



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103221427 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201180051223.5

(22)申请日 2011.08.23

(30)优先权数据

61/375,999 2010.08.23 US

61/380,827 2010.09.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/048752 2011.08.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/027328 EN 2012.03.01

(73)专利权人 德克萨斯州立大学董事会

地址 美国德克萨斯州奥斯汀

(72)发明人 刘勇军 邬揭新 劳拉·博韦尔

鹤下直也 J·云·曹

尚卡尔·库马尔

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋 杨生平

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2006/0281072 A1,2006.12.14,

US 2009/0214560 A1,2009.08.27,

Silvia Piconese et al.OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection.《the Journal of Experimental Medicine》.2008,第205卷(第4期),825-839.

Andrew D. Weinberg et al.Anti-OX40 (CD134) Administration to Nonhuman Primates: Immunostimulatory Effects and Toxicokinetic Study.《J Immunother》.2006,第29卷(第6期),575-585.

审查员 李影

权利要求书1页 说明书38页

序列表8页 附图59页

(54)发明名称

抗OX40抗体和使用其的方法

(57)摘要

公开了与OX40特异性结合的人抗体,优选地重组的人抗体,人源化和嵌合的两种。优选的抗体具有对OX40受体的高亲和性并且体外和体内活化所述受体。所述抗体可以是全长抗体或其抗原结合部分。所述抗体或抗体部分被用于调节受体活性,例如在患有其中OX40活性是有害的病症的人类受治疗者中。提供用于表达所述重组人抗体的核酸、载体和宿主细胞,以及还提供了合成重组人抗体的方法。

1. 一种与OX40结合的分离的抗体,其包含(a)由氨基酸序列SEQ ID NO:1构成的重链可变区CDR1;(b)由氨基酸序列SEQ ID NO:2构成的重链可变区CDR2;(c)由氨基酸序列SEQ ID NO.3构成的重链可变区CDR3;(d)由氨基酸序列SEQ ID NO.7构成的轻链可变区CDR1;(e)由氨基酸序列SEQ ID NO.8构成的轻链可变区CDR2和(f)由氨基酸序列SEQ ID NO.9构成的轻链可变区CDR3。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其重链可变区由SEQ ID NO:4或5构成,并且其轻链可变区由SEQ ID NO:10或11构成。

3. 一种与OX40结合的分离的抗体,其包含(a)由氨基酸序列SEQ ID NO:13构成的重链可变区CDR1;(b)由氨基酸序列SEQ ID NO:14构成的重链可变区CDR2;(c)由氨基酸序列SEQ ID NO.15构成的重链可变区CDR3;(d)由氨基酸序列SEQ ID NO.19构成的轻链可变区CDR1;(e)由氨基酸序列SEQ ID NO.20构成的轻链可变区CDR2和(f)由氨基酸序列SEQ ID NO.21构成的轻链可变区CDR3。

4. 根据权利要求3所述的分离的抗体,其重链可变区由SEQ ID NO:16或17的序列构成,并且其轻链可变区由SEQ ID NO:22或23的序列构成。

5. 一种与OX40结合的分离的抗体,其包含由SEQ ID NO.5的氨基酸序列构成的重链可变区和由SEQ ID No.11的氨基酸序列构成的轻链可变区。

6. 编码如权利要求1至5中任一项所述的抗体的分离的核酸。

7. 一种宿主细胞,其包含编码如权利要求1至5中任一项所述的抗体的核酸。

8. 一种生产抗体的步骤,其包含培养如权利要求7所述的宿主细胞的步骤。

9. 如权利要求8所述的方法,其进一步包含从所述宿主细胞回收所述抗体的步骤。

10. 如权利要求1至5中任一项所述的抗体在药物制备中的用途,其中所述药物用于治疗癌症。

抗OX40抗体和使用其的方法

技术领域

[0001] 本发明通常涉及OX40受体活化的调节,以及更具体地,涉及调节OX40受体以抑制产生白介素10(IL-10)的CD4⁺型调节性T细胞(“Tr1细胞”)和表达Foxp3⁺的调节性T细胞(本文中有时也称为“Foxp3⁺T-reg”细胞)的免疫抑制功能以及从CD4⁺细胞或初始细胞产生Tr1细胞和IL-10生产。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2010年8月23号提交的美国专利申请序列第61/375,999号和2010年9月8日提交的美国专利申请序列第61/380,827号的优先权。这两个申请通过引用并入本文。

[0004] 关于联邦政府资助的研究或研发的声明

[0005] 本申请在美国国立卫生研究院授予的R01 AI061645-01、R01 AI062888-01和U19 AI071130-01的政府支持下进行。政府在本发明中享有一定的权利。

[0006] 联合研究协议参与方的名称

[0007] 无。

[0008] 对序列表的引用

[0009] 本发明内容包括作为于2011年8月23号生成的名为sequence_listing.txt的根据37C.F.R. §1.52(e)(v)的文本文档提交的序列表,具有13,836字节大小,其通过引用并入本文。所附的序列描述和序列表符合如37C.F.R. §§1.821-1.825中所阐述的适用于专利申请中核苷酸和/或氨基酸序列公开的法则。序列表包含如符合Nucleic Acids Res.13:3021-3030(1985)和the Biochemical J.219(No.2):345-373(1984)中描述的IUPAC-IUBMB标准所定义的用于核苷酸序列字符的单字母代码和用于氨基酸的三字母代码。用于核苷酸和氨基酸序列信息的符号和格式符合37C.F.R. §1.822中阐述的法则。

背景技术

[0010] Tr1细胞在外周耐受中具有关键作用。Tr1细胞在于炎症免疫响应期间将组织损伤限制于宿主中特别重要。Tr1细胞的产生伴随体内和体外TH1和TH2免疫响应。

[0011] Tr1细胞在抗原驱动的T细胞免疫响应期间从初始CD4⁺T细胞生成。Tr1在对经由TCR、CD28和IL-2受体的信号传导的响应中是无变应性的并且具有抑制抗原驱动的初始CD4⁺T细胞体内和体外增殖的能力。Tr1细胞具有抑制自身免疫疾病的发展并限制对微生物病原体的免疫响应的等级的能力。

[0012] 尽管已经研究了导致Tr1细胞的分子信号,但关于反向调节这些细胞生成的分子信号所知甚少。尽管免疫抑制药物、细胞活素类、共刺激分子和DC已经牵涉于Tr1细胞的诱导中,但反向调节Tr1细胞的信号仍然是难以捉摸的。

发明内容

[0013] OX40受体的活化阻断Tr1从初始或记忆CD4⁺T细胞产生以及IL-10从Tr1细胞生成和Tr1细胞的免疫抑制功能。OX40受体的活化还阻断IL-10经由Foxp3⁺T-reg细胞产生和免

疫抑制功能。像这样,本文给出的是与OX40受体结合的激动剂抗体,由此所述激动剂调节OX40受体的活化以阻断IL-10细胞因子分泌和/或Tr1和Foxp3⁺T-reg细胞全部免疫抑制功能。基本上,抗体可模拟OX40配体并且触发Tr1和/或初始T调节性细胞(“nTreg”),也称为“Foxp3⁺T-reg”,上的OX40受体。

[0014] 如我们在共同未决专利申请美国序列第11/659,266和12/861,135号中所示,OX40L抑制由免疫抑制药物地塞米松和维他命D3诱导的产生IL-10的Tr1细胞从初始和记忆CD4⁺T细胞的生成和功能。我们发现OX40L抑制产生IL-10的调节性T细胞的生成和功能。这些发现证实经由OX40L的信号传导OX40L抑制培养中产生人类IL-10的免疫抑制T细胞的产生。OX40L的这一独有的功能未被两个另外的共刺激TNF家族成员,GITR-配体和4-1BB-配体,所共有。OX40L还强烈抑制由可诱导的共刺激配体和成熟DC提供的两种生理刺激诱导的产生IL-10的Tr1细胞的产生和功能。经由单克隆抗体、小分子或者经由OX40L或与其具有至少90百分比同源性的蛋白信号传导人类T细胞上的OX40受体调节和控制产生IL-10的免疫抑制T细胞的产生和功能。

[0015] 所述发现带来多个治疗应用。例如,激动型抗体、小分子或OX40L可被用于抑制产生IL-10的免疫抑制T细胞的产生和功能并因此可被用于增强免疫响应以治疗癌症和传染病或者作为癌症疫苗的佐剂。OX40或OX40L的拮抗型抗体或拮抗型小分子可备用增强产生IL-10的免疫抑制T细胞的产生和功能并因此可被用于自身免疫性疾病和移植物抗宿主疾病的治疗。我们的发现还为用于癌症或可选择地自身免疫性疾病和移植物抗宿主疾病的治疗上文开发提供筛选活化T细胞上OX40受体(或反向阻断OX40信号传导)的抗体或小分子的高通量方法。

[0016] 本文提供结合人OX40受体的单克隆抗体和人抗体(本文有时称为“抗OX40抗体”和/或其另外的变化形式)。这些抗体被用于治疗或预防其病理涉及OX40的急性或慢性疾病或病况。在一个方面,描述了与人OX40结合并作为癌症治疗或抗自身免疫疾病治疗有效的分离的人抗体或其抗原结合片段。本文公开的抗OX40抗体中的任一个可被用作药物。抗OX40抗体中的任一个或多个可被用于治疗本文描述的多种癌症或自身免疫疾病中的一种或多种。

[0017] 本文提供结合OX40的分离的人源化抗体。本文描述的分离的抗体与OX40结合并且可与来自下列基因编码的OX40结合:NCBI登录号NP_003317、Genpept登录号P23510或与其具有90百分比同源性的基因。本文提供的分离的抗体还与具有下列GenBank登录号中的一个的OX40受体结合:AAB39944、CAE11757或AAI05071。

[0018] 如本文教导的,示例性的是与OX40结合的分离的抗体,其包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的重链可变区CDR1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的重链可变区CDR2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的重链可变区CDR3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的轻链可变区CDR1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的轻链可变区CDR2;和(f)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的轻链可变区CDR3。

[0019] 而且,另一个实例是与OX40结合的分离的抗体,其包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的重链可变区CDR1;(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的重链可变区CDR2;(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的重链可变区CDR3;(d)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的轻链可变区CDR1;(e)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的轻链可变区CDR2;和(f)包含氨基酸序列

SEQ ID NO.21的轻链可变区CDR3。

[0020] 可选择地,分离的抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或13的重链可变区CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:2或14的重链可变区CDR2和/或包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或15的重链可变区CDR3,或与其具有90百分比同源性的重链可变区CDR。

[0021] 此外,分离的抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:7或19的轻链可变区CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:8或20的轻链可变区CDR2和/或包含氨基酸序列SEQ ID NO:9或21的轻链可变区CDR3或与其具有90百分比同源性的重链可变区。

[0022] 所述分离的抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:10、11、22或23或者与氨基酸序列SEQ ID NO:10、11、22或23具有90百分比同源性的氨基酸序列的轻链可变区(“VL”)。所述分离的抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:4、5、16和17或者与氨基酸序列SEQ ID NO:4、5、16和17具有90百分比同源性的氨基酸序列的重链可变区(“VH”)。像这样,作为一个实例,分离的抗体可包含SEQ ID NO:5的可变重链序列和SEQ ID NO:11的可变轻链序列或与其具有90百分比同源性的序列。相似地,分离的抗体可具有SEQ ID NO:17的可变重链序列和SEQ ID NO:23的可变轻链序列或与其具有90百分比同源性的序列。

[0023] 所述分离的抗体可具有由核酸序列SEQ ID NO:12或24或与核酸序列SEQ ID NO:12或24具有90百分比同一性的核酸序列编码的可变轻链。所述分离的抗体可具有由核酸序列SEQ ID NO:6或18或与核酸序列SEQ ID NO:6或18具有90百分比同一性的核酸序列编码的可变重链。

[0024] 本文还提供单克隆抗体。所述单克隆抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:10或22或与氨基酸序列SEQ ID NO:10或22的氨基酸序列具有至少90百分比的氨基酸序列的可变轻链。本文还提供具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:4或16或与氨基酸序列SEQ ID NO:4或16具有至少90百分比的氨基酸序列的可变重链的单克隆抗体。

[0025] 本文还提供编码本文教导的抗OX40抗体中的任一种的分离的核酸。本文还提供的是宿主细胞,其每个包含编码本文描述的抗OX40抗体中的任一种的分离的核酸。进一步提供生产抗体(例如包含编码本文描述的抗OX40抗体中的任一种的分离的核酸的宿主细胞)的方法,其包括培养所述宿主细胞以便生产抗体和/或从所述宿主细胞回收所述抗体。

附图说明

[0026] 上文简要概括的本发明的更具体的描述可通过参照在形成本说明书一部分的附图中说明的其实施方案来完成,因此上文列举的本发明的特征、方面和优点以及其他将变得清楚的方式获得并被更详细地理解,。然而应注意的是附图说明本发明的某些实施方案但并不因此被认为限制本发明的范围,因为本发明可允许其他相当的有效实施方案。

[0027] 图1显示浸润人类滤泡性淋巴瘤(FL)组织并与肿瘤B细胞和单核细胞共定位的FOXP3⁺Treg。左边:FOXP3⁺Treg(红色)和CD20⁺B淋巴瘤细胞(绿色)的双重免疫染色;右边:FOXP3⁺Treg(红色)和CD11c⁺单核细胞/巨噬细胞/DC(绿色)。

[0028] 图2A和2B患有FL的患者中增加数目的CD4⁺FOXP3⁺Treg。从处于治疗前的初次诊断的六个患有FL的患者获得肿瘤细胞和PBMC。还从六个正常供体获得PBMC用于比较。调节性T细胞占全部CD4⁺T细胞的百分比通过CD4⁺CD25⁺CD127^低FOXP3⁺Treg的流式细胞计数分析来确定。图2A显示Treg的代表性FACS分析。FL PBMC和FL肿瘤细胞来源于相同的患者。图2B显示

所有供体的Treg百分比。单划线表示平均值。

[0029] 图3显示从FL分离ICOS⁺FOXP3⁺或ICOS⁻FOXP3⁺Treg。从未进行任何治疗的脾样本获得单细胞悬浮液。在测定当天将细胞解冻。将富集的CD4⁺CD8⁻CD14⁻CD16⁻CD56⁻CD11c⁻TCR γ δ ⁻T细胞分为CD25^低和CD25^高亚类。将CD4⁺CD25^高FOXP3⁺Treg根据ICOS的表面表达进一步分选为ICOS^高和ICOS^低亚类。在所有亚类中确定FOXP3的细胞内表达。

[0030] 图4显示瘤内Treg抑制FL中浸润CD4⁺CD25⁻T细胞的增殖并且所述抑制可被抗IL-10中和抗体部分阻断。用通过重组CD40L预活化的自体肿瘤细胞在自体ICOS⁺FOXP3⁺Treg或ICOS⁻FOXP3⁺Treg或抗IL-10(10 μ g/ml)存在或不存在的条件下培养浸润CFSE标记的CD4⁺CD25⁻肿瘤的T细胞。培养72小时后,通过CFSE稀释法的流式细胞计数分析确定CD4⁺CD25⁻细胞的增殖。

[0031] 图5A显示根据本发明的方法的实施方案如流式细胞计数所确定的初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0032] 图5B显示根据本发明的方法的实施方案如ELISA所确定的初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生。

[0033] 图5C显示通过根据本发明的方法的实施方案的如[³H]胸腺嘧啶核苷掺入所确定的生产IL-10的Tr1细胞的抑制功能。

[0034] 图6A显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数所确定的记忆CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0035] 图6B显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的记忆CD4⁺T细胞的IL-10产生。

[0036] 图7A显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数所确定的初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0037] 图7B显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的初始CD4⁺T细胞的IL-10产生。

[0038] 图7C显示根据本发明的方法的实施方案计数的可见T细胞的数目。

[0039] 图8A显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数所确定的初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0040] 图8B显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的初始CD4⁺T细胞的IL-10产生。

[0041] 图8C显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数所确定的记忆CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0042] 图8D显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的记忆CD4⁺T细胞的IL-10产生。

[0043] 图8E显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数所确定的初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。

[0044] 图8F显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的初始CD4⁺T细胞的IL-10产生。

[0045] 图9显示根据本发明的方法的实施方案的如ELISA所确定的调节性T细胞的IL-10产生。

[0046] 图10显示如ELISA所确定的抗L-OX40的抗人类OX40杂交瘤上清液对比L亲本细胞的筛选结果。

[0047] 图11显示根据本发明的方法的实施方案的如流式细胞计数分析所确定的人OX40特异性单克隆抗体的筛选。

[0048] 图12显示使用根据本发明的方法的实施方案的使用表达OX40的SUPM2细胞(SUPM2-OX40)确认抗hOX40单克隆抗体特异性。

[0049] 图13由显示根据本发明的方法的实施方案的可抑制从vit D₃(0.1μM)/Dex(50nm)、CD32L/ICOSL和抗CD3/CD28(0.2μg/ml)的刺激CD4⁺T细胞生成产生IL-10的细胞(Tr1)的OX40特异性单克隆抗体。代表性的荧光活化细胞分选(FACS)数据示于A而产生IL-10的细胞占OX40单克隆抗体处理的百分比示于B中。

[0050] 图14显示根据本发明的方法的实施方案的抑制Tr1细胞生成同时刺激CD4⁺T细胞增殖的hOX40特异性单克隆抗体的结果。

[0051] 图15A、15B和15C详述根据本发明的方法的实施方案的对OX40单克隆抗体抑制Tr1细胞从CD4⁺T细胞生成的能力的滴定。代表性的FACS数据示于图15A而用九种OX40单克隆抗体处理后Tr1细胞的百分比示于图15B。

[0052] 图16A、16B和16C显示抑制从CD4⁺T细胞生成产生IL-10的Tr1细胞还抑制ICOS⁺CD4⁺CD25^高CD127⁻Treg的IL-10生产和免疫抑制功能的OX40特异性单克隆抗体。将新鲜分选的ICOS⁺CD4⁺CD25^高CD127⁻Treg(COS⁺Treg)用抗CD3(0.2μg/ml)在CD32L/ICOSL细胞和CD32L/OX40L细胞(图16A)或OX40单克隆抗体或对照抗体(图16B)存在的情况下刺激5天。之后将细胞用抗CD3/CD28再刺激24小时并且通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定上清液的IL-10。图16是基于单核细胞的增殖测定,显示抗体中的两种阻断ICOS⁺Treg功能。

[0053] 图17A和17B显示根据本发明的方法的实施方案的抑制Tr1细胞生成并且阻断FOXP3⁺CD4⁺CD25^高Treg功能的抗hOX40单克隆抗体的鉴定,代表性的流式细胞计数分析示于图17A。六种单克隆抗体的数据示于图17B。

[0054] 图18证实根据本发明的方法的实施方案的不抑制Tr1细胞生成但阻断FOXP3⁺CD4⁺CD25^高Treg功能的抗hOX40单克隆抗体的鉴定。

[0055] 图19A和19B显示根据本发明的方法的实施方案的阻断淋巴瘤来源的CD4⁺CD25^高Treg功能的抗hOX40激动型抗体。代表性的FACS分析示于图19A中而所有实验的数据示于图19B中。

[0056] 图20显示抗hOX40单克隆抗体可结合猕猴CD4⁺T细胞。如所示的,抗hOX40mAb中的六种可结合猕猴活化的CD4⁺T细胞并与猕猴OX40结合并活化OX40信号传导。

[0057] 图21显示实施例1中的Hu106-222批次I和II抗体中的每一种由具有约50kD分子量的重链和约25kD分子量的轻链组成。Hu106-222批次I和II抗体的纯度显示高于95%。

[0058] 图22显示小鼠106-122、Ch106和Hu106-222(批次II)抗体结合L/OX40细胞的分析(实施例I)。

[0059] 图23描绘Hu106 IgG1/κ抗体的表达载体(Expression Vector)的图示结构。从顶部的SalI位点顺时针前进,质粒含有从人巨细胞病毒(CMV)主要立即早期启动子和增强子(CMV启动子)开始的重链转录单元以起始抗体重链基因的转录。CMV启动子之后是VH外显子、含有包括CH1、铰链区、CH2和CH3外显子以及插入的内含子的人γ-1重链恒定区的基因

组序列以及CH3外显子之后的多腺苷酸化位点。重链基因序列之后,轻链转录单元从CMV启动子开始,之后是VL外显子和内含有 κ 链恒定区外显子(CL)以及在其前面的部分内含子的基因组序列以及CL外显子之后的多腺苷酸化位点。轻链基因之后是SV40早期启动子(SV40启动子),大肠杆菌(*E.coli*)黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(*gpt*)和含有SV40多腺苷酸化位点的片段(SV40 poly(A)位点)。最后,质粒含有质粒pUC19的一部分,包含细菌的复制起点(pUC ori)和 β 内酰胺酶基因(β 内酰胺酶)。相关限制性内切酶位点示于图中。

[0060] 图24显示Hu 106-222批次I和II抗体之间结合L/OX40细胞的对比(下文实施例I)。

[0061] 图25显示Hu119-122由具有约50kD分子量的重链和具有约25kD分子量的轻链组成。Hu119的纯度显示高于95%(下文实施例II)。

[0062] 图26显示本文描述的Ch119-122和Hu119-122抗体的FACS分析的结果(下文实施例II)。

[0063] 图27显示人源化抗人OX40 mAb克隆119-122(Hu119)及其结合FcR的突变抗体(Hu119-AA)增强初始CD4⁺T细胞增殖。与亲本小鼠抗人OX40mAb(小鼠119-122)相比Hu119-122产生较好的T细胞刺激活性。然而,嵌合的抗人OX40mAb(Ch119,小鼠VH和VL但是人 γ -1和 κ 恒定区)未能增强T细胞增殖。

[0064] 图28显示结合FcR的突变人源化抗人OX40mAb克隆106-222(Hu222AA)和嵌合的抗人OX40mAb克隆106-222(Ch222)增强抗CD3刺激的初始CD4⁺T细胞增殖。这些抗体与亲本小鼠抗人OX40mAb(小鼠222)相比具有相似的刺激活性。然而,完整的人源化抗人OX40 Ab, Hu222,与人IgG1相比未增强T细胞增殖。

[0065] 图29A和B显示人源化的和小鼠抗人OX40mAb克隆119-122阻断CD4⁺Treg抑制性功能。

[0066] 图30提供数据显示抗人OX40抗体增强CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖,使用板结合抗体。

[0067] 图31显示人源化和小鼠抗人OX40抗体需要交联以便增强T细胞增殖。

[0068] 图32显示抗人OX40抗体阻断CD4⁺FOXP3⁺nTreg的活性,使用板结合抗体。

[0069] 图33显示高浓度的小鼠抗人OX40抗体优先杀死FOXP3⁺Treg。

[0070] 图34显示小鼠抗人OX40mAb直接作用于效应子T细胞或nTreg以阻断Treg的抑制性功能。

[0071] 图35A、35B和35C显示小鼠中用hOX40⁺CD8⁺T细胞转移的抗hOX40mAb肿瘤处理的结果。抗人OX40mAb促进体内T细胞扩展和存活。治疗性疫苗接种时间表示于图35A。体内代表性生物发光图片示于图35B。抗体肿瘤处理的结果示于图35C。

[0072] 图36显示106-222、人源化106-222(Hu106)以及人类受体X61012(GenBank登录号)VH序列的氨基酸序列的比对被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。序列上的数字表示根据Kabat et al.(Sequences of Proteins of Immunological Interests,Fifth edition,NIH Publication No.91-3242,U.S.Department of Health and Human Services,1991)的定位。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而位点编号可能不同。在图36中,由Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是106-222VH中下划线的。X61012 VH中CDR残基在图中被省略。在GenBank数据库中搜索与106-222VH框架同源的人VH序列并将由人X61012 cDNA(X61012VH)编码的VH序列选作人源化接受体。106-222VH的CDR序列首先被转移至X61012VH的相应位点。之后在106-222可变区的三维模型显示与CDR明显接触的框架

位点上,小鼠106-222 VH的氨基酸残基取代为相应的人残基。这些取代在位点46和94进行(Hu106 VH中下划线的)。此外,发现在相应的V区亚组中不典型的人框架残基被最典型的残基取代以减少可能的免疫原性。这一取代在位点105进行(Hu106 VH中双下划线的)。

[0073] 图37显示106-222、人源化106-222(Hu106)以及人接受体AJ388641(GenBank登录号)VL序列的氨基酸序列的比对被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。序列上的数字表示根据Kabat et al.(1991)的定位。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而位点编号可能不同。由Kabat et al.(1)定义的CDR序列是106-222VH中下划线的。AJ388641 VL中CDR残基在图中被省略。在GenBank数据库中搜索与106-222 VL框架同源的人VL序列并将由人AJ388641 cDNA(AJ388641 VL)编码的VL序列选作人源化接受体。106-222 VL的CDR序列被转移至AJ388641 VL的相应位点。在人源化形式中不进行框架取代。

[0074] 图38显示两侧为SpeI和HindIII位点(下划线的)的Hu106 VH基因的核苷酸序列与推导出的氨基酸序列一起被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。信号肽序列为斜体。成熟VH的N端氨基酸残基(Q)是双划线的。根据Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是下划线的。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而序列表中的位点编号可能不同。内含子序列为斜体。用SpeI和HindIII消化的Hu106 VH基因片段被克隆至图23所示的表达载体中的相应位点之间。

[0075] 图39显示两侧为NheI和EcoRI位点(下划线的)的Hu106 VH基因的核苷酸序列与推导出的氨基酸序列一起被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。信号肽序列为斜体。成熟VL的N端氨基酸残基(D)是双划线的。根据Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是下划线的。内含子序列为斜体。用NheI和EcoRI消化的Hu106VL基因片段被克隆至图23所示的表达载体中的相应位点之间。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而序列表中位点编号可能不同。

[0076] 图40显示119-122、人源化119-122(Hu119)和人接受体Z14189(GenBank登录号)VH序列的氨基酸序列的比对被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。序列上的数字表示根据Kabat et al.(Sequences of Proteins of Immunological Interests,Fifth edition, NIH Publication No.91-3242,U.S.Department of Health and Human Services,1991)的定位。由Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是119-122VH中下划线的。Z14189 VH中CDR残基在图中被省略。在GenBank数据库中搜索与119-122 VH框架同源的人VH序列并将由人Z14189 cDNA(Z14189VH)编码的VH序列选作人源化接受体。119-122 VH的CDR序列首先被转移至Z14189 VH的相应位点。之后在119-122可变区的三维模型显示与CDR明显接触的框架位点上,小鼠119-122 VH的氨基酸残基取代为相应的人残基。这些取代在位点26、27、28、30和47进行(Hu119 VH中下划线的)。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而序列表中位点编号可能不同。

[0077] 图41显示119-122、人源化119-122(Hu119)和人类接受体M29469(GenBank登录号)VL序列的氨基酸序列的比对被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。序列上的数字表示根据Kabat et al.(1991)定位。由Kabat et al.(1)定义的CDR序列是119-122 VH中下划线的。M29469 VL中CDR残基在序列中被省略。在GenBank数据库中搜索与119-122 VL框架同源的人VL序列并将由人M29469 cDNA(M29469 VL)编码的VL序列选作人源化接受体。119-122 VL的CDR序列被转移至M29469 VL的相应位点。在人源化形式中不进行框架取代。本文要求

的相同序列同样提供于序列表中而序列表中位点编号可能不同。

[0078] 图42显示两侧为SpeI和HindIII位点(下划线的)的Hu119 VH基因的核苷酸序列与推导出的氨基酸序列一起被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。信号肽序列为斜体。成熟VH的N端氨基酸残基(E)是双划线的。根据Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是下划线的。内含子序列为斜体。用SpeI和HindIII消化的Hu119 VH基因片段被克隆至图23所示的表达载体中的相应位点之间。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而序列表中位点编号可能不同。

[0079] 图43显示两侧为NheI和EcoRI位点(下划线的)的Hu119 VL基因的核苷酸序列与推导出的氨基酸序列一起被显示。氨基酸序列以单字母规则显示。信号肽序列为斜体。成熟VL的N端氨基酸残基(E)是双划线的。根据Kabat et al.(1991)定义的CDR序列是下划线的。内含子序列为斜体。用NheI和EcoRI消化的Hu119VL基因片段被克隆至图23所示的表达载体中的相应位点之间。本文要求的相同序列同样提供于序列表中而序列表中位点编号可能不同。

具体实施方式

[0080] 术语“抗体”包括四个多肽链,通过二硫键内部连接的两个重链(H)和两个轻链(L),组成的免疫球蛋白分子。每个重链由重链可变区(本文简称为HCVR或VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。轻链由轻链可变区(本文简称为LCVR或VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可进一步分为超变区(称为互补决定区(CDR)),其间散布更保守的区(称为构架区(FR))。各VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端至羧基末端的排列顺序如下:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0081] 术语抗体的“抗原结合部分”(或“抗体部分”)包括保持特异性结合抗原(例如hOX40)能力的抗体片段。曾经证实抗体的抗原结合功能可由全长抗体片段完成。属于术语抗体的“抗原结合部分”的结合片段实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的一价片段;(ii)F(ab')₂片段,包括通过铰链区的二硫键连接的2个Fab片段的二价片段;(iii)VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)抗体单臂VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)VH结构域构成的dAb片段(Ward et al.,(1989)Nature 341:544-546);以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的2个结构域VL和VH由独立的基因编码,但是它们可利用重组方法以合成连接体连接在一起,合成连接体使它们能够被制成其中VL和VH区成对形成一价分子的单一蛋白链(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al.(1988)Science 242:423-426;和Huston et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这种单链抗体也预期包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。也包括其他形式的单链抗体例如双体。双体是双价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域表达在单一多肽链上,但是采用太短而不能允许同一链上的所述两个结构域成对的连接体,由此迫使所述结构域与另一条链的互补结构域成对,而产生2个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.,et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure 2:1121-1123)。进而,抗体或其抗原结合部分可以成为所述抗体或其抗原结合部分与一个或多个其他蛋白或肽通过共价或非共价结合形成的更大免疫粘附分子的一部分。这样的免疫粘附分子的实例包括利用链霉抗生物素蛋白核心区制成四聚scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies

and Hybridomas 6:93-101) 以及利用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标记制成双价生物素化scFv分子(Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。可采用常规技术例如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体, 由完整抗体制备诸如Fab和F(ab')₂片段的抗体部分。而且如本文所述, 可采用标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子。优选的抗原结合部分是完整结构域或成对的完整结构域。

[0082] OX40/OX40-配体(OX40受体)/(OX40L) 是对于T细胞增殖、存活、细胞因子产生和记忆细胞生成来说很关键的一对共刺激分子。在体外实验中早就证实经由CD4⁺T细胞上的OX40的信号传导导致TH2发育但不导致TH1发育。这些结果得到体内研究的支持, 其显示阻断OX40/OX40L相互作用防止TH2介导的变态免疫相应的诱导和维持。然而, 阻断OX40/OX40L相互作用改善或防止TH1介导的疾病。而且, 施用溶解的OX40L或将OX40L转基因至肿瘤中显示显著增强小鼠中的抗肿瘤免疫性。最近的研究也显示OX40/OX40L可在促进CD8T细胞介导的免疫响应中起作用。如本文所讨论的, OX40信号传导阻断CD4⁺CD25⁺天然存在的调节性T细胞的抑制性功能并且OX40/OX40L对在外周免疫性对比耐受性的整体调控上起到关键作用。

[0083] 术语“Kabat编号”、“Kabat定义”和“Kabat标记”在本文中可互换使用。本领域公知的这些术语是指将比抗体或其抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区的其他氨基酸残基更易变(即超变)的氨基酸残基编号的系统(Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391和Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

[0084] 术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体, 例如利用转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体(在以下部分II中进一步介绍)、从重组组合人抗体文库分离的抗体(在以下部分III中进一步介绍)、从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如(Taylor, L.D.等(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或者涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接为其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有人种系免疫球蛋白序列来源的可变区和恒定区(参见Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

[0085] “分离的抗体”包括基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如基本不含特异性结合非hOX40抗原的抗体的特异性结合hOX40的分离抗体)。特异性结合hOX40的分离抗体可结合其他物种的OX40分子。此外, 分离抗体可基本不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0086] 术语“活性”包括各种活性, 例如抗体对抗原的结合特异性/亲和性例如结合OX40抗原的抗人OX40抗体和/或抗体的活化效价例如其与hOX40受体的结合活化hOX40的生物活性的抗OX40抗体或人L/OX40细胞测定中结合的受体的活化。

[0087] 本文使用的术语“K_{off}”预期是指抗体从抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。本文使用的术语“K_d”预期是指特定抗体抗原相互作用的解离常数。

[0088] 术语“表面等离子体共振”包括允许例如采用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)通过检测生物传感器基质中的蛋白浓度改变而

分析实时生物特异性作用的光学现象。关于其进一步的介绍参见实施例5和Jonsson,U.,et al.(1993)Ann.Biol.Clin.51:19-26;Jonsson,U.,et al.(1991)Biotechniques 11:620-627;Johnsson,B.,et al.(1995)J.Mol.Recognit.8:125-131和Johnnson,B.,et al.(1991)Anal.Biochem.198:268-277。

[0089] 术语“载体”包括能够转运与其连接的另一个核酸分子的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，质粒是另外的DNA节段可连接入其中的环形双链DNA环。另一类载体是病毒载体，其中另外的DNA节段可连接入病毒基因组中。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞时整合入宿主细胞的基因组中，由此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够控制与其可操做地连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或者简称为“表达载体”)。一般来说，重组DNA技术中表达载体的应用通常为质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可交互使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，本发明预期包括这些其他形式的表达载体，例如具有同等功能的病毒载体(例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0090] 术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)包括重组表达载体已经引入其中的细胞。应当理解的是这些术语不仅指特定对象的细胞，而且也指这种细胞的子代细胞。因为突变或环境的影响连续传代时可能发生某些改变，所以这样的子代细胞可能事实上与亲代细胞不完全相同，但是仍然包括在本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0091] 术语“单克隆抗体”(单克隆抗体)是指从基本上同源的抗体的群获得的抗体或类似抗体的群并且不被解释为需要通过任何特殊的方法生产抗体，包括但不限于，单克隆抗体可通过由Kohler和Milstein(Nature,256:495-497,1975)最初描述的杂交瘤方法或通过重组DNA方法制得。

[0092] 术语“嵌合抗体”(或“嵌合的免疫球蛋白”)是指包含与来源于特定物种或属于特定抗体类型或亚型的抗体中的相应序列相同或同源的重链和/或轻链而所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类型或亚型的抗体中的相应片段相同或同源的分子以及这些抗体的片段，条件是它们表现出所期望的生物学活性(Cabilly et al.(1984),*infra*;Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81:6851)。

[0093] 术语“人源化抗体”是指包含来自非人(例如，小鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。人源化抗体可包括不会显著改变其结合和/或生物学活性的保守氨基酸取代或来自相同或不同物种的非天然残基。这些抗体是包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于绝大部分来说，人源化抗体是人类免疫球蛋白(接受抗体)，其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基被来自具有所期望的性质的非人类物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊或兔的CDR的残基代替。而且人源化抗体可包含在接受抗体或引进的CDR中都不存在的残基或框架序列。可进行这些修饰以进一步将抗体表现精细化和最大化。因此，通常人源化抗体将包含至少一个以及在一个方面两个可变结构域的全部或基本上全部，其中超变环的全部或基本上全部相应于非人免疫球蛋白的那些而FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，通常为人免疫球蛋白的一部分。(参见例如Cabilly et al.,U.S.Pat.No.4,816,567;Cabilly et al.,European Patent No.0,125,023B1;Boss et al.,U.S.Pat.No.4,816,

397;Boss et al.,European Patent No.0,120,694B1;Neuberger,M.S.et al.,WO 86/01533;Neuberger,M.S.et al.,European Patent No.0,194,276 B1;Winter,U.S.Pat.No.5,225,539;Winter,European Patent No.0,239,400 B1;Padlan,E.A.et al.,European Patent Application No.0,519,596 A1;Queen et al.(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,Vol 86:10029-10033)。

[0094] 本文所描述和要求的抗体中的每一个可以是指,单数或复数形式,如:“抗OX40抗体;”“抗hOX40抗体;”“抗hOX40单克隆抗体;”“抗人OX40抗体;”“抗人OX40 mAb;”“抗hOX40 mAb”“hOX40特异性单克隆抗体;”“抗OX40L抗体;”“抗hOX40L抗体;”“抗人OX40L抗体;”“人OX40特异性抗体;”“人OX40特异性单克隆抗体;”“人OX40特异性抗体;”“抗人OX40特异性抗体;”“抗人OX40特异性单克隆抗体;”“h-OX40特异性抗体;”“h-OX40特异性单克隆抗体;”“hOX40agonistic抗体;”“hOX40拮抗剂”和/或其其他相似变体。

[0095] 如通过引用并入本文的美国专利申请第11/659,266号题目为“Methods to Treat Disease States by Influencing the signalling of OX-40-Receptors and High Throughput Screening Methods and Identifying Substrates Thereof”中所公开的,其公开了OX40L的功能是反向调节由免疫抑制剂Dex和vit D3、ICOSL或不成熟的DC所诱导的Tr1细胞的生成。这一发现证明OX40L增强免疫性并且打破免疫耐受性的一般机制。

[0096] 使用免疫组织学分析(图1)、细胞内染色(图2)和细胞分选(图3),我们已经显示产生ICOS⁺IL-10和产生COS-TGF-β⁻的Treg浸润人FL组织。这些FL来源的FOXP3⁺Treg可强烈抑制响应于CD40⁻配体预活化的自体淋巴瘤细胞的浸润FOXP3⁻CD4⁺CD25⁻肿瘤的T细胞的增殖(图4)。ICOS⁺Treg的抑制活性可被中和抗IL-10抗体部分阻断,证实FL中产生ICOS⁺IL-10的Treg的作用。在图2的实验中,肿瘤细胞和PBMC从具有治疗前的初始诊断的7个患者获得。也从7个健康供体获得PBMC用于比较。调节性T细胞占整个CD4⁺T细胞的百分比通过CD4⁺CD25⁺CD127^低FOXP3⁺Treg的流式细胞计数分析来确定。图2A提供Treg的代表性FACS分析而图2B显示所有供体的Treg的百分比。

