

抗 BTLA 抗体

技术领域

本发明属于生物技术领域,具体涉及结合 BTLA 的抗体或其抗原结合片段及其用途。更具体而言,本发明涉及识别人 BTLA 并可用于治疗或预防肿瘤、感染性疾病、炎性、自身免疫性疾病等的活性抗体。

背景技术

正性和负性共刺激信号在 B 细胞和 T 细胞活性的调节中起决定性作用,而且已证实介导这些信号的分子是免疫调节剂的有效靶标。除 T 细胞受体(TCR)参与外,幼稚 T 细胞的最佳活化也需要正性共刺激,而负性共刺激则被认为是自身免疫耐受性的获得以及效应 T 细胞功能的终止所需要的。与抗原呈递细胞(APC)表面上的 B7.1 或 B7.2 相互作用时,原型 T 细胞共刺激分子 CD28 响应 TCR 参与而发出促进 T 细胞增殖和分化的信号,但是 CD28 同源物细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)介导 T 细胞增殖和效应子功能的抑制(Chambers 等, Ann.Rev.Immunol., 19: 565-594, 2001; Egen 等, Nature Immunol., 3: 611-618, 2002)。已发现与 B7 家族同源的若干新分子(Abbas 等, Nat.Med., 5: 1345-6, 1999 ; Coyle 等, Nat.Immunol., 2: 203-9, 2001; Carreno 等, Annu. Rev. Immunol., 20: 29-53, 2002; Liang 等, Curr. Opin. Immunol., 14: 384-90, 2002), 并且刚开始阐明它们在 T 细胞活化中的作用。

B 和 T 淋巴细胞弱化子(BTLA)是 CD28 家族的成员,该家族还包括 CD28、ICOS、CTLA-4 和 PD-1。根据加入单抗后对提高 T 细胞增殖的功能作用,发现了该家族最初的成员 CD28 和 ICOS 具有免疫激活作用(Hutloff 等, 1999)。而 BTLA、CTLA-4 和 PD-1 等被描述为负性调节蛋白。若干体内研究证实了 BTLA 在淋巴细胞应答中的抑制作用。由 Murphy 与同事(Washington University St.Louis)制备的 BTLA 缺陷型小鼠在响应 T 依赖性抗原产生的 IgG 方面表现出 3 倍增加。另外,自 BTLA^{-/-}小鼠分离的 T 细胞和 B 细胞对分别使用 CD3-和抗 IgM 进行抗原-受体刺激显示较大的增殖应答(Watanabe, 2003)。在过量表达研究中,发现 BTLA 与 B 细胞受体复合物以及与 T 细胞受体缔合。与该研究结果一致,在 BTLA 缺陷型淋巴细胞中,使用 ConA(T 细胞)或 LPS(B 细胞)进行抗原-受体非依赖性刺激不受影响,而且使用抗 BTLA 抗体也不能被调节。已经表明 BTLA 敲除小鼠随时间推移发生自发性自身免疫病,且寿命缩短(Oya, 2008)。BTLA 敲除小鼠

显示在自身免疫性脑脊髓炎(EAE)和变应性气道炎症模型中疾病严重程度加剧,这两种模型均有赖于T细胞活性(Watanabe, 2005; Deppong, 2006)。

已经表明疱疹病毒进入介体(HVEM)是BTLA的配体(Scully等, 2005)。HVEM是I型跨膜糖蛋白,属于TNF受体超家族的成员,带有4个胞外半胱氨酸富含区域(CDRs),包含6个假性重复的半胱氨酸。BTLA及HVEM主要通过细胞表面的动态表达来调节T细胞和APC的功能。BTLA与配体结合不仅抑制T细胞增殖,下调T细胞活化标志CD25,还可以抑制IFN- γ , IL-2, IL-4, 和IL-10等的产生,但不能诱导细胞凋亡。HVEM与BTLA结合导致T细胞活化和增殖的下调(Sedy, 2005)。这些研究结果表明,BTLA的表达或BTLA-HVEM结合情况与T细胞的活化与增值密切相关。

抗体可用作治疗药物。某些抗体在体内用作治疗药物时可引起不需要的抗体免疫原性。因为大多数单克隆抗体来源于啮齿动物,所以在人中重复使用导致产生针对治疗性抗体(例如,人抗小鼠抗体或HAMA)的免疫应答。这类免疫应答至少导致丧失治疗功效,而最高则导致潜在致死过敏反应。降低啮齿动物抗体的免疫原性的一种方法包括嵌合抗体的产生,其中将小鼠可变区(Fv)与人恒定区融合(Liu等(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 3439-43)。然而,用人可变区和小鼠恒定区的杂合体注射的小鼠发生针对人可变区的强抗体应答,这就表明这种嵌合抗体中的完整啮齿动物Fv区的保留仍可在患者中引起有害的免疫原性。

另外,将啮齿动物可变结构域的互补决定区(CDR)环移植到人构架上(即人源化)已被用于进一步将啮齿动物序列减至最低。Jones等(1986)Nature 321: 522; Verhoeyen等(1988)Science 239: 1534。然而,CDR环交换仍不能均匀产生具有与起始抗体相同的结合性质的抗体。在人源化抗体中,常常还需要构架残基(FR)(参与CDR环支持的残基)改变以保持抗原结合亲和力。Kabat等(1991)J.Immunol.147: 1709。虽然已经报道了许多人源化抗体构建体中CDR移植和构架残基保持的使用,但是难以预测特定序列是否可产生具有所需结合性质以及间或具有生物学性质的抗体。参见例如Queen等,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 10029; Gorman等,(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88: 4181; 及Hodgson,(1991)Biotechnology (NY), 9: 421-5。此外,大部分现有研究对动物轻链和重链可变序列使用不同人序列,致使这种研究的预测性成问题。已在使用已知抗体的序列,或者更通常使用具有已知X射线晶体结构的抗体例如抗体NEW和KOL的序列。参见例如Jones等,同上; Verhoeyen等,同上; 以及Gorman等,同上。已经报道了少数人源化构建体的确切序列信息。

存在对用于治疗人病症(例如炎症病症、自身免疫病症和增殖性病症)的抗BTLA抗体、特别是抗BTLA单克隆抗体的需要。这种抗体可优选在人受试者中具有低免疫原性,允

许重复给予而无不良免疫应答。

发明内容

本发明涉及在一种或多种抗人 BTLA 抗体或其抗原结合片段，以及所述抗体或其抗原结合片段在治疗疾病中的用途。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA (B⁺和 T 淋巴细胞弱化子) 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段，其包括一种或多种选自以下的性质：

- A) 阻断 BTLA 与 HVEM (疱疹病毒进入介体) 结合；
- B) 与食蟹猴 BTLA 交叉反应；
- C) 与人 BTLA 结合的 $K_D \leq 0.28 \text{ nM}$ ；或
- D) 不介导 ADCC 效应。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其包含至少一个选自 SEQ ID NO: 7、8、9、10、11、12、16、17、18、22、23、24、31、32 和 33 的轻链 CDR 结构域和至少一个选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、13、14、15、19、20、21、25、26、27、28、29 和 30 的重链 CDR 结构域。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链 CDR 的 CDR1, CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如以下 A-E 组中的任一组所示：

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
B	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
C	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
D	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
E	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33

和/或其重链 CDR 的 CDR1, CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如以下 F-K 组中的任一组所示：

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
F	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
H	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
I	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
G	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
K	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片

段，其重链 CDR 的 CDR1，CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列和轻链 CDR 的 CDR1，CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列如以下 I-IX 组中的任一组所示：

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
I	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
II	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
III	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
IV	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
V	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
VI	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30
VII	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
VIII	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
IX	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区和重链可变区，其中，轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 36、37、39、41、44、46、47 或 48 所示的氨基酸序列，重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 34、35、38、40、42、43 或 45 所示的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示；其重链可变区的氨基酸序列如

SEQ ID NO: 38 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段，其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示；其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段是 IgG 类型，更优选为 IgG4 亚型。

在一个或多个实施方式中，本发明涉及与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段是单链 Fv 抗体；在某些实施方式中，抗体或其抗原结合片段是 Fab 抗体；在某些实施方式中，抗体或其抗原结合片段是 Fab' 抗体；在某些实施方式中，抗体或其抗原结合片段是 (Fab')₂ 抗体。

在另外的实施方式中，本发明涉及包含本文所述的任意抗体或其抗原结合片段的 VL 结构域或 VH 结构域的分离多肽。

在另外的实施方式中，本发明涉及编码本文所述任意抗体或抗原结合片段的 VL 结构域和 VH 结构域的分离核酸。

在另外的实施方式中，本发明涉及包含本文所述的一种或多种抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或稀释剂的组合物。

在另外的实施方式中，本发明涉及利用本文所述的一种或多种抗体或其抗原结合片段

通过消除、抑制或降低 BTLA 活性来预防或治疗疾病的方法，其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明所公开的抗体或其抗原结合片段，核酸，表达载体，宿主细胞，免疫缀合物或药物组合物。优选地，所述疾病或病症的预防或治疗受益于 BTLA 活性的消除、抑制或降低；优选地，所述疾病或病灶选自癌症、感染性疾病或炎性疾病。

在另外的实施方式中，本发明还涉及所述抗体或抗原结合片段、核酸、表达载体、宿主细胞、免疫缀合物或药物组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途，所述的疾病或病症优选为 BTLA 介导的疾病，可选自癌症、感染性疾病或炎性疾病。

