



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113912723 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 11

(21) 申请号 202111024797.5

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2015.03.24

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 37/02 (2006.01)

1405264.1 2014.03.24 GB

A61P 31/00 (2006.01)

1405275.7 2014.03.25 GB

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 29/00 (2006.01)

201580023010.X 2015.03.24

(71) 申请人 癌症研究技术有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 M·J·格兰尼 A·怀特

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 张小勇

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

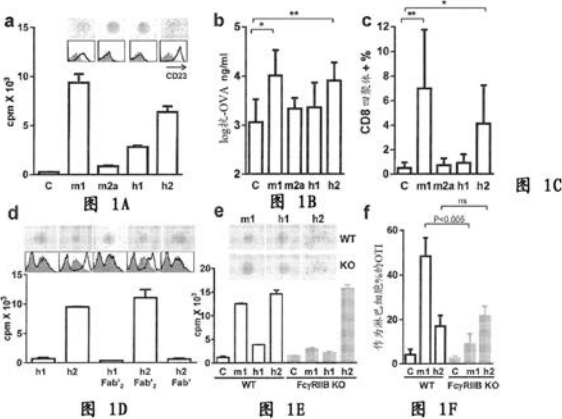
权利要求书1页 说明书53页 附图32页

(54) 发明名称

含有修饰IgG2结构域的引起激动或拮抗特性的修饰抗体及其用途

(57) 摘要

通过体外和体内方法的组合,本发明人显示人IgG2 (h2) 向抗-CD40抗体或对包括4-1BB和CD28的其他免疫刺激受体有特异性的抗体递送独特的FcγR-独立性激动活性。抗人CD40mAb, LOB7.4的研究显示h2的独特活性依赖于铰链和CH1二硫键的精确排列。将LOB7.4 ‘锁定’ 成更柔性 ‘h2A’ 或更紧密 ‘h2B’ 构象的化学 ‘改组’ 或诱变分别赋予了拮抗和激动特性。以这种方式对h2进行工程化允许开发具有免疫刺激或免疫抑制特征的试剂,这直接提示了治疗性mAb药剂和融合蛋白的设计。



1. 一种特异性结合人细胞表面上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述修饰抗体激动由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或者由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,其中所述抗体不是人IgG2抗体,并且另外其中不是人IgG2的所述修饰抗体的整个或基本上重链铰链和C_H1结构域和任选地轻链恒定区被hIgG2抗体相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和任选地轻链恒定区替换。

2. 根据权利要求1所述的修饰抗体,其选自hIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE或IgM,其中所述抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和任选地整个或基本上整个轻链恒定区已被hIgG2相应的整个或基本上整个轻链和铰链和C_H1结构域(“H2区”或“H2结构域”)替换。

3. 根据权利要求1或2所述的修饰抗体,其中位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基中的任一个或两者(其中编号是根据Kabat)是缺失的或者被改变成不同的氨基酸残基,从而使得所述所得修饰抗体的激动特性相对于其中所述半胱氨酸残基中的任一个或两者未改变的其他方面相同抗体有所增加。

4. 根据权利要求1、2或3所述的修饰抗体,其中在所述修饰抗体的所述H2区中突变或缺失的唯一半胱氨酸残基为所述轻链的位置214处的半胱氨酸并且所述修饰抗体包含(i) 其中在所述H2区中没有半胱氨酸残基缺失或修饰的重链或者(ii) 所述重链的位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的一个或多个是缺失或突变的,从而产生修饰抗体,其中所述所得修饰抗体的激动特性相对于缺乏所述缺失或修饰的其他方面相同的抗体有所增加。

5. 根据权利要求3或4所述的修饰抗体,其为修饰的hIgG1或hIgG3。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合人免疫细胞。

7. 根据权利要求6所述的修饰抗体,其中所述免疫细胞包括树突状细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞或以上任何组合。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体缺乏激动活性。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过10%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过20%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

含有修饰IgG2结构域的引起激动或拮抗特性的修饰抗体及其用途

[0001] 本申请是CN201580023010.X的分案申请。

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求2014年3月24日提交的英国申请号1405264.1和2014年3月25日提交的英国申请号1405275.7的优先权,所述申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0004] 领域

[0005] 本申请大体上涉及以下发现,人IgG2 (h2) 向抗-CD40抗体和其他免疫刺激受体抗体递送独特的Fc γ R-独立性激动活性,所述其他免疫刺激受体包括4-1BB和CD28;以及可能地其他B7/CD28和TNF/TNFR家族成员,以及另外的发现,即h2的独特激动或相反地拮抗活性依赖于铰链和C_H1二硫键的精确排列。基于此发现,本发明提供了新颖激动和拮抗抗体以及其在治疗中的用途,其中IgG2的铰链区被诱变为将所述抗体‘锁定’成更柔性‘h2A’或更紧密‘h2B’构象,以便分别赋予抗体拮抗和激动特性。

[0006] 背景

[0007] 单克隆抗体 (mAb) 为革命性的癌症治疗,它重新燃起免疫系统可用于根除肿瘤的信念 (Sliwowski等, (2013); Hodi FS等, (2010); Wolchok JD等, (2013)。使用抗-CTLA-4和抗-PD-1mAb的结果已证实以下观点, T-细胞免疫可提供针对攻击性和难以治疗的癌症的持久防护,所述癌症诸如转移性黑色素瘤和非小细胞肺癌。(Hodi FS等, (2010); Wolchok JD等, (2013); Topalian SL等, (2012)。不同mAb药剂以不同方式介导其作用并且改进治疗功效需要精确理解其作用机制。此外, mAb同种型的选择主要由于指导抗原接合下游事件的Fc γ 受体 (Fc γ R) 相互作用中的差异而为关键的 (Nimmerjahn F&Ravetch JV (2012); White AL等, (2013)。

[0008] 药剂通过消耗其细胞靶标起作用,诸如用抗-CD20消耗恶性B细胞 (Uchida J等, (2004)) 或用抗-CTLA4和抗-GITR消耗鼠T调节细胞 (Simpson TR等, (2013) Bulliard Y等, (2013)。对于这种类型的药剂,小鼠IgG2a (m2a) 和人IgG1 (h1) 为有效的,因为它们具有高激动性/抑制性 (A/I) Fc γ R结合比率 (Hamaguchi Y等, The Journal of experimental medicine 203 (3): 743-753; Nimmerjahn F&Ravetch JV (2005))。相比之下,其作用依赖于激动受体接合的mAb诸如免疫刺激性抗-CD40 (Brahmer等, (2012); Bruhns等, Blood 113, 3716-3725或细胞凋亡促进抗死亡受体 (DR) 4、DR5和Fas (Li F&Ravetch JV (2012); Wilson NS等, (2011)。Xu Y等, (2003) 似乎主要依赖于与抑制性Fc γ RIIB交联来递送其活性 (White AL等, (2011); Li F&Ravetch JV (2013), White等, (2013))。对于这种类型的药剂,小鼠IgG1 (m1) 在临床前模型中为最佳的,因为它具有低A/I比率并且以足够亲和力接合Fc γ RIIB,以介导交联 (White等, (2011); Li F&Ravetch JV (2011))。在临床试验中的激动性抗-CD40 mAb CP870,893 (Vonderheide RH等, (2007)) 为一种人IgG2 (h2), 它基于其同种型而未被预测接合Fc γ R (Bruhns P等, (2009)。另外两种激动性较小的CD40抗体ChiLOB7.4和SGN40二者均为h1 (Advani R等, (2009); Johnson等, (2010))。另外,最新研究表明h2恒定区赋予特异性抗人CD28 mAb (TGN1412) 增加的刺激活性 (Ball C等, (2012))。

[0009] 尽管这样,但是在本发明之前还不清楚待用于人治疗中的应在激动性mAb或融合蛋白中使用的最佳同种型。具体地说,关于抗体同种型如何可以实现治疗性抗体的治疗特性即其激动性或拮抗特性的理解较少。本发明解决了此需要,提供了改进的激动性(以及拮抗性)抗体,并且还提供了用于合成所述抗体的方式。在一个示例性实施方案中,这些抗体和融合蛋白例如靶向TNFR超家族成员的那些抗体和融合蛋白适用于治疗适应症,其中无论是激动性还是拮抗性抗体或融合蛋白均是治疗上需要的。

[0010] 概述

[0011] 本发明提供一种关于用于产生具有激动或拮抗特性的抗体的最佳抗体同种型的理解。更确切地说,本发明提供保护具有特异性突变的人IgG2恒定区的抗体,其中根据这些特异性突变,这些抗体具有激动或拮抗特性。

[0012] 本发明特别利用针对多种人共刺激受体(CD40、4-1BB和CD28)的mAb确定人IgG同种型的免疫调节活性并因此显示人IgG2(h2)比h1或人h4赋予这些药剂更大的免疫刺激活性,并且显示此活性并不依赖于FcγR相互作用中的差异而是依赖于h2铰链和CH1结构域中二硫键的构象,所述构象使用诱变可被操纵成将mAb‘锁定’成具有相反水平的激动水平的不同构象,从而提供具有限定水平的活性的同源超激动治疗性抗体,所述活性独立于局部微环境中的FcγR表达水平。

[0013] 本发明还涉及包含具有特异性突变的人IgG2恒定区的此类抗体和融合蛋白在疾病治疗或预防中作为受体激动剂或受体拮抗剂的用途,其中此类受体激动剂或受体拮抗剂具有治疗性应用。在示例性实施方案中,所述抗体将特异性接合TNF超家族成员,诸如CD40、LTα、LTβ、FASL、CD30、CD27、OX40、TRAIL/APO-2L、4-1BB、4-1BBL、TNF、TNF-R、TRANCE、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、FN14等;或者接合B7/CD28家族成员,诸如B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、B7-DC(PD-L2或CD273)、B7-H1、B7-H2、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、B7-H5(VISTA)、B7-H6(NCR3LG1)、B7-H7(HHLA2)、PD-1(CD279)、PD-L3、CD28、CTLA-4(CD152)、ICOS(CD278)、BTLA、NCR3、CD28H、以及Nkp30。

[0014] 发明目的

[0015] 本发明的一个目的为提供新颖的免疫激动剂或拮抗剂,并且更具体地说涉及超激动剂。

[0016] 本发明的一个更具体的目的为提供包含突变IgG2恒定区的新颖免疫激动剂或拮抗剂,其中此类突变增强了此类激动剂或拮抗剂多肽例如激动性或拮抗性IgG2抗体或IgG2/IgG2嵌合融合蛋白的激动或拮抗特性。

[0017] 本发明的另一个具体目的为提供非人IgG2同种型例如人IgG1、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE或IgM抗体的修饰激动或拮抗抗体,其中hIgG2的整个或基本上整个铰链和C_H1区和任选地hIgG2的轻链恒定区用于替换非人IgG2抗体例如人IgG1、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE或IgM相应的轻链恒定区、铰链和C_H1结构域或区。

[0018] 本发明的一个更具体的目的为提供特异性结合人免疫细胞上表达的受体或配体的激动抗体,其中所述抗体激动由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性、或由所述配体和受体的相互作用引起的生物活性,并且另外其中所述激动抗体包含至少人IgG2的C_H1和铰链区(“H2区”),其中所述IgG2区的一个或多个半胱氨酸残基被去除或改变成不同的氨基酸残基,从而使得所得激动抗体的激动特性相对于其中所述一个或多个半胱氨酸未

改变的其他方面相同的抗体有所增加。

[0019] 本发明的另一个具体目的为提供特异性结合人细胞表面上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述修饰抗体激动由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或者由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,其中所述抗体不是人IgG2抗体,并且另外其中不是人IgG2的所述修饰抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和任选地轻链恒定区被hIgG2抗体相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域(“H2区”或“H2结构域”)和任选地轻链恒定区替换。

[0020] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的选自hIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE或IgM的修饰抗体,其中所述抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域已被hIgG2相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域(“H2区”或“H2结构域”)替换。

[0021] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基中的任一个或两者(其中编号是根据Kabat)是缺失的或者被改变成不同的氨基酸残基,从而使得所得修饰抗体的激动特性相对于其中所述半胱氨酸残基中的任一个或两者未改变的其他方面相同抗体有所增加。

[0022] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中在所述修饰抗体的H2区中突变或缺失的唯一半胱氨酸残基为轻链的位置214处的半胱氨酸并且所述修饰抗体包含(i) 其中在H2区中没有半胱氨酸残基缺失或修饰的重链或者(ii) 在重链的位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的一个或多个是缺失或突变的,从而产生修饰抗体,其中所得修饰抗体的激动特性相对于缺乏所述缺失或修饰的其他方面相同的抗体有所增加。

[0023] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其包含修饰hIgG1或hIgG3。

[0024] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体特异性结合人免疫细胞。

[0025] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体结合树突状细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞或以上任何组合。

[0026] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体缺乏激动活性。

[0027] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过10%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0028] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过20%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0029] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过30%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0030] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过40%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0031] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0032] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%-80%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0033] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中所述抗体激动由人受体或配体引起的一种或多种生物活性或由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,并且另外其中所述修饰抗体包含至少hIgG2的轻链恒定区和重链的C_H1和铰链区(“H2区”),其中选自位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基的半胱氨酸残基中的任一个或两者被去除或改变成不同的氨基酸残基,从而使得所得激动抗体的激动特性相对于其中所述半胱氨酸残基二者未改变的其他方面相同的抗体有所增加(其中氨基酸编号是根据Kabat)。

[0034] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体轻链在位置214处的半胱氨酸残基为缺失或突变的并且所述修饰抗体包含(i)其中H2区内没有半胱氨酸残基缺失或突变的重链或者(ii)所述修饰抗体包含其中位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的至少一个缺失或突变的重链。

[0035] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中重链的H2区内没有半胱氨酸残基缺失或突变。

[0036] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中重链内的位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的至少一个缺失或突变。

[0037] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中重链内的位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的一个或两个残基的任何组合缺失或突变。

[0038] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体的H2区为处于h2B构象中。

[0039] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中hIgG2重链H2区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基包括位置127处的重链半胱氨酸残基。

[0040] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中轻链区内没有半胱氨酸被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代。

[0041] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中hIG2轻链恒定区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基包括位置214处的轻链半胱氨酸残基。

[0042] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中hIgG2 H2区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基选自位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基。

[0043] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体包含取代在轻链的位置214处的半胱氨酸的丝氨酸和/或取代在重链的位置127处的半胱氨酸残基的丝氨酸残基。

[0044] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的hIgG1或hIgG3或hIgG4同种型的修饰抗体,其中所述hIgG1、hIgG3或hIgG4的整个铰链或C_H1区被hIgG2相应的铰链和C_H1区替换。

[0045] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体为hIgG1。

[0046] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体包含轻链或重链H2区内的一个或多个半胱氨酸残基。

[0047] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体包含H2区之外的另外的修饰,所述修饰并不影响或可感知地影响(不超过10%变化)所述修饰抗体的激动特性。

[0048] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体特异性结合在人细胞表面上表达的TNF或B7超家族成员,例如CD40、4-1BB或CD28。

[0049] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体特异性结合在至少一种类型的人免疫细胞上表达的受体或配体。

[0050] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体结合选自以下各项的免疫细胞:T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、肥大细胞、巨噬细胞、NK细胞、以及树突状细胞或其组合。

[0051] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体包含整个人IgG2 CH1和铰链区。

[0052] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体缺乏所述人IgG2 Fc区。

[0053] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中所述抗体或融合物的激动特性为Fc γ R独立性的。

[0054] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,其中所述抗体特异性结合选自CD40、LT α 、LT β 、CD30、CD27、OX40、4-1BB、TNF-R、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、以及FN14的TNFR超家族成员或结合选自B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7-H1、B7-H2、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、B7-H5 (VISTA)、B7-H6 (NCR3LG1)、B7-H7 (HHLA2)、PD-1 (CD279)、CD28、CTLA-4 (CD152)、ICOS (CD278)、BTLA、NCR3、CD28H、以及NKp30的B7/CD28家族成员。

[0055] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体结合选自4-1BB、CD40或CD27的TNFR成员或者B7/CD28家族成员为CTLA-4或CD28。

[0056] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体,所述修饰抗体包含LOB7.4的可变区。

[0057] 本发明的另一个具体目的为提供含有如上所述的修饰抗体的药物组合物,所述药物组合物包含药物有效量的此修饰抗体。

[0058] 本发明的另一个具体目的为提供此类抗体或具有其他免疫激动剂的此类组合物的用途。

[0059] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰抗体在治疗方法中的用途,所述治疗方法包括施用至少一种修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白,所述方法包括施用有效量的至少一种修饰抗体或含有根据本发明的修饰抗体的融合蛋白或组合物。在优选的实施方案中,治疗的病状选自癌症、感染、过敏症、自身免疫、移植、GVHD或炎症。

[0060] 本发明的另一个具体目的为提供特异性结合人细胞表面上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述修饰抗体拮抗由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或者由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,其中所述抗体不是人IgG2抗体,并且另外其中不是人IgG2的所述修饰抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和任选地轻链恒定区被hIgG2抗体相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和轻链恒定区(“H2区”或“H2结构域”)替换,其中H2区内一个或多个半胱氨酸残基被任选地修饰,所述修饰引起所得修饰抗体的拮抗特性增加。

[0061] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的选自hIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE或IgM的修饰拮抗抗体,其中所述抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域以及任选地轻链恒定区已被hIgG2相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域以及轻链恒定区(“H2区”或“H2结构域”)替换。

[0062] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述IgG2 H2区的选自位置232、233、236和239处的半胱氨酸残基中的至少一个半胱氨酸残基被去除或改变成不同的氨基酸残基,使得所得修饰抗体的拮抗特性相对于其中所述一个或多个半胱氨酸残基未改变的其他方面相同的抗体有所增加。

[0063] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述修饰抗体在轻链的残基214处的半胱氨酸和在重链的残基127处的半胱氨酸未缺失、修饰或被另一种氨基酸残基取代。

[0064] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述抗体的H2区内的半胱氨酸修饰选择性促进或引起所述修饰抗体的重链和轻链经由轻链的位置214处的半胱氨酸和重链的位置127处的半胱氨酸来缔合。

[0065] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述修饰抗体的H2区呈h2A构象。

[0066] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中在H2区内除C214和C127之外的至少一个半胱氨酸残基被改变成丝氨酸残基。

[0067] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体包含取代重链的位置232处的半胱氨酸的丝氨酸。

[0068] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体包含取代重链的位置233处的半胱氨酸的丝氨酸。

[0069] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其包含修饰hIgG1或hIgG3。

[0070] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰抗体特异性结合人免疫细胞。

[0071] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体结合免疫细胞,包括树突状细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞或以上任何组合中的至少一种。

[0072] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体缺乏拮抗活性。

[0073] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰

时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过10%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0074] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过20%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0075] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过30%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0076] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过40%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0077] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测到。

[0078] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体特异性结合在人细胞上表达的受体或配体,其中所述抗体拮抗由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性、或由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,并且另外其中所述拮抗抗体包含至少人IgG2的C_H1和铰链和轻链恒定区(“H2区”),其中所述IgG2 H2区的选自位置232、233、236和239处的半胱氨酸残基中的至少一个半胱氨酸残基被去除或改变成不同的氨基酸残基,使得所得拮抗抗体的拮抗特性相对于其中所述一个或多个半胱氨酸残基未改变的其他方面相同的抗体有所增加。

[0079] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中在轻链的位置214和重链的位置127处的半胱氨酸残基未缺失、修饰或被另一种氨基酸取代。

[0080] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中在hIgG2 H2区内的一个或多个半胱氨酸残基或其他氨基酸残基被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代,使得H2区呈h2A构象。

[0081] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中在hIgG2 H2区内所述半胱氨酸残基中的至少一个被改变成丝氨酸残基。

[0082] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体包含取代重链的位置232处的半胱氨酸的丝氨酸。

[0083] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体包含取代重链的位置233处的半胱氨酸的丝氨酸。

[0084] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体特异性结合在人细胞表面上表达的TNF或TNFR超家族成员或B7家族成员。

[0085] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体特异性结合至少一种类型的人免疫细胞。

[0086] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰抗体特异性结合在T细胞、B细胞、肥大细胞、巨噬细胞、单核细胞、NK细胞或树突状细胞上表达的受体或配体。

[0087] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体包含整个人IgG2恒定重链和轻链恒定区。

[0088] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,所述修饰拮抗抗体缺乏人IgG2 Fc区。

[0089] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述抗体的拮抗特性为Fc γ R独立的。

[0090] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中所述抗体特异性结合选自以下各项的TNF/R超家族成员:CD40、CD40L (CD154)、LT α 、LT β 、FASL (CD178)、CD30、CD30L (CD153)、CD27、CD27L (CD70)、OX40、OX40L、TRAIL/APO-2L、4-1BB、4-1BBL、TNF、TNF-R、TRANCE、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、以及FN14。

[0091] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体,其中TNF/R或B7家族成员为4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、CD27、CD28、B7.1、B7.2或CD70。

[0092] 本发明的另一个具体目的为提供含有如上所述的修饰拮抗抗体的药物组合物,所述药物组合物包含有效量的修饰抗体或含有根据本发明的修饰抗体的融合蛋白。

[0093] 本发明的另一个具体目的为提供含有如上所述的修饰拮抗抗体的药物组合物或其用途,所述药物组合物可包含另一种免疫激动剂或其他活性剂。

[0094] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体在治疗方法中的用途,所述治疗方法包括施用至少一种拮抗抗体或含有根据本发明的抗体的融合蛋白或组合物,其中此类病状优选地包括癌症、过敏、感染性疾病、自身免疫、移植、GVHD或炎性病状。

[0095] 本发明的另一个具体目的为提供如上所述的修饰拮抗抗体或其用途,所述用途包括施用包含LOB7.4的可变区的抗体或对CD40、4-1BB或CD28有特异的另一种抗体,所述抗体可用于治疗诸如癌症、感染、过敏、自身免疫或炎症的病状。

[0096] 本发明的另一个具体目的为提供新颖IgG2激动抗体或含有所述抗体的融合蛋白,它们包含整个人IgG2恒定区,所述抗体在铰链区内被修饰以改变二硫键改组。

[0097] 本发明的另一个具体目的为新颖IgG2激动抗体或含有所述抗体的融合蛋白,所述抗体不含人IgG2 Fc或另一个Fc区。

[0098] 本发明的另一个具体目的为提供新颖拮抗或激动抗体,其中人IgG2的整个或基本上整个铰链和C_H1区和任选地hIgG2的轻链恒定区用于替换人IgG1、IgG3、IgG4、IgA或IgM的相同结构域或区,任选地其中所述引入的hIgG2铰链和/或hIgG2 C_H1区和轻链恒定区可包含增强所得修饰抗体的激动或拮抗特性的一个或多个突变。

[0099] 本发明的另一个具体目的为提供新颖激动或拮抗抗体,其中所述抗体或融合物的激动特性为Fc γ R独立的。

[0100] 本发明的另一个具体目的为提供新颖激动或拮抗抗体或其自人治疗中的用途,其中所述抗体特异性结合选自以下各项的TNFR超家族成员:CD40、LT α 、LT β 、CD30、CD27、OX40、4-1BB、TNF、TNF-R、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、以及FN14。

[0101] 附图简述

[0102] 图1(a)-图1(f)包含显示人IgG2赋予抗-hCD40 mAb,LOB7.4 Fc γ R独立的激动活性的实验结果。

[0103] 图2(a)-图2(c)包含显示人IgG2赋予抗-TNFRSF mAb Fc γ R独立的活性的实验结

果。

[0104] 图3(a)-图3(d)包含显示h2 C_H1和铰链区赋予LOB7.4 Fc γ R-独立的激动活性的实验结果。

[0105] 图4(a)-图4(e)包含显示LOB7.4 h2的激动活性依赖于其形成h2B构象的能力的实验结果。

[0106] 图5(a)-图5(e)包含显示抗小鼠CD40 mAb,3/23的同种型依赖性的实验。

[0107] 图6(a)-图6(e)包含证实LOB7.4人IgG2对人细胞的活性比人IgG1更大并独立于Fc γ R相互作用的实验结果。

[0108] 图7(a)-图7(d)包含证实h2A和h2B的拮抗和激动特性的实验结果。

[0109] 图8(a)-图8(h)包含显示不同人同种型对抗-CD40活性的作用的实验。

[0110] 图9(a)-图9(g)包含进一步验证同种型对图8中的实验的抗-CD40活性的作用的对照实验。

[0111] 图10(a)-图10(e)包含显示人IgG2的Fc γ R独立性活性的实验数据。

[0112] 图11(a)-图11(f)包含验证ChiLob 7/4 h2激动活性为Fc γ R-独立性的其他实验数据。

[0113] 图12(a)-图12(e)包含显示人IgG2针对多种受体靶标的拮抗作用的数据。

[0114] 图13(a)和图13(b)包含显示CH1和铰链区赋予ChiLob7/4 h2活性的实验。

[0115] 图14包含验证ChiLob 7/4开关突变体类似地结合CD40的对照实验。

[0116] 图15(a)-图15(i)总结了显示诱变生成一系列ChiLob 7/4 h2激动形式的诱变实验结果。

[0117] 图16(a)-图16(g)包含验证ChiLob 7/4 h2A和h2B形式的不同活性的另外的实验数据。

[0118] 图17包含不同二硫键连接的h2亚型的示例性代表方案(改编自(Martinez 2008))。左图示出h2A的结构,其被认为是h2合成的形式,并且右图h2B示出主要的交替排列形式。突出显示参与改组的半胱氨酸残基。二硫键由各链之间或各链内的黑线表示。所示的CE-SDS曲线示出了h2A和h2B形式的解析(正如所述,参考)而h1解析为单峰。

[0119] 图18(a)包含不同二硫键连接的h2亚型的示例性代表方案(改编自(Martinez 2008)),图18(b)示出指定ChiLob 7/4 mAb的nrCE-SDS曲线。指示了h2A和h2B位置和10kDa标准。

[0120] 图19、图20和图21示例性示出诱变可将抗体‘锁定’成h2a和h2B形式的方法。

[0121] 图22、图23、图24和图25包含显示h2的诱变产生不同激动剂和拮抗剂的方式的实验数据。

[0122] 图26包含表明h2B对比h2A形式的激动或拮抗特性可参与抗原加盖或NFκB活化的实验数据(表明多聚化可克服对Fc γ R x-连接的需要)。

[0123] 图27包含显示不同同种型形式的抗-CD40抗体的免疫刺激特性的实验数据。

[0124] 图28包含显示不同同种型形式的抗-CD40抗体对B细胞增殖的作用的B细胞测定结果。

[0125] 详述

[0126] 定义

[0127] 正如所述的,本发明在广义上涉及新颖激动或拮抗抗体和融合蛋白、以及其制造和在治疗中的用途,其中所述抗体或融合蛋白包含人IgG2恒定结构域,其中所述抗体包含产生具有增强的激动剂或拮抗剂特性的抗体或融合蛋白的特异性突变。

[0128] 应理解,本发明不限于特定方法、方案、细胞系、动物种类或属、以及所述试剂,这些可发生改变。也应了解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且并不意图限制本发明的范围,本发明仅由所附权利要求书限定。除非上下文另外明确地指出,否则本文所用的单数形式“一个(种)(a/and)”和“所述(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个此类细胞并且提及“蛋白质”包括提及一种或多种蛋白质以及其本领域技术人员已知的等效物,等等。除非另外明确说明,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域一般技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0129] “激动剂”是指与受体组合可产生细胞反应的化合物。激动剂可为直接结合受体的配体。或者,激动剂可通过例如以下方式与受体间接组合:(a)与直接结合受体的另一种分子形成复合物,或者(b)以其他方式引起另一种化合物修饰以使得所述另一种化合物直接结合受体。激动剂可称为特定受体或受体家族的激动剂(例如,TNF或TNFR激动剂)。“超激动剂”为在铰链和CH1区的半胱氨酸中具有突变从而提供最佳激动特性的激动剂。

[0130] “拮抗剂”是指当与感兴趣的分子例如TNF或TNFR家族超家族成员或其他配体或受体接触时引起所述分子的某一活性或功能的大小与在所述拮抗剂不存在时观察到的活性或功能的大小相比有所减小的化合物。感兴趣的特定拮抗剂包括对包含IgG2恒定结构域的TNFR超家族成员有特异的抗体和融合蛋白。

[0131] “抗原”是指能够作为免疫反应的靶标的任何物质。抗原可为例如细胞介导的免疫反应和/或由受试者生物体引起的体液免疫反应的靶标。或者,抗原可为与免疫细胞接触时的细胞免疫反应(例如,免疫细胞成熟、细胞因子产生、抗体产生等)的靶标。

[0132] 在本文中“TNF/R”大体上是指肿瘤坏死因子(TNF)超家族或肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的任何成员。TNF和TNFR超家族包括例如CD40、CD40L(CD154)、LT α 、LT β 、LT- β R、FASL(CD178)、CD30、CD30L(CD153)、CD27、CD27L(CD70)、OX40、OX40L、TRAIL/APO-2L、4-1BB、4-1BBL、TNF、TNF-R、TNF-R2、TRANCE、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、GITR配体、RELt、TWEAK、FN14、TNF α 、TNF β 、RANK、RANK配体、LIGHT、HVEM、GITR、TROY、以及RELt。除非另外说明,否则提及TNF/R激动剂或拮抗剂化合物可包括任何药物可接受形式的化合物。

[0133] “B7家族成员”或“B7-CD28家族成员”是指在涉及免疫信号传导的免疫细胞上表达的受体和配体大家族的成员。对于B7多肽家族成员常见的典型结构元件包括细胞外结构域,包括V-样和C-样Ig结构域。发现信号序列处于全长B7家族多肽的N-末端,并且接着是N-至-C顺序的V-样Ig结构域、C-样Ig结构域、跨膜结构域、以及细胞内结构域。在B7多肽的细胞外结构域内存在某些关键性残基,即涉及多肽的二硫键形成和三维构象的两对保守性半胱氨酸残基(每对处于每个Ig结构域内)。B7多肽家族中度保守,其中人家族成员的Ig结构域彼此非常类似,并且与来自其他物种的B7家族成员的Ig结构域非常类似。所述家族包括子家族,包括B7-1(CD80)、B7-2(CD86)和B7-H1、以及嗜乳脂蛋白(BTN)/MOG(髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白样)家族成员,其中免疫调节B7子家族缺乏B30.2结构域并且嗜乳脂蛋白/MOG子家族具有B30.2结构域。B7/CD28超家族的成员作为实例包括B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、

B7-DC (PD-L2或CD273)、B7-H1、B7-H2、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、B7-H5 (VISTA)、B7-H6 (NCR3LG1)、B7-H7 (HHLA2)、PD-1 (CD279)、PD-L3、CD28、CTLA-4 (CD152)、ICOS (CD278)、BTLA、NCR3、CD28H、以及NKp30。

[0134] 例如TNF或TNFR超家族成员或其他免疫细胞受体的术语“与X有关的生物效应”和“X活性”可互换使用并且包括与和激动剂或拮抗剂特异性相互作用的部分例如TNF或TNF/R超家族成员有关的任何生物效应。

[0135] 在本文中术语“宿主细胞”通常是指工程化为表达根据本发明的一种或多种抗体的任何细胞。此细胞作为实例包括细菌、真菌、酵母、哺乳动物、无脊椎动物诸如昆虫、植物以及禽类细胞。

[0136] 术语“表达载体”是指含有促进靶宿主细胞内的外源蛋白表达操纵的元件的DNA载体。通常，序列的操纵和用于转化的DNA的产生首先在细菌宿主细胞例如大肠杆菌中进行，并且载体通常将包含促进此类操纵的序列，包括细菌复制起点和适当的细菌选择性标记物。选择性标记物编码在选择培养基中生长的转化宿主细胞的存活或生长所需要的蛋白质。未用含有选择基因的载体转化的宿主细胞将不能在所述培养基中存活。典型选择基因编码以下蛋白质：(a) 对原核宿主细胞赋予对抗生素或其他毒素的抗性；(b) 补体营养缺陷不足；或(c) 供应不可从复合培养基获得的关键营养素。用于转化酵母的示例性载体和方法描述于例如，在Burke, D.、Dawson, D.和Stearns, T. (2000) .Methods in yeast genetics:a Cold Spring Harbor Laboratory course manual.Plainview,N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press中。感兴趣的多肽编码序列可操作地连接至提供所述多肽在酵母细胞内的表达的转录和翻译调节序列。这些载体组件可包括但不限于以下各项中的一种或多种：增强子元件、启动子和转录终止序列。还可包括用于分泌多肽的序列，例如信号序列等。酵母复制起点为任选的，因为表达载体通常整合到酵母基因组中。在本发明的一个实施方案中，感兴趣的多肽可操作地连接至或融合至提供多肽从酵母二倍体细胞中最佳分泌的序列。

[0137] 在本文中“抗体结构域”或“区”是指抗体分子的不同部分或亚基。在IgG情况下，重链具有四个亚基“C_H3”、“C_H2”、“C_H1” (恒定部分) 和V_H (可变部分)。轻链具有两个亚基C_L和V_L。两个C_H3单元直接连接，而C_H2单元被寡糖分开。C_H1位于重链“铰链”之后并且通过二硫键连接至C_L单元。“C_H2结构域”通常根据EU编号系统从IgG的约残基231延伸至约340。C_H2结构域的独特之处在于它并未与另一个结构域紧密配对。相反，两个N-连接的分支碳水化合物链插入在完整天然IgG分子的两个C_H2结构域之间。已推测，碳水化合物可提供用于结构域-结构域配对的取代基并帮助稳定CH2结构域。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)。“C_H3结构域”包含Fc区内C-末端残基至C_H2结构域的片段 (即根据EU编号系统从IgG的约氨基酸残基341至约氨基酸残基447)。

[0138] 术语“Fc区”通常是指包含免疫球蛋白重链的C末端多肽序列的二聚体复合物，其中C-末端多肽序列为可通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体获得的多肽序列。Fc区可包含天然或变体Fc序列。尽管免疫球蛋白重链的Fc序列的边界可发生改变，但是人IgG重链Fc序列通常被定义为从约位置Cys226的氨基酸残基或从约位置Pro230到Fc序列的羧基末端的片段。免疫球蛋白的Fc序列通常包含两个恒定结构域C_H2结构域和C_H3结构域，并且任选地保护C.sub.H4结构域。在本文中“Fc多肽”意指构成Fc区例如单体Fc的一种多肽。Fc多肽可从任

何适合的免疫球蛋白获得,所述免疫球蛋白诸如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD或IgM。

[0139] 在本文中术语“h2A”构象是指IgG2或含有IgG2的铰链和CH2区的修饰抗体的特定亚型。人IgG2在免疫球蛋白中的独特之处在于其改组C_H1和铰链区((25-28))内的二硫键的能力。h2的两种亚型占主导地位。h2A具有柔性的经典IgG构象,其中C_H1中的重链(HC)C127连接至轻链(LC)中的C214并且在相反铰链半胱氨酸232、233、236和239之间存在4个HC间二硫键。

[0140] 在本文中术语“h2B”或“h2B”构象是指IgG2或含有hIgG2的铰链和CH2区的修饰抗体的第二种特定亚型。((25-28))。h2B比h2A更紧密并且HC C127和LC C214与HC铰链半胱氨酸232和233形成二硫键桥。

[0141] “Kabat”或“EU编号方案”也称为“EU索引”,它是本领域公认的且广泛接受的指定抗体和具体地人抗体、以及包含在整个抗体或抗体片段内的特定结构域的特定氨基酸残基的系统。除非本文另外指示,否则氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,其也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991中所述的。