[0097] 还发现的是OX40L抑制Dex和vit D3诱导的Tr1细胞从CD4⁺T细胞的生成。已知的是免疫抑制性药物Dex和vit D3的组合持续诱导初始CD4⁺T细胞分化为Tr1细胞。为了证实OX40L是否可抑制Tr1细胞的生成和功能,将初始CD4⁺T细胞与抗CD3以及抗CD28单克隆抗体在OX40L转染的L细胞存在或不存在的条件下在四种不同培养条件下培养7天,所述培养条件包括:Tr1(Dex和vit D3);(2)TH1(IL-12);(3)TH2(IL-4)或(4)中性的(仅培养基)(图5A)。通过细胞内细胞因子染色和ELISA分析经由已预处理的T细胞的IL-10产生。

[0098] 在图5A的实验中,通过细胞计数进行了初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将初始CD4⁺T细胞与抗CD3和抗CD28单克隆抗体在IL-2存在的条件下在亲本L细胞或OX40L-L细胞上与所显示的重组细胞因子或试剂一起培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制不同极化信号诱导的Tr1细胞从初始CD4⁺T细胞生成。如图5A中所示,在中性或TH1或TH2条件下培养的初始CD4⁺T细胞生成2%至4%的Tr1细胞。在采用Dex加上vit D3的培养中生成超过15%的Tr1细胞。在所有培养条件下,加入OX40L完全阻断Tr 1细胞的生成,而促进产生TNF-α的T细胞的生成。

[0099] 这些数据通过ELISA数据(图5B)证实。在图5B的实验中,通过ELISA测量用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后上清液中经由初始CD4⁺细胞的细胞因子生产。将初始CD4⁺

T细胞与抗CD3和抗CD28单克隆抗体在IL-2存在的情况下在亲本L细胞或OX40L-L细胞上与所指示的重组细胞因子或试剂一起培养7天。将数据显示为平均值±四个独立实验的平均值(SEM)的标准误差。结果显示OX40L抑制不同极化信号诱导的Tr1细胞从初始CD4⁺T细胞生成。

[0100] 用Tr1条件(Dex加上vit D3)预处理的初始CD4⁺T细胞是无变应性的并且具有抑制初始CD4⁺T细胞响应于抗CD3和抗CD28单克隆抗体的增殖的能力(图5C)。在图5C的实验中,通过[³H]胸腺嘧啶核苷掺入测量T细胞中的抑制性功能。所指示的T细胞群的混合物通过抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激。误差条代表三个孔的SEM。已经发现用相同的Tr1条件预处理的初始CD4⁺T细胞在OX40L存在的情况下强烈增殖并且未能抑制响应于抗CD3和抗CD28单克隆抗体的初始CD4⁺T细胞的增殖。数据显示OX40L阻断功能性Tr1细胞从Dex和vit D3诱导的初始CD4⁺T细胞生成。

[0101] 发现Tr1细胞可从记忆CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺T细胞生成而OX40L可抑制Tr1细胞从记忆CD4⁺T细胞生成。将记忆CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺T细胞与抗CD3加上抗CD28单克隆抗体在转染OX40L的L细胞Tr1条件(Dex加上vit D3)存在或不存在的条件下培养7天。在图6A的实验中,通过细胞计数进行了CD4⁺记忆T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将记忆CD4⁺CD45RO⁺CD25⁻记忆T细胞与抗CD3、抗CD28单克隆抗体和IL-2一起在亲本L细胞或OX40L-L细胞上在Dex加上vit D3存在或不存在的条件下培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制Dex加上vit D3条件下Tr1细胞从记忆CD4⁺T细胞生成。图6A显示大量的Tr1细胞(>20%)在采用Dex加上vit D3的培养中从CD4⁺记忆T细胞生成。加入OX40L完全阻断Tr1细胞的生成并且促进产生TNF-α的细胞从记忆CD4⁺T细胞生成。

[0102] 通过IL-10ELISA分析(图6B)证实了Dex加上vit D3促进从记忆CD4⁺T细胞产生IL-10的能力并且这一能力可被OX40L抑制。在图6B的实验中,通过ELISA在用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后测量上清液中经由记忆CD4⁺T细胞的IL-10产生。将数据显示为平均值±四个独立实验SEM。结果显示OX40L在采用Dex加上vit D3的条件下抑制Tr1细胞从记忆CD4⁺T细胞生成。

[0103] 还发现OX40L抑制Tr1细胞的生成而其他的TNF家族成员(GITR1和4-1BBL)并没有。在TNF超家族中,OX40L、糖皮质激素诱导的TNF受体-配体(GITR1)和4-1BB-配体(4-1BBL)具有对T细胞的共刺激功能。为了证实OX40L在Tr1细胞的抑制中是否是唯一的,将初始CD4⁺T细胞用抗CD3加上抗CD28单克隆抗体以及Dex加上vit D3与亲本L细胞或用OX40L、GITR1或4-1BBL转染的L细胞一起培养7天。尽管OX40L、GITR1和4-1BBL都促进产生TNF-α的细胞的生成,但仅OX40L抑制Tr1细胞的生成(图7A和7B)。

[0104] 在图7A的实验中,通过细胞计数进行了初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将初始CD4⁺T细胞与抗CD3、抗CD28单克隆抗体和IL-2一起在亲本L细胞、OX40L-L细胞、GITR1-L细胞或4-1BBL-L细胞上在Dex加上vit D3存在的情况下培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制Tr1细胞生成而GITR1和4-1BBL都不抑制。

[0105] 在图7B的实验中,通过ELISA在用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后测量上清液中初始CD4⁺细胞的IL-10。将数据显示为平均值±四个独立实验的SEM。所述结果显

示OX40L抑制Tr1细胞生成而GITR1和4-1BBL都不抑制。

[0106] OX40L、GITR1和4-1BBL都促进整体T细胞数目的扩张(图7C)。在图7C的实验中,将可见T细胞的数目计数。将数据显示为平均值±四个独立实验的SEM。

[0107] 如本领域技术人员所理解的,图7A、7B和7C的结果显示OX40L抑制Tr1细胞生成而GITR1和4-1BBL都不抑制。这些数据表明在已知共刺激T细胞的TNF超家族三个成员中,OX40L在抑制Tr1细胞生成上具有新的并且独特的功能。

[0108] 还发现OX40L抑制ICOSL或不成熟DC诱导的Tr1细胞生成。ICOS和CD28代表T细胞上表达的CD28家族的两个正向共刺激受体。通过激动型抗体或ICOSL的经由ICOS的信号传导已经显示促进CD4⁺T细胞产生IL-10。为了研究OX40L是否可抑制ICOS诱导经由CD4⁺T细胞的IL-10生产的能力,将初始和记忆CD4⁺T细胞与抗CD3一起在ICOSL转染的L细胞或ICOSL转染的L细胞存在的情况下在OX40L存在的情况下培养7天。

[0109] 在图8A的实验中,通过细胞计数进行了初始CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将初始CD4⁺T细胞在用抗CD3单克隆抗体预包被的亲本L细胞、ICOSL-L细胞和L细胞的混合物或ICOSL-L细胞和OX40L-L细胞的混合物上培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制ICOSL诱导的Tr1细胞从初始CD4⁺T细胞的生成。

[0110] 在图8B的实验中,通过ELISA测量在用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后上清液中初始CD4⁺细胞的IL-10产生。将初始CD4⁺T细胞在用抗CD3单克隆抗体预包被的亲本L细胞、ICOSL-L细胞和L细胞的混合物或ICOSL-L细胞和OX40L-L细胞的混合物上培养7天。将数据显示为平均值±三个独立实验的SEM。所述结果显示OX40L抑制ICOSL诱导的Tr1细胞从初始CD4⁺T细胞的生成。

[0111] 在图8C的实验中,通过细胞计数进行了记忆CD4⁺T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将记忆CD4⁺T细胞在用抗CD3单克隆抗体预包被的亲本L细胞、ICOSL-L细胞和L细胞的混合物或ICOSL-L细胞和OX40L-L细胞的混合物上培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制ICOSL诱导的Tr1细胞从记忆CD4⁺T细胞的生成。

[0112] 在图8D的实验中,通过ELISA测量在用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后上清液中记忆CD4⁺细胞的IL-10产生。将记忆CD4⁺T细胞在用抗CD3单克隆抗体预包被的亲本L细胞、ICOSL-L细胞和L细胞的混合物或ICOSL-L细胞和OX40L-L细胞的混合物上培养7天。将数据显示为平均值±三个独立实验的SEM。所述结果显示OX40L抑制ICOSL诱导的Tr1细胞从记忆CD4⁺T细胞的生成。

[0113] 图8A、8B、8C和8D的实验结果显示ICOSL显著促进Tr1细胞从初始和记忆CD4⁺T细胞的生成。加入OX40L完全抑制Tr1细胞从初始和记忆CD4⁺T细胞的生成而强烈促进生产TNF-α的细胞的生成。

[0114] 已知的是不成熟的DC或用IFN-α或IL-10处理的DC可诱导初始CD4⁺T细胞分化为Tr1细胞。已经研究OX40L是否可以抑制DC诱导的Tr1细胞的生成。如图8E中所示,不成熟的DC或用IFN-α或IL-10处理的DC都诱导来自初始CD4⁺T细胞的超过10%的Tr1细胞的生成。通过比较,由CD40L活化的DC诱导强烈的TH1响应,伴随着约3%Tr1细胞的生成。在DC-T细胞培养物中加入重组的OX40L完全抑制由不成熟的DC或用IFN-α或IL-10处理的DC诱导的Tr1细

胞的生成。此外,OX40L同样抑制由CD40L活化的成熟DC诱导的其余数目的Tr1细胞的生成。在图8E的实验中,通过细胞计数进行了CD4⁺初始T细胞的细胞因子产生的细胞内分析。将初始CD4⁺T细胞在可溶重组OX40L存在或不存在的条件下与不成熟的DC或用IFN- α 、IL-10和CD40L培养的DC一起培养7天。在每个点印迹概况中指示各个产生细胞因子的T细胞的百分比。所述结果显示OX40L抑制DC诱导的Tr1细胞从CD4⁺T细胞的生成。

[0115] 通过ELISA数据(图8F)证实OX40L抑制DC诱导的Tr1细胞生成的能力。在图8F的实验中,通过ELISA在用抗CD3和抗CD28单克隆抗体再刺激24h之后测量上清液中经由初始CD4⁺细胞的IL-10生产。将初始CD4⁺T细胞在可溶重组OX40L存在或不存在的条件下与不成熟的DC或用IFN- α 、IL-10和CD40L培养的DC一起培养7天。将数据显示为平均值 $\pm$ 三个独立实验的SEM。所述结果显示OX40L抑制DC诱导的Tr1细胞从CD4⁺T细胞的生成。因此,这些数据证明OX40L可抑制ICOSL和DC提供的更多生理信号诱导的Tr1细胞生成。

[0116] 之前已经表明调节性T细胞在B细胞非霍奇金淋巴瘤的区域内高度表达并且该B细胞参与将调节性T细胞募集至淋巴瘤的区域中。研究了影响OX40受体的信号传导(例如通过OX40L)是否能够提供抗B细胞淋巴瘤的治疗。冷藏保存的来自B细胞淋巴瘤患者的样品被用于评估OX40L停止Tr1细胞的能力。所用的样品是从未受到任何治疗的脾样品获得的滤泡性淋巴瘤。将细胞解冻,400 $\times$ 10⁶冷冻细胞产生127 $\times$ 10⁶活细胞和33.9 $\times$ 10⁶死细胞(79%活力)。通过FACS染色确定足够数目的CD25⁺细胞。在图9的实验中,通过ELISA确定产生ICOS⁺IL-10的Treg的IL-10分泌。将Treg细胞在两种不同条件下培养。在条件1中,将CD25⁺/ICOS⁺细胞与抗CD3一起在IL-2(900 μ l/ml)存在的条件下在亲本L细胞或OX40L-L细胞上与抗ICOS抗体一起培养3-6天。在条件2中,将CD25⁺/ICOS⁺细胞与抗CD3在ICOS-L-L细胞或OX40L-L和ICOS-L-L细胞的混合物上的IL-2(900 μ l/ml)存在的条件下培养3-6天。通过ELISA测量上清液中的细胞因子生产。所述结果显示OX40L显著抑制Treg细胞的IL-10产生。

[0117] 如本领域技术人员应当理解的,OX40L具有抑制由免疫抑制性药物Dex加上vit D3、ICOSL,或DC诱导的Tr1细胞的生成和功能的能力的发现使得OX40L在不同形式的CD4-或CD8介导的免疫响应中促进免疫性并打破耐受性的新机制更受瞩目。OX40L在IL-12诱导的TH1或IL-4诱导的TH2响应期间抑制Tr1细胞生成的能力表明OX40L可控制TH1或TH2介导的免疫响应的等级。而且OX40L抑制Tr1细胞生成的能力似乎是OX40L的独有特性,因为其他两个TNF家族成员GITR1和4-1BBL不具有这一功能特性。而且,OX40L抑制经由Treg细胞的IL-10产生的能力将OX40L鉴定为对B细胞淋巴瘤和其他癌症的有力治疗。

[0118] 已经鉴定促进Tr1细胞生成的许多分子,包括IL-10、IFN- α 、ICOSL和免疫抑制化合物例如Dex加上vit D3。OX40L代表不仅从初始CD4⁺T细胞还有从记忆CD4⁺T细胞和调节性T细胞生成Tr1细胞的有力抑制剂。OX40/OX40L的这一新特性可解释最近的显示OX40信号传导允许无变应性的自体反应T细胞获得效应子细胞功能的报道。靶向OX40/OX40L因此为人类变应性和自身免疫疾病的提供了治疗并且也为人传染性疾病和癌症提供了对治疗的开发,所述癌症包括但不限于黑色素瘤,脑癌,骨癌,白血病,淋巴瘤,上皮细胞来源的瘤样病变(上皮癌)例如基底细胞癌,腺癌,胃肠道癌例如唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌,结肠癌,肝癌,膀胱癌,胰腺癌,卵巢癌,子宫颈癌,肺癌,乳腺癌和皮肤癌例如鳞状细胞和基底细胞癌,前列腺癌,肾细胞癌和其它已知的癌症。

[0119] 可通过本文描述的抗体和方法预防或治疗的疾病或病况包括癌症的预防或治疗,

所述癌症例如皮肤性T-细胞白血病、头部和颈部肿瘤、胰腺癌、膀胱癌、高级别胶质瘤、脑转移瘤、黑色素瘤、皮肤癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、白血病、骨髓增生异常综合征(前白血病病况)和多发性骨髓瘤。通常,任何癌症的转移都可用本文描述的化合物和方法预防或治疗。抗体也可被用于预防或治疗增生性血管生成病况,包括毛细血管扩张症、静脉血管瘤、成血管细胞瘤。其他病症、疾病或病况包括病毒疾病,其中的一些传统上被认为是“不可治疗的”。抗体例如也可被用于将单个病原体的株分类。研究人员可使用本文描述的抗体鉴定并追踪有机体中特定的细胞或分子。

[0120] 通常术语“癌症”和“癌的”是指或描述通常由不受调控的细胞生长所表征的哺乳动物中的生理学病况。更具体地,可使用本文描述的抗体中的任一种或多种或其变体治疗或预防的癌症包括但不限于癌(carcinoma),淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤和白血病。这些癌症的更具体的实例包括但不限于鳞状细胞癌,肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌),腹膜的癌,肝细胞癌,胃(gastric)癌或胃(stomach)癌(包括胃肠道癌和胃肠道间质癌),胰腺癌,胶质母细胞瘤,子宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝瘤,乳腺癌,结肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾脏癌,肝癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝癌(hepatic carcinoma)和各种类型的头部和颈部肿瘤,黑色素瘤,浅表扩散性黑色素瘤,恶性雀斑样痣黑色素瘤,肢端雀斑样痣黑色素瘤,结节性黑色素瘤以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中等级/滤泡性NHL;中等级弥漫性NHL;高等级免疫母细胞性NHL;高等级淋巴母细胞性NHL;高等级小无裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤和巨球蛋白血症),慢性淋巴细胞白血病(CLL)急性成淋巴细胞白血病(ALL),多毛细胞白血病,慢性粒细胞白血病和移植后淋巴组织增生症(PTLD)以及与癌症病有关的异常血管增生,水肿(例如与脑肿瘤相关)和梅格斯综合征。

[0121] 本文提供治疗或预防免疫病症的方法。这些方法包括向需要这些治疗的受治疗者施用有效量的所述抗体。在一些实施方案中,所述免疫病症是米那一病症或自身免疫病症。所述病症是哮喘,特应性皮炎,过敏性鼻炎,炎性肠病,多发性硬化症,GVHD和/或系统性红斑狼疮。在一些实施方案中,所述病症是与病毒、子君或其他感染剂有关的疾病。

[0122] 而且,本文描述的抗体和方法可被用于预防或治疗炎性疾病和病况例如骨关节炎、类风湿关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎和自身免疫疾病例如狼疮和混合自身免疫疾病。例如,本文描述的抗体可被用于治疗各种自身免疫疾病和炎性疾病,其包括向需要其的受治疗者施用治疗上有效的量的所述抗体的步骤,其中所述自身免疫疾病和炎性疾病是下列疾病中的任一种或多种:胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、糖尿病、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、急性播散性脑脊髓炎、关节炎、类风湿关节炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎、重症肌无力症、甲状腺炎、桥本病、原发性粘液水肿、甲状腺功能亢进、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、艾迪生病、过早绝经、男性不育症、青少年糖尿病、肺出血肾炎综合征、寻常型天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、晶状体源性葡萄膜炎、自身免疫性溶血性贫血、特发性白细胞减少、原发性胆汁性肝硬化、慢性活动性肝炎Hb_{s-ve}、隐源性肝硬化、溃疡性结肠炎、干燥综合征、硬皮病、韦格内氏肉芽肿、多/皮肌炎、盘状LE、系统性红斑狼疮、克隆氏病、牛皮癣、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、腹腔疾病、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征(GBS)、特发性血小板减少性紫癜、眼球阵挛肌阵挛综合征

(OMS)、视神经炎、Orl's thyroiditis、天疱疮、多关节炎、原发性胆汁性肝硬化、赖特综合征、多发性大动脉炎、颞动脉炎、温抗体型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿、普秃、白塞病、查加斯病、慢性疲劳综合征、家族性自主神经机能异常、子宫内膜异位症、化脓性汗腺炎、间质性膀胱炎、神经性肌强直、结节病、硬皮病、溃疡性结肠炎、白癜风、外阴痛、炎症性皮肤病、过敏性接触性皮炎、幽门螺杆菌(*H. pylori*)胃炎、慢性鼻腔炎性疾病、动脉粥样硬化和移植物抗宿主病。

[0123] 更特别地，“自身免疫疾病”如本文所用的是产生自并直接抗个体自身组织或器官的疾病或病症或其共分离或表现或从其产生的病况。自身免疫疾病可以指由具有对正常身体组织和抗原起反应的抗体的B细胞的产生导致或加重的病况。同样，自身免疫疾病是可引起对来自自身抗原(例如核抗原)的表位特异性的自身抗体分泌的疾病。

[0124] 可由本文描述的抗体中的任一种或多种治疗和/或预防的自身免疫疾病或病症包括但不限于关节炎(类风湿关节炎例如急性关节炎、慢性风湿性关节炎、痛风或痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、急性免疫性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、II型胶原诱导的关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、斯提耳病、椎关节炎和幼年发作类风湿关节炎、骨性关节炎、*arthritis chronica progrediente*、变形性关节炎、*polyarthritis chronica primaria*、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎性过度增生性皮肤病、银屑病例如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱型银屑病和指甲银屑病、特应性包括特应性疾病例如花粉热和乔布综合征、皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、剥脱性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎、钱币状皮炎、脂溢性皮炎、非特异性皮炎、原发刺激性接触性皮炎和特应性皮炎、x连锁高IgM血症、过敏性眼内炎性疾病、荨麻疹例如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹包括慢性自身免疫性荨麻疹、肌炎、多发性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括系统性硬皮病)、硬化症例如系统性硬化症、多发性硬化症(MS)(诸如脊髓-视觉MS、原发性进行性MS(PPMS)和硬化和复发缓解型MS(RRMS))、进行性系统性硬化症、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化症、共济失调硬化症、视神经脊髓炎(NMO)、炎性肠病(IBD)(例如克罗恩病、自身免疫介导的胃肠道疾病、大肠炎诸如溃疡性结肠炎(*ulcerative colitis*)、溃疡性结肠炎(*colitis ulcerosa*)、微小性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎以及和自身免疫性炎症性肠道疾病)、肠道炎症、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化性胆管炎、呼吸窘迫综合征包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、葡萄膜全部或部分炎症、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫性血液疾病、类风湿性脊柱炎、类风湿性滑膜炎、遗传性血管性水肿、脑神经损伤例如脑膜炎、妊娠疱疹、妊娠性类天疱疮、瘙痒症、自身免疫性卵巢功能早衰、由于自身免疫性病况的突发性听力损失、IgE介导的疾病例如过敏反应以及过敏性和特发性鼻炎、脑炎例如Rasmussen脑炎以及边缘和/或脑干脑炎、葡萄膜炎例如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎、具有和不具有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)例如慢性或急性肾小球肾炎诸如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜-或膜性增生性GN(MPGN)包括I型和II型和迅速进行性GN、增生性肾炎、自身免疫性多腺体内分泌衰竭、龟头炎包括浆细胞性局限性龟头炎、龟头包皮炎、心性环状红斑、持久性色素异常性红斑、*erythema multiform*、环状肉芽肿、光泽苔癣、硬化萎缩苔癣、单纯慢性

苔癣,小棘苔癣,扁平苔癣,层状鱼鳞病,表皮松解性角化过度,恶化前角化病,坏疽性脓皮病,变应性病况和反应,变应性反应,湿疹包括变应性或特发性湿疹、干性湿疹、汗疱和水泡性掌跖湿疹,哮喘例如哮喘支气管炎、支气管哮喘和自身免疫性哮喘,涉及T细胞浸润和慢性炎症响应的病症,针对外来抗原的免疫反应例如妊娠期间胎儿的ABO血型,慢性肺部炎症性疾病,自身免疫性心肌炎,白细胞粘附缺陷,狼疮包括狼疮性肾炎、狼疮性脑炎、小儿狼疮、非肾性狼疮、肾外狼疮、盘状狼疮和盘状红斑狼疮、脱发性狼疮、系统性红斑狼疮(SLE)例如表皮SLE或亚急性表皮SLE,新生儿狼疮综合征(NLE)和播散性红斑狼疮,幼年发病型糖尿病(I型)包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM),成人发病型糖尿病(类型II型糖尿病),自身免疫性糖尿病,特发性尿崩症,糖尿病性视网膜病,糖尿病性肾病,糖尿病性大动脉紊乱,细胞因子和T淋巴细胞介导的与急性和迟发性超敏感性相关的免疫反应,结核,结节病,肉芽肿包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳肉芽肿,粒细胞缺乏,血管炎包括脉管炎、大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu)动脉炎)、中等血管血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎/结节性动脉周围炎)、显微镜下多动脉炎、免疫血管炎、CNS血管炎、皮肤脉管炎、高敏感性脉管炎、坏死性血管炎例如系统性坏死性血管炎以及ANCA相关性血管炎例如C丘-施二氏血管炎或综合征(CSS)和ANCA相关性小血管血管炎,颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,Coombs阳性贫血,戴-布二氏贫血,溶血性贫血或免疫溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(anemia perniciosa),阿狄森氏病,纯红细胞性贫血或发育不良(PRCA),凝血因子VIII缺乏,血友病A,自身免疫性嗜中性白血球减少症,全血细胞减少,白细胞减少,涉及白细胞血球渗出的疾病,CNS炎症性疾病,阿尔茨海默氏病,帕金森病,多脏器损伤综合征例如败血症、外伤或出血继发的那些,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,抗磷脂抗体综合征,变应性神经炎,白塞病/综合征,Castleman综合征,古德帕斯丘综合征,雷诺综合征,干燥综合征,斯-约二氏综合征,类天疱疮例如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶性天疱疮、天疱疮粘膜性类天疱疮和红斑性天疱疮),自身免疫性多内分泌病,莱特病或综合征,热损伤,先兆子痫,免疫复合物病症例如免疫复合物性肾炎,抗体介导的肾炎,多发性神经病,慢性神经病例如IgM型多发性神经病或IgM抗体介导的神经病变,血小板减少(例如如心肌梗死患者所发展的)包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、输血后紫癜(PTP)、肝素诱发的血小板减少症和自身免疫或免疫介导的血小板减少症例如特发性血小板减少性紫癜(ITP)包括慢性或急性ITP,巩膜炎例如特发性角膜巩膜炎、巩膜外层炎,睾丸和卵巢的自身免疫性疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退,甲状旁腺功能减退,自身免疫性内分泌疾病包括甲状腺炎例如自身免疫性甲状腺炎,桥本病,慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺疾病,特发性甲状腺功能减退,Grave's病,多腺体综合征例如自身免疫性多腺体综合征(或多腺体内分泌综合征),瘤外综合征包括神经系统瘤外综合征例如兰伯特-伊顿肌无力综合征或伊顿-兰伯特综合征,僵人或僵人综合征,脑脊髓炎例如变应性脑脊髓炎(allergic encephalomyelitis)或变应性脑脊髓炎(encephalomyelitis allergica)和实验性变应性脑脊髓炎(EAE),重症肌无力例如胸腺瘤相关重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、眼阵挛或眼球阵挛肌阵挛综合征(OMS)和感觉神经病变,多灶性运动神经病,席汉综合征,自身免疫性肝炎,慢性肝炎,类狼疮肝炎,巨细胞性肝炎,慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴间质性肺炎(LIP),梗阻性

细支气管炎(非移植)对比NSIP,格-巴二氏综合征,贝格尔病(IgA肾病),特发性型IgA肾病,线性IgA皮肤病,急性热性嗜中性白细胞皮肤病,角质层下脓疱皮肤病,瞬时性棘层松解性皮肤病,肝硬化例如嗜原发性胆汁性肝硬变和肺硬变,自身免疫性肠病综合征,腹部或腹腔病,口炎性腹泻(麸质肠病),难治性口炎性腹泻(refractory sprue),特发性口炎性腹泻,冷球蛋白血症,肌萎缩侧索硬化(ALS;Lou Gehrig病),冠状动脉疾病,自身免疫性耳病例如自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性听力损失,多软骨炎例如难治愈的或复发的或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉积症,柯根综合征/非梅毒性间质性角膜炎,贝耳麻痹,Sweet病/综合征,自身免疫性酒渣鼻,带状疱疹相关疼痛,淀粉样变性,非癌性淋巴细胞增多,原发淋巴细胞增多包括单克隆的B细胞淋巴细胞增多(例如,良性单克隆性丙种球蛋白病和意义未定的单克隆丙种球蛋白病,MGUS),周围神经病变,瘤外综合征,离子通道病例如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉失常、耳聋、失明、周期性麻痹和CNS的离子通道病,自闭症,炎性肌病,局灶性或节段性或局灶性节段性肾小球硬化(FSGS),内分泌性眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝脏疾病,纤维肌痛,多发性内分泌衰竭,施密特综合征,肾上腺炎,胃萎缩,早老性痴呆症,脱髓鞘性疾病例如自身免疫性脱髓鞘性疾病和慢性炎症性脱髓鞘性多神经病,德雷斯勒综合征,alopecia areata,全秃,CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏现象、食管运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张症),男性和女性的自身免疫性不育例如由于抗精子抗体,混合结缔组织病,恰加斯病,风湿热,习惯性流产,农民肺,多形性红斑,心脏切开术后综合征,柯兴氏综合征,养鸟人肺,变应性肉芽肿血管炎,良性淋巴细胞性血管炎,阿尔波特综合征,肺泡炎例如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎,间质性肺病,输血反应,麻风病,寄生虫病例如利什曼病、kpanosomiasis、血吸虫病、蛔虫病、曲霉病,Sampter综合征、卡普兰综合征,登革热,心内膜炎,心内膜纤维化,弥漫性间质性肺纤维化,肺间质纤维化,肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久隆起性红斑,胎儿溶血症,嗜酸性筋膜炎,舒尔曼综合征、费耳提综合征,丝虫病,睫状体炎例如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、虹膜睫状体炎(急性或慢性)或Fuch睫状体炎,亨-舍二氏紫癜,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染SCID,获得性免疫缺陷综合征(AIDS),埃可病毒感染,败血症,内毒素血症,胰腺炎,甲状腺毒症,细小病毒感染,风疹病毒感染,疫苗接种后综合征,先天性风疹感染,EB病毒感染,腮腺炎,埃文氏综合征,自身免疫性性腺衰竭,西登哈姆舞蹈病,链球菌感染后性肾炎,血栓闭塞性血管炎,甲状腺毒症,脊髓痨,脉络膜炎,巨细胞多肌痛,慢性过敏性肺炎,干燥性角结膜炎,流行性角结膜炎,特发性肾炎综合征,微小病变性肾病,良性家族性和缺血再灌注损伤,移植器官再灌注,视网膜自身免疫,关节炎,支气管炎,慢性呼吸道梗阻/肺疾病,硅肺病,口疮,口疮性口炎,动脉硬化疾病,asplenia,自身免疫性溶血,伯克氏病,冷球蛋白血症,杜普伊特挛缩,endophthalmitis,phacoanaphylaxis,enteritis allergica,麻风结节性红斑,特发性贝耳麻痹,慢性疲劳综合征,febris rheumatica,Hamman-Rich病,感觉神经性听力损失,haemoglobinuria paroxysmatica,性腺机能减退,ileitis regionalis,白细胞减少,传染性单核细胞增多症,横贯性脊髓炎,原发性特发性粘液性水肿,肾病,ophthalmia sympathica,肉芽肿性睾丸炎,胰腺炎,多神经根炎,坏疽性脓皮症,Quervain甲状腺炎,获得性脾萎缩,非恶性胸腺瘤,白癜风,中毒性休克综合征,食物中毒,涉及T细胞浸润的病况,白细胞粘附缺陷,细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发超敏反应相关的免疫反应,涉及白细胞血细胞渗出的疾病,多器官损伤综合征,抗原抗体复合物介

导的疾病,抗肾小球基底膜病,变应性神经炎,自身免疫性多内分泌病,卵巢炎,原发性粘液性水肿,自身免疫性萎缩性胃炎,交感性眼炎,风湿性疾病,混合性结缔组织病,肾病综合征,胰岛炎,多内分泌腺病衰竭,自身免疫性多腺体综合征I型,成年发作的特发性甲状旁腺功能减退(AOIH),心肌病例如扩张型心肌病,后天性大疱性表皮松解(EBA),血色素沉着症,心肌炎,肾病综合征,原发性硬化性胆管炎,化脓性或非化脓性鼻窦炎,急性或慢性鼻窦炎,筛骨、额骨、上颌骨或蝴蝶骨鼻窦炎,嗜曙红细胞相关疾病例如嗜曙红细胞增多、肺浸润嗜曙红细胞增多、嗜酸细胞增多性肌痛综合征、吕弗勒综合征、慢性嗜酸性肺炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多、支气管肺曲霉病、曲霉肿或包含嗜酸性粒细胞的肉芽肿,过敏症,血清阴性脊椎关节炎,多内分泌自身免疫病,硬化性胆管炎,巩膜,巩膜外层,慢性皮肤粘膜念珠菌病,布鲁顿综合征,婴儿的瞬态低丙种球蛋白血症,维-奥二氏综合征,毛细血管扩张运动失调综合征,血管扩张,与胶原病相关的自身免疫性疾病,风湿病,神经系统疾病,淋巴结炎,降低血压反应,血管功能障碍,组织损伤,心血管局部缺血,痛觉过敏,肾缺血,脑缺血和疾病伴随的血管形成,变应性超敏感症,肾小球肾炎,再灌注损伤,缺血性再灌注障碍,心肌或其他组织的再灌注损伤,淋巴瘤气管支气管炎,炎症性皮肤病,具有急性炎症元件的皮肤病,多器官功能衰竭,大疱性疾病,肾皮质坏死,急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎症性疾病,眼和眼眶炎性疾病,粒细胞输血相关的综合征,细胞因子诱导的毒性,发作性睡病,急性严重的炎症,慢性顽固性炎症,肾盂炎,动脉内增生,消化性溃疡,心瓣炎和子宫内膜异位症。

[0125] 本文描述的抗体可具有多种学术、医药和商业用途。所述抗体可被用于不同类型的诊断测试,例如体外或体内检测各种各样的疾病或者药品(药物)、毒素或其他蛋白包括激素的存在。本文描述的抗体可用于测试疾病,例如在患者的血清或血液中。所述疾病可包括OX40相关疾病或与OX40不相关的疾病或适应症,包括各种癌症、炎性或自身免疫性疾病。抗体也可用于癌症的放射免疫检测和放射免疫治疗而某些新的测试方法可使用所描述的抗体以仅靶向特定细胞类型即癌症的细胞膜。

[0126] 本文描述的抗体可被制成试剂盒或其他诊断包的一部分。像这样,本文提供了制造用于与本文的预处理方法一起使用的诊断试剂盒或物品。诊断试剂盒可包含下列中的任一种或多种:拮抗物/抗体/药物参照材料;正对照中和抗体(优选地猕猴的山羊);蛋白A+G柱(例如蛋白A/G柱);去脂试剂;免疫球蛋白亲和纯化缓冲剂(例如结合、洗脱和中和缓冲剂);补体血清;细胞的测定稀释剂;制造商说明书或文献;小瓶冷冻细胞(例如WIL2细胞);细胞标记试剂(例如CELL TITER GLO.RTM.)等。以实例的方式,诊断试剂盒可包括但不限于:(a)去脂试剂;(b)用于免疫球蛋白的亲亲和纯化的缓冲剂(例如结合和洗脱缓冲剂)和(c)制造商手册,其指导诊断试剂盒的使用者在对来自自身免疫性疾病或癌症受治疗者的生物学样品进行细胞基础的生物测定(例如中和抗体测定)之前使用试剂盒预处理所述样品(例如以避免血清干扰的问题)的。诊断试剂盒任选还包含下列中的任一种或多种:药物参照材料、正对照中和抗体、补体血清,细胞的测定稀释剂和细胞标记试剂等。

[0127] 本文描述的抗体和其他发现同样提供了高通量的筛选方法。更特别地并如本领域技术人员所理解的,可能得到筛选与OX40受体结合并抑制Tr1细胞生成和功能或促进Tr1细胞的生成和功能的拮抗型或激动型单克隆抗体或小分子的高通量方法。在一个这样的方法中,将具有生产IL-10的能力的人T细胞系(SU-DHL-1)用人OX40基因(SUOX40)转染。将100,

000个SUOX40细胞与100,000个小鼠的成纤维细胞(L细胞)或100,000个表达人OX40-配体(OX40-配体L细胞)的小鼠成纤维细胞在96孔板中一起培养。培养48小时后,收集培养上清液用以通过IL-10特异性ELISA测量IL-10。在代表性的实验中,在OX40-配体不存在的情况下培养的100,000个SUOX40细胞生产高达6,000pg/ml IL-10。在OX40-配体存在的情况下,100,000个SUOX40细胞产生少于1,000pg/ml IL-10。这一培养方法可被用于筛选,除了别的之外,阻断OX40-配体抑制经由SUOX40细胞的IL-10生产的能力的拮抗型单克隆抗体或小分子。可选择地,这一培养方法可通过用对OX40特异性的可能的激动型单克隆抗体或小分子替换表达OX40-配体的L细胞来修饰以确定,除了别的之外,它们抑制经由SUOX40细胞的IL-10生产的能力。

[0128] 本文描述的抗OX40抗体可被用作测定或在用于检测或测量在有机体或有机样品中发现的药物或其他分子的活性的测定中使用。它们也可以用于定量测定以测量样品中物质的量。生物测定和免疫测定是可使用这些抗体的许多不同专用生物化学测定之中。本文教导的抗OX40抗体可被用于其他测定中以测量过程例如酶活性、抗体捕获、干细胞活性和竞争性蛋白结合。

[0129] 如本领域技术人员所理解的,表达人GITR1、OX40L、4-1BBL、ICOSL的L细胞通过逆转录病毒介导的转导生成。简单地说,人GITR1(Accession#NM_005092)、OX40L(Accession#NM_003326)、4-1BBL(Accession#NM_003811)、ICOSL(Accession#NM_015259)的全长编码序列用从HSV-1刺激的PBMC制备的RNA通过RT-PCR扩增。随后,将cDNA克隆至MSCV基础的逆转录病毒载体pMIGW2中并且所得到的质粒通过限制性酶消化和DNA测序来证实。为了产生重组逆转录病毒,每个载体与包装构建体pCL-gp(gag/pol)和pHCMV-VSVg(VSV糖蛋白被膜)在HEK293T细胞中共同转染。两天后,收集包含病毒的培养上清液并用于以moi 100感染CD32L细胞。在这一条件下,有结果地转导了>95%的细胞

[0130] 如本领域技术人员所理解的,将分离的CD14⁺单核细胞(纯度>94%)在100ng/ml GM-CSF和50ng/ml IL-4(均来自R&D)存在的情况下培养5天。如本领域技术人员所理解的,将获得的不成熟的DC清洗并与IFN- α (1000U/ml,PBLBiomedical Laboratories)、IL-10(10ng/ml,R&D)和受辐照的CD40L转染的L细胞(DC与L细胞的比例4:1)一起培养24h以获得成熟DC。