附图说明

- 图 1：人 BTLA 胞外区蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。
- 图 2：流式细胞仪检测 BTLA 与 HVEM 的结合能力。
- 图 3：嵌合抗体与人 BTLA 结合的 ELISA 实验。
- 图 4：嵌合抗体阻断 BTLA-HVEM 结合的能力。
- 图 5：嵌合抗体对 T 细胞活性的影响实验。
- 图 6：人源化抗体与 BTLA 特异性结合实验。
- 图 7：人源化抗体与 293F 细胞上 hBTLA 的结合实验。
- 图 8：人源化抗体阻断 BTLA 与细胞表面的 HVEM 结合的实验。
- 图 9：人源化抗体促进 T 细胞的激活实验。
- 图 10：人源化抗体 17 与不同种属 BTLA 结合的对比实验。
- 图 11：hu18 对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响。
- 图 12：受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠体重的影响。

具体实施方式

哺乳动物免疫系统已发展控制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的潜在有害活性的若干途径。它们包括各种细胞因子-受体途径以及涉及受体(像 CD28、CTLA-4、PD-1 和 BTLA)的共刺激途径。尽管 CD28-B7 相互作用是正性共刺激途径的例子(即 CD28 触发提高对抗原特异性触发物的 T 细胞应答)，但其它 3 种受体表现为抑制性共刺激途径。CTLA-4、PD-1 和 BTLA 显示重叠但独特的表达概况，并限制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞以及其它免疫细胞的活性(参见 Deppong 等，J Immunol 2006；Tao 等，J Immunol 2005)。虽然 CTLA-4 与 CD28 竞争结合 B7.1 和 B7.2(CD80 和 CD86)并为淋巴结和脾中的幼稚 T 细胞活化设定原始阈值，但是 PD-1 和 BTLA 各有自己独特的配体(分别为 PD-L1/L2 和 HVEM)，并且似乎控制外周 T 细胞稳态和再活化(参见 Krieg 等，Nat Immunol 2007)。

BTLA 下调 B 细胞和 T 细胞活化。如其名称所表示的一样, B 和 T 淋巴细胞弱化子(BTLA)在静息和活化的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞两者上表达。BTLA 是 I 型跨膜糖蛋白, 具有含有若干抑制酪氨酸基序的胞质尾(Watanabe, 2003)。BTLA 具有 CD28/CTLA-4 家族成员的某种结构相似性, 但其具有独特的性质。BTLA 与多种免疫性疾病、炎症疾病和增殖性疾病相关。因此, 开发能够阻断人 BTLA-HVEM 结合的单抗药物是疾病治疗的持续需要。

定义

为了可以更容易的理解本发明, 某些科技术语具体定义如下。除非本文其他部分另有明确定义, 否则所用的所有其他科技术语都具有本发明所述领域普通技术人员通常理解的含义。

本文中, 用于细胞或受体的“活化”、“刺激”和“处理”可具有相同含义, 例如细胞或受体用配体活化、刺激或处理, 除非上下文另外或明确规定。“配体”包括天然和合成配体, 例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和来源于抗体的结合化合物。

“配体”还包括小分子, 例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。“活化”可指通过内部机制以及外部或环境因素调节的细胞活化。“应答/反应”, 例如细胞、组织、器官或生物体的应答, 包括生化或生理行为(例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移、基因表达速率或分化状态)的改变, 其中改变与活化、刺激或处理有关, 或者与例如遗传编程等内部机制有关。

分子的“活性”可描述或指该分子与配体或受体的结合; 催化活性; 刺激基因表达或细胞信号转导、分化或成熟的能力; 抗原活性; 调节其它分子的活性等。分子的“活性”还可指在调节或保持细胞-细胞间相互作用(例如粘附)中的活性, 或在保持细胞结构(例如细胞膜或细胞骨架)中的活性。“活性”也可指比活, 例如[催化活性]/[mg 蛋白质]或[免疫活性]/[mg 蛋白质]、生物区室中的浓度等。“活性”可指先天免疫系统或适应性免疫系统的组分的调节。“增殖活性”包括促进、对以下方面是必需的或与以下方面明确有关的活性: 例如正常的细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管生成。

应用于动物、人、实验对象、细胞、组织、器官或生物流体的“给予”和“治疗”是指使外源药物、治疗药、诊断药或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体接触。“给予”和“治疗”可指例如治疗、药代动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的治疗包括使试剂与细胞接触以及使试剂与流体(其中该流体与细胞接触)接触。“给予”和“治疗”还意指体外和离体治疗, 例如细胞用试剂、诊断、结合化合物或用另一种细胞的体外和离体治疗。“治疗”也包括将治疗药物例如含有本发明的任何抗体或其抗原结合片

段的组合物，经内部或外部给予有需要的患者。通常，以有效减轻受治疗的患者或群体的一种或多种疾病症状的量给予本文所述的抗体或其抗原结合片段或相应的药物组合物，而不论是通过诱导这些症状的消退还是抑制这些症状的进展达到任何临床可测量的程度。有效减轻任何特定疾病症状的治疗药物的量(亦称为“治疗有效量”)可随例如患者的疾病状态、年龄和体重及药物在患者中引起所需反应的能力等因素而变化。可通过医师或其他专业保健提供者常用于评价疾病症状的严重程度或进展状态的任何临床测量来评价该症状是否减轻。

术语“受试者”或“患者”包括任何生物体，优选动物，更优选哺乳动物(例如大鼠、小鼠、狗、猫、兔)，最优选人。

本文中，“给予”或“治疗”可通过侵入性途径例如通过注射给予本文所述的任一抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段或其相应的药物组合物而得以实现。通过非侵入性途径(例如口服；例如以丸剂、胶囊剂或片剂口服)给药也落入本发明的范围内。在本发明的一个实施方式中，经静脉内、皮下、肌内、动脉内、关节内(例如在关节炎关节中)、通过吸入、气雾剂递送或肿瘤内给予抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。

可用本领域已知的医疗装置给予本文所述的任一抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段或其相应的组合物。例如，可用皮下注射针经注射给予本发明的药物组合物；或可用静脉注射针经注射给与本发明的药物组合物。

在某些实施方式中，可单独或组合使用本文所述的任一抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段或其相应的药物组合物，以治疗或预防需要这种治疗或预防的受试者的任何疾病或病况。

本文中，术语“B 和 T 淋巴细胞弱化子”和“BTLA”基因/蛋白质可互换使用，其包括变体、同种型、同源物、直向同源物(ortholog)和种内同源物(paralog)。例如，在某些实施方式中，人 BTLA 特异性抗体可与来自非人物种的 BTLA 交叉反应。在其它实施方式中，人 BTLA 特异性抗体可以是人 BTLA 完全特异性的，并且不具有物种交叉反应性或其它类型的交叉反应性。除非另有说明，否则术语“人 BTLA”或“hBTLA”是指人 BTLA 序列。除非另有说明，否则人 BTLA 序列包括所有人同种型和 BTLA 变体，例如 Genbank 登记号为 AAP44003 的人 BTLA 的完整氨基酸序列。还存在至少两种人 BTLA 转录物变体，转录物变体 1 编码蛋白长度为 289 个氨基酸(GenBank 登记号 NP_861445)，并且与登记号 AAP44003 的 BTLA 序列有近 98% 同一性；转录物变体 2 编码蛋白长度为 241 个氨基酸的蛋白质(GenBank 登记号 NP_001078826)。

BTLA 是一种免疫应答负性调节因子，其 C 端抑制基序具有参与抑制 IL-2 产生和 T 细胞扩增(Watanabe 等, Nat.Immunol., 4, 670-679, 2003 ; Chemnitz 等, J.Immunol.,

176, 6603-6614, 2006)。另外, 人 BTLA 可为与本发明所述抗体特异性结合的 BTLA 的胞外结构域中的表位。

具体的 BTLA 序列其胞外核苷酸序列一般可与 SEQ ID NO: 49 的人 BTLA 的胞外区或其它同种型的核苷酸序列有至少 90% 同一性, 并且当与其它物种(例如鼠)的 BTLA 氨基酸序列相比时, 含有鉴定为人的氨基酸序列的氨基酸残基。在某些情况下, 人 BTLA 胞外区可与 SEQ ID NO: 49 的人 BTLA 胞外区或其它同种型或变体有至少 95% 或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 同一性。

术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用, 该作用导致从人体选择性损害、破坏或清除侵入病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞或者在自体免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织。

本文所用术语“抗体”是指具有所需生物活性的任何形式的抗体。因此, 其以最广义使用, 具体包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源化抗体、完全人抗体、嵌合抗体和骆驼源化(camelized)单结构域抗体。本文所用术语“抗 BTLA 抗体”或抗体的“抗原结合片段”是指与 BTLA 结合并阻断 BTLA 与 HVEM 结合的抗体, 包括抗体的片段或衍生物, 通常包括抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR)的至少一个片段, 其保持抗体的至少一些结合特异性。抗体结合片段的实例包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子, 例如 sc-Fv; 由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当 BTLA 结合活性在摩尔浓度基础上表示时, 结合片段或衍生物通常保持其 BTLA 结合活性的至少 10%。优选结合片段或衍生物保持抗体的 BTLA 结合亲和力的至少 20%、50%、70%、80%、90%、95% 或 100% 或更高。还预期抗 BTLA 抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

“分离抗体”是指抗体或其抗原结合片段的纯化状态, 且在这种情况下意指该分子基本不含其它生物分子, 例如核酸、蛋白质、脂质、糖或其它物质例如细胞碎片和生长培养基。术语“分离(的)”并非意指完全不存在这类物质或不存在水、缓冲液或盐, 除非它们以明显干扰本文所述抗体或其抗原结合片段的实验或治疗应用的量存在。

本文所使用的术语“功能性片段”或“抗原结合片段”尤其是指抗体片段如 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或者双抗体、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半衰期的任何片段, 所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化, PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇), 所述片段具有 EGFR 结合活性。优选地,

所述功能片段由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们,所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力,对于 BTLA,优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100,在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸,优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

“Fab 片段”由一条轻链及 CH1 和一条重链的可变区组成。Fab 分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。

“Fc”区含有包含抗体的 CH1 和 CH2 结构域的 2 个重链片段。该 2 个重链片段通过两个或更多个二硫键以及通过 CH3 结构域的疏水相互作用保持在一起。

