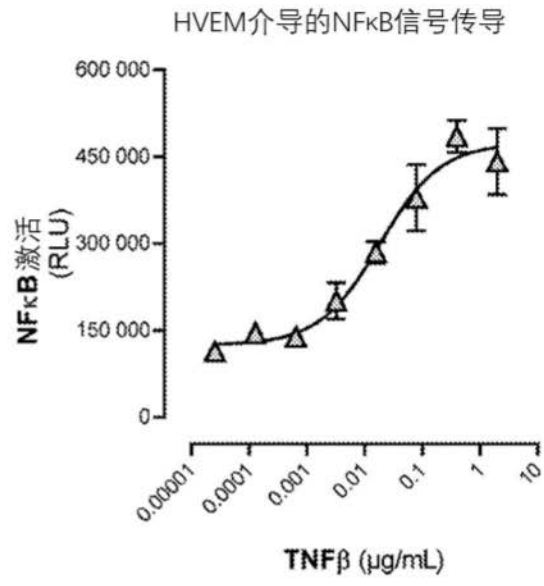


图8C续

A



B

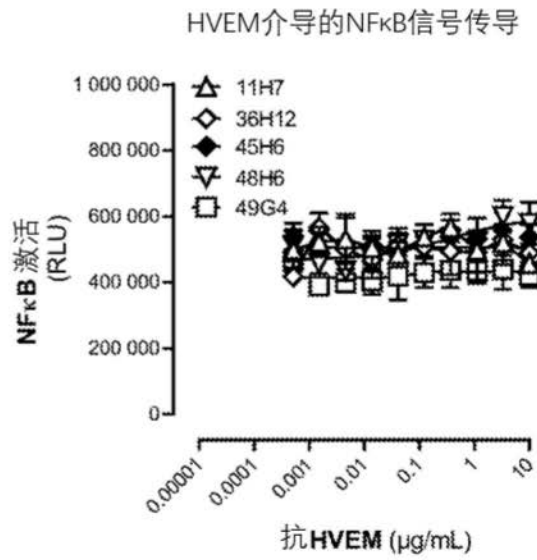
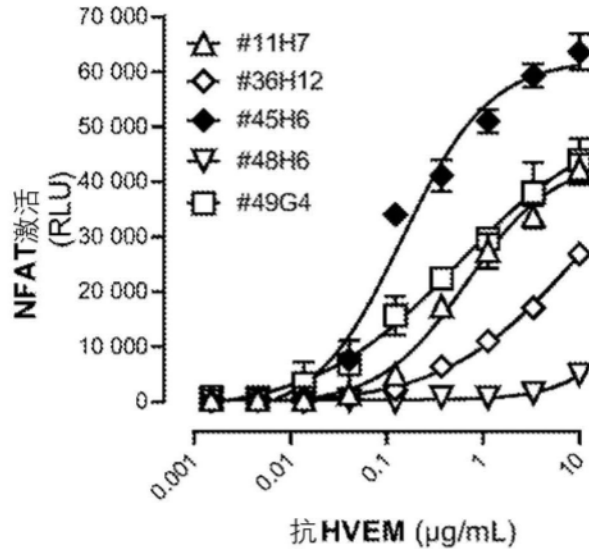


图9

(实验1和2)

阻断BTLA/HVEM介导的  
TCR-NFAT信号传导抑制



阻断BTLA/HVEM介导的  
TCR-NFAT信号传导抑制

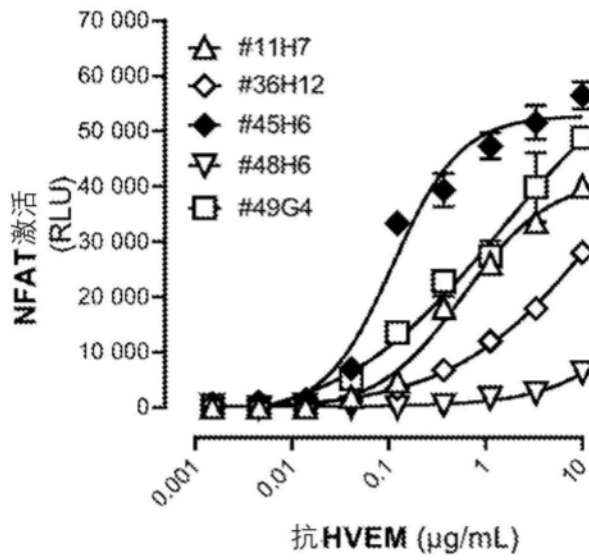


图10

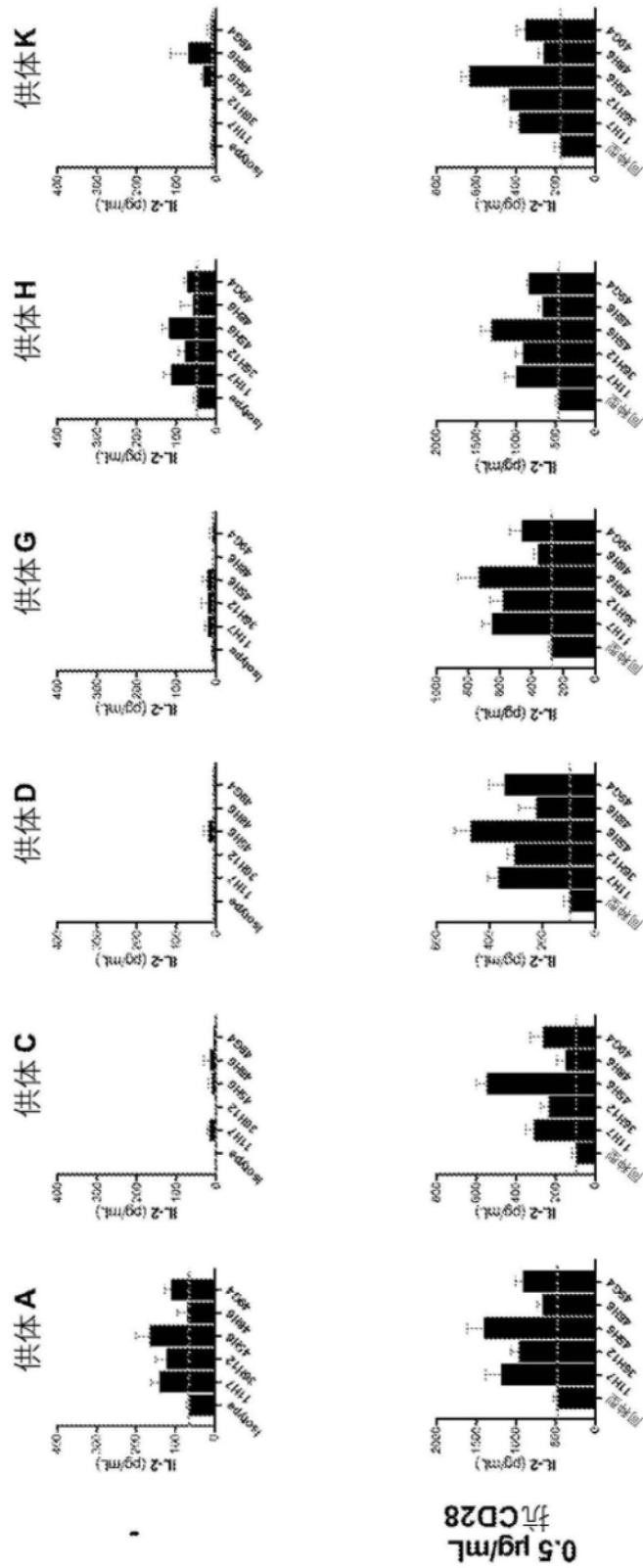


图11A

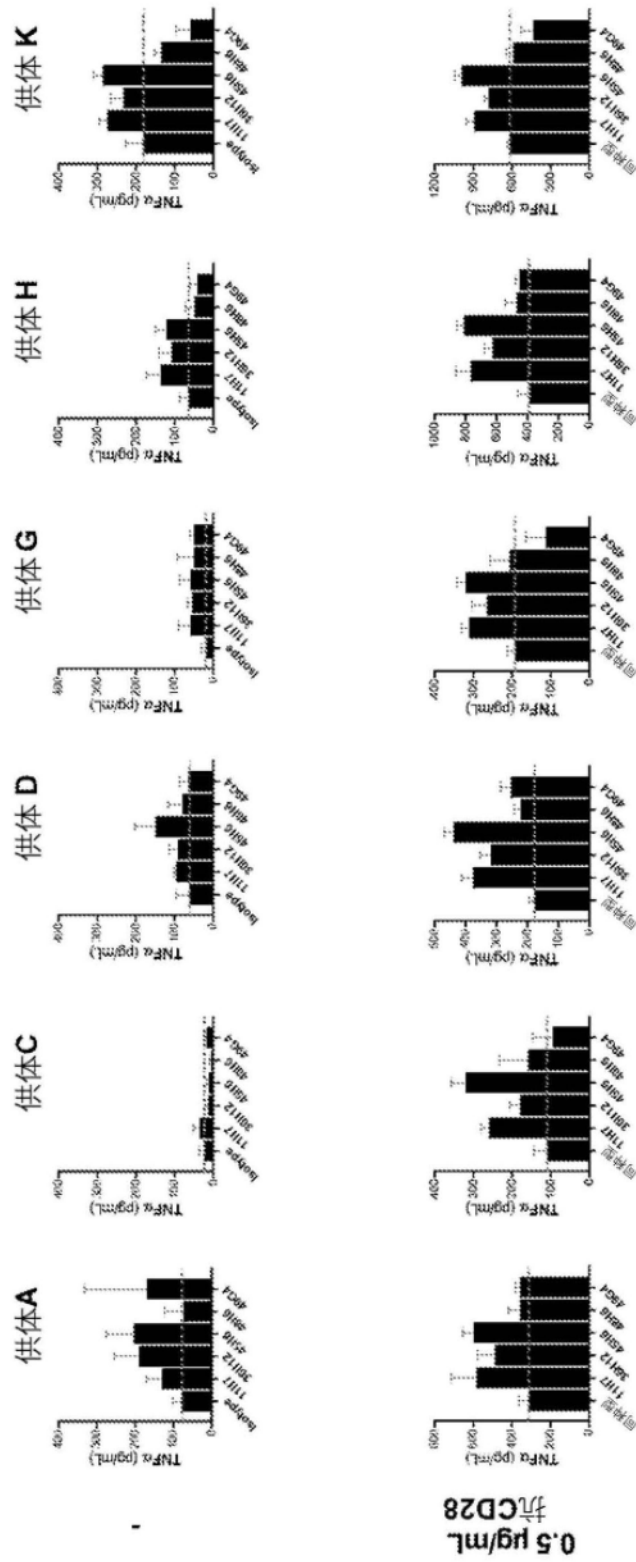


图11B

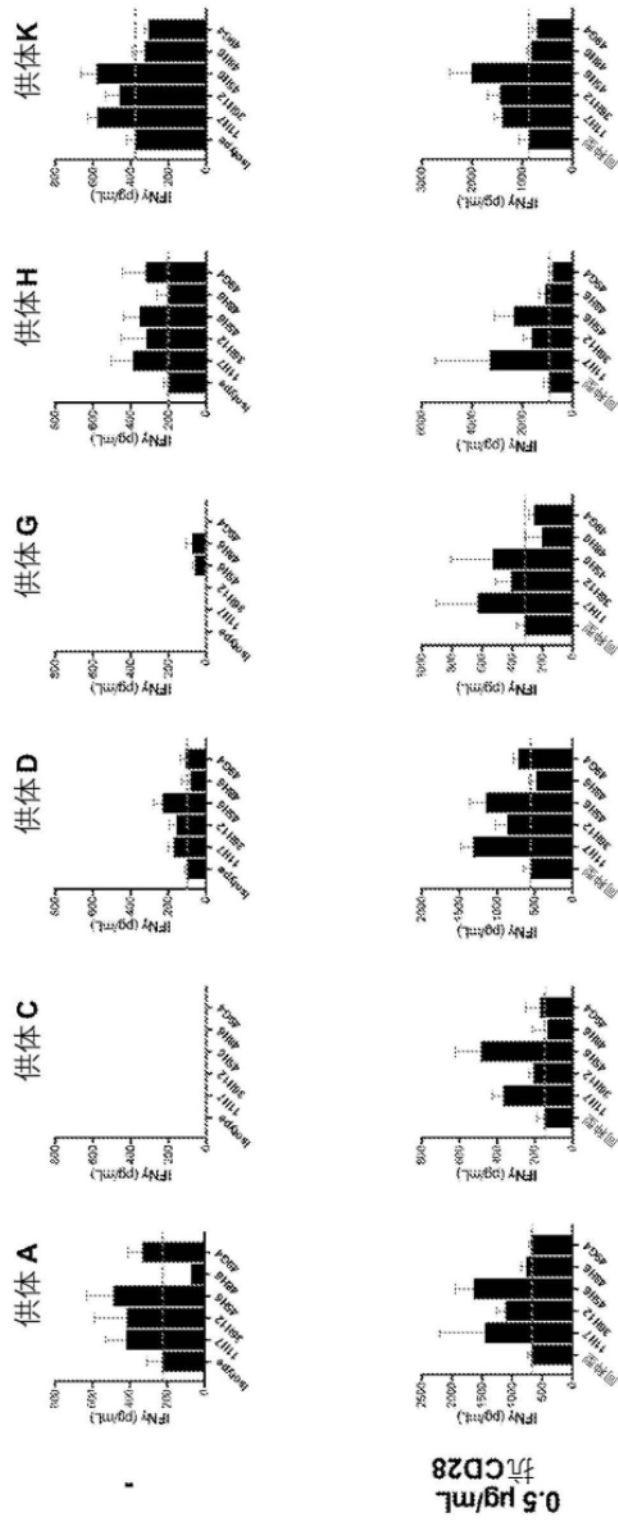


图11C