[0131] 如本领域技术人员所理解的,使用CD4⁺T细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec)将初始CD4⁺T细胞和记忆CD4⁺T细胞(每个纯度>99%)从PBMC分离并且之后剂型细胞分选(D4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻部分作为初始T细胞而CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD25⁻部分作为记忆T细胞)。如本领域技术人员所理解的,将4x10⁴个新鲜纯化的同种异体的初始CD4⁺T细胞与不成熟或培养的DC(DC与T比例1:10)一起在重组人OX40L(R&D,100ng/ml)存在或不存在的条件下在圆底96孔培养盘中共同培养7天。如本领域技术人员所理解的,将纯化的CD4⁺T细胞也与IL-12(10ng/ml,R&D)、IL-4(25ng/ml,R&D)或地塞米松(5x10⁻⁸M,Life Technologies)和1 α ,25-二羟维生素D3(10⁻⁷M)的混合物在可溶抗CD28单克隆抗体(CD28.2,1 μ g/ml)和IL-2(50U/ml,R&D)存在的情况在48孔培养板中已经用抗CD3单克隆抗体预处理的受辐照的CD32/OX40L-L细胞、CD32/GITR1-L细胞、CD32/4-1BBL-L细胞或亲本CD32-L细胞上培养7天。在某些实验中,如本领域技术人员所理解的,将CD4⁺T细胞在48孔培养板中用CD3单克隆抗体(0.2 μ g/ml)预孵育的CD32-L细胞、CD32-L细胞和CD32/ICOSL-L细胞的混合物(比例1:1)

或CD32/ICOSL-L细胞和CD32/OX40L-L细胞的混合物(比例1:1)上培养7天。如本领域技术人员所理解的,将RPMI 1640用于培养基并补充10%FCS、2mM L-谷酰胺、1mM丙酮酸钠、青霉素G和链霉素。

[0132] 如本领域技术人员所理解的,收集并清洗所培养的T细胞并且之后用结合板的抗CD3(5 μ g/ml)和溶解的抗CD28(2 μ g/ml)以 1×10^6 个细胞/ml的浓度再刺激24h。如本领域技术人员所理解的,通过ELISA测量上清液中的IL-4、IL-10、TNF- α 和IFN- α 水平(所有试剂盒来自R&D)。对于细胞内细胞因子生产,将培养的T细胞用50ng/ml of PMA加上2 μ g/ml伊屋诺霉素再刺激6h。如本领域技术人员所理解的,在最后2h加入布雷菲德菌素A(10 μ g/ml)。如本领域技术人员所理解的,使用FIX和PERM试剂盒(CALTAG)将细胞用PE-标记的抗IL-4的单克隆抗体或TNF- α FITC-标记的抗IFN- α 的单克隆抗体和APC-标记的抗IL-10(所有都来自BD)染色。

[0133] 如本领域技术人员所理解的,收集T细胞并重悬在含有EDTA的培养基中以分离簇。如本领域技术人员所理解的,将有活力的细胞通过死细胞的锥虫蓝排除计数。如本领域技术人员所理解的,对于抑制性功能测定,在亲本L细胞(B)或OX40L-L细胞(C)存在的情况下初始CD4⁺T细胞(A)和通过抗CD3单克隆抗体、抗CD28单克隆抗体,IL-2、Dex和vit D3从初始CD4⁺T细胞生成的Tr1细胞,这三种细胞类型和它们1:1比例的混合物之后通过在5 μ g/ml抗CD3单克隆抗体和1 μ g/ml抗CD28单克隆抗体存在的情况下培养来重刺激5天,之后通过[³H]胸腺嘧啶核苷掺入测定细胞增殖。

[0134] 抗人OX40特异性单克隆抗体的生成

[0135] 我们生成多种抗人OX40激动型小鼠单克隆抗体。抗体的抗原结合特异性通过流式细胞计数来证实(图10-12)。抗体的激动剂活性通过功能测定来证实。我们发现20个OX40特异性抗体中的九个可阻断维生素D3/地塞米松介导的来自CD4⁺T细胞的Tr1细胞生成(图13),增强CD4⁺T细胞增殖(图14)并抑制ICOS⁺CD4⁺CD25^高FOXP3⁺Treg的IL-10生产(图16)。我们滴定所述抗体并且发现五种在以低至4ng/ml的浓度抑制Tr1细胞生成上具有有力活性。

[0136] OX40抗体抑制CD4⁺CD25^高FOXP3⁺Treg功能

[0137] OX40单克隆抗体中的某些抑制FOXP3⁺Treg的抑制性功能(图17)。有力抑制来自Tr1细胞和CD4⁺CD25^高CD127⁺FOXP3⁺Treg的IL-10生产的五种抗体中三种(119-8B、119-43、119-122、119-173B和106-222)在阻断CD4⁺CD25^高CD127⁺FOXP3⁺Treg功能上是有力的(图17)。然而,11种抗体中的两种(119-33和120-140A)无抗IL-10生产的活性但阻断CD4⁺CD25^高FOXP3⁺Treg功能(图18)。

[0138] 抗人OX40单克隆抗体

[0139] 通过例如将6-8周大的BALB/c小鼠与用人OX40按照已知程序转染的小鼠细胞系免疫进行抗人OX40单克隆抗体的生成。建立并进一步分析了分泌特异性染色OX40⁺细胞的单克隆抗体的杂交瘤克隆。

[0140] 我们设计全面筛选以检测通过抑制Tr1细胞的生成和功能触发OX40信号传导的那些克隆(激动型抗体)。进一步纯化这些克隆。抗hOX40的激动型抗体可被人源化并且单独或与抗肿瘤疫苗或其他佐剂组合用于人类抗肿瘤治疗的临床程序。几种不同的肿瘤类型可以作为这些抗体的靶,包括黑素瘤、淋巴瘤和乳腺癌。

[0141] 在另一个实施方案中,将6-8周大的BALB/c雌性小鼠用于足垫或皮下免疫。每个小

鼠用由人OX40(L-OX40)转染的5百万个小鼠L细胞以3天的间隔注射6次。第六次注射之后三天,使用已有的程序将小鼠安乐死并且移除淋巴结(来自足垫免疫)或脾(来自皮下免疫)并且将细胞与SP2.0骨髓瘤或NS0骨髓瘤细胞以1比1的比例融合以生成杂交瘤克隆。之后通过ELISA测定筛选分泌单克隆抗体的杂交瘤克隆的与L-hOX40细胞的结合特异性。通过流式细胞计数分析进一步确定与L-hOX40细胞结合但不与L亲本细胞结合的杂交瘤在L-hOX40和SUPM2-hOX40细胞上的结合。

[0142] 在图10的实验中,通过ELISA筛选抗L-hOX40对比L亲本细胞的hOX40杂交瘤上清液。选择了二十种hOX40特异性单克隆抗体。通过将细胞与溶于PBS的0.01%氯化镁钙混合将表达人OX40(L-hOX40)的两千万细胞包被在96孔板上并在层流罩中干燥过夜。之后将板在使用前于-20℃冷冻至少一天。对于抗体结合测定,将冷冻的细胞用PBS再水化并用含有PBS加上0.05%Tween 20的清洗缓冲液清洗并且用溶于清洗缓冲液的2%BSA封闭。之后将调整的细胞用于结合OX40抗体上清液。之后用二级抗体抗小鼠IgG FC HRP检测与细胞结合的抗体。hOX40特异性杂交瘤上清液识别表达OX40的L细胞但不识别亲本L细胞。

[0143] 在图11的实验中,通过流式细胞计数分析筛选hOX40特异性单克隆抗体。相等数目(100k)的L细胞和L-hOX40在FACS缓冲液(1%FCS/2mM EDTA/PBS)中混合且与0.5μg的FPLC(Protein A HiTrap/Gentle Ag/Ab清洗缓冲液)纯化抗体一起孵育。之后将细胞清洗并用二级抗体PE耦联的抗小鼠IgG染色。两个峰指示抗hOX40单克隆抗体的阳性和阴性染色。单个峰表明没有结合抗体或抗体的非特异性结合。通过流式细胞计数分析证实二十种hOX40特异性单克隆抗体。

[0144] 在图12的实验中,通过使用表达hOX40的SUPM2细胞(SUPM2-hOX40)证实hOX40单克隆抗体特异性。如图11中将相等数目(100k)的SUPM2和SUPM2-hOX40细胞在FACS缓冲液(1%FCS/2mM EDTA/PBS)中混合并用于hOX40单克隆抗体结合。通过流式细胞计数分析每种抗体的结合特异性。两个峰指示抗hOX40单克隆抗体的阳性和阴性染色,而单个峰表明没有结合抗体或抗体的非特异性结合。证实了二十种hOX40特异性单克隆抗体。

[0145] 在图13的实验中,我们寻求鉴定可抑制Tr1细胞从由VitD3(10微摩尔mM)/Dex(50纳M)、CD32L/ICOSL和抗CD3/CD28(0.2微克/ml)刺激的CD4⁺T细胞生成的人OX40特异性单克隆抗体。在细胞培养的第0天加入抗hOX40单克隆抗体并且在刺激7天后CD4⁺T细胞经历IL-10细胞内染色以及之后的流式细胞计数分析。代表性的荧光活化细胞分选(FACS)数据示于A中而占有所有抗hOX40单克隆抗体处理的Tr1细胞的百分比示于B。使用从这一实验获得的细胞,我们寻求鉴定刺激CD4⁺T细胞增殖(图14,在刺激后第7天将细胞计数)并抑制Tr1从CD4⁺生成(图13)的hOX40特异性单克隆抗体。

[0146] 为了鉴定这些hOX40单克隆抗体抑制Tr1细胞从CD4⁺T细胞生成的能力,如上文图13的实验中所描述的生成并培养Tr1细胞。代表性的FACS数据示于A而用九种抗hOX40单克隆抗体处理之后的Tr1细胞的百分比示于B中。五种hOX40特异性单克隆抗体于4ng/ml浓度强烈抑制Tr1细胞的生成(图15)。

[0147] 在图16A、16B和16C的实验中,将新鲜分选的ICOS⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{high}T细胞用抗CD3(0.2μg/ml)(在CD32L/ICOSL细胞和CD32L/hOX40L细胞存在的情况下)或抗hOX40单克隆抗体或对照抗体刺激5天。之后将细胞计数并将5x10⁴个细胞用抗CD3/CD28再刺激24h并用Elisa试剂盒检测上清液的IL-10分泌。我们鉴定抑制Tr1从CD4⁺T细胞生成也抑制IL-10从

天然的ICOS⁺CD4⁺CD25^高T细胞产生的hOX40特异性单克隆抗体。将新鲜分选的ICOS⁺ICOS-CD4⁺CD127-CD25^高Treg与CFSE标记的CD4⁺CD25低细胞在受辐照的单核细胞和抗CD3(0.3μg/ml)和抗hOX40mAb存在的情况下一起培养。培养3.5天之后,通过FACS通过细胞中CFSE的稀释测定细胞增殖(图16C)。

[0148] 图17A和17B显示抑制Tr1细胞的生成并阻断FOXP3⁺CD4⁺CD25^高Treg功能的抗hOX40单克隆抗体的鉴定。将新鲜分选的FOXP3⁺CD4⁺CD127-CD25^高T细胞(3.5×10^4)与CFSE标记的CD4⁺CD25^{low}细胞(7×10^4)一起在受辐照的单核细胞(7×10^4 , 6000rad)和0.3μg/ml抗CD3以及各种浓度的抗hOX40单克隆抗体存在的情况下培养。培养3至4天后,通过流式细胞计数分析通过测定细胞中CFSE的稀释测定细胞增殖。表示分裂的细胞的百分比。代表性的流式细胞计数分析示于图17A。6个单克隆抗体的数据示于图17B。

[0149] 在图18的实验中,将新鲜分选的FOXP3⁺CD4⁺CD127-CD25^高T细胞(3.5×10^4)与CFSE标记的CD4⁺CD25^低细胞(7×10^4)一起在受辐照的单核细胞(7×10^4 , 6000rad)和0.3μg/ml抗CD3以及各种浓度的OX40单克隆抗体存在的情况下培养。培养3至4天后,通过FACS通过测定细胞中CFSE的稀释测定细胞增殖。数据代表两个实验。我们鉴定不抑制Tr1生成但封闭FOXP3⁺CD4⁺CD25^高Treg功能的抗hOX40单克隆抗体。

[0150] 在图19A和19B的实验中,将淋巴瘤来源的CD4⁺CD25^高T细胞与从健康供体分离的CFSE标记的CD4⁺CD25^{low}细胞(7×10^4)一起在受辐照的同种异体单核细胞(7×10^4 , 6000rad)和0.3微克/ml抗CD3和25μg/ml的抗hOX40单克隆抗体存在情况下培养。培养3至4天后,通过FACS通过测定细胞中CFSE的稀释测定细胞增殖。代表性的FACS分析数据示于19A中而占有所有实验数据示于19B。我们发现hOX40激动型抗体阻断淋巴瘤来源的CD4⁺CD25^高Treg功能。

[0151] 图20显示与人和恒河猴OX40特异性结合的激动型抗体的鉴定。恒河猴外周血单核细胞通过ficoll离心获得。CD4⁺T细胞通过CD4微珠获得。将CD4⁺T细胞用10μg/ml的菜豆凝集素(PHA)刺激。刺激后两天,将细胞用抗hOX40mAb染色之后用山羊抗小鼠IgG-APC和CD69-PE染色。106-317作为阴性对照。显示六种强烈活化T细胞增殖的抗hOX40 mAb可结合活化的恒河猴CD4⁺T细胞。这些结果表明可在猴中测试这六种抗hOX40单克隆抗体的毒性。

[0152] 使用传统融合程序获得的500个抗人OX40阳性克隆中仅七个表现出促发OX40的特性,包括但不限于如表1中所公开的阻断生成IL-10的Tr1生成和nTreg抑制性功能的能力。

[0153] 表1 List of OX40特异性单克隆抗体的列表

[0154]

	单克隆抗体克隆	封闭 IL-10	封闭 nTreg
1	106-108	-	-
2	106-317	-	-
3	106-107	-	-
4	106-148	-	-
5	119-204A	-	-
6	119-220C	-	+
7	119-33A	-	+
8	119-58	-	+
9	119-181A	-	+
10	119-157A	-	+
11	120-140A	-	+
12	119-8B	+	-
13	119-173B	+	-
14	106-132	+	+
15	106-222	+	+
16	119-43	+	+
17	119-122	+	+
18	119-69A	+	+
19	120-56	+	+
20	120-270	+	+

[0155] 基于三个标准选择杂交瘤克隆106-222和119-122

[0156] 1. 它们抑制Tr1细胞从CD4⁺T细胞生成(可诱导的Treg)

[0157] 2. 它们逆转FOXP3+nTreg细胞的抑制性功能

[0158] 3. 它们显示Tr1细胞关闭的剂量依赖性抑制以及FOXP3+Treg功能的逆转。

[0159] 嵌合和人源化抗体

[0160] 人源化(也称为重构或CDR移植)是用于减少来自异种来源(包括但不限于啮齿类)的单克隆抗体的免疫原性并增加其人类免疫系统活化的已知技术。尽管使用分子生物学的技术产生工程化单克隆抗体的机制已知,但是啮齿类互补决定区(CDR)简单移植到人框架区中没有总是重建原始单克隆抗体的结合亲和性和特异性。

[0161] 为了将抗体人源化,人源化抗体的设计成为重新产生原始分子的功能的关键步骤。这一设计包括各种选择:CDR的范围、将使用的人框架以及将来自啮齿类单克隆抗体的残基取代至人框架区(回复突变)中。这些回复突变的位点大部分已经通过序列/结构分析或通过可变区的3D结构的同源模型分析确定。

[0162] 近来,噬菌体文库已经被用于改变所选择的位点的氨基酸。相似地,许多方法已经被用于选择将啮齿类CDR移植其中的最适合的人类框架。早期实验室用有限亚型的良好表征的人单克隆抗体(其中结构常常但不总是可得的),不考虑与啮齿类单克隆抗体的序列同一性(所谓的固定的框架法)。某些小组使用具有与啮齿类可变区高度氨基酸序列同一性(同源匹配或最佳拟合)的可变区;其他的使用共有或种系序列而还有其他的选择在来自若干不同人单克隆抗体的轻链或重链可变区中的框架区序列的片段。还有用在人单克隆抗体中存在的最常见的残基取代表面啮齿类残基的所开发的人源化方法(“表面重建”或“贴面”)和使用不同范围定义的CDR的那些。人源化抗体描述于下文。然而,包含SEQ ID NO:4和10或SEQ ID NO:16和22的可变重链区和轻链区的嵌合抗体同样描述于本文。

[0163] 人源化单克隆抗体来源于小鼠抗OX40抗体。

[0164] 分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或13的可变重链CDR1。分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:2或14的可变重链CDR2。分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或15的可变重链CDR3。

[0165] 分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:7或19的可变轻链CDR1。分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:8或20的可变轻链CDR2。分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:9或21的可变轻链CDR3。

[0166] 分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:11或23或与SEQ ID NO:11或23的氨基酸序列具有至少90百分比同一性的氨基酸序列的可变轻链。分离的人源化抗OX40抗体可具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:5或17与SEQ ID NO:5或17的氨基酸序列具有至少90百分比同一性的氨基酸序列的可变重链。

[0167] 分离的人源化抗OX40抗体可具有由SEQ ID NO:12或24的核酸序列或与SEQ ID NO:12或24的氨基酸序列具有至少90百分比同一性的核酸序列编码的可变轻链。分离的人源化抗OX40抗体可具有由SEQ ID NO:6或18的核酸序列与SEQ ID NO:6或18的氨基酸序列具有至少90百分比同一性的核酸序列编码的可变重链。

[0168] 人源化抗OX40抗体的表达

[0169] 可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链基因和重链基因,制备本发明的抗体或抗体部分。为了重组表达抗体,用一个或多个携带编码所述抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得所述轻链和重链在宿主细胞中表达,而且优选分泌入培养所述宿主细胞的培养基中,从该培养基中可回收所述抗体。标准重组DNA方法学用来获得抗体重链基因和抗体轻链基因,使这些基因导入重组表达载体中,然后使所述载体导入宿主细胞中,所述标准方法例如为以下文献介绍的方法:Sambrook,Fritsch和Maniatis(编辑),Molecular Cloning;A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1989),Ausubel,F.M.等(编辑)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates,(1989)和Boss等的美国专利第4,816,397号。

[0170] 可从各种动物细胞优选从哺乳动物细胞生产抗体以及抗体片段和变体,小鼠和人细胞是尤其优选的。同样,重组DNA表达系统可包括利用已经被工程化以生产高水平的特定蛋白的宿主细胞和表达构建体的那些。这些宿主细胞核表达构建体可包括大肠杆菌(*Escherichia coli*),携带来源于质粒或病毒(噬菌体)的表达构建体;酵母例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*),携带游离的或染色体整合

的表达构建体;昆虫细胞和病毒例如Sf9细胞和杆状病毒;以及哺乳动物细胞,携带游离的或染色体整合的(包括但不限于逆转录病毒)表达构建体(这些方法例如可参见手稿Verma et al.,J.Immunol.Methods 216:165-181,1998)。抗体也可在植物中(这些方法例如可参见美国专利第6,046,037号;Ma et al.,Science 268:716-719,1995)或通过噬菌体展示技术(这些方法例如可参见Winter et al.,Annu.Rev.Immunol.12:433-455,1994)生产。

[0171] 显示一定水平所期望的活性和结合特异性/亲和性的人抗OX40抗体可进一步通过标准重组DNA技术操作以例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,VL或VH编码DNA片段可操作地连接于编码另一蛋白例如抗体恒定区或弹性连接体的DNA片段。如本文背景下所用的。术语“可操作地连接”是指两个DNA片段连接以使由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0172] 在另一方面,编码VH区的分离DNA可通过使VH编码DNA与另一种编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的DNA分子可操作地连接而转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)并且通过标准PCR扩增可获得包含这些区段的DNA片段。所述重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区及Kabat描述的其任何同种异型变异体(Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),但是最优选为IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,VH编码DNA可以与另一种只编码重链CH1恒定区的DNA分子可操作地连接。

[0173] 同样,与表面抗原结合的人源化抗体可与负载FcR的细胞相互作用。这样的作用可引出效应子功能例如ADCC和/或由于Fc介导的交联而增强信号传导。所述作用对于治疗可能是有利或有害的。这些有害的副作用包括发冷、发烧、低血压和某些实例中呼吸困难(Thistlethwaite JR Jr.,Cosimi AB,Delmonico FL,et al.)。

[0174] 某些有害影响可开始于T细胞表面上存在的蛋白复合物中。当T细胞活化时,蛋白复合物开始参与经由抗原受体产生的信号的传导。简单地说,T细胞的活化开始级联事件,其包括抗原受体的增强的交联。受体的交联可促成导致某些细胞因子例如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素2(IL-2)和干扰素 γ (IFN- γ)的诱导的强烈的促有丝分裂信号传导。已知大量生成时这些细胞因子是有毒的。

[0175] 例如,抗CD3 mAb目前用于自身免疫性疾病包括I型糖尿病的治疗,其中T细胞介导抗胰岛(胰岛素的生产者)的攻击(Kaufman A,和Herold K.anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes Diabetes Metab Res Rev 2009;25:302-306)。抗CD3抗体已知抑制经由T细胞的靶溶解并且增强抗原受体CD3的交联。此外,与其有力的促有丝分裂活性一起,抗CD3抗体已知是细胞因子尤其是肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素2(IL-2)和干扰素 γ (IFN- γ)的有力的诱导剂。响应于药物(Chatenoud L.)从T细胞大量释放细胞因子尤其是TNF- α 产生毒性作用。这些不期望的副作用已被归因于负载CD3分子的T细胞同与抗体的Fc部分结合的负载FcR的细胞的交联。交联活化T细胞和负载FcR的细胞,导致如上文提及的细胞因子的大量释放的。

[0176] 相似地,使用抗OX40抗体可导致可能的不期望的副作用。例如,与表达OX40的T细

胞结合的抗OX40抗体也可结合负载FcR的细胞并且促发对用所述抗体治疗的患者有利或有害的细胞因子的产生。为了克服这一可能的问题,我们已经设计并且提供了本文突变抗OX40抗体的FcR部分的方法以避免毒性作用并为FcR部分提供期望的突变。

[0177] 与FcR(CD16、CD32和CD64)反应的人IgG1的位点已知的。将其作图至上游CH2结构域。最重要的氨基酸是位点234和235的两个Leu残基。通过将这两个残基突变至两个Ala残基,废止了IgG1与所有FcR的相互作用。掺入这些突变的人源化抗CD3(HuOKT3AA)是更安全的药物并且具有与HuOKT3.不同的作用机制。参见例如美国专利第6,491,916号,其通过引用全文并入本文。

[0178] AA突变的位点如下所示:

[0179] 234 235

[0180] ---A---P---E---L---L---G---G---P---野生型IgG1上游CH2

[0181] ---A---P---E---A---A---G---G---P---AA突变体IgG1上游CH2

[0182] 本文描述的Hu222AA和Hu122AA可含有这些突变。如果测定系统包含负载FcR的细胞,你可以看见野生型和AA突变体之间的差异。否则,两种抗体将表现一样。

[0183] 编码VL区的分离DNA可通过使VL编码DNA与另一种编码轻链恒定区CL的DNA分子可操作地连接而转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)并且通过标准PCR扩增可获得包含这些区段的DNA片段。所述轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0184] 为了获得scFv基因,使VH和VL编码DNA片段与另一种编码弹性连接体的片段如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃的片段可操作地连接,使得VH和VL序列可表达为邻接的单链蛋白,并且VL和VH区通过弹性连接体连接在一起(参见例如Bird等(1988)Science242:423-426;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883;McCafferty等,Nature(1990)348:552-554)。

[0185] 本文描述的氨基酸序列修饰是所预期的。例如,所期望的是提高抗体的结合亲和性和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体通过将适合的核苷酸变化引入抗体核酸或通过肽合成来制备。这样的修饰包括例将抗体氨基酸序列中的残基缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任意组合以达到最终的构建体,只要最终的构建体具有所期望的表征。氨基酸变化可在制得序列的同时被引入目标抗体氨基酸序列中。

[0186] 用于鉴定抗体某些残基或区域为诱变优选部位的有效方法称为“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells, 1989, Science, 244:1081-1085所描述的。鉴定了靶残基的残基或基团(例如，带电荷残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸及谷氨酸)并由中性或带负电荷氨基酸(最优选丙氨酸或多丙氨酸)替代以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后对证实对取代功能敏感性的那些氨基酸部位通过在或对取代的位置导入其它变体进行完善。因此，虽然预先确定了引入氨基酸序列变异的位点，但突变本身的性质不需要预先确定。例如，为分析在给定位点突变的性能，在靶密码子或靶区域进行了丙氨酸扫描或随机诱变并筛选所表达的免疫球蛋白的所期望的活性。

[0187] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至包含一百或更多残基的多肽的氨基

和/或羧基端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酸残基的抗体或与细胞毒性多肽物融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C端与增加抗体血清半衰期的酶(例如用于ADEPT的)或多肽的融合体。抗体的另一类氨基酸变体改变抗体的原始糖基化模式。这些变化包括缺失抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分和/或加入一个或多个抗体中不存在的糖基化位点。

[0188] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体具有由不同残基代替的抗体分子中的至少一个氨基酸残基。最有趣进行取代诱变的位点包括超变区,但是FR改变也是预期的。保守取代见美国专利第7,812,133号表1中第43栏第55列至第44栏第49列于“优选的取代”的标题下,其通过引用并入本文。如果这些取代引起生物学活性的改变,则可引入表1中称作“示例性取代”或如下文参考氨基酸分类而进一步描述的更实质性改变并筛选产物。

[0189] 抗体的生物学特性的实质性修改可通过选择取代来完成,所选的取代在它们对维持(a)取代区多肽骨架的结构,例如片层结构或螺旋构象,(b)靶位点处该分子的电荷或疏水性或(c)侧链的大小的影响上显著不同。天然存在的残基根据共有的侧链特性可分为:(1)疏水性:正亮氨酸,甲硫氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸、异亮氨酸;(2)中性亲水:半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺;(3)酸性:天冬氨酸,谷氨酸(4)碱性:组氨酸,赖氨酸,精氨酸;(5)影响侧链定向的残基:甘氨酸,脯氨酸和(6)芳香族:色氨酸,酪氨酸,苯丙氨酸。非保守取代将限定上述某一类的成员被改变为另一类。

[0190] 为了表达本文描述的抗体或抗体部分,使如上所述获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体中以使所述基因与转录控制序列和翻译控制序列可操作地连接。在这种情况下,术语“可操作地连接”是指抗体基因连接入载体,使得所述载体中的转录控制序列和翻译控制序列发挥其预定的调节所述抗体基因的转录和翻译的作用。选择与所用的表达宿主细胞匹配的表达载体和表达控制序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可插入独立的载体,而更常见的是,将这两种基因插入同一表达载体。通过标准方法(例如连接在抗体基因片段和载体中的互补限制性位点,或者如果没有限制性位点时则平端连接)将抗体基因插入表达载体中。

[0191] 如图23中所示,用于Hu106-222 IgG1/ κ 抗体的表达载体的一个这样的图示式结构。从顶部的SalI位点顺时针前进,质粒含有从人巨细胞病毒(CMV)主要立即早期启动子和增强子(CMV启动子)开始的重链转录单元以起始抗体重链基因的转录。CMV启动子之后是VH外显子、含有包括CH1、铰链区、CH2和CH3外显子以及插入的内含子的人 γ -1重链恒定区的基因组序列以及CH3外显子之后的多腺苷酸化位点。重链基因序列之后,轻链转录单元从CMV启动子开始,之后是VL外显子和内有人 κ 链恒定区外显子(CL)以及在其前面的部分内含子的基因组序列以及CL外显子之后的多腺苷酸化位点。轻链基因之后是SV40早期启动子(SV40启动子),大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(gpt)和含有SV40多腺苷酸化位点的片段(SV40poly(A)位点)。最后,质粒含有质粒pUC19的一部分,包含细菌的复制起点(pUC ori)和 β 内酰胺酶基因(β 内酰胺酶)。相关限制性内切酶位点示于图中。

[0192] 重组表达载体可编码有助于抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可克隆入载体以使信号肽按读框与抗体链基因的氨基末端连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即非免疫球蛋白信号肽)。

[0193] 如上文所指出的,除了抗体链基因之外,本发明重组表达载体携带有控制抗体链

基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”是指包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。这类调节序列描述于例如Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology185,Academic Press,San Diego,CA(1990)中。应当理解的是表达载体的设计,包括调节序列的选择,可能取决于诸如有待转化的宿主细胞的选择、需要蛋白的表达水平等的因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括控制蛋白在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,例如得自以下病毒的启动子和/或增强子:巨细胞病毒(CMV)(例如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(例如SV40启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒。关于病毒调节元件及其序列的进一步介绍,参见例如Stinski的美国专利第5,168,062号、Bell等的美国专利第4,510,245号和Schaffner等的美国专利第4,968,615号,Bujard等的美国专利第5,464,758号和Bujard等的美国专利第5,654,168号。

[0194] 除了抗体链基因和调节序列之外,本发明重组表达载体可携带其他序列,例如调节所述载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于选择所述载体已经导入其中的宿主细胞(参见例如均为Axel等的美国专利第4,399,216、4,634,665和5,179,017号)。例如,选择标记基因通常赋予载体导入其中的宿主细胞对药物如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。

[0195] 为了表达轻链和重链,编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染入宿主细胞中。各种形式的术语“转染”预期包括通常用于将外源DNA引入原核生物宿主细胞或真核生物宿主细胞的各种各样的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖转染等。尽管理论上可在原核生物宿主细胞或真核生物宿主细胞中表达本发明抗体,但是在真核生物宿主细胞中并最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最优选的,因为真核生物细胞、尤其是哺乳动物细胞较原核生物细胞更可能装配和分泌适当折叠的免疫活性抗体。用于表达本文描述的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:4216-4220介绍的dhfr-CHO细胞,和DHFR选择标记一起使用的,如R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621中所介绍)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足够使抗体在宿主细胞中表达更优选所述抗体分泌至宿主细胞在其中生长的培养基中的时间生产所述抗体。使用标准蛋白纯化方法可从培养基中回收抗体。

[0196] 宿主细胞也可以用来产生完整抗体的一部分,例如Fab片段或scFv分子。应该理解的是关于上述方法的各种改变也在本发明的范围内。例如最好用编码本发明抗体的轻链或重链(而不是同时的二者)的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可用来去除结合OX40非必需的编码轻链和重链之一或二者的DNA的一部分或全部。本发明的抗体也包括这样的截短DNA分子表达的分子。另外,可以使用标准化学交联方法交联本发明抗体与第二种抗体制备双功能抗体,其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体,而另一条重链和轻链是非OX40抗原特异性的。

[0197] 药物组合物和药物施用

[0198] 本发明抗体和各种抗体部分可掺入适合施用于患者的药物组合物中。通常所述药

物组合物包含本发明抗体或抗体部分以及药学上可接受的载体。本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等以及它们的组合物中的一种或多种。在大多数情况下,优选的是所述组合物包含等渗剂,例如糖类、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。药学上可接受的载体还可包括微量的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们延长抗体或抗体部分的保藏期或有效性。

[0199] 本发明的抗体和抗体部分可掺入适用于胃肠外施用(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)的药物组合物中。本发明的组合物可以为各种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如注射溶液和输注溶液)、分散剂或悬浮剂、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式取决于预定的施用模式和治疗用途。典型的组合物为注射溶液或输注溶液形式,例如类似于用于与其他抗体一起被动免疫接种人类的那些的组合物。所述抗体通过静脉输注或注射或肌肉内或皮下注射来施用。

[0200] 施用途和/或模式取决于需要的效果。在某些实施方案中,可用避免所述活性化合物快速释放的载体制备所述化合物,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴片和微胶囊传递系统。可使用可生物降解、生物相容的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这类制剂的大多数方法是专利方法或本领域技术人员公知的方法。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson编著,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0201] 补充的活性化合物也可以掺入所述组合物中。在某些实施方案中,本发明抗体或抗体部分可与对治疗OX40失活起有害作用病症有用的一种或多种其他治疗剂共同配制和/或共同施用。例如本发明的抗OX40抗体或抗体部分可与结合其他靶的一种或多种的其他抗体(例如结合其他细胞因子或结合细胞表面分子的抗体)共同配制和/或共同施用。而且,本发明的一种或多种抗体可与两种或两种以上的前述药物组合使用。这样的组合治疗可有利地使用较低剂量的所施用的治疗剂,因此避免与各种单一治疗相关的可能毒性或并发症。熟练医师应当知道当本发明抗体用作组合治疗的一部分时,比仅将所述抗体施用于受治疗者时更低剂量的抗体可能是所期望的(例如通过使用组合治疗可达到协同治疗效果,其反过来允许使用较低剂量的所述抗体而达到需要的治疗效果)。

[0202] 本发明抗体或其抗原结合部分可单独或组合使用以治疗这些疾病。应该理解的是本发明抗体或其抗原结合部分可单独使用或与另外的剂例如治疗剂组合使用,所述另外的剂由技术人员选定以达到预期目的。例如所述另外的剂可以是本领域已知的对治疗本发明教导的抗体所治疗疾病或病况有用的治疗剂。所述另外的剂也可以是赋予所述治疗组合物有益特性的剂,例如影响所述组合物粘度的剂。

[0203] 本文描述的药用组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或抗体部分。“治疗有效量”是指达到需要的治疗效果(所必需的剂量和时间周期的)有效的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可随各种因素(例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重)以及抗体或抗体部分在个体中激发需要反应的能力而变化。治疗有效量也可以为抗体或抗体部分的治疗有益作用超过其任何毒性或有害作用的剂量。“预防有效量”是指达到需要的预防效果(所必需的剂量和时间周期的)有效的量。

[0204] 可调整给药方案以获得最佳需要响应(例如治疗响应或预防响应)。例如施用单次大剂量,可随时间施用若干分开的剂量或者可根据治疗情况的需要成比例减少或增加剂量。特别有利的是配制为剂量单位形式的胃肠外组合物以便于施用而且剂量均匀。本文使用的剂量单位形式是适于作为待治疗的哺乳动物受治疗者的单位剂量的物理独立单位;每个单位含有计算产生需要治疗效果的预定量活性化合物和需要的药用载体。剂量单位形式的规格取决于或直接取决于(a)活性化合物的独特特性和需要达到的具体治疗效果或预防效果,以及(b)配制领域固有的限制,例如活性化合物在个体中的治疗敏感性。

[0205] 实施例I

[0206] 如附录A和B中所描述的用蛋白A柱将嵌合和人源化106-222IgG1/ κ 单克隆抗体(分别为Ch222和Hu222)从相应的NS0稳定转染子的培养上清液中纯化。通过两种不同方式将Hu222从柱洗脱。简单的说,用低pH缓冲液洗脱Hu222批次I而用Pierce's Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液洗脱批次II。当使用较低pH缓冲液洗脱时Hu222的产量较好。用Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液将Ch222从柱洗脱。

[0207] 根据标准程序将纯化的Hu222批次I和II抗体与小鼠106-222一起通过SDS-PAGE表征。在还原条件下分析每种抗体5 μ g。如图21所示,Hu222批次I和II抗体每种由具有约50kD分子量的重链和约25kD分子量的轻链组成。Hu222批次I和II抗体的纯度显示超过95%。

[0208] 用Lonza's Limulus Amebocyte Lysate(LAL)QCL-1000试剂盒分析人源化抗提中的内毒素杂质。Hu222批次I和II抗体的内毒素水平都小于0.5EU/mg蛋白。

[0209] 与L/OX40细胞结合的Hu106-222的表征

[0210] 基本上根据由Laura Bover博士提供的程序在FACS结合测定中用L/hOX40细胞检测小鼠106-222、Ch106-222和Hu106-222抗体与OX40的结合。用PE标记的山羊抗小鼠IgG抗体(用于小鼠106-222)或PE标记的山羊抗人IgG抗体(用于Ch106和Hu106)检测与L/hOX40细胞结合的抗体。

[0211] 图22显示对于小鼠106-222、Ch106和Hu106-222(批次II)抗体与L/OX40细胞结合的分析。Hu106-222(批次II)的滴定曲线几乎与Ch106-222的相同,表示小鼠106-222的抗原结合亲和性保留在Hu106-222中。小鼠106-222的滴定曲线与Ch106和Hu106的相似;然而,由于二级抗体的不同,数据仅显示小鼠106-222的亲和性与Hu106-222的相似。

[0212] 图24显示就与L/hOX40细胞结合而言Hu106-222批次I和II抗体之间的比较。尽管需要进一步的分析,但是两个批次的Hu106-222的亲和性如果不相同那么也显示是彼此相似的。因此,将Hu106-222从蛋白A柱酸性洗脱似乎没有影响其亲和性。

[0213] Ch106-222的纯化

[0214] NS0稳定转染子C8于转瓶中在500ml的Invitrogen's Hybridoma SFM培养基中生长至衰竭。将培养基在Coming's 250ml离心管(目录号430776)中于Beckman Coulter's Allegra X-12R离心机(2000RPM,15min)中快速离心。将培养上清液用Pharmacia P1泵上样在1ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe柱(目录号11-034-95)上。将柱用Tris缓冲的盐水(Pierce,目录号28379)清洗并用Pierce's Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液(目录号21027)洗脱。收集流份(约1ml)并于280nm读取它们的OD。

[0215]

流份#	280nm的OD
-----	----------

3	0.12
4	0.30
5	0.18
6	0.11

[0216] 混合流份3至6(体积=3.0ml, 280nm的OD=0.14)。将混合的流份在PBS中在10ml Sephadex G25 medium柱上脱盐。收集1ml的流份。

[0217]