“Fab'片段”含有一条轻链和一条重链的部分或片段,该重链的部分或片段含有 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的区域,使得 2 个 Fab'片段的 2 条重链之间可形成链间二硫键以形成 F(ab')₂ 分子。

“F(ab')₂ 片段”含有 2 条轻链和 2 条含有介于 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区的一部分的重链,使得在 2 条重链之间形成链间二硫键。因此, F(ab')₂ 片段由通过 2 条重链间的二硫键保持在一起的 2 个 Fab'片段组成。

“Fv 区”包含来源于重链和轻链两者的可变区,但缺乏恒定区。

术语“单链 Fv”或“scFv”抗体是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单条多肽链中。scFv 多肽一般还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头,其使 scFv 能够形成用于抗原结合的所需结构。

“结构域抗体”是只含有重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在某些情况下,两个或更多个 VH 区与肽接头共价连接形成二价结构域抗体。二价结构域抗体的 2 个 VH 区可靶向相同或不同的抗原。

“二价抗体”包含 2 个抗原结合部位。在某些情况下,2 个结合部位具有相同的抗原特异性。然而,二价抗体可以是双特异性的。

除非另有规定,否则本文所用“抗 BTLA 抗体”是指针对人 BTLA 或其变体或其任何抗原片段产生的抗体。

本文所用术语“单克隆抗体”是指获自基本均质抗体群的抗体,即组成该群的各个抗体除可少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原表位。相比之下,常规(多克隆)抗体制备物通常包括大量针对不同表位(或对不同表位有特异性)的抗体。修饰语“单克隆”表明获自基本均质抗体群的抗体的特征,且不得解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,本发明使用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法制备,或可通过重组 DNA 方法制备。还可采用噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

在某些实施方式中,单克隆抗体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链

的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体的相应序列相同或同源，而该链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段的相应序列相同或同源，只要它们具有所需生物活性即可。

本文所用“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体，其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常可变结构域获自啮齿动物等实验动物的抗体(“亲代抗体”)，而恒定结构域序列获自人抗体，使得与亲代啮齿动物抗体相比，所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

在某些实施方式中，本文的单克隆抗体还包括骆驼源化单结构域抗体。参见例如 Muyltermans 等(2001)*Trends Biochem.Sci.*26: 230; Reichmann 等(1999)*J.Immunol.Methods* 231: 25。

本文所用术语“双抗体”是指具有两个抗原结合部位的小抗体片段，所述片段包含在同一多肽链(VH-VL 或 VL-VH)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用短得不允许在同一链的两个结构域之间配对的接头，迫使该结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合部位。

本文所用术语“人源化抗体”是指含有来自人和非人(例如鼠、大鼠)抗体的序列的抗体形式。一般而言，人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本所有的高变区相当于非人免疫球蛋白的高变区，而所有或基本所有的构架(FR)区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区(Fc)。

总的来说，已知基本的抗体结构单位包含四聚体。每个四聚体包括两个相同的多肽链对，每对具有一条“轻”链(约 25kDa)和一条“重”链(约 50-70kDa)。每条链的氨基端部分或片段可包括主要负责抗原识别的约 100-110 个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分或片段可限定主要负责效应子功能的恒定区。通常将人轻链归类为 κ 和 λ 轻链。此外，通常将人重链归类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并将抗体的同种型分别定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接，其中重链还包括约 10 多个氨基酸的“D”区。一般参见 *Fundamental Immunology* 第 7 章(Paul, W. 主编，第 2 版。Raven Press, N.Y.(1989))。

每个轻链/重链对的可变区配对形成抗体结合部位。因此，完整 IgG 抗体一般具有 2 个结合部位。除双功能或双特异性抗体以外，2 个结合部位通常相同。

通常，各链均具有相同的通过 3 个高变区(亦称为互补决定区或 CDR)连接的相对保守构架区(FR)的通用结构。每对的 2 条链的 CDR 通常通过构架区对准，使之能与特定表位结合。总的来说，轻链和重链两者从 N 端到 C 端包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、

FR3、CDR3 和 FR4。一般按照以下文献中的定义指定每个结构域的氨基酸：Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat 等; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 第 5 版; NIH 公告号 91-3242(1991); Kabat(1978)Adv.Prot.Chem.32: 1-75; Kabat 等(1977) J.Biol.Chem.252: 6609-6616; Chothia 等(1987) J Mol.Biol.196: 901-917 或 Chothia 等(1989) Nature 342 : 878-883。

本文所用术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。高变区包含“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。本文所用术语“构架”或“FR”残基是指本文定义为 CDR 残基的超变区残基以外的可变结构域残基。

“有效量”包括足以改善或预防医学病症的症状或体征的量。有效量还意指足以允许或便于诊断的量。特定患者或兽医对象的有效量可根据例如待治疗的病况、患者的总体健康状况、给药的方法途径和剂量及副作用的严重程度等因素而变化。有效量可以是避免明显副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。结果可导致诊断测量或参数改进至少 5%、通常为至少 10%、更常为至少 20%、最常为至少 30%、优选至少 40%、更优选至少 50%、最优选至少 60%、理想为至少 70%、更理想为至少 80%、最理想为至少 90%，其中 100%定义为正常受试者显示的诊断参数(参见例如 Maynard 等(1996)A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL ; Dent(2001)Good Laboratory and Good ClinicalPractice, Urch Publ., London, UK)。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽序列之间的序列相似性。当所比较的两个序列中某一位置被相同碱基或氨基酸单体单元占据时，例如如果两个 DNA 分子每个中某一位置均被腺嘌呤占据，则分子在该位置上是同源的。两个序列间的同源性百分比是两个序列共有的匹配位置或同源位置数除以所比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，如果在对序列进行最佳比对时两个序列 10 个位置中有 6 个匹配或同源，则两个序列是 60%同源的。一般在比对两个序列时进行比较以得到最大百分比同源性。

本文中，“免疫病症”包括例如病理性炎症、炎性病症和自身免疫病症或疾病。“免疫病症”还指感染、持续感染和增殖性病况，例如癌症、肿瘤和血管生成，包括抵抗免疫系统根除的感染、肿瘤和癌症。“癌性病况”包括例如癌症、癌细胞、肿瘤、血管生成和癌前病况，例如发育异常。本文所述的“免疫病灶”和“癌性病况”优选均为 BTLA 所介导。

“炎性病症”意指其中病理全部或部分由例如免疫系统细胞的数目改变、迁移速率改变或活化改变引起的病症或病理状况。免疫系统细胞包括例如 T 细胞、B 细胞、单核细胞或巨噬细胞、抗原呈递细胞(APC)、树突细胞、小胶质细胞、NK 细胞、NKT 细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞或与免疫学特别有关的任何其它细胞，例如产细

胞因子的内皮或上皮细胞。本文所述的“炎症病症”优选为 BTLA 所介导。

“分离核酸分子”意指基因组、mRNA、cDNA 或合成来源或其某些组合的 DNA 或 RNA，其不与多核苷酸的全部或部分缔合(其中分离多核苷酸天然存在)，或者与其天然不连接的多核苷酸连接。对于本公开内容的目的，应当理解的是，“包含”特定核苷酸序列的“核酸分子”不包括完整的染色体。除规定序列外，“包含”规定核酸序列的分离核酸分子还可包括多达 10 个或甚至多达 20 个或更多个其它蛋白质或其部分或片段的编码序列，或者可包括有效连接的控制所列举的核酸序列编码区表达的调节序列，和/或可包括载体序列。

本文所用表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，所有这类名称包括子代。因此，术语“转化体”和“转化细胞”包括原代主题细胞和由其得到的培养物而不论传递次数。还要理解的是，由于有意的或不经意的突变所致，所有子代的 DNA 内容物可能并不完全相同。包括了在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物活性的突变型子代。虽然指定不同名称，但从上下文看将是清楚的。

本发明所述的宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。真核宿主细胞，可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，如草地粘虫等昆虫细胞，如烟草等植物细胞，如 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中，本发明所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

本文所用“聚合酶链式反应”或“PCR”一般目标区末端或以外的序列信息必须是可得的，使得可设计寡核苷酸引物；这些引物可与待扩增模板的相反链的序列相同或相似。2 个引物的 5'端核苷酸可与扩增材料的末端一致。可采用 PCR 扩增特定的 RNA 序列、来自全基因组 DNA 的特定 DNA 序列和自细胞总 RNA、噬菌体或质粒序列转录的 cDNA 等。一般参见 Mullis 等(1987)Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.51: 263；Erich 主编(1989)PCR TECHNOLOGY(Stockton Press, N.Y)。本文所用 PCR 被视为是一个(但不是唯一的)用于扩增核酸试验样品的核酸聚合酶反应方法的实例，该方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶以扩增或产生特定的核酸片段。

人 BTLA 特异性抗体

本发明总的来讲涉及与 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段和这类抗体或其抗原结合片段的用途。更具体而言，本发明提供分离的抗 BTLA 抗体以及这些抗体或其抗原结合片段在疾病治疗和预防中的应用。抗 BTLA 抗体的实例包括但不限于本文所述的

ch7、ch12、ch17、ch22、ch27、hu17、hu18 和 hu19。

本发明提供与人 BTLA (B 和 T 淋巴细胞弱化子) 结合的分离抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括以下一种或多种性质: A) 阻断 BTLA 与 HVEM (疱疹病毒进入介体) 结合; B) 与食蟹猴 BTLA 交叉反应; C) 与人 BTLA 结合的 $K_D \leq 0.28 \text{ nM}$ 。

在一个或多个实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 至少包含一个选自 SEQ ID NO: 7、8、9、10、11、12、16、17、18、22、23、24、31、32 和 33 的轻链 CDR。例如, 在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 LCDR1 可选自 SEQ ID NO: 7、10、16、22 和 31 中的任一 CDR 序列; 在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 LCDR2 可选自 SEQ ID NO: 8、11、17、23 和 32 中的任一 CDR 序列; 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 LCDR3 可选自 SEQ ID NO: 9、12、18、24 和 33 中的任一 CDR 序列。