[0142] 术语“可操作地连接”是指与另一种核酸序列处于功能关系中的核酸。例如,如果信号序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,那么其可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子或增强子影响序列的转录,那么其可操作地连接至编码序列。通常,“可操作地连接”意指所连接的DNA序列为连续的并且在分泌前导序列的情况下为连续的且处于阅读框中。然而,增强子并不需要为连续的。连接通过在常规限制性位点处连接或者经由本领域技术人员所熟悉的PCR/重组方法(Gateway^R Technology;Invitrogen,Carlsbad California)来实现。如果此类位点并不存在,那么根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0143] 术语“启动子”是指位于结构基因起始密码子上游(5')的控制它们可操作地连接的特定核酸序列的转录和翻译的非翻译序列(通常在约100至1000bp内)。此类启动子属于若干类别:诱导型启动子、组成型启动子和阻抑型启动子(响应于阻遏子的不存在而增加转录水平)。诱导型启动子可响应于培养条件的某一变化(例如存在或不存在某一营养素或温度变化)来引发在它们控制下自DNA的转录程度增加。

[0144] 启动子片段也可用作同源重组和表达载体到宿主基因组中的相同位点的整合的位点;或者可选择性标记用作同源重组的位点。

[0145] 在本文中术语“感兴趣的多肽”是指激动性或拮抗性人IgG2抗体或人IgG2融合蛋白。

[0146] 术语“所需抗体”通常是指对靶标例如TNF或TNF/R超家族成员有特异的亲本抗体或片段。术语“抗体”旨在包括具有匹配并识别表位的特定形状的任何含多肽链分子结构,其中一种或多种非共价结合相互作用使复合物在分子结构与表位之间稳定。原型抗体分子为免疫球蛋白,并且来自所有来源例如人、啮齿动物、兔、牛、羊、猪、狗、其他哺乳动物、鸡、其他禽类等的所有类型的免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等均被视为“抗体”。

[0147] 感兴趣的抗体编码序列包括由天然序列编码的那些序列、以及凭借遗传密码子的简并性而使序列不同于公开核酸的核酸、以及其变体。变体多肽可包含氨基酸(aa)取代、添加或缺失。氨基酸取代可为保守性氨基酸取代或去除非必需氨基酸的取代,例如改变糖基

化位点或通过取代或缺失非功能必需的一个或多个半胱氨酸残基来最小化错误折叠。变体可设计为保留或增强蛋白质特定区域(例如,功能结构域、催化性氨基酸残基等)的生物活性。变体还包含本文所公开的多肽的片段,具体地是生物活性片段和/或与功能结构域相对应的片段。用于体外诱变克隆基因的技术为已知的。在本发明中还包括已利用普通分子生物技术修饰以提高它们对蛋白水解降解的抗性 or 优化溶解特性或使它们更适合用作治疗剂的多肽。

[0148] 嵌合抗体可通过重组方式通过将可变轻链区和重链区(V_L 和 V_H)组合来产生,所述抗体从一种物种中具有来自另一种物种的恒定轻链区和重链区的产生抗体细胞中获得。通常嵌合抗体利用啮齿动物或兔的可变区和人恒定区来产生具有主要人结构域的抗体。此类嵌合抗体的产生为本领域已熟知的,并且可通过标准方式实现(例如如美国专利号5,624,659中所述的,所述专利以引用的方式整体并入本文。在本文中重组嵌合抗体将包含铰链区内修饰的人IgG2恒定区,以便产生作为受体或配体激动剂或拮抗剂起作用的抗体。

[0149] 人源化抗体被工程化为含有甚至更多人样免疫球蛋白结构域,并且仅结合动物来源抗体的互补决定区。这通过小心评估单克隆抗体可变区的高变环序列并使它们匹配人抗体链的结构来实现。尽管在表面上较复杂,但是所述方法直接用于实践。参见例如美国专利号6,187,287,所述专利以引用的方式完全并入本文。

[0150] 免疫球蛋白及其片段可进行翻译后修饰,例如以添加效应部分,诸如化学接头,可检测部分诸如荧光染料、酶、毒素、底物、生物发光材料、放射性材料、化学发光部分等,或者特异性结合部分诸如链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白或生物素等,它们可用于本发明的方法和组合物中。

[0151] 现在已深入了解了在脊椎动物中的抗体的一般结构(Edelman, G.M., Ann.N.Y.Acad.Sci., 190:5 (1971))。抗体由分子量约23,000道尔顿的两条相同多肽轻链(“轻链”)和分子量53,000-70,000的两条相同重链(“重链”)组成。在“Y”构型四条链通过二硫键连接,其中轻链在“Y”构型开口处开始将重链括在一起。“Y”构型的“分支”部分标记为 F_{ab} 区;“Y”构型的主干部分标记为 F_c 区。氨基酸序列取向从“Y”构型顶部的N-末端延伸至每条链底部的C-末端。N-末端具有带有对引起它的抗原的特异性的可变区,并且长约100个氨基酸,在轻链与重链之间和从抗体至抗体之间存在轻微变化。

[0152] 在每条链中可变区连接至恒定区,所述恒定区延伸所述链的其余长度并且在特定类别的抗体内并不随着抗体特异性而改变(即,产生它的抗原)。存在五种已知的主要类别的恒定区,它们决定了免疫球蛋白分子的类别(与 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ (γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ)重链恒定区相对应的IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)。恒定区或类别决定了随后的抗体效应功能,包括补体活化(Kabat, E.A., Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, 第2版, 第413-436页, Holt, Rinehart, Winston (1976)), 以及其他细胞反应(Andrews, D.W.等, Clinical Immunobiology, pp 1-18, W.B.Sanders (1980); Kohl, S.等, Immunology, 48:187 (1983)); 而可变区决定了与它反应的抗原。轻链被分类为 κ 链(κ)或 λ 链(λ)。每个重链类别均可用 κ 或 λ 轻链制备。轻链和重链彼此共价结合,并且当通过杂交瘤或通过B细胞产生免疫球蛋白时两条重链的“尾”部分通过共价二硫键彼此结合。

[0153] 表述“可变区”或“VR”是指抗体的每对轻链和重链内直接涉及抗体与抗原的结合的结构域。每条重链在一个末端具有可变结构域(V_H),接着具有多个恒定结构域。每条轻链

具有在一个末端的可变结构域(V_L)和在另一个末端的恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。

[0154] 表述“互补决定去”、“高变区”或“CDR”是指抗体轻链或重链可变区内可见的一个或多个高变区或互补决定区(CDR)(参见Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,(1987))。这些表述包括如Kabat等所定义的高变区(“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat E.等,US Dept.of Health and Human Services,1983)或抗体三维结构中的高变环(Chothia和Lesk,J Mol.Biol.196 901-917(1987))。每条链中的CDR由框架区紧密固定在一起并且与来自另一条链的CDR一起帮助形成抗原结合位点。在所述CDR内存在已描述为选择性决定区(SDR)的选择氨基酸,所述选择性决定区表示由CDR以抗体-抗原相互作用使用的关键性接触残基(Kashmiri,S.,Methods,36:25-34(2005))。

[0155] “表位”或“结合位点”为抗原接合肽(诸如抗体)特异性结合的抗原上的部分或区域。蛋白质表位可包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性组分)和未直接参与结合的其他氨基酸残基,诸如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,氨基酸残基处于特异性结合肽的“足迹”内)。

[0156] 短语第一抗体“基本上”或“至少部分”结合与第二抗体相同的表位意指所述第一抗体表位结合位点在抗原上包含的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或更多的氨基酸残基构成第二抗体表位结合位点。而且,第一抗体基本上或部分结合与第二抗体相同或重叠的表位意指第一抗体和第二抗体竞争结合如上所述的抗原。因此,术语“结合与单克隆抗体基本上相同的表位或决定簇”意指一种抗体与所述抗体“竞争”。

[0157] 短语“结合与感兴趣的抗体相同或重叠的表位或决定簇”意指抗体所述感兴趣的抗体“竞争”在所述感兴趣的抗体特异性结合的抗原上的至少一个或所有的残基。结合与本文所述的单克隆抗体基本上或大致上相同的表位的一种或多种抗体的鉴别可容易利用许多其中可评定抗体竞争的免疫筛选测定中的任一种测定来确定。许多此类测定按常规方式实施并为本领域中所熟知的(参见例如1997年8月26日提交的美国专利号5,660,827,所述专利以引用的方式特别并入本文中)。应理解实际上确定本文所述抗体所结合的表位并不需要以任何方式鉴别结合与本文所述单克隆抗体相同或基本上相同或重叠的表位的抗体。

[0158] 术语“融合蛋白”是指包含经由其单独肽主链由共价键连接的两个或更多个蛋白质或其片段的分子,最优选地通过编码那些蛋白质的多核苷酸分子的遗传表达所生成。在本发明中,融合蛋白通常将包含IgG2恒定结构域,通常其中铰链区被突变来锁定激动或拮抗构象的H2。

[0159] 术语“免疫球蛋白融合蛋白”是指多肽的功能部分(通常包含细胞表面蛋白的细胞外结构域)与免疫球蛋白恒定区的一个或多个部分例如铰链 C_{H1} 、 C_{H2} 或 C_{H3} 结构域或其部分或组合的融合物。在一个实施方案中,细胞外结构域或片段所来源的多肽为TNF配体和受体超家族的成员。所述分子的Ig部分将整体或部分来源于IgG2免疫球蛋白并且可能将包括其他免疫球蛋白同种型的部分,包括例如IgG1、IgG3、IgG4、IgM、IgA等。免疫球蛋白融合蛋白在本文中被称为Fc融合蛋白的Ig,其中铰链和/或CH1区内的半胱氨酸被修饰或缺失。

[0160] 因此,本发明大体上涉及包含IgG2恒定区、优选地在铰链区内含有特定突变的IgG2恒定区的结构域的激动或拮抗抗体和免疫球蛋白融合蛋白。本发明人在本文中利用体

外和体内方法的组合证实人IgG2 (h2) 向抗体、特别是抗-CD40抗体和其他TNF/TNFR受体 (包括4-1BB和CD28) 抗体递送独特的Fc γ R-独立性激动活性。更具体地说, 本发明人利用以下实施例中所公开的材料和方法证实以下各项:

[0161] 人IgG2比人IgG1赋予抗-CD40更大激动活性

[0162] 在本发明之前, 用于激动性mAb's的最佳同种型为未知的, 因为还未报道用于激动性mAb's的人同种型的正式研究。具体地说, 如下文详细公开的, 抗人CD40 mAb LOB7.4的研究惊人地显示h2的独特活性依赖于铰链和C_H1二硫键的精确排列。将LOB7.4 '锁定' 成更柔性 'h2A' 或更紧密 'h2B' 构象的化学 '改组' 或诱变分别赋予了拮抗和激动特性。以这种方式对h2进行工程化允许开发具有免疫刺激或免疫抑制特征的多肽, 这直接提示了治疗性mAb和治疗性融合蛋白的设计。

[0163] 如下文中详细公开的, 本发明人比较了当表达为具有h1或h2恒定区时mAb针对CD40以及共刺激T细胞受体CD28和4-1BB的免疫刺激特性。在所有情况下, 本发明人发现h2的激动性比h1更大, 这独立于mAb Fc和Fc γ R二者的相互作用。抗人CD40 mAb LOB7.4的嵌合形式的分析显示活性依赖于二硫键在h2铰链中的排列。此外, 特定半胱氨酸残基的突变可将mAb锁定成激动或拮抗构象。基于这些观察, 人IgG2因此提供了操纵mAb功能从而允许选择Fc γ R-独立性激动剂以及阻断不适当免疫活化的抑制剂的独特机会。

[0164] 先前利用抗小鼠CD40 mAb 3/23的研究证实3/23m1具有高激动性而3/23m2a由于与Fc γ RIIB结合的差异而不具有激动性 (White AL等, (2013); White等 (2011))。为了分析人同种型对活性的作用; 本发明人将3/23和抗人 (h) CD40 mAb LOB7.4的可变区克隆到h1和h2恒定区上并且在许多体外和体内测定中比较了它们的活性与m1和m2a的活性。

[0165] 对于两种mAb, h2证实了与m1类似的免疫刺激特征, 而h1和m2a为大部分无活性的 (参见图1、图2和图5)。在体内, 3/23m1和h2有效刺激Ab和CD8 T细胞针对OVA的反应、脾脏DC的活化, 并且在疫苗环境 (表达OVA的实体EG7肿瘤) 和治疗环境中 (BCL1淋巴瘤模型) 提供针对肿瘤发展的保护, 而3/23 h1和m2a并不如此 (图5a-图5e和 (18))。类似地, 在体外, LOB7.4 h2比LOB7.4 h1引起大得多的分离的人B细胞活化 (如通过作为活化标记物的细胞团聚或细胞聚集所评定的)、活化标记物CD23的上调和³H-胸苷结合以及分离的主要人朗格汉斯细胞的活化 (如通过CD70上调所评定的) (参见图6a、图6b)。

[0166] LOB7.4 m1和h2 (而非m2a或h1) 也允许hCD40 Tg小鼠B细胞在体外活化和增殖 (参见图1a) 并刺激hCD40 Tg小鼠中Ab和内源性CD8 T细胞针对OVA的反应大量且显著的增加 (图1b、图1c)。因此, 在许多模型系统中, 使用针对小鼠和人受体的mAb, h2恒定区比h1赋予抗-CD40更大的激动活性。

[0167] 人IgG2的Fc-和Fc γ R-独立性活性

[0168] 表面等离子体共振 (SPR) 证实LOB7.4 h2具有对Fc γ R (包括Fc γ RIIB (图6c), 其为小鼠B细胞上的唯一Fc γ R) 的低亲和力, 这表明h2的激动活性为Fc γ R-独立的。与此一致的是, 去除LOB7.4 h2 Fc以产生Fab' ₂并不会减小其促进人或hCD40 Tg小鼠B细胞活化和增殖的能力, 而进一步裂解成Fab' 或使用h1或h1 Fab' ₂会减小活性 (图1d并且数据未示出)。另外, pan阻断的抗-Fc γ RII mAb并不影响LOB7.4 h2活化人B细胞的能力, 而它确实阻断通过Fc γ RII过度表达的交联细胞诱导的LOB7.4 h1的活性 (图6e)。此外, 尽管LOB7.4 m1和h2二者均促进hCD40 Tg B细胞在体外活化和增殖, 但是Fc γ RIIB的遗传缺失消融了m1而非h2的

活性(图1e)。最后,当用OVA免疫hCD40转基因Fc γ RIIB WT或KO小鼠时,在KO动物中LOB7.4 m1增加CD8 T细胞扩增的能力减小>80%,而Fc γ RIIB的损失并不会影响LOB7.4 h2的激动活性(图1f)。

[0169] 人IgG2对其他共刺激受体具有激动性

[0170] H2恒定区还赋予其他免疫刺激mAb Fc γ R-独立的活性。最初来源于亲本m1 SC26 (24) 的另一种抗-hCD40 mAb特异性的嵌合h2 (目前在临床开发中为SGN40 (Seattle Genetics)) 活化分离的人B细胞,如通过团聚、CD23上调和增殖所评定的,而嵌合h1并不如此(图2a)。此外,亲本SC26 m1和SGN40-Soton h2促进了hCD40 Tg小鼠B细胞的增殖(图2b),而当Fc γ RIIB在遗传上缺失时,仅SGN40-Soton h2刺激增殖(图2b)。

[0171] 利用针对两种人T细胞受体4-1BB (CD137;内部产生的mAb) 和CD28 (基于TGN1412专利保护序列) 的mAb得到类似的观察。对于两种靶标,当促进体外人T细胞增殖时h2的激动性大于h1(图2c)。抗-hCD28 h2 mAb引起并不表达Fc γ R的纯化T细胞团聚和增殖,再次支持Fc γ R-独立性作用机制(图2c)。

[0172] 人IgG2铰链和C_H1结构域为激动活性所必需的

[0173] 由于h2 Fc并非活性所需要的,所以利用其中LOB7.4 h1和h2的C_H1或C_H1和铰链结构域二者转换的嵌合mAb研究C_H1和铰链结构域的作用(图3)。使用超过扩增mAb浓度范围(<1至>5,000ng/ml)的hCD40 Tg WT或Fc γ RIIB KO B细胞的增殖测量活性。天然LOB7.4 h2引起两种细胞类型的显著活化和增殖,其中活性峰值为约200ng/ml,而在任何浓度下均观察到很少的对h1的反应(图3a)。LOB7.4 m1在Fc γ RIIB WT中而非KO细胞中刺激增殖并且在低浓度下功效显著小于h2(图3a,底部2个图)。具有转换的C_H1结构域(CH1 1/2和C_H1 2/1)或其中h1的C_H1和铰链转移至h2(铰链1/2)的mAb在两种细胞类型之一中具有很小的活性。相比之下,将h2 CH1和铰链区转移至h1(铰链2/1)产生与天然h2类似的活性(图3b)。这些数据表明h2的C_H1和铰链结构域为激动活性所必需的。

[0174] 与体外数据一致,LOB7.4 h1和铰链1/2突变体在hCD40 Tg小鼠中引起CD8 T细胞针对OVA的反应的较少刺激,而LOB7.4 h2和铰链2/1嵌合体引起抗-OVA-特异性CD8 T细胞扩增的大量和显著增加(图3c)。

[0175] 二硫键改组指示huIgG2激动活性

[0176] 人IgG2在免疫球蛋白中的独特之处在于其改组C_H1和铰链区内的二硫键的能力(图17; Wpych等, (2008); Martinez等, (2008); Zhang等, (2010))。h2的两种亚型占主导地位:具有柔性的经典IgG构象的h2A,其中C_H1中的重链(HC) C127连接至轻链(LC) 中的C214并且在相对铰链半胱氨酸232、233、236和239之间存在4个HC间二硫键(图17);以及更紧密的h2B,其中HC C127和LC C214与铰链半胱氨酸232和233形成二硫键桥(图17)。h2A和h2B形成可通过非还原性毛细管电泳(nrCE-SDS (26, 29)),它揭示了h2的双峰和h1的单峰(图17)) 来以分析方式分离。

[0177] 嵌合LOB7.4 mAb的nrCE-SDS分析显示仅铰链2/1突变体保留改组二硫键并产生双峰的能力(图3d)。这与以下观察一致,HC半胱氨酸127(在C_H1中)、232或233(在铰链中)中任一个的突变防止了二硫键重新排列(26, 30)并且表明LOB7.4 h2的激动活性与其改组二硫键的能力相关。

[0178] 为了确定h2A和h2B形式是否与不同水平的激动活性相关,在具有或不具有变性剂

的氧化还原缓冲液中使LOB7.4化学‘倾向 (skewed)’ 于其h2A或h2B形式,如(28)中所述的。在单独的氧化还原缓冲液中孵育迫使大部分(~75%)成为h2B,如通过nrCE-SDS所评定,而加入盐酸胍使得>70%倾向于h2A(图4A,左图)。倾向的mAb与显著不同的活性相关,如通过其引起人B细胞团聚和活化或hCD40 Tg B细胞增殖(图4a并且数据未示出)的能力评定的,其中h2B的活性显著大于h2A。当抗小鼠CD40 mAb 3/23、h2倾向于其A和B形式时观察到类似的活性差异(图7a-图7c)。

[0179] 点突变可将h2锁定成激动和拮抗构象

[0180] 由Ballard和其他人(26,30)进行的简洁研究表明HC C232或C233突变成S可将h2锁定成其h2A形式,而HC C127S产生与h2 B类似的形式。将这些突变引入到LOB7.4 h2中并通过nrCE-SDS证实其朝向h2A或h2B偏移(图4b)。HC C232S或C233S导致LOB7.4 h2激动活性完全丧失,如通过hCD40 Tg B细胞增殖所测量的(WT或Fc γ RIIB KO;图4c,蓝色线)。相比之下,HC C127S在高浓度下相对于天然h2使活性增加至几乎与倾向的h2B一样高的水平(图4c,底部图,蓝色线)。有趣的时,与HC C233S h2A共孵育减小了LOB7.4 h2B的活性,特别是在高浓度下,从而产生几乎与天然h2相同的特征性钟形曲线(图4d)。类似地,LOB7.4 HC C233S也在体外显著减小SGN40 h2在hCD40 Tg B细胞上的激动活性(图7d)。

[0181] LC C214S的诱变还产生显著的活性变化。LC C214S防止了LC与HC之间的二硫键合,从而在nrCE-SDS上产生分离的LC和HC二聚体峰(图4c)。重要的是注意到H:L二硫键的丧失并不影响抗体结合,因为在生理缓冲液中两条链通过非共价键保持在一起。当与WT LC或LC C214S组合时,这通过CD40在HC C233S的SPR上的相同亲和力来证实(图4e)。

[0182] 当LC C214S与WT HC、HC C232S或C233S组合时,HC二聚体在nrCE-SDS上作为单一物质运行,这表明在每种情况下的单一构象。在所有情况下,LC C214S增加了激动活性并提供了特征性B细胞增殖曲线:与WT HC组合时观察到与C127S突变体类似的曲线;与HC C232S组合时产生与天然h2类似的曲线;并且当与HC C233S组合时可见与倾向的h2B非常类似的最大活性(图4c,红色线)。这些曲线具有高再现性并使用hCD40 Tg或人B细胞时为类似的(数据未示出)。因此,一级序列中的小变化可对h2活性具有显著作用,从而使得能够工程化激动剂和拮抗剂的活性谱。

[0183] 人IgG同种型和抗-CD40活性

[0184] 为了评估人恒定区对激动活性的作用,使用抗人CD40 mAb ChiLob 7/4 (Chowdhury,2014),通常用于癌症患者的第1期临床试验。最初通过当嵌合到不同人恒定区时ChiLob 7/4引起人B细胞在体外活化和增殖的能力来评定激动活性。所有嵌合体均类似地结合CD40,如通过流式细胞术测定的(图8D)。ChiLob 7/4 h1和h2的Fab' 片段也以类似的亲和力结合固定的hCD40(分别为10.0和 10.2×10^{-9} M),如通过SPR所测量的(图8E)。当加入到纯化的人B细胞中时,与ChiLob 7/4 h1或h4相比,ChiLob 7/4 h2引起大得多的B细胞活化和增殖,如分别通过同型粘附(细胞团聚)和3H胸苷摄取所评定的(图8A)。为了确定Fab' 臂交换并不引起h4活性缺乏,将稳定的S228P突变引入到h4中(Angal等,1993)。此改变(在图8A中的h4*)并不改变h4活性。

[0185] 在临床前模型中,抗-CD40 mAb的免疫刺激和治疗作用可通过上调DC上的共刺激分子CD70来介导,从而使得CD8 T细胞免疫性增强(French等,1999;French等,2007;Sanchez等,2007)。为了比较ChiLob 7/4 h1和h2活化人DC的能力,评定其在体外上调原代

人朗格汉斯细胞上的CD70表达的能力(图8B),以及其增强由IFN γ 测量的EBV-特异性人CD8 T细胞的朗格汉斯细胞诱导的引物的能力(图8C)。与对B细胞的作用一致,ChiLob 7/4 h2增强了朗格汉斯细胞CD70表达和CD8 T细胞致敏,而ChiLob 7/4 h1并不如此。

[0186] 在hCD40 Tg小鼠中评估ChiLob 7/4同种型的体内激动活性(Ahonen等,2002)。初始体外研究证实小鼠细胞中的hCD40响应于与ChiLob 7/4的连接,这与人细胞中类似,因为ChiLob 7/4 h2刺激比h1(图8D)大得多的分离hCD40 Tg小鼠B细胞活化和增殖,所述活化和增殖依赖于hCD40的表达(图9F)。为了测试体内激动活性,评估ChiLob 7/4当与模型抗原OVA共同施用增强CD8 T细胞和Ab反应的能力。与体外数据一致,ChiLob 7/4 h2刺激比使用h1所观察到的显著更大的抗-OVA CD8 T-细胞扩增以及Ab反应(图8E)。因此使用一系列的体外和体内方法,ChiLob 7/4证实了当与h2对比h1或h4恒定区一起表达时更大的免疫刺激活性。

[0187] 当评估抗小鼠CD40 mAb 3/23时也在体内观察到h1与h2激动活性之间的类似差异,其中还是3/23 h2而非h1刺激有效的抗-OVA CD8 T-细胞和Ab反应(图8F)并且上调脾脏DC上的CD70(图9G)。重要的时,免疫刺激能力的此差异与治疗活性的差异相关,其中3/23h2而非h1在疫苗环境和治疗环境中提供针对肿瘤发展的保护,在所述疫苗环境中用OVA-表达的EG7肿瘤攻击以OVA和抗-CD40免疫的小鼠(图9G)并且在治疗环境中用单一100 μ g剂量的mAb治疗具有建立的B细胞淋巴瘤的小鼠(BCL₁淋巴瘤模型(White,2014);图8H)。

[0188] 人IgG2活性为Fc γ R-独立的。

[0189] h2对Fc γ RIIB(Bruhns等,2009)的低亲和力、在B细胞上的主导Fc γ R表明与使用Fc γ RIIB作为交联剂的激动性m1(White等,2011),其活性可为Fc γ R独立的。实际上,其中可溶性Fc γ R穿过固定的mAb的表面等离子体共振(SPR)显示ChiLob 7/4 h2与任何人或小鼠Fc γ R的结合非常少(图11A和图11B),而ChiLob 7/4 h1在相同条件下明显结合hFc γ RI、IIA和IIIA以及mFc γ RI和IV(图11A和图11B)。许多方法证实h2的Fc γ R独立性活性。首先,pan-阻断的抗-Fc γ RII mAb(AT10)未能阻止ChiLob 7/4 h2对人B细胞的活化,如通过同型粘附和CD23上调所评定的(图10A)。相比之下,AT10完全阻断了在Fc γ II-表达的同型细胞存在下诱导的ChiLob 7/4 h1进行的活化(图10A)。

[0190] 其次,通过胃蛋白酶裂解去除ChiLob 7/4 h2 Fc(产生F(ab')₂片段)并不阻止人B细胞的活化和增殖,而Fab'的减小消除了活性(图10C)。相比之下,在相同条件下ChiLob 7/4 h1当作为IgG、F(ab')₂或Fab'加入时不能活化细胞,尽管过量加入时每种形式均防止由ChiLob 7/4 h2进行的活化(图10B;图11F)。第三,来自小鼠B细胞的遗传缺失的Fc γ RIIB为这些细胞表达的唯一Fc γ R,它并不阻止响应于广泛浓度范围的ChiLob 7/4 h2的增殖(图10C),而对活性依赖于Fc γ RIIB交联的ChiLob 7/4 m1的反应(White等,2011)已丧失(图10C)。注意,ChiLob 7/4 h2当用于以不同浓度刺激B细胞时产生特征性'钟'形反应曲线并且在非常低水平为有活性的,这与活性随着浓度升高而增加的交联依赖性ChiLob 7/4 m1相反(图10D)。这些不同曲线据推测反映了同种型赋予激动活性的不同机制并且在下文中进一步讨论。

[0191] 还在体内证实了ChiLob 7/4 h2的Fc γ R-独立性活性。遗传缺失的Fc γ RIIB先前显示导致mAb针对CD40(Li和Ravetch,2011;White等,2011;White,2014)、Fas、DR4和DR5(Li和Ravetch,2012;Wilson等,2011;Xu等,2003)的激动活性丧失,与野生型(WT)小鼠中观察

到的相比,它并不减少由ChiLob 7/4 h2诱导的OVA-特异性CD8 T细胞的扩增,而正如预期的,ChiLob 7/4 m1的活性在Fc γ RIIB KO中丧失(图10D)。在不具有激动性Fc γ R的 γ 链KO小鼠中两种mAb均保留活性(图10D)。最后,当作为F(ab')₂片段施用时ChiLob 7/4提供强烈的体内CD8T细胞反应刺激,而使用ChiLob 7/4 h1的F(ab')₂时未观察到反应(图10E)。

[0192] 人IgG2对多种靶标具有激动性。

[0193] 然后在临床试验中评价h2恒定区对另一种hCD40 mAb SGN40(也称为嵌合h1)的活性的影响(Advani等,2009)。由亲本序列合成SGN40的可变区并将其嵌合到h1和h2恒定区上,以产生SGN40-Soton h1和h2。与ChiLob 7/4类似地,SGN40-Soton h2提供比SGN40-Soton h1更大的人B细胞活化和增殖(图12A)并且hCD40 Tg B细胞响应于SGN40-Soton h2而非其亲本m1 SC26的增殖(Hanks等,2005)独立于Fc γ RIIB表达(图12B)。另外,SGN40-Soton h2显著且有效地增加了Fc γ RIIB KO小鼠中的体内OVA-特异性CD8 T细胞反应,而SGN40-Soton h1并不如此(图12C)。在临床开发中使用针对另外两种共刺激受体h4-1BB和hCD28的mAb的进一步研究显示了由人T细胞体外增殖评定的h1与h2激动功能的类似差异(图12D-图12E)。对于hCD28,使用纯化的T细胞。T细胞通常缺乏Fc γ R但显示出同型粘附和响应于抗-hCD28 h2的增殖增加,再次支持了Fc γ R-独立性作用模式(图12E)。与ChiLob 7/4(图8A)类似的,在纯化的T细胞培养物中h4恒定区并未赋予抗-hCD28活性(图12E)。

[0194] H2活性取决于人IgG2 CH1和铰链区。

[0195] 由于h1和h2 ChiLob 7/4 mAb的可变区相同并且h2的活性独立于其Fc结构域,所以评价ChiLob 7/4 h2的CH1和铰链结构域在激动活性中的作用。为此,产生其中ChiLob 7/4 h1和h2的单独CH1结构域或CH1和铰链结构域二者转换的突变体(图13A)。结构域交换并不干扰抗原结合,如通过流式细胞术评定的(图14)。不同mAb的比较性激动活性通过其促进人B细胞活化和hCD40 Tg B细胞体外增殖的能力来评定(图13A)。当h2的CH1结构域被h1的该结构域(CH1 1/2)替换或者h1的CH1被h2的该结构域(CH1 2/1)替换(图13A, (i)和(ii))时,可见少量B细胞增殖并且未活化人B细胞,除非提供表达高水平Fc γ RIIB的细胞来交联mAb。因此单独h2 CH1结构域(在CH1 2/1中)或单独h2铰链区(在CH1 1/2中)并不赋予活性。类似地,当h2的CH1和铰链被h1的CH1和铰链替换(CH1Hge 1/2)时(图13A(iii))未见活性。然而,当h1的CH1和铰链被h2的CH1和铰链替换(CH1Hge 2/1)(图13A(iv))时观察到Fc γ RIIB WT和KO hCD40 Tg B细胞二者的剧烈人B-细胞活化和增殖,这与使用天然h2所观察到的类似。类似地,在体内,ChiLob 7/4CH1Hge 2/1产生OVA-特异性CD8 T-细胞扩增的显著增加而CH1Hge 1/2为无活性的(图13B)。这些数据显示h2的不常见激动活性需要其CH1和铰链结构域。

[0196] 人IgG2活性依赖于其二硫键构型。

[0197] IgG2在人IgG中的独特之处在于其‘改组’CH1和铰链区内的二硫键(图18)从而产生一系列亚型的能力(Dillon等,2008;Martinez等,2008;Wypych等,2008;Zhang等,2010)。据信所述分子以其“h2A”形式合成,其中CH1中的重链(HC)Cys127连接至轻链(LC)中的Cys214,然后在血液中通过一系列中间体(Liu等,2008)逐渐转化成其‘h2B’形式,其中HC Cys127和LC Cys214与HC铰链Cys232和Cys233形成二硫键(图18A)。重要的时,生理化学特性(Dillon等,2008)和电子显微镜检查(Ryazantsev等,2013)表明h2A具有经典的IgG柔性‘Y’构象,而h2B采用更紧密的形状,其中Fab’臂与铰链紧密保持在一起。h2A和h2B形式可通

过非还原性毛细管电泳(nrCE-SDS; (Martinez等,2008))区分,其中它们与h1的单峰相比被显示为未分离h2中的双峰(图18B)。在以上分析的ChiLob 7/4 mAb突变体中,仅CH1Hge 2/1在nrCE-SDS上保留双峰(图18B),这支持以下假设,二硫键改组对于激动活性为重要的。

[0198] 为了确定不同二硫键合形式的ChiLob 7/4是否与不同激动活性相关,采用两种方法。首先,在变性剂存在或不存在下在氧化还原缓冲液中ChiLob 7/4的化学‘倾向’分别用于富集h2A或h2B(Dillon等,2008)(图15A,顶部图)。这产生显著不同的活性,其中使用倾向的h2B产生比h2A大得多的hCD40Tg B细胞活化(图15A)。当将倾向形式加入到人B细胞中时对于以下各项观察到类似的B细胞活化差异(图16A):倾向形式的ChiLob 7/4CH1Hge 2/1突变体(图16B)和抗小鼠CD40 mAb 3/23,其中3/23h2B能够以可溶形式活化小鼠B细胞,而h2A需要与表达Fc γ RIIB的交联细胞共孵育(图15B;这些细胞表达非生理高水平的能够交联h2的Fc γ RIIB(White等,2011))。h2B倾向形式的ChiLob 7/4还能够作为完整IgG(图15D(i))或作为F(ab')₂片段(图16C)活化Fc γ RIIB KO B细胞,这证实其活性保持为Fc γ R-独立的。其次,使用诱变产生如先前所述的‘锁定’h2A-和h2B-样形式(Allen等,2009;Martinez等,2008)。ChiLob 7/4的HC C232S或C233S突变产生同源h2A mAb,如通过nrCE-SDS评定的(图15C(HC C232S,HC C233S)),所述h2A mAb在所测试的广泛范围的任何浓度下并不刺激hCD40 Tg小鼠B-细胞增殖(图15D(ii)和(iii)),而h2B-样HC C127S突变体(图15C(HC C127S))对于Fc γ RIIB WT和KO细胞显示相对于高浓度天然h2增加的活性(图15D(iv))。

[0199] 这些合并的数据表明h2的Fc γ R独立性激动活性取决于在其铰链和CH1结构域中的精确二硫键构象,并且确切地说取决于其采用更紧密h2B形式的能力。通过CD40连接进行免疫活化似乎需要在细胞膜上的受体成簇,以允许TRAF募集和细胞内信号向下游传导。通过NF κ B活化介导了许多作用(Elgueta等,2009)。使用原代hCD40Tg B细胞(图15E)和转化的人Ramos B细胞(图16D)的实验显示ChiLob 7/4h2B与h2A相比大得多的活化NF κ B的能力,如由细胞刺激之后大大增强的IkB磷酸化所反映的。这与更紧密h2B促进CD40在细胞膜上成簇从而导致NF κ B信号传导和细胞活化的能力一致。

[0200] 诱变产生一定范围的IgG2激动活性。

[0201] 进一步研究显示ChiLob 7/4 h2可被操纵来实现一定范围的激动活性。LC Cys214突变成Ser阻止了LC-HC二硫键合,从而在nrCE-SDS上产生两个峰(图15C(LC C214S))。然而,在非变性条件下mAb保持完整而与CD40的结合没有减少,如通过SPR(图15F)或流式细胞术(图16E)所测量的。LC C214S引起hCD40 Tg B-细胞增殖的增加,这与C127S突变体类似(图15D(i))。然而,LC C214S与HC C232S组合得到与天然h2类似的曲线,其中活性在高浓度下极大地减小(图15D(ii)),而LC C214S与HC C233S组合提供了与倾向的h2B类似的最大活性(图15D(iii)对比(i))。如本文所述,天然ChiLob 7/4(各亚型混合物)当用于在体外刺激B细胞时产生特征性‘钟’形浓度曲线,其中B细胞反应在搞浓度下较低(例如,图10D、图12B和图15D(i))。此作用在使用纯h2B的情况下极大地丧失,其中高浓度保留全部活性(图15D),但在使用h2A和h2B的1:1混合物的情况下再现该结果(图15G)。如果完全缺乏对h2A形式的反应,那么这表明h2A可阻断h2B的活性,从而减小其高浓度下的功效并且表明h2A具有一定水平的拮抗活性。最后,概括ChiLob 7/4 h2A和h2B活性在体内的差异,其中在hCD40Tg Fc γ RIIB KO小鼠中h2B引起比h2A显著更大的OVA-特异性CD8 T细胞(图15H)和OVA特异性IgG(图15I)的扩增。对于h2A和h2B倾向形式的CH1Hge 2/1突变体观察到类似的体内活性差