流份#	280nm的OD
5	0.09
6	0.19
7	0.12
8	0.12
9	0.00

[0218] 混合流份6至9(体积=3.0ml, 280nm的OD=0.11)。将混合的流份在PBS中透析过夜。透析之后, 体积为3.0ml而280nm的OD为0.19。这一制品称为Ch106, 批次8/31/09, 具有0.13mg/ml. 的浓度。

[0219] Hu106-222的纯化

[0220] NS0稳定转染子1-C6于转瓶中在500ml的Invitrogen's Hybridoma SFM培养基中生长至衰竭。将培养基在Corning's 250ml离心管(目录号430776)中于Beckman Coulter's Allegra X-12R离心机(2000RPM, 15min)中快速离心。

[0221] 批次1: 用Pharmacia P1泵将150ml的培养上清液上样至1ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe柱(目录号11-034-95)上。将柱用PBS清洗并且用0.1M甘氨酸-HCl、0.1M NaCl(pH 3.0)洗脱结合的抗体。洗脱流份(每个1ml)收集至含有50μl 1M Tris-HCl(pH 8.0)的管中。

[0222]

流份#	280nm的OD
2	0.88
3	2.84
4	1.29
5	0.63
6	0.18

[0223] 混合流份2至5(体积=4.2ml, 280nm的OD=1.59)。将混合的流份在PBS中透析过夜。透析之后, 体积为4.2ml而280nm的OD为1.54。将抗体溶液(批次9/18/09I; 1.1mg/ml)过滤灭菌。

[0224] 批次II:

[0225] 使用Pharmacia P1泵将剩余的培养上清液(350ml)上样至1ml GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe柱上。将柱用Tris缓冲的盐水清洗并用Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液洗脱。收集流份(约1ml)并于280nm读取它们的OD。

[0226]

流份#	280nm的OD
2	0.12
3	0.85
4	2.17
5	1.47
6	1.02
7	0.81
8	0.66
9	0.54
10	0.44

[0227]

11	0.46
----	------

[0228] 混合流份3至7(体积=4.2ml, 280nm的OD=1.22)。将柱用Tris缓冲的盐水再次清洗并且用0.1M glycine-HCl、0.1M NaCl(pH 3.0)洗脱抗体以检测通过GentleAg/Ab Elution Buffer洗脱是否足够。

[0229]

流份#	280nm的OD
1	0.05
2	0.05
3	1.23
4	0.49
5	0.10

[0230] 收集用GentleAg/Ab洗脱缓冲液洗脱的流份3至7并且于PBS中在10mlSephadex G25 medium柱上脱盐。收集1ml的流份。

[0231]

流份#	280nm的OD
4	0.38
5	0.96
6	1.38
7	1.33
8	1.10
9	0.12

[0232] 混合流份5至8(体积=4.0ml, 280nm的OD=1.12)。将混合的流份在PBS中透析过夜。透析之后, 体积为4.0ml而280nm的OD为1.12。将抗体溶液(批次9/18/09II; 0.8mg/ml)过滤灭菌。

[0233] 使用Pierce's Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液的高盐洗脱方法不如低pH方法那么有效地从蛋白A柱洗脱结合的人IgG1抗体。由于使用Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液时抗体未在一个尖锐的峰中洗脱, 因此必须收集许多流份以便收集洗脱的IgG并且在透析前将收集的流份

脱盐。使用Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液的不良的洗脱概况和额外的纯化步骤影响了抗体的产量。建议仅在有待纯化的IgG1对酸敏感的时候使用高盐洗脱法。

[0234] 实施例II

[0235] Ch119-122和Hu119-122抗体的纯化

[0236] 用蛋白A柱将嵌合119-122IgG1/ κ 单克隆抗体(Ch119)从Hybridoma-SFM培养基(Invitrogen)上生长的相应的NS0稳定转染子(克隆G11)的培养上清液中纯化。用Pierce's Gentle Ag/Ab洗脱缓冲液洗脱后,通过凝胶过滤和之后的透析将Ch119的缓冲液更换为PBS。Ch119的浓度为0.21mg/ml。

[0237] 用蛋白A柱将人源化119-122IgG1/ κ 单克隆抗体(Hu119)从Hybridoma-SFM培养基(Invitrogen)上生长的相应的NS0稳定转染子(克隆2F5)的培养上清液中纯化。将Hu106-222用低pH缓冲液从柱上洗脱,用1M Tris-HCl(pH 8.0)中和并在PBS中透析。Hu122的浓度为1.6mg/ml。

[0238] 根据标准程序将纯化的Hu106-222与小鼠119-122一起通过SDS-PAGE表征。在还原条件下分析每种抗体5 μ g。如图25所示,Hu119-122由具有约50kD分子量的重链和约25kD分子量的轻链组成。Hu119的纯度显示超过95%。

[0239] Hu119-122结合L/hOX40细胞的表征

[0240] 基本上根据由Laura Bover博士提供的程序在FACS结合测定中用L/hOX40细胞检测小鼠119-122、Ch119-122和Hu119-122抗体与OX40的结合。用PE标记的山羊抗小鼠IgG抗体(用于小鼠119-122)或PE标记的山羊抗人IgG抗体(用于Ch119-122和Hu119-122)检测与L/hOX40细胞结合的抗体。

[0241] 图26显示FACS分析的结果。Hu119-122的滴定曲线与Ch119-122的相似,表示小鼠119-122的抗原结合亲和性保留在Hu 119-122中。然而较高抗体浓度的Ch109-122和Hu119-122时MCF值没有正确落入相应曲线。调整实验条件后,应重复FACS分析。

[0242] 实施例III

[0243] 为了评估我们的人源化抗人OX40抗体增强T细胞增殖的能力,我们使用抗CD3包被的CD32-L细胞和新鲜分选的初始CD4⁺T细胞进行增殖测定。图27显示人源化抗人OX40 mAb克隆119-122(Hu122)及其结合FcR的突变抗体(Hu122-AA)增强初始CD4⁺T细胞增殖。与亲本小鼠抗人OX40 mAb(Mouse122)相比Hu122产生较好的T细胞刺激活性(图27)。

[0244] 结合FcR的突变人源化抗人OX40 mAb克隆106-222(Hu222-AA)和嵌合抗人OX40 mAb克隆106-222(Ch222)增强抗CD3刺激的初始CD4⁺T细胞增殖。与亲本小鼠抗人OX40 mAb(Mouse106-222)相比,这些抗体具有相似的刺激活性。然而,完全的人源化抗人OX40Ab, Hu106,没有增强T细胞增殖(图28)。

[0245] 为了评估人源化抗人OX40抗体阻断CD4⁺调节型T细胞(Treg)抑制性功能的能力,我们使用新鲜分选的初始CD4⁺T细胞和CD4⁺CD25^高CD127^低Treg进行了增殖测定。我们发现嵌合抗体Ch122和结合Fc的突变的人源化抗体(Hu122-AA)在阻断CD4⁺Treg抑制性功能上表现出比亲本小鼠抗人OX40 mAb(Mouse122)更好的效力(图29A-B)。

[0246] 在图27的实验中,将新鲜分选的CD4⁺CD25^低CD127⁺CD45RO⁻CD45RA⁺初始T细胞用由四种浓度的抗CD3抗体加上2 μ g/ml的抗人OX40Ab克隆119抗体或对照抗体包被的表达CD32(CD32-L)的L细胞刺激。刺激后三天,加入放射性同位素氚并且在细胞收获前培养另外16-

18h。数据代表来自两个供体的实验。表达hOX40配体的CD32-L细胞(CD32-L/hOX40L)作为正对照,而人和小鼠IgG1作为负对照。

[0247] 在图28的实验中,将新鲜分选的初始CD4⁺T细胞用由四种浓度的抗CD3抗体加上2μg/ml的抗人OX40 mAb克隆106-222(Hu222)抗体或对照抗体包被的CD32-L细胞刺激。刺激后三天,加入放射性同位素氚并且在细胞收获前培养另外16-18h。数据代表来自两个供体的实验。CD32-L/hOX40L作为正对照,而人和小鼠IgG1作为负对照。

[0248] 在图29的实验中,将新鲜分选的初始CD4⁺T细胞在CD4⁺CD25^高CD127^低Treg存在的情况下以三种Treg:T效应子比例培养和并且用由0.2μg/ml的抗CD3抗体加上10μg/ml的抗人OX40mAb克隆119-122抗体或对照抗体包被的CD32-L细胞刺激。刺激后三天,加入放射性同位素氚并且在细胞收获前培养另外16-18h。数据代表三个实验。CD32-L/hOX40L作为正对照,而人和小鼠IgG1作为负对照。

[0249] 实施例IV

[0250] 由于抗体在经由静脉注射给予患者时将遇到全部外周血单核细胞(PBMC),因此我们在我们的增殖测定中使用PBMC作为抗原递呈细胞(APC)检测了我们的抗人OX40抗体刺激T细胞增殖的能力。然而,我们在使用PBMC作为APC时用我们的小鼠抗人OX40 mAb获得高度变化的数据而在我们用单核细胞作为APC时未见到,表明我们的抗体需要某种利于活性的交联。为了检测这一可能性,将板用我们的抗人OX40 mAb和抗CD3包被并用于在辅佐细胞不存在的情况下刺激CD4⁺或CD8⁺T细胞增殖。图30显示抗人OX40抗体增强CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的结果。

[0251] 将新鲜分选的1x10⁵个CD4⁺CD25^低CD45RO-CD45RA⁺初始T细胞(图30A)或CD3⁺CD8⁺T细胞(图30B)用结合板的抗CD3(3μg/ml)和抗人OX40小鼠mAb(2μg/ml)刺激。在培养第三天加入氚化胸腺嘧啶并在孵育另外15小时后收获细胞。通过胸腺嘧啶掺入评估T细胞的增殖。抗人OX40mAb来源于三个杂交瘤融合。融合数目之后的数目表示特定的抗体。小鼠IgG1和119-42作为正对照。每个处理一式三份进行。显示来自4个T细胞供体代表性数据(图30C)。所有三种人源化抗人OX40 mAb[Hu106-222和Hu119-122;Hu106-222AA和Hu119-122AA(AA表示Fc结合残基中的两个被突变为氨基酸丙氨酸)和Ch119-122(除了保留小鼠可变区“互补位”之外与人源化119-122类似)]刺激CD4⁺T细胞增殖。抗CD28作为负对照。

[0252] 如图30所示,图板A和B显示与结合板的小鼠抗人OX40 mAb以10至40倍的范围有力地刺激初始CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的增殖。我们将我们的实验延伸到我们的人源化抗人OX40 mAb并且发现三种版本的我们的人源化抗体,无论是完全人源化的、嵌合的或其中可能负责结合Fc受体的残基被改变为丙氨酸的AA突变体,都是初始CD4⁺T细胞增殖的有力的刺激剂(图30C)。

[0253] 图31显示小鼠和人源化抗人OX40抗体需要交联以便增强T细胞增殖。将新鲜分选的初始CD4⁺T细胞用结合板的抗CD3(3μg/ml)加上结合板的或溶解的人源化抗人OX40mAb(2μg/ml)在辅佐细胞不存在的情况下刺激。在培养第三天加入氚化胸腺嘧啶并在孵育另外15小时后收获细胞。通过胸腺嘧啶掺入评估T细胞的增殖。小鼠IgG1和抗CD28分别作为正对照和负对照。显示来自于两个供体的代表性数据。将初始CD4⁺T细胞在辅佐细胞不存在的情况下用结合板的抗CD3刺激。第二天,将抗人OX40mAb 119-122(2μg/ml)单独或与等量的抗Fc第二抗体组合加入。如图板A中所描述的评估细胞增殖。

[0254] 将我们的人源化抗人OX40mAb Hu106-222和Hu119-122的效力与抗CD28的相比较。相反,当将溶解的抗人OX40抗体加至T细胞培养物时,刺激性作用被终止(图31A)。然而,当将溶解的抗人OX40mAb 119-122与F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG、Fc片段特异性二级抗体一起加入时,刺激性作用被恢复(图31B)。这些结果证实抗人OX40 mAb需要交联以便它们的生物学活性。

[0255] 为了评估我们的激动型的抗人OX40 mAb阻断CD4⁺CD25^高CD127⁺nTreg的抑制性功能的能力,我们在CD4⁺CD25^低CD127⁺CD45RO⁺T效应子细胞(Teff)和CD4⁺nTreg存在的情况下进行了增殖测定。通过使用我们的板结合系统(其中抗人OX40mAb与抗CD3一起被包被在板上)并且在辅佐细胞不存在的情况下,我们的抗人OX40小鼠mAb中的十二个(222、132、8B、33A、43、58B、122、157A、173B、220C、140A、270)有力地抑制nTreg抑制(图32A和32B)。尽管在这些测定中所用的nTreg与T效应子细胞的比例是1:1,但是这些抗体能够刺激T效应子细胞增殖在nTreg不存在的情况下由T效应子细胞获得的百分比以上10至35个百分比。我们的人源化抗人OX40 mAb同样以相似的水平逆转nTreg的抑制性功能(图32C)。这些结果相结合表明我们的抗人OX40小鼠mAb是OX40的有力的刺激剂,导致T细胞增殖的显著增强和nTreg抑制性功能的抑制。而且,我们的人源化抗人OX40 mAb保留了它们亲本小鼠抗体的有力的生物活性。

[0256] 图32显示抗人OX20 mAb阻断CD4⁺FOXP3⁺nTreg的活性。CFSE标记的CD4⁺CD25⁻CD45RO⁺T效应子细胞和CD4⁺FOXP3⁺Treg来自于相同的健康供体。将T细胞用溶解的抗CD28(0.5μg/ml)和结合板的抗CD3(3μg/ml)和抗人OX40mAb(2μg/ml)刺激。通过对CFSE稀释的流式细胞计数评估T效应子细胞的增殖。nTreg与T效应子细胞的比例是1:1。小鼠IgG1作为正对照。初始CD4⁺T细胞作为对照T细胞以证实效应子细胞增殖被nTreg特异性抑制。图32A是代表性FACS数据,显示在初始CD4⁺T细胞、nTreg或nTreg加上the抗人OX40 mAb119-33A存在的情况下T效应子细胞的增殖。图32B显示在用小鼠抗人OX40 mAb处理后的nTreg存在的情况下T效应子细胞增殖的百分比(所测试的20个)。图32C显示所有三种版本的人源化抗人OX40 mAb恢复T效应子细胞的增殖。

[0257] 近来的报道显示OX40触发可诱导表达OX40的人T细胞系的凋亡(Yoshiaki Takahashi et al., 200B, Aids Research and human Retroviruses, 24)。我们因此测试了单核细胞存在的情况下逐渐增加浓度的抗人OX40 mAb 106-222加上固定的低剂量的抗CD3对三种T细胞亚类的存活率的影响。图33A显示高浓度的抗人OX40mAb 106-222(20-30μg/ml)优选地杀死活化的FOXP3⁺nTreg而活化的初始和记忆CD4⁺T对这一作用具有耐性或不那么敏感。为了测试抗人OX40 mAb是否直接作用于Treg以诱导细胞死亡,我们在辅佐细胞不存在的情况下进行了新的实验。图33B显示与抗CD3组合的强的OX40信号传导在辅佐细胞不存在的情况下特异性杀死nTreg。为了证实抗人OX40 mAb介导的杀死作用模拟经由天然OX40配体的OX40触发,我们使用过量表达OX40的小鼠成纤维L细胞系并将其用于在低剂量CD3存在的情况下刺激nTreg并且获得对nTreg的相似的杀死作用(图33C)。这些结果表明强烈的OX40触发杀死表达OX40的Treg细胞。

[0258] 特别地,图33显示高浓度的抗人OX40 mAb优先杀死FOXP3⁺Treg。在图33A中,T细胞亚类(初始的,CD4⁺CD25^低CD127⁺CD45RO⁻CD45RA⁺;记忆的,CD4⁺CD25^低CD127⁺CD45RA⁻CD45RO⁺和nTreg,CD4⁺CD25^高CD127^低)每种与等比例的CD14⁺单核细胞在可溶抗CD3(0.3μg/ml)和逐渐

增加浓度的小鼠抗人OX40 mAb 106-222存在的条件下培养。培养3天后通过流式细胞计数对有活力的淋巴细胞设门分析确定细胞生活力。显示来自两个T细胞供体的数据。图33B和33C显示OX40的强烈触发杀死CD4⁺FOXP3⁺Treg。图33B显示将CD4⁺FOXP3⁺Treg用结合板的抗CD3(2μg/ml)加上溶解的119-122mAb(30μg每百万个细胞)或小鼠IgG1对照抗体刺激。培养一天后用血细胞计数器对锥虫蓝阴性活细胞计数。图33C显示将CD4⁺FOXP3⁺Treg用溶解的抗CD3(0.2μg/ml)加上L细胞或表达hOX40配体的L细胞(L/hOX40L)刺激。刺激一天之后将活细胞计数。

[0259] 接下来我们寻求确定抗人OX40 mAb是否直接作用于T细胞以阻断nTreg抑制性功能。将新鲜分选的CD4⁺T效应子细胞或nTreg用抗CD3预活化过夜并且之后用抗人OX40 mAb冲击4小时。之后将T效应子细胞清洗、用CFSE标记并在等量的CD14⁺单核细胞和抗CD3存在的情况下与nTreg共培养。相似地,将预刺激的nTreg清洗并与未处理的CFSE标记的T效应子细胞一起培养。

[0260] 图34显示抗人OX40 mAb直接作用于T细胞以阻断Treg的抑制性功能。图34A显示抗人OX40 mAb直接作用于效应子记忆T细胞以赋予它们对经由nTreg的抑制的抗性。将CD4⁺CD25^低CD127⁺CD45RA⁻CD45RO⁺记忆T细胞用结合板的抗CD3(0.8μg/ml)在培养基(RPMI/10% FCS/P/S加上30IU/ml的IL-2)中刺激12小时,之后在培养基中用抗人OX40 mAb(119-122, 22 μg每50万个细胞)冲击4小时,清洗3次并且将8x10⁴的CFSE标记的效应子T细胞与逐渐降低比例的nTreg一起培养。通过对CFSE稀释的流式细胞计数评估效应子T细胞的增殖。抗人OX40mAb作用于Treg使得它们不能够抑制T效应子细胞增殖(图34B)。将CD4⁺CD25^高CD127^低nTreg用结合板的抗CD3(2μg/ml)培养基中预刺激12小时,之后用抗人OX40 mAb、119-122或106-222或对照抗体抗(ICOS或小鼠IgG1)冲击,如图板A中所描述的,清洗并用CFSE标记的T效应子记忆细胞培养。通过对CFSE稀释的流式细胞计数分析评估效应子T细胞的增殖。

[0261] 用抗人OX40mAb处理的T效应子细胞开始对经由nTreg细胞的抑制有抗性(图34A)。相反,用小鼠IgG1对照抗体处理的T效应子细胞的增殖仍然对经由nTreg的抑制敏感。图34B显示用抗人OX40mAb处理的nTreg不能够抑制T效应子细胞的增殖。相反,用对照抗体例如抗ICOS或小鼠IgG1处理的nTreg保留抑制性。这些结果表明我们的OX40mAb直接作用于T效应子细胞和nTreg两者以恢复T效应子细胞增殖

[0262] 实施例V

[0263] 补充的体内预备数据 displays 进入小鼠的抗人OX40抗体增强小鼠中的T细胞扩展和肿瘤排斥。之前显示了抗人OX40mAb可在用人OX40转导的小鼠CD8⁺T细胞中特异性地活化NF-κB级联。为了确定抗hOX40mAb是否能够通过促进效应子CD8⁺T细胞体内存活和同种细胞扩展来增强肿瘤排斥,将用荧光酶基因和hOX40转导的转基因Pme1 CD8⁺T细胞适当地转移至负载无色素MC38肿瘤的C57BL/6白化小鼠中。适当转移所转导的T细胞之后,将小鼠用Ab处理。发现与用IgG1对照抗体处理的小鼠相比用抗hOX40 mAb处理的小鼠中在第4天明显更多的人OX40⁺荧光酶⁺Pme1T细胞移行至肺中(图35B),表明小鼠中的hOX40触发促进CD8⁺T细胞扩展。在处理第8天(数据未显示)和第12天,发现用抗hOX40mAb处理的同组小鼠与用IgG1处理的对照组小鼠相比在肿瘤位点恢复明显更多的荧光酶⁺Pme1T细胞(图35B),再次表明小鼠中的hOX40触发促进CD8⁺T细胞存活。最后,接受hOX40⁺Pme1 CD8⁺T细胞并随后用抗hOX40 mAb处理的小鼠的肿瘤尺寸与接收未转导的Pme1T细胞并用抗hOX40 mAb或hOX40⁺

Pme1T细胞处理之后用对照小鼠IgG1匹配抗体处理的小鼠的那些相比明显更小。这些结果显示小鼠中人OX40的触发导致与小鼠OX40的那些相似的生物学作用(Gough MJ et, 2008)。因此,所述数据证明抗人OX40 mAb刺激CD⁺T细胞体内扩展和存活并增强肿瘤排斥的能力。

[0264] 抗人OX40 mAb促进T细胞体内扩展和存活。

[0265] 我们的治疗性疫苗接种方案示于图35A中。将5只一组的C57BL/6白化小鼠用 5×10^5 个无色素的MC38/gp100肿瘤细胞皮下(S.C)植入(第0天)。在第6天,通过施用350cGy剂量的放射诱导淋巴细胞减少。在第7天,将 1×10^6 个具有或不具有人OX40表达的荧光酶转导的Pme1-1T细胞适当地转移至负载肿瘤的小鼠中($n=5$ 只每组),之后静脉注射 5×10^5 Gp100肽脉冲的DC。T细胞转移后将重组的人IL-2腹膜内施用3天。在第7、9和11天分别用每次注射每只小鼠100, 50和50 μ g施用抗体(图35B)。体内生物发光成像显示在第4和12天肺和肿瘤位点中表达荧光酶的CD8⁺pme1-1T细胞的累积。显示在第4和12天时每组五只小鼠中的两只(图35C)。肿瘤响应于使用抗hOX40 mAb的处理。每3天测量肿瘤大小。将Pme1-1和Pme1-1加上小鼠IgG1作为对照。

序列表

<110> 德克萨斯州立大学董事会

<120> 抗OX40抗体和使用其的方法

<130> UTFC. P1193WO

<140>

<141>

<150> 61/380,827

<151> 2010-09-08

<150> 61/375,999

<151> 2010-08-23

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 1

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠属

[0001]

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 3

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 4

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

[0002] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 6

<211> 458

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多核苷酸

<400> 6

actagtacca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt 60

atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca 120

gtcaagggtt cctgcaaggc ttctggttat accttcacag actattcaat gcactgggtg 180

cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactgggtgag 240

ccaacatatg cagatgactt caagggacgg ttgtgtctct ctttgacac ctctgtcagc 300

actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct 360
aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actgggggtca gggaaccacg 420
gtcacctgtc cctcaggtaa gaatggccic tcaagctt 458

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 7
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 8
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 9
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

[0003]

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 11

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 12

<211> 416

<212> DNA

<213> 人工序列

[0004]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸

<400> 12

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtccttctgtat tcgtgtttct ctggttgtct 60

ggtgttgacg gagacattca gatgaccacg tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga 120

gacagggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctggtat 180

caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact 240

ggagtcctt cagcgttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc 300

agtcgtcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg 360

acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 13

Ser His Asp Met Ser
 1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 14

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
 1 5 10 15

Arg

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 15

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> 小鼠属

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

[0005]

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 451
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸

<400> 18
actagtacca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt 60
gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc 120
ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc 180
cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tgggtggtagc 240
acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
tcactgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360
agacactatg atgattacta cgcttggttt gcttactggg gcccaaggac tatggtcact 420
gtctcttcag gtgagtccta acttcaagct t 451

[0006]

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 19
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 20
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 21
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 111

<212> PRT
<213> 小鼠属

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007] <220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24
<211> 428
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的多核苷酸

	<400> 24	
	gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctgggttcca	60
	ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta cttatcttt gtctccagg	120
	gaaaggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat	180
[0008]	atgcactggt accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcattc	240
	aacctagaat ctggggctcc tgccagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc	300
	ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg	360
	gagcttcgc tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt	420
	ctgaattc	428