在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中, LCDR1 选自 SEQ ID NO: 7、10、16、22 和 31 中的任一 CDR 序列; LCDR2 选自 SEQ ID NO: 8、11、17、23 和 32 中的任一 CDR 序列; LCDR3 选自 SEQ ID NO: 9、12、18、24 和 33 中的任一 CDR 序列。

在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段中, 其轻链的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列如以下 A-E 组中的任一组所示:

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
B	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
C	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
D	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
E	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33

在一个或多个实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 至少包括一个选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、13、14、15、19、20、21、25、26、27、28、29 和 30 的重链 CDR。例如, 在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 HCDR1 可选自 SEQ ID NO: 1、4、13、19、25 和 28 中的任一 CDR 序列; 在某些实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 HCDR2 可选自 SEQ ID NO: 2、

5、14、20、26 和 29 中的任一 CDR 序列；在某些实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 中 HCDR3 可选自 SEQ ID NO:3、6、15、21、27 和 30 中的任一 CDR 序列。

在某些实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 中，HCDR1 选自 SEQ ID NO:1、4、13、19、25 和 28 中的任一 CDR 序列；HCDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、14、20、26 和 29 中的任一 CDR 序列；HCDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、15、21、27 和 30 中的任一 CDR 序列。

在某些实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段中，其重链 CDR 的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列如以下 F-K 组中的任一组所示：

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
F	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
H	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
I	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
G	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
K	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30

在一个或多个实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中，LCDR1 选自 SEQ ID NO:7、10、16、22 和 31 中的任一 CDR 序列；LCDR2 选自 SEQ ID NO:8、11、17、23 和 32 中的任一 CDR 序列；LCDR3 选自 SEQ ID NO:9、12、18、24 和 33 中的任一 CDR 序列；且其重链 CDR 中，HCDR1 选自 SEQ ID NO:1、4、13、19、25 和 28 中的任一 CDR 序列；HCDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、14、20、26 和 29 中的任一 CDR 序列；HCDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、15、21、27 和 30 中的任一 CDR 序列。

在一个或多个实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段中，其轻链的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列如以下 A-E 组中的任一组所示：

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
B	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
C	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

D	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
E	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33

和/或其重链 CDR 的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列如以下 F-K 组中的任一组所示:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
F	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
H	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
I	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
G	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
K	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30

应理解的是, 本文公开的轻链的各 CDR 序列, 尤其是各 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列, 与重链的各 CDR 序列, 尤其是各 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列, 可任意地组合。例如, 由本文定义为 LCDR1 的序列中的任意一条序列可与本文定义为 LCDR2 的序列中的任意一条、LCDR3 的序列中的任意一条、HCDR1 的序列中的任意一条、HCDR2 的序列中的任意一条以及 HCDR3 的序列中的任意一条组合, 形成本文所述的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段所包含的完整的 6 个 CDR 结构域。

因此, 举例而言, 在一个或多个实施方式中, 本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段中, 其重链 CDR 的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列和轻链 CDR 的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列如以下 I-IX 组中的任一组所示:

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
I	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
II	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
III	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
IV	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
V	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
VI	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30
VII	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6

VIII	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
IX	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15

在一个或多个实施方式中，本发明提供的与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 36、37、39、41、44、46、47 和 48 中任一所示的轻链可变区的氨基酸序列；和/或选自 SEQ ID NO: 34、35、38、40、42、43 和 45 中任一所示的重链可变区的氨基酸序列。

在一个或多个实施方式中，本发明的分离抗体包含重链恒定区，优选人恒定区，例如 γ 1、 γ 2、 γ 3 或 γ 4 人重链恒定区或其变体。在另一个实施方式中，本发明的分离抗体包含轻链恒定区，优选人轻链恒定区，例如 λ 或 κ 人轻链区或其变体。通过举例而非限制，人重链恒定区可为 γ 4，人轻链恒定区可为 κ 。在一个实施方式中，抗体的 Fc 区可以是具有保守修饰或保守取代或保守突变的 γ 4。

本文中，术语“保守修饰变体”或“保守取代”或“保守突变”是指蛋白质中的氨基酸被具有相似性质(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸取代，使得在不改变蛋白质的生物活性的情况下可频繁进行变化。本领域技术人员认识到，多肽非必要区的单个氨基酸取代一般不会显著改变生物活性(参见例如 Watson 等，(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页(第 4 版))。另外，结构或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。本发明各种实施方式的抗体或其抗原结合片段包含具有下述序列的多肽链：与本文公开的具体氨基酸序列(例如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47 和 48)比较时，其包括至多 0(无变化)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20 个或更多个保守氨基酸取代；例如，可包括 0-20 个氨基酸取代，或包括 1-15、1-10、1-8、1-5 个取代，或取代的数量在上述任意两个数值所组成的范围内。

因此，本发明也包括本发明抗体或其抗原结合片段的功能保守变体，即本发明抗体或其抗原结合片段中的一个或多个氨基酸残基在不改变抗体的整体构象和功能的情况下发生改变的变体，包括但不限于氨基酸被具有类似性质的氨基酸置换。通常，置换的数量可在前文所述的范围内，如 0-20 个保守取代。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段是单链 Fv 抗体；在某些实施方式中，该抗体或其抗原结合片段是 Fab 抗体；在某些实施方式中，该抗体或其抗原结合片段是 Fab' 抗体；在某些实施方式中，该抗体或其抗原结合

片段是(Fab')₂ 抗体。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 或 35 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 或 35 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 或 42 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示。

在一个或多个实施方式中，本发明与人 BTLA 结合的分离抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46、47 或 48 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。

本发明还提供分离的核酸，例如 DNA，其编码本发明的分离抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中，本发明分离的核酸编码包含至少一个成熟抗体轻链可变(VL)结构域和至少一个成熟抗体重链可变(VH)结构域的抗体或其抗原结合片段，其中 VL 结构域包含至少 3 个具有选自 SEQ ID NO: 7-8、10-12、16-18、22-24 和 31-33 的序列的 CDR，VH 结构域包含至少 3 个具有选自 SEQ ID NO: 1-3、4-6、13-15、19-21、25-27 和 28-30 的序列的 CDR。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 34 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 35 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 39 和 SEQ ID NO: 38 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 40 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 42 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 43 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中，分离核酸分别编码 SEQ ID NO:

46 和 SEQ ID NO: 45 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中,分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 47 和 SEQ ID NO: 45 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个实施方式中,分离核酸分别编码 SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO: 45 的成熟轻链和重链可变区序列。在一个或多个实施方式中,分离核酸编码单个核酸分子上的轻链和重链两者,而在其它实施方式中,在两个或更多个独立核酸分子上编码轻链和重链。

本发明还提供包含本发明的分离核酸的表达载体。还提供包含本发明的表达载体的宿主细胞。本发明还涉及产生本发明的抗体或其抗原结合片段的方法。

本发明还涉及与本文所述的抗体 ch7、ch12、ch17、ch22、ch27、hu17、hu18 和 hu19 一样结合人 BTLA 上的相同表位的抗体或其抗原结合片段,例如能够交叉阻断任何本发明抗体的结合的抗体。

疾病及其治疗或预防

本发明还提供用本发明的抗体或其抗原结合片段(优选人源化抗体)治疗或预防需要用分离抗体或其抗原结合片段治疗的受试者(包括人受试者)的方法。该方法通常包括给予需要的对象治疗或预防有效量的本发明任一实施方式所述的抗体或其抗原结合片段,或含有所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物。可根据实际情况选择合适的给药方式,包括但不限于口服、静脉内、皮下、肌肉内、动脉内、关节内(例如在关节炎关节中)、通过吸入、气雾剂递送或肿瘤内给予等。

受试者通常患有 BTLA 介导的疾病,即受益于 BTLA 活性的消除、抑制或降低的疾病。通常,BTLA 介导的疾病为与免疫抑制相关所有疾病,包括自身免疫性疾病、移植排斥反应、肿瘤等。所述的肿瘤包括黑色素瘤、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、骨癌、皮肤癌、头或颈癌、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、食道癌、小肠癌、宫颈癌、阴道癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、肾上腺癌、软组织癌、尿道癌、慢性或急性白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的赘生物、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、其包括石棉所诱发的那些,和所述癌症的组合。所述自身免疫性疾病包括器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病;所述器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等;所述系

统性自身免疫病包括系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性血管炎、硬皮病、天胞疮、皮炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血、溃疡性结肠炎等。

这种治疗方法还可包括给予一种或多种其它的治疗药物，例如肿瘤疫苗、标准肿瘤化学疗法治疗药物、其它免疫诱导剂。

药盒

本发明还提供呈药盒形式的包括本发明的联合药物的组分的药盒。本发明的药盒包括一种或多种组分，包括但不限于本文所述的与 BTLA 特异性结合的抗体或抗原结合片段(例如抗体 ch7、ch12、ch17、ch22、ch27、hu17、hu18 和 hu19，但不限于上述抗体)以及一种或多种其它组分，包括但不限于本文所述药学上可接受的载体和/或化疗药物。可将所述抗体或抗原结合片段和/或化疗药物配成纯的组合物或在药物组合物中与药学上可接受的载体组合。

在一个实施方式中，药盒包括在一个容器(例如无菌玻璃或塑料小瓶)中的本发明的抗体或其抗原结合片段(例如抗体 ch7、ch12、ch17、ch22、ch27、hu17、hu18 和 hu19，但不限于上述抗体)或其药物组合物，以及在另一个容器(例如无菌玻璃或塑料小瓶)中的本发明的抗体或其抗原结合片段或其药物组合物和/或化疗药物。