异(图16F和图16G)。总之,数据表明h2的二硫键结构的操纵使得能够产生具有限定和不同的免疫刺激功能的治疗剂,重要的是所述功能独立于Fc γ R在靶组织中的存在。

[0202] 在实施例中进一步描述所进行的实验并且在下文中更详细地描述了本文所用的材料和方法。

实施例

[0203] 在实施例1-7中使用的材料和方法小鼠

[0204] C57BL/6和RAG^{-/-}小鼠来自Charles River Laboratories (Kent, UK)。其他遗传改变的品系(所有均在C57BL/6背景下)为C57BL/6Fc γ RIIB^{-/-}、OTI TCR转基因品系(来自Dr. Matthias Merkenschlager, Imperial College, London)和人CD40转基因品系(hCD40 Tg)(来自Randolph Noelle (Kings College, London))。人CD40 Tg/Fc γ RIIB^{-/-}小鼠通过与由流式细胞术证实的基因型杂交育种来获得。繁殖动物并在当地动物工厂中养殖动物并且使用约8-12周大的动物。所有实验均根据当地伦理学协会指南在UK Home Office许可证编号PPL30/2451和PPL30/2964下进行。

[0205] 抗体和试剂

[0206] 使用以下杂交瘤:抗人CD23 (MHM6) 来自J Gordon (University of Birmingham)。在室内使用常规杂交瘤技术产生结合Fc γ RIIA和IIB (33) 的抗人Fc γ RII (AT10)、抗人CD40 (LOB7.4; (22)) 和抗人4-1BB。抗小鼠CD19-PE (克隆1D3)、抗人CD19-PE (克隆RFB9) 来自AbDSerotec (Oxford, UK)。抗小鼠CD23-PE来自BD Biosciences。对于OTI细胞染色,使用APC-标记的抗-CD8 α (克隆53-6.7; BD Biosciences) 和先前所述的在室内产生的PE标记的SIINFEKL四聚体 (12)。使用FACS Caliber (BD Biosciences) 进行流式细胞术。鸡卵清蛋白 (OVA) 购自Sigma-Aldridge (Poole, UK)。无内毒素OVA来自AG (Regensburg, Germany)。

[0207] 嵌合抗体

[0208] 编码不同抗体的重链和轻链可变区的DNA构建体从杂交瘤中通过PCR反应扩增或者通过Genewiz, Inc合成。SGN40-Soton和TGN1412-Soton使用公布序列(美国专利号W0 2007/075326和US 7,585,960)产生。将可变区亚克隆到含有不同抗体同种型的恒定区的表达载体(重链的pEE6.4载体和轻链的pEE12.4载体, Lonza)。将重链和轻链载体进一步亚克隆在一起,之后转染到293F细胞以瞬时产生抗体或者转染到CHO-K1细胞中以稳定产生抗体。通过蛋白A-琼脂糖(Sigma-Aldrich)色谱法纯化分泌的抗体并且通过凝胶过滤经由Sephadex 200 (Sigma-Aldrich) 去除聚集物。所有制备物均含低内毒素(<1ng/mg蛋白质),如通过Endosafe-PTS便携式测试系统(Charles River Laboratories)测定的。

[0209] 免疫和免疫反应的评定

[0210] 如对个别实验详述的,经由尾静脉注射200 μ L生理盐水来免疫小鼠。通过ELISA测定血清抗-OVA Ab水平 (34)。在一些实验中,在免疫前一天经由尾静脉给予3X 10⁵脾脏OVA-特异性脾脏CD8 (OTI) T细胞。OTI细胞制备物消耗B细胞,之后使用抗-CD19-PE和抗-PE微珠 (Miltenyi Biotech) 注射。

[0211] 肿瘤治疗

[0212] 对于针对表达OVA的肿瘤的疫苗EG7,在D-6时用5x10⁴OTI细胞过继转移小鼠,接着在D-5时接受0.5mg Sigma OVA+100 μ g抗-CD40 mAb。在D0时用5x10⁵EG7肿瘤细胞皮下攻击

小鼠。监控肿瘤生长并且在达到人道终点时处死小鼠(在任何方向上肿瘤>1.5cm)。如先前所述地进行B细胞淋巴瘤(BCL1)治疗(18)。

[0213] 细胞活化和增殖

[0214] 树突状细胞:对于显微镜检查,在用100 μ g抗-CD40 mAb静脉内注射后2天从RAG^{-/-}小鼠收获脾脏并且如先前所述地对CD70和MIDC8进行切片染色(12)。如先前所述地分离人原代朗格汉斯细胞(LC)(35)。简言之,在根据Helsinki Guidelines由南安普顿和南西汉普郡研究伦理委员会(Southampton and South West Hampshire Research Ethics Committee)批准并获得正式书面同意之后从健康个体获取皮肤样本。在20h酶促消化(Disopase, 2IU, Gibco, UK)分离出上皮层。在从上皮层迁移48h后收集LC并且通过OptiprepTM密度梯度(Axis Shield, Norway)富集至>70%CD1a+HLADR+细胞。将细胞以5 $\times 10^4$ 个细胞/孔接种到96U-底板中补充有青霉素/链霉素(1%, Sigma, UK)和FBS(10%, Invitrogen, UK)的RPMI 1640(Gibco, UK)中并且LOB7.4人IgG1或人IgG2抗体或同种型对照(0.001 μ g/ml-10 μ g/ml)刺激18h。通过流式细胞术评定活化标记物(CD40、CD86、CD70, BD Biosciences, UK)在CD1a+HLADR+(BD Biosciences, UK)LC上的表达。

[0215] B细胞:使用磁性阴性选择试剂盒(Miltenyi Biotec or StemCell Technologies)从脾脏(小鼠)或周围血液单核细胞(PBMC, 人)中纯化B细胞。从血液锥体细胞中分离人PBMC(淋巴细胞分离剂, Axis-Shield), 所述血液锥体细胞通过国家血液中心(Southampton General Hospital)从不具名健康供体中获得。将细胞以1 $\times 10^5$ 个细胞/孔接种到具有不同浓度的mAb的96-孔圆底盘中, 如对于个别实验所述的。对于人细胞, 使用具有和不具有重组人IL-4(20ng/ml)的培养。在一些情况下, 还加入用人Fc γ R转染的1 $\times 10^5$ 个293细胞。如先前(White等(2011))所述地进行转染。为了评定活化, 在孵育过夜后对细胞进行拍照(具有CC12软成像系统的Olympus CKX41显微镜)并且通过流式细胞术(FACSCalibur, BD Biosciences)分析活化标记物表达。在培养5天(小鼠)或8天(人)之后通过[甲基-³H]胸苷(PerkinElmer, Cambridge, UK)结合评定增殖, 如(White等, (2011))所述的。

[0216] T细胞:用2mM CFSE标记人PBMC并且接着在如(36)所述的24孔板中以高密度预培养2天, 其中每孔1.5ml细胞, 1 $\times 10^7$ 个/ml。洗涤预培养的细胞并且以1 $\times 10^6$ 个/ml重新悬浮以用于测定。对于一些实验, 使用总T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从预培养的PBMC中分离出T细胞。对于抗-h4-1BB mAb, 将96孔圆底板的孔用PBS中的0.02 μ g/ml OKT3涂覆4h, 接着洗涤两次并将10⁵PBMC/孔用5 μ g/ml mAb(最终体积150 μ l)孵育5天。通过流式细胞术分析CFSE稀释液来评定CD4⁺细胞的增殖。对于抗-CD28 mAb, 在未涂覆孔中用mAb孵育10⁵个分离的T细胞并且如上所述地评定增殖。结果表示为分裂细胞百分比。

[0217] 表面等离子体共振

[0218] 使用Biacore T100评定可溶性Fc γ 受体与3/23和LOB7.4 mAb同种型之间的相互作用。通过标准胺偶联根据制造商说明书将抗体或作为对照的BSA以高密度(15,000RU)和低密度(1,000RU)固定至CM5传感器芯片(Biacore)的流动细胞中。将可溶性Fc受体(Fc γ RI、IIA、IIB、IIIA和IIIB, R and D Systems, Abingdon, UK)以200、100、50、25、12.5和6.25nM(在50nM点, 重复两次进行)注射通过HBS-EP运行缓冲液(Biacore)中的流动细胞中, 流速为30 μ L/min。将可溶性Fc受体注射5min并且监控解离10min。自动减去对照流动细胞的

背景反应。

[0219] 统计学分析

[0220] 使用GraphPad™Prism软件(GraphPad™Software, inc., La Jolla, California)进行学生T-检验(非成对)。对于Ab反应的比较,对数据进行对数转换,随后进行分析。当分析前对数转换的 $p < 0.05$ 时接受显著性。当 $p < 0.05$ 时接受显著性。

[0221] 实施例1

[0222] 实施例1涉及图1(a)-图1(f)中显示人IgG2赋予抗-hCD40 mAb LOB7.4 Fc γ R独立性激动活性的实验。图(a)显示其中纯化的hCD40Tg小鼠脾脏B细胞用200ng/ml指定的同种型LOB7.4 mAb孵育的实验结果。通过在孵育过夜后的细胞团聚(顶部图)和CD23上调(中部图;填充灰色直方图,未处理对照,黑线处理的细胞)以及作为增殖量度的³H胸苷掺入量(底部图;三份样品的平均值 $\pm$ SE)评估B细胞活化。示出来自7个实验中的1个的数据。图(b和c)示出其中hCD40Tg小鼠用0.5mg Sigma OVA+100 μ g指定的mAb免疫的结果。分别在8天和14天后测定循环SIINFEKL-特异性内源性CD8+T细胞(b)和抗-OVA Ab(c)。示出来自2个实验的组合数据($n=7$)。图(d)示出其中hCD40 Tg B细胞与(a)中一样用1 μ g/ml LOB7.4 h1和h2完整IgG、Fab'₂或Fab'片段孵育16h后进行分析的实验结果。(所示5个实验中的1个)图(e)示出其中作为Fc γ RIIB^{+/+}(WT)或Fc γ RIIB^{-/-}(KO)的hCD40Tg B细胞用1 μ g/ml指定的LOB7.4 mAb孵育并与(a)中一样进行分析的实验结果。示出来自5个实验中的1个的结果。(f)作为Fc γ RIIB^{+/+}(WT)或Fc γ RIIB^{-/-}的hCD40 Tg小鼠用OTI细胞过继转移,接着用100 μ g Sigma OVA+100 μ g指定的LOB7.4 mAb免疫。在5天后列举循环OTI细胞。值为三次重复小鼠的平均值 $\pm$ SD。示出来自2个实验中的1个的结果。

[0223] 实施例2

[0224] 此实施例涉及在图2中示出人IgG2赋予其他抗-TNFRSF mAb Fc γ R-独立性活性。图(a)包含其中人B细胞用抗-hCD40 mAb SGN40-Soton h1或h2孵育的实验结果和如图1(a)中评定的活化和增殖。图(b)包含其中响应于200ng/ml SGN40 h1和h2或SC26 ml(SGN40亲本mAb)而发生的hCD40 Tg B细胞增殖(WT或Fc γ RIIB^{-/-})与图1(e)中一样地评定的实验结果。示出来自2个实验中的1个的结果。图(c)包含其中响应于嵌合h1和h2的人T细胞增殖为PBMC培养物中的抗h4-1BB或纯化T细胞培养物中的抗-hCD28。示出用于比较的同种型处理的对照(C)。在下部图中的照片为用抗-CD28 h1和h2处理的纯化T细胞。

[0225] 实施例3

[0226] 此实施例涉及在图3(a)-图3(d)示出h2 C_H1和铰链区赋予LOB7.4Fc γ R-独立性激动活性的实验。图(a和b)包含天然(a)或其中C_H1(C_H1 1/2和C_H1 2/1)或C_H1和铰链区(交联1/2和交联2/1)已交换(b)的LOB7.4 h1和h2 mAb的(顶部)示意图。在这些图的中部图中,示出与未刺激细胞(灰色直方图)相比,在用指定的mAb孵育过夜后在人B细胞上的CD23表达(黑线)。在这些图的底部图中,通过³H胸苷掺入量来评定响应于各种浓度的嵌合mAb的hCD40 Tg Fc γ RIIB^{+/+}(WT)或Fc γ RIIB^{-/-}(KO)B细胞增殖。在(a)中比较了响应于LOB7.4 h1、h2和m1的增殖。(c)hCD40 Tg小鼠用OTI细胞过继转移,接着用0.5mg Sigma OVA加上100 μ g所指定的LOB7.4 h1或h2或者嵌合铰链1/2或铰链2/1免疫。示出反应峰值(第5天)的循环OTI细胞(平均值 $\pm$ SD, $n=6$,从2个实验中组合)。 $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ 。(D)LOB7.4 h1、h2和嵌合mAb的CE-SDS曲线。

[0227] 实施例4

[0228] 此实施例涉及在图4(a)-图4(e)中示出LOB7.4 h2的激动活性依赖于其形成h2B构象的能力的实验。图(a)包含CE-SDS曲线并示出响应于LOB7.4天然h2或化学倾向于其h2A(‘A’倾向)和h2B(‘B’倾向)形式的h2的hCD40 Tg B细胞增殖。示出2个实验中的1个的结果。图(b)包含具有指定点突变的LOB7.4 mAb的CE-SDS曲线。LC C214S突变防止了HC和LC共价键合并因此这些形式在电泳上为分离的。指示完整IgG、HC-HC复合物(HH)、游离LC(L)和内部10kDa标记物的位置。图(c)示出Fc γ RIIB^{+/+}(WT)或Fc γ RIIB^{-/-}(KO)hCD40 Tg B细胞响应于不同浓度的操纵LOB7.4 mAb的增殖。(示出来自至少3个实验中的1个的结果)。图(d)示出hCD40 Tg B细胞响应于天然LOB7.4 h2、h2A(HC C233S)、倾向的h2B或h2A:h2B的1:1混合物的增殖。(示出来自>5个类似实验中的1个的数据。)图(e)示出结合固定hCD40的指定LOB7.4 h2突变体的SPR曲线。所用的mAb浓度为:100、20、4、0.8和0.16nM, hCD40~8000RU。在1200RU hCD40下获得类似结果。

[0229] 实施例5

[0230] 此实施例涉及在图5(a)-图5(e)中示出抗小鼠CD40 mAb 3/23的同种型依赖性的实验。图(a和b)包含其中小鼠用OTI细胞过继转移接着用不具有(对照)或具有100 μ g指定3/23 mAb的500 μ g Sigma OVA或100 μ g endoOVA免疫的实验结果。在(a)和(b)中分别在5天和14天后测量循环OTI细胞和抗-OVA Ab浓度。结果对于三次重复小鼠为平均值 $\pm$ SD并且表示5次(Sigma OVA)或3次(endo OVA)实验中的1个。(*p<0.05**p<0.01)。图(c)包含其中施用100 μ g指定3/23同种型的小鼠的脾切片进行CD70(绿色,左图)和DC标记物MIDC8(红色,中间图;在右图中合并)染色的实验。(条=100 μ m)。图(d)示出其中C57BL/6小鼠用OTI细胞过继转移、用OVA+100 μ g指定mAb免疫并在五天后用EG7肿瘤皮下攻击的实验。示出来自2个实验中的1个的5只小鼠组的存活曲线。m1和h2的曲线彼此重叠。(e)BALB/c小鼠用1 $\times$ 10⁴BCL₁肿瘤细胞静脉内注射。在十四天后,当肿瘤代表5%-10%总脾细胞时,小鼠接受单次100 μ g静脉内剂量的指定3/23 h1或h2或PBS(对照)。示出来自2个实验中的1个的5只小鼠组的存活。

[0231] 实施例6

[0232] 此实施例涉及在图6(a)-图6(e)中证实LOB7.4人IgG2对人细胞的活性比人IgG1更大并独立于Fc γ R相互作用的实验。图(a)示出其中人周围血液B细胞用1 μ g/ml的LOB7.4 h1或h2孵育并与图1(a)中一样分析细胞活化和增殖(除了在8天后评定增殖之外)的实验。示出>10个单独实验中的1个的结果。图(b)包含其中来源于朗格汉斯细胞的人皮肤用LOB7.4 h1或h2或同种型对照mAb孵育18h并且通过流式细胞术分析CD70表达的实验。(示出来自2个实验中的1个的结果)。(p<0.05**p<0.01)。图(c)示出与人Fc γ R结合的LOB7.4 h1和h2的表面等离子体共振 (SPR) 传感图。使用以1,000或15,000RU固定的mAb获得类似的结果。图(d)示出其中CFSE-标记的人B细胞用LOB7.4 h1或h2加上未转染293细胞(对照)或表达高水平的指定人Fc γ R的细胞孵育的实验。在8天后通过流式细胞术分析CFSE稀释液来评定B细胞增殖。灰色直方图表示未刺激细胞。图(e)示出其中分离的人B细胞在50倍过量AT10 Fab’₂和/或表达高水平指定hFc γ RIIA的293细胞存在或不存在下用LOB7.4 h1或h2孵育16h的实验。将CD23表达(黑线)与未刺激细胞(灰色直方图)进行比较。

[0233] 实施例7

[0234] 此实施例涉及在图7(a)-图7(d)中证实h2A和h2B的拮抗和激动特性的实验。图(a)

示出天然3/23h2或化学倾向于其h2A和h2B形式的h2的nrCE-SDS曲线。图(b)示出在表达Fc γ RIIB的交联细胞不存在或存在下用天然或倾向形式的3/23h2孵育的小鼠B细胞上的CD23表达上调。(示出3个实验中的1个)。图(c)示出小鼠B细胞响应于指定浓度的3/23h2A和h2B的增殖。图(d)示出hCD40 Tg B细胞WT或Fc γ RIIB KO响应于单独的SGN40-Soton h2或与LOB7.4 HC C233S(h2A)的1:1混合物的增殖。(示出来自2个实验中的1个的重复两次样品的平均值和范围)。

[0235] 以下方法和材料用于实施例8-16中所述的实验中。

[0236] 材料和方法

[0237] 小鼠

[0238] C57BI/6和RAG-/-小鼠来自Charles River Laboratories (Kent, UK)。其他遗传改变的品系(所有均在C57BL/6背景下)为Fc γ RIIB-/- (Boross等, 2011)、OTI TCR转基因品系(由Dr. Matthias Merkenschlager, Imperial College, London惠赠)和人CD40转基因品系(hCD40 Tg)(由Randolph Noelle (Kings College, London)惠赠)(Ahonen等, 2002)。人CD40 Tg/Fc γ RIIB-/-和g链-/-小鼠通过与由流式细胞术证实的基因型杂交育种来产生。繁殖动物并在当地动物工厂中养殖动物并且使用约8-12周大的动物。所有实验均根据当地伦理学协会指南在UK Home Office许可证编号PPL30/2451和PPL30/2964下进行。

[0239] 抗体和试剂。

[0240] 使用以下杂交瘤:抗人CD23 (MHM6) 来自J Gordon (University of Birmingham)。抗人Fc γ nti-人Fc) 3 (MHM6) 来自 γ RIIA和IIB (Greenman等, 1991), 抗人Fc γ RIIB (KB61)、抗人CD40 (ChiLob7/4; (Chowdhury, 2014)) 和抗人4-1BB使用常规杂交瘤技术在室内产生。抗小鼠CD23-PE来自BD Biosciences。对于OTI细胞染色, 使用APC-标记的抗-CD8 α (克隆53-6.7; BD Biosciences) 和先前所述 (White等, 2011) 的在室内产生的PE标记的SIINFEKL四聚体。使用FACS Calibur (BD Biosciences) 进行流式细胞术。鸡卵清蛋白 (OVA) 来自Sigma-Aldridge (Poole, UK)。无内毒素OVA来自AG (Regensburg, Germany)。

[0241] 嵌合抗体。

[0242] 编码不同mAb的重链和轻链(κ)可变区的DNA构建体从杂交瘤中通过PCR反应扩增或者通过Genewiz, Inc合成。抗-CD40 mAb SGN40-Soton和抗-CD28 TGN-Soton使用公布序列(分别为美国专利号W0 2007/075326和US 7,585,960)产生。在增补版试验方法中可见mAb纯化和质量控制方法的详情。

[0243] 免疫和免疫反应的评定。

[0244] 如对个别实验详述的, 经由尾静脉注射200 μ L PBS来免疫小鼠。通过ELISA测定血清抗-OVA Ab水平 (White等, 2010)。在一些实验中, 在免疫前一天经由尾静脉给予 3×10^5 脾脏OVA-特异性CD8 (OTI) T细胞。

[0245] 肿瘤治疗。

[0246] 对于针对表达OVA的胸腺瘤的疫苗EG7, 在第-6天时用 5×10^4 OTI细胞过继转移小鼠, 接着在第-5天时接受0.5mg Sigma OVA+100mg抗-CD40 mAb。在第0天时用 5×10^5 EG7肿瘤细胞皮下攻击小鼠。监控肿瘤生长并且在达到人道终点(当获得两个最大垂直测量值时为15mm平均肿瘤直径)时处死小鼠。如 (White, 2014) 所述地进行B细胞淋巴瘤 (BCL1) 治疗。简言之, 在第0天用 1×10^4 个BCL₁细胞通过尾静脉接种小鼠。在第14天(当肿瘤良好地形成并且

代表5%-10%脾重量)用单次100 μ g剂量的抗-CD40处理小鼠。

[0247] 细胞活化和增殖。

[0248] 在下文中描述了评定树突状细胞、B细胞和T细胞的活化和/或增殖的分离和测定详情。

[0249] 表面等离子体共振。

[0250] 将Biacore T100 (GE Healthcare) 用于评定可溶性Fc γ 受体和ChiLob7/4 mAb同种型之间的相互作用以及可溶性mAb与固定CD40之间的相互作用,如下文所述的。

[0251] 统计学分析。

[0252] 使用GraphPadTMPrism软件(GraphPadTMSoftware,inc.,La Jolla,California)进行学生T-检验(非配对,双尾)和存活分析(Log-rank Mantel-Cox检验)。对于Ab反应的比较,对数据进行对数转换,随后进行分析。在一些情况下,将来自多个实验的数据合并。然而,这未必总是可能的,因为尽管在实验之间的相对差值保持相同,但是绝对测量值通常变化太大难以合并。当处于此情况下时,示出具有在图例中说明地进行的许多实验的一个单一代表性实验。

[0253] 嵌合抗体产生和质量控制

[0254] 将可变区亚克隆到含有不同抗体同种型的恒定区的表达载体(重链的pEE6.4载体和轻链的pEE12.4载体,Lonza)。将重链和轻链载体进一步亚克隆在一起,之后转染到293F细胞以瞬时产生mAb或者转染到CHO-K1细胞中以稳定产生mAb。通过蛋白A-琼脂糖(Sigma-Aldrich)色谱法纯化分泌的mAb并且通过凝胶过滤经由Sephadex 200(Sigma-Aldrich)去除聚集物(如SEC-HPLC所揭示的)。所有制备物均含低内毒素(<1ng/mg蛋白质),如通过Endosafe-PTS便携式测试系统(Charles River Laboratories)测定的。在此研究中污染的内毒素不能解释mAb功能,因为i)提供足以引起小鼠B细胞在体外增殖的内毒素将需要>10mg/ml的mAb浓度(图9A);ii)人B细胞在体外并不响应于内毒素((Bourke等,2003)和图9B),但确实显示在使用ChiLob 7/4的活化中的同种型依赖性差异;iii)提供足以在体内增加对此水平的免疫反应的内毒素将需要至少50mg剂量的mAb(为所给予的500倍)(图9C)。

[0255] 将流式细胞术和/或SPR用于评定Ag结合的差异。通过化学还原产生所述Fab'来进行mAb制备物的非还原性变性毛细管电泳(nrCE-SDS)(Glennie等,1987)。使用蛋白A色谱法去除任何残留的Fc。

[0256] 细胞分离、活化和增殖

[0257] 树突状细胞:如先前所述地分离人原代朗格汉斯细胞(Polak等,2012)。简言之,在根据Helsinki Guidelines由南安普顿和南西汉普郡研究伦理委员会批准并获得正式书面同意之后从健康个体获取皮肤样本。在20h酶促消化(Disopase,2IU,Gibco,UK)分离出上皮层。在从上皮层迁移48h后收集LC并且通过OptiprepTM密度梯度(Axis Shield,Norway)富集至>70%CD1a+HLADR+细胞。将细胞以5x10⁴个细胞/孔接种到96U-底板中补充有青霉素/链霉素(1%,Sigma,UK)和FBS(10%,Invitrogen,UK)的RPMI 1640(Gibco,UK)中并且ChiLob 7/4人IgG1或人IgG2 mAb或同种型对照刺激18h。通过流式细胞术评定活化标记物CD40、CD86、CD70在CD1a⁺HLADR⁺(全部为BD Biosciences)LC上的表达。

[0258] B细胞:使用磁性阴性选择试剂盒(Miltenyi Biotech或StemCell Technologies)从脾脏(小鼠)或周围血液单核细胞(PBMC,人)中纯化B细胞。从血液锥体细胞中分离人PBMC

(淋巴细胞分离剂, Axis-Shield), 所述血液锥体细胞通过国家血液中心 (Southampton General Hospital) 从不具名健康供体中获得。将细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种到具有不同浓度的 mAb 的 96-孔圆底盘中, 如对于个别实验所述的。在一些情况下, 根据制造商说明书用人 Fc γ R Beckman PA800 加上分析仪转染 1×10^5 个 293F 细胞。为了产生倾向形式的 h2, 在 40°C 下在含有 6mM 半胱氨酸加上具有 (对于 h2A) 或不具有 (对于 h2B) 2M 盐酸胍的 1mM 半胱氨酸的 0.2M Tris pH 8.0 中将 mAb 透析 4 天, 然后在 PBS 中透析, 随后使用。使用胃蛋白酶消化来制备 (Fab')₂ 片段, 接种使其化学减小成所述的 Fab' (Glennie 等, 1987)。使用蛋白 A 色谱法去除任何残留的 Fc。

[0259] 细胞分离、活化和增殖

[0260] 树突状细胞: 如先前所述地分离人原代朗格汉斯细胞 (Polak 等, 2012)。简言之, 在根据 Helsinki Guidelines 由南安普顿和南西汉普郡研究伦理委员会批准并获得正式书面同意之后从健康个体获取皮肤样本。在 20h 酶促消化 (Disopase, 2IU, Gibco, UK) 分离出上皮层。在从上皮层迁移 48h 后收集 LC 并且通过 Optiprep™ 密度梯度 (Axis Shield, Norway) 富集至 $>70\%$ CD1a⁺HLADR⁺ 细胞。将细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种到 96U-底板中补充有青霉素/链霉素 (1%, Sigma, UK) 和 FBS (10%, Invitrogen, UK) 的 RPMI 1640 (Gibco, UK) 中并且 ChiLob 7/4 人 IgG1 或人 IgG2 mAb 或同种型对照刺激 18h。通过流式细胞术评定活化标记物 CD40、CD86、CD70 在 CD1a⁺HLADR⁺ (全部为 BD Biosciences) LC 上的表达。

[0261] B 细胞: 使用磁性阴性选择试剂盒 (Miltenyi Biotec 或 StemCell Technologies) 从脾脏 (小鼠) 或周围血液单核细胞 (PBMC, 人) 中纯化 B 细胞。从血液锥体细胞中分离人 PBMC (淋巴细胞分离剂, Axis-Shield), 所述血液锥体细胞通过国家血液中心 (Southampton General Hospital) 从不具名健康供体中获得。将细胞以 1×10^5 个细胞/孔接种到具有不同浓度的 mAb 的 96-孔圆底盘中, 如对于个别实验所述的。在一些情况下, 还加入用人 Fc γ R 转染的 1×10^5 个 293F 细胞 (White 等, 2011)。为了评定活化, 在孵育过夜后对细胞进行拍照 (具有 CC12 软成像系统的 Olympus CKX41 显微镜) 并且通过流式细胞术 (FACSCalibur, BD Biosciences) 分析活化标记物表达。在培养 5 天 (小鼠) 或 8 天 (人) 之后通过 [甲基-³H] 胸苷 (PerkinElmer, Cambridge, UK) 结合评定增殖, 如 (White 等, 2011) 所述的。

[0262] T 细胞: 用 2mM CFSE 标记人 PBMC 并且接着在如 (Romer 等, 2011) 所述的 24 孔板中以高密度预培养 2 天, 其中每孔 1.5ml 细胞, 1×10^6 个/ml。洗涤预培养的细胞并且以 $1 \times 10_6$ 个/ml 重新悬浮以用于测定。对于一些实验, 使用总 T 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 从预培养的 PBMC 中分离出 T 细胞。对于抗-h4-1BB mAb, 将 96 孔圆底板的孔用 PBS 中的 0.02mg/ml OKT3 涂覆 4h, 接着洗涤两次并将 10^5 个 PBMC/孔用 5² PBMC/孔孵育 5 或 4h。通过流式细胞术分析 CFSE 稀释液来评定 CD4⁺ 细胞的增殖。对于抗-CD28 mAb, 在未涂覆孔中用 mAb 孵育 10^5 个分离的 T 细胞并且如上所述地评定增殖。结果表示为分裂细胞百分比。

[0263] 对于 EBV-肽特异性 CD8⁺ 人 T 淋巴细胞的活化: 从 HLA-A2 个体中扩增对 EBV (GLCTLVAML; Cambridge Peptides, UK) 的 BMLF-1 表型有特异的 HLA-A2 限制性 T 细胞, 如 (Polak 等, 2012) 所述的。将人原代朗格汉斯细胞 (LC) 用含有 BMLF-1 (proGLC: FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEGLCTLVAML, 10 μ M) 的延长肽孵育 6h 并且用 100ng/ml 的 ChiLob 7/4 h1 或 h2 mAb 或同种型对照刺激 18h。按照制造商方案在 ELISpot 测定中将脉冲和洗涤的 LC (1×10^4 个细胞) 与 BMLF-1-特异性 T 细胞 (5×10^4 个细胞) 共培养 20 小时, 以产生 IFN- γ

(Mabtech, Sweden)。用ELISpot 3.5读取器列举斑点形成单位(sfu)。

[0264] 表面等离子体共振。

[0265] 使用BiacoreT100 (GE Healthcare) 比较可溶性Fc γ 受体与ChiLob7/4 mAb同种型之间相对的相互作用。通过标准胺偶联根据制造商说明书将抗体或作为参考的BSA以15,000RU固定至CM5传感器芯片(Biacore)中。由于存在Fc,所以排除使用同种型对照mAb涂覆参考流动细胞。在25℃下将可溶性Fc γ R(R和D系统, Abingdon, UK)以HBS-EP+运行缓冲液(Biacore)中的100nM注射通过流动细胞中,流速为30 μ L/min。用pH 2 10mM甘氨酸再生30秒。通过使用100nM的阳性(hCD40-Fc)和阴性(hOX40-Fc)对照融合蛋白(R和D系统)检查涂覆到流动细胞上的mAb的完整性(图11C)。自动减去参考流动细胞的背景反应;忽略所有Fc γ R与参考细胞的结合(图11D并且数据未示出)。通过以下各项中的至少一种来验证纯化Fc γ R蛋白各自的完整性: IgG同种型的预期结合曲线(White等, 2011, White等, 2011)和此研究;使用已知增强Fc γ R相互作用的突变Fc增加与mAb的结合(未示出);通过固定抗-Fc γ 相互作用进行的结合(未示出);分类Fc γ R(未示出以及图11E)。用于比较不同抗-CD40 mAb与固定化hCD40之间的相互作用的条件如下:用于比较Fab'结合的条件, hCD40-Fc(R和D系统)在pH 5在如1000RU下如上所述地固定并且Fab'片段以640、128、25.6、5.12和1.024nM经过(图11E);用于比较IgG结合的条件, hCD40-Fc在8000RU下固定并且IgG以100、20、4、0.8和0.16nM经过(图11F)。用pH 1.5 10mM甘氨酸再生30秒。使用拟合1:1结合模型的Biacore评价软件测定ChiLob 7/4 h1和h2 Fab'片段对CD40的亲合力。

[0266] 实施例8

[0267] 此实施例涉及在图8(a)-图8(h)中的实验。这些实验显示不同人同种型对抗-CD40活性的作用。(A)在16h后通过同型粘附(顶部)和3H胸苷掺入评定人B细胞响应于指定同种型的ChiLob 7/4 (1 μ g/ml)的活化。各点代表来自每种同种型的2-5个实验的个别样品。(B)人朗格汉斯细胞未处理(黑色线)或用ChiLob 7/4 h1、h2或同种型对照(c)孵育(灰线)18h并且通过流式细胞术分析CD70表达;示出2个实验中的1个。(C)与(B)中一样通过用ChiLob 7/4活化的HLA-匹配的人朗格汉斯细胞进行的BMLF-1-特异性CD8⁺T-细胞活化的IFN- γ ELISpot测定。代表一式三份的2个实验的数据归一化成未脉冲细胞的活化。(D)与(A)中一样分析ChiLob 7/4 h1和h2对hCD40 Tg B细胞的活化。各点为来自一式三份进行的3个实验的个别样品。(E)用具有或不具有(对照)100 μ g指定的ChiLob 7/4 mAb的100 μ g OVA免疫hCD40 Tg小鼠。在第8天列举循环的内源性OVA-特异性CD8⁺T细胞,在第14天测定反应(左图)和抗-OVA Ab(右图)的峰值。示出来自4个实验中的2个的个别动物。(F)用不具有(对照)或具有100 μ g指定3/23mAb的100 μ g无内毒素OVA免疫用OTI细胞过继转移的小鼠(n=3)。在反应峰值(第5天;左图)和在第14天的抗-OVA Ab(右图)处列举循环OTI细胞。合并来自>5个实验中的2个的数据。(G)将C57BI/6小鼠(n=5)用OTI细胞过继转移,用OVA加上100 μ g指定3/23同种型免疫并且在5天后用EG7肿瘤皮下攻击。示来自2个实验中的1个的存活曲线。(H)将BALB/c小鼠(n=5)用BCL1肿瘤细胞静脉内攻击并且在14天后(当肿瘤代表5%-10%脾重量时(White, 2014))静脉内给予100 μ g指定的3/23 h1、h2或PBS(对照)。示来自2个实验中的1个的存活曲线。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。

[0268] 实施例9

[0269] 此实施例涉及在图9(a)-图9(g)中作为验证在图8的实验中同种型对抗-CD40活性

的作用的对照实验的实验。用于同种型对抗-CD40活性的作用的对照实验。(A-C) 内毒素污染并不能解释抗-CD40活性。(A) 在400ng/ml 3/23m2a存在或不存在下将Fc γ RIIB-/-小鼠B细胞用逐渐增加浓度的LPS孵育。通过3H胸苷掺入(平均值 $\pm$ SEM三次重复) 评定增殖。(B) 在指示的1mg/ml ChiLob 7/4 h1和/或Fc γ RIIB过度表达交联细胞存在或不存在下用1mg/ml LPS孵育16h后通过CD23上调(与对照的灰色相比的黑线) 评定的人B细胞活化。(C) 将小鼠用100mg无内毒素OVA加上指定剂量的LPS免疫。在第14天测定循环抗-OVA Ab滴度。(D) 人ChiLob 7/4同种型类似地结合CD40。用与不同浓度的不同人同种型的竞争性未标记ChiLob mAb预先混合的10mg/ml ChiLob 7/4 h1-FITC孵育纯化的hCD40Tg小鼠B细胞。使用流式细胞术测定ChiLob 7/4-FITC结合水平并将其表示为MFI最大值%(无竞争性mAb存在)。将非靶向人IgG4同种型mAb(灰色三角形) 作为非竞争性对照包括在内。(E) ChiLob 7/4 h1和h2 Fab' 片段对hCD40具有类似亲和力。将hCD40以1000RU固定并且将ChiLob 7/4 h1(实线) 或h2(虚线) Fab' 片段以640、128、25.6和1.024nM流过芯片。通过拟合1:1结合模型计算亲和力并且所述亲和力分别为10.0和10.2nM h1和h2。(F) 人和小鼠CD40 mAb的同种型对照。将纯化的WT (mCD40+/+) 或hCD40Tg/mCD40 KO (mCD40-/-, hCD40+/-) 小鼠B细胞用1mg/ml的指定mAb孵育16h。通过同型粘附(顶部图) 和CD23上调(底部图) 评定B细胞活化: 填充灰色直方图, 未处理细胞; 黑线, 用仅mAb处理; 蓝线, 用mAb+Fc γ RIIB过度表达交联细胞孵育。(G) CD70在小鼠脾DC上的同种型特异性上调。对施用100mg指定3/23同种型的小鼠的脾切片进行CD70(绿色, 左图) 和DC标记物MIDC8(红色, 中间图; 在右图中合并) 染色。条=100mm。示出来自2个实验中的1个的结果。