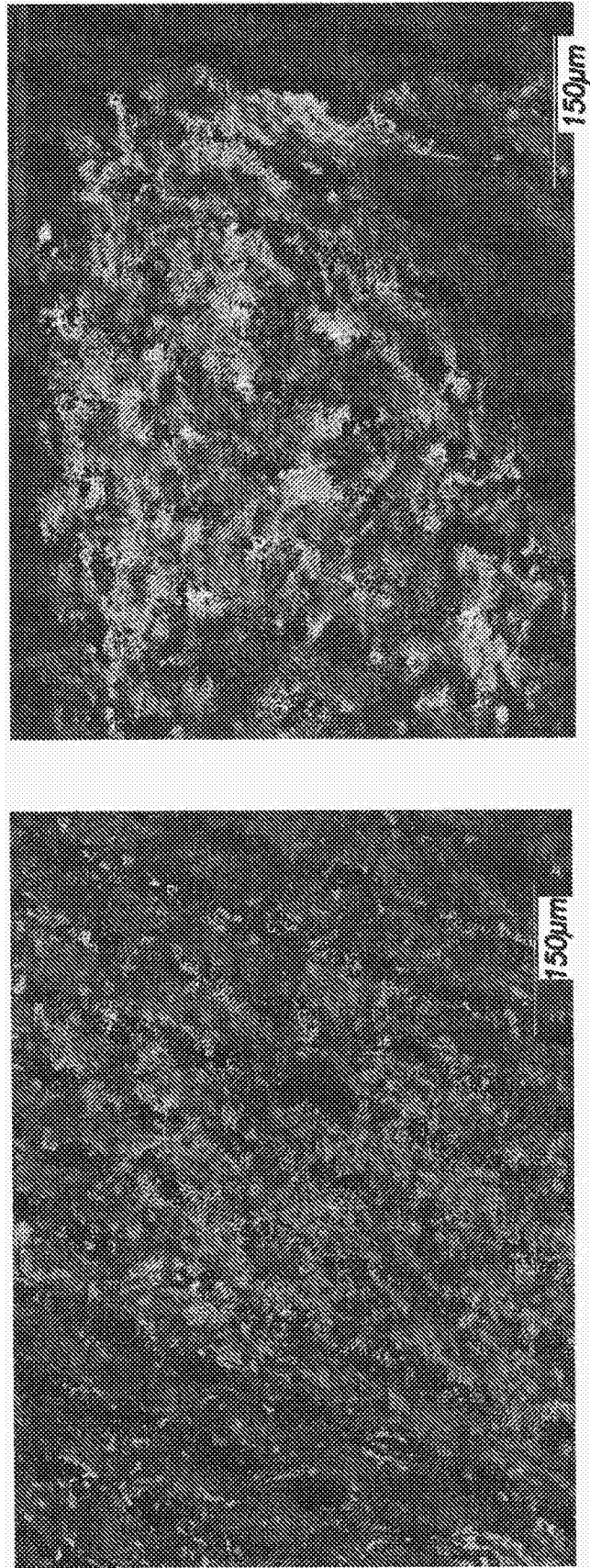


图1

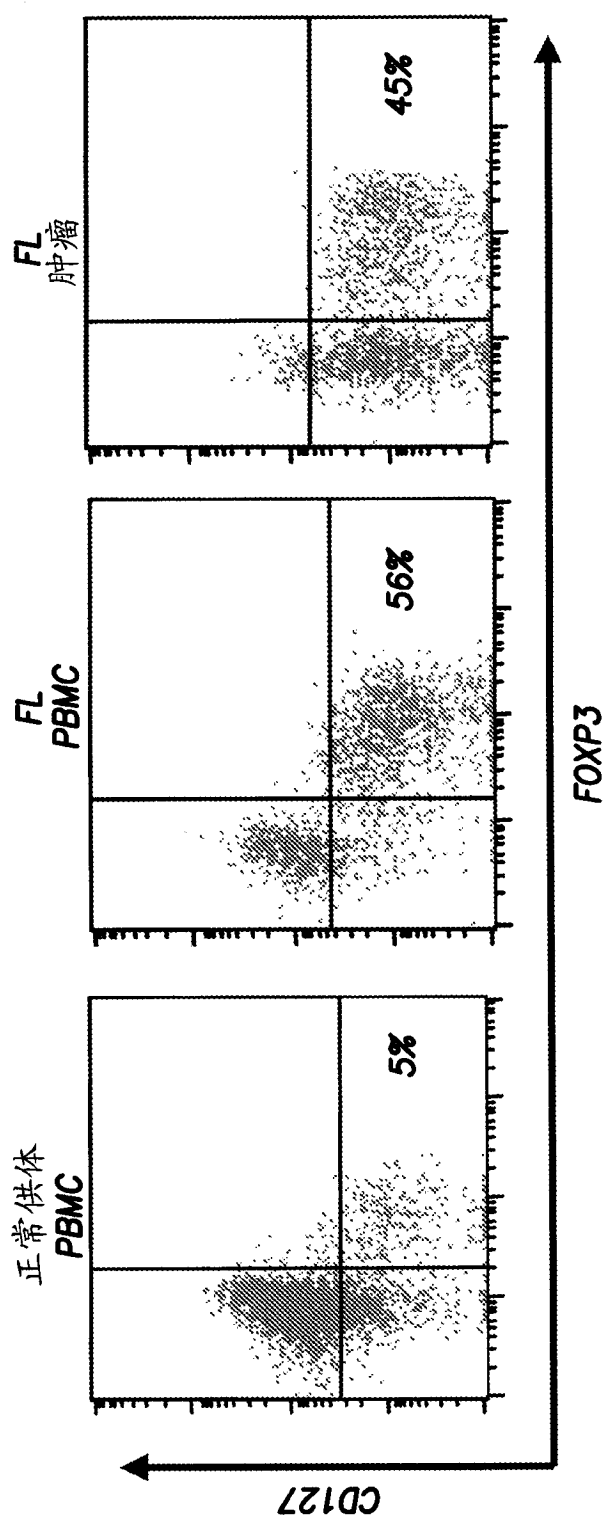


图2A

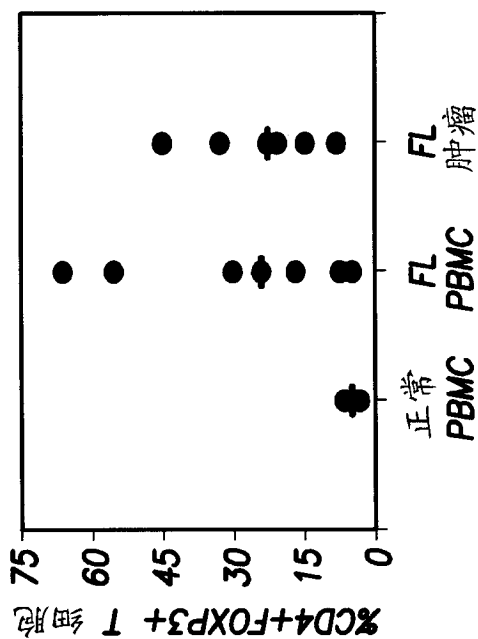


图2B

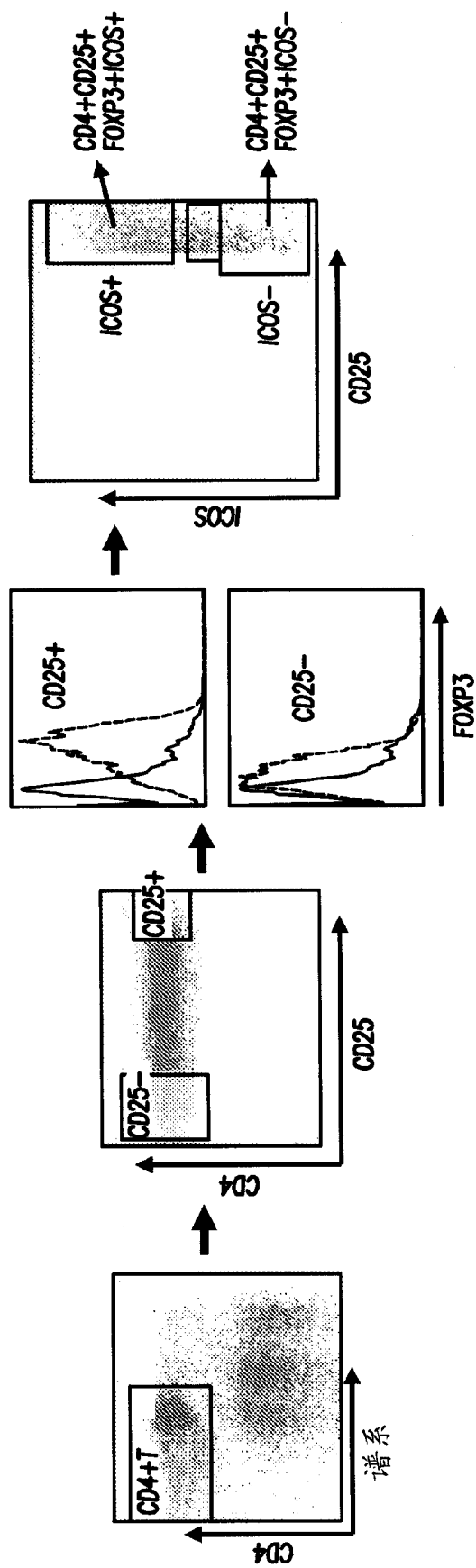


图3

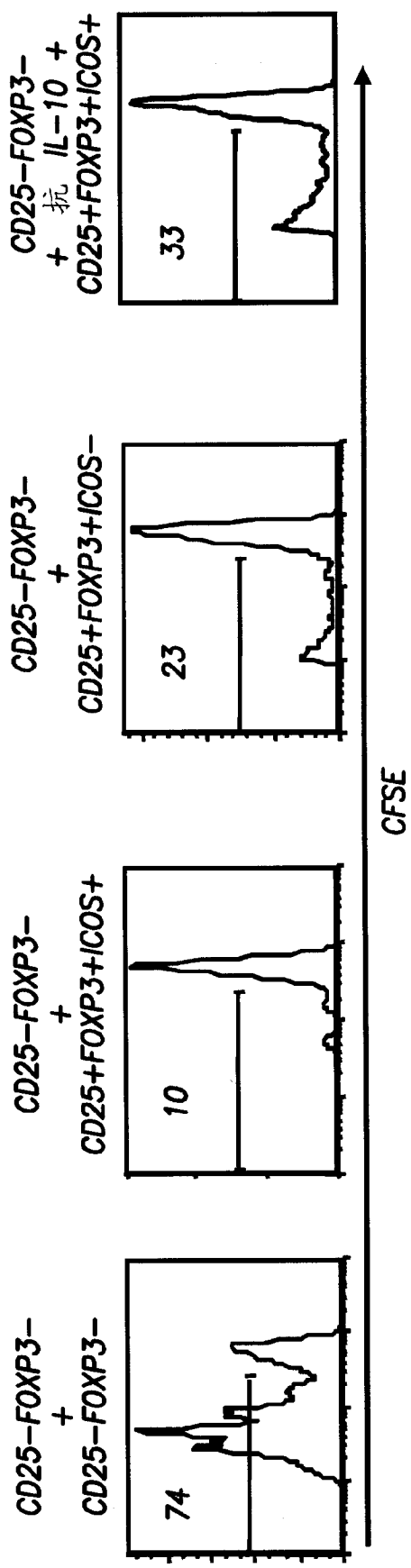


图4

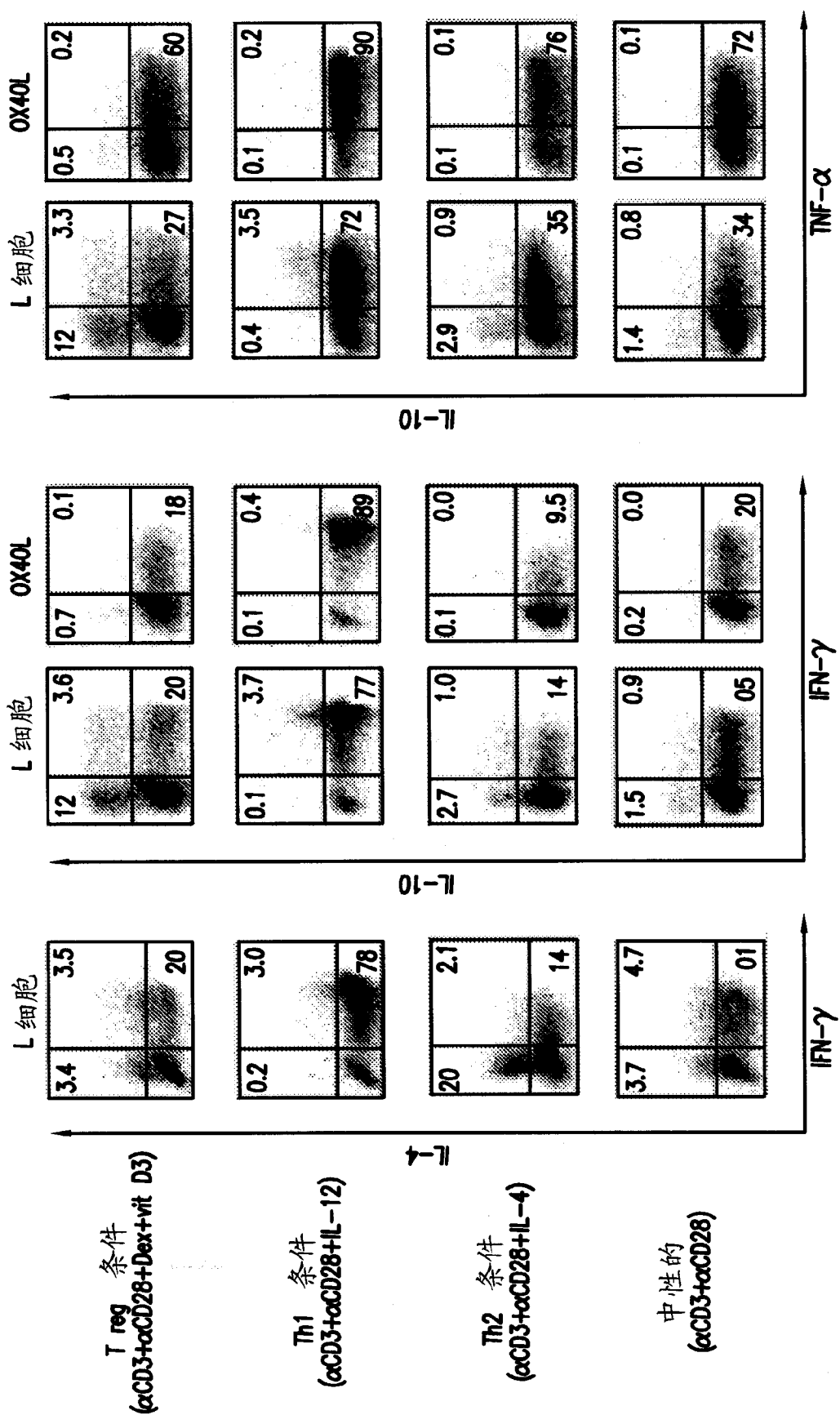


图5A

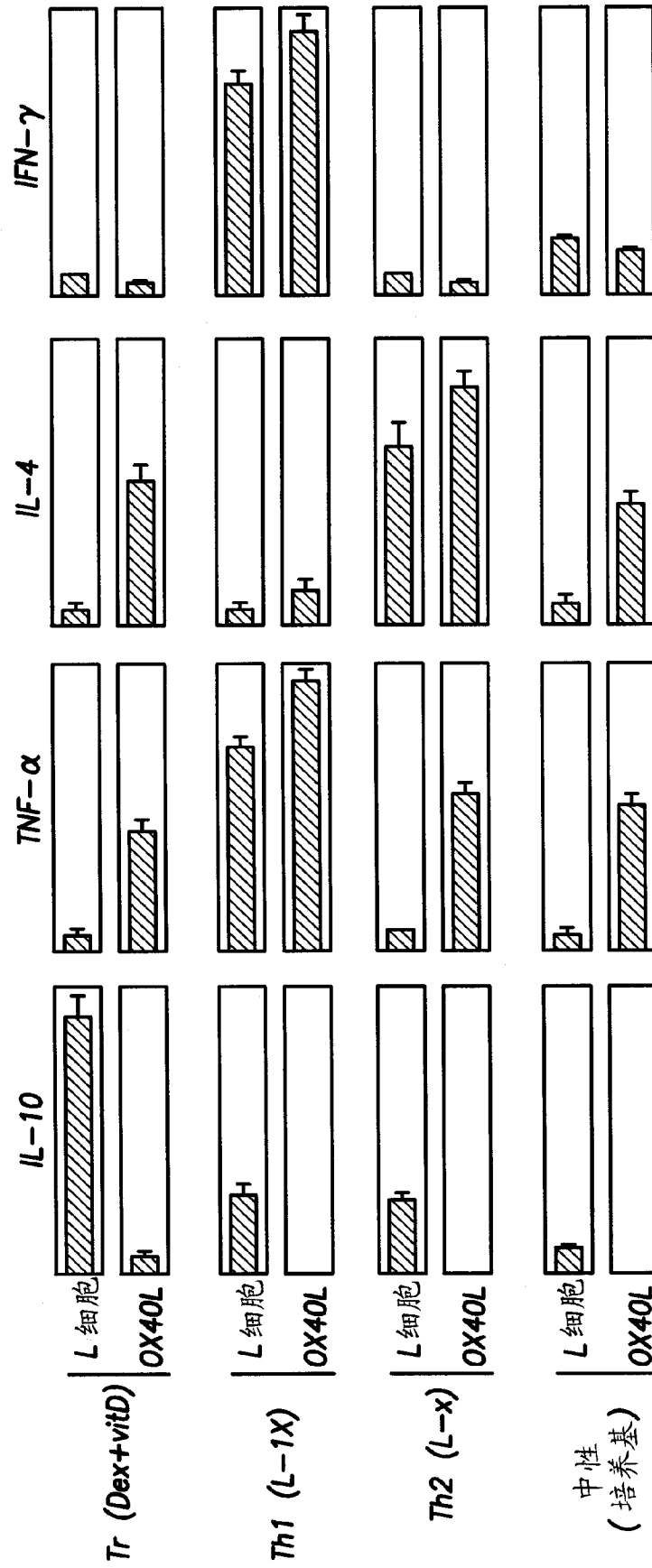


图5B

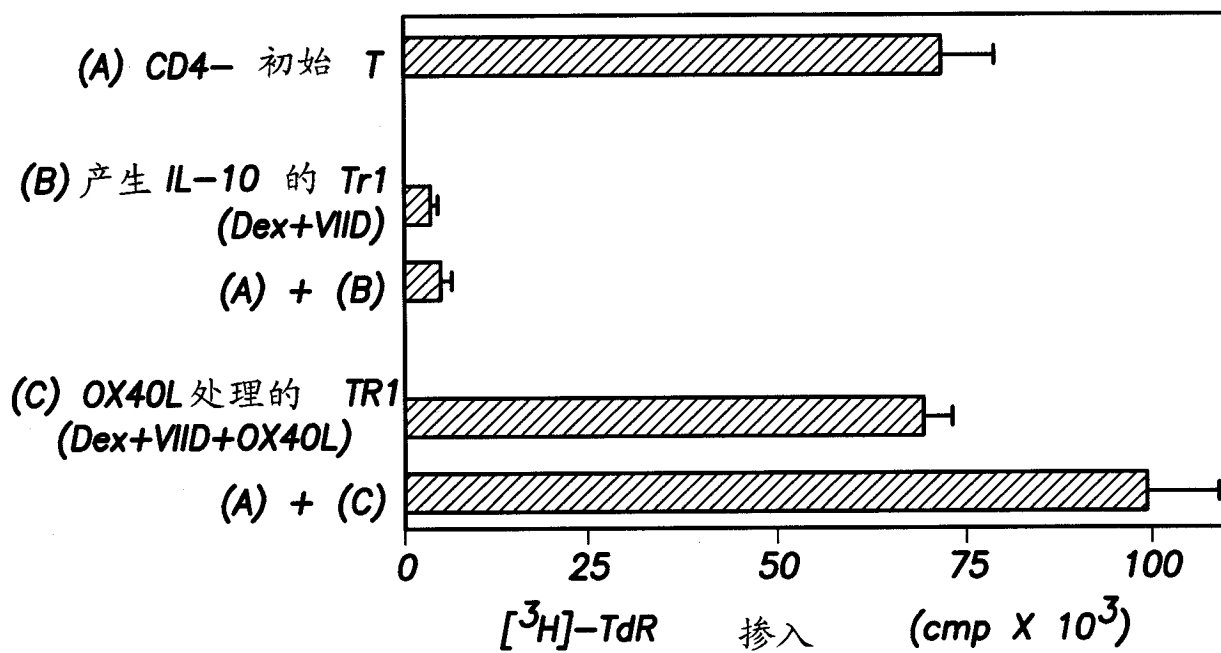


图5C

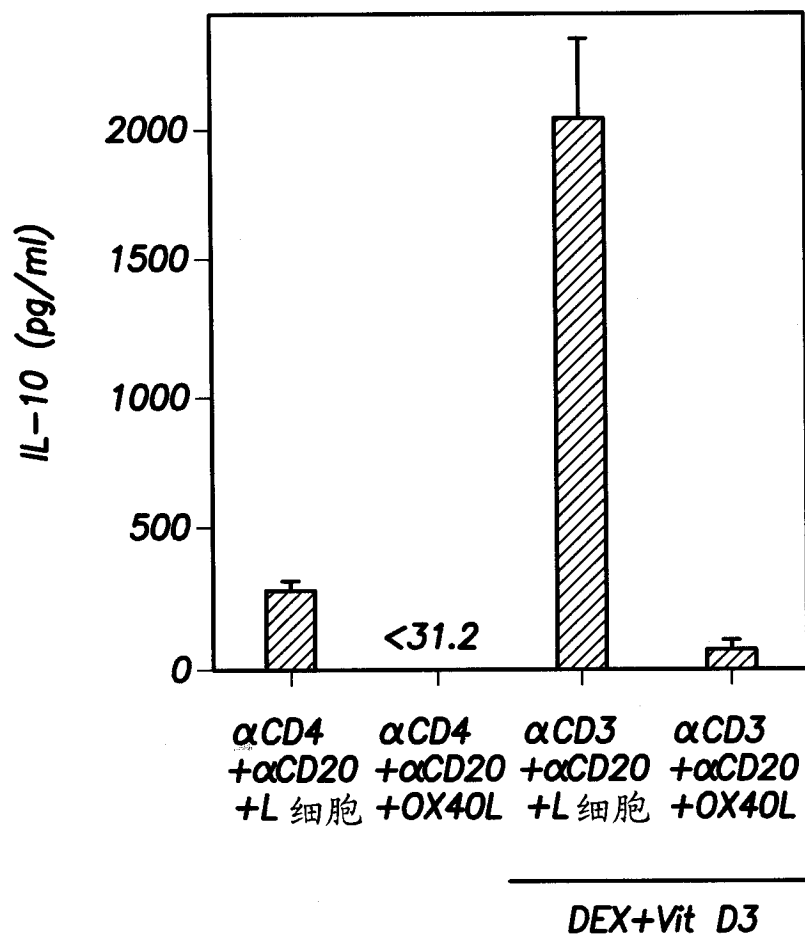


图6B

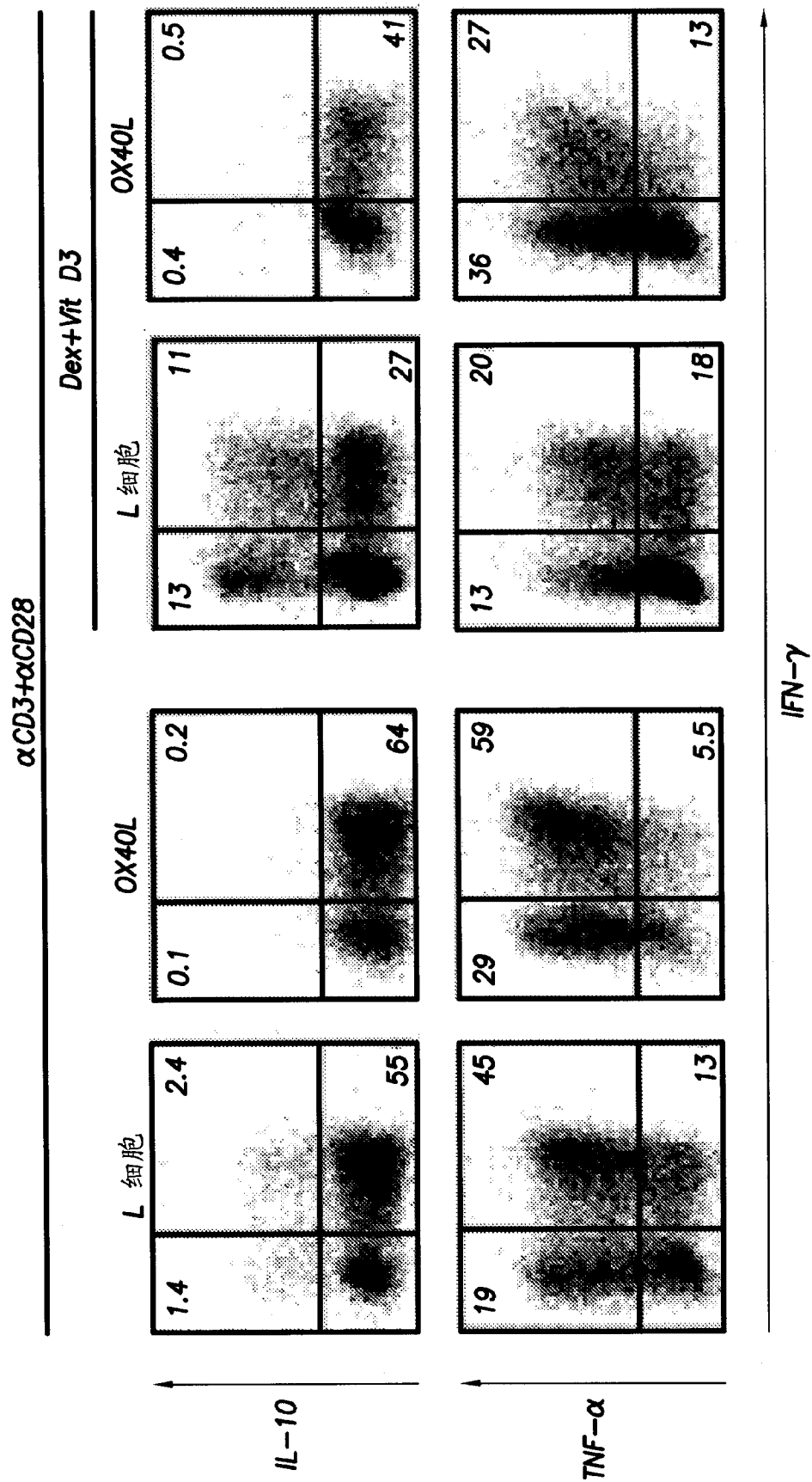


图6A

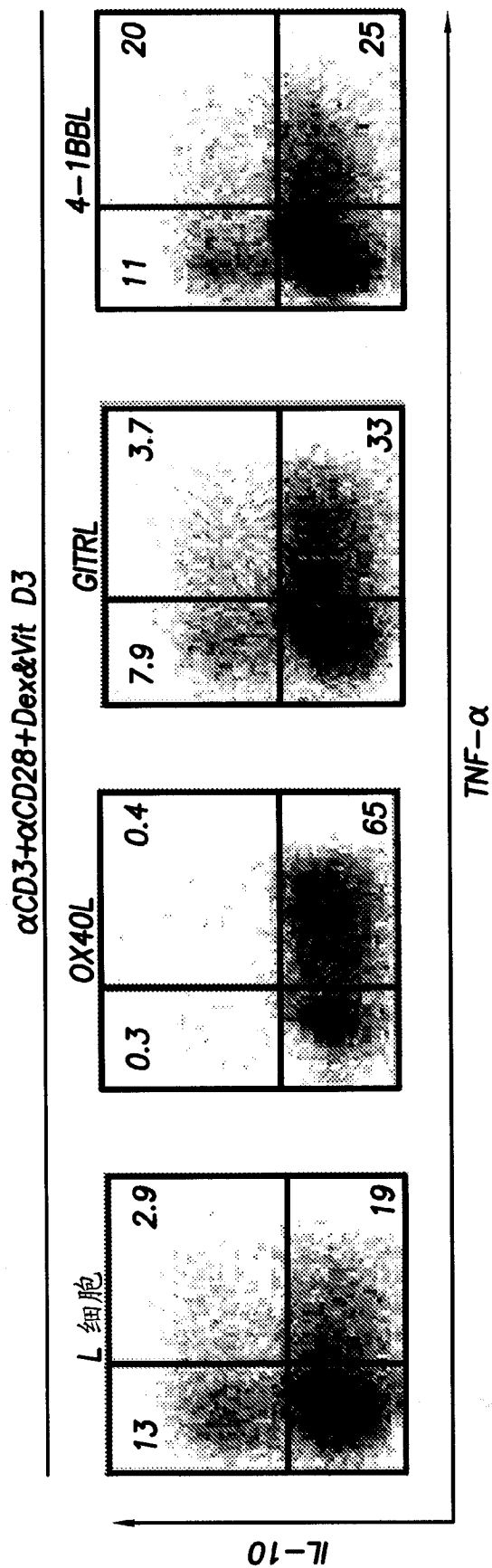


图7A

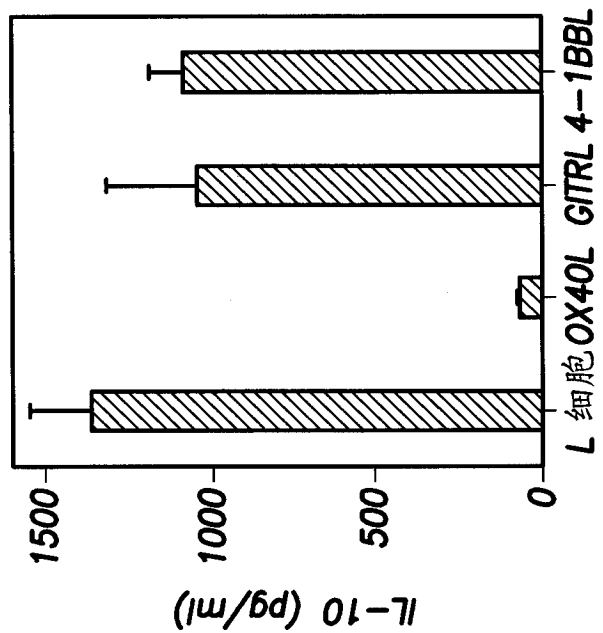


图7B

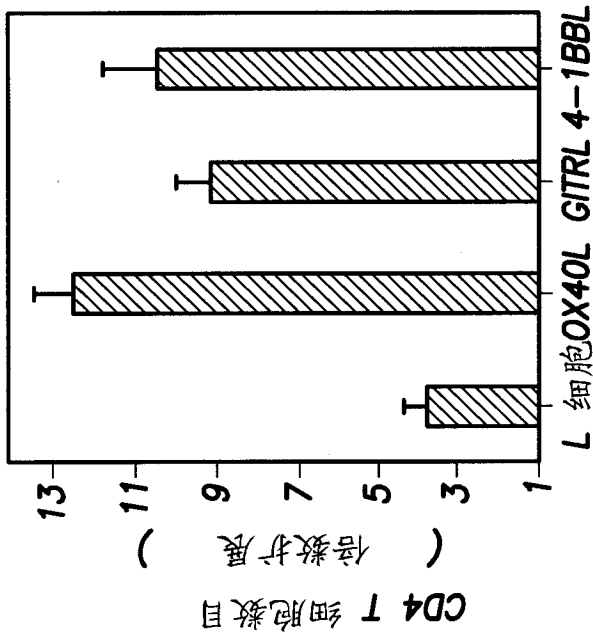


图7C

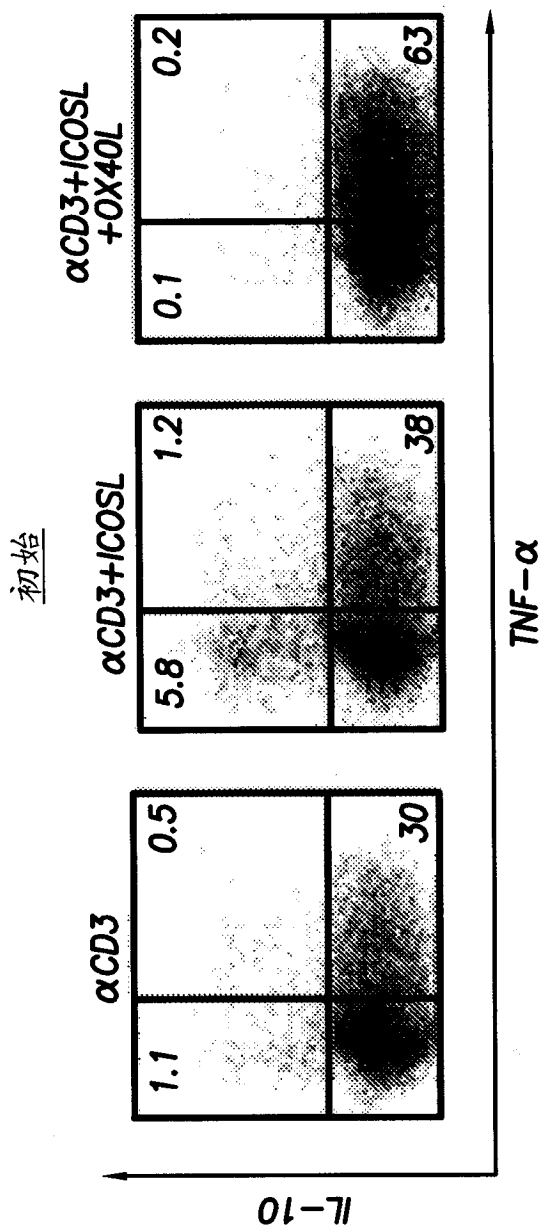


图8A

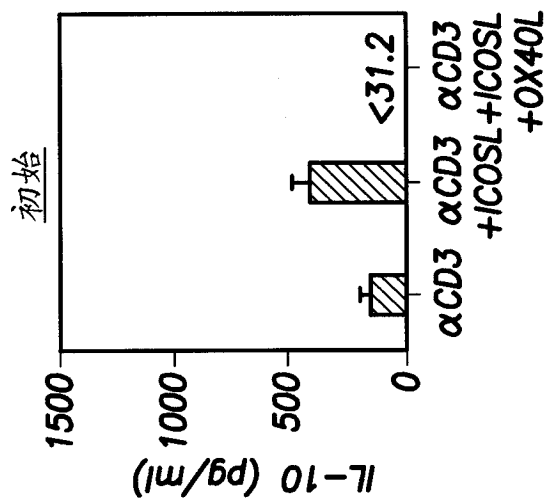


图8B