在本发明的另一个实施方式中，药盒包括本发明的联合药物，包括在单个公用容器中的抗体或抗原结合片段(例如抗体 ch7、ch12、ch17、ch22、ch27、hu17、hu18 和 hu19，但不限于上述抗体)连同药学上可接受的载体，任选与配制在一起的一种或多种化疗药物组分联合，任选在药物组合物中。

药盒可包括药品说明书，其包括有关药盒中的药物组合物和剂型的信息。这类信息一般帮助患者和医师有效安全地使用所附药物组合物和剂型。例如，药品说明书中可提供有关本发明的联合药物的下列信息：药代动力学、药效学、临床研究、效果参数、适应证和用法、禁忌证、警告事项、预防措施、不良反应、过量使用、适当剂量和给药、供应规格、合适的贮存条件、参考、生产商/批发商信息和专利信息。

药物组合物和给药

本发明也包括含有本文所述任一抗人 BTLA 抗体或其抗原结合片段的药物组合物。本文使用的术语“药物组合物”表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中，所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如，所述药物组合物中所含的成分(例如根据本发明的抗体、核酸分子、核酸分子组合和/或缀合物)可以以整

体施用于对象，或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时，所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS（磷酸盐缓冲液）、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。本发明的免疫缀合物可含有与治疗剂偶联的本文任一实施方式所述的抗体或其抗原结合片段，优选地所述治疗剂为本领域周知和常用于制备免疫缀合物的免疫毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂。

为了制备本发明的抗人 BTLA 抗体或其抗原结合片段的药物组合物或无菌组合物，可将该抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia : National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA(1984)。

可将本发明的药物组合物制备成本领域周知的各种合适的给药剂型，包括但不先于冻干粉、膏剂、水溶液剂或混悬剂等。可通过与可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备以下形式的治疗剂和诊断剂的剂型：例如冻干粉、膏剂、水溶液剂或混悬剂(参见例如 Hardman 等(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY ; Gennaro (2000) Remington : The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY ; Avis 等(主编)(1993)Pharmaceutical Dosage Forms : Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY ; Lieberman 等(主编)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms : Tablets, Marcel Dekker, NY ; Lieberman 等(主编)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms : Disperse Systems, Marcel Dekker, NY ; Weiner 和 Kotkoskie(2000)Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY)。

给药方案取决于若干因素，包括治疗性抗体的血清或组织周转率、症状水平、治疗性抗体的免疫原性和生物基质中靶细胞的可及性。优选给药方案递送足够的治疗性抗体以实现靶疾病状态的改善，同时使不良副作用降到最低。因此，递送的生物剂(biologic)的量部分取决于具体的治疗性抗体和待治疗病况的严重程度。可获得有关选择适当剂量的治疗性抗体方面的指引(参见例如 Wawrzynczak(1996)Antibody Therapy, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK ; Kresina(主编)(1991)Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY ; Bach(主编)(1993)Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY ; Baert 等(2003)New

Engl.J.Med.348 : 601-608 ; Milgrom 等(1999)New Engl.J.Med.341: 1966-1973 ; Slamon 等(2001)New Engl.J.Med.344 : 783-792 ; Beniaminovitz 等(2000)New Engl.J.Med.342 : 613-619 ; Ghosh 等 (2003)New Engl.J.Med.348 : 24-32 ; Lipsky 等 (2000) New Engl.J.Med.343 : 1594-1602)。

应用

本发明提供抗本文任一实施方式所述的 BTLA 抗体及其抗原结合片段在治疗、预防和诊断 BTLA 介导的疾病中的应用。在某些实施方案中, 本发明提供用于治疗、预防和诊断 BTLA 介导的疾病的本文任一实施方式所述的 BTLA 抗体及其抗原结合片段。

实施例

提供以下实施例以证明并进一步解释本发明的一些优选的实施方式和方面, 不应被解释为限制其范围。

实施例 1、克隆人 BTLA 胞外结构区入真核表达质粒

从义翘神州购买含有人 BTLA 基因 cDNA 序列的质粒 HG11895-G-N, 利用正向引物 5'-gtacGCTCTTCATGTaaagaatcatgtgatgtacagcttta-3' (SEQ ID NO:50) 和反向引物 5'-gatcGCTCTTCTAGCatacaggagccagggtctgcttgcca-3' (SEQ ID NO:51), PCR 扩增人 BTLA 胞外片段(核苷酸序列如 SEQ ID NO:49 所示)。扩增片段经 BSPQI 酶切后, 插入到自主构建的真核表达质粒系统(HX1-FC)中, 产生人 BTLA 胞外区蛋白(hBTLA-ECD-FC)的表达质粒。以此质粒通过 PEI 转染 293E 细胞, 6 天后, 收集培养基上清液, 通过亲和层析纯化人 BTLA 胞外区重组蛋白(hBTLA-ECD-FC)。

图 1 显示人 BTLA 胞外区蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。

实施例 2、FACS 检测重组蛋白 hBTLA-ECD-FC 与细胞上人 HVEM 的结合

构建表达人 HVEM(Gene Bank: NP_003811.2)的 293F 稳转细胞株(hHVEM-293F)。将 hHVEM-293F 细胞悬液与生物素标记的 hBTLA (300ng/mL) 混合, 室温孵育 30 分钟。以 FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次后, 加入 5μg/ml 的 NA-PE 并孵育 30 分钟。FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次后, 通过流式细胞仪检测验证 BTLA 重组蛋白与 293F 细胞表面的 HVEM 的结合。结果如图 2 所示。

实施例 3、抗 BTLA 鼠源抗体的制备

3.1、免疫动物

将实施例 1 获得的重组蛋白 hBTLA-ECD-FC 作为抗原与等量免疫佐剂（福氏佐剂）混合，取 5 只 6 周大雌性 Balb/c 小鼠进行皮下免疫。在初次免疫以后，每两周进行一次加强免疫，共 6 次免疫。

3.2、细胞融合

在最后一针加强免疫后，取小鼠腹股沟淋巴结，在生理盐水中碾磨后取富含淋巴细胞的悬浮液，按常规电转方法(参见 BTX 公司电转仪手册)将其与 SP2/0 细胞融合。将融合细胞在含有 HAT 的 DMEM 完全培养基(Corning)中置于 8% CO₂，37⁰C 条件下培养。

实施例 4、杂交瘤细胞的筛选实验

在 11500 株不同多克隆杂交瘤细胞中，通过酶标(ELISA)反应，筛选出 560 株所分泌的抗体可结合人 BTLA 蛋白的克隆。在这 560 株克隆中，有 33 株可以结合 293F 细胞上表达的 BTLA；在这 33 株克隆中，有 16 株具备抑制生物素标记的人 BTLA 与 293F 上 HVEM 的结合的能力。我们集中对这 16 株克隆中的前 4 株(2D12、3B3、3E3 和 6A7)进行后续实验，具体筛选的实验方法如下所示。

4.1、ELISA 检测杂交瘤抗体与 hBTLA 的结合

通过酶标反应（ELISA），筛选所分泌的抗体与 hBTLA 结合的杂交瘤细胞株。384 孔酶标板，用 1 μ g/ml 的 hBTLA 包被，4 摄氏度孵育过夜。然后弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗 3 次，加入含有 1% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入杂交瘤培养上清，室温孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次。然后加入 1：5000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗，室温孵育 30 分钟。经洗涤缓冲液冲洗三次后，加入 30 μ l TMB 底物溶液显色，室温反应 10 分钟后，以 30 μ l 的盐酸溶液（2M）终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

4.2、ELISA 检测杂交瘤抗体结合 hBTLA 的种属特异性

通过酶标反应(ELISA)筛选杂交瘤分泌的抗体与食蟹猴 BTLA 结合的杂交瘤细胞株。96 孔酶标板，用 1 μ g/ml 的食蟹猴 BTLA 包被，室温孵育 60 分钟。然后弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗 3 次，加入含有 1% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入杂交瘤培养上清，室温孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次。然后加入 1：5000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗，室温孵育 30 分钟。经洗涤缓冲液冲洗三次后，加入 100 μ l TMB 底物溶液显色，室温反应 10 分钟后，以 100 μ l 的盐酸溶液（2M）终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

4.3、FACS 检测杂交瘤抗体阻断 BTLA 与 HVEM 结合作用

将 33 株抗体培养液上清与生物素标记的人 BTLA (300ng/mL) 混合, 室温孵育 30 分钟。然后将混合物与 hHVEM-293F 稳转细胞株悬液在室温孵育 30 分钟。以 FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次后, 加入 5 μ g/ml 的 NA-PE 并孵育 30 分钟。FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次后, 通过流式细胞仪检测验证杂交瘤细胞分泌的抗体能够阻断人 BTLA 与 293F 细胞表面的 HVEM 的结合作用。

实施例 5、候选抗体可变区序列的获得 (Kabat 或 IMGT 表示)

用基于简并引物 PCR 的方法, 测定由候选杂交瘤表达的小鼠抗体可变区的 DNA 序列。简言之, 将杂交瘤细胞株分别扩大培养, 1000rpm 离心收集细胞, 并以 Trizol 提取总 RNA。以此为模板, 合成第一链 cDNA 后, 以第一链 cDNA 为后续模板 PCR 扩增对应的可变区 DNA 序列, 所用 PCR 引物基于 Ig-引物组。回收纯化 PCR 产物, 将扩增产物测序后, 得到候选杂交瘤重链可变区和轻链可变区序列。

用 NCBI Ig-Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>) 在种系和重排 Ig 可变区序列数据库中搜索共有序列。基于 Kabat (Wu, T.T 及 Kabat, E.A. 1970 J.Exp.Med., 132:211-250) 及 IMGT 系统 (Lefranc M.-P. 等人, 1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212), 藉由序列批注及藉由基于因特网的序列分析 (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html 与 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 鉴定互补决定区 (CDR)。