[0270] 实施例10

[0271] 此实施例涉及在图10(a)-图10(e)中其结果显示人IgG2的Fc γ R-独立性活性的实验。(A) ChiLob 7/4 h1或h2+/-或50-倍过量阻断性抗-Fc γ RII(AT10) F(ab')₂和/或指定的hFc γ RIIB过度表达293F细胞(+/-Fc γ RII) 对人B细胞的活化。将CD23表达(黑线) 与未刺激细胞(灰色直方图) 进行比较。(B) 通过1mg/ml的ChiLob 7/4 h1和h2完整IgG、F(ab')₂或Fab' 对人B细胞活化(同型粘附和CD23上调, 顶部图) 和增殖(底部图) 16h。示出来自4个实验中的1个的重复两次样品的平均值和范围。(C) 通过3H胸苷掺入法测定使用具有不同浓度的指定ChiLob 7/4同种型的Fc γ RIIB对hCD40 Tg B细胞WT或KO的增殖(4个实验中的1个的重复两次的平均值和范围)。(D) 作为Fc γ R WT、Fc γ RIIB KO或常见g链KO(未活化Fc γ R) 接受OTI细胞接着接受OVA加上指定ChiLob 7/4mAb的hCD40 Tg小鼠(n=3-5)。在第5天列举循环OTI细胞。合并来自2个实验的结果。(E) hCD40Tg/Fc γ RIIB KO小鼠接受OTI细胞, 然后在D0时用单独的OVA(对照) 或用200mg ChiLob 7/4 h1或h2 Fab' 2静脉内免疫, 接着在第1天和第2天用100mg Fab' 2免疫。示出在D5时的循环OTI细胞。当静脉内给予小鼠单次100mg剂量的h2 Fab' 2时获得类似结果(未示出)。***p<0.001, *p<0.05。

[0272] 实施例11

[0273] 此实施例涉及在图11(a)-图11(f)中证实ChiLob 7/4 h2激动活性为Fc γ R独立性的实验。(A和B) 示出100nM指定人(A) 和小鼠(B) Fc γ R与以15,000RU固定的ChiLob 7/4 h1或h2的SPR曲线。所有曲线均相同标度(Y轴至2500RU) 呈现以允许比较相对结合。Fc γ RIIA的插图显示用200RU的Y轴标度绘图以显示低水平结合的相同数据。(C) 为了验证结合mAb的完整性, 测定100nM hCD40蛋白(实线) 或hOX40蛋白(虚线) 与在A和B中使用的流动细胞上固

定的h1和h2 mAb的结合。(D) hFc γ RI和IIB与固定BSA的背景结合。对于所有Fc γ R获得类似结果。此背景从A和B中的曲线中减去。(E) 为了证实hFc γ RIIB的完整性,固定抗-Fc γ RIIB特异性mAb (KB61) 并比较hFc γ RI和IIB的结合。(F) 将纯化的hCD40Tg小鼠B细胞用单独的1mg/ml ChiLob 7/4 h2 IgG(左图,黑条)或在50-倍过量的指定ChiLob 7/4IgG片段存在下孵育16小时。在20小时后通过流式细胞术分析CD23表达(顶部图;灰色直方图为未处理细胞,黑线为mAb处理的细胞)并且在5天后通过³H胸苷掺入分析B细胞增殖(底部图,重复两次样品的平均值和范围)。示出来自2个实验中的1个的结果。

[0274] 实施例12

[0275] 此实施例涉及在图12(a)-图12(e)中示出人IgG2针对多种受体靶标的拮抗作用的实验。(A) 如图8A中一样评定使用SGN40-Soton h1或h2对人B细胞的活化,示出5个实验中的1个(两次重复样品的平均值和范围)。(B) 响应于SGN40 h1和h2或亲本SC26 m1 hCD40的Tg B-细胞增殖(WT或Fc γ RIIB KO)(两次重复的平均值和范围,3个实验中的1个)。(C) hCD40Tg/Fc γ RIIB KO小鼠(n=5)接受OTI细胞并且然后用单独的OVA(对照)或用100mg SGN40-Soton h1或h2免疫。在D5列举循环OTI细胞,***p<0.001,示出2个实验中的1个。(D和E) 在总PBMC(C)或纯化的T细胞(D)培养物中人CD4 T细胞响应于嵌合h1、h2或h4抗-h4-1BB或hCD28的活化和增殖。各点表示个别供体。

[0276] 实施例13

[0277] 此实施例涉及在图13中示出CH1和铰链区赋予ChiLob7/4 h2活性的实验。(A) ChiLob 7/4 h1和h2(左图)和突变体(顶部图)的示意图,其中h1和h2的CH1((i) CH1 1/2和(ii) CH1 2/1)或CH1和铰链区((iii) CH1Hge 1/2和(iv) CH1Hge 2/1)得以交换。中间图:在表达Fc γ RIIB的交联细胞不存在或存在下在人B细胞上的CD23表达,并且底部图:响应于嵌合mAb的hCD40 Tg Fc γ RIIB WT或KO B-细胞增殖(两次重复的平均值和范围)。(B) 如图10E中测定的用指定mAb处理的hCD40 Tg小鼠(n=3)中的OTI反应。合并来自2个实验的数据,****p<0.0001。

[0278] 实施例14

[0279] 此实施例涉及在图14中验证ChiLob 7/4开关突变体类似地结合CD40的对照实验。用与不同比率的指定未标记突变体预先混合的ChiLob 7/4 h1-FITC孵育纯化的hCD40Tg小鼠B细胞并如图8所示地进行分析。

[0280] 实施例15

[0281] 此实施例涉及在图15(a))-图11(h)中显示诱变产生一定范围的ChiLob 7/4 h2激动形式的实验。(A) nrCE-SDS曲线(顶部图)和响应于‘倾向的’h2A和h2B ChiLob 7/4的hCD40 Tg B-细胞增殖(两次重复的平均值和范围,3个实验中的1个)。(B) nrCE-SDS曲线(顶部图)和在表达Fc γ RIIB的交联细胞存在和不存在下由CD23上调评定的响应于倾向的3/23h2的小鼠B细胞活化(底部图),示出3个实验中的1个。(C) 指定ChiLob 7/4突变体的nrCE-SDS曲线。示出完整IgG、HCHC复合物(HH)、游离LC(L)和10kDa标记物的位置。(D) 作为WT或KO的hCD40 Tg B细胞对于Fc γ RIIB响应于ChiLob 7/4突变体的增殖(来自至少3个实验中的1个的两次重复的平均值和范围)。(E) 来自用1mg/ml的ChiLob 7/4 h2A和h2B处理指定时间并用对phosph- IKKa/b、磷IkB-a或IkB-a有特异的Ab探测的hCD40 Tg小鼠B细胞的裂解物的蛋白质印迹。使用抗微管蛋白作为负载对照。(F) 与以8000RU固定的hCD40结合的ChiLob 7/

4 h2突变体(100、20、4、0.8和0.16nM)的SPR。(G)使用ChiLob 7/4 h2、h2A(HC C233S)、倾向的h2B或h2A:h2B的1:1混合物的hCD40 Tg B-细胞增殖。来自>5个实验中的1个的重复两次的平均值和范围。(H和I)在用OVA加上100mg ChiLob 7/4C233S(h2A)或倾向的h2B免疫的hCD40 Tg Fc γ RIIB KO小鼠(n=5)中的OVA-特异性OTI CD8 T-细胞反应(H)和第18天的血清Ab反应(I)。示出来自2个实验中的1个的结果。 $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0282] 实施例16

[0283] 此实施例涉及在图16(a)-图16(g)中进一步验证ChiLob 7/4 h2A和h2B形式的不同活性的实验。(A)在用200ng/ml天然、‘A’或‘B’倾向形式的ChiLob 7/4 h2孵育16 h之后通过同型粘附评定的纯化的人B细胞的活化(顶部图)和CD23上调(底部图)。(B)用指定浓度的ChiLob 7/4 h2、CH1Hge 2/1突变体或倾向形式的突变体孵育纯化的hCD40Tg B细胞并且如图15A中所示地测量增殖(重复两次样品的平均值和范围)。(C)响应于逐渐增加浓度的h2B倾向的ChiLob 7/4 h2 IgG或Fab’ 2h的CD40Tg小鼠B细胞增殖,如B中所测量的。(D)来自用1mg/ml ChiLob 7/4 h2A和h2B处理指定时间并用对phosph-IKKa/b、磷Ikb-a或Ikb-a有特异的Ab探测的Ramos细胞的裂解物的蛋白质印迹。使用抗微管蛋白作为负载对照。(E)用与不同浓度的指定未标记突变体预先混合的ChiLob 7/4 h1-FITC孵育纯化的hCD40Tg小鼠B细胞并如图13D所示地进行分析。(F)和(G)用OTI细胞过继转移的hCD40Tg Fc γ RIIB KO小鼠用100mg OVA加上100mg倾向的突变体免疫,如图12中一样。随着时间列举循环OTI细胞(每组5只动物的平均值 $\pm$ SD)(D)和在第18天测量的血清中的抗-OVA抗体(E)。示出来2个类似实验中的一个的结果。 $*p<0.05$, $***p<0.001$ 。

[0284] 结论

[0285] 最新临床结果表明免疫刺激性mAb’s可适用作治疗剂,例如用于治疗癌症(Hodi等,(2010);Wolchok等,(2013);Topalian等,(2012);Brahmer等,(2012))和感染性疾病。然而,可用于体内治疗的mAb和融合蛋白的鉴别需要清楚地理解精确的作用机制。现在,大量数据表明同种型选择是决定性的,因为它指示在Ag结合之后介导事件的不同Fc γ R相互作用(Nimmerjahn等,(2012);White等,(2013))。已提出将mAb Fc的操纵作为一种通过使Fc与Fc γ RIIB交联来增强选定的相互作用并增加治疗功效的方式(white等,(2013);Li和Ravetch(2012);Li和Ravetch(2013))。在本文中的数据反而提出同种型依赖性但Fc γ R-独立性机制也可为活性的重要决定因素。

[0286] 已证实Fc γ R接合的作用用于许多抗癌mAb中。在抗-CD40的情况下,通过对mAb交联的需要,我们和其他人均已证实与Fc γ RIIB的结合为临床前模型中的活性所必需的(White等,(2011);Li和Ravetch(2011))。当开发用于人使用的药剂时这具有一个挑战,因为没有人IgG同种型能以足够高的亲和力结合Fc γ RIIB以介导此功能。对于Fc γ RIIB接合的需要也可能是有限的,因为此受体可能并不总是与mAb靶标抗原共定位。在h2同种型的mAb具有Fc γ R-独立性激动活性的此报道中的说明因此是重要的,因为它提供了开发无论靶细胞位置在何处均具有激动性的药剂的机会。

[0287] h2 mAb的激动活性并不需要外源性交联的观察为独特且意外的。人IgG2同种型的异常之处在于其在合成之后能重新排列其铰链和C_H1结构域内的二硫键的能力,从而产生具有不同构象的亚型(Martinez等,(2008);Dillon等,(2008);Allen等,(2009))。据信IgG2被合成为具有经典的柔性IgG结合(其‘A’形式),所述结构含有4个HC间铰链二硫键。随着时

间这通过一系列中间体转化成更刚性且紧密的‘B’形式,其中LC和HC C_H1被二硫键合至HC铰链半胱氨酸232和233 (Martinez等, (2008); Dillon等, (2008); Allen等, (2009))。使用一系列遗传工程化的mAb,证实LOB7.4 h2的激动活性依赖于其改组铰链中的二硫键的能力。此外,特定半胱氨酸或半胱氨酸残基的组合的突变可将它锁定成拮抗和激动构象。

[0288] 先前的研究员报道了二硫键改组对h2活性的有限影响,其中B亚型倾向于具有更低的亲和力和减小的功效。然而,在这些情况下,测量在抗原结合或阻断受体-配体相互作用的能力方面的活性, Dillon等, (2008)。发现通过激动和拮抗形式的LOB7.4 h2进行的CD40结合没有差异。据推测,更刚性且紧密形式h2 (与h2B类似) 可与膜中的CD40形成致密的组织性复合物,从而允许TRAF募集和下游细胞内信号传导,而不是交联。更柔性形式h2如h2A抑制功能的能力可影响破坏这些复合物的能力,并且可解释当天然h2活性或h2A和h2B形式的混合物活性在广泛浓度范围测量时观察到的特征性钟形曲线。潜在地不同形式的LOB7.4 h2将结晶化来测定器精确构象并阐明其作用机制。h2恒定区还赋予另一种抗-hCD40 mAb SGN40以及针对在T细胞上表达的共刺激分子的mAb (4-1BB和CD28) Fc γ R-独立性活性的观察表明这可能是此同种型的一般特性。

[0289] 我们和其他人均发现激动性抗-CD40至少在鼠类模型中需要与Fc γ RIIB结合 (Li和Ravetch, 2011; White等, 2011), 当开发用于人使用的药剂时具有一个挑战, 因为人IgG以非常低的亲和力结合Fc γ RIIB, 特别是作为单体 (Bruhns等, 2009)。尽管Fc工程化可增强Fc γ RIIB相互作用并提高活性 (Li和Ravetch, 2012; Li和Ravetch, 2013; White等, 2013), 但是此方法受限于以下事实, Fc γ RIIB并不一直可用于肿瘤微环境内的交联并且当Fc γ RIIB接合在内皮细胞上时还可导致不良事件 (Xu等, 2003)。在h2同种型的mAb具有Fc γ R-独立性激动活性的此报道中的说明因此是重要的, 因为它提供了开发无论靶细胞位置在何处均具有激动性的药剂的机会。人IgG2同种型的独特之处在于其在合成之后能重新排列其铰链和C_{H1}结构域内的二硫键的能力, 从而产生一系列具有不同构象的亚型 (Allen等, 2009; Dillon等, 2008; Martinez等, 2008; Wypych等, 2008)。据信它被合成为具有经典的柔性IgG结合 (其‘A’形式), 所述结构含有4个HC间铰链二硫键。随着时间这通过一系列中间体转化成更紧密的‘B’形式, 其中LC和HC CH1被二硫键合至HC铰链半胱氨酸232和233 (Allen等, 2009; Dillon等, 2008; Liu等, 2008; Martinez等, 2008; Wypych等, 2008)。使用化学倾向方法和一系列遗传工程化mAb, 证实ChiLob 7/4 h2的激动活性依赖于其形成h2B形式的能力。此外, 特定半胱氨酸或其组合的突变可将其锁定成具有不同程度的激动活性的构象。

[0290] 注意, 所选定轻链似乎影响了h2形成不同构象的能力, 其中 κ 轻链而非 λ 轻链允许二硫键改组 (Dillon等, 2008)。与此一致的时, 研究中所用的所有mAb均包含 κ 轻链。另外感兴趣的是, 已描述了二硫键连接的h2二聚体在人血液中的存在 (Yoo等, 2003)。然而, 也如其他人使用重组mAb所报道的 (Martinez等, 2008), 发现二聚体不存在于任何mAb制备物质, 如通过nrCE-SDS所揭示的。

[0291] 先前研究h2A和h2B亚型的功能影响的尝试未揭示Fc γ R或C1q接合 (Lightle等, 2010) 中的差异或者Ag结合或阻断受体-配体相互作用的能力中的一致差异, 其中如果存在的话则h2B的活性较小 (Dillon等, 2008; Guo等, 2008; Martinez等, 2008)。类似地, 当通过SPR或通过流式细胞术测量时在ChiLob 7/4 h2A和h2B形式对CD40的亲合力中未观察到任何差异。与非常类似的ChiLob 7/4 h1和h2 Fab对CD40的亲合力组合, 似乎很不可能的时亲

和力的变化可解释h2A和h2B非常不同的特性。令人感兴趣的时,Liu等(Liu等,2008)也说明了在患者中在数天内从A形式天然转化成B形式并不是由半衰期的变化所引起的。在本文中评定了接合免疫共受体的mAb的激动活性,其中已知受体成簇为启动下游免疫活化的强制性需要(Elgueta等,2009)。发现可实现此类交联而无Fc γ R接合的抗体形式既未预期也未解释,因为截至目前所述的几乎所有激动性mAb对于活性需要Fc γ R交联(Bartholomaeus等,2014),所述激动性mAb包括在2006年在健康志愿者中引起严重毒性的抗-CD28超激动剂TGN1412(Suntharalingam等,2006)。据推测h2B的激动特性有其不常见的紧密构象引起,其中Fab'臂向下靠近抗体的Fc区旋转。这可允许关闭在膜平面上接合的相邻受体的‘包装’。在h2B中缺乏柔性也可使受体处于更刚性晶格中,以促进有效的下游信号传导。此方面的延伸可为h2B不同于h2A,可在预先存在的簇内稳定受体(Smulski等,2013),而柔性h2A可引起这些簇解离。由于h2响应于细菌多糖产生的主要同种型(Barrett和Ayoub,1986),所以形成h2B的能力可为由接合这些重复性紧密包装的表位的需要驱动的进化反应。

[0292] 当使用抗-CD40 h2A和h2B的混合物刺激B细胞从而在较高浓度下可见活性减小时在此研究中观察到的特征性钟形曲线(例如图10D)可反映更柔性h2A形式战胜结构受限更大的h2B形式而交联的能力。这可能是因为柔性h2A更有效地结合靶分子,而所述分子在流体血浆膜中继续移动。进一步研究可测定不同形式的h2的更精确构型,从而可更多地解释其精确作用模式。h2恒定区还赋予另一种抗-hCD40 mAb SGN40以及针对其他受体(4-1BB和CD28)的mAb Fc γ R-独立性活性的观察表明这可能是此受限构象的一般特性。

[0293] 在hCD40Tg小鼠中的体内实验清楚地证明了ChiLob 7/4当作为嵌合m1对比h2 mAb施用时的不同作用机制。在两种情况下均观察到免疫刺激,然而,m1的活性依赖于Fc γ RIIB表达,而h2的活性完全独立于Fc γ R相互作用。这增加了通过工程化试剂以同时接合两种机制路径来进一步增强活性的可能性;例如,含有SE/LF突变以增加Fc γ RIIB亲和力的嵌合CH1Hge 2/1(Chu等,2008)。这是正在进行的研究的主题。另外,尽管在研究中h2活性为Fc γ R-独立性的,但是重要的是确定其活性是否在体内受到人Fc γ R的存在的影响,所述人Fc γ R可以足够亲和力结合细胞表面上固定的h2以允许交联,特别是在表达Fc γ RIIA-¹³¹H或Fc γ RIIIA-¹⁵⁸V的患者中(Lux等,2013)。

[0294] 重要的是,目前为止临床试验中激动性最大的抗-CD40 mAb为是h2的CP870,893,与二者均为h1的激动性较小的ChiLob 7/4和SGN40不同。CP870,893的最大耐受剂量比ChiLob 7/4或SGN40的最大耐受剂量低10倍(Vonderheide和Glennie 2013),并且在胰腺癌和转移性黑色素瘤患者中使用此药剂产生有希望的临床数据(Bajor等,2014;Beatty等,2013)。如在目前的研究中,Richman和Vonderheide最近证实CP870,893的体外激动活性均为Fc和Fc γ R独立性的(Richman和Vonderheide,2014)。这是重要的,因为它表明Fc γ R-独立性路径可递送临床环境中的结果并且目前的发现结果可能在一定程度上解释了CP870,893的不常见功效。

[0295] 所提供的数据深入参与了基于激动性mAb的治疗剂的开发。基于这些观点,使得操纵h2的二硫键构型以控制mAb针对一系列免疫受体的活性和毒性从而允许微调生物功能并随后开发独立于Fc γ R相互作用的新颖治疗剂成为可能。

[0296] 刺激抗癌免疫性的单克隆抗体(mAb)在一个亚类患有传统末端恶性肿瘤的患者中提供了治愈性治疗。然而,实现这些药剂的全部潜能将需要由其作用机制的详细理解所提

供的精确工程化。在此证实人IgG2 (h2) 恒定区提供了在临床开发中靶向三种免疫刺激共受体CD40、4-1BB和CD28 (其激动活性独立于Fc γ 2-1BB) 以及CD28 (其激动活性为受体成簇和下游细胞内信号传导所需要的) 的mAb。此异常活性由h2铰链内的独特二硫键构型所赋予并且为工程化无论局部微环境内的Fc γ R表达如何均具有限定活性的改进临床药剂铺平道路。

[0297] 总之,在本文中证实了免疫刺激性mAb当表达为h2时具有Fc γ R-独立性激动活性,所述激动活性依赖于h2改组其铰链区内的二硫键的独特能力。因此使用h2可允许开发其功能并不依赖于Fc γ R的、具有长血清半衰期的且其活性独立于细胞类型或解剖学位置的固有活性治疗剂。所述数据还说明通过本文所述的二硫键修饰操纵h2 mAb产生可分别用于刺激或抑制免疫反应的激动剂或拮抗剂,例如IgG2抗体或IgG2融合蛋白,例如由B7/CD28或TNF/TNFR家族成员引起的那些。这些激动剂和拮抗剂将应用于治疗许多疾病,例如癌症、自身免疫、感染性疾病、过敏以及炎性病变。

[0298] 治疗性应用本发明的激动和拮抗抗体可用于治疗任何病状,其中激动或拮抗特异性受体或配体的作用将为临床上相关的。例如,这些抗体和融合蛋白可适用于治疗自身免疫性病症,诸如获得性脾脏萎缩、急性前葡萄膜炎、急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、急性痛风性关节炎、急性坏死性出血性白质脑炎、急性鼻窦炎、慢性鼻窦炎、急性化脓性脑膜炎、其他中枢神经系统炎性病症、急性重度炎症、阿狄森病、肾上腺炎、成人发作型糖尿病(II型糖尿病)、成人发作型特发性甲状旁腺功能减退(AOIH)、丙种球蛋白缺乏症、粒细胞缺乏症、脉管炎(包括血管炎、大血管血管炎、风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu氏)动脉炎)、过敏性病状、过敏性接触性皮炎、过敏性皮炎、过敏性肉芽肿性血管炎、过敏性超敏反应病症、过敏性神经炎、过敏性反应、斑秃、全秃、阿尔波特氏综合征、牙槽炎(过敏性牙槽炎、纤维性肺泡炎、阿尔兹海默病、淀粉样变性、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS;Lou Gehrig氏病)、嗜酸性粒细胞相关性病症、嗜酸性粒细胞增多症、全身性过敏反应、强直性脊柱炎、血管扩张、抗体介导性肾炎、抗-GBM/抗-TBM肾炎、抗原-抗体复合物介导性疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、抗磷脂综合征(APS)、口疮、口疮性口炎、再生障碍性贫血、心律失常、动脉硬化、动脉硬化性病症、关节炎、类风湿性关节炎、任选地急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、蛔虫病、曲霉肿、含嗜酸细胞性肉芽肿、曲霉病、aspermiogenesis、哮喘、支气管哮喘(asthma bronchiale)、支气管性气喘(bronchial asthma)和自身免疫哮喘、共济失调毛细血管扩张、共济失调性硬化、动脉粥样硬化、孤独症、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、自身免疫性糖尿病、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)、与胶原病相关的自身免疫性病症、自身免疫性神经异常、自身免疫性耳病、自身免疫性内耳病(AGED)、自身免疫性内分泌疾病(包括甲状腺炎)、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性肠病综合征、自身免疫性性腺衰竭、自身免疫性听力丧失、自身免疫性溶血、自身免疫性肝炎、自身免疫性造血系统疾病、自身免疫性高脂血、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性中性粒细胞减少、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺疾病、自身免疫性多腺综合征I型、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺疾病、自身免疫性荨麻疹、自身免疫介导的胃肠道疾病、轴突和神经元神经病变、巴妥病、贝切特氏病、良性家族性和缺血再灌注损伤、良性淋巴

性血管炎、贝格尔氏病、IgA肾病、养鸟人肺、失明症、伯克氏病、闭塞性细支气管炎、支气管炎、支气管肺炎曲霉病、布鲁顿综合征、大疱性类天疱疮、卡普兰氏综合征、心肌症、心血管缺血、Castleman氏综合征、脂泻病、口炎性腹泻(麸质性肠病)、小脑变性、脑缺血和伴随血管形成的疾病、查加斯病、通道病、癫痫症、CNS的通道病、脉络膜视网膜炎、脉络膜炎、自身免疫性造血系统疾病、慢性活动性肝炎、自身免疫性慢性活动性肝炎、慢性接触性皮炎、慢性嗜酸粒细胞性肺炎、慢性疲劳综合征、慢性肝炎、慢性超敏性肺炎、慢性炎症性关节炎、慢性发炎去髓鞘多发性神经病变(CIDP)、慢性顽固性炎症、慢性皮肤粘膜念珠菌病、慢性神经病、IgM多发性神经病变、IgM-介导性神经病、慢性阻塞性气道疾病、慢性肺部炎症性疾病、慢性复发性多病灶性骨髓炎(CRMO)、慢性甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎)亚急性甲状腺炎、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、CNS炎症病症、CNS血管炎、乳糜泻、寇甘氏综合征、冷凝集素病、息肉状结肠炎、结肠炎(任选地溃疡性结肠炎、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎)、涉及T细胞浸润的病状和慢性炎症反应、先天性心脏传导阻滞、先天性风疹感染、Coombs阳性贫血、冠状动脉性心脏病、柯萨奇病毒性心肌炎、CREST综合征(钙质沉着,雷诺氏现象)、克罗恩氏病、冷球蛋白血症、柯兴氏综合征、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎、Fuch氏睫状体炎、囊泡性纤维症、细胞因子诱导的毒性、耳聋、退化性关节炎、脱髓鞘病、自身免疫性脱髓鞘病、脱髓鞘性神经病、登革热、疱疹样皮炎和异位性皮炎、皮炎(包括接触性皮炎)、皮炎、具有急性炎症组分的皮肤病、德维克氏病(视神经脊髓炎)、糖尿病大动脉疾病、糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、戴-布二氏贫血、弥漫性肺间质纤维化、扩张型心肌病、盘状红斑狼疮、涉及白细胞渗出的疾病、德雷斯勒氏综合征、杜普伊特伦氏挛缩、埃可病毒感染、湿疹(包括过敏性湿疹、特应性湿疹)、脑炎、任选地拉斯穆森脑炎和边缘性和/或脑干性脑炎、脑脊髓炎、变态反应性脑脊髓炎、过敏性脊髓炎和实验性过敏性脑脊髓(EAE)、动脉内增生、心内膜炎、内分泌性眼病、子宫内膜异位、心内膜心肌纤维化、晶状体蛋白过敏性内眼炎(endophthalma phacoanaphylactica)、内眼炎、过敏性肠炎、嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征、嗜酸性筋膜炎、流行性角膜结膜炎、后天性大疱性表皮松解症(EBA)、巩膜外层、巩膜外层炎、埃-巴二氏病毒感染、持久隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、多形性红斑、麻风结节性红斑、结节性红斑、胎儿成红细胞增多病、食管运动功能障碍、原发性混合型冷球蛋白血症、筛骨、埃文斯综合征、实验性变应性脑脊髓炎(EAE)、因子VIII缺乏症、农民肺、风湿性发热、费尔提氏综合征、纤维肌痛、纤维性肺泡炎、丝虫病、局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)、食物中毒、额骨(frontal)、胃萎缩、巨细胞动脉炎(颞关节炎)、巨细胞肝炎、巨细胞多肌痛、肾小球性肾炎、伴随或未伴随肾病综合征的肾小球性肾炎(GN)、慢性肾小球肾炎、急性肾小球肾炎(任选地原发性GN)、古德帕斯彻氏综合征、痛风性关节炎、粒细胞输血相关性综合征、肉芽肿病(包括淋巴瘤样肉芽肿病、肉芽肿病伴随多血管炎(GPA)、肉芽肿性葡萄膜炎)、格雷夫斯病(Grave's disease)、格-巴二氏综合征(Guillain-Barre syndrome)、滴状银屑病、阵发性血红蛋白尿、Hamman-Rich氏病、Hashimoto氏病、Hashimoto氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、血色沉着病、溶血性贫血、免疫性溶血性贫血(包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、溶血性贫血、甲型血友病、Henoch-Schönlein紫癜、妊娠疱疹、人免疫缺陷型病毒(HIV)感染、痛觉过敏、血丙种球蛋白过少、性腺机能减退、甲状旁腺功能减退、特发性糖尿病性尿崩症、特发性面神经麻痹、特发性甲状腺功能减退症、特发性IgA肾病、特发性膜性GN、特发性膜性肾病、特发性肾病综

合征、特发性肺纤维化、特发性脂肪泻、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、IgE-介导性疾病 (任选地为全身性过敏反应和过敏性和特异性鼻炎)、IgG4-相关性硬化病、地域性回肠炎、免疫复合物性肾炎、与由细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和延迟性超敏反应相关的免疫反应、免疫介导的GN、免疫调节性脂蛋白 (包括成人呼吸窘迫综合症、急性呼吸道窘迫综合症 (ARDS)、包涵体肌炎)、感染性关节炎、由于抗精子抗体引起的不育、所有或部分眼葡萄膜的炎症、炎性肠病 (IBD)、炎性增生性皮肤病、炎性肌病、胰岛素依赖型糖尿病 (1型)、胰岛炎、间质性膀胱炎、间质性肺病、肺间质纤维化、虹膜炎、缺血性再灌注病症、关节炎症、幼年型关节炎、青少年型皮炎、青少年糖尿病、青少年发作型 (I型) 糖尿病 (包括儿童胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM))、青少年发作型类风湿性关节炎、川崎综合征 (Kawasaki syndrome)、燥性角膜结膜炎、锥虫病 (kypanosomiasis)、朗-伊二氏综合征 (Lambert-Eaton syndrome)、利什曼病、麻风病、白细胞减少症、白细胞粘附缺陷、白细胞分裂性脉管炎、白血球减少、扁平苔藓、萎缩性硬化性苔藓、木样结膜炎、线性IgA皮肤病、线性IgA病 (LAD)、吕弗勒氏综合征 (Loffler's syndrome)、狼疮状肝炎、狼疮、肾炎、脑炎、儿童的非肾性肾外盘状脱发性狼疮 (SLE)、播散性红斑狼疮、莱姆关节炎 (Lyme arthritis)、拉姆病 (Lyme disease)、淋巴细胞性间质性肺炎、疟疾、男性和女性自身免疫性不孕症、上颌骨 (maxillary)、中型血管炎、川崎氏病 (Kawasaki's disease)、结节性多动脉炎、膜增生性GN (MPGN) (包括I型和II型)、以及快速进行性GN、膜GN (膜性肾病)、梅尼尔氏病 (Meniere's disease)、脑膜炎、微小性结肠炎、显微镜型多血管炎、偏头痛、微小病变性肾病、混合结缔组织病 (MCTD)、传染性单核细胞增多症、莫伦氏溃疡、穆-哈二氏病 (Mucha-Habermann disease)、多灶性运动神经病、多发性内分泌衰竭、多器官损害综合征、败血症继发性疾病、创伤、出血、多器官损害综合征、多发性硬化症 (MS)、脊髓光学MS、多发性硬化症、腮腺炎、肌肉疾病、重症肌无力、胸腺瘤相关性重症肌无力、重症肌无力、心肌炎、肌炎、猝睡症、坏死性小肠结肠炎、以及透壁性结肠炎和自身免疫性炎性肠病、坏死性皮肤性超敏性血管炎、新生儿狼疮综合征 (NLE)、肾病、肾病综合症、神经系统疾病、视神经脊髓炎 (德维克氏 (Devic's))、视神经脊髓炎、神经性肌强直、嗜中性白血球减少症、非癌性淋巴球增多症、非肉芽肿型葡萄膜炎、非恶性胸腺瘤、眼睛和眼眶炎性病症、眼部疤痕性类天疱疮、卵巢炎、淋巴性眼炎 (ophthalmia sympathica)、眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS)、斜视眼阵挛、眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS)、以及感觉神经病、视神经炎、肉芽肿性睾丸炎、骨关节炎、复发性风湿病、胰腺炎、全血细胞减少症、PANDAS (与链球菌有关的儿童自身免疫性神经精神异常)、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤综合征、副肿瘤综合征 (包括神经性伴肿瘤综合征 (例如, Lambert-Eaton肌无力综合征、伊顿-兰伯特综合征 (Eaton-Lambert syndrome)、寄生虫病、利什曼原虫病、阵发性睡眠性血红蛋白尿 (PNH)、帕-罗二氏综合征 (Parry Romberg syndrome)、睫状体扁平部炎 (周边葡萄膜炎)、Parsonage-Turner综合征、细小病毒感染、类天疱疮、大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮、寻常型天疱疮、红斑性天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮型粘膜性类天疱疮、天疱疮、消化性溃疡、周期性麻痹、周围神经病、静脉周脑脊髓炎、恶性贫血 (pernicious anemia) (恶性贫血 (anemia perniciosa))、恶性贫血、晶状体抗原性葡萄膜炎、肺硬变、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I型、II型和III型原发性慢性多发性关节炎、多软骨炎、顽固性复发性多软骨炎、多内分泌自身免疫性疾病、多内分泌衰竭、多腺性综合征、自身免疫性多腺性综合征 (或多腺性内分泌病变综合征)、风湿性多肌痛、多发性肌炎、多发