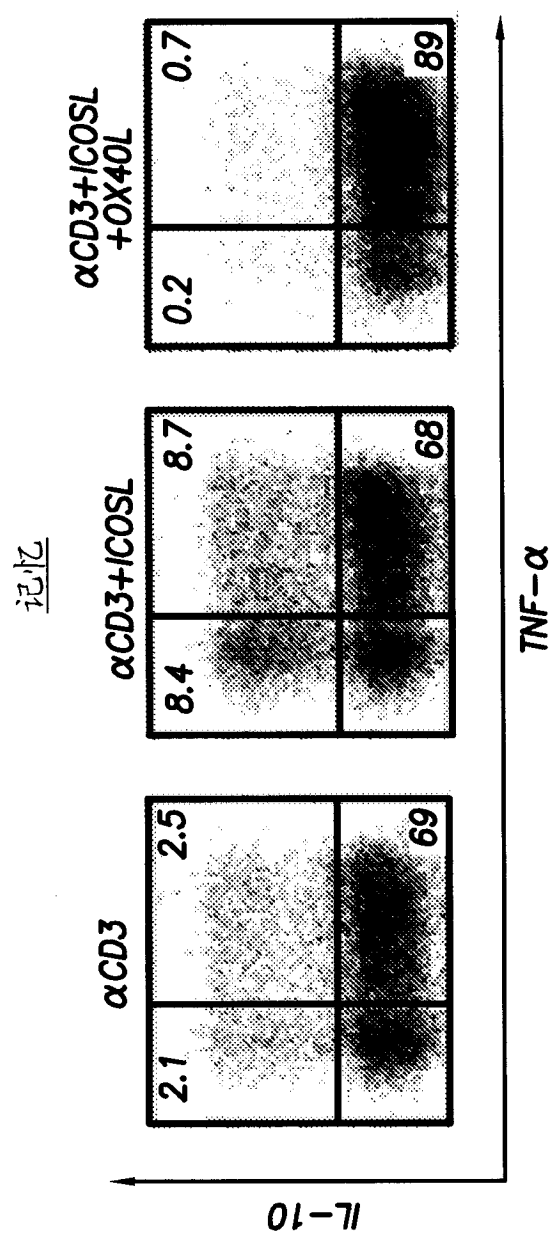


图8C

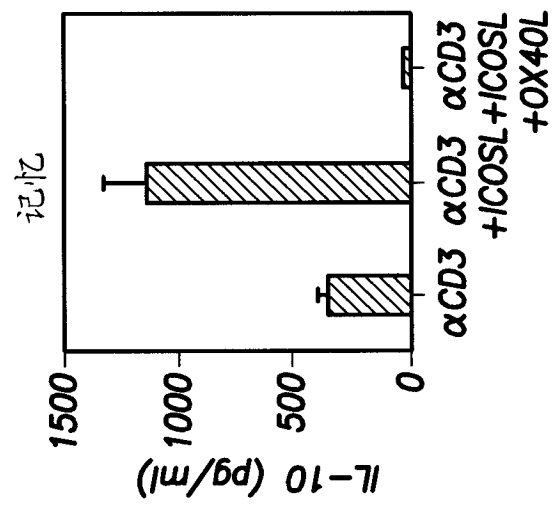


图8D

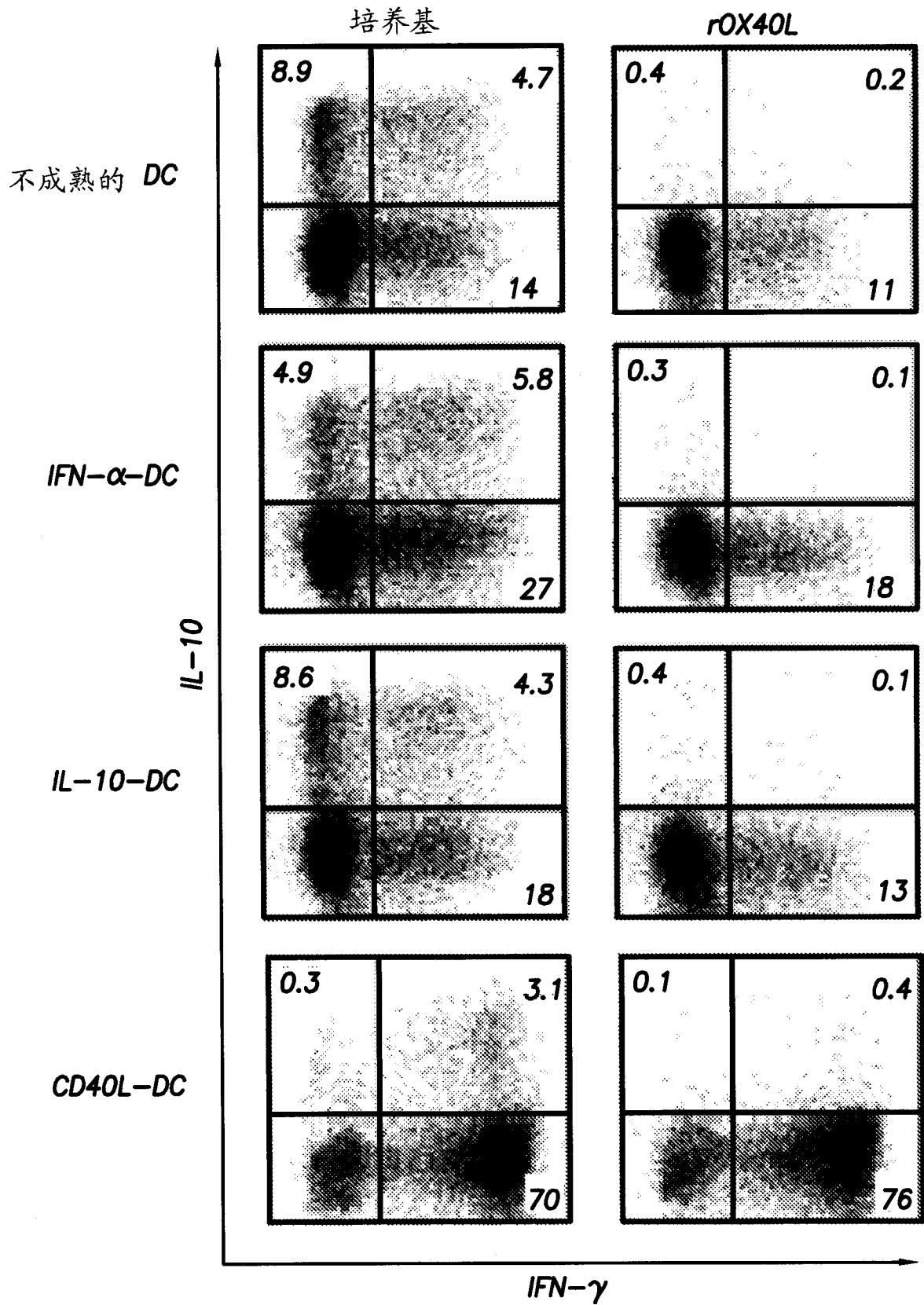


图8E

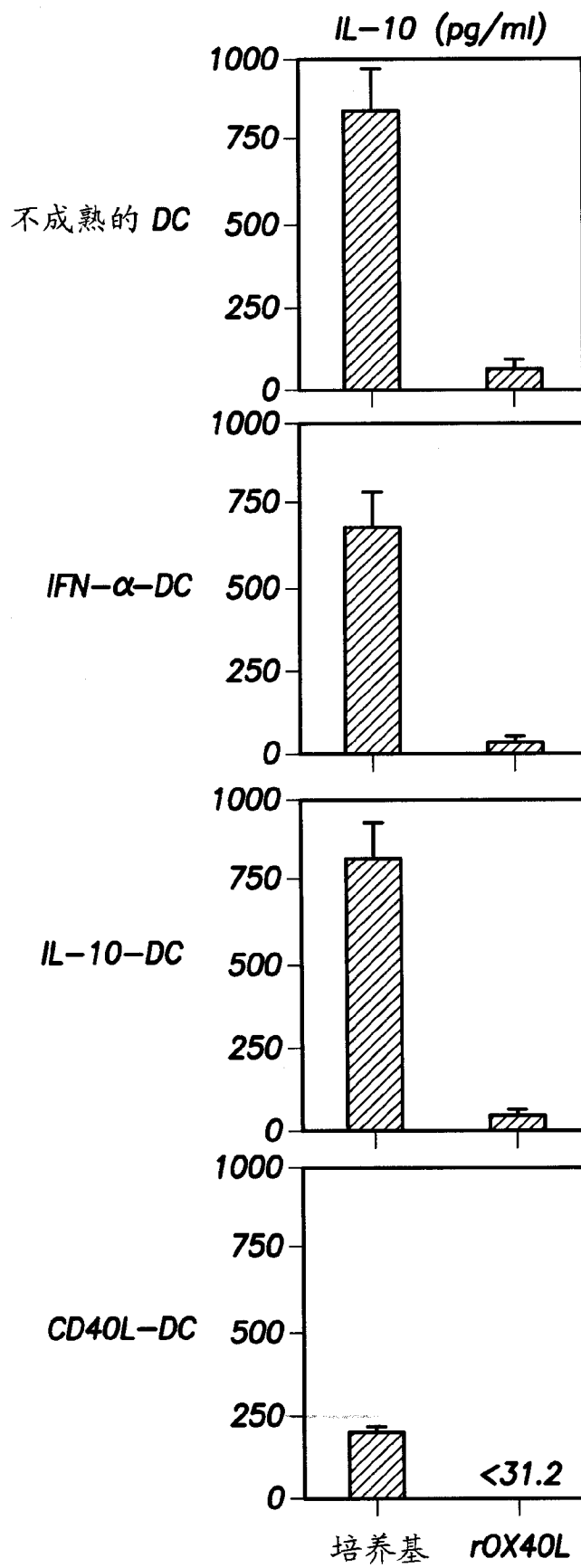


图8F

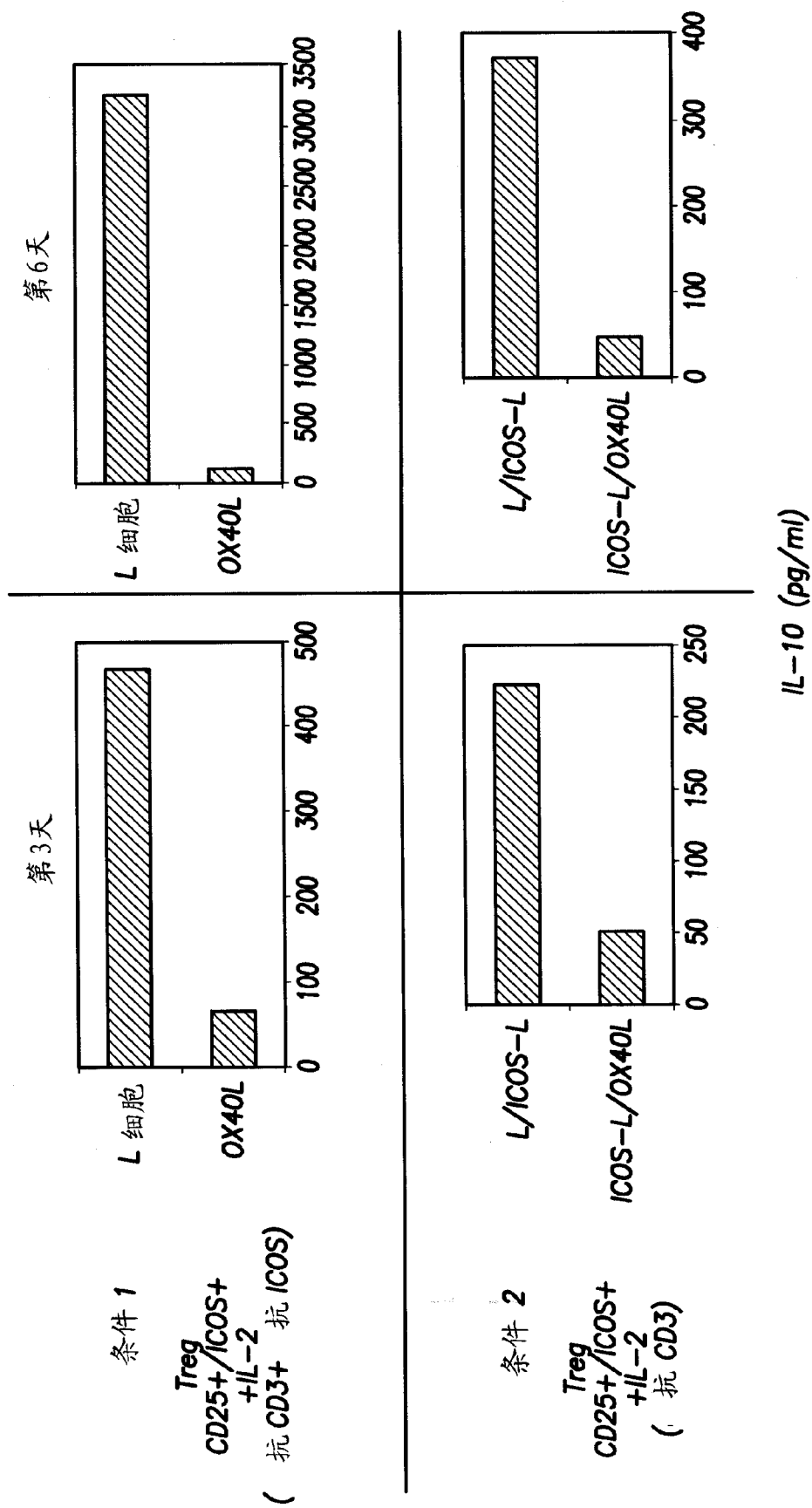


图9

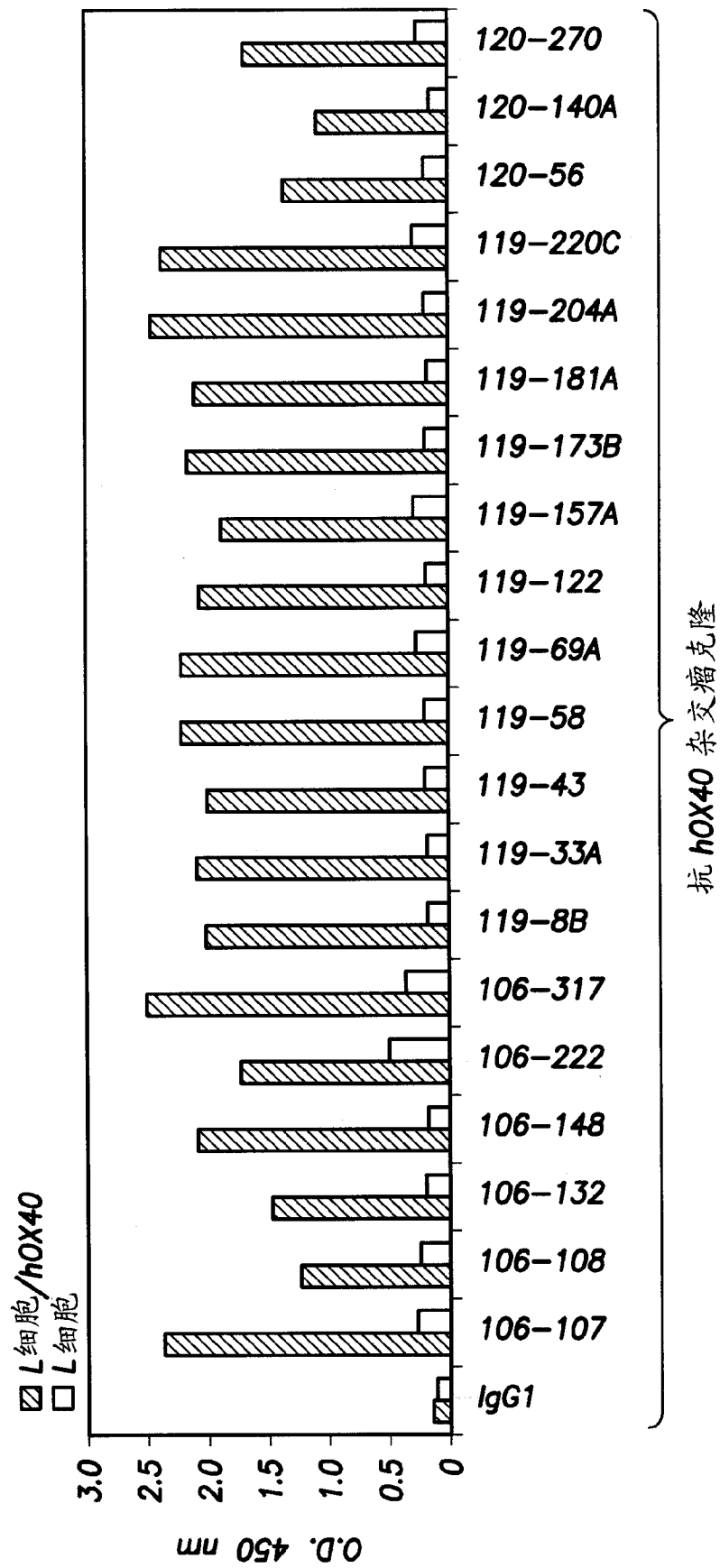


图10

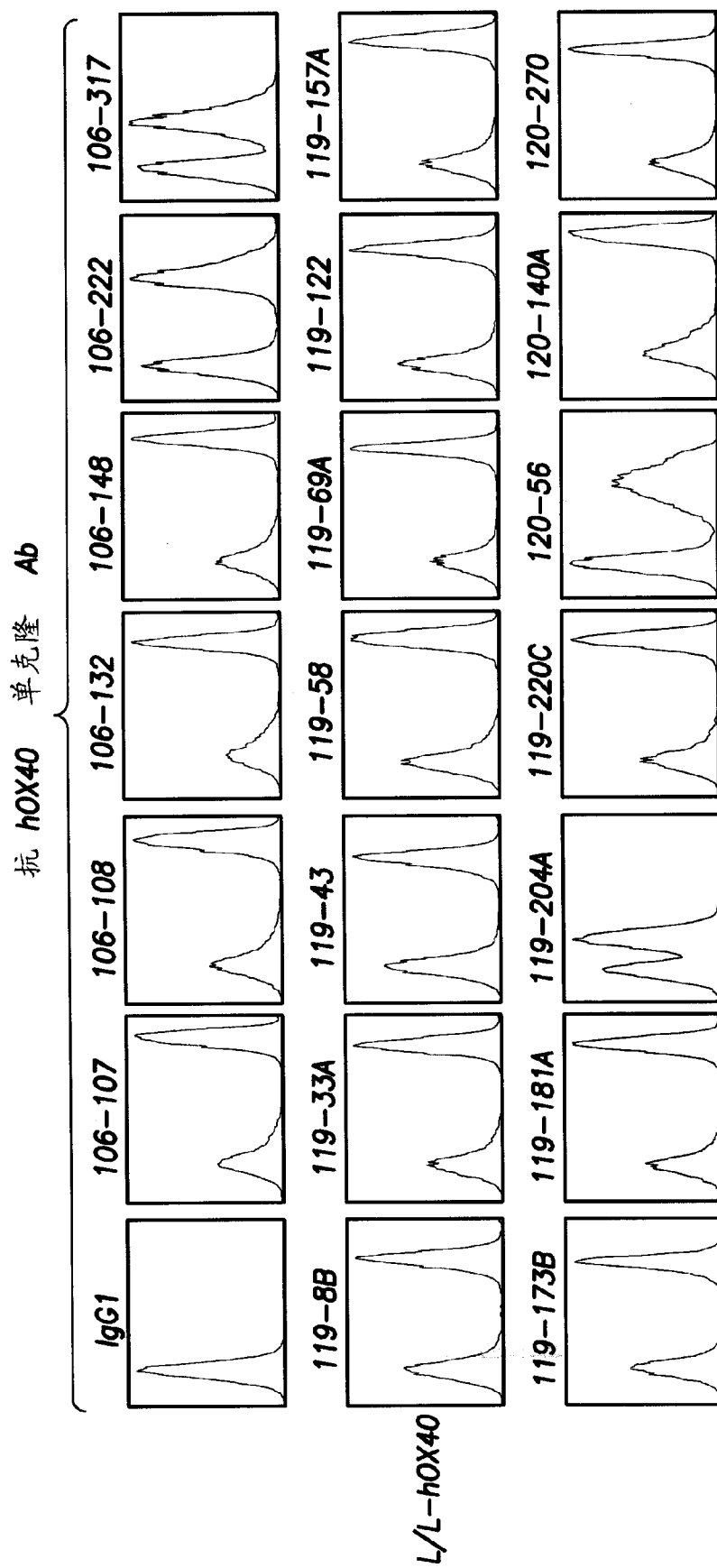


图11

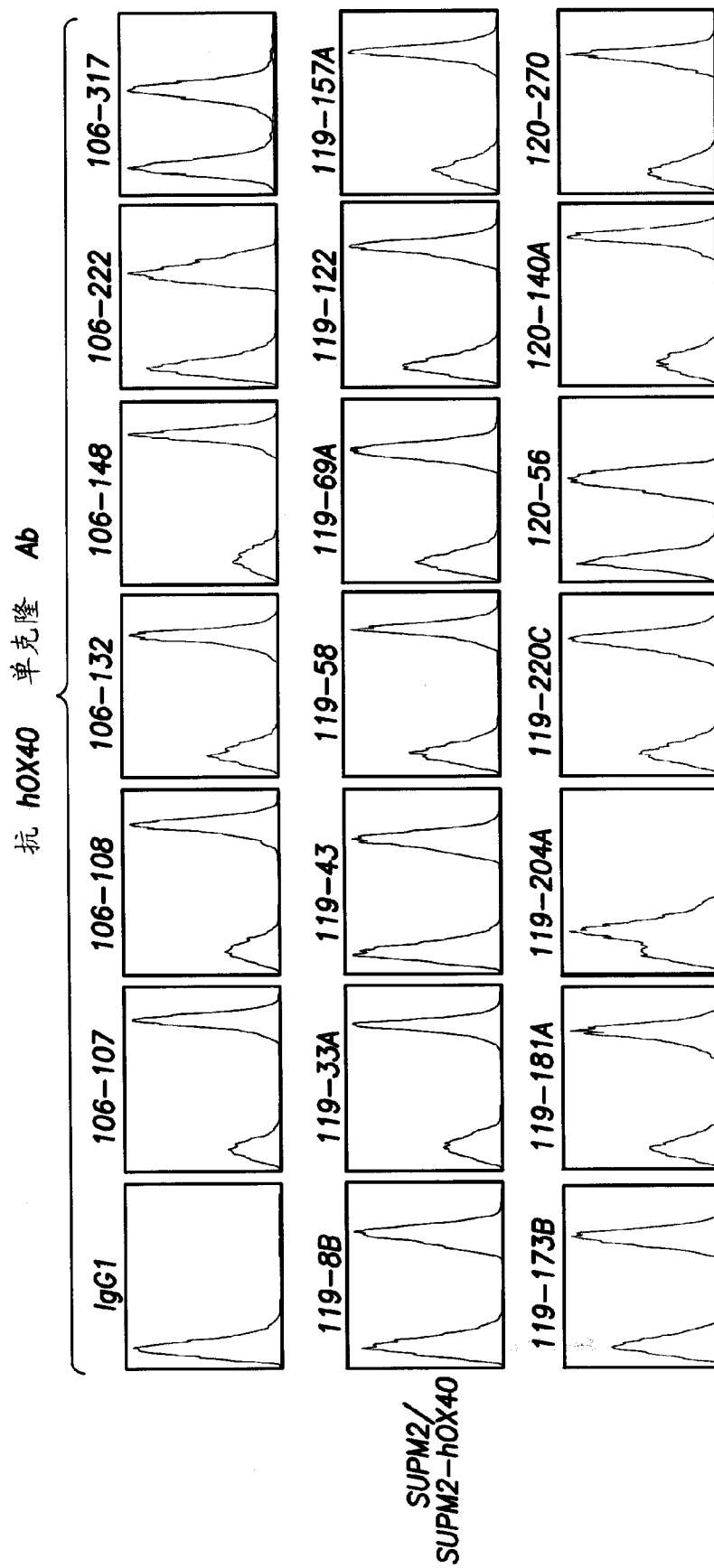


图12

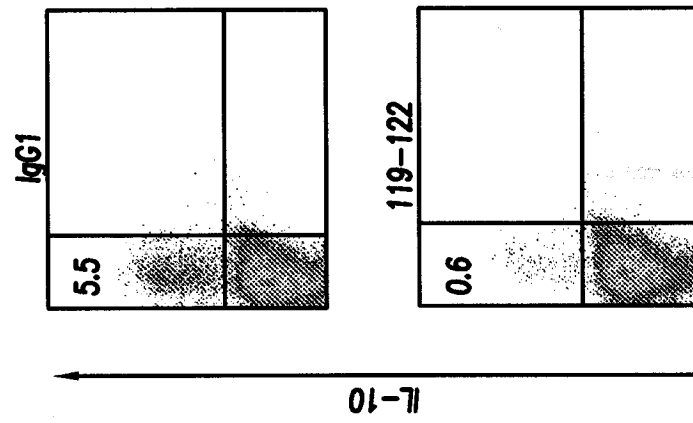


图13A

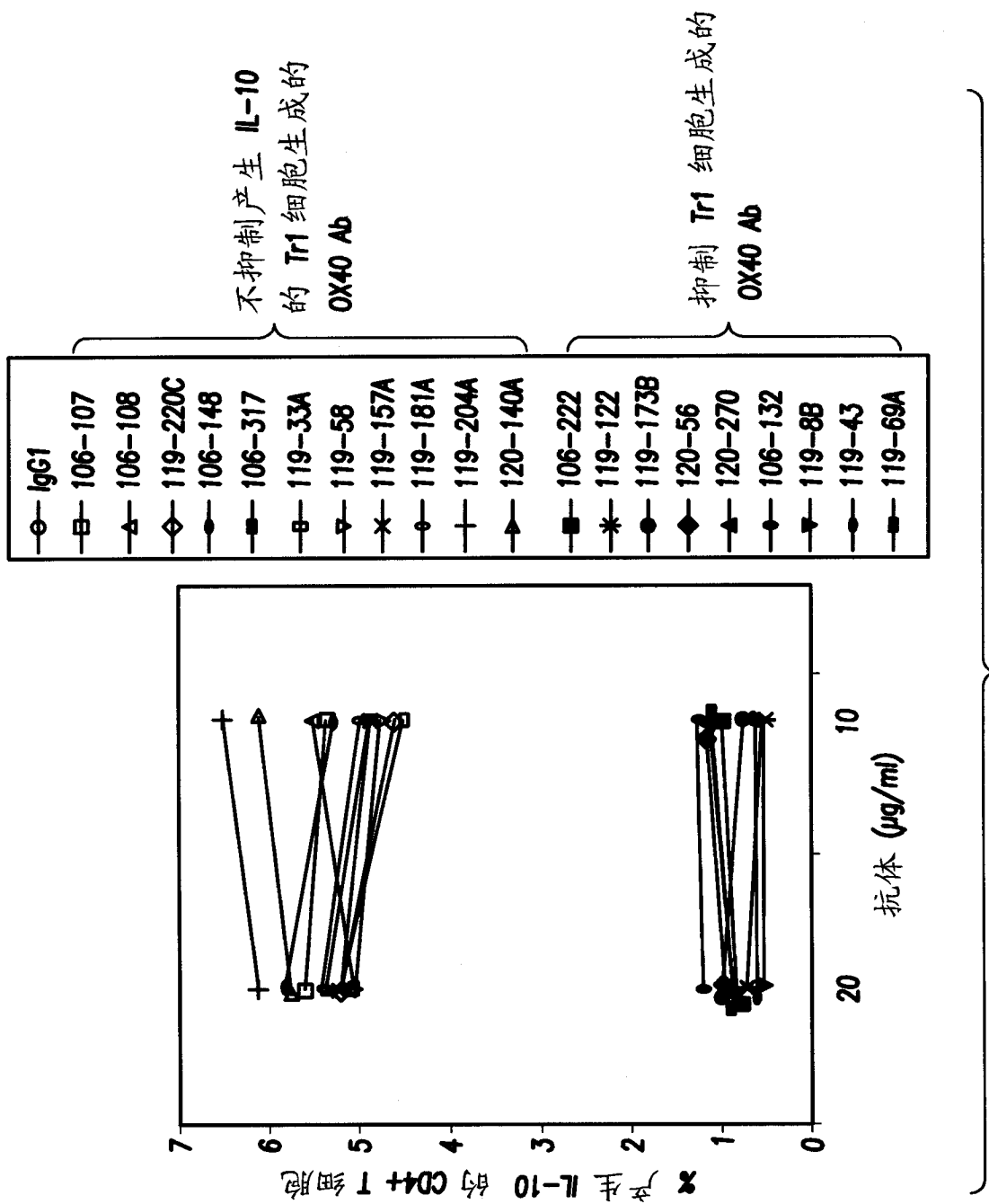


图13B

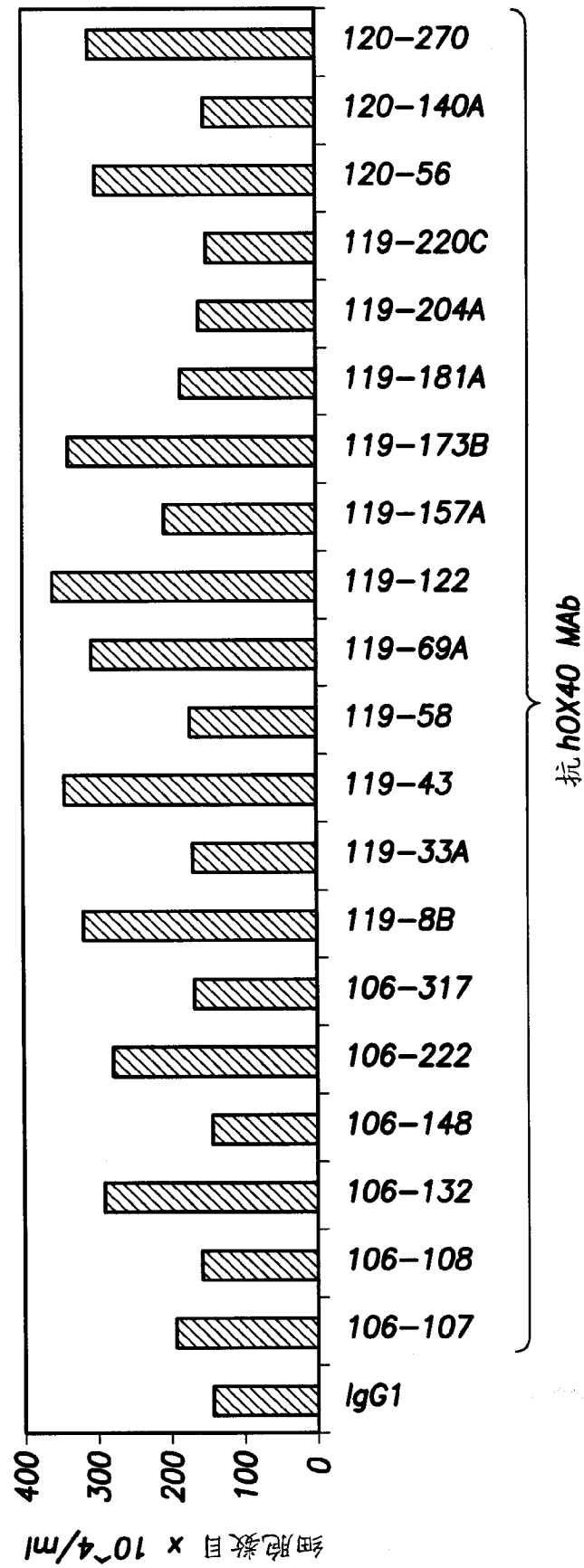


图14

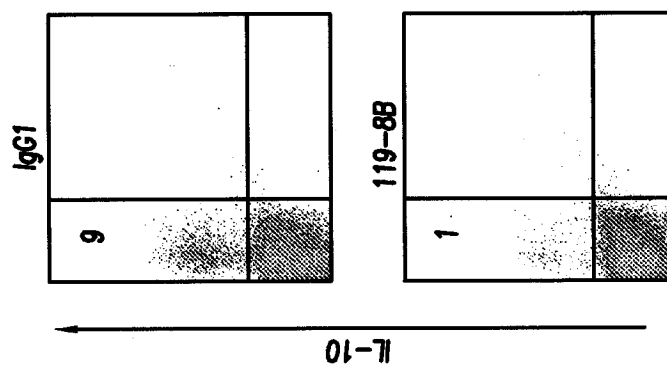


图15A

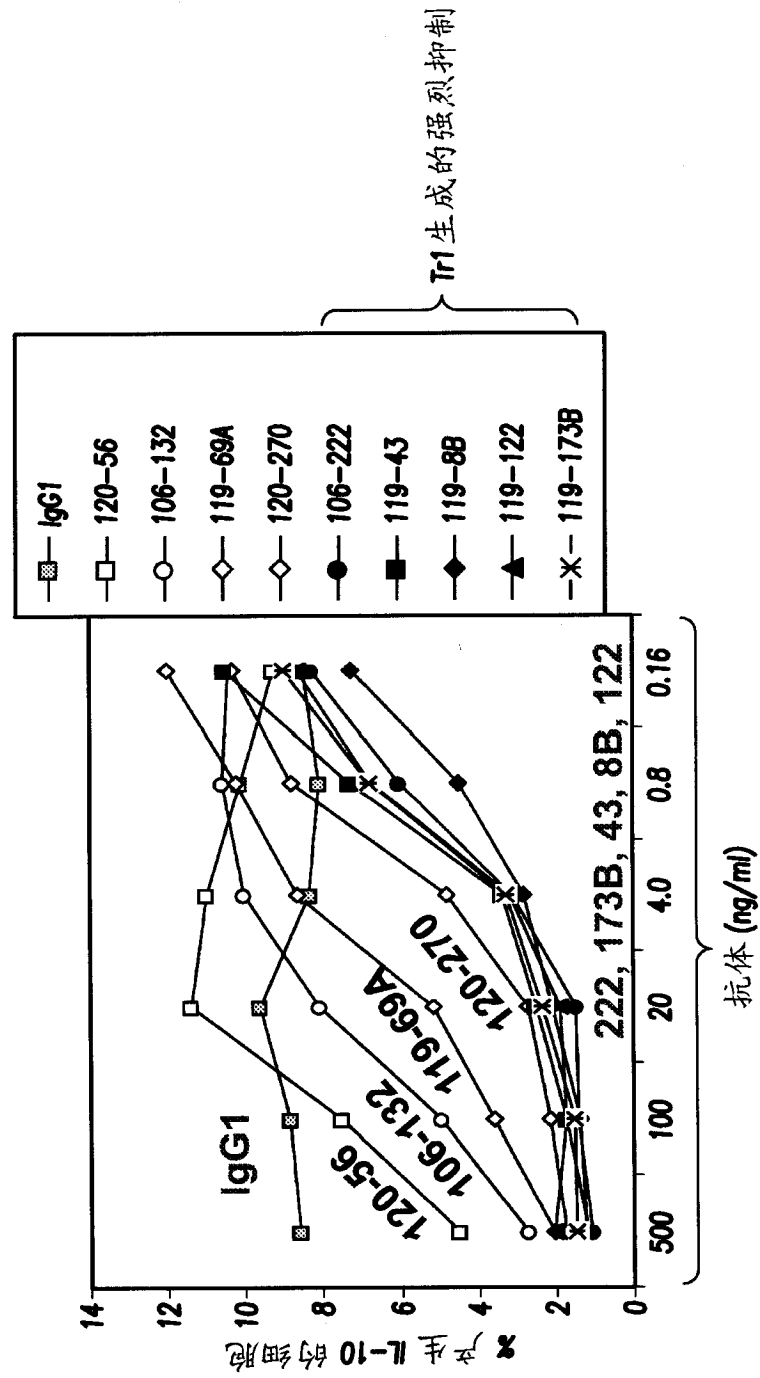


图15B

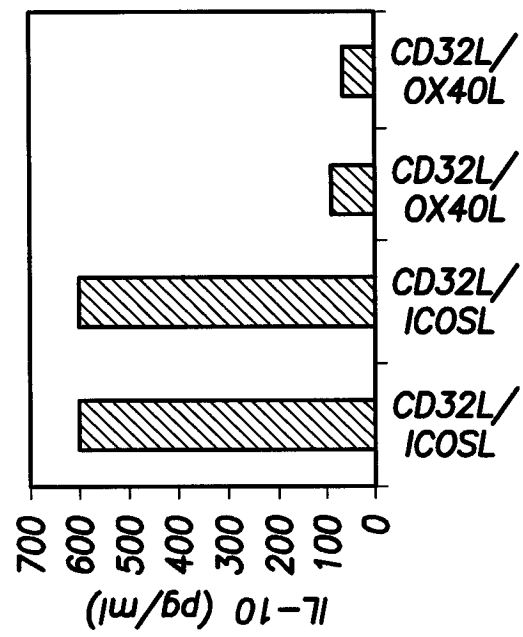


图16A

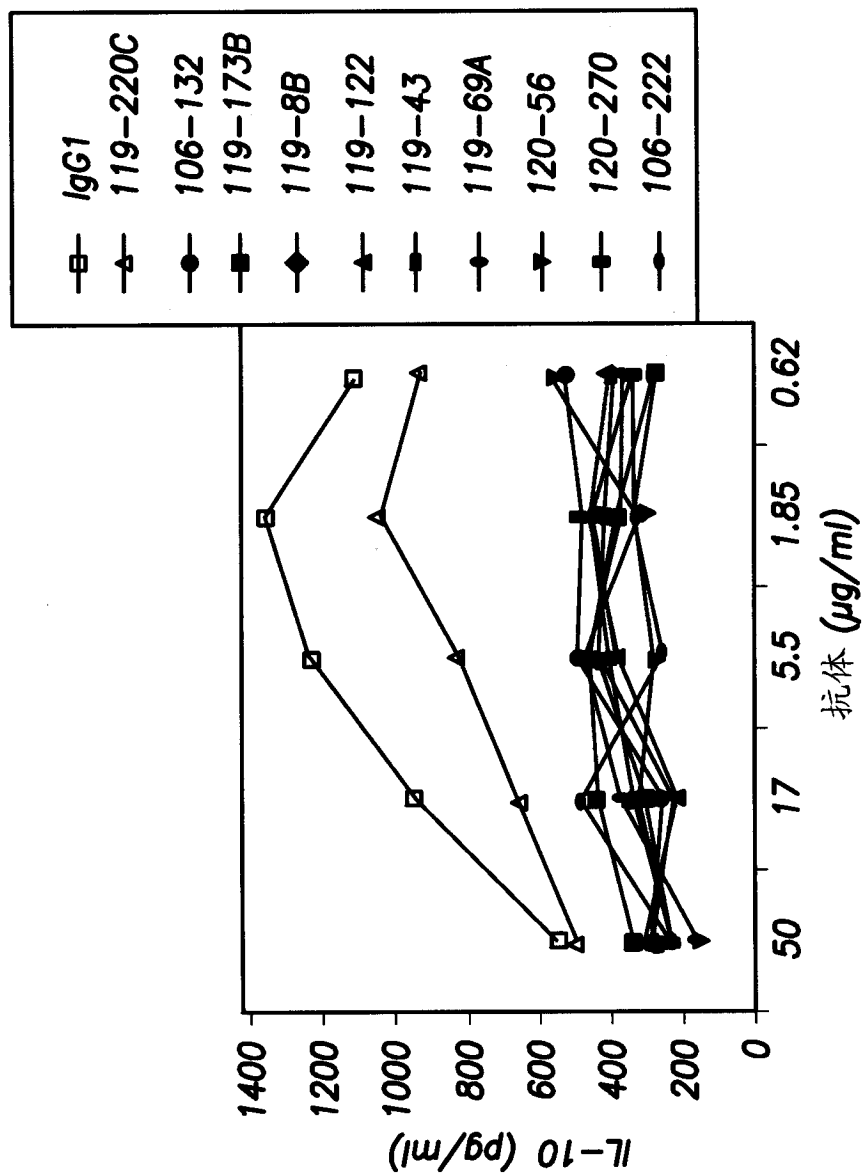


图16B

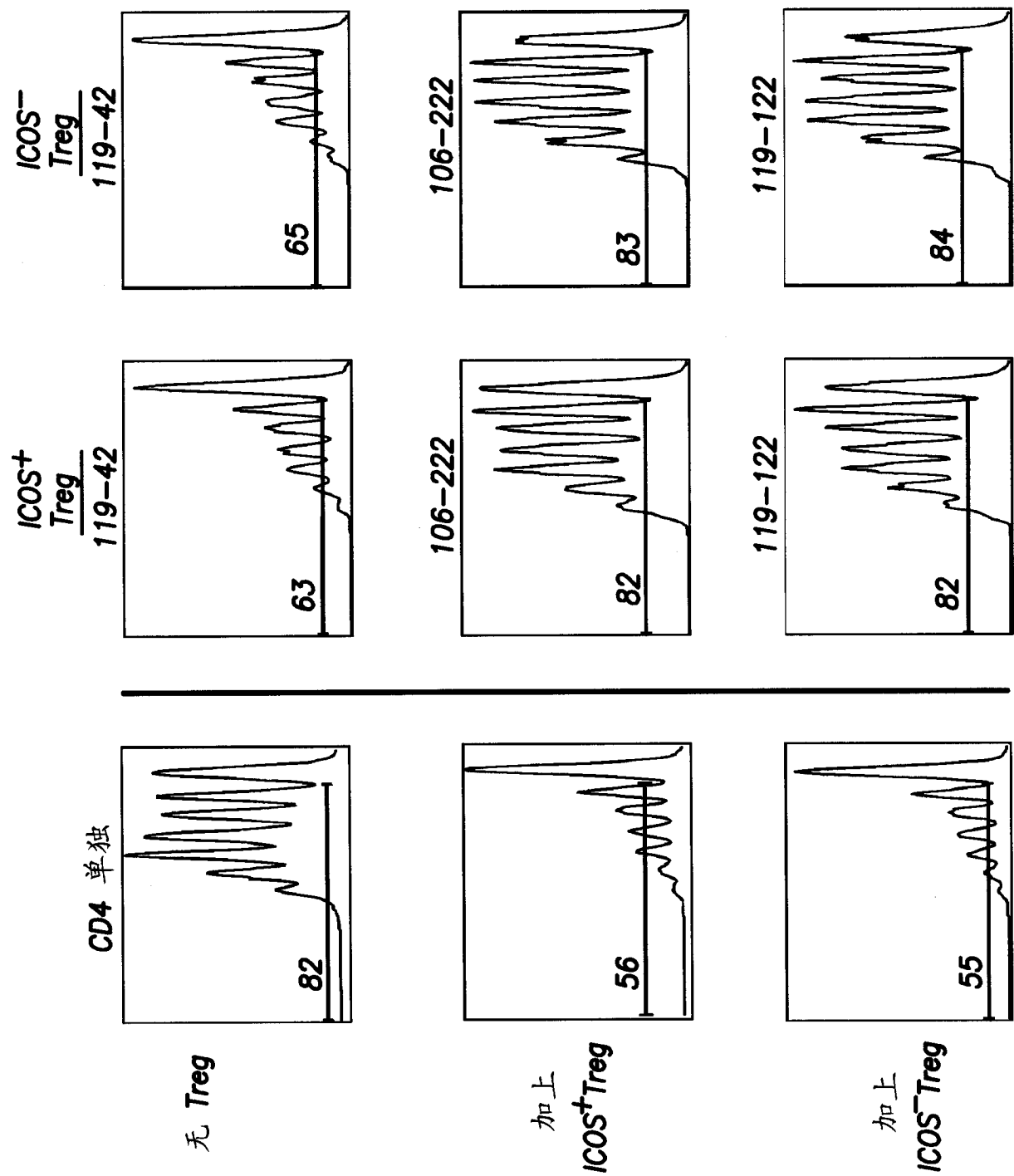