杂交瘤细胞编码的轻链和重链可变区及 CDR 的氨基酸序列如下所示 (其中 **加粗下划线** 为基于 Kabat 系统划分的 CDRs, 而 **斜体加粗** 为基于 IMGT 系统划分的 CDRs) :

2D12 HC1

EVQLQQSGAELVKPGASVNLSTASGFAIR**DTYLHWVKQRPEQVLEWTGRIDPANGNTKYDPRFQG**KATLTADTSS
NTAYLHLSSLTSEDVAVYYCV**ADYYGSSLFDY**WGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:34, 3 个 HCDR 的序列分别对应于 SEQ ID NO:1-3)

2D12 HC2

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTVSGFNIR**DSYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFRG**KATITADASS
NTAALQVSSLTSEDVAVYFCV**GDDHYGSSLFDY**WGHTTTLTVSS (SEQ ID NO:35, 3 个 HCDR 的序列分别对应于 SEQ ID NO:4-6)

2D12 LC1

DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYVLSKLESGVPDRFTGVGSG
TDFTLKISRVEAVDLGVYYCWQGTTFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:36, 3 个 LCDR 的序列分别
对应于 SEQ ID NO:7—9)

2D12 LC2

EVVMTQTPLTSLVTIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFLQRPQGSPKRLMHLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF
TLKISGVEADLGVYYCWQGTTFPYTFGGGTKLETK (SEQ ID NO:37, 3 个 LCDR 的序列分别对应于
SEQ ID NO:10—12)

3B3 HC

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNFKHTYAHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGGKATMTAD
TASNAAFLQLSSLTSEDVAVYYCVADHYGSSLLDYWGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:38, 3 个 HCDR 的
序列分别对应于 SEQ ID NO:13—15)

3B3 LC

DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKGKGPRLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGSDYSL
TISSELEDSANYCYCLQYATYAPPAVSIIFGAGTKLELK (SEQ ID NO:39, 3 个 LCDR 的序列分别
对应于 SEQ ID NO:16—18)

3E3 HC1

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIDITYVHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTKFDPKFQGGKATITAD
TSSNTANLQISSLTSEDVAVYYCVSDYYGSSLLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:40, 3 个 HCDR 的
序列分别对应于 SEQ ID NO:19—21)

3E3 LC

DPDSTHFVDYHWTTCCLHLLQVQSEPPSEDGKTYLSWIFQMFHLSPKRLIYVVSKLNSGVPVRLSANHSRTDFT
LKISRVEADLGVYYCWQGTTFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:41, 3 个 LCDR 的序列分别对应
于 SEQ ID NO:22—24)

3E3 HC2

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTVSGFNIDITYVHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTKYDPKLQGTATITAD
TSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCATDYYGSSLLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:42, 3 个 HCDR 的

序列分别对应于 SEQ ID NO:25—27)

6A7 HC

EVHLQQSGTELMKPGASVKLSCTASGLNIRDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKFDPKFQGGKATLTSD
TSSNTAYLHFSSLTSEDAAVYYCVSDHYGSSLLDYWGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:43, 3 个 HCDR 的
序列分别对应于 SEQ ID NO:28—30)

6A7 LC

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIKSYLSWYQQKPKWSPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSL
TITSLESDDTATYYCLQHGAADAAPTVSIFGGGTGLEIK (SEQ ID NO:44, 3 个 LCDR 的序列分别
对应于 SEQ ID NO:31—33)

实施例 6、构建嵌合抗体表达载体

通过标准 PCR 技术将候选鼠源抗体重链可变区和轻链可变区基因分别融合至人类 IgG4 的 FC 及 κ 链恒定区的 N 末端, 插入 pcDNA3.1 载体来构建嵌合型重链或轻链的表达质粒。后续的嵌合抗体均由上述重链和轻链的表达载体质粒两两组合转染表达细胞后, 纯化提取获得, 获得嵌合抗体 ch7、ch12、ch17、ch22 和 ch27。杂交瘤细胞编码的轻链和重链可变区及 CDR 的氨基酸序列如下所示。

嵌合抗体编号	链/CDR	序列编号
ch7	重链	
	HCDR1	SEQ ID NO:4
	HCDR2	SEQ ID NO:5
	HCDR3	SEQ ID NO:6
	轻链	
	LCDR1	SEQ ID NO:10
	LCDR2	SEQ ID NO:11
	LCDR3	SEQ ID NO:12
ch12	重链	
	HCDR1	SEQ ID NO:13
	HCDR2	SEQ ID NO:14
	HCDR3	SEQ ID NO:15
	轻链	

	LCDR1	SEQ ID NO:10
	LCDR2	SEQ ID NO:11
	LCDR3	SEQ ID NO:12
ch17	重链	
	HCDR1	SEQ ID NO:19
	HCDR2	SEQ ID NO:20
	HCDR3	SEQ ID NO:21
	轻链	
	LCDR1	SEQ ID NO:10
	LCDR2	SEQ ID NO:11
	LCDR3	SEQ ID NO:12
ch22	重链	
	HCDR1	SEQ ID NO:25
	HCDR2	SEQ ID NO:26
	HCDR3	SEQ ID NO:27
	轻链	
	LCDR1	SEQ ID NO:10
	LCDR2	SEQ ID NO:11
	LCDR3	SEQ ID NO:12
ch27	重链	
	HCDR1	SEQ ID NO:28
	HCDR2	SEQ ID NO:29
	HCDR3	SEQ ID NO:30
	轻链	
	LCDR1	SEQ ID NO:10
	LCDR2	SEQ ID NO:11
	LCDR3	SEQ ID NO:12

实施例 7、ELISA 检测嵌合抗体与 hBTLA 的结合

通过酶标反应 (ELISA) 检测嵌合抗体与 hBTLA 的结合能力。用 0.5 μ g/ml 的 hBTLA 包被 96 孔酶标板, 37 摄氏度恒温孵育 60 分钟。然后弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入梯度稀释的

抗体, 37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 然后加入 1: 10000 倍稀释的 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 二抗, 37 摄氏度孵育 1 小时, 经洗涤缓冲液冲洗三次后, 加入 100 μ l TMB 底物溶液显色, 室温反应 30 分钟后, 以 100 μ l 2M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

结果如图 3 所示, 嵌合抗体 ch7, ch12, ch17, ch22 和 ch27 可以与 hBTLA 特异性结合。其 EC₅₀ 值如下表 1 所示。

表 1: 嵌合抗体与人 BTLA 特异性结合数据

嵌合抗体	ch7	ch12	ch17	ch22	ch27
EC ₅₀ (ng/mL)	0.066	0.094	0.298	0.373	0.052

实施例 8、FACS 检测嵌合抗体对阻断 BTLA 与 HVEM 结合作用

采用 FACS 检测嵌合抗体阻断 hBTLA 结合表达于 293F 细胞上 hHVEM 的能力。将 hHVEM-293F 稳定表达细胞消化后离心重悬到 FACS 缓冲液中, 按细胞量为 2.5 $\times 10^4$ 个/50ul 加入到 96 孔圆底板孔中, 加入预先生物素标记的 hBTLA (1 μ g/ml) 蛋白混合, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟; 再加入 50ul 不同浓度的嵌合抗体稀释液 (起始 5 μ g/ml, 3 倍滴定) 混匀, 室温孵育 30min; 用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次后加入 100ul 山羊抗人 IgG-PE 抗体, 避光孵育 30min; 用 FACS 缓冲液洗涤两次后进行 FACS 检测。将经洗涤的细胞重悬于含有碘化丙啶 (PI) 以及防止受体内化的 0.02% 叠氮化钠的 4 $^{\circ}$ C 缓冲剂中后, 通过流式细胞术分析。根据从 FSC/SSC 门排除 PI 阳性细胞, 对活细胞进行门控, 并测量其几何平均荧光强度 (MFI)。使用 Prism™ 软件内的 S 形剂量-响应模型进行分析数据。

结果如图 4 和下表 2 所示, 嵌合抗体 ch12, ch17, ch22 和 ch27 能有效阻断人 BTLA 与细胞表面的 HVEM 结合。

表 2

嵌合抗体	ch12	ch17	ch22	ch27
FACS, IC ₅₀ (ng/ml)	77.17	76.07	75.67	69.54

实施例 9、荧光素酶报告基因实验检测嵌合抗体对 T 细胞活性的影响

通过刺激识别抗原呈递细胞(APC)上由主要组织相容性复合体 I 类或 II 类蛋白呈递的特定肽的 T 细胞受体(TCR)来实现 T 细胞活化。活化的 TCR 转而启动信号传导事件的级联, 其可通过转录因子(例如活化子-蛋白-1(AP-1)、活化的 T 细胞的核因子(NFAT)或活

化的 B 细胞的核因子 κ 轻链增强子(NF κ b))驱动的报告基因来监测。通过在 T 细胞上组成或诱导表达的共同受体的接合(engagement)来调整 T 细胞应答。程序性细胞死亡蛋白(PD1)和 BTLA 是 T 细胞活性的负调节物。PD-1 和 BTLA 分别与在包括 APC 或癌症细胞的靶细胞上表达的其配体 (PD-L1) 和 HVEM 相互作用, 这种相互作用导致通过将磷酸酶募集到 TCR 信号小体(signalosome)来递送抑制信号, 从而产生正信号传导的抑制。通过构建两个工程化改造的稳定表达细胞系 Jurkat 细胞(Jurkat/NFAT-Luc/hPD-1-hBTLA)和 CHO 细胞(CHO/hPD-L1-hHVEM)来测量通过 APC 和 T 细胞之间的相互作用诱导的 T 细胞信号传导。