性肌炎/皮肤肌炎、多发性神经病变、急性多神经根炎、心切开后综合征、后葡萄膜炎、自身免疫性葡萄膜炎、心肌梗死后综合征、心包切开后综合征、链球菌感染后性肾炎、疫苗接种后综合征、早老性痴呆、原发性胆汁性肝硬化、原发性甲状腺功能减退、原发性特发性粘液性水肿、原发性淋巴球增多症(包括单克隆B淋巴细胞增多、良性单克隆丙球蛋白病和意义不明的单克隆丙种球蛋白病)、MGUS、原发性粘液性水肿、原发性进行性MS(PPMS)、以及复发性多发性MS(RRMS)、原发性硬化性胆管炎、孕酮性皮炎、进行性全身性硬化、增生性关节炎、银屑病、斑块状银屑病、银屑病、银屑病关节炎、肺泡蛋白沉积症、肺嗜酸粒细胞浸润症、真性红细胞性贫血、发育不全症(PRCA)、真性红细胞性贫血、化脓性鼻窦炎、非化脓性鼻窦炎、脓疱型银屑病和指甲性银屑病、肾盂炎、坏疽性脓皮病、奎尔万氏甲状腺炎(Quervain's thyroiditis)、雷诺氏现象、反应性关节炎、习惯性流产、血压反应减小、反射性交感神经营养不良、顽固性口炎性腹泻、莱特氏病或综合征、复发性多软骨炎、心肌或其他组织的再灌注损伤、再灌注损伤、呼吸窘迫综合征、多动腿综合征、视网膜自身免疫病、腹膜后纤维变性、雷诺综合征、风湿性疾病、风湿热、风湿病、类风湿性关节炎、类风湿性脊柱炎、风疹病毒感染、Sampter氏综合征、肉样瘤病、血吸虫病、施密特综合征(Schmidt syndrome)、SCID和埃-巴二氏病毒相关性疾病、巩膜、巩膜炎、指硬皮病(sclerodactyl)、硬皮病、全身性硬皮病、硬化性胆管炎、扩散性硬化、硬化症、全身性硬化症、感觉神经听力丧失、血清反应阴性脊柱关节病、席汉氏综合征、输血后紫癜综合征(Shulman's syndrome)、硅肺、斯耶格伦氏综合征(Sjögren syndrome)、精子和睾丸自身免疫病、蝶窦炎、斯-约二氏综合征(Stevens-Johnson syndrome)、全身肌强直(僵人)综合症、亚急性细菌性心内膜炎(SBE)、亚急性皮肤型红斑狼疮、突发性听力丧失、Susac氏综合征、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、交感性眼炎、全身性红斑性狼疮(SLE)、系统性红斑狼疮、皮肤SLE、系统性坏死性血管炎、以及ANCA-相关性血管炎、丘-施二氏血管炎综合征(CSS)、脊髓痨、高安氏动脉炎、毛细血管扩张、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症(包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫性或免疫介导性血小板减少症)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP)、血小板减少性紫癜(TTP)、甲状腺机能亢进、组织损伤、托-亨二氏综合征(Tolosa-Hunt syndrome)、毒性表皮坏死溶解症、中毒性休克综合症、输血反应、婴儿临时性低丙种球蛋白血症、横贯性脊髓炎、横贯性脊髓炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多症、结核病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病(UCTD)、荨麻疹、慢性过敏性草麻症和慢性特发性荨麻疹(包括自身免疫性荨麻疹)、葡萄膜炎、前葡萄膜炎、葡萄膜视网膜炎、心瓣炎、血管功能障碍、血管炎、椎骨关节炎、水疱性皮肤病、白癜风、韦格内氏肉芽肿症(肉芽肿病伴随多血管炎(GPA))、维-奥二氏综合征、以及x-连锁高IgM综合征。

[0299] 另外,这些抗体和融合多肽可适用于治疗炎性病症,诸如风湿病、类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎、椎体关节病变、强直性脊柱炎、反应性关节炎、赖特综合征、晶体状关节病变、痛风、假性痛风、焦磷酸钙沉积病、多发性硬化症、拉姆病、风湿性多肌痛;结缔组织病、全身性红斑狼疮、全身性硬化症、多肌炎、皮肌炎、斯耶格伦氏综合征;脉管炎、结节性多动脉炎、韦格内氏肉芽肿症、Churg-Strauss综合征;炎性病状,包括创伤或缺血的后果、肉状瘤病;血管疾病,包括动脉粥样硬化血管疾病、动脉粥样硬化和血管闭塞性疾病、动脉粥样硬化、缺血性心脏病、心肌梗死、中风、周围血管疾病、血管支架内再狭窄;眼部疾病,包括葡萄膜炎、角膜疾病、虹膜炎、虹膜睫体炎、白内障、胃酸逆流/烧心、痤疮、寻常

痤疮、过敏和过敏反应、阿尔兹海默病、哮喘、动脉粥样硬化、血管闭塞性疾病、动脉粥样硬化、缺血性心脏病、心肌梗死、中风、周围血管疾病、血管支架内再狭窄、自身免疫性疾病、支气管炎、癌症、心脏炎、白内障、脂泻病、慢性疼痛、慢性前列腺炎、肝硬化、结肠炎、结缔组织疾病、全身性红斑狼疮、全身性硬化症、多肌炎、皮炎、斯耶格伦氏综合征、角膜病、克罗恩氏病、晶体状关节病变、痛风、假性痛风、焦磷酸钙沉积病、痴呆、皮炎、糖尿病、干眼症、湿疹、水肿、肺气肿、纤维肌痛、胃肠炎、牙龈炎、肾小球肾炎、心脏病、肝炎、高血压、超敏反应、炎症肠病、炎症病状、创伤或缺血的后果、胰岛素耐受性、间质性膀胱炎、虹膜睫状体炎、虹膜炎、关节痛/关节炎/类风湿性关节炎、拉姆病、代谢性综合征(综合征X)、多发性硬化症、肌炎、肾炎、肥胖症、眼部疾病、葡萄膜炎、骨质缺乏症、骨质疏松症、帕金森病、盆腔炎症性疾病、牙周疾病、多动脉炎、多软骨炎、风湿性多肌痛、银屑病、再灌注损伤、类风湿性关节炎、风湿病、类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病性关节炎、类风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、窦炎、斯耶格伦氏综合征、痉挛性结肠、脊椎关节病、强直性脊柱炎、反应性关节炎、赖特综合征、全身性念珠菌病、肌腱炎、移植排斥、UTI's、阴道炎、血管疾病、动脉粥样硬化血管疾病、血管炎病、结节性多动脉炎、韦格内氏肉芽肿症、Churg-Strauss综合征、以及血管炎。

[0300] 而且,本发明的激动剂和拮抗剂可用于治疗过敏性疾病,诸如支气管哮喘、过敏性鼻炎、特异性皮炎、以及花粉和昆虫过敏、湿疹、过敏性鼻炎、枯草热、荨麻疹、荨麻疹(假膜性喉头炎)以及食物过敏、以及其他特应性疾病。

[0301] 另外,本发明激动剂和拮抗剂可用于治疗不同癌症,诸如恶性肿瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、以及白血病。此类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、以及肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃部癌症或胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌症或肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和不同类型的头颈癌、以及B-细胞性淋巴瘤(包括轻度/滤泡型非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中度/卵泡NHL;中度弥漫性NHL;重度免疫母细胞NHL;重度淋巴母细胞NHL;重度小型非裂细胞NHL;大体积病变NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关性淋巴瘤;特发性巨球蛋白血症(**Waldenström** Macroglobulinemia));慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性成髓细胞性白血病;多发性骨髓瘤以及移植后淋巴组织增生性疾病(PTLD)。

[0302] 而且,能使用本发明的激动剂和拮抗剂治疗的癌症包括但不限于,恶性肿瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、以及白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例包括膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、以及肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃部癌症或胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌症或肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和不同类型的头颈癌、以及B-细胞性淋巴瘤(包括轻度/滤泡型非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中度/卵泡NHL;中度弥漫性NHL;重度免疫母细胞NHL;重度淋巴母细胞NHL;重度小型非裂细胞NHL;大体积病变NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关性淋巴瘤;特发性巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性成髓细胞性白血病;以及移植后淋巴组织增生性疾病(PTLD),以及母斑病相关的异常血管增生、水肿(诸如与脑部肿瘤相关

的水肿)和梅格斯综合征。优选地,所述癌症选自由以下组成的组:乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波济氏肉瘤、类癌性癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤、以及多发性骨髓瘤。所述癌症可为早期晚期(包括转移性)膀胱癌、卵巢癌或黑色素瘤。所述癌症可为结肠直肠癌。适合于本发明的治疗的癌症病状包括转移癌,其中髓源性抑制细胞进行的VISTA表达抑制了抗肿瘤反应和抗侵袭性免疫反应。本发明的方法特别适用于治疗血管化肿瘤。

[0303] 另外,本发明激动剂和拮抗剂可用于治疗感染性病状,例如病毒、细菌、真菌或寄生虫感染性病状。其实例包括例如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒、免疫缺陷型病毒(HIV)感染、HIV-1、HIV-2、疱疹、乳头瘤病毒感染以及相关疾病、结核病、疟疾、血吸虫病、埃可病毒感染、细小病毒感染、风疹病毒感染、免疫接种后综合征、先天性风疹感染、百日咳、流行性感、腮腺炎、以及埃-巴二氏病毒相关性疾病。

[0304] 根据本发明的CD40或CD27激动或拮抗抗体可特别用于治疗诸如癌症、炎症、感染性和自身免疫性疾病、移植、GVHD等病状并且用于促进疫苗的功效。

[0305] 本发明抗体可单独使用或与其他治疗剂结合使用,其中此类治疗剂可包括其他生物剂或非生物剂诸如小分子、化学治疗剂、抗感染剂、抗炎剂、抗过敏剂、放射性核素、其他受体激动剂或拮抗剂、激素调节剂、生长因子调节剂等。用于治疗癌症、感染性疾病、炎症病状的适合治疗剂为本领域已知的。适当的其他治疗剂的选择将取决于所治疗的特定病状。

[0306] 本发明的激动剂和拮抗剂当用于治疗时将并入到适用于治疗性施用的药物组合物中。此类组合物通常将包含有效量的激动剂或拮抗剂抗体或融合蛋白和载体,例如药学上可接受的载体。如本文所用的,语言“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。用于药理学活性物质的此类介质的用途为本领域中已知的。除非任何常规介质或试剂与所述活性化合物不相容,否则预期其在所述组合物中的用途。辅助性活性化合物也可并入到所述组合物中。

[0307] 本发明的药物组合物被配制为与其希望的施用路径相容。施用路径的实例包括胃肠外,例如静脉内、真皮内、皮下、经口(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜、以及直肠施用。用于胃肠外、真皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包含以下组分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、肝素、丙二醇或其他合成的溶剂;抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张度的试剂诸如氯化钠或右旋糖。pH可用酸或碱调节,诸如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可包含在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0308] 适用于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其中为水溶性的)或分散液和用于临时配制无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™。(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,所述组合物必需为无菌的并且流动性达到易于注射的程度。它在制造和保存条件下必需稳定并且防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可为含有以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过维持所要求的颗粒大

小、以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选地在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)、以及氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的吸收延长。

[0309] 可通过以下各项来制备无菌可注射溶液:将激动剂或拮抗剂以所需的量,根据需要,与一种以上列举的成分或这些成分的组合并入适当的溶剂中,然后进行过滤灭菌。总体上,通过将活性化合物并入无菌媒介物来制备分散液,所述无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上列举成分的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥,这些方法产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外需要的成分的粉末。

[0310] 口服组合物大体上包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可包含在明胶胶囊内或者压制成片剂。出于口服治疗性施用的目的,活性化合物可与赋形剂结合并用于片剂、锭剂或胶囊形式中。口服组合物还使用流体载体作为漱口剂来制备,其中所述流体载体中的化合物口服应用,漱口后吐出或吞咽。药学上相容的结合剂和/或佐剂材料可作为组合物的一部分包含在内。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、羧甲基淀粉(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶态二氧化硅;增甜剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷油、水杨酸甲酯或橙味调节剂。

[0311] 对于通过吸入进行施用,化合物以来自加压容器或分配器(含有可溶性推进剂例如气体诸如二氧化碳)或喷雾器的气溶胶喷雾形式递送。全身性施用还可通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用适用于穿透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常为本领域已知的,并且对于经粘膜施用包括例如洗涤剂、胆酸盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用,将活性化合物配制成膏剂、油膏、凝胶或霜剂,如本领域通常已知的。

[0312] 所述化合物还可制备为栓剂(例如,使用常规栓剂基质诸如可可粉和其他甘油)或滞留灌肠剂形式以用于直肠递送。在一个实施方案中,活性化合物用保护所述化合物使其免于从身体内快速消除的载体制备,诸如控制释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、以及聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。所述材料也可从Alza Corporation商购获得并且Nova Pharmaceuticals, Inc Liposomal悬浮液(包括用病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述的。

[0313] 为方便施用和统一剂量,将口服或胃肠外组合物配制成单位剂型为特别有利的。如本文所述的单位剂型是指适用作用于待治疗受试者的单位剂量的物理分散单位;每个单位含有计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载体。本发明的单位剂量的规格由活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果以及将此活性化合物混合以治疗个体的领域内的固有限制性指示或者直接取决于所述特征和治疗效果以及所述固

有限制性。

[0314] 此类化合物的毒性和治疗功效由细胞培养或实验动物中的标准药物程序所决定。从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于配制一定范围的用于人的剂量。此类化合物的剂量优选地在包括ED₅₀而几乎不具有或不具有毒性的循环浓度范围内。所述剂量在此范围内根据所采用的剂型和所利用的施用路径来变化。对于在本发明的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量最初可由细胞培养测定评估。剂量可被配制为在动物模型中实现循环血浆浓度范围,所述范围包括如在细胞培养中测定的IC₅₀(即测试化合物实现症状的半最大抑制的浓度)。此信息可用于更准确地确定人中有用的剂量。例如可通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0315] 如本文所限定的,蛋白质或多肽的治疗有效量(即,有效剂量)的范围为约0.001至30mg/kg体重,优选地约0.01至25mg/kg体重,更优选地约0.1至20mg/kg体重,以及甚至更优选地约1至10mg/kg、2至9mg/kg、3至8mg/kg、4至7mg/kg或者5至6mg/kg体重。技术人员将了解的是,某些因素可影响有效治疗受试者所需要的剂量,所述因素包括但不限于疾病或病症的严重性、受试者的一般健康和/或年龄、以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的蛋白质、多肽或抗体治疗受试者可包括单次治疗,或者优选地可包括一系列治疗。

[0316] 参考文献

[0317] 本申请中引用的所有参考文献的内容均以引用的方式整体并入本文。

[0318] 1.Advani,R.,Forero-Torres,A.,Furman,R.R.,Rosenblatt,J.D.,Younes,A.,Ren,H.,Harrop,K.,Whiting,N.,and Drachman,J.G.(2009).Phase I study of the humanized anti-CD40monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma.J Clin Oncol27,4371-4377.

[0319] 2.Ahonen,C.,Manning,E.,Erickson,L.D.,O'Connor,B.,Lind,E.F.,Pullen,S.S.,Kenry,M.R.,and Noelle,R.J.(2002).The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells.Nat Immunol 3,451-456

[0320] 3.Allen,M.J.,Guo,A.,Martinez,T.,Han,M.,Flynn,G.C.,Wypych,J.,Liu,Y.D.,Shen,W.D.,Dillon,T.M.,Vezina,C.,and Balland,A.(2009).Interchain disulfide bonding in human IgG2 antibodies probed by site-directed mutagenesis.Biochemistry 48,3755-3766

[0321] 4.Angal,S.,king,D.J.,Bodmer,M.W.,Turner,A.Lawson,A.D.Roberts,G.,Pesley B.,and Adair,J.R.(1993).A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4)antibody.Mol Immunol30,105-108.

[0322] 5.Bajor,D.L.,Xu,X.,Torigian,D.A.,Mick,R.,Garcia,L.,Richman,L.,Desmarais,C.,Nathanson,K.I.,Schuchter,L.M.,Kalos,M.,and Vonderhede,R.H.(2014).Immune activation and a 9-year ongoing complete remission following CD40antibody therapy and metastasectomy in a patient with metastatic melanoma.Cancer Immunol Res 2,19-26.

[0323] 6.Ball C,et al.(2012)Antibody C region influences TGN1412-like functional activity in vitro.Journal of Immunology 189(12):5831-5840.

- [0324] 7.Barrett,D.J.,and Ayoub,E.M.(1986).IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides.Clin Exp Immunol 63,127-134.
- [0325] 8.Bartholomaeus,P.,Semmler,L.Y.,Bukur,T.,Boisguerin,V.,Romer,P.S.,Tabares,P.,Chuvpilo,S.,Tyrsin,D.Y.,Matskevich,A.,Hengel,H.,et al.(2014).Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32⁺immune cells contribute to the TGN1412-triggered cytokine response.J Immunol192,2091-2098.
- [0326] 9.Beatty,G.L.,Chiorean,E.G.,Fishman,M.P.,Saboury,B.,Teitelbaum,U.R.,Sun,W.,Huhn,R.D.,Song,W.,Li,D.,Sharp,L.L.,et al.(2011).CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans.Science 331,1612-1616.
- [0327] 10.Beatty,G.L.,Torigian,D.A.,Chiorean,E.G.,Saboury,B.,Brothers,A.,Alavi,A.,Troxel,A.B.,Sun,W.,Teitelbaum,U.R.,Vonderheide,R.H.,and O'Dwyer,P.J.(2013).A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody(CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma.Clin Cancer Res 19,6286-6295.
- [0328] 11.Boross,P.,Arandhara,V.L.,Martin-Ramirez,J.,Santiago-Raber,M.L.,Carlucci,F.,Flierman,R.,van der Kaa,J.,Breukel,C.,Claassens,J.W.,Camps,M.,et al.(2011).The inhibiting Fcreceptor for IgG,Fc γ RIIB,is a modifier of autoimmune susceptibility.J Immunol 187,1304-1313.
- [0329] 12.Brahmer,I.R.,Tykodi,S.S.,Chow,L.Q.,Hwu,W.J.,Topalian,S.L.,Hwu,P.,Drake,C.G.,Camacho,L.H.,Kauh,J.,Odunsi,K.,et al.(2012).Safety and activity of anti-PD-L1 antibodyin patients with advanced cancer.New Engl JMed 366,2455-2465.
- [0330] 13.Bruhns,P.,Iannascoli,B.,England,P.,Mancardi,D.A.,Fernandez,N.,Jorieux,S.,and Daeron,M.(2009).Specificity and affinity of human Fe γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses.Blood 113,3716-3725.
- [0331] 14.Bulliard,Y.,Jolicoeur,R.,Windman,M.,Rue,S.M.,Ettenberg,S.,Knee,D.A.,Wilson,N.S.,Dranoff,G.,and Brogdon,J.L.(2013).Activating Fc γ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies.J Exp Med 210,1685-1693.
- [0332] 15.Bulliard,Y.,Jolicoeur,R.,Zhang,J.,Dranoff,G.,Wilson,N.S.,and Brogdon,J.L.(2014).OX40engagement depletes intratumoral Tregs via activating Fc γ Rs,leading to antitumor efficacy.Immunol Cell Biol 92,475-480.
- [0333] 16.Bourke,E.,Bosisio,D.,Golay,J.,Polentarutti,N.,and Mantovani,A.(2003).The toll-like receptor repertoire of human Blymphocytes:inducible and selective expression of TLR9 and TLR10in normal and transformed cells.Blood 102,956-963.
- [0334] 17.Chowdhury,F.,Johnson,P.W.,Glennie,M.J.,and Williams,A.P.(2014).Ex

vivo assays of dendritic cell activation and cytokine profiles as predictors of in vivo effects in an anti-human CD40 monoclonal antibody ChiLob 7/4 phase I trial. *Cancer Immunol Res* 2,229-240.

[0335] 18. Chu, S.Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G.L., Lazar, G.A., Pong, E., Joyce, P.F., Szymkowski, D.E., and Desjarlais, J.R. (2008). Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol Immunol* 45,3926-3933.

[0336] 19. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6,443-446.

[0337] 20. Dillon, T.M., Ricci, M.S., Vezina, C., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Rehder, D.S., Plant, M., Henkle, B., Li, Y., Deechongkit, S., et al. (2008) Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem* 283,16206-16215.

[0338] 21. Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229,152-172.

[0339] 22. French, R.R., Chan, H.T., Tutt, A.L., and Glennie, M.J. (1999). CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 5,548-553.

[0340] 23. French, R.R., Taraban, V.Y., Crowther, G.R., Rowley, T.F., Gray, J.C., Johnson, P.W., Tutt, A.L., Al-Shamkhani, A., and Glennie, M.J. (2007). Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* 109,4810-4815.

[0341] 24. Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., and Stevenson, G.T. (1987). Preparation and performance of bispecific F(ab' γ)₂ antibody containing thioether-linked Fab' γ fragments. *J Immunol* 139,2367-2375.

[0342] 25. Greenman, J., Tutt, A.L., George, A.J., Pulford, K.A., Stevenson, G.T., and Glennie, M.J. (1991). Characterization of a new monoclonal anti-Fc γ RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol Immunol* 28,1243-1254.

[0343] 26. Guo, A., Han, M., Martinez, T., Ketchum, R.R., Novick, S., Jochheim, C., and Balland, A. (2008). Electrophoretic evidence for the presence of structural isoforms specific for the IgG2 isotype. *Electrophoresis* 29,2550-2556.

[0344] 27. Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., and Tedder, T.F. (2006). Antibody isotype-specific engagement of Fc γ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med* 203,743-753.

[0345] 28. Hanks, B.A., Jiang, J., Singh, R.A., Song, W., Barry, M., Huls, M.H., Slawin, K.M., and Spencer, D.M. (2005). Re-engineered CD40 receptor enables

potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines in vivo. *Nat Med* 11,130-137.

[0346] 29. Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New Engl J Med* 363,711-723.

[0347] 30. Johnson PW, Steve, N.M., Chowdhury, F., Dobbyn, J., Hall, E., Ashton-Key, M., Hodges, E., Ottensmeier, C.H., Williams, A., Glennie, M.J. (2010) A cancer research UK phase 1 study evaluating safety, tolerability, and biological effects of chimeric anti-CD40 monoclonal antibody (Mab), Chi Lob 7/4. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (Suppl):abstr 2057.

[0348] 31. Kohrt, H.E., Colevas, A.D., Houot, R., Weiskopf, K., Goldstein, M.J., Lund, P., Mueller, A., Sagiv-Barfi, I., Marabelle, A., Lira, R., et al. (2014). Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. *J Clin Invest* 124,2668-2682.

[0349] 32. Kohrt, H.E., Houot, R., Goldstein, M.J., Weiskopf, K., Alizadeh, A.A., Brody, J., Muller, A., Pachynski, R., Czerwinski, D., Coutre, S., et al. (2011). CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies. *Blood* 117,2423-2432.

[0350] 33. Kohrt, H.E., Houot, R., Weiskopf, K., Goldstein, M.J., Scheeren, F., Czerwinski, D., Colevas, A.D., Weng, W.K., Clarke, M.F., Carlson, R.W., et al. (2012). Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest* 122,1066-1075.

[0351] 34. Kurai, J., Chikumi, H., Hashimoto, K., Yamaguchi, K., Yamasaki, A., Sako, T., Touge, H., Makino, H., Takata, M., Miyata, M., et al. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 13,1552-1561.

[0352] 35. Li, F., and Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fc γ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333,1030-1034.

[0353] 36. Li, F., and Ravetch, J.V. (2012). Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fc γ receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* 109,10966-10971.

[0354] 37. Li, F., and Ravetch, J.V. (2013). Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential Fc γ RIIB coengagement in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110,19501-19506

[0355] 38. Lightle, S., Aykent, S., Lacher, N., Mitaksov, V., Wells, K., Zobel, J., and Oliphant, T. (2010). Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and

homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma receptor or C1q binding. *Prot Sci* 19,753-762.

[0356] 39. Liu, Y.D., Chen, X., Enk, J.Z., Plant, M., Dillon, T.M., and Flynn, G.C. (2008). Human IgG2 antibody disulfide rearrangement in vivo. *J Biol Chem* 283, 29266-29272.

[0357] 40. Law CL, et al. (2005) Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40. *Cancer Research* 65(18):8331-8338.

[0358] 41. Lux, A., Yu, X., Scanlan, C.N., and Nimmerjahn, F. (2013) Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol* 190, 4315-4323.

[0359] 42. Martinez, T., Guo, A., Allen, M.J., Han, M., Pace, D., Jones, J., Gillespie, R., Ketchum, R.R., Zhang, Y., and Balland, A. (2008). Disulfide connectivity of human immunoglobulin G2 structural isoforms. *Biochemistry* 47, 7496-7508.

[0360] 43. Moran, A.E., Kovacsics-Bankowski, M., and Weinberg, A.D. (2013). The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 25, 230-237.

[0361] 44. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2005). Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510-1512.

[0362] 45. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2012). Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. *Cancer Immunity* 12, 13-19.

[0363] 46. Polak ME, et al. (2012) CD70-CD27 interaction augments CD8+T-cell activation by human epidermal Langerhans cells. *The Journal of Investigative Dermatology* 132(6):1636-1644.

[0364] 47. Richman, L.P., and Vonderheide, R.H. (2014). Role of crosslinking for agonistic CD40 monoclonal antibodies as immune therapy of cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 19-26.

[0365] 48. Romer PS, et al. (2011) Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118(26):6772-6782.

[0366] 49. Ryazantsev, S., Tischenko, V., Nguyen, C., Abramov, V., and Zav'yalov, V. (2013). Three dimensional structure of the human myeloma IgG2. *PloS One* 8, e64076.

[0367] 50. Sanchez, P.J., McWilliams, J.A., Haluszczak, C., Yagita, H., and Kedl, R.M. (2007). Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J Immunol* 178, 1564-1572.

[0368] 51. Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of

anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210,1695-1710.

[0369] 52. Sliwowski, M.X., and Mellman, I. (2013). Antibody therapeutics in cancer. *Science* 341,1192-1198.

[0370] 53. Smulski, C.R., Beyrath, J., Decossas, M., Chekkat, N., Wolff, P., Estieu-Gionnet, K., Guichard, G., Speiser, D., Schneider, P., and Fournel, S. (2013). Cysteine-rich domain 1 of CD40 mediates receptor self-assembly. *J Biol Chem* 288,10914-10922

[0371] 54. Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., and Panoskaltsis, N. (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *New Engl J Med* 355,1018-1028.

[0372] 55. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New Engl J Med* 366,2443-2454.

[0373] 56. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., and Tedder, T.F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199,1659-1669.

[0374] 57. Vonderheide, R.H., and Glennie, M.J., (2013). Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy, *Clin Cancer Res* 19,1035-1043.

[0375] 58. Vonderheide RH, et al. (2007) Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody., *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(7):876-883.

[0376] 59. White, A.L., Chan, H.T., French, R.R., Beers, S.A., Cragg, M.S., Johnson, P.W., and Glennie, M.J. (2013). Fc γ RIIB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs. *Cancer Immunol Immunother* 62,941-948.

[0377] 60. White, A.L., Charn, H.T., Roghanian, A., French, R.R., Mockridge, C.I., Tutt, A.L., Dixon, S.V., Ajona, D., Verbeek, J.S., Al-Shamkhani, A., et al. (2011). Interaction with Fc γ RIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol* 187,1754-1763.

[0378] 61. White, A.L., Dou, L., Chan, H.T.C., Field, V.L., Mockridge, C.I., Moss, K., Williams, E., Butts, C., Al-Shamkhani, A., Cragg, M.S., Verbeek, S.J., Johnson, P., Glennie, M.J., Beers, S.A. (2014). FcR dependence of agonistic CD40 antibody is related to anatomical location and can be overcome by antibody multimerization. *Journal of Immunology* 193,1828-1835.

[0379] 62. White, A.L., Tutt, A.L., James, S., Wilkinson, K.A., Castro, F.V., Dixon, S.V., Hitchcock, J., Khan, M., Al-Shamkhani, A., Cunningham, A.F., and Glennie, M.J. (2010). Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal center

induction and robust humoral responses without adjuvant. *Immunology* 131,141-151.

[0380] 63. Wilson, N.S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., et al. (2011). An $\text{Fc}\gamma$ receptor-dependent mechanism drives antibody mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* 19,101-113.

[0381] 64. Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *New Engl J Med* 369,122-133.

[0382] 65. Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Kelner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., et al. (2008) Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem* 283,16194-16205.

[0383] 66. Xu, Y., Szalai, A.J., Zhou, T., Zinn, K.R., Chaudhuri, T.R., Li, X., Koopman, W.J., and Kimberly, R.P. (2003). $\text{Fc}\gamma$ Rs modulate cytotoxicity of anti-Fas antibodies: implications for agonistic antibody-based therapeutics. *J Immunol* 171,562-568.

[0384] 67. Yoo, E.M., Wims, L.A., Chan, L.A., and Morrison, S.L., (2003). Human IgG2 can form covalent dimers. *J Immunol* 170,3134-3138.

[0385] 68. Zhang, B., Harder, A.G., Connelly, H.M., Maheu, L.L., and Cockri], S.L. (2010). Determination of Fab-hinge disulfide connectivity in structural isoforms of a recombinant human immunoglobulin G2 antibody. *Anal Chem* 82,1090-1099.

[0386] 已描述本发明及其示例性实施方案,本发明由所附权利要求书进一步描述。

[0387] 本发明包括以下实施方案:

[0388] 1. 一种特异性结合人细胞表面上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述修饰抗体激动由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或者由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,其中所述抗体不是人IgG2抗体,并且另外其中不是人IgG2的所述修饰抗体的整个或基本上重链铰链和 $\text{C}_{\text{H}}1$ 结构域和任选地轻链恒定区被hIgG2抗体相应的整个或基本上整个铰链和 $\text{C}_{\text{H}}1$ 结构域和任选地轻链恒定区替换。

[0389] 2. 根据实施方案1所述的修饰抗体,其选自hIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE或IgM,其中所述抗体的整个或基本上整个铰链和 $\text{CH}1$ 结构域和任选地整个或基本上整个轻链恒定区已被hIgG2相应的整个或基本上整个轻链和铰链和 $\text{C}_{\text{H}}1$ 结构域(“H2区”或“H2结构域”)替换。

[0390] 3. 根据实施方案1或2所述的修饰抗体,其中位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基中的任一个或两者(其中编号是根据Kabat)是缺失的或者被改变成不同的氨基酸残基,从而使得所述所得修饰抗体的激动特性相对于其中所述半胱氨酸残基中的任一个或两者未改变的其他方面相同抗体有所增加。

[0391] 4. 根据实施方案1、2或3所述的修饰抗体,其中在所述修饰抗体的所述H2区中突变或缺失的唯一半胱氨酸残基为所述轻链的位置214处的半胱氨酸并且所述修饰抗体包含

(i) 其中在所述H2区中没有半胱氨酸残基缺失或修饰的重链或者(ii)所述重链的位置127、232或233处的半胱氨酸残基中的一个或多个是缺失或突变的,从而产生修饰抗体,其中所述所得修饰抗体的激动特性相对于缺乏所述缺失或修饰的其他方面相同的抗体有所增加。

[0392] 5. 根据实施方案3或4所述的修饰抗体,其为修饰的hIgG1或hIgG3。

[0393] 6. 根据实施方案1-5中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合人免疫细胞。

[0394] 7. 根据实施方案6所述的修饰抗体,其中所述免疫细胞包括树突状细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞或以上任何组合。

[0395] 8. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体缺乏激动活性。

[0396] 9. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过10%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0397] 10. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过20%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0398] 11. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过30%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0399] 12. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过40%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0400] 13. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0401] 14. 根据实施方案1-7中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%-80%的激动活性,其中激动活性在用于量化激动性的可接受测定中检测。

[0402] 15. 一种特异性结合人细胞上表达的受体或配体的修饰人IgG2抗体(hIgG2),其中所述抗体激动由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,并且另外其中所述修饰抗体包含至少hIgG2的轻链以及重链C_H1和铰链区("H2区"),其中选自位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基的所述半胱氨酸残基中的任一个或两者被去除或改变成不同的氨基酸残基,从而使得所得激动抗体的激动特性相对于其中所述半胱氨酸残基二者未改变的其他方面相同的抗体有所增加(其中氨基酸编号是根据Kabat)。

[0403] 16. 根据实施方案15所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体的轻链在位置214处的所述半胱氨酸残基为缺失的或被另一种氨基酸取代并且所述修饰抗体包含(i)其中所述H2区内没有半胱氨酸残基缺失或突变的重链或者(ii)所述修饰抗体包含其中位置127、232或233处的所述半胱氨酸残基中的至少一个缺失或突变的重链。

[0404] 17. 根据实施方案16所述的修饰抗体,其中所述重链的所述H2区内没有半胱氨酸

残基缺失或突变。

[0405] 18. 根据实施方案16所述的修饰抗体,其中所述重链内的位置127、232或233处的所述半胱氨酸残基中的至少一个缺失或突变。

[0406] 19. 根据实施方案16所述的修饰抗体,其中所述重链内的位置127、232或233处的所述半胱氨酸残基中的一个或两个的任何组合缺失或突变。

[0407] 20. 根据实施方案1-19中任一项所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体的所述H2区处于h2B构象中(重链C127和轻链C214与重链半胱氨酸232和233形成二硫键桥)。

[0408] 21. 根据实施方案1-20中任一项所述的修饰抗体,其中所述hIgG2重链H2区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基包括位置127处的重链半胱氨酸残基。

[0409] 22. 根据实施方案21所述的修饰抗体,其中在所述轻链H2区内没有半胱氨酸残基被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代。

[0410] 23. 根据实施方案1-21中任一项所述的修饰抗体,其中所述hIgG2轻链区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基包括在位置214处的轻链半胱氨酸残基。

[0411] 24. 根据实施方案1-21中任一项所述的修饰抗体,其中所述hIgG2 H2区内被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代的唯一半胱氨酸残基选自位置127处的重链半胱氨酸残基和位置214处的轻链半胱氨酸残基。

[0412] 25. 根据实施方案1-21中任一项所述的修饰抗体,其包含取代所述轻链的位置214处的半胱氨酸的丝氨酸和/或取代所述重链的位置127处的半胱氨酸残基的丝氨酸残基。

[0413] 26. 一种修饰的hIgG1或hIgG3或hIgG4抗体,其中所述hIgG1、hIgG3或hIgG4的整个铰链和C_H1区和任选地所述轻链恒定区(H2区)被hIgG2相应的铰链和C_H1区的轻链恒定区替换。

[0414] 27. 根据实施方案26所述的修饰抗体,其为hIgG1。

[0415] 28. 根据实施方案26或27所述的修饰抗体,其任选地包含所述H2区内的一个或多个修饰半胱氨酸残基。

[0416] 29. 根据实施方案1-28中任一项所述的修饰抗体,其任选地包含所述H2区之外的另外的修饰,所述修饰并不影响或可感知地影响(不超过10%变化)所述修饰抗体的激动特性。

[0417] 30. 根据实施方案1-29中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合在人细胞例根据免疫细胞的表面上表达的TNF或B7超家族成员。

[0418] 31. 根据实施方案1-29中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合在至少一种类型的人免疫细胞上表达的受体或配体。

[0419] 32. 根据实施方案30或31所述的修饰抗体,其中所述免疫细胞选自T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、肥大细胞、巨噬细胞、NK细胞、以及树突状细胞或其组合。

[0420] 33. 根据实施方案1-32中任一项所述的修饰抗体,其包含整个人IgG2 C_H1和铰链和轻链恒定区。

[0421] 34. 根据实施方案1-33中任一项所述的修饰c抗体,其缺乏所述人IgG2 Fc区。

[0422] 35. 根据实施方案1-34中任一项所述的修饰抗体,其中所述抗体或融合物的所述

激动特性为Fc γ R独立的。

[0423] 36. 根据实施方案1-35中任一项所述的修饰抗体,其中所述抗体特异性结合选自CD40、LT α 、LT β 、CD30、CD27、OX40、4-1BB、TNF-R、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、以及FN14的TNFR超家族成员或结合选自B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7-H1、B7-H2、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、B7-H5 (VISTA)、B7-H6 (NCR3LG1)、B7-H7 (HHLA2)、PD-1 (CD279)、CD28、CTLA-4 (CD152)、ICOS (CD278)、BTLA、NCR3、CD28H、以及Nkp30的B7/CD28家族成员。

[0424] 37. 根据实施方案36所述的修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白,其中所述TNFR成员为4-1BB、CD40或CD27或者所述B7/CD28家族成员为CTLA-4或CD28。

[0425] 38. 根据实施方案1-37中任一项所述的修饰抗体,其包含LOB7.4的所述可变区。

[0426] 39. 一种药物组合物,其包含有效量的根据实施方案1-38中任一项所述的修饰抗体。

[0427] 40. 根据实施方案39所述的组合物,其包含另一种免疫激动剂。

[0428] 41. 一种治疗方法,其包括施用至少一种修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白,所述方法包括施用有效量的至少一种根据实施方案1-40中任一项所述的修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白或组合物。

[0429] 42. 根据实施方案41所述的方法,其用于治疗选自癌症、感染、过敏、自身免疫或炎症的病症。

[0430] 43. 一种特异性结合人细胞表面上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述修饰抗体拮抗由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性或者由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,其中所述抗体不是人IgG2抗体,并且另外其中不是人IgG2的所述修饰抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和任选地轻链恒定区被hIgG2抗体相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域和轻链恒定区(“H2区”或“H2结构域”)替换,其中所述H2区内一个或多个半胱氨酸残基被任选地修饰,所述修饰引起所述所得修饰抗体的拮抗特性增加。

[0431] 44. 根据实施方案43所述的修饰抗体,其任选地通过将任选修饰轻链与修饰重链组合来产生,所述任选修饰轻链含有其中C214未改变的hIgG2恒定区和对人细胞上表达的所需人配体或受体有特异的抗体轻链可变区,所述修饰重链包含hIgG2的所述C_H1和铰链区和对与所述轻链可变区相同的人配体或受体有特异的相同抗体的可变区,所述修饰重链包含一个或多个修饰,所述修饰包括位置232、233、236和239处的一个或多个半胱氨酸残基(其任何组合)的缺失或取代,其中此类组合选择性产生呈所述h2A构象的修饰抗体,所述修饰抗体特异性结合并拮抗由因此结合的特定人配体或受体引起的生物活性。

[0432] 45. 根据实施方案44所述的修饰抗体,其选自hIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE或IgM,其中所述抗体的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域已被hIgG2相应的整个或基本上整个铰链和C_H1结构域(“H2区”或“H2结构域”)替换。

[0433] 46. 根据实施方案44或45所述的修饰抗体,其中包含于所述IgG2 H2区的选自位置232、233、236和239处的半胱氨酸残基中的至少一个半胱氨酸残基的任何组合被去除或改变成不同的氨基酸残基,使得所述所得修饰抗体的拮抗特性相对于其中所述一个或多个半胱氨酸残基未改变的其他方面相同的抗体有所增加。

[0434] 47. 根据实施方案44、45或46所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体在所述轻链的残基214处的半胱氨酸和在所述重链的残基127处的半胱氨酸未缺失、修饰或被另一种氨基酸残基取代。

[0435] 48. 根据实施方案43-47中任一项所述的修饰抗体,其中所述抗体的所述H2区内的所述半胱氨酸修饰选择性促进或引起所述修饰抗体的所述重链和轻链经由所述轻链的位置214处的半胱氨酸和所述重链的位置127处的半胱氨酸来缔合。

[0436] 49. 根据实施方案43-47中任一项所述的修饰抗体,其中所述修饰抗体的所述H2区呈所述h2A构象。

[0437] 50. 根据实施方案43-49中任一项所述的修饰抗体,其中在所述H2内除C214和C127之外的至少一个半胱氨酸残基被改变成丝氨酸残基。

[0438] 51. 根据实施方案43-50中任一项所述的修饰抗体,其包含取代所述重链的位置232处的所述半胱氨酸的丝氨酸。

[0439] 52. 根据实施方案43-51中任一项所述的拮抗抗体,其包含取代所述重链的位置233处的所述半胱氨酸的丝氨酸。

[0440] 53. 根据实施方案43-52中任一项所述的修饰抗体,其为修饰的hIgG1或hIgG3。

[0441] 54. 根据实施方案43-53中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合人免疫细胞。

[0442] 55. 根据实施方案54所述的修饰抗体,其中所述免疫细胞包括树突状细胞、肥大细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞或以上任何组合。

[0443] 56. 根据实施方案43-55中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体缺乏拮抗活性。

[0444] 57. 根据实施方案43-56中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过10%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0445] 58. 根据实施方案43-56中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过20%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0446] 59. 根据实施方案43-56中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过30%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0447] 60. 根据实施方案43-56中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过40%的拮抗活性,其中拮抗活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0448] 61. 根据实施方案43-56中任一项所述的修饰抗体,其中不存在所述修饰时所述抗体具有所述修饰抗体的不超过50%的拮抗活性,其中激动活性在用于量化拮抗性的可接受测定中检测。

[0449] 62. 一种特异性结合人细胞上表达的受体或配体的修饰抗体,其中所述抗体拮抗由所述受体或配体引起的一种或多种生物活性、或由所述配体及其相应受体的相互作用引起的生物活性,并且另外其中所述拮抗抗体包含至少人IgG2的C_H1和铰链和轻链恒定区(“H2区”),其中所述IgG2 H2区的选自位置232、233、236和239处的半胱氨酸残基中的至少

一个半胱氨酸残基被去除或改变成不同的氨基酸残基,使得所得拮抗抗体的拮抗特性相对于其中所述一个或多个半胱氨酸残基未改变的其他方面相同的抗体有所增加。

[0450] 63. 根据实施方案62所述的修饰抗体,其任选地通过将任选修饰轻链与修饰重链组合来产生,所述任选修饰轻链含有其中C214未改变的hIgG2恒定区和对人细胞上表达的所需人配体或受体有特异的轻链可变区,所述修饰重链包含hIgG2的所述C_H1和铰链区和对与所述轻链可变区相同的人配体或受体有特异的C_H1的可变区,所述修饰重链包含一个或多个修饰,所述修饰包括位置232、233、236和239处的一个或多个半胱氨酸残基(其任何组合)的缺失或取代,其中此类组合选择性产生呈所述h2A构象的修饰抗体,所述修饰抗体特异性结合并拮抗由因此结合的特定人配体或受体引起的生物活性。

[0451] 64. 根据实施方案62或63所述的修饰抗体,其中所述轻链的位置214处和所述重链的位置127处的半胱氨酸未缺失、修饰或被另一种氨基酸残基取代。

[0452] 65. 根据实施方案43-64中任一项所述的修饰抗体,其中在所述hIgG2 H2区中一个或多个半胱氨酸或其他氨基酸残基被去除、修饰或被另一种氨基酸残基取代,从而产生呈所述h2A构象的所述H2区,其中h2A构象意指C_H1中的所述重链C127连接至所述轻链中的C214并且任选地在相反铰链半胱氨酸232、233、236和239之间存在零个、一个、两个或三个HC间二硫键。

[0453] 66. 根据实施方案43-65中任一项所述的修饰抗体,其中在所述hIgG2 H2区内除C127和C214之外的所述H2区半胱氨酸残基中的至少一个、两个、三个或所有被改变成丝氨酸残基,并且另外其中C127和C214为未修饰的。

[0454] 67. 根据实施方案43-66中任一项所述的修饰c抗体,其包含取代所述重链的位置232处的所述半胱氨酸的丝氨酸或取代位置233处的所述半胱氨酸的丝氨酸、或者取代位置236处的所述半胱氨酸的丝氨酸或取代位置239处的所述半胱氨酸的丝氨酸、或所述修饰中的两种、三种或所有的任何组合。

[0455] 68. 根据实施方案43-67中任一项所述的修饰c抗体,其包含取代所述重链的位置233处的所述半胱氨酸的丝氨酸。

[0456] 69. 根据实施方案43-68中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合在人细胞表面上表达的TNF或TNFR超家族成员或B7家族成员。

[0457] 70. 根据实施方案43-69中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合至少一种类型的人免疫细胞。

[0458] 71. 根据实施方案42-69中任一项所述的修饰抗体,其特异性结合在T细胞、B细胞、肥大细胞、巨噬细胞、单核细胞、NK细胞或树突状细胞上表达的受体或配体。

[0459] 72. 根据实施方案43-71中任一项所述的修饰抗体,其包含整个人IgG2恒定重链和轻链恒定区。

[0460] 73. 根据实施方案43-72中任一项所述的修饰抗体,其缺乏人IgG2 Fc区。

[0461] 74. 根据实施方案43-73中任一项所述的修饰抗体,其中所述抗体的所述拮抗特性为Fc γ R独立的。

[0462] 75. 根据实施方案43-74中任一项所述的修饰抗体,其中所述抗体或融合蛋白特异性结合选自以下各项的TNFR超家族成员:CD40、CD40L (CD154)、LT α 、LT β 、FASL (CD178)、CD30、CD30L (CD153)、CD27、CD27L (CD70)、OX40、OX40L、TRAIL/APO-2L、4-1BB、4-1BBL、TNF、

TNF-R、TRANCE、TRANCE-R、GITR或“糖皮质激素诱导的TNF受体”、TWEAK、以及FN14。

[0463] 76. 根据实施方案75所述的修饰抗体,其中所述TNFR或B7家族成员为4-1BB、4-1BBL、CD40、CD40L、CD27、CD28、B7.1、B7.2或CD70。

[0464] 77. 一种含有根据实施方案1-76中任一项所述的纯化修饰抗体的药物或诊断组合物,其为基本上均匀的,即所述组合物基本上不含有任何其他“h2a”或“h2b”形式的所述抗体。

[0465] 78. 根据实施方案77所述的组合物,其包含至多0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的任何其他形式的所述抗体。

[0466] 79. 一种药物组合物,其包含有效量的根据实施方案43-78中任一项所述的修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白。

[0467] 80. 根据实施方案77、78或79所述的组合物,其包含另一种免疫拮抗剂或其他活性剂,例如抗体或细胞因子。

[0468] 81. 一种治疗方法,其包括施用至少一种拮抗抗体或含有所述拮抗抗体的融合蛋白或组合物,其中所述方法包括施用根据实施方案43-80中任一项所述的修饰抗体或含有所述修饰抗体的融合蛋白或组合物。

[0469] 82. 根据实施方案81所述的方法,其用于治疗选自癌症、过敏、感染性疾病、自身免疫或炎症疾病的病状。

[0470] 83. 根据实施方案82所述的方法,其中所述方法包括施用包含LOB7.4的可变区的抗体或对CD40、4-1BB或CD28有特异的另一种抗体。根据实施方案77-80中任一项所述的方法,其用于治疗选自癌症、感染、过敏、自身免疫或炎症的病状。

[0471] 84. 一种在重组宿主细胞中表达根据上述实施方案中任一项所述的修饰抗体的方法。

[0472] 85. 根据实施方案84所述的方法,其中所述修饰抗体的所述轻链和重链的表达由一种或多种诱导型启动子或组成型启动子调节。

[0473] 86. 一种重组宿主细胞,其表达且任选地分泌根据本发明的修饰抗体。

[0474] 87. 根据实施方案86所述的重组宿主细胞,其为哺乳动物、酵母、真菌、细菌或昆虫细胞。

[0475] 88. 根据实施方案87所述的重组细胞,其表达人蛋白的内源性糖基化所需要的酶或被工程化为表达所述酶。

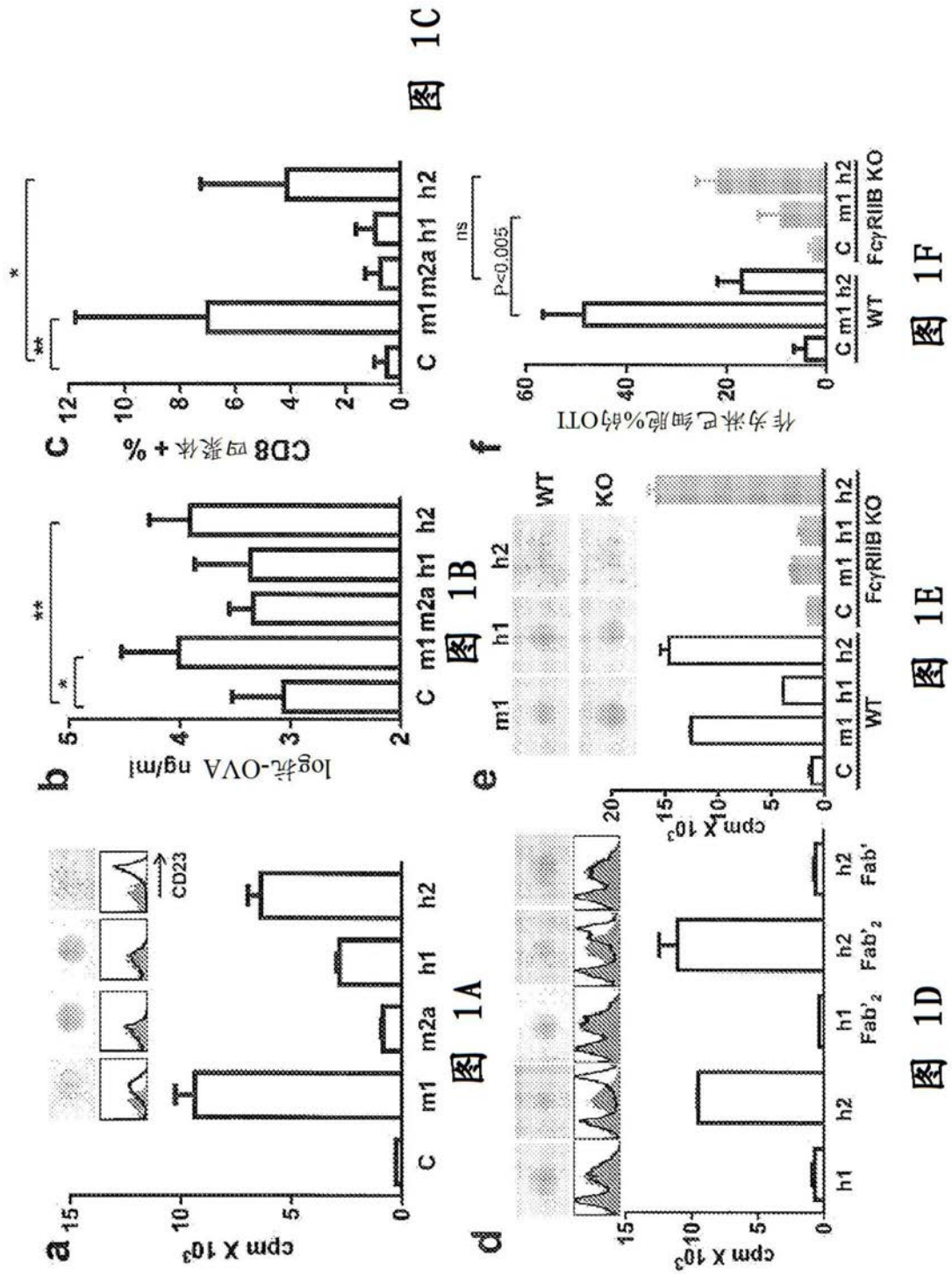


图1

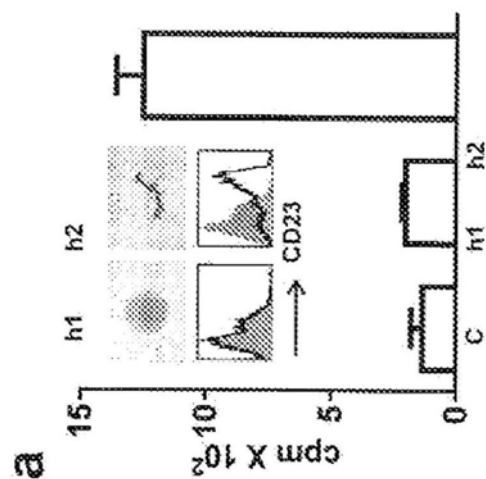


图2A

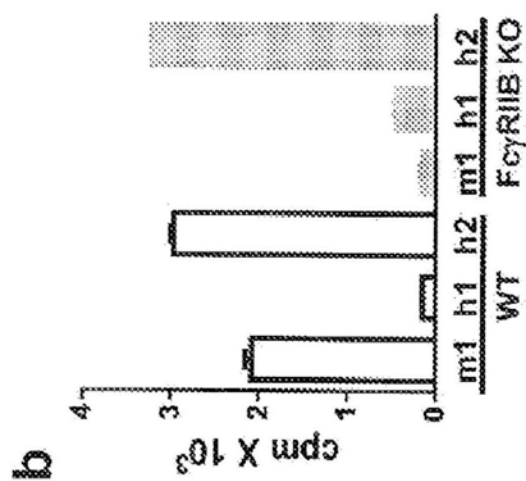


图2B

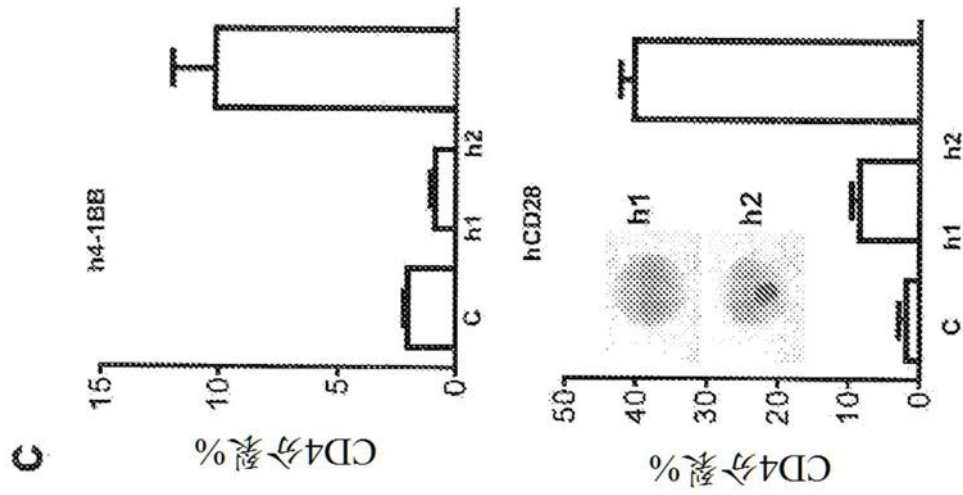


图2C

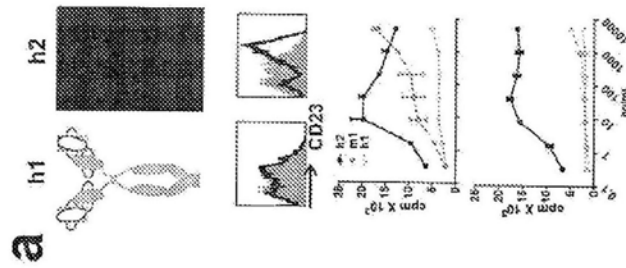


图3A

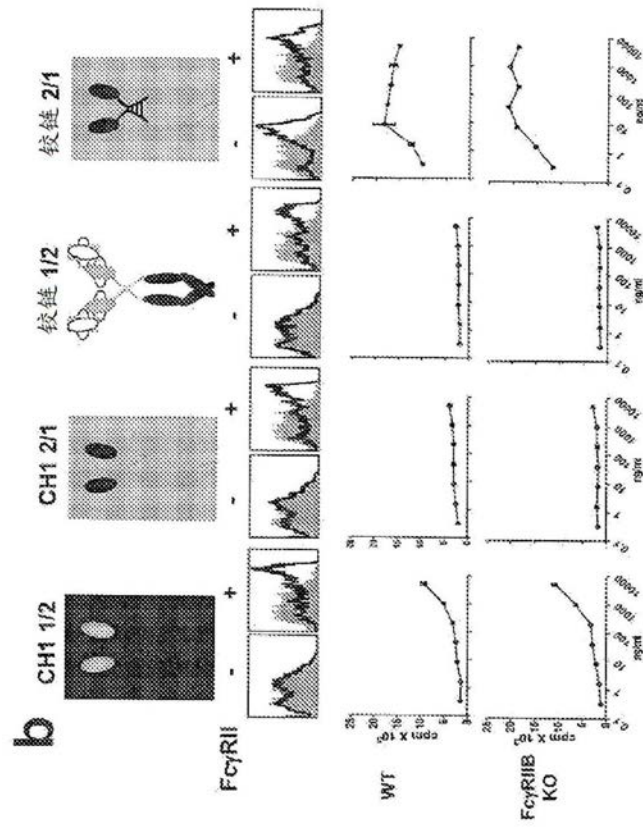


图3B

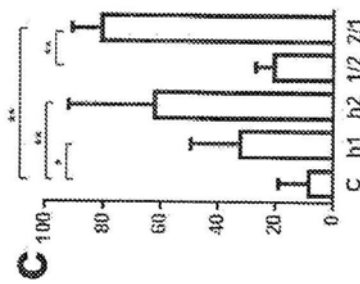
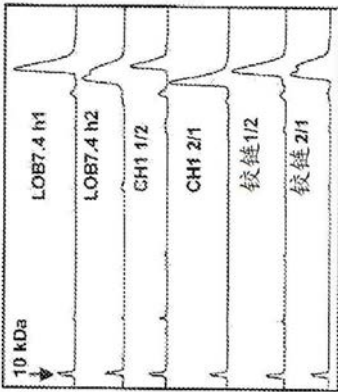
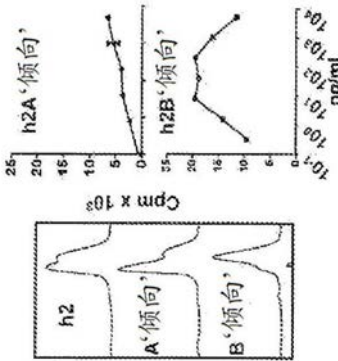


图3C



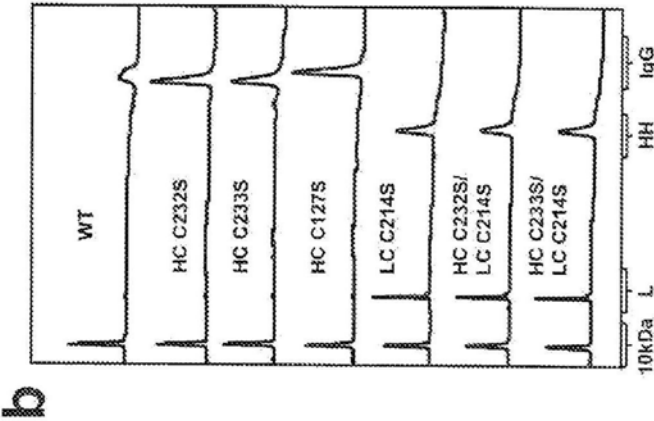
d

图3D



a

图4A



b

图4B

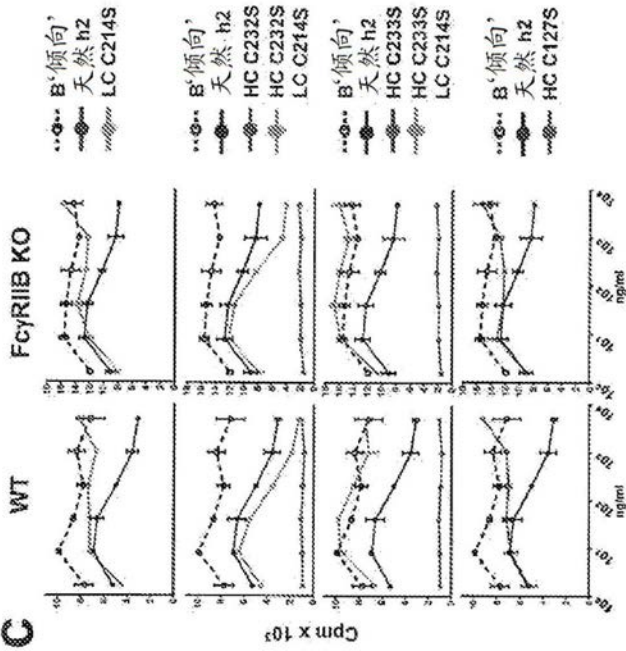


图4C

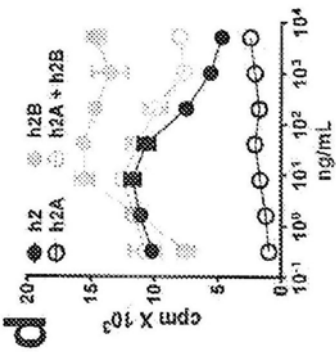


图4D

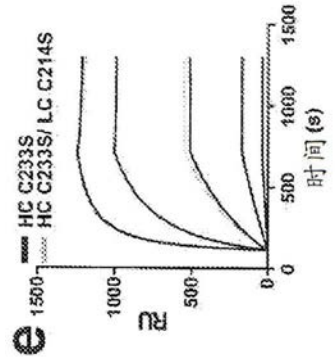


图4E

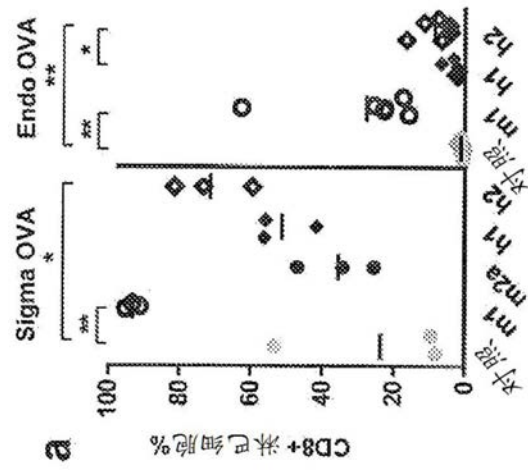


图5A

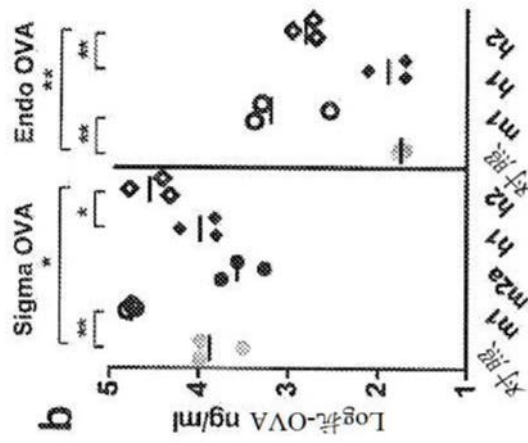


图5B

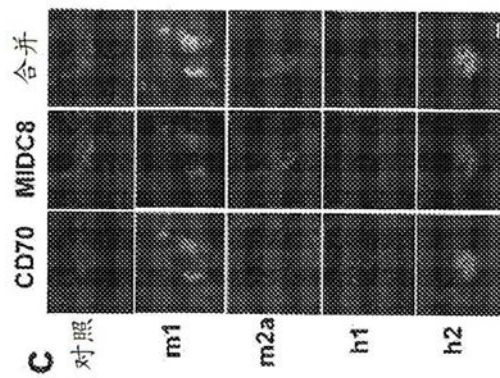


图5C

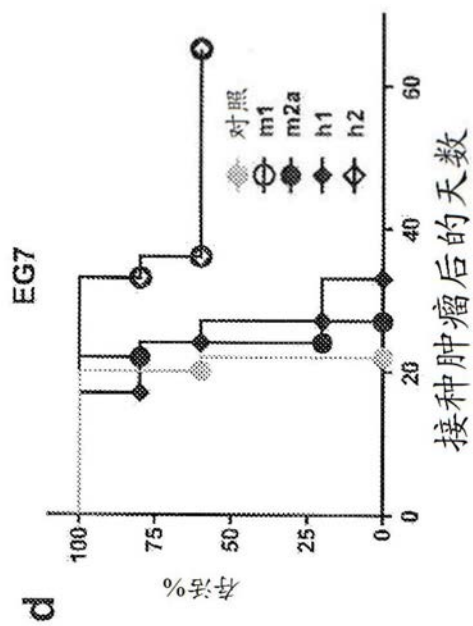


图5D

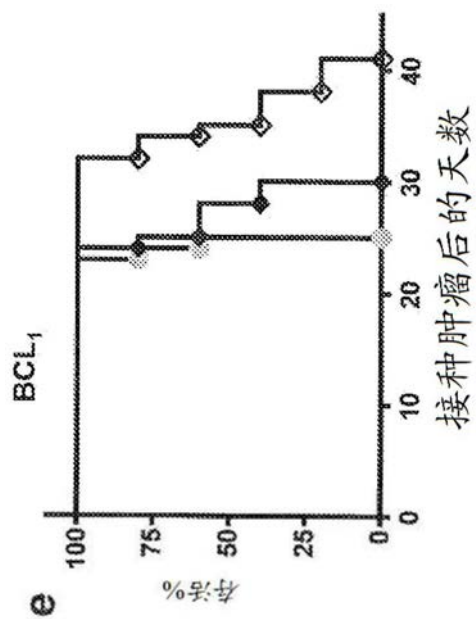


图5E

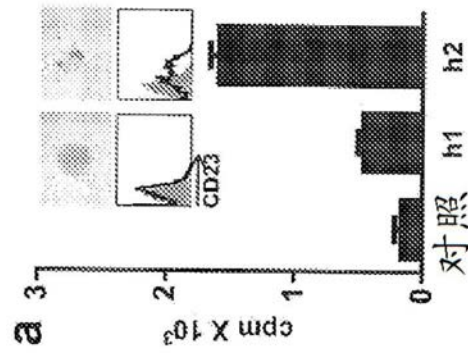


图6A

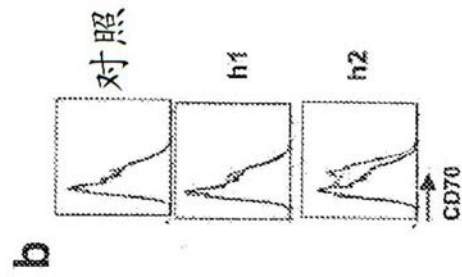


图6B

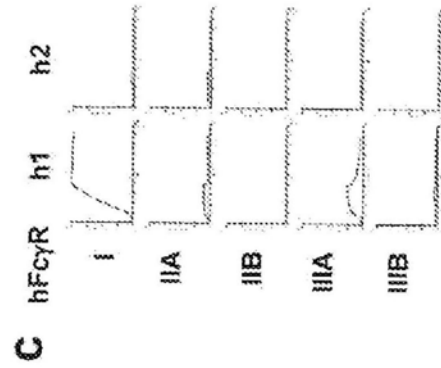


图6C

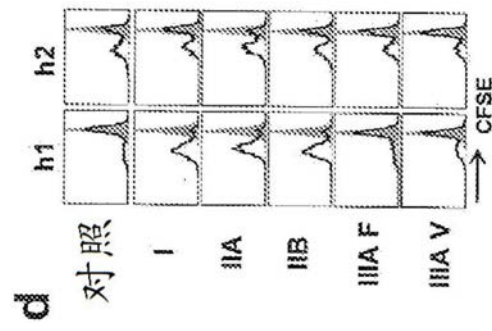


图6D

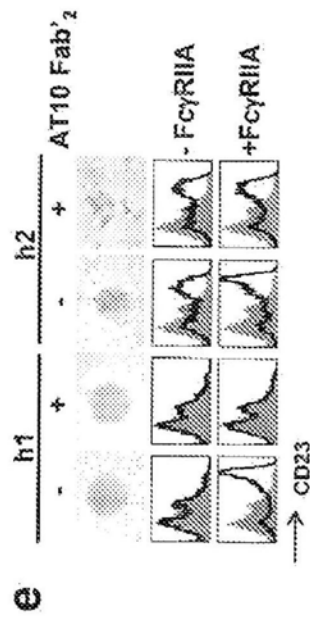


图6E

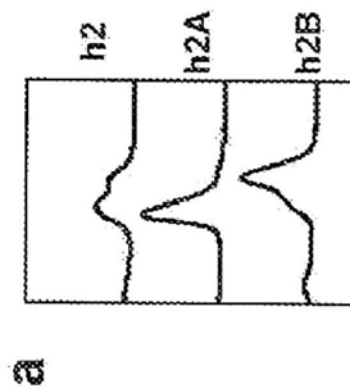


图7A

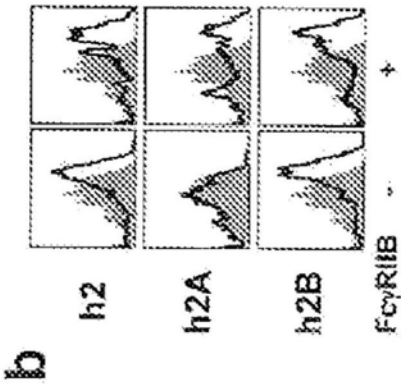


图7B

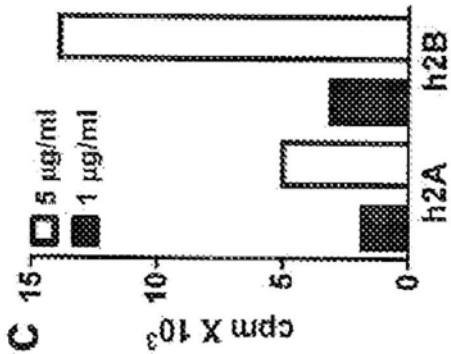


图7C

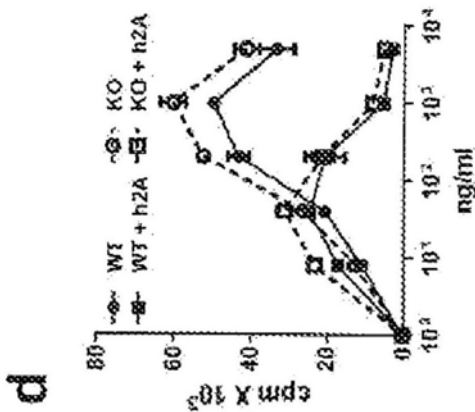


图7D

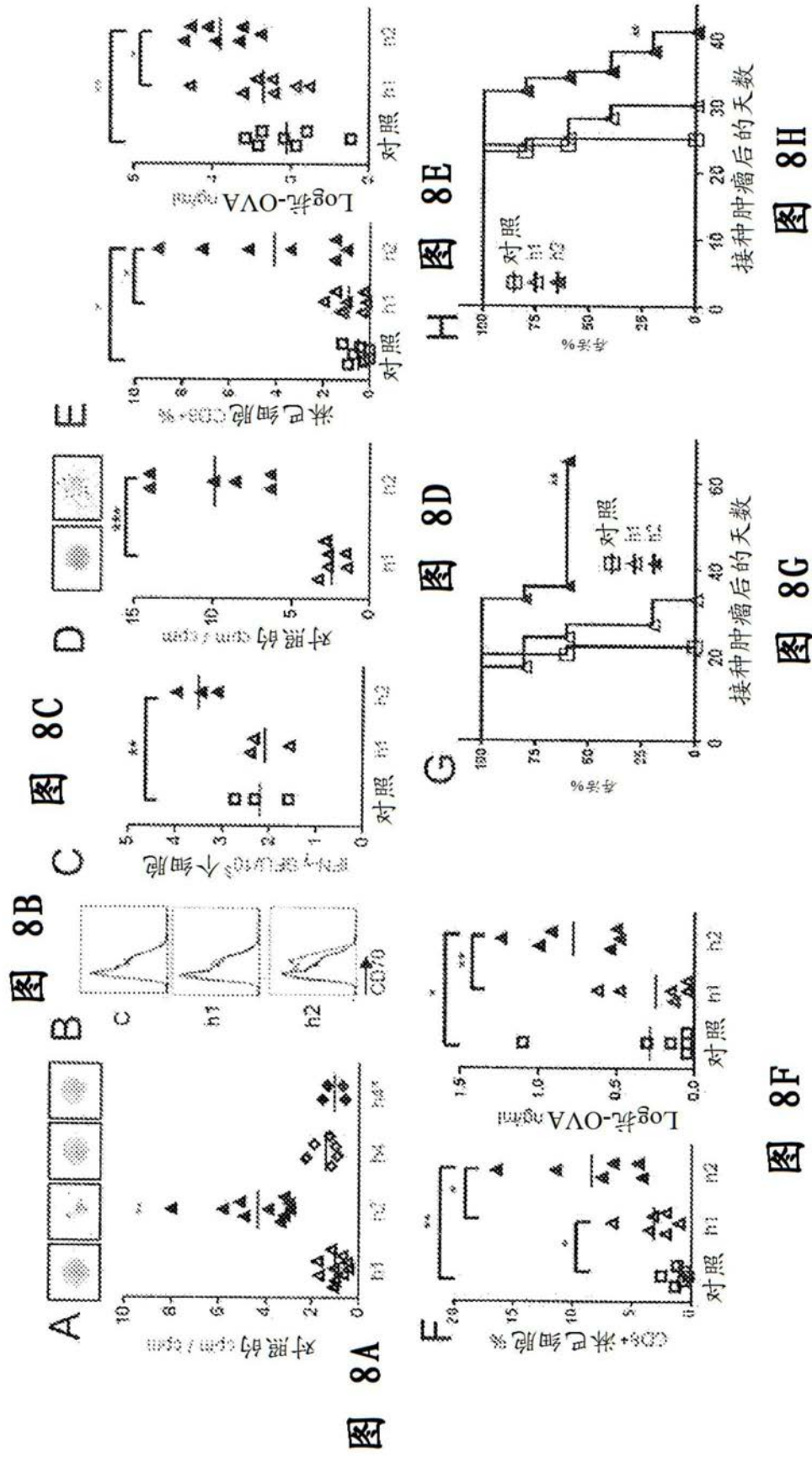


图8

人类同种型和抗-CD40活性

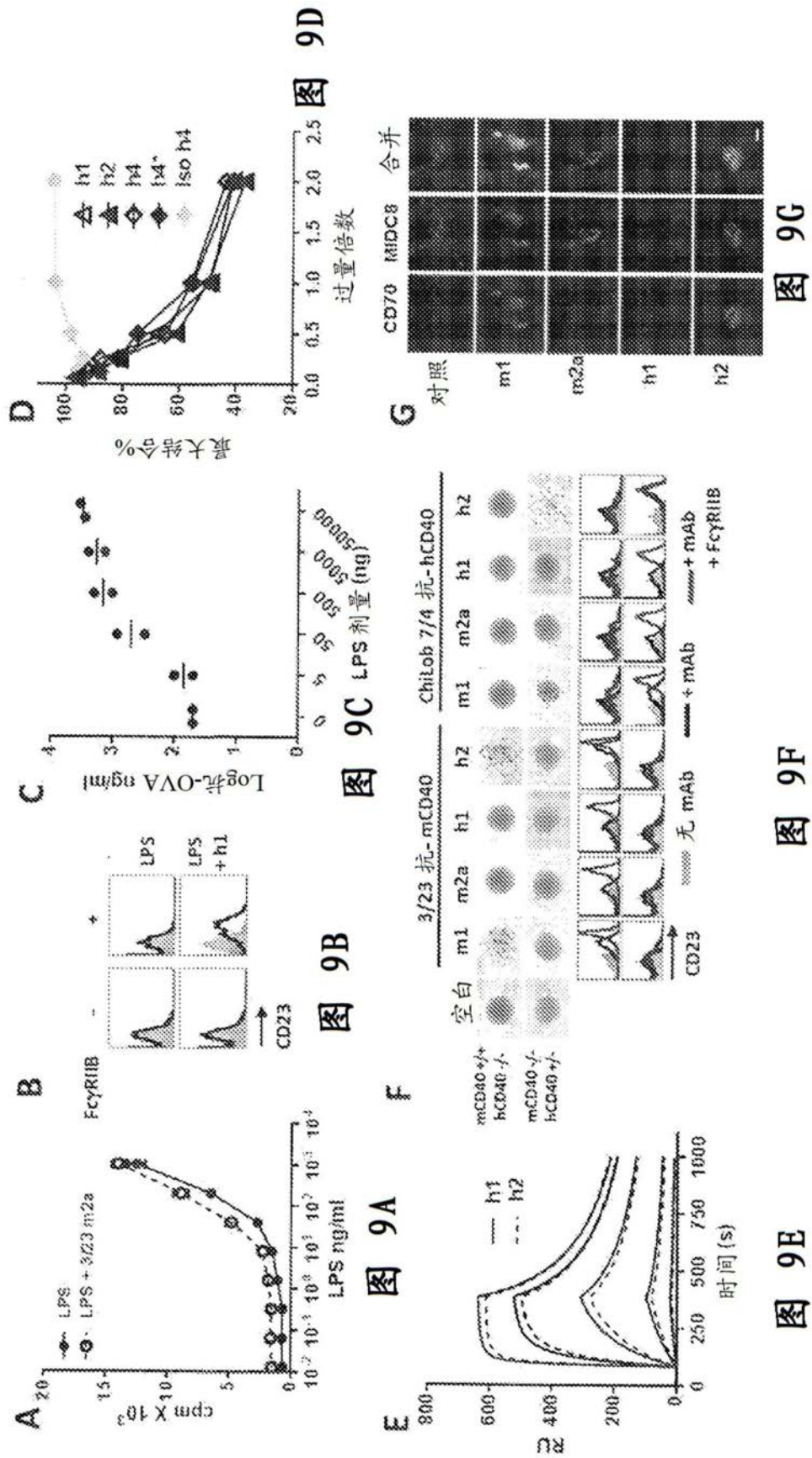


图9

对抗-CD40活性的同种型作用的对照实验

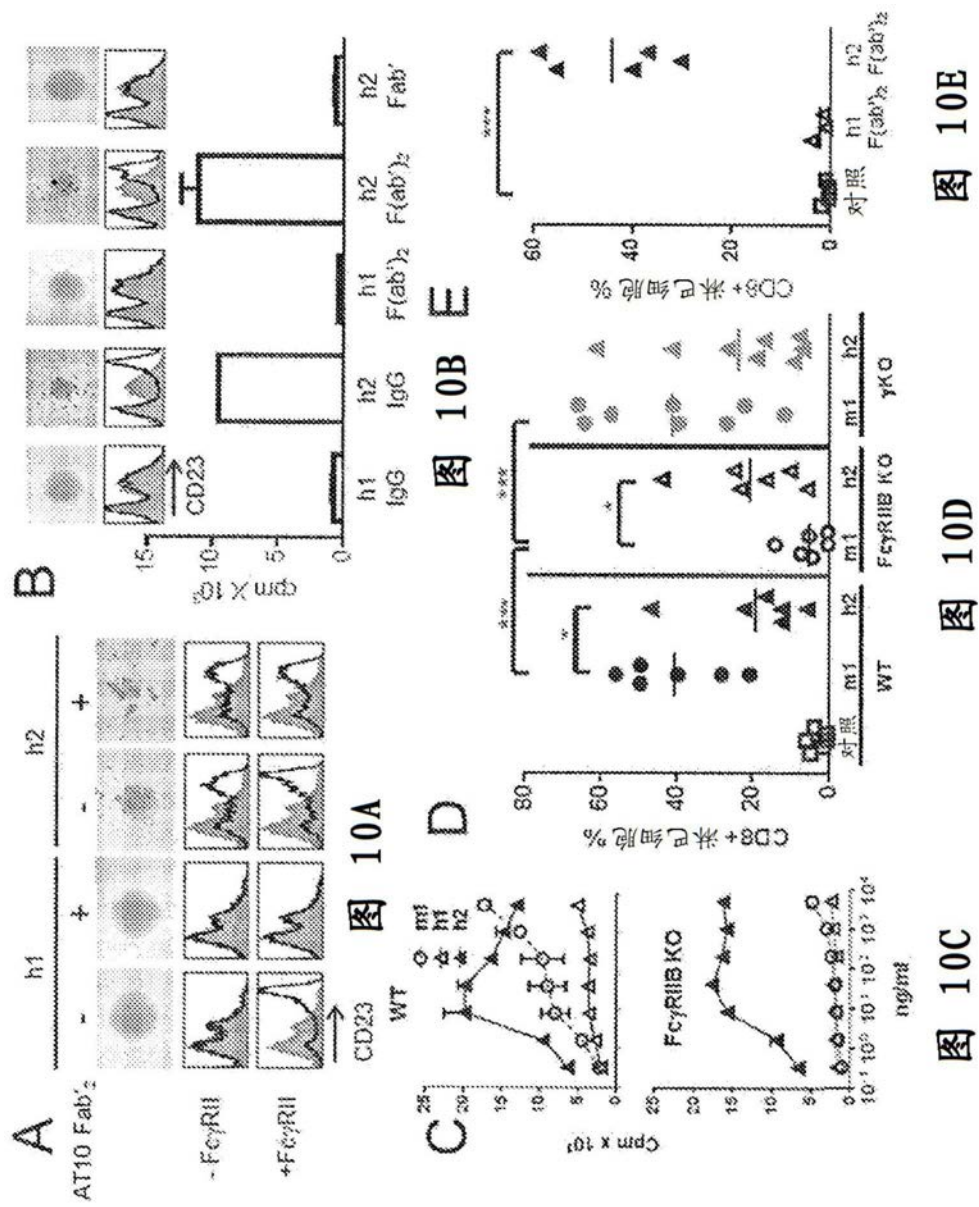


图10

人类IgG2的FcγR-独立性活性

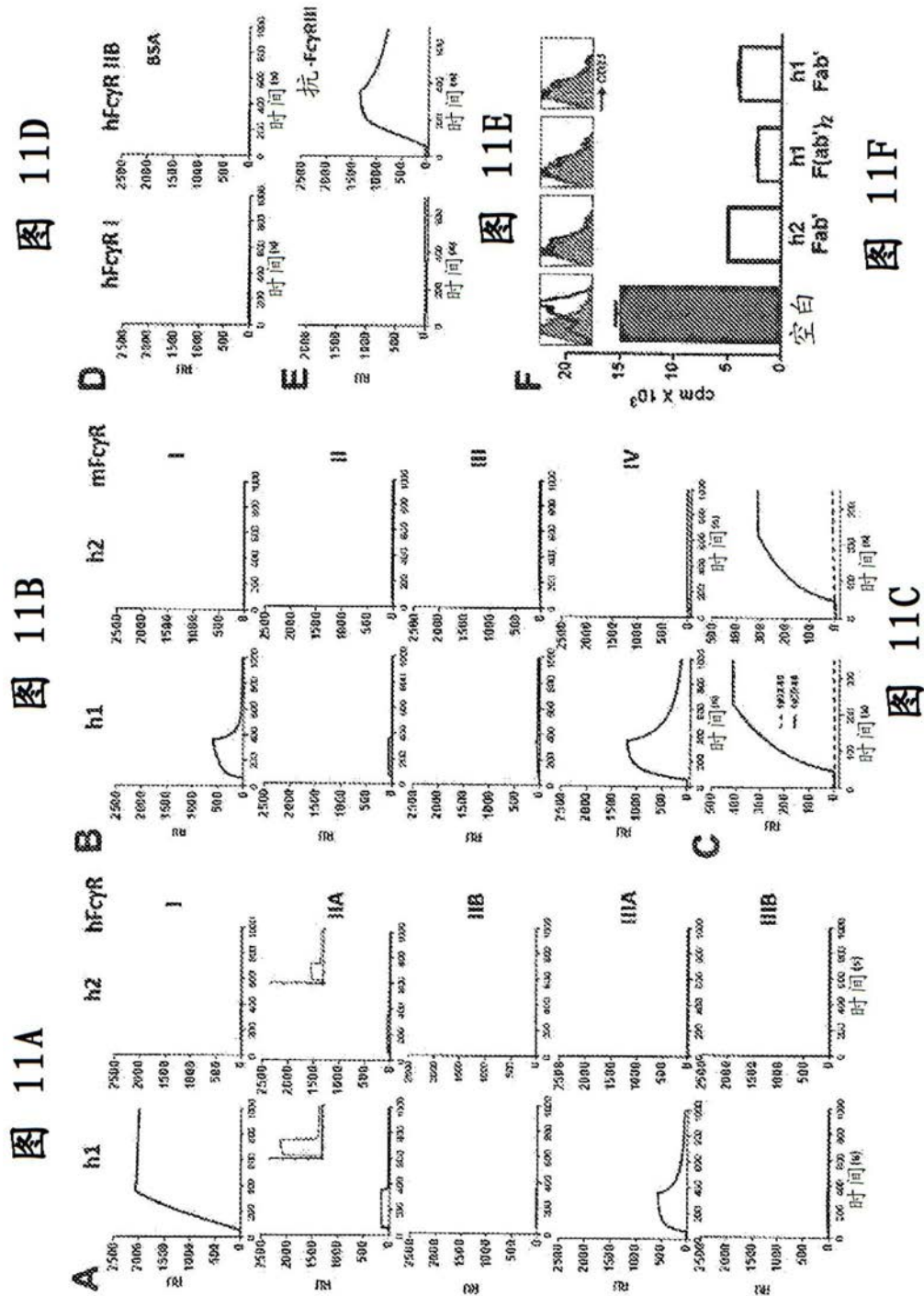


图11

ChiLob 7/4 h2激动活性为FcγR独立性的

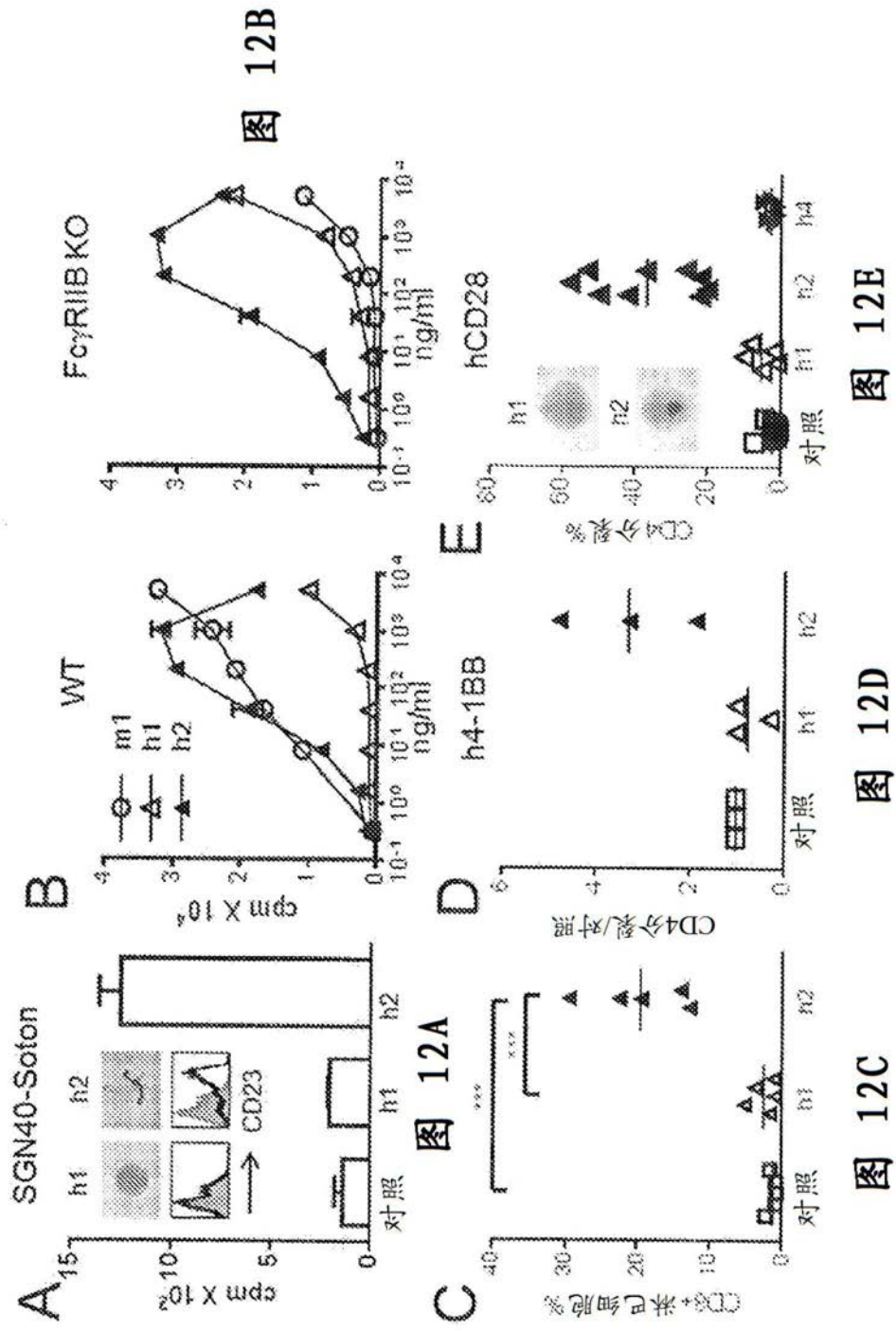


图12

人类IgG2对于多种受体靶标具有激动性

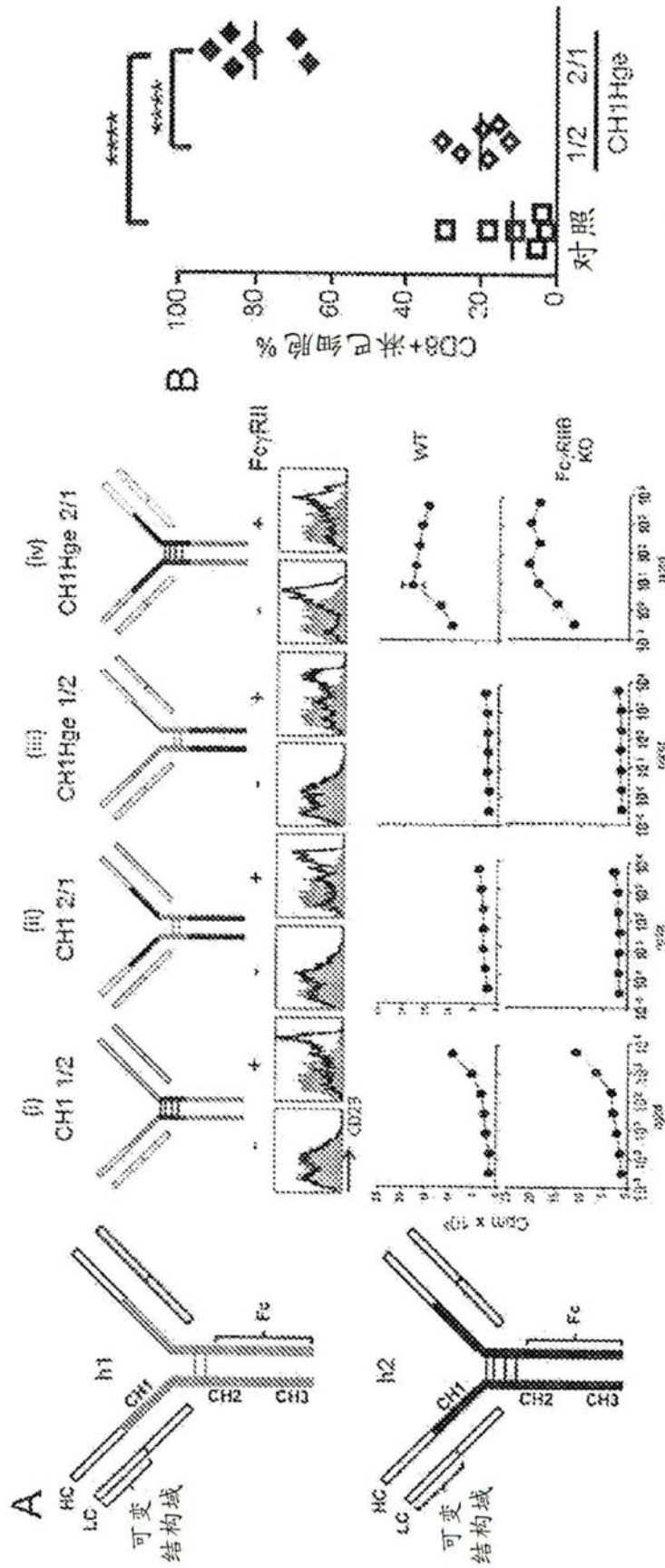
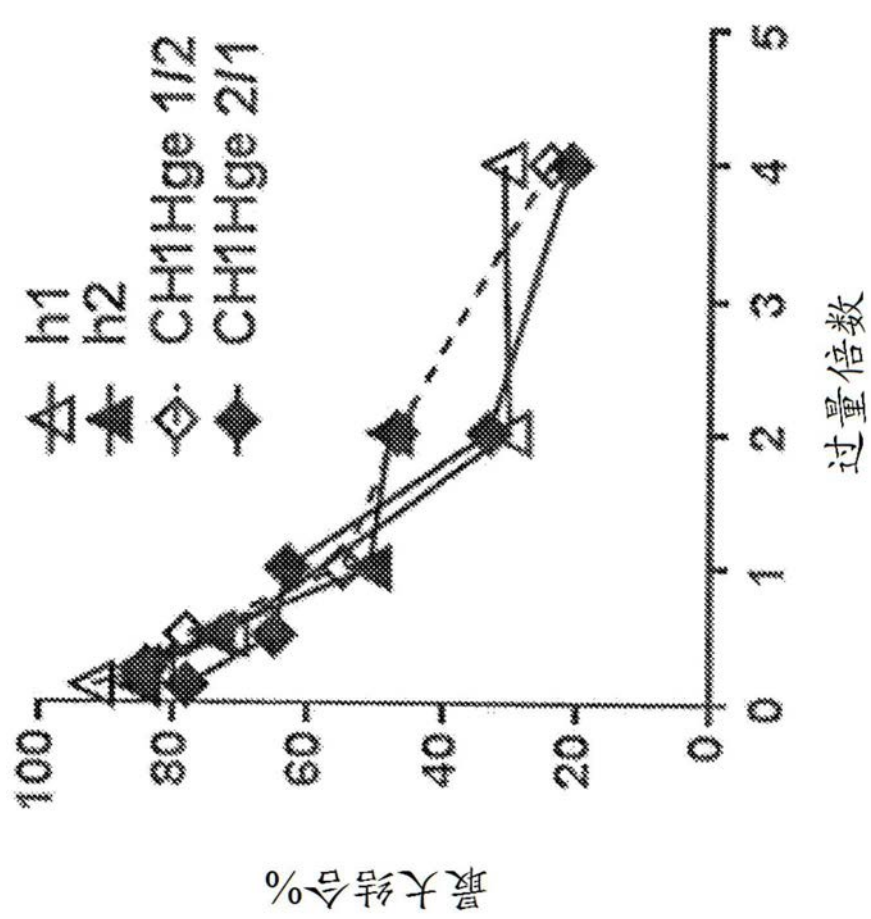


图 13B

图 13A

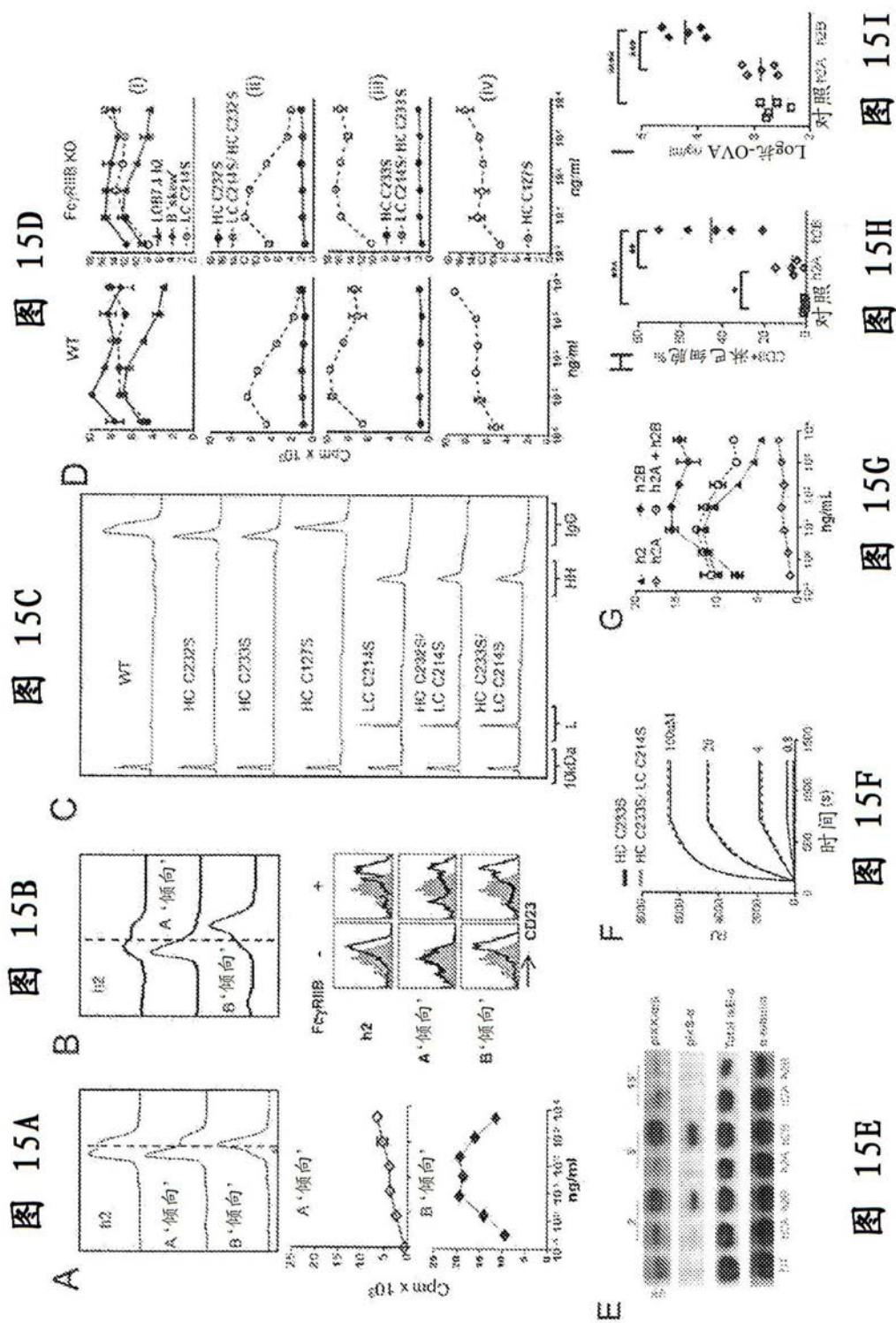
CH1和铰链区赋予ChiLob7/4 h2活性

图13

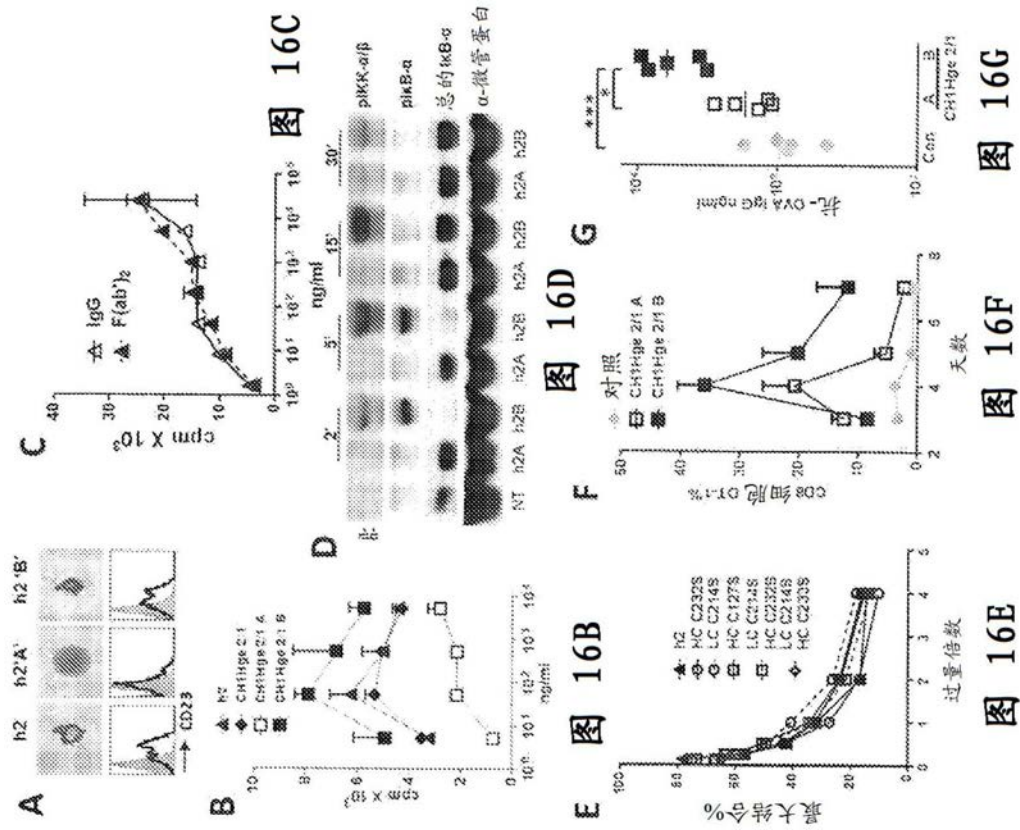


ChiLob 7/4转换突变体类似地结合CD40

图14



诱导生成一系列ChiLob7/4 h2激动形式



ChiLob 7/4 h2A和h2B形式的不同活性

图16

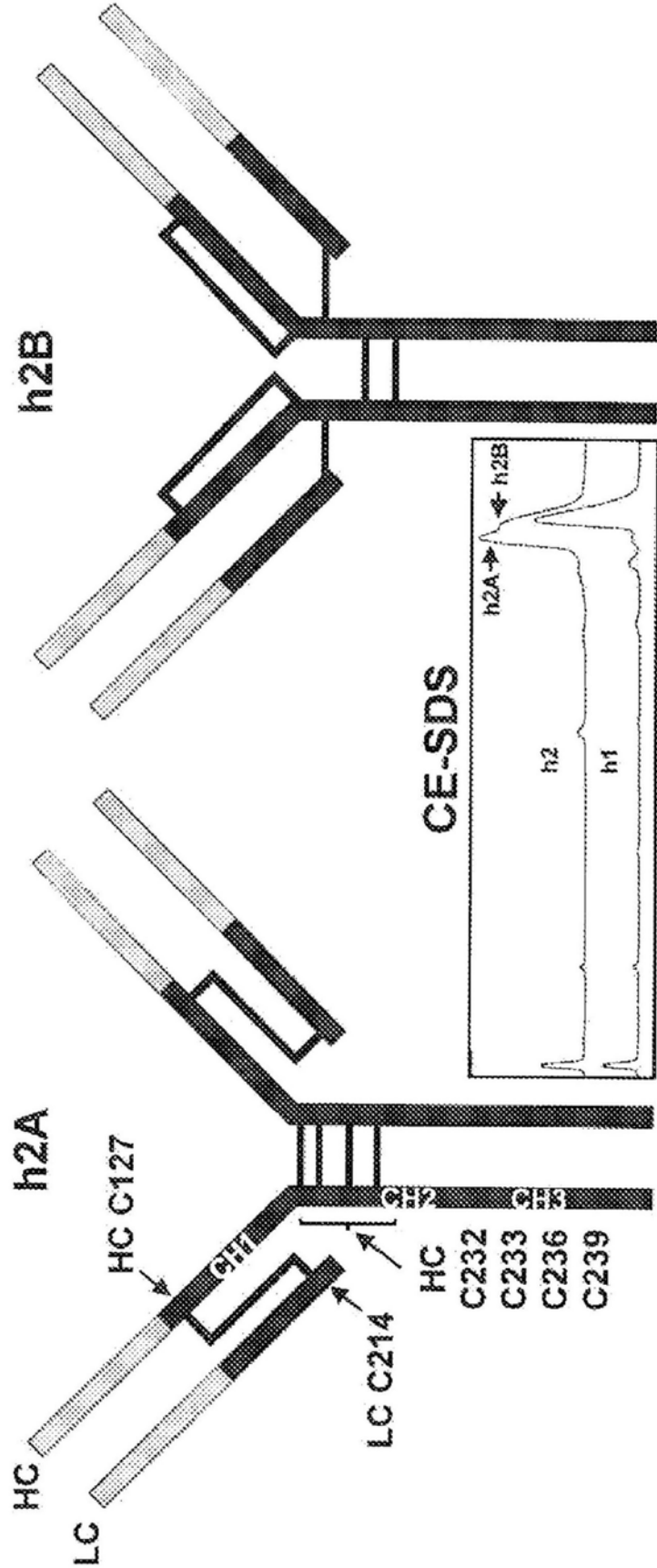


图17

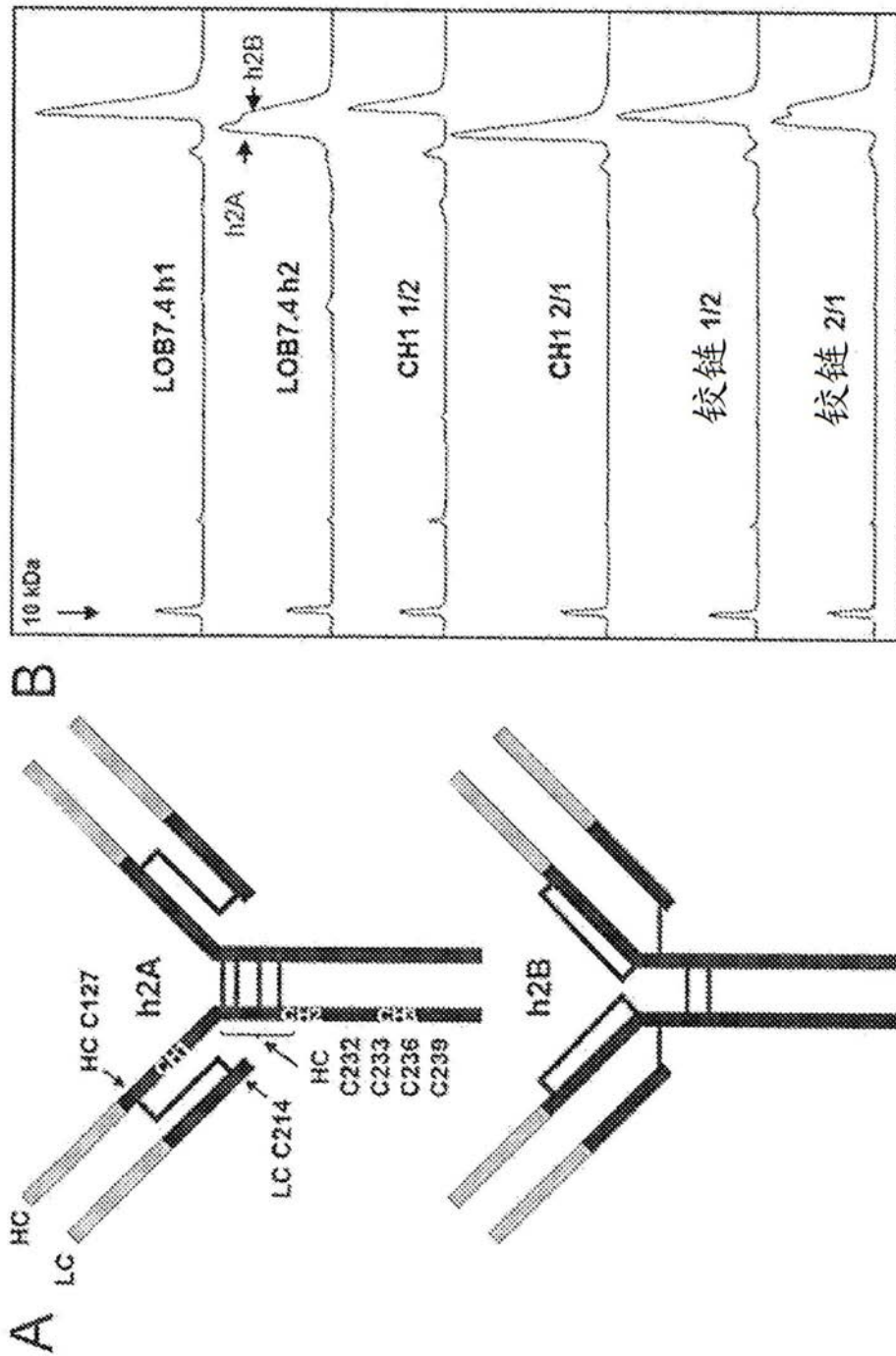


图 18B

图 18A

人类IgG2铰链内的二硫键改组

图18

诱变可将h2‘锁定’成h2A和h2B形式

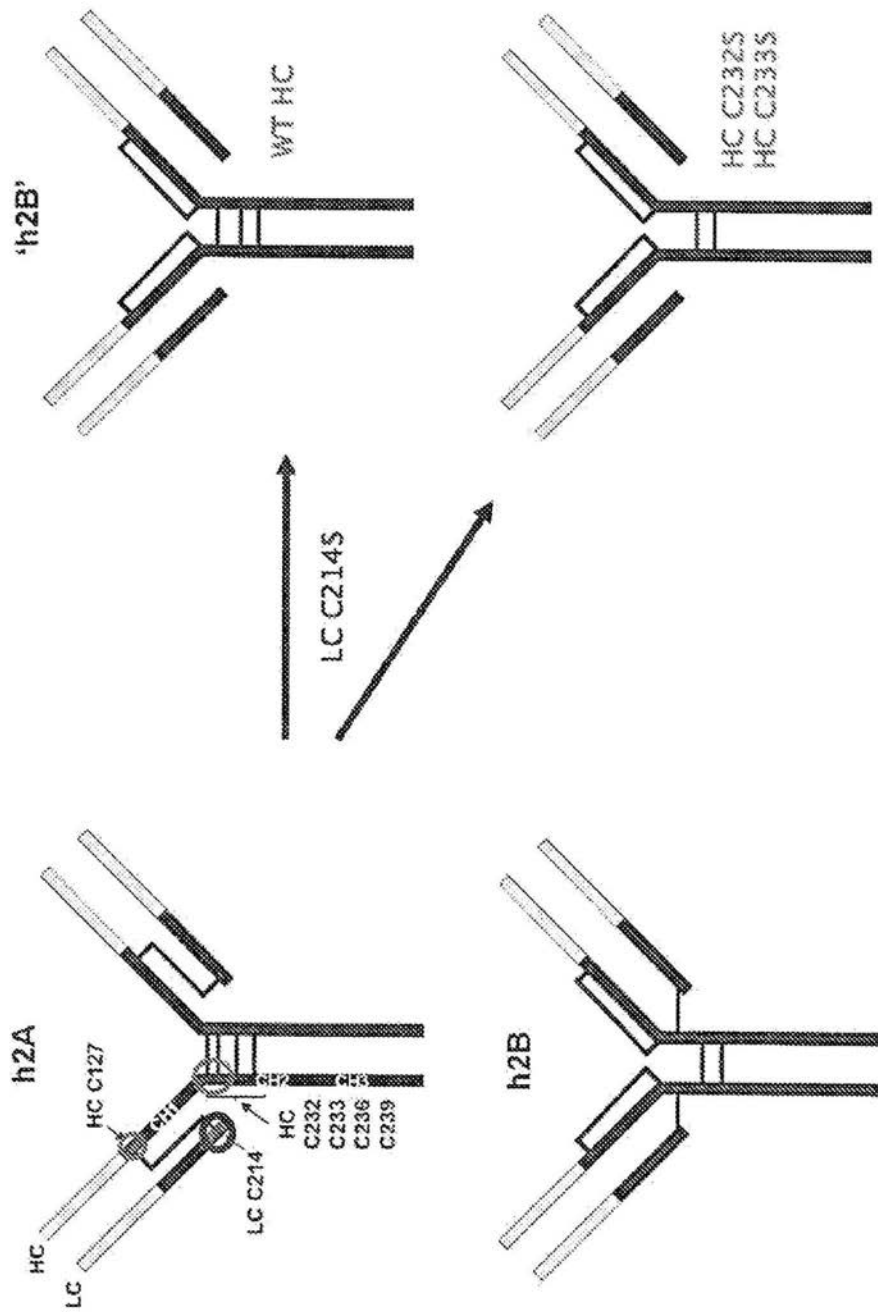


图19

诱变可将h2 ‘锁定’ 成h2A和h2B形式

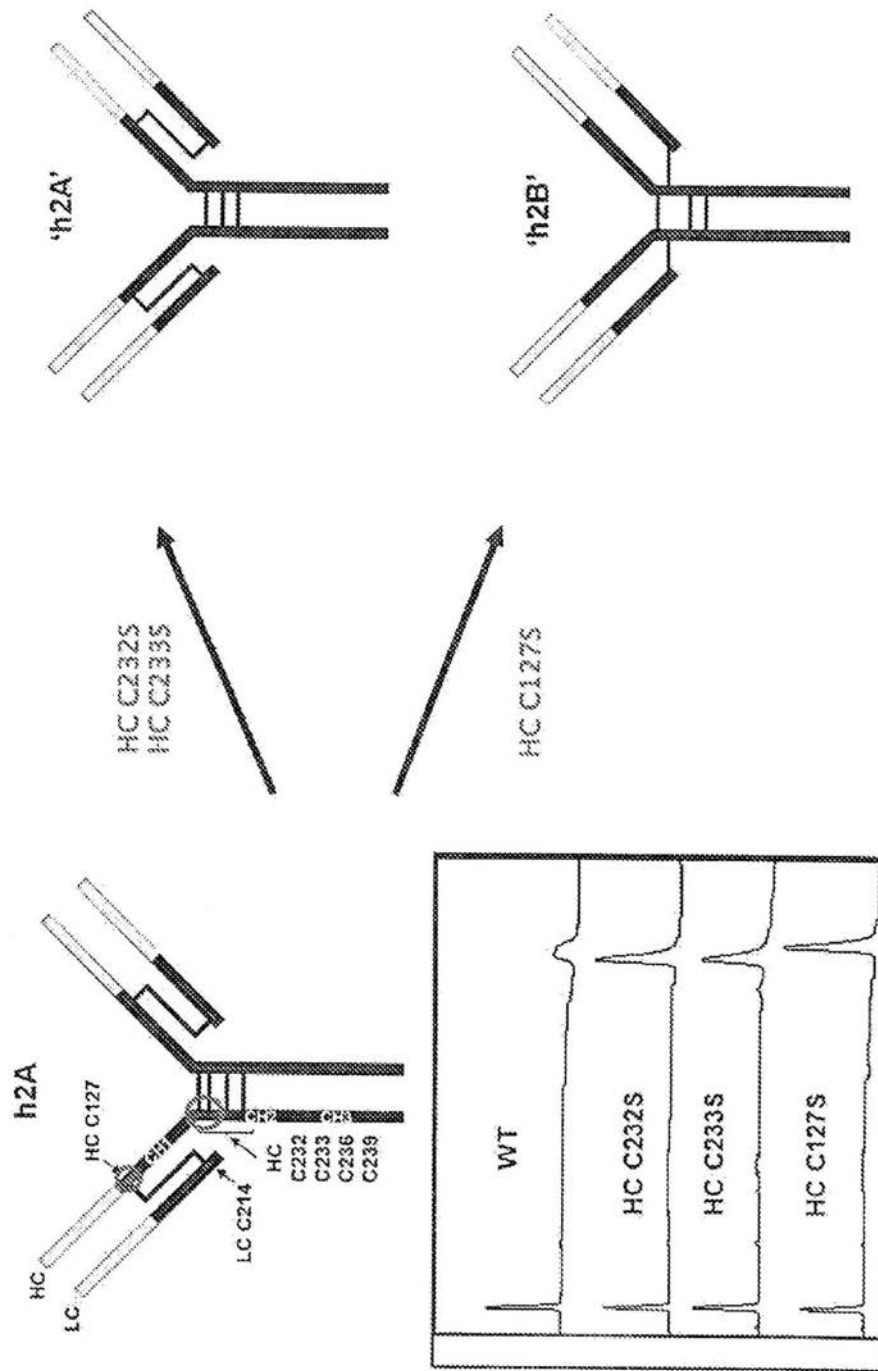


图20

诱变可将h2 ‘锁定’ 成h2A和h2B形式

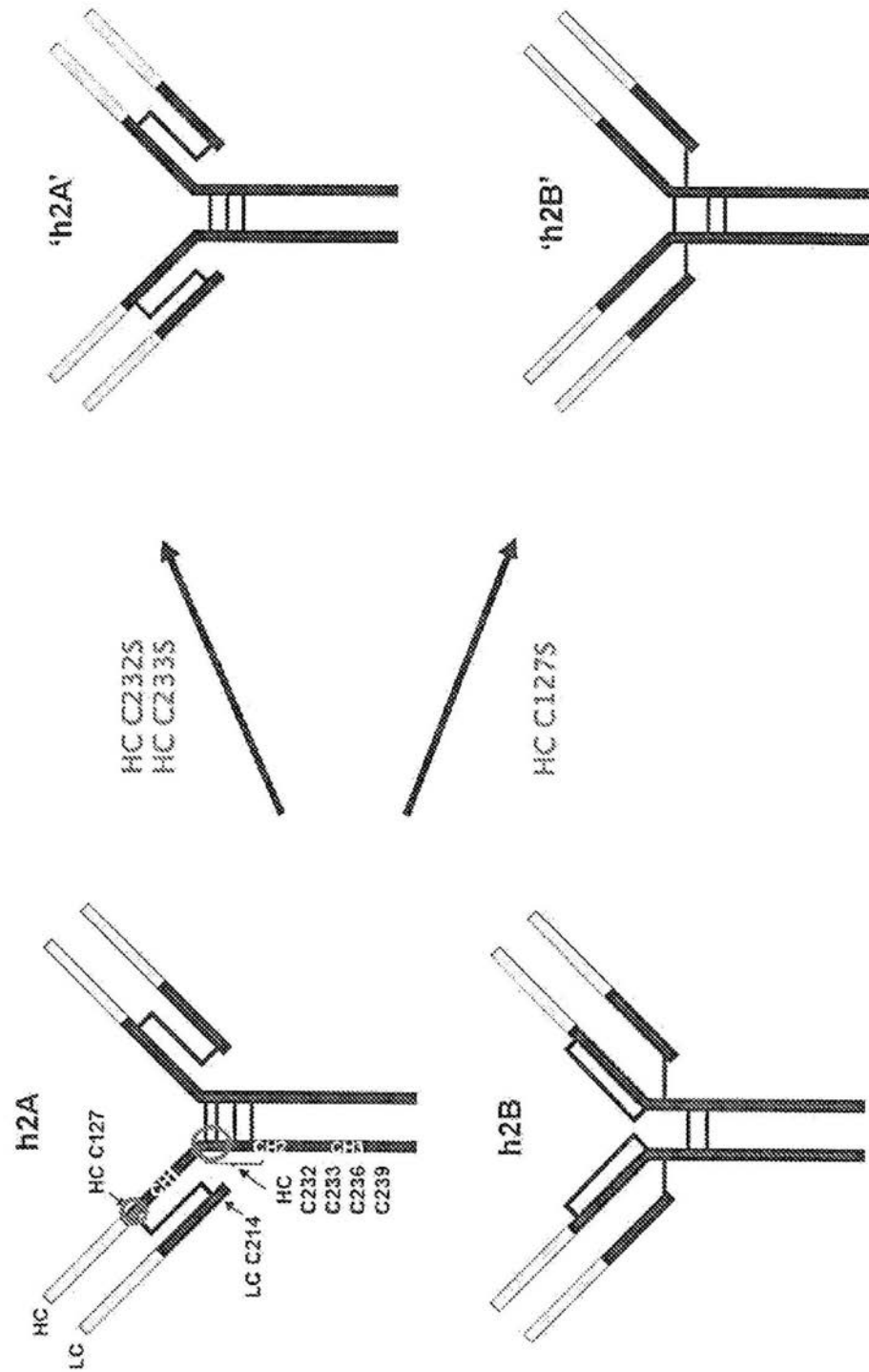


图21

h2的诱变可产生激动剂和拮抗剂

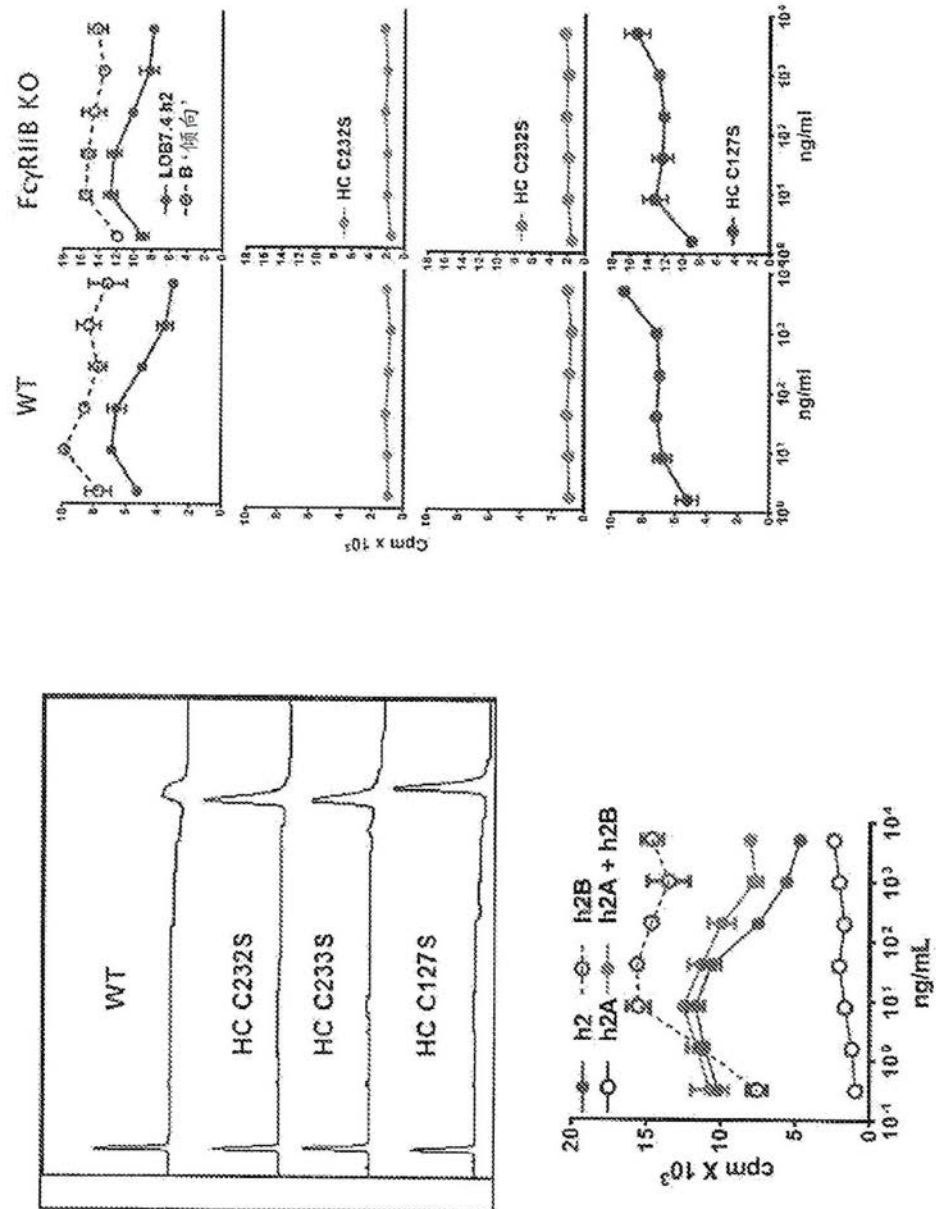


图22

h2的诱变可产生激动剂和拮抗剂

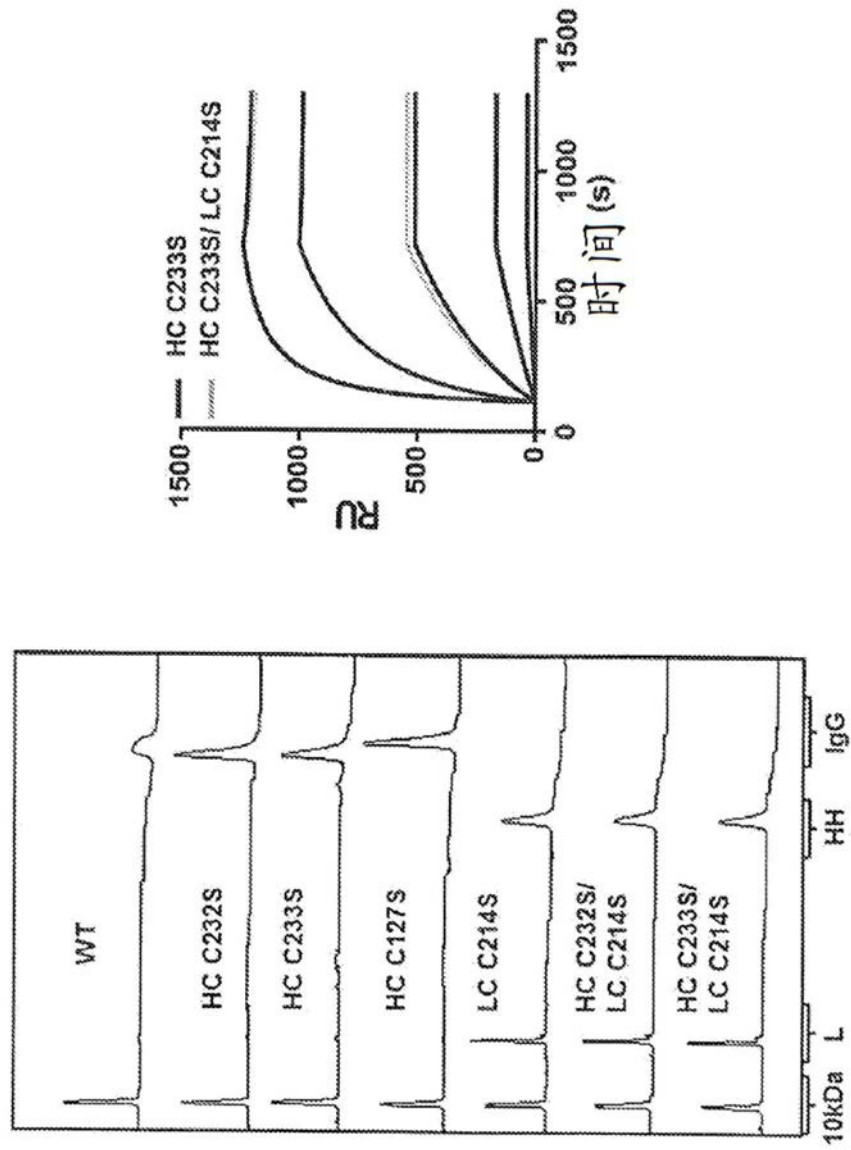


图23

h2的诱变可产生激动剂和拮抗剂

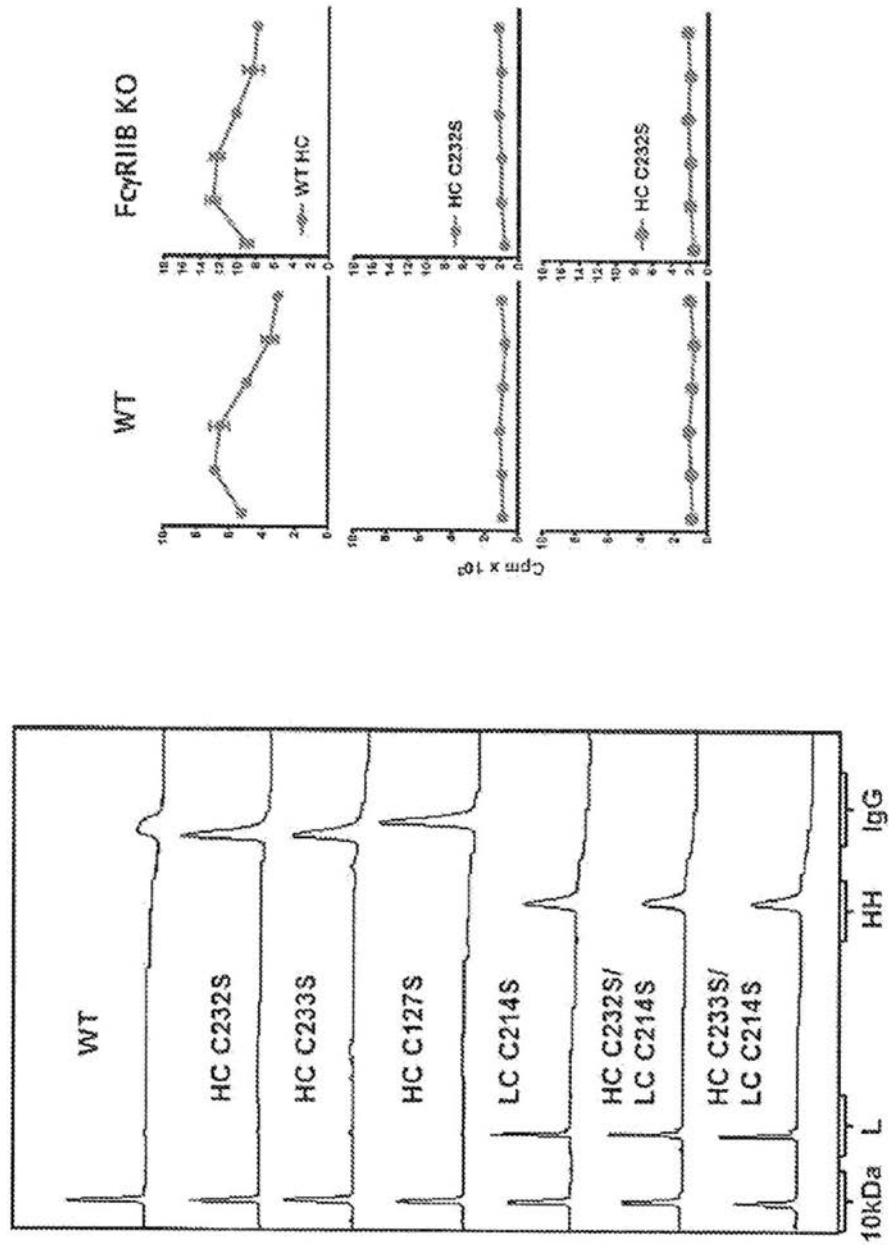


图24

h2的诱变可产生激动剂和拮抗剂

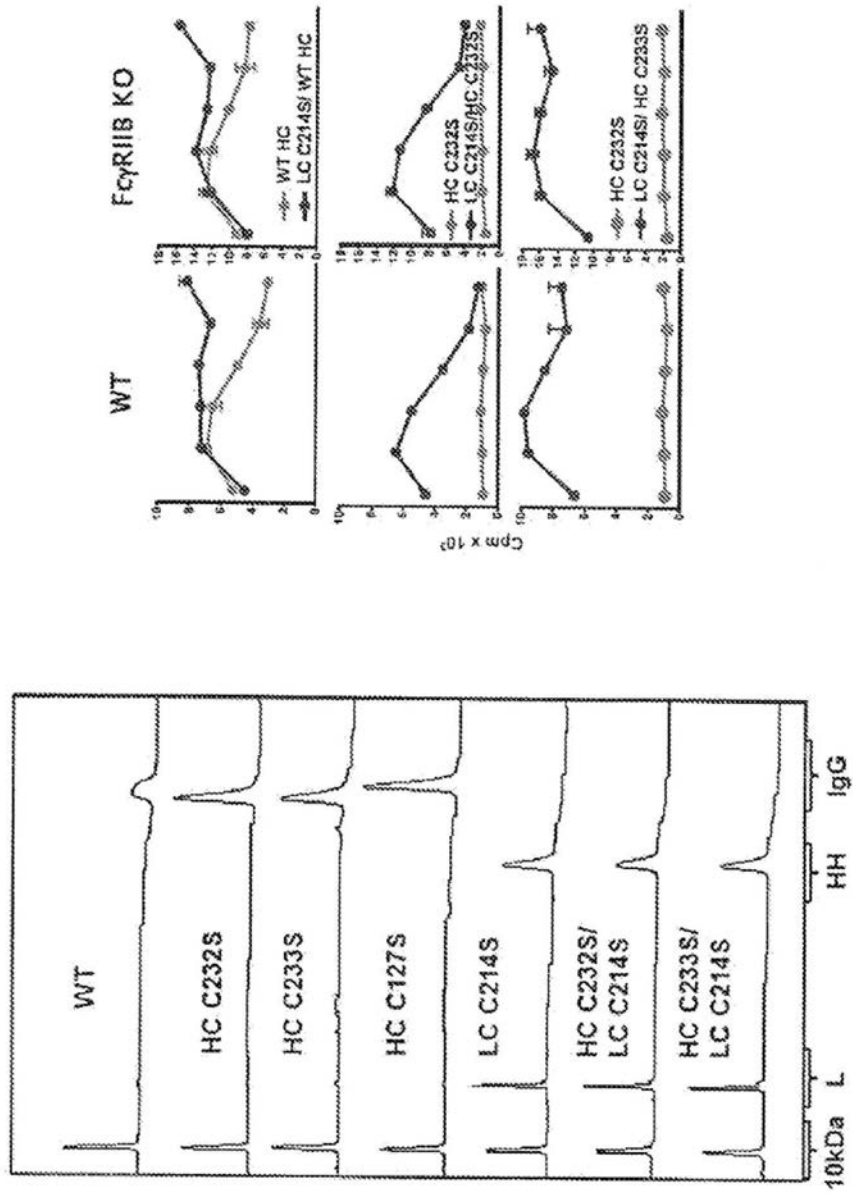


图25

B是激动的而h2A是拮抗的？

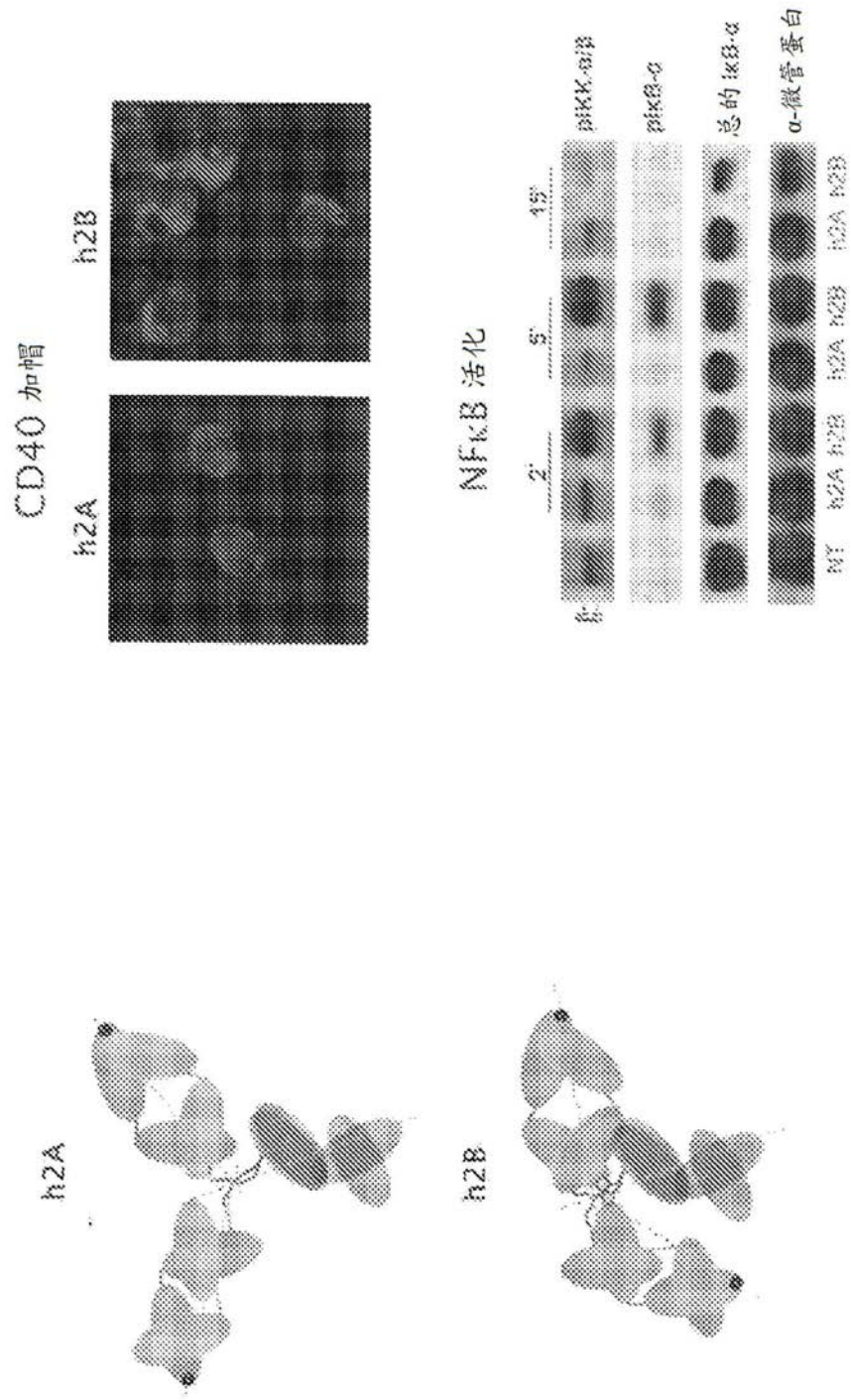


图26

抗-CD40 mAb的免疫刺激特性

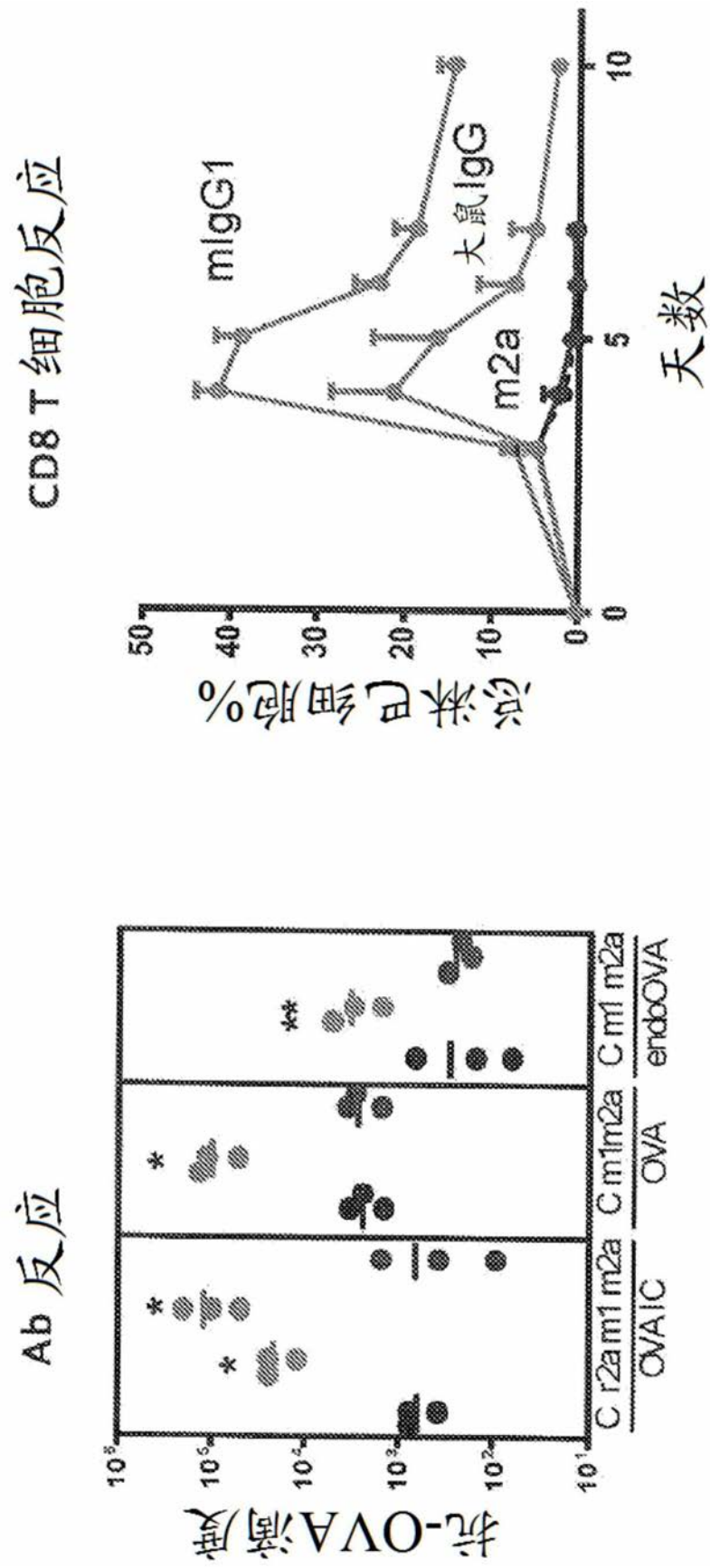


图27

抗-CD40活性的B细胞测定

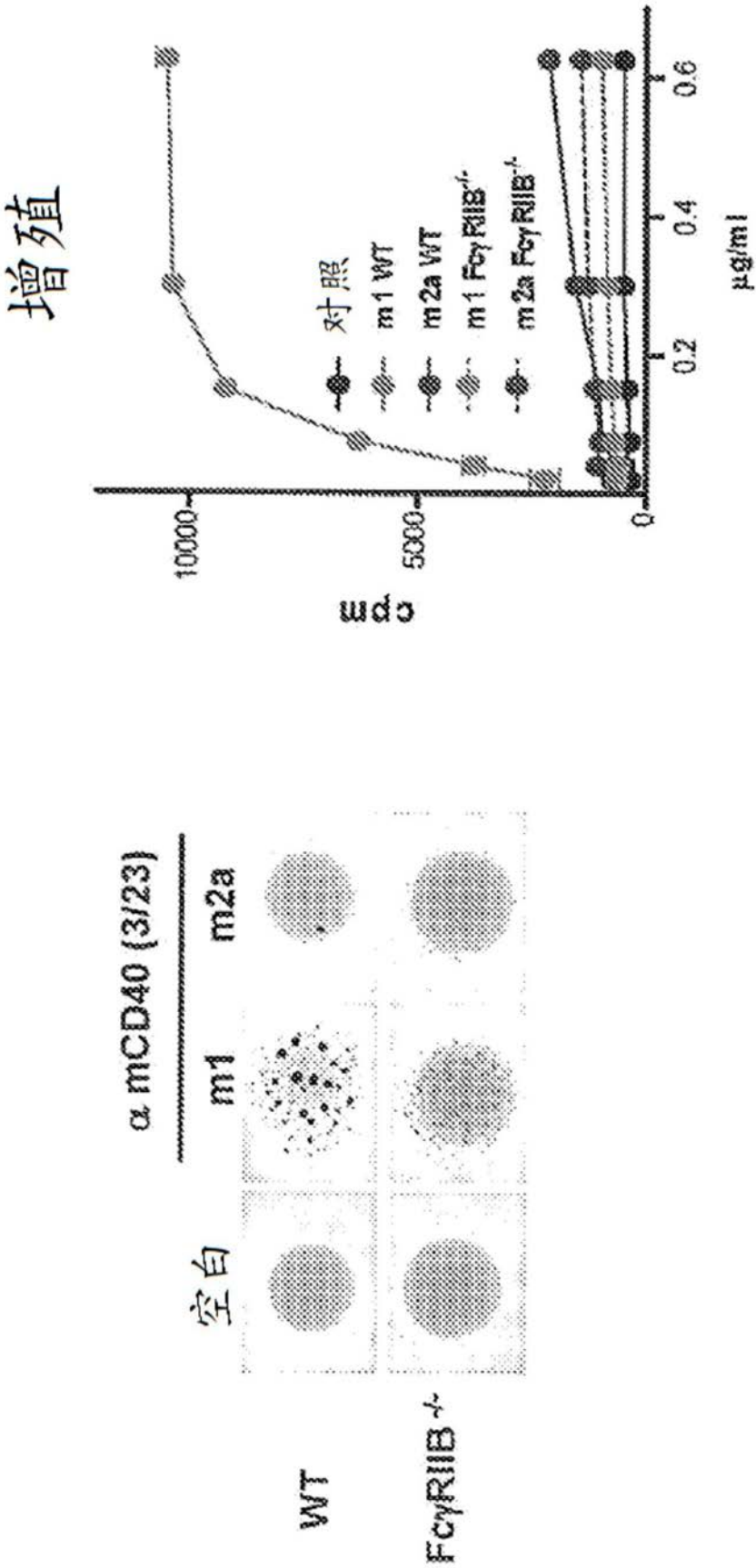


图28