图16C

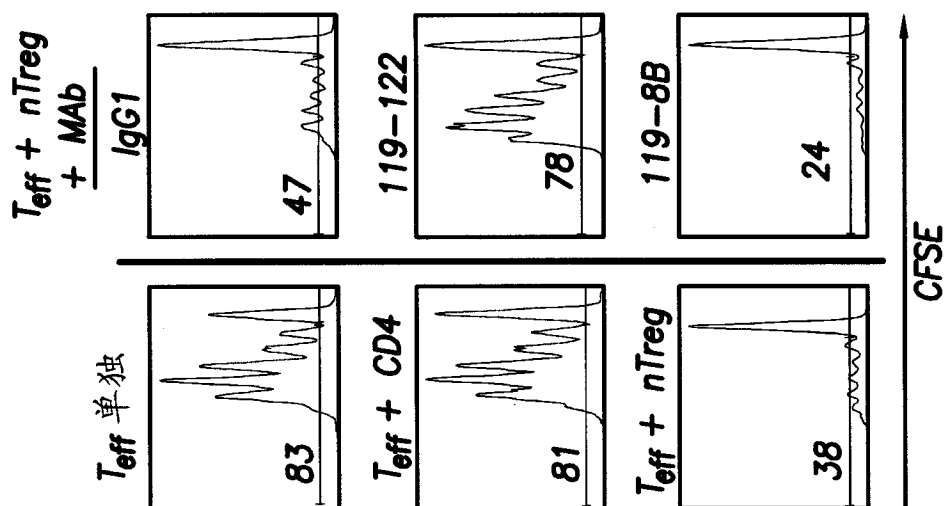


图17A

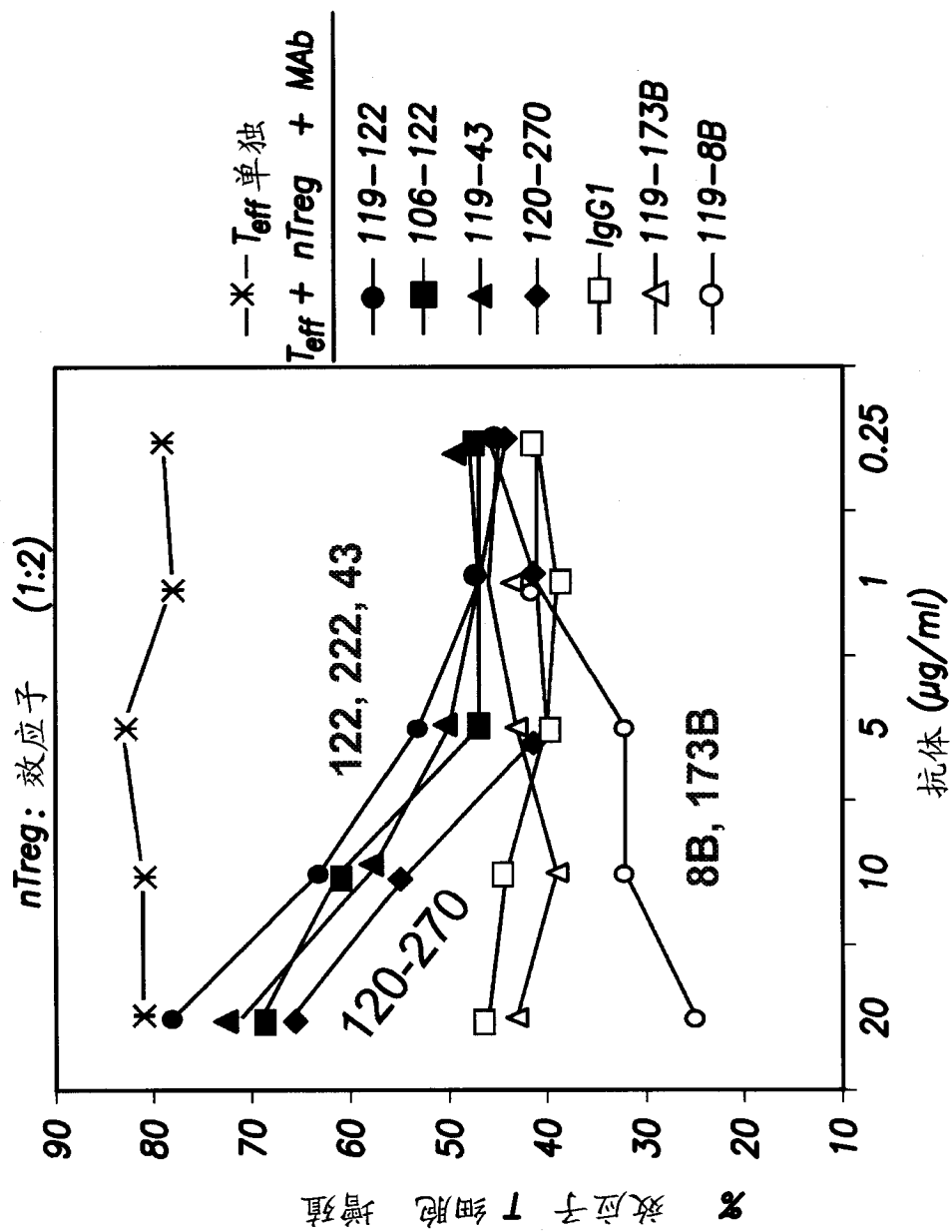


图17B

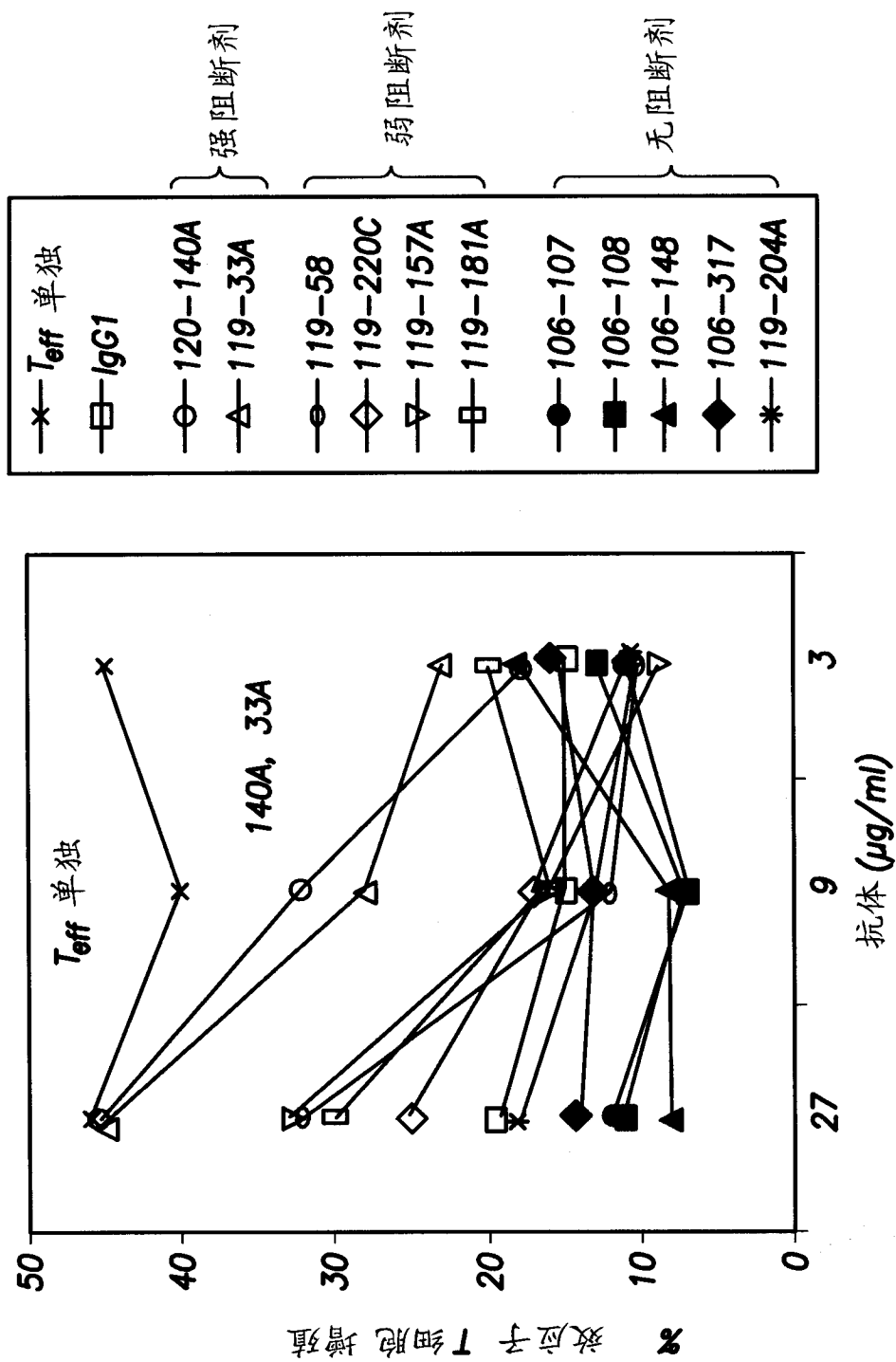


图18

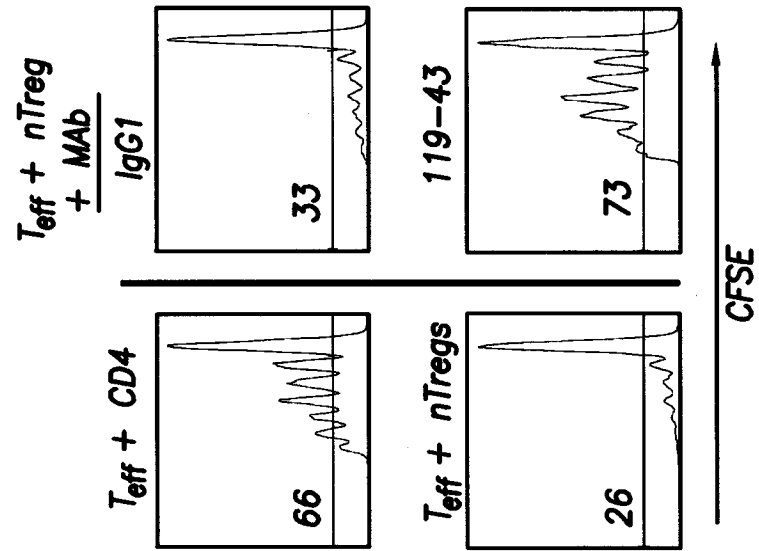


图19A

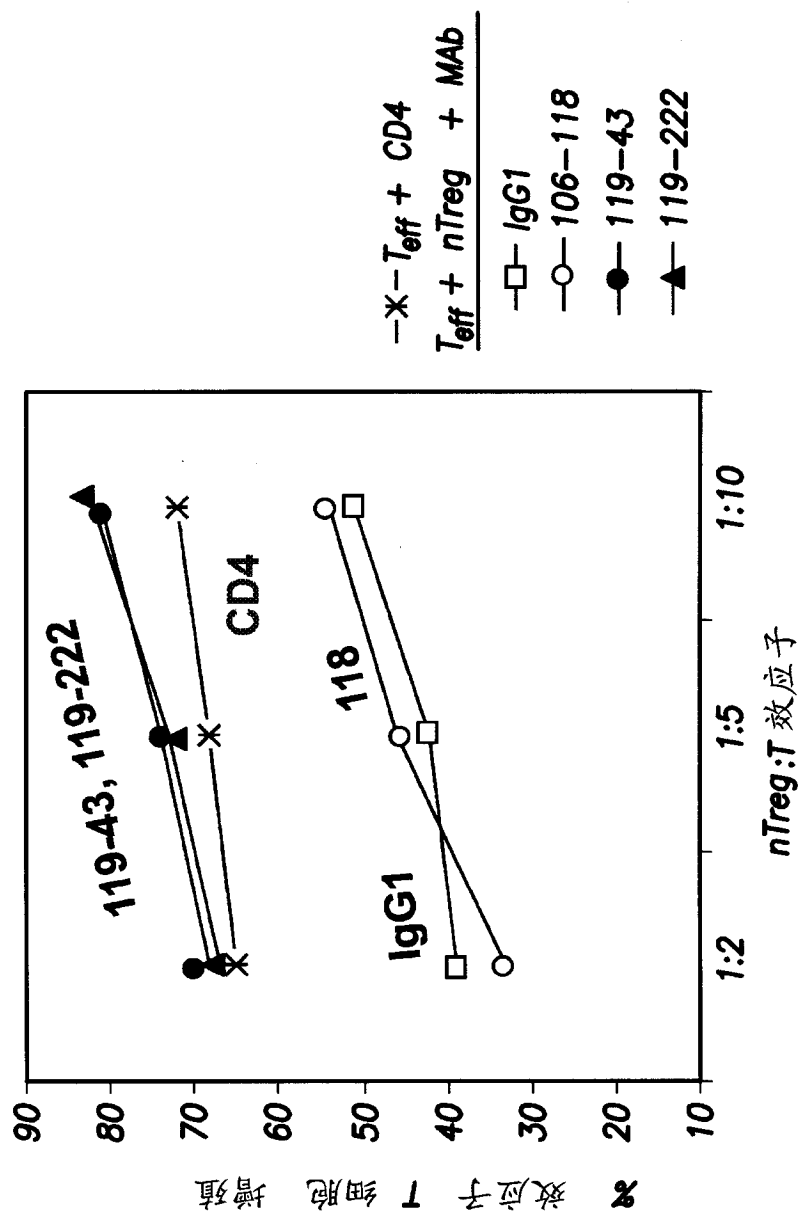


图19B

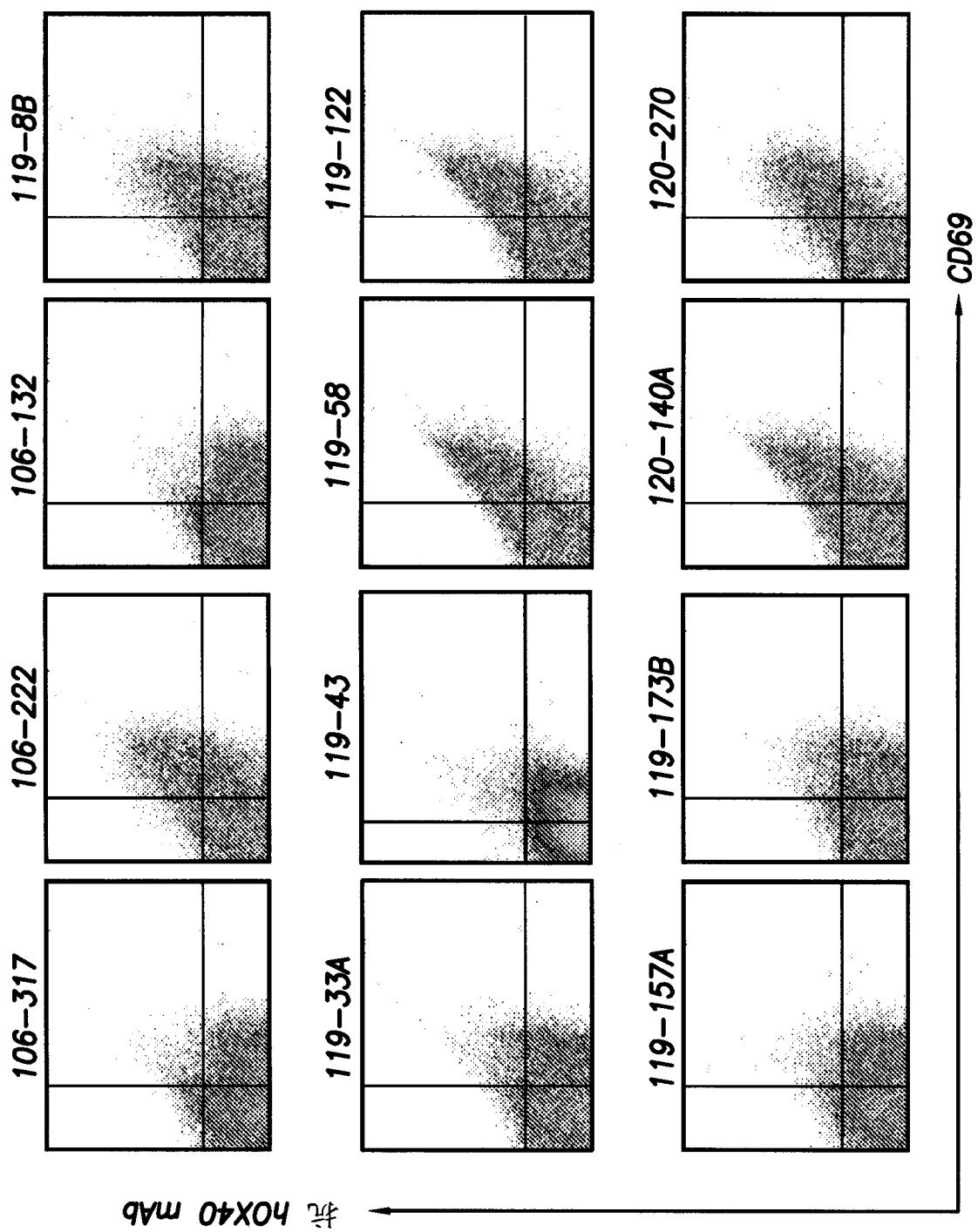


图20

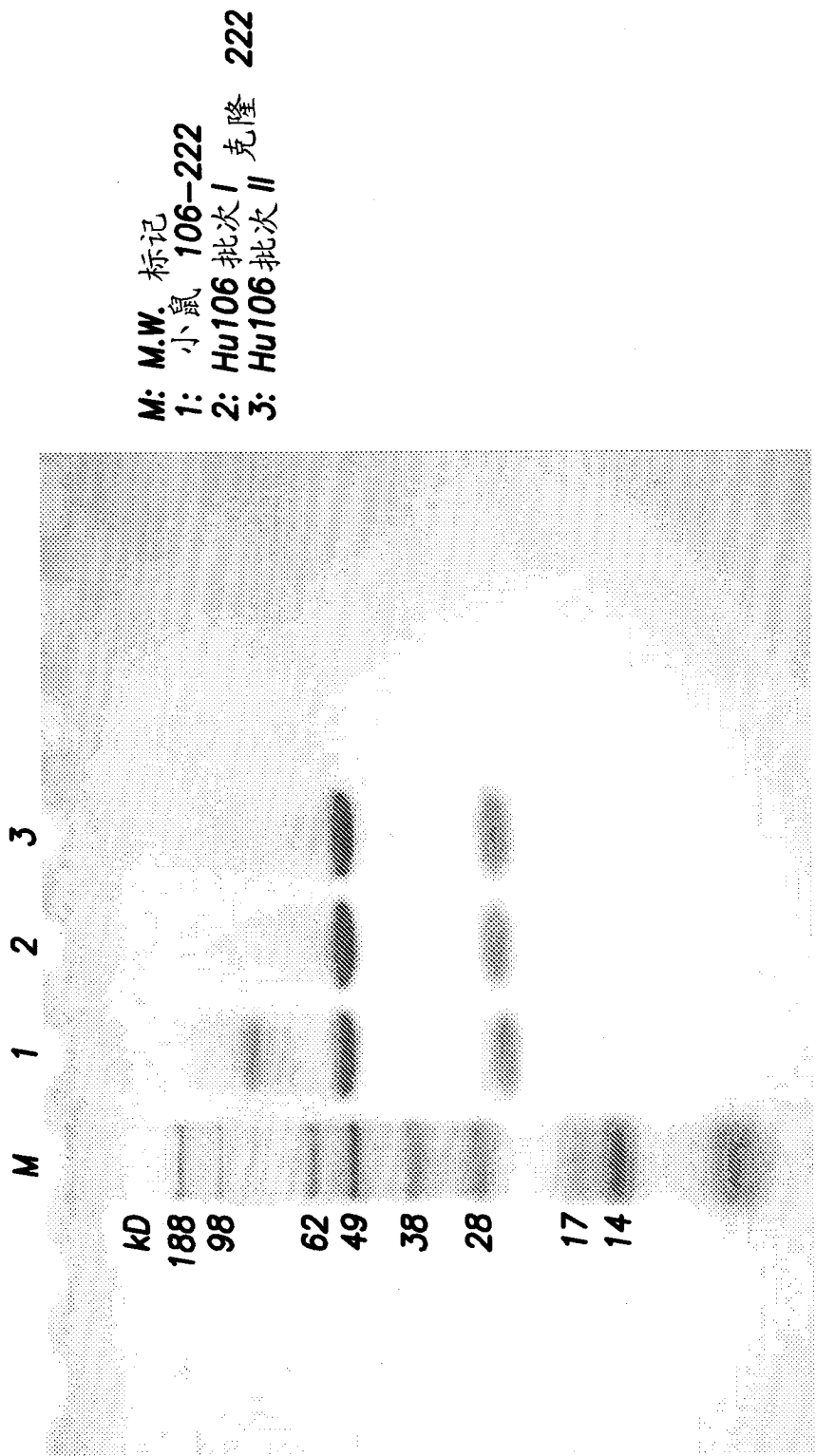


图21

与 L/OX40 细胞的结合

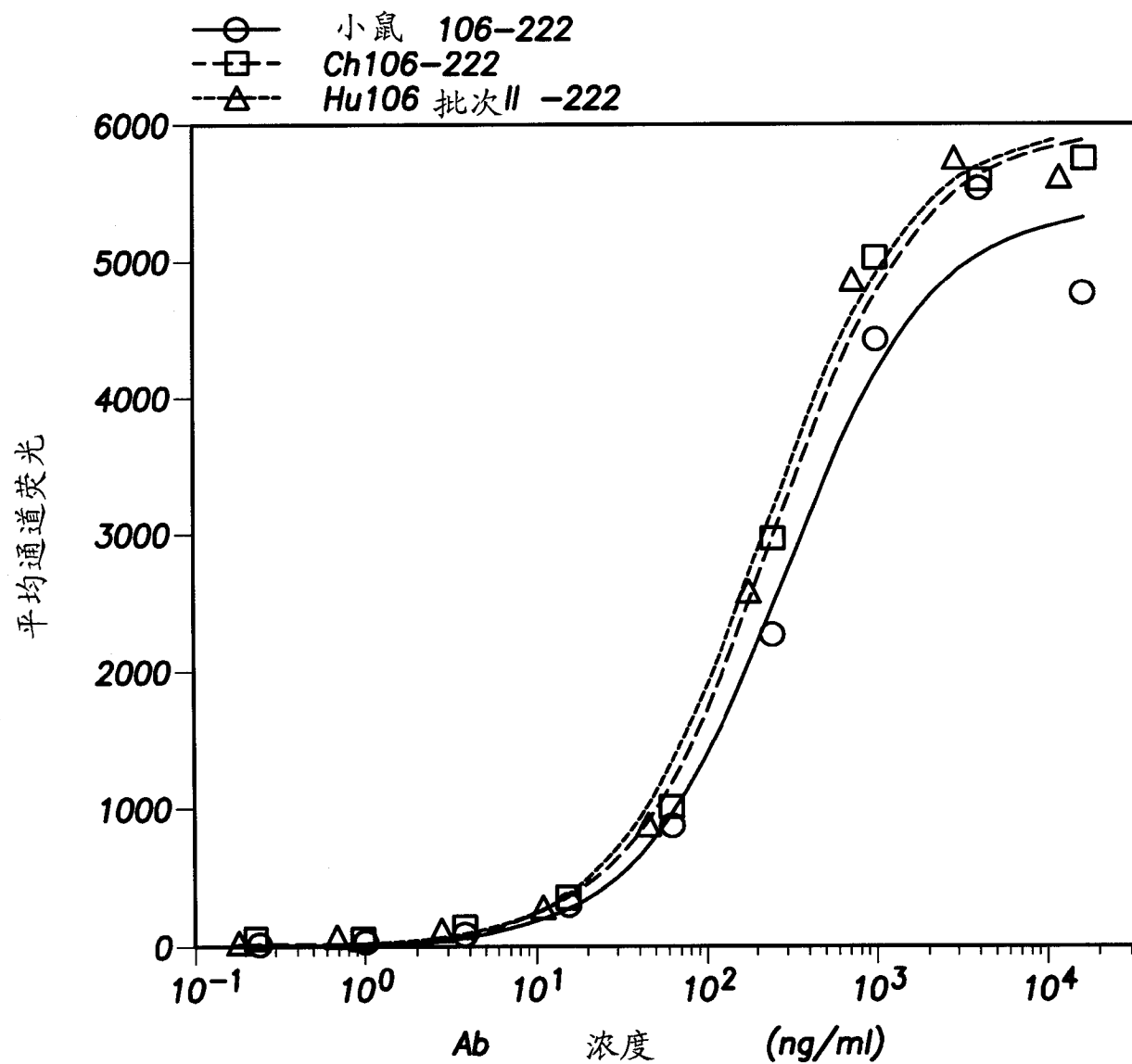


图22

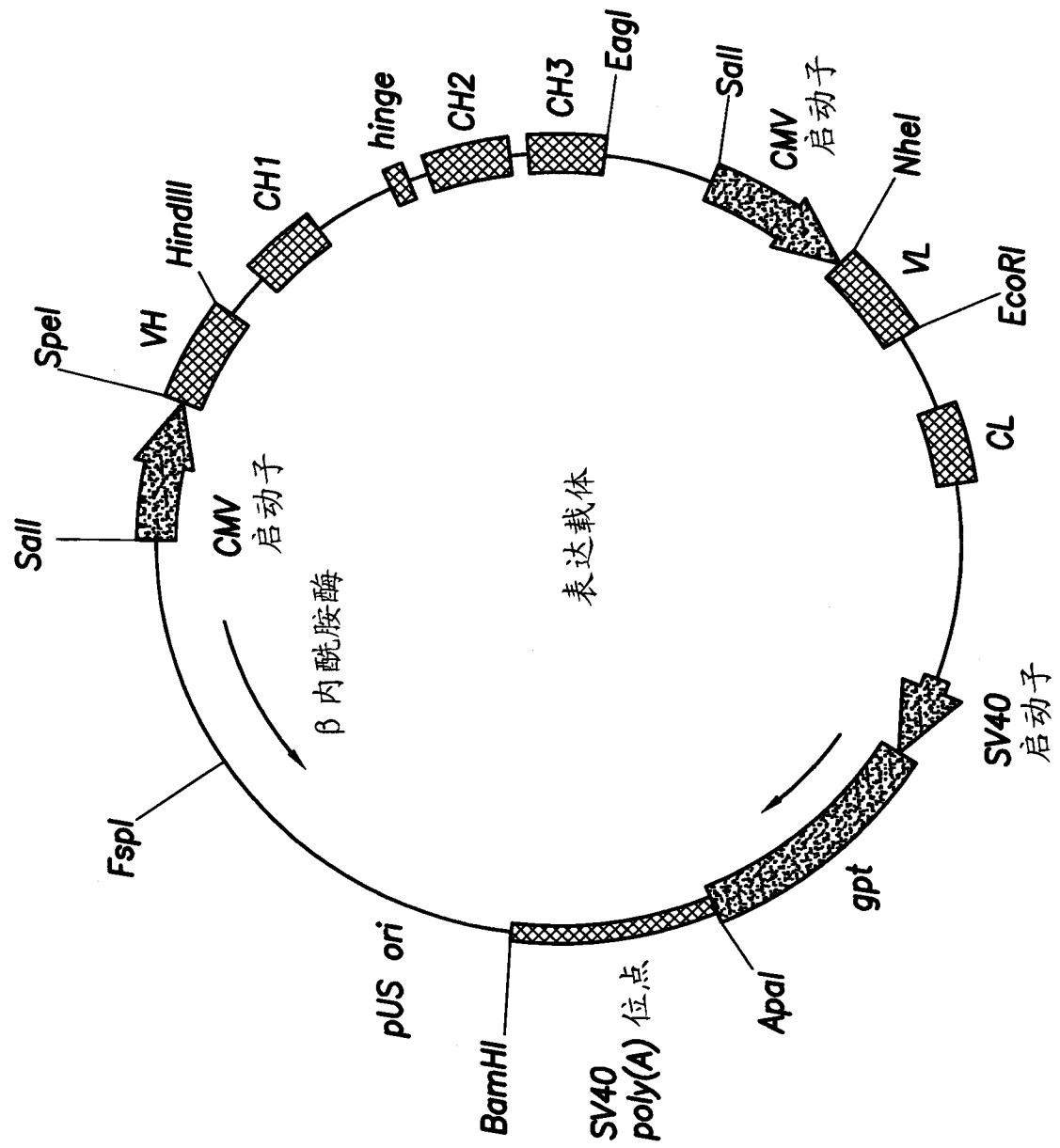


图23

与 L/OX40 细胞的结合

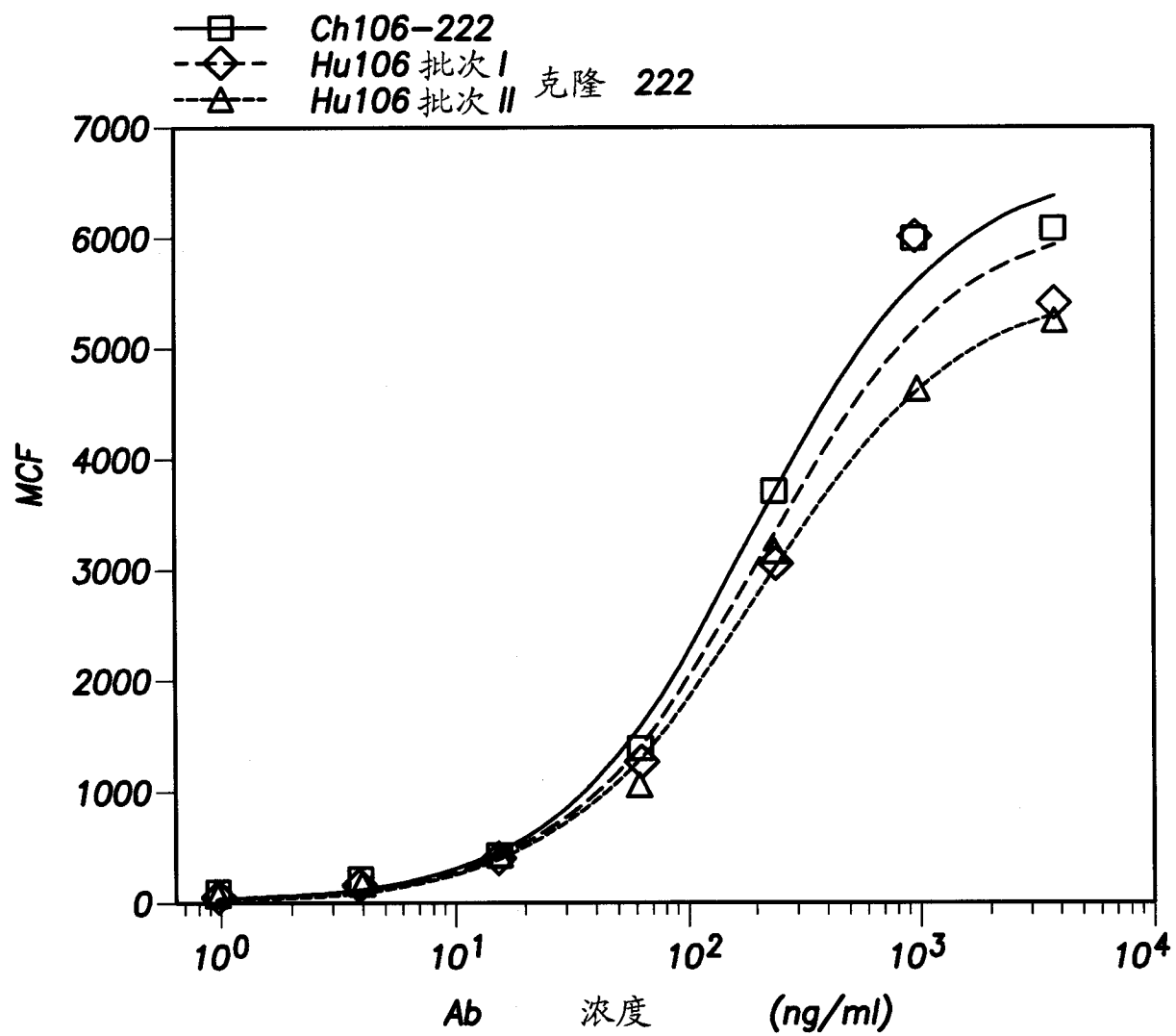


图24

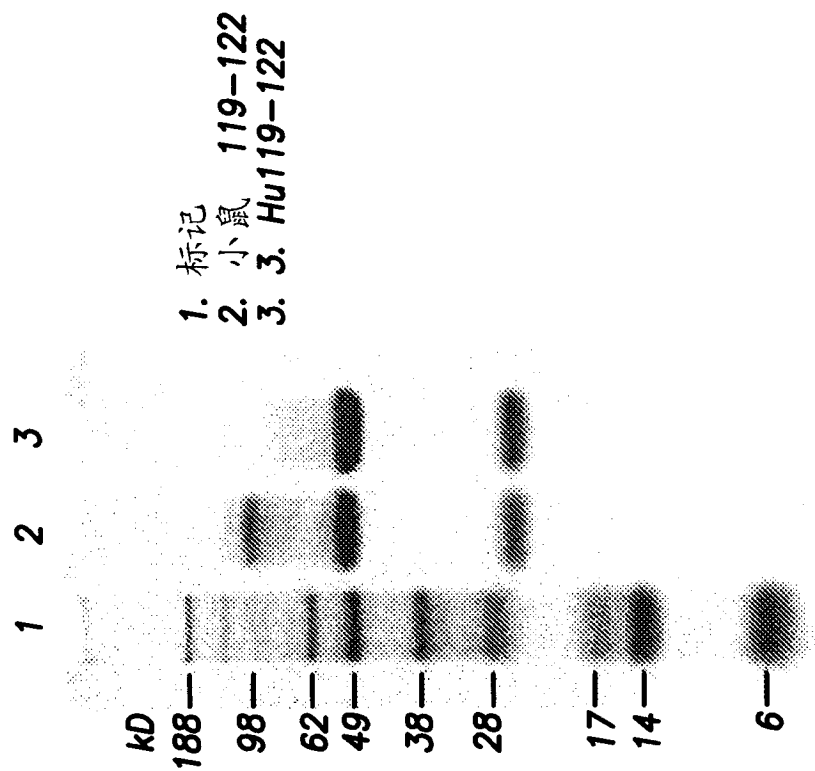


图25

与 L/OX40 细胞的结合

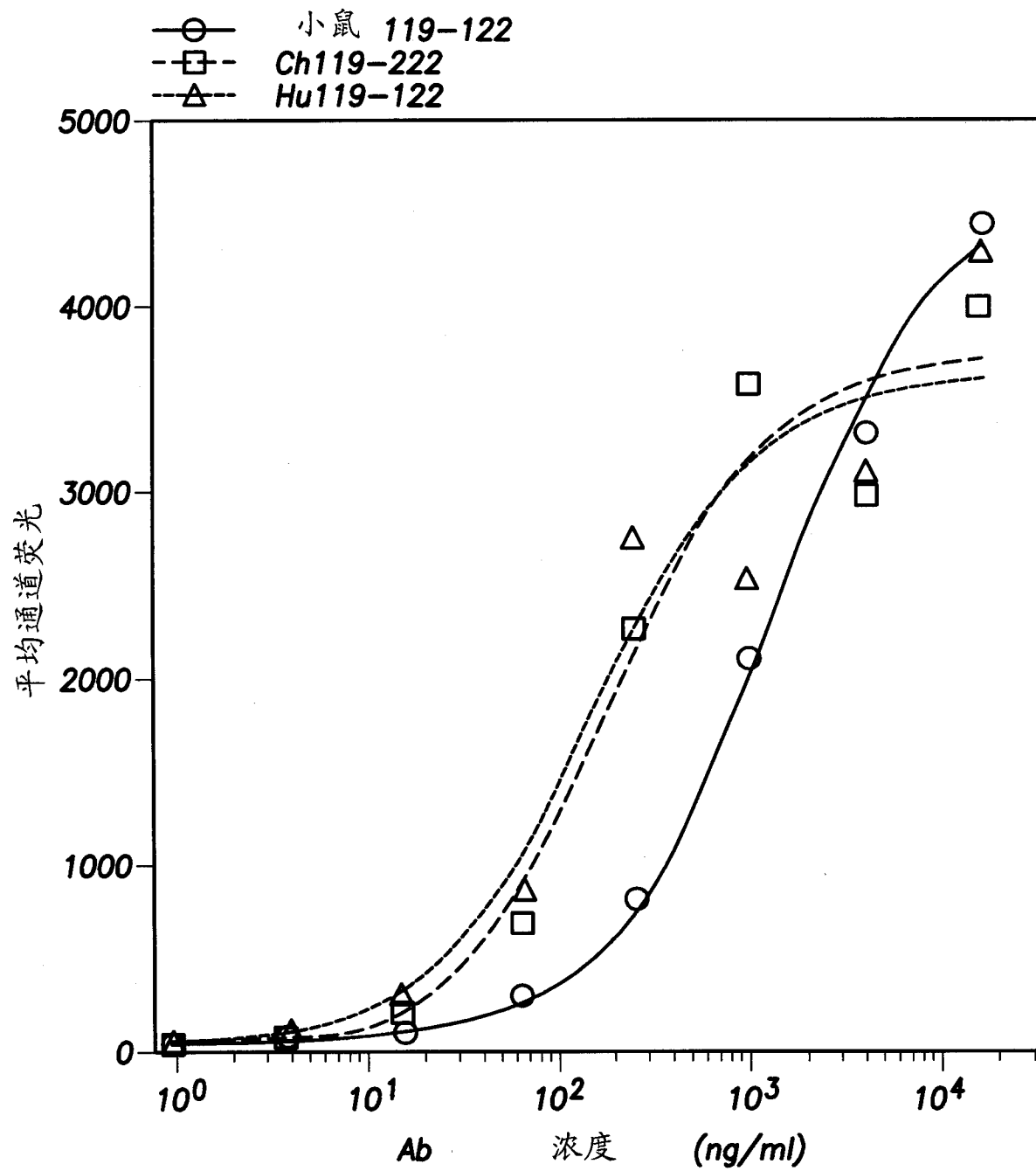
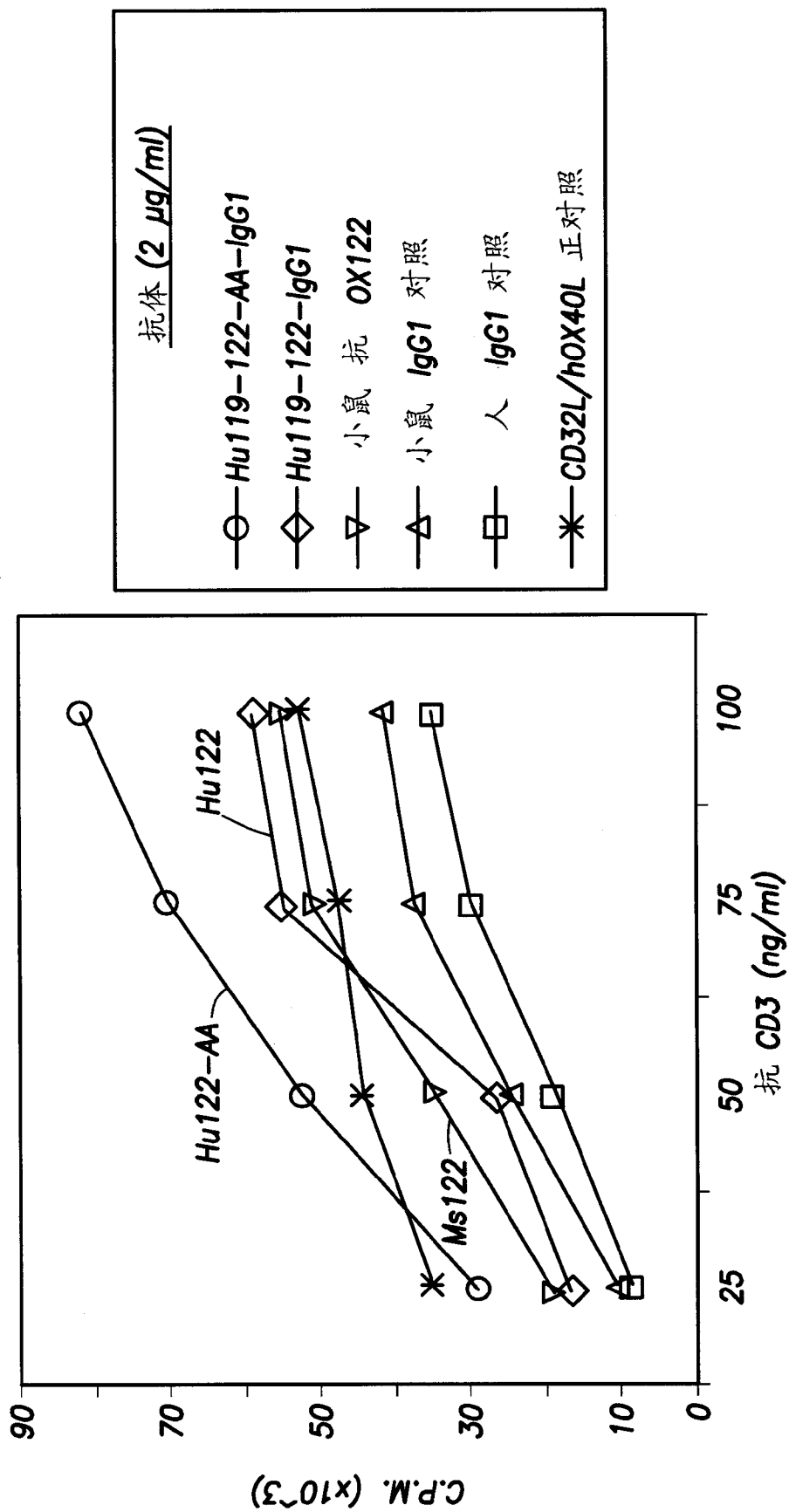
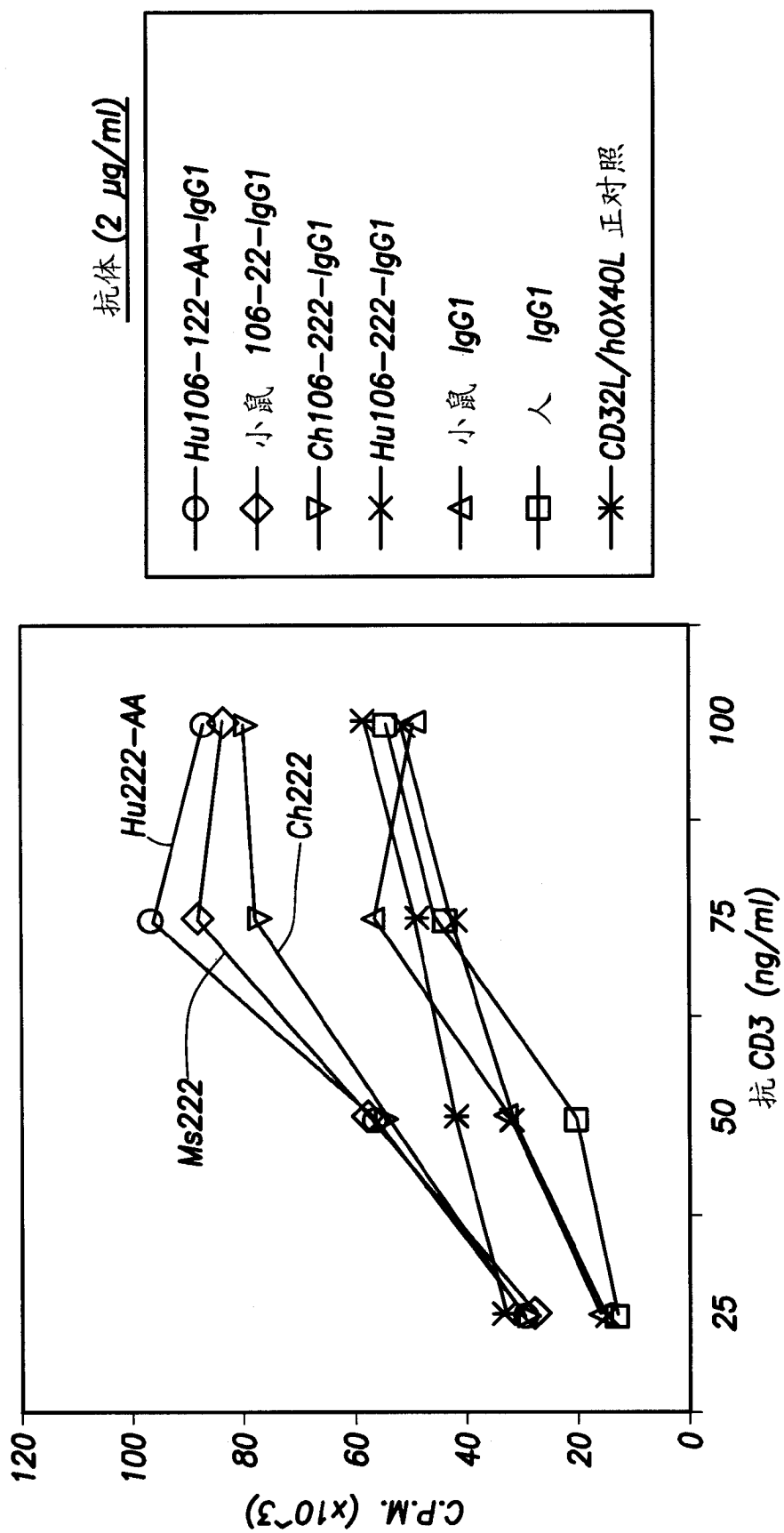


图26



L 细胞系统

图27



L 细胞系统

图28

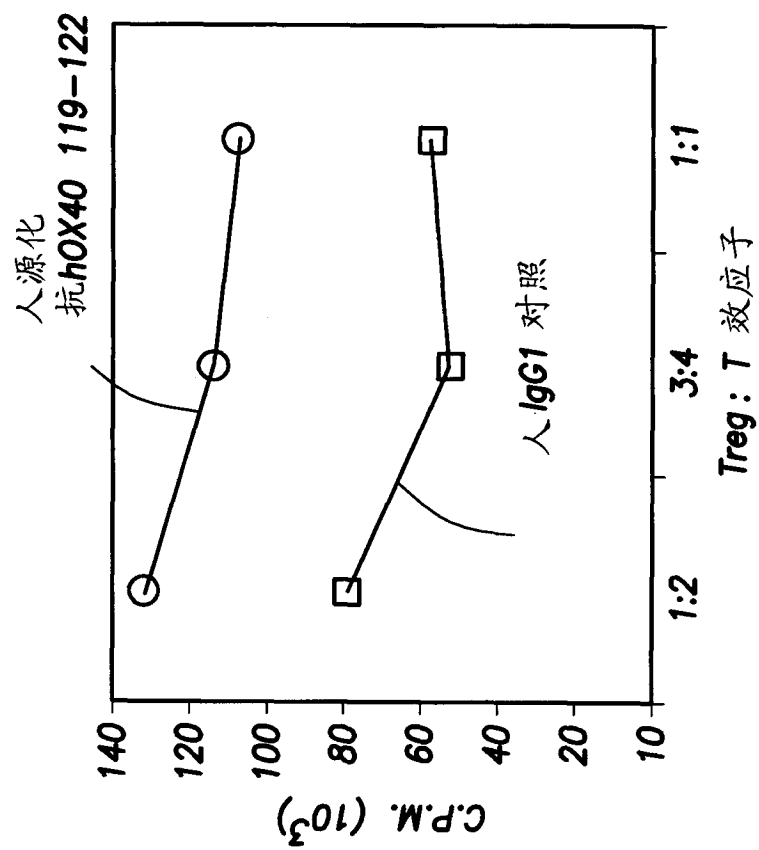


图29A

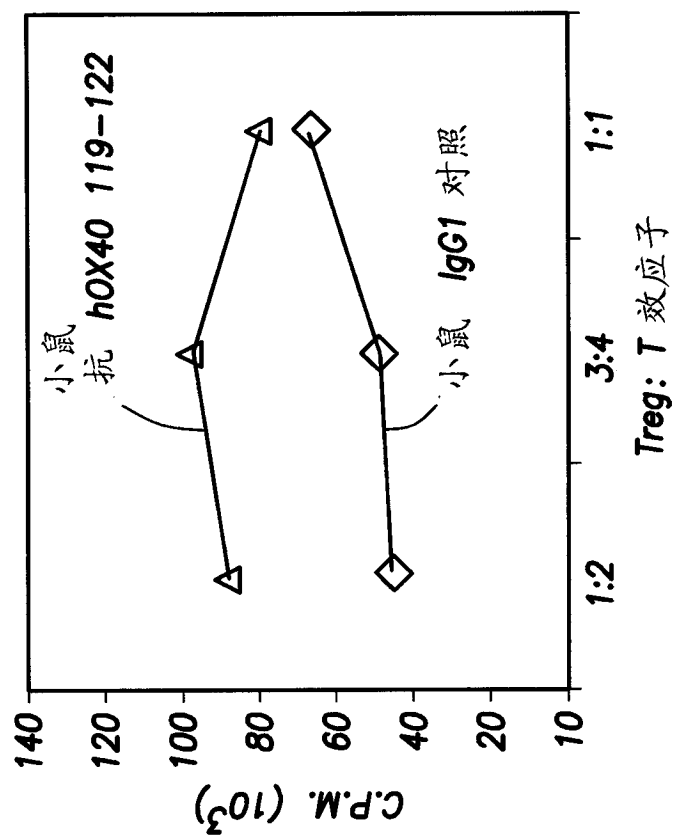


图29B

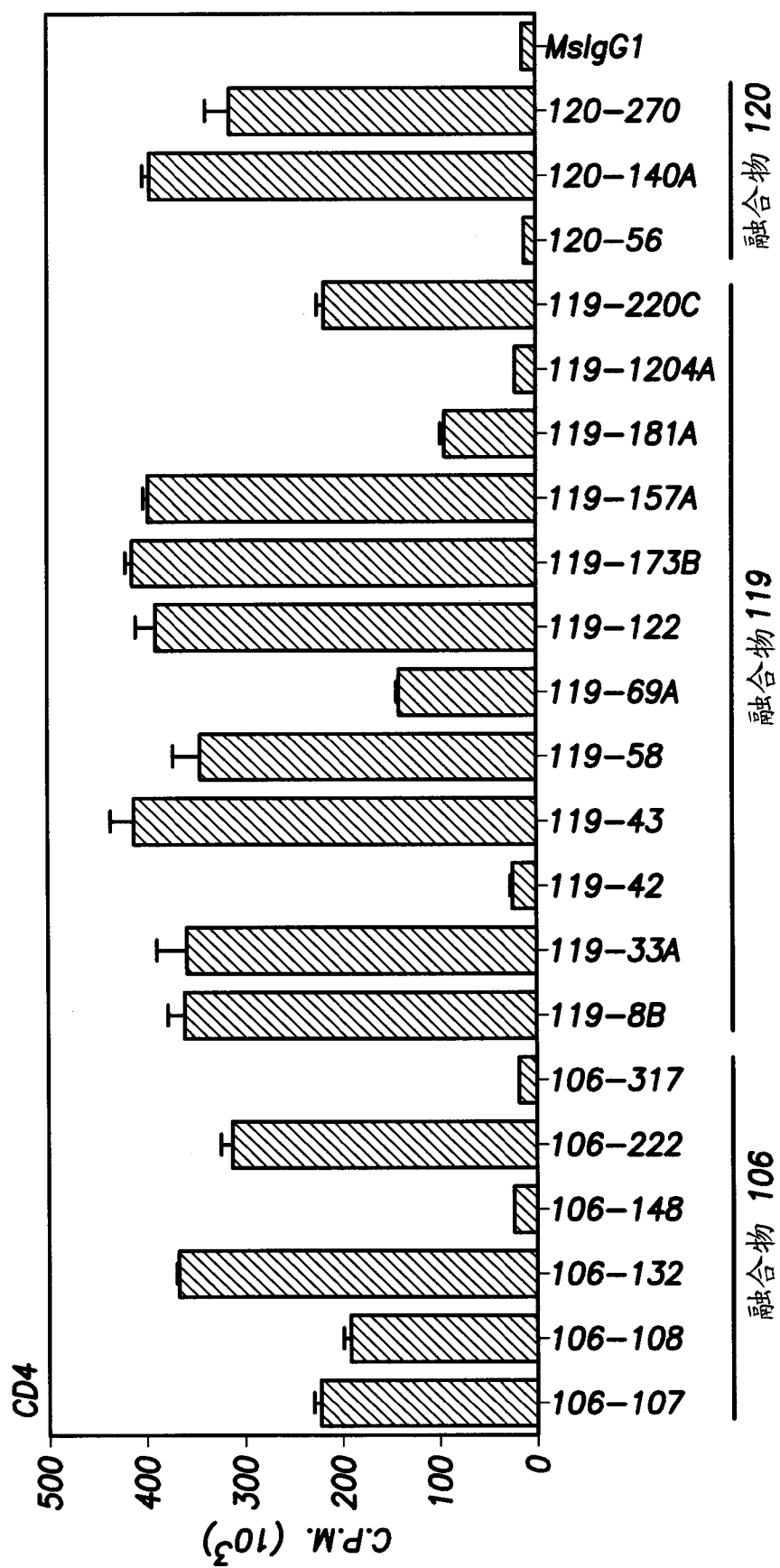


图30A

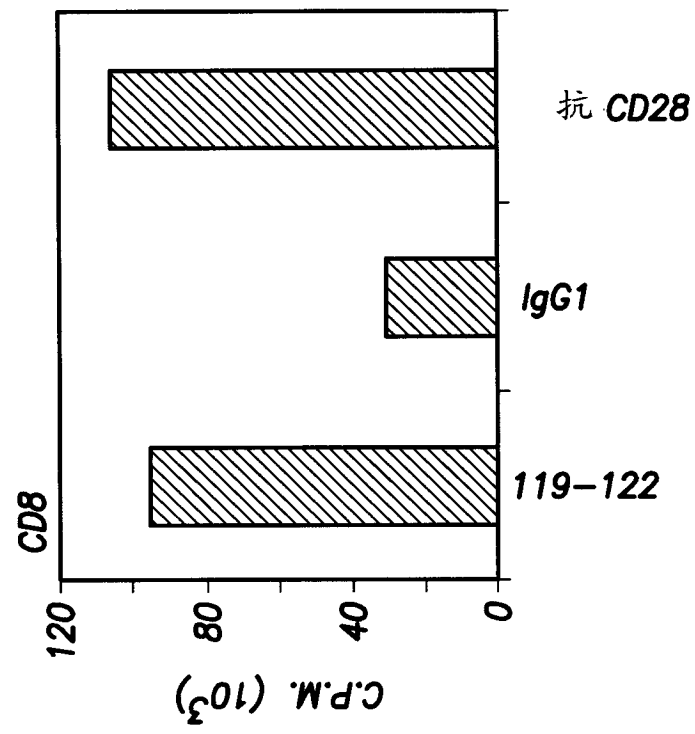


图30B

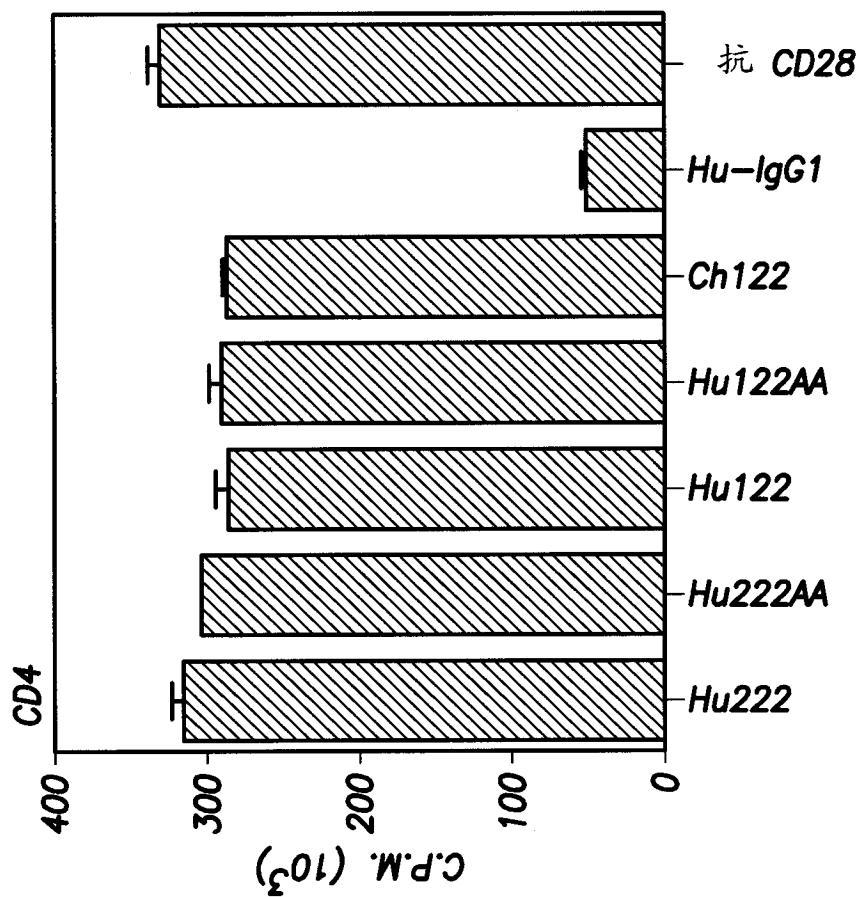


图30C

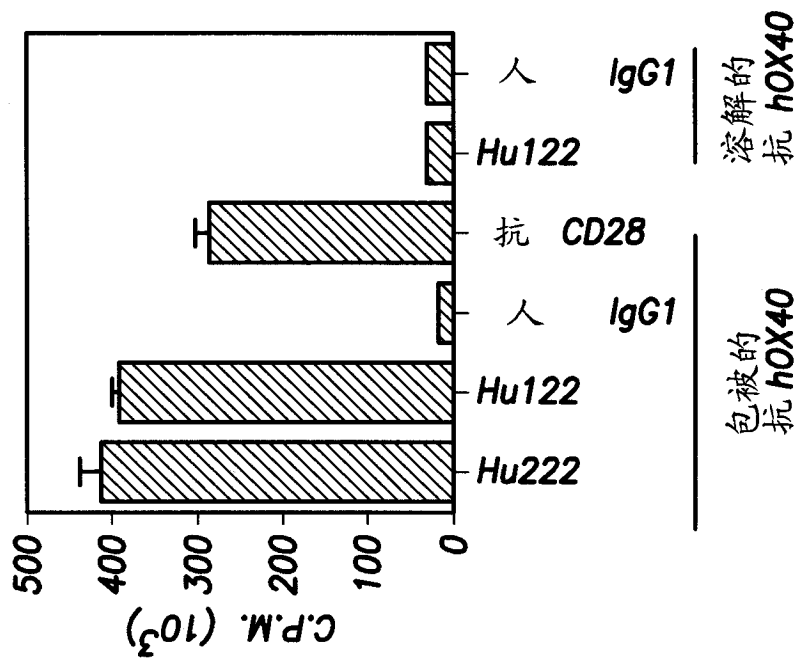


图31A

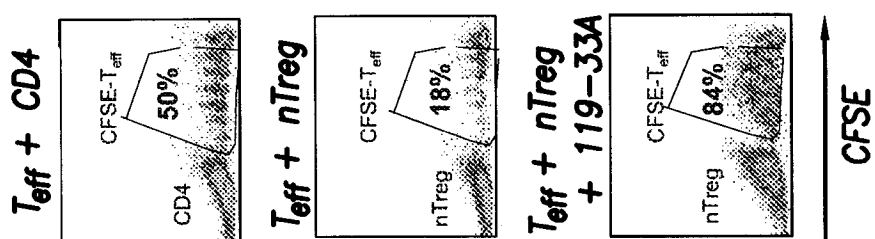


图32A

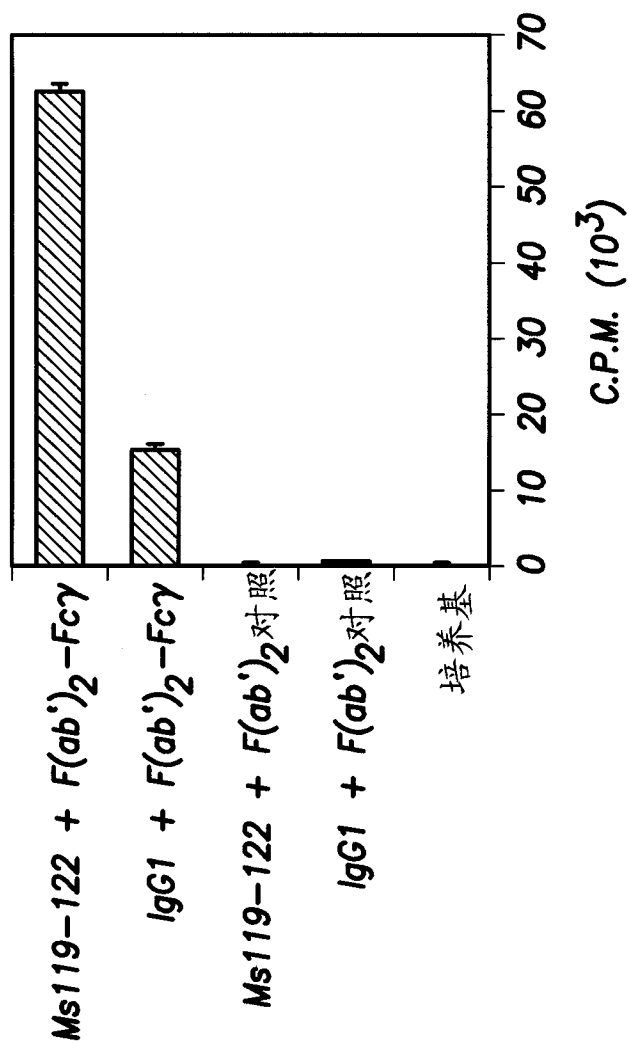


图31B

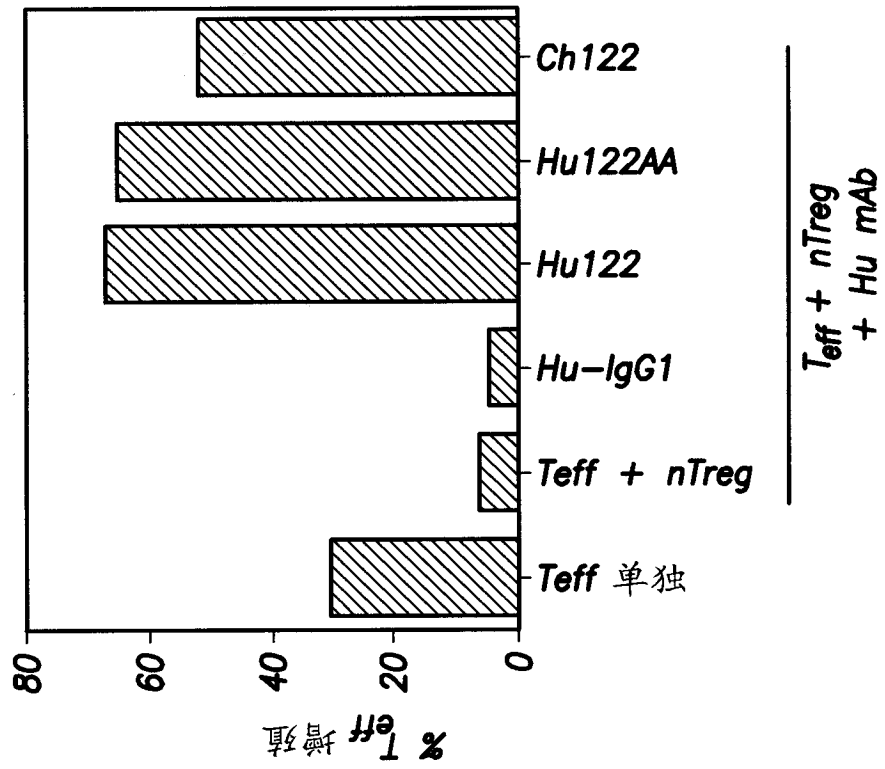


图32C

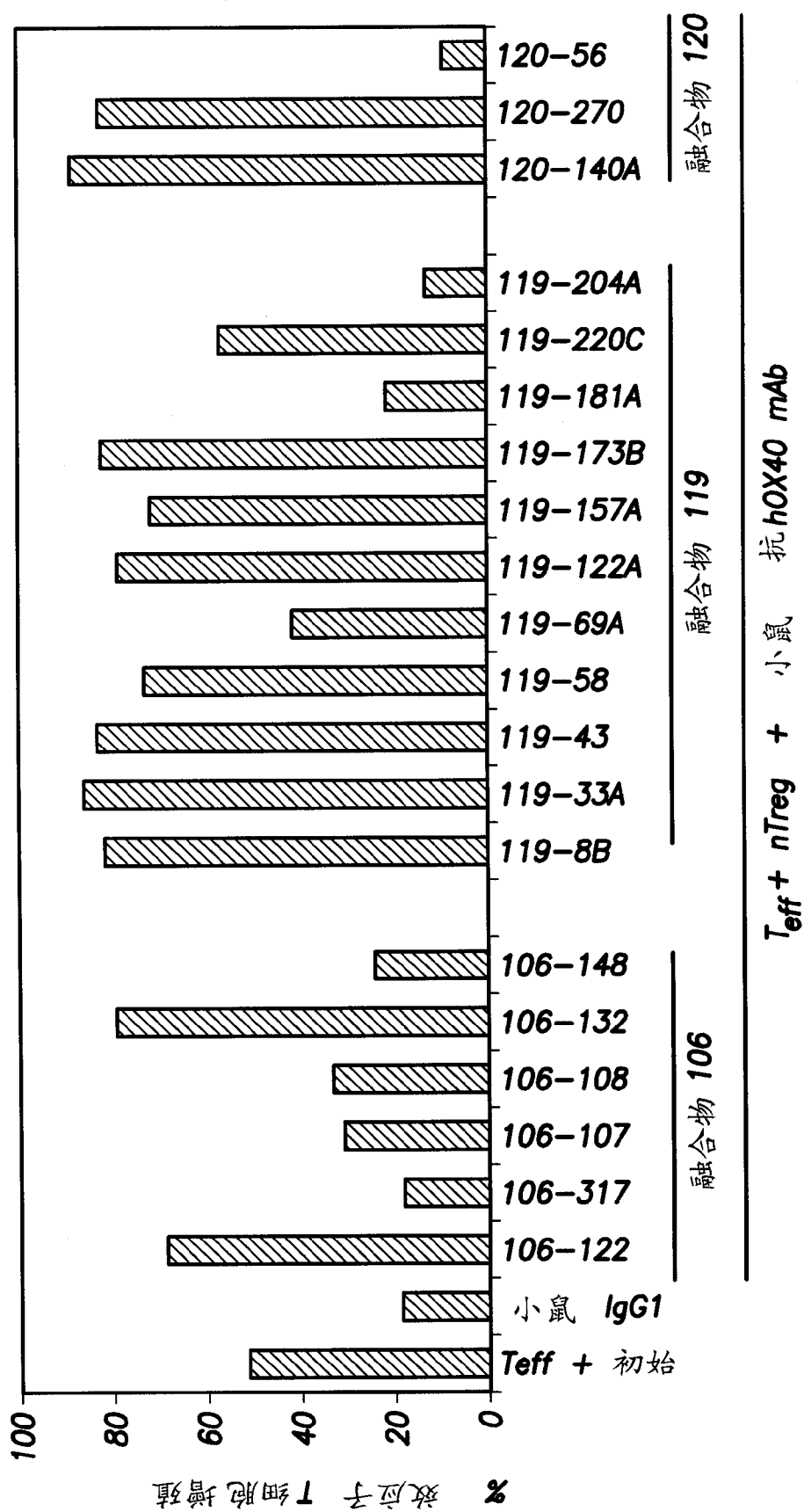


图32B

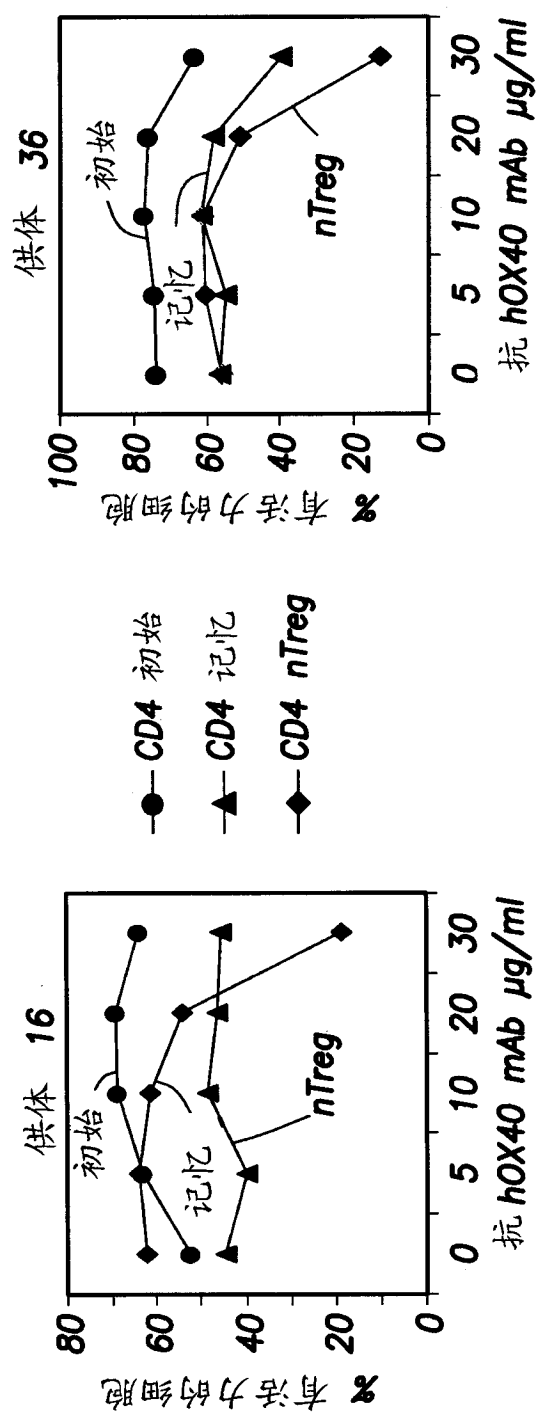


图33A

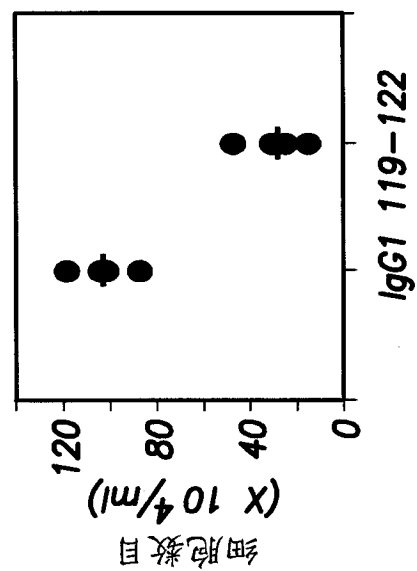


图33B

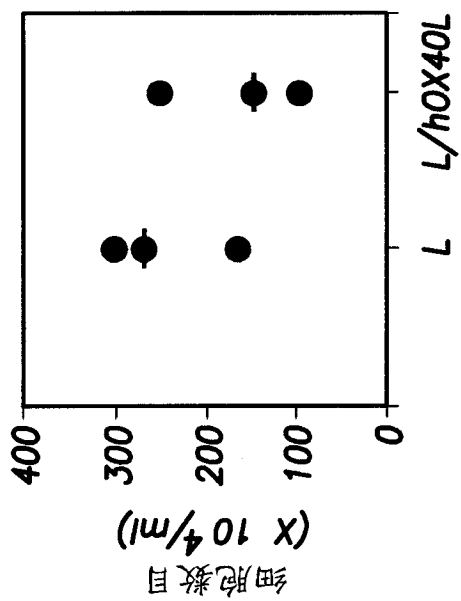


图33C

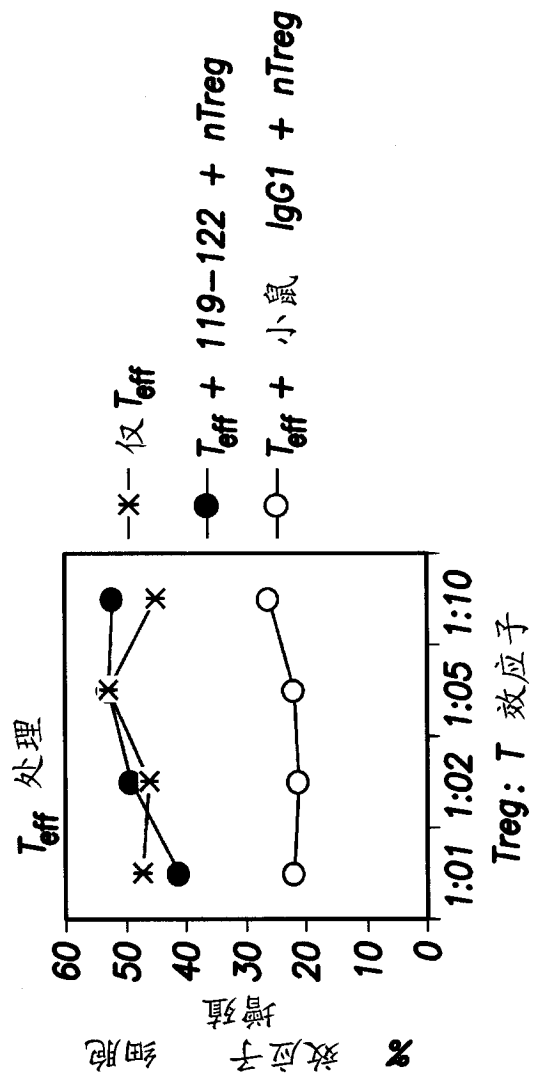


图34A

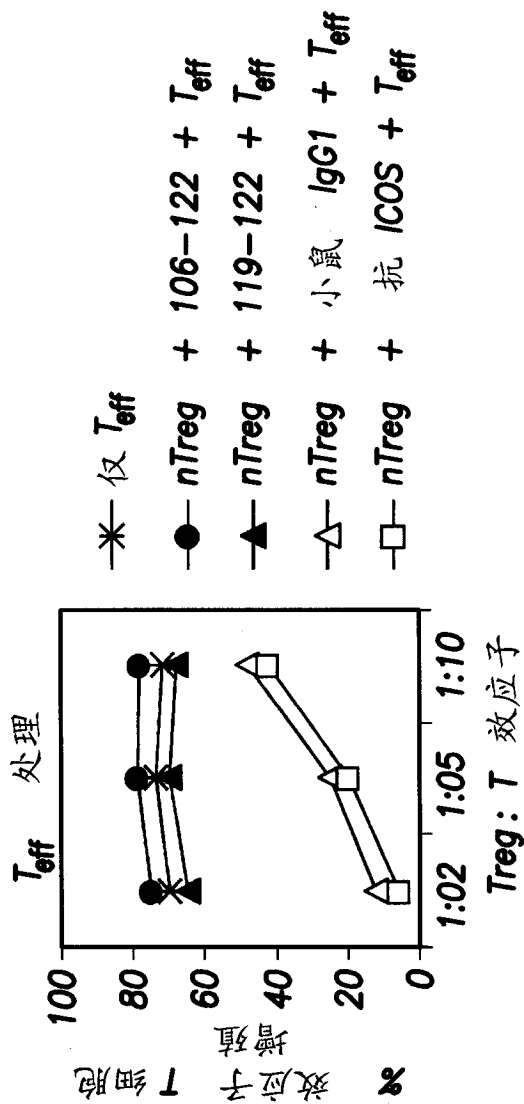


图34B

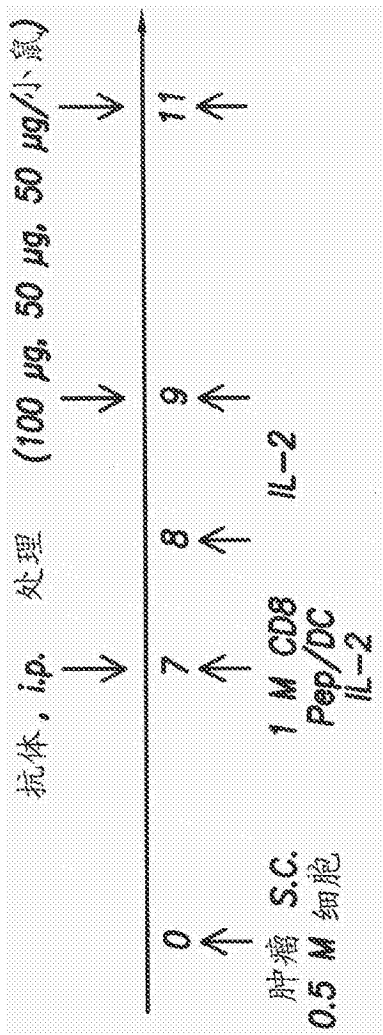


图35A

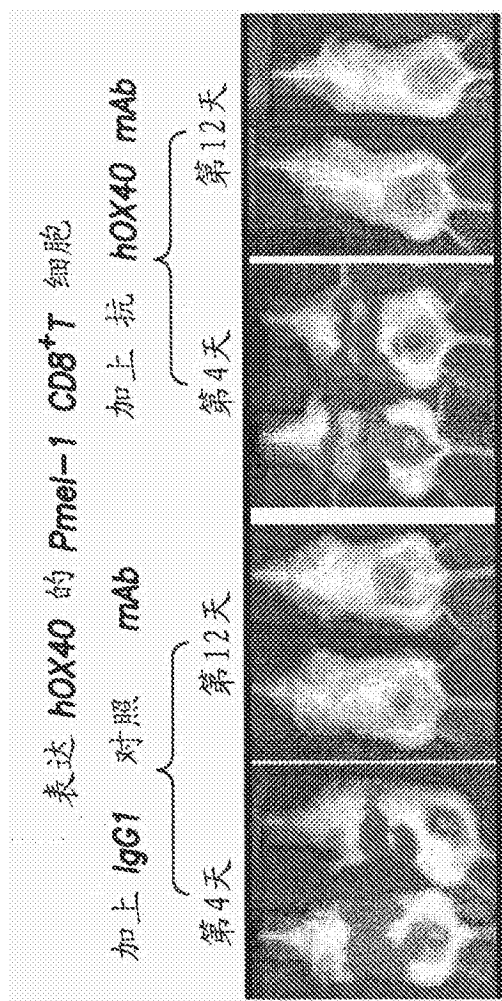


图35B

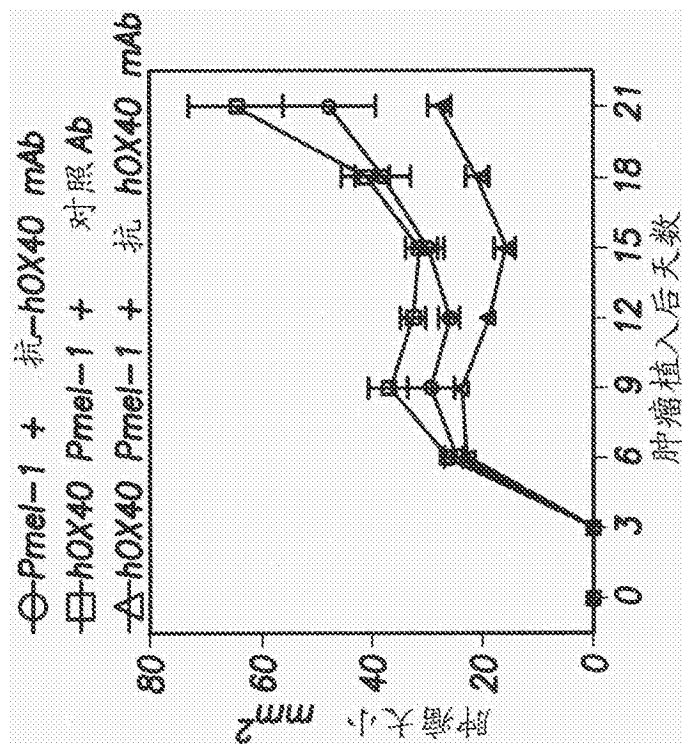


图35C

106-222 VH

	1	2	3	
123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
QIQLVQSGP	ELKKPGETVK	ISCKASGYTF	TDYSMHVWKQ	CDR1 SEQ ID No.1
QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYSMHVWRQ	
QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ	

SEQ ID No.4 106-222 VH
 SEQ ID No.5 Hu106 VH
 X61012

4	5	6	7	
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY	
APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY	
APGQGLEWMG	-----	-----RFVF	SLDTSVSTAY	

106-222 VH
 Hu106 VH
 X61012

8	9	1	1	
012223456789	0123456789	000000123456789	0123	
abc	abcde	CDR3 SEQ ID No.3		
LQINNLKNETAT	YFCANPYDY	VSYIAMDYWGHTSV	TVSS	
LQISSSLKAEDTAV	YYCANPYDY	VSYIAMDYWGHTTV	TVSS	
LQISSSLKAEDTAV	YYCAR-----	WGKGTTV	TVSS	

106-222 VH
 Hu106 VH
 X61012

图36

106-222 VL		CDR1 SEQ ID No.7	
SEQ ID No.10	106-222 VL	1	2
SEQ ID No.11	Hu106 VL	3	
AJ388641		123456789 0123456789 0123456789 0123456789	
		DIVMTQSHK FMSTSVRDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK	
		DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK	
		DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITC-----WYQQK	
		CDR2 SEQ ID No.8	
		4	5
		0123456789 0123456789 0123456789 0123456789	6
		PGQSPKLLIY SASLYTGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ	7
		PGKAPKLLIY SASLYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ	
		PGKAPKLLIY -----GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ	
		CDR3 SEQ ID No.9	
		8	9
		0123456789 0123456789 01234567	0
		AEDLAVYVCQ QHYSTPRTFG GGTKLEIK	
		PEDIATYVCQ QHYSTPRTFG QGTKLEIK	
		PEDIATYVC- -----FG QGTKLEIK	
106-222 VL			
Hu106 VL			
AJ388641			

图37

Hu106-222 VH

SpeI

SEQ ID No.6

ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGTCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT
M A W V W T L L F L M A A A Q S

ATCCAAGCACAGGTTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S

GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG
V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V

CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG
R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E

CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGTCTCTCTTTGGACACCTCTGTCTCAGC
P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S

ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT
T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A

AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGGAACCCAG
N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T

HindIII

GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
V T V S S

图38

ACGTTCCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAAATTC
T F G Q G T K L E I K

119-122 VH			
SEQ ID No.16	119-122 VH	1	2
SEQ ID No.17	Hu119 VH	3	
Z14189			
		123456789	0123456789 0123456789 0123456789
		EVQLVESGG	GLVQPGESLK LSCESNEYEF PSHDMSWVRK
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR LSCAASEYEF PSHDMSWVRQ
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ
		4	5
		6	7
		0123456789	01223456789 0123456789 0123456789
			a CDR2 SEQ ID No.14
	119-122 VH	TPEKRLELVA	AINSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY
	Hu119 VH	APGKGLELVA	AINSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY
	Z14189	APGKGLEWVA	-----RFTI SRDNAKNSLY
		8	9
		0	1
		012223456789	0123456789 0000123456789 0123
			abc CDR3 SEQ ID No.15
	119-122 VH	LQMSSLRSED	TAL YYCARHYDDY YAWFAYWGQGLV TVSA
	Hu119 VH	LQMNSLRAED	TAV YYCARHYDDY YAWFAYWGQGLV TVSS
	Z14189	LQMNSLRAED	TAV YYCAR-----WGQGLV TVSS

图40

	1	2	3
	123456789	0123456789	0123456789
		abcd	CDR1 SEQ ID No.19
SEQ ID No.22	DIVLTQSPA	SLAVSLGQRA	TISCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
SEQ ID No.23	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----WYQQK

	CDR2	SEQ ID	No.20
4	0123456789	5	6
	0123456789	0123456789	0123456789
119-122 VL	PGQPPKLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT
	PGQAPRLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT
Hu119 VL	PGQAPRLLIY	-----GVP	ARFSGSGSGT
M29469			

CDR3 SEQ ID No.21	8	9	0	1
119-122 VL	0123456789	0123456789	01234567	
Hu119 VL	EEDAATYYCQ	<u>HSRELPLTFG</u>	AGTKLELK	
M29469	PEDFAVYYCQ	HSRELPLTFG	GGTKVEIK	
	PEDFAVYYC-	-----FG	GGTKVEIK	

图41

Hu119-122 VH

SpeI

SEQ ID No.18

ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTCCCTTGTCTTATTTAAAAAGT
M D F G L S L V F L V L I L K S

GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V Q C E V Q L V E S G G L V Q P G G S

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCTTCCCATGACATGTCTTGGTCTC
L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V

CGCCAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAAATAGTGTGGTAGC
R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S

ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N

TCACTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A

AGACACTATGATGATTACTACGCCCTGGTTTGCTTACTGGGCCAAGGACTATGGTCAC
R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V T

HindIII

GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
V S S

图42

119-122 VL

NheI

SEQ ID No.24

GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTCTGGGTTCCA
M E T D T L L L W V L L L W V P

GGTTCCACTGGTGAAATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G

GAAAGGCCACCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y

ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCAGACTCCTCATCTATCTTGCATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S

AACCTAGAATCTGGGTCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T

CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R

GAGCTTCGCTCAGGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCGAGATCAAAACGTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K

ECORI
CTGAATTC

图43