将稳定表达 hPD-L1/hHVEM 的 CHO 细胞铺到 96 孔板, 每孔细胞量为 5×10^4 , 37℃, 7%CO₂ 培养过夜, 去除细胞上清, 每孔中加入 40ul 嵌合抗 BTLA 抗体稀释液 (起始浓度为 60ug/ml, 3 倍滴定), 加入 40ul 可以持续表达 hPD-1/hBTLA/NFAT-荧光素酶的 Jurkat 报告细胞, 总细胞数为 1×10^5 细胞, 37℃, 7%CO₂ 培养 6 小时, 加入荧光素酶试剂, 酶标仪检测发光值。

结果如图 5 和下表 3 所示, 嵌合抗体 ch12, ch17, ch22 和 ch27 能显著抑制 BTLA 和 PD-1 介导的 T 细胞活性抑制作用。

表 3: 嵌合抗体有效促进 T 细胞活性

嵌合抗体	ch12	ch17	ch22	ch27
荧光素酶, EC ₅₀ (ng/mL)	300.6	370.6	912.4	278.6

实施例 10、抗体的人源化改造

根据上述获得的杂交瘤细胞分泌的抗体的可变区序列, 进行人源化改造。简言之, 人源化改造过程涉及以下步骤: A、把各杂交瘤细胞分泌的抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对, 找出同源性高的序列; B、分析考察 HLA-DR 亲和性, 选出亲和力低的人胚胎系框架序列; C、利用计算机模拟技术, 应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列, 考察其空间立体结合方式。通过计算静电力, 范德华力, 亲疏水性和熵值, 分析各杂交瘤细胞分泌的抗体基因序列中可与 hBTLA 作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体, 将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架, 并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点, 合成人源化抗体 (Pini, A.等, et al. (1998). design and use of a phage display library: human antibodies with 10 subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel.,Journal of Biological Chemistry, 273(34): 21769-21776)。在此基础上我们得到了以下多个人源化抗体。其中包括以下克隆, hu17、

hu18 和 hu19。

hu17:

重链氨基酸序列 SEQ ID NO:45;

轻链氨基酸序列 SEQ ID NO:46;

hu18:

重链氨基酸序列 SEQ ID NO:45;

轻链氨基酸序列 SEQ ID NO:47;

hu19:

重链氨基酸序列 SEQ ID NO:45;

轻链氨基酸序列 SEQ ID NO:48。

实施例 11、ELISA 检测人源化抗体与 hBTLA 的结合

利用常规 ELISA 检测方法检测人源化抗体与 hBTLA 结合特异性。用 0.5 μ g/ml 的 hBTLA 包被 96 孔酶标板, 37 摄氏度恒温孵育 60 分钟。然后弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入梯度稀释的抗体, 37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 然后加入 1: 10000 倍稀释的 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 二抗, 37 摄氏度孵育 1 小时, 经洗涤缓冲液冲洗三次后, 加入 100 μ l TMB 底物溶液显色, 室温反应 30 分钟后, 以 100 μ l 2M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

结果如图 6 所示, 人源化抗体 hu17, hu18 和 hu19 可以与 hBTLA 特异性结合。其 EC₅₀ 值如下表 4 所示。

表 4: 人源化抗体组合 hu17, hu18 和 hu19 与 hBTLA 特异性结合数据

人源化抗体	hu17	hu18	hu19
EC ₅₀ (ng/mL)	6.3	5.4	6.6

实施例 12、FACS 检测人源化抗体与 293F 细胞上 hBTLA 的结合

采用基于细胞的流式细胞(FACS)测定人源化抗 BTLA 抗体与细胞上表达的 hBTLA 结合能力。将表达 hBTLA 的 293F 细胞消化后离心重悬到 FACS 缓冲液中, 按细胞量为 2.5 $\times 10^4$, 体积为 50 μ l 加入到 96 孔圆底板孔中, 加入 50 μ l 不同浓度的抗体稀释液(起始浓度 10 μ g/ml, 3 倍滴定)混匀, 室温孵育 30min; 用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次后加入 100 μ l 山羊抗人 IgG-PE 抗体, 避光孵育 30min; 用 FACS buffer 洗涤两次后进行 FACS 检测。

将经洗涤的细胞重悬于含有碘化丙啶 (PI)以及防止受体内化的 0.02%叠氮化钠的 4℃ 缓冲剂中后,通过流式细胞术分析。根据从 FSC/SSC 门排除 PI 阳性细胞,对活细胞进行门控,并测量其几何平均荧光。使用 Prism™ 软件内的 S 形剂量-响应模型进行分析数据。

结果如图 7 所示,人源化抗体 hu17、hu18、hu19 与 293F 细胞上 hBTLA 能有效的结合。各抗体的 EC50 值如下表 5 所示。

表 5

	hu17	hu18	hu19	ch12
EC50 (ng/mL)	96.74	89.34	95.06	88.12

实施例 13、FACS 检测人源化抗体对阻断 BTLA 与 HVEM 结合的阻断作用

采用基于细胞的流式细胞(FACS)测定,检测人源化抗体阻断 hBTLA 结合表达于 293F 细胞上 hHVEM 的能力。将 hHVEM-293F 稳定表达细胞消化后离心重悬到 FACS 缓冲液中,按细胞量为 2.5×10^4 个,体积为 50ul 加入到 96 孔圆底板孔中,加入预先生物素标记的 hBTLA (1ug/ml) 蛋白混合,4℃ 孵育 15 分钟;再加入 50ul 不同浓度的人源化抗体稀释液(起始 5ug/ml, 3 倍滴定)混匀,室温孵育 30min;用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次后加入 100ul 山羊抗人 IgG-PE 抗体,避光孵育 30min;用 FACS 缓冲液洗涤两次后进行 FACS 检测。将经洗涤的细胞重悬于含有碘化丙啶 (PI)以及防止受体内化的 0.02%叠氮化钠的 4℃ 缓冲剂中后,通过流式细胞术分析。根据从 FSC/SSC 门排除 PI 阳性细胞,对活细胞进行门控,并测量其几何平均荧光。使用 Prism™ 软件内的 S 形剂量-响应模型进行分析数据。

结果如图 8 所示,人源化抗体 hu17、hu18、hu19 能有效阻断 BTLA 与细胞表面的 HVEM 结合。各抗体的 IC50 值如下表 6 所示。

表 6

	hu17	hu18	hu19	ch12
IC50 (ng/mL)	142.7	172.2	161.5	156.9

实施例 14、人源化抗 BTLA 抗体促进 T 细胞的激活

将稳定表达 hPD-L1/hHVEM 的 CHO 细胞铺到 96 孔板,每孔细胞量为 5×10^4 , 37℃, 7%CO₂ 培养过夜,去除细胞上清,每孔中加入 40ul 人源化抗 BTLA 抗体稀释液(起始浓度为 60ug/ml, 3 倍浓度梯度稀释),加入 40ul 可以持续表达 hPD-1/hBTLA/NFAT-荧光

素酶的 Jurkat 报告细胞，总细胞数为 1×10^5 细胞， 37°C ， $7\%\text{CO}_2$ 培养 6 小时，加入荧光素酶试剂，酶标仪检测发光值。

结果如图 9 所示，人源化抗 BTLA 抗体 hu17、hu18 能有效促进 T 细胞活化。各抗体的 EC50 值如下表 7 所示。

表 7

	hu17	hu18	hu19	ch12
EC50 (ng/mL)	256.7	277.3	290.4	138.7

实施例 15、人源化抗 BTLA 抗体与 hBTLA 的亲合力

使用 GE 医疗生命科学公司的 Biacore T200 仪器进行检测实验，将 Series S CM5 芯片装载到仪器上，使用的系统缓冲液为 HBS-EP+(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%表面活性剂 P20)。进行 BTLA-Fc 抗原在芯片检测通道的偶联，用 400 mM EDC 与 100 mM NHS 的混合液以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 注入 420 s 活化芯片表面，将 BTLA-Fc 抗原稀释在 10 mM 醋酸钠/醋酸(pH 5.5)缓冲液中至终浓度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，并以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 注入进行偶联，将 1 M 乙醇胺-盐酸溶液 (pH 8.5)以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 注入 420s 进行封闭。

用 Biacore 系统缓冲液将抗体进行 2 倍梯度稀释，共 6 个浓度点。浓度梯度为 24 nM、12 nM、6 nM、3 nM、1.5 nM 和 0.75 nM，其中 24 nM 为重复测试。数据分析使用 GE 医疗生命科学公司的数据分析软件 Biacore T200 Evaluation Software 版本号 3.0。数据拟合使用模型为 1:1 Binding。拟合得到抗体与抗原间结合的动力学常数结合速率 k_a (1/Ms)，解离速率 k_d (1/s)，亲和力常数 K_D (M)，结果如表 8 所示。

表 8：人源化抗体的亲和力数据

	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	$K_D(\text{M})$
hu17	6.24E+05	1.16E-04	1.86E-10
hu18	6.39E+05	8.67E-05	1.36E-10

实施例 16、人源化抗体与不同种属 BTLA 结合动力学的表征

为了检测嵌合抗体与食蟹猴源和鼠源 BTLA 之间的交叉反应，使用 ForteBio 检定。简而言之，将人 BTLA、食蟹猴 BTLA 或鼠 BTLA 偶联至已活化的 CM5 生物传感器芯片以实现大约 100-200 个响应单位(RU)，然后用 IM 乙醇胺封闭未反应基团。以 30 次/分钟在 SPR 运行缓冲液中注射自 0.12nM 至 90nM 递增浓度的人源化抗体样品，且藉由减去来自

空白流动室的 RU 来计算在不同种源 BTLA 的结合响应。

结果如图 10 所示。hu17 与不同种属 BTLA 结合对比结果显示：其不仅与人 BTLA 具有高亲和力，并且与食蟹猴源 BTLA 有相近的亲和力，但其与鼠 BTLA 基本不发生结合。

实施例 17、人源化抗体对小鼠肿瘤生长的抑制作用

在 MC38 细胞(ATCC)上通过电转 Hxp-hHVEM 质粒，构建 MC38-hHVME 细胞库，然后通过有限稀释法进行细胞亚克隆，通过流式筛选出单克隆，得到 MC38-HVEM 细胞；接着将 MC38-hHVEM 细胞以 1×10^6 个/0.1 mL 浓度接种于 B-hBTLA 人源化雌性小鼠的右侧皮下，待肿瘤生长到约 118 mm^3 时按肿瘤体积随机分组，每组 8 只，共 5 组，分别为：G1 0.9%氯化钠注射液溶剂对照组、G2 KLH (10 mg/kg)阴性对照组、G3 hu18 (1 mg/kg)组、G4 hu18 (3 mg/kg)组和 G5 hu18 (10 mg/kg)组。所有组给药途径均为腹腔注射，每周给药 2 次，连续给药 7 次，末次给药 4 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率 ($\text{TGI}_{\text{TW}}\%$)。

各组受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响结果如表 9 和图 11 所示。首次给药后 21 天，KLH (10mg/kg)阴性对照组平均肿瘤体积为 $1560 \pm 256 \text{ mm}^3$ ，其他给药组平均肿瘤体积分别为 $1073 \pm 224 \text{ mm}^3$ 、 $747 \pm 268 \text{ mm}^3$ 和 $868 \pm 211 \text{ mm}^3$ 。各给药组与 KLH 阴性对照组相比， $\text{TGI}_{\text{TV}}\%$ 分别为 33.7%、56.4%和 48.0%，P 值分别为 0.175、0.046 和 0.056，表明受试药物 hu18 在 3 mg/kg 剂量水平下对肿瘤生长有一定抑制作用。

表 9：hu18 对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响

组别	受试药物	肿瘤体积 (mm^3) ^a			P^b
		给药前	首次给药 21 后	TGI (%)	
G1	0.9%氯化钠注射液	118 ± 2	1029 ± 155	-	-
G2	KLH (10 mg/kg)	118 ± 2	1560 ± 256	-	-
G3	hu18 (1 mg/kg)	118 ± 3	1073 ± 224	33.7	0.175
G4	JS004 (3 mg/kg)	118 ± 2	747 ± 268	56.4	0.046
G5	JS004 (10 mg/kg)	118 ± 3	868 ± 211	48.0	0.056

注：a：平均数±标准误；b：给药组肿瘤体积与 KLH 阴性对照组肿瘤体积在给药 21 天后统计学比较，t-test。

各组受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLa 小鼠体重的影响结果如表 10 和图 12 所示。所有实验动物在给药期间活动和进食状态良好，各给药组动物体重均有一定程度的上升。实验期间未出现实验动物死亡情况。给药后 21 天，与 KLH 阴性对照组小鼠体重相比，各给药组小鼠体重无显著变化($P>0.05$)，表明实验动物对受试品耐受性良好。

表 10：受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLa 小鼠体重的影响

组别	受试药物	体重 (g) ^a			给药 21 天后 体重变化 (g)
		给药前	首次给药 21 天后	P^b	
G1	0.9%氯化钠注射液	18.4±0.4	20.7±0.4	-	+2.3
G2	KLH (10 mg/kg)	18.3±0.5	20.8±0.6	-	+2.5
G3	hu18 (1 mg/kg)	18.5±0.4	20.8±0.4	0.943	+2.3
G4	hu18 (3 mg/kg)	18.5±0.4	20.0±0.6	0.341	+1.5
G5	hu184 (10 mg/kg)	18.6±0.3	20.5±0.2	0.623	+1.9

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与 KLH 阴性对照组体重在给药 21 天后统计学比较，t-test。

实施例 18、人源化抗体 hu18 没有 ADCC 效应功能

当抗体结合至细胞表面靶蛋白质，然后连接至效应细胞上所表达的 Fc γ 受体 (Fc γ R) 时，启动 ADCC。很清楚地记载了人类 IgG1 对 Fc γ R 具有比 IgG4 明显更高的结合亲和力，尤其是结合 Fc γ R-I 及 Fc γ R-IIIa，该亲和力与 IgG1 激活 ADCC 的强度相关联。联想到 ADCC，当抗体交联细胞表面靶点及 C1q 蛋白质，继之以补体复合物形成及靶细胞裂解的级联反应时，激活 CDC。作为 ADCC 和 CDC 的代理，抗体结合至 Fc γ R 及 C1q 的检测就可充当 ADCC 及 CDC 的基本指标。因此，本发明利用 biacore T200 (GE) 评估了单抗对主要 Fc γ R 结合的动力学亲和力。

GE 的抗-His 抗体固定在传感器晶片上。各种 Fc 受体，包括重组人 Fc γ RIIIa (CD16a) V176，重组人 Fc γ RIIa (CD32a) R167，重组人 Fc γ RI (CD64) 和重组人 FcRn 被捕获，然后注射一系列稀释的重组人抗-BTLA 抗体 (即 hu18)，检测并分析相互作用的结合性质。hu18 是 IgG4 亚型抗体，hu18-IgG1 是 IgG1 亚型，其与 hu18 共享相同的 Fab，并作为阳性对照。

结果如表 11 所示，相比于 IgG1 亚型的对照抗体，IgG4 亚型的重组人抗-BTLA 抗体与 Fc 受体的结合相对较弱，hu18 抗体与 IgG1 亚型对照抗体相比，其与 Fc γ RIIIa (CD16a)

V176 的相互作用弱 400 倍。这显示 hu18 具有较弱或无 ADCC 效应。如表 12 所示, hu18 抗体不结合 C1q, 而 hu18-IgG1 抗体能够结合 C1q。

表 11: 抗-BTLA 抗体与 Fc 受体之间相互作用的结合亲和性

Fc 受体名称	抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
FcγRIIIA (CD16a) V176	hu18-IgG1	6.15E+04	8.85E-03	1.44E-07
	hu18	N/A	N/A	6.02E-05
FcγRIIA (CD32a) R167	hu18-IgG1	N/A	N/A	5.90E-06
	hu18	N/A	N/A	4.06E-05
FcγRI (CD64)	hu18-IgG1	2.99E+05	1.20E-03	4.00E-09
	hu18	2.10E+05	3.87E-03	1.84E-08
FcRn	hu18-IgG1	1.69E+06	3.88E-02	2.29E-08
	hu18	5.12E+05	7.08E-02	1.38E-07

表 12. 抗-BTLA 抗体与人 C1q 之间相互作用的结合亲和力

蛋白名称	抗体名称	结论
C1q	hu18-IgG1	特异性结合
	hu18	非特异性结合

权 利 要 求 书

1、分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个选自 SEQ ID NO: 7、8、9、10、11、12、16、17、18、22、23、24、31、32 和 33 的轻链 CDR 结构域和/或至少一个选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、13、14、15、19、20、21、25、26、27、28、29 和 30 的重链 CDR 结构域。

2、如权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中 LCDR1 选自 SEQ ID NO:7、10、16、22 和 31 中的任一 CDR 序列；和/或其 LCDR2 选自 SEQ ID NO:8、11、17、23 和 32 中的任一 CDR 序列；和/或其 LCDR3 选自 SEQ ID NO:9、12、18、24 和 33 中的任一 CDR 序列；和/或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 中 HCDR1 选自 SEQ ID NO:1、4、13、19、25 和 28 中的任一 CDR 序列；和/或其 HCDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、14、20、26 和 29 中的任一 CDR 序列；和/或其 HCDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、15、21、27 和 30 中的任一 CDR 序列。

3、如权利要求 2 所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR 中，LCDR1 选自 SEQ ID NO:7、10、16、22 和 31 中的任一 CDR 序列；LCDR2 选自 SEQ ID NO:8、11、17、23 和 32 中的任一 CDR 序列；和 LCDR3 选自 SEQ ID NO:9、12、18、24 和 33 中的任一 CDR 序列；和/或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 中，HCDR1 选自 SEQ ID NO:1、4、13、19、25 和 28 中的任一 CDR 序列；HCDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、14、20、26 和 29 中的任一 CDR 序列；和 HCDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、15、21、27 和 30 中的任一 CDR 序列。

4、如权利要求 2 所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列如以下 A-E 组中的任一组所示：

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
B	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
C	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
D	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24

E	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
---	---------------	---------------	---------------

和/或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列如以下 F-K 组中的任一组所示:

组别	HCDR1	HCDR2	HCDR3
F	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
G	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
H	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
I	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
G	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
K	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30

。

5、如权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述分离的抗体或其抗原结合片段的重链 CDR 的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列和轻链 CDR 的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列如以下 I-IX 组中的任一组所示:

组别	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
I	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
II	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
III	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
IV	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
V	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
VI	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30
VII	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
VIII	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
IX	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15

。

6、如权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于,

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 36、37、39、41、44、46、47 和 48 中任一所示的氨基酸序列; 和/或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 34、

35、38、40、42、43 和 45 中任一所示的氨基酸序列。

7、如权利要求 6 所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 或 35 所示；或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 或 35 所示；或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示；或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 或 42 所示；或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示；或

所述分离的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46、47 或 48 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示。

8、如权利要求 1—7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

9、分离的核酸，选自：

(1) 编码权利要求 1—7 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列；和

(2) (1) 所述多核苷酸序列的互补序列。

10、表达载体或含该表达载体的宿主细胞，其特征在于，所述表达载体含有权利要求 9 所述的分离的核酸。

11、药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有权利要求 1—7 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段、权利要求 9 所述的核酸、权利要求 10 所述的表达载体或宿主细胞，或它们的任意组合。

12、权利要求 1—7 中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段、权利要求 9 所述的核酸、权利要求 10 所述的表达载体或宿主细胞在制备用于治疗或预防 BTLA 介导的疾病的药物中的应用。

13、免疫缀合物，其特征在于，所述免疫缀合物含有与治疗剂偶联的权利要求 1—7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，优选地所述治疗剂为毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂。