



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119264273 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 07

(21) 申请号 202411461986.2

(22) 申请日 2020.11.27

(30) 优先权数据

19306552.1 2019.12.03 EP

19306573.7 2019.12.04 EP

(62) 分案原申请数据

202080095487.X 2020.11.27

(71) 申请人 埃沃特克国际有限责任公司

地址 德国汉堡

申请人 赛诺菲

(72) 发明人 安托万·阿拉姆

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

专利代理师 陈知宇

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

权利要求书3页 说明书77页

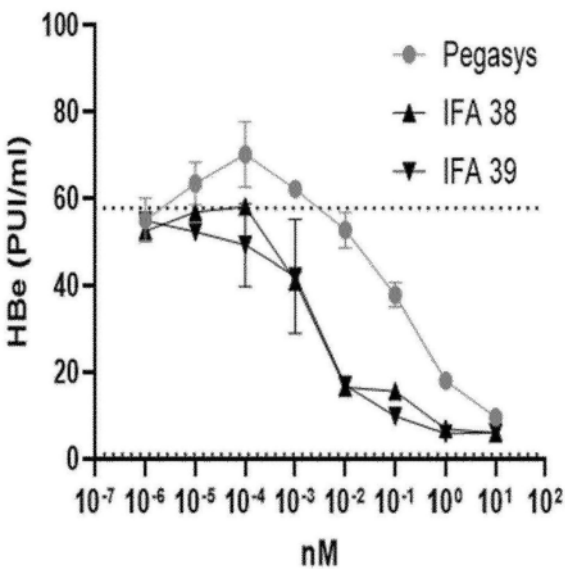
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

干扰素相关抗原结合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明涉及干扰素相关抗原结合蛋白及其用途。具体地,本发明涉及新的干扰素相关抗原结合蛋白以及编码这些干扰素相关抗原结合蛋白的核酸、载体和载体体系。本发明还涉及包含这些干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体和载体体系的组合物。新的干扰素相关抗原结合蛋白提供了优于本领域当前状态的有益改善。因此,本发明还提供了这些干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系和组合物。本发明还提供了包含这些核酸、载体和载体体系的宿主细胞以及使用所述宿主细胞制备根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的方法。



1. 一种干扰素相关抗原结合蛋白, 包括

(I) 激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段, 和

(II) 干扰素 (IFN) 或其功能性片段,

其中, 所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包括

(a) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列具有至少90%的同一性的三个轻链互补决定区 (CDR); 以及与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列具有至少90%的同一性的三个重链CDR; 其中, 根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR; 优选地其中, 根据CDR的Kabat定义或CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

(b) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列相同的三个轻链互补决定区 (CDR); 以及与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列相同的三个重链CDR; 其中, 根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR; 优选地其中, 根据CDR的Kabat定义或CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

(c) 重链或其片段, 所述重链或其片段包含与SEQ ID NO 56具有至少90%的同一性的互补决定区 (CDR) CDRH1、与SEQ ID NO 57具有至少90%的同一性的CDRH2以及与SEQ ID NO 58具有至少90%的同一性的CDRH3; 和轻链或其片段, 所述轻链或其片段包含与SEQ ID NO 52具有至少90%的同一性的CDRL1、与SEQ ID NO 53具有至少90%的同一性的CDRL2以及与SEQ ID NO 54具有至少90%的同一性的CDRL3;

(d) 重链或其片段, 所述重链或其片段包含与SEQ ID NO 56相同的互补决定区 (CDR) CDRH1、与SEQ ID NO 57相同的CDRH2以及与SEQ ID NO 58相同的CDRH3; 和轻链或其片段, 所述轻链或其片段包含与SEQ ID NO 52相同的CDRL1、与SEQ ID NO 53相同的CDRL2以及与SEQ ID NO 54相同的CDRL3;

(e) 轻链可变区 V_L , 所述轻链可变区 V_L 包含SEQ ID NO 51中所示序列或与其具有至少90%的同一性的序列; 和/或重链可变区 V_H , 所述重链可变区 V_H 包含SEQ ID NO 55中所示序列或与其具有至少90%的同一性的序列;

(f) Fab区重链, 所述Fab区重链包含SEQ ID NO 12中所示氨基酸序列或与其具有至少90%的同一性的序列; 或

(g) 轻链 (LC), 所述轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列或与其具有至少90%的同一性的序列; 和/或重链 (HC), 所述重链包含选自由SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49和SEQ ID NO 48组成的组的序列或与它们具有至少90%的同一性的序列。

2. 根据权利要求1所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, IFN或其功能性片段选自由I型IFN、II型IFN和III型IFN或它们的功能性片段组成的组。

3. 根据权利要求2所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, 所述I型IFN或其功能性片段是IFN α 或IFN β 或它们的功能性片段。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, IFN或其功能性片段是IFN α 2a或其功能性片段; 优选地其中, 所述IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列或与其具有至少90%的同一性的序列。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, IFN或其功能性片段是IFN β 或其功能性片段; 优选地其中, 所述IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列或与其具有至少90%的同一性的序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, IFN或其功能性片段被融合至所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链; 优选地其中, 所述IFN或其功能性片段被融合至所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, IFN或其功能性片段被融合至所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链; 优选地其中, 所述IFN或其功能性片段被融合至所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, 所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段与IFN或其功能性片段通过接头彼此融合, 并且优选地其中, 所述接头包括SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或SEQ ID NO 26中所示序列。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 包含选自以下组成的组的序列: SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 30、SEQ ID NO 31、SEQ ID NO 32、SEQ ID NO 33、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 35、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 37、SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42、SEQ ID NO 43、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 45、SEQ ID NO 46和SEQ ID NO 47。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中, 所述干扰素相关抗原结合蛋白是干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的激动性抗-CD40抗体的激动性抗原结合片段, 所述干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的激动性抗-CD40抗体的激动性抗原结合片段包含表8、特别地表8A或表8B、更特别地表8A中公开的序列组合之一。

11. 一种编码根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的核酸, 优选地其中, 所述核酸还编码分泌性信号肽。

12. 一种载体, 包含根据权利要求11所述的核酸。

13. 一种载体体系, 包括

(I) 第一载体, 所述第一载体包含编码IFN或其功能性片段的核酸, 所述IFN或其功能性片段融合至根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链; 和第二载体, 所述第二载体包含编码根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的核酸; 或

(II) 第一载体, 所述第一载体包含编码IFN或其功能性片段的核酸, 所述IFN或其功能性片段融合至根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链; 和第二载体, 所述第二载体包含编码根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的核酸。

14. 一种组合物、优选药物组合物, 包含根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白、根据权利要求11所述的核酸、根据权利要求12所述的载体或根据权利要求13所述的载体体系。

15. 一种宿主细胞, 包含根据权利要求11所述的核酸、根据权利要求12所述的载体或根据权利要求13所述的载体体系。

16. 一种制备根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白的方法, 包括培养根据权利要求14所述的宿主细胞和回收所述干扰素相关抗原结合蛋白。

17. 根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白、根据权利要求11所述的核酸、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的载体体系或根据权利要求14所述的组合物, 用作药物。

18. 根据权利要求1至10中任一项所述的干扰素相关抗原结合蛋白、根据权利要求11所述的核酸、根据权利要求12所述的载体、根据权利要求13所述的载体体系或根据权利要求14所述的组合物, 用于治疗受试者中的乙型肝炎病毒 (HBV) 感染和/或用于减少受试者中的一种或多种HBV感染症状。

干扰素相关抗原结合蛋白及其用途

[0001] 本申请是申请日为2020年11月27日的题为“干扰素相关抗原结合蛋白及其用途”的中国专利申请号202080095487.X的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及基于激动性 (agonistic) 抗CD40抗体CP870,893的新的干扰素相关抗原结合蛋白以及编码这些干扰素相关抗原结合蛋白的核酸、载体和载体体系。本发明还涉及包含这些干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体和载体体系的组合物。新的干扰素相关抗原结合蛋白提供了优于本领域当前状态的有益改善,例如,其中它们有效破坏病毒复制并借此减少HBV病毒载量。因此,本发明还提供了这些干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系和组合物,例如,在治疗受试者中乙型肝炎病毒 (HBV) 感染和/或减少一种或多种HBV感染症状中的医学用途。本发明还提供了包含这些核酸、载体和载体体系的宿主细胞以及使用所述宿主细胞制备根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的方法。

背景技术

[0003] HBV感染全世界超过3亿人并且是造成肝脏疾病和肝癌的常见原因 (Liang (2009) Hepatology 49:S13)。HBV是具有类似于反转录病毒的不常见特征的小DNA病毒,其通过RNA中间体 (前基因组RNA, pgRNA) 复制并且可以整合到宿主基因组中。HBV复制循环的独特特征赋予病毒在感染细胞中持续的独特能力。HBV感染导致了从急性肝炎 (包括暴发性肝衰竭) 到慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的一系列广谱肝脏疾病。急性HBV感染可以是无症状的或者呈现有症状的急性肝炎。90-95%的感染HBV的儿童和5-10%的感染HBV的成年人不能清除病毒并且成为慢性感染。多位慢性感染者具有轻微肝脏疾病,其几乎没有长期发病或死亡。患有慢性HBV感染的其他个体出现活动性疾病,其可以发展成肝硬化和肝癌。这些患者需要小心监测和批准的治疗干预。

[0004] 需要通过调节细胞中HBV感染用于治疗HBV感染的新方法。具体地,需要有效破坏病毒复制,减少HBV感染细胞的HBV病毒载量,减少HBV感染细胞中共价闭环HBV DNA的转录和/或减少HBV感染细胞中前基因组HBV RNA的量的方法。

发明内容

[0005] 本发明涉及包含 (I) 激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和 (II) 干扰素 (IFN) 或其功能性片段的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含

[0006] (a) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列具有至少90%的同一性的3个轻链互补决定区 (CDR); 和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列具有至少90%的同一性的3个重链CDR; 其中根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义 (contact definition) 来定义每个CDR; 优选地其中根据CDR的Kabat定义或者CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

[0007] (b) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列相同的3个轻链互补决定区(CDR);和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列相同的3个重链CDR;其中根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR;优选地其中根据CDR的Kabat定义或者CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

[0008] (c) 重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56具有至少90%的同一性的互补决定区(CDR)CDRH1、与SEQ ID NO 57具有至少90%的同一性CDRH2和与SEQ ID NO 58具有至少90%的同一性的CDRH3;和轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52具有至少90%的同一性的CDRL1、与SEQ ID NO 53具有至少90%的同一性的CDRL2和与SEQ ID NO 54具有至少90%的同一性的CDRL3;

[0009] (d) 重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56相同的互补决定区(CDR)CDRH1、与SEQ ID NO 57相同的CDRH2和与SEQ ID NO 58相同的CDRH3;和轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52相同的CDRL1、与SEQ ID NO 53相同的CDRL2和与SEQ ID NO 54相同的CDRL3;

[0010] (e) 包含SEQ ID NO 51中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的轻链可变区 V_L ;和/或包含SEQ ID NO 55中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的重链可变区 V_H ;

[0011] (f) 包含SEQ ID NO 12中所示氨基酸序列或与之具有至少90%的同一性的序列的Fab区重链;或者

[0012] (g) 包含SEQ ID NO 3中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的轻链(LC);和/或包含选自SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49和SEQ ID NO 48组成的组的序列或与之具有至少90%的同一性的序列的重链(HC)。

[0013] 根据本发明的这个方面,IFN或其功能性片段选自I型IFN、II型IFN和III型IFN或其功能性片段组成的组。在优选的实施方式中,I型IFN或其功能性片段是IFN α 或IFN β 或其功能性片段。

[0014] 根据一个实施方式,IFN或其功能性片段是IFN α 2a或其功能性片段。优选地,IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0015] 根据另一个实施方式,IFN或其功能性片段是IFN β 或其功能性片段。在优选的实施方式中,IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0016] 根据其它实施方式,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。优选地,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

[0017] 根据另一个实施方式,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在优选的实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

[0018] 根据另一个实施方式,将激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和IFN或其功能性片段通过接头彼此融合。在优选的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。

[0019] 根据另一个实施方式,干扰素相关抗原结合蛋白包含选自下列组成的组的序列:SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 30、SEQ ID NO 31、SEQ ID NO 32、SEQ ID NO 33、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 35、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 37、SEQ ID NO 38、SEQ ID NO

39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42、SEQ ID NO 43、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 45、SEQ ID NO 46和SEQ ID NO 47。

[0020] 根据其它实施方式,干扰素相关抗原结合蛋白是包含表8中所公开的序列组合之一的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0021] 根据另一个方面,本发明涉及编码根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的核酸。在优选的实施方式中,核酸还编码分泌性信号肽。

[0022] 根据其它方面,本发明涉及包含所述核酸的载体。

[0023] 根据另一个方面,本发明涉及载体体系,其包含

[0024] (I) 第一载体,其包含编码融合至本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的核酸;和第二载体,其包含编码本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的核酸;或者

[0025] (II) 第一载体,其包含编码融合至本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的核酸;和第二载体,其包含编码本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的核酸。

[0026] 根据另一个方面,本发明涉及组合物,优选地药物组合物,其包含根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体或载体体系。

[0027] 根据其它方面,本发明涉及包含根据本发明的核酸、载体或载体体系的宿主细胞。根据另一个方面,本发明涉及制备根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的方法,其包括培养所述宿主细胞和回收(recover)所述干扰素相关抗原结合蛋白。

[0028] 根据另一个方面,本发明涉及根据本发明用作药物的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物。

[0029] 根据另一个方面,本发明涉及用于治疗受试者中乙型肝炎病毒(HBV)感染和/或减少一种或多种HBV感染症状的根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物。

[0030] 此外:

[0031] 表9a-表9b:这些表总结了在得自健康志愿者的全血细胞(WBC)体外刺激之后获得的数据。对来自4位不同供体的WBC测试每个IFA。WBC保持未处理(NT),用LPS(10ng/mL)或用IFA(1 μ g/mL)处理24h。收集上清液并使用MSD u-Plex试剂盒对人细胞因子进行细胞因子释放定量。结果代表来自每位供体的两个独立刺激的平均值并且以pg/mL表示(nd:未检出)。

[0032] 表10A:PK报告总结:向雄性CD1瑞士(Swiss)小鼠单次静脉内施用0.5mg/kg后的CP870,893、IFA27、IFA29和IFA30的PK参数。在7-天实验中研究了CP870,893的PK参数并且在10-天实验中研究了IFA27、IFA29和IFA30的那些PK参数(使用2种不同的ELISA方法进行IFA27定量)。

[0033] 表10B:向雄性CD1瑞士小鼠单次静脉内推注施用0.5mg/kg后的CP870,893、Pegasys和3种不同的IFA(IFA25、IFA26和IFA28)的PK参数。在21-天实验中研究了CP870,893和IFA25、IFA26、IFA28和Pegasys的PK参数(使用2种不同的ELISA方法进行IFA25定量)。

附图说明

[0034] 图1:该示意图显示了示例性干扰素相关抗原结合蛋白形式(format)。干扰素相关抗原结合蛋白是干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。IFN通过接头结合至抗体或其抗原结合片段上的不同位置:轻链(LC)或重链(HC)的N末端或C末端部分。具体地,IFN选自I型、II型和III型干扰素家族。

[0035] 图2A显示了受pCMV启动子控制的编码SEQ ID NO 32的pcDNA3.1质粒的示例性图谱(map)。右侧还显示了编码SEQ ID NO 32(SEQ ID NO 59)的核酸序列。斜体:信号肽序列;黑色:CP870,893重链编码序列;下划线:HL接头编码序列;加粗:IFN β 编码序列。

[0036] 图2B显示了还原条件下一些IFA的SDS PAGE的实例,其中在重链或轻链融合IFN α 或IFN β 。左侧还显示了亲代CP870,893的迁移。

[0037] 图3A-图3B图示地显示了一些具有IFN β 融合的IFA分子对HEK-Blue™CD40L细胞中激活CD40-介导的NF κ B通路报告测定的剂量依赖性影响。图3A显示了对于具有融合至重链(HC)的C末端部分的IFN β 的IFA的抗-CD40活性的实例。图3B显示了对于具有融合至LC(IFA34)或HC(IFA36)的N末端部分的IFN β 的IFA和具有C末端部分上的相应融合的IFA(IFA35和IFA37)的抗-CD40活性的实例。后一组IFA的纯化得率极低,因此为了测试它们的活性,使用了来自HEK转染的细胞的上清液并依次稀释以评价对HEK-Blue™CD40L细胞的抗-CD40活性。

[0038] 图3C-图3D图示地显示了一些具有IFN β 融合的IFA分子对HEK-Blue-IFN- α/β 报告细胞中激活I型IFN-通路的剂量依赖性影响。图3C显示了对于具有融合至HC的C末端部分的IFN β 的IFA的IFN活性的实例。图3D显示了对于具有融合至LC(IFA34)或HC(IFA36)的N末端部分的IFN β 的IFA和具有C末端部分上的相应融合的IFA(IFA35和IFA37)的IFN活性的实例。使用了与图3B中相同的来自HEK转染细胞的上清液并依次稀释以评价IFN活性。将亲代抗体CP870,893用作阴性对照并且将重组人IFN β 用作阳性对照。NS:未刺激的。

[0039] 图4A图示地显示了一些具有IFN α 融合的IFA分子对HEK-Blue™CD40L细胞中激活CD40-介导的NF κ B通路报告测定的剂量影响。

[0040] 图4B图示地显示了一些具有IFN α 融合的IFA分子对HEK-Blue-IFN- α/β 报告细胞中激活I型IFN-介导的通路的剂量影响。在右下角的插图中显示了Pegasys活性。

[0041] 图4C图示地显示了在HC(IFA38)或LC(IFA39)上具有IFN α 融合和HL接头的IFA分子对HEK-Blue™CD40L细胞中激活CD40-介导的NF κ B通路报告测定的影响。

[0042] 图4D图示地显示了IFA38和IFA39对HEK-Blue-IFN α/β 报告细胞中激活I型IFN-通路的影响。

[0043] 图5显示了IFN β 基IFA(IFN β based IFA)以剂量依赖性方式对感染HBV的原代肝细胞的HBeAg释放的影响。IFA1、IFA12:IFN β 分别通过HL或RL接头向LC的C-末端的融合。IFA2和IFA13:IFN β _C17S分别通过HL或RL接头向LC的C-末端的融合。

[0044] 图6A显示了IFA25、IFA26和IFA27以剂量依赖性方式对感染HBV的原代人肝细胞的HBeAg释放的影响。

[0045] 图6B显示了IFA28、IFA29和IFA30以剂量依赖性方式对感染HBV的原代人肝细胞的HBeAg释放的影响。

[0046] 图6C显示了具有HL接头的IFA(IFA38和IFA39)对HBV-感染的PHH的剂量反应抗-病

毒活性 (dose response anti-viral activity) (HBeAg释放)。

[0047] 图6D-图6H显示了4个具有通过肽接头向IFN α 的融合的IFA分子对感染HBV的原代人肝细胞的剂量反应抗-病毒活性。图6D:显示研究设计的动画。图6E:与Pegasys相比, IFA对HBeAg释放的影响。图6F:与Pegasys相比, IFA对HBsAg释放的影响。图6G:与Pegasys相比, IFA对pgRNA水平的影响。图6H:与Pegasys相比, IFA对CXCL10释放的影响。

[0048] 图7显示了来自人全血细胞 (WBC) 的体外细胞因子释放测定的结果:来自4位健康志愿者供体的WBC的刺激后所获得的数据的实例。WBC保持未刺激 (NS), 用LPS (10ng/mL) 或用IFA1 (1 μ g/mL) 处理24h。收集上清液并使用MSD u-Plex试剂盒对人细胞因子进行细胞因子释放定量。结果代表了来自每个供体的两个独立刺激的平均值。显示了CXCL10 (IP10)、IL6、IL1 β 和TNF α 的谱图。

[0049] 图8A-图8D:在向小鼠静脉内推注0.5mg/kg (IFA) 或0.3mg/kg (Pegasys) 后IFA25、IFA26、IFA27、IFA28、IFA29和IFA30的药物动力学谱。数据表示为半对数坐标上的平均值 $\pm$ SD。收集施用后长达10天的样品。将使用抗-IFN α 作为用于定量方法的第二抗体的ELISA测定用于IFA27、IFA29和IFA30 (图8A) 和IFA25、IFA26和IFA28 (图8B)。将使用抗-IgG2作为用于定量方法的第二抗体的ELISA测定用于IFA25和IFA27 (图8C)。图8D:使用人IFN α 匹配的抗体对进行Pegasys定量。标线 (LLOQ) 表示Pegasys测定的检测限。

[0050] 图9A显示了在HEK-BlueTMCD40L报告细胞中,与亲代抗-CD40抗体相比,没有Fc区的IFA50和IFA51以剂量依赖性方式的CD40激动性活性。图9B显示了在HEK-BlueTMhIFN- α/β 报告细胞中IFA50和IFA51以剂量依赖性方式的IFN α 活性。图9C:IFA50和IFA51对HBV-感染的PHH的HBeAg释放的影响。

[0051] 图10A显示了在HEK-BlueTMCD40L报告细胞中,与亲代抗-CD40抗体相比,IFN ϵ 基IFA49以剂量依赖性方式的CD40激动性活性。IFA49对应于IFN ϵ 通过肽接头向HC的融合。图10B显示了IFA49对通过I型干扰素激活的HEK-BlueTMhIFN- α/β 报告细胞以剂量依赖性方式的IFN活性。图10C:IFA49对HBV-感染的PHH的HBeAg释放的影响。

[0052] 图11A显示了在HEK-BlueTMCD40L报告细胞中,与亲代抗-CD40抗体相比,IFN ω 基IFA46以剂量依赖性方式的CD40激动性活性。IFA46对应于IFN ω 通过肽接头向LC的融合。图11B显示了IFA46对通过I型干扰素激活的HEK-BlueTMhIFN- α/β 报告细胞以剂量依赖性方式的IFN活性。图11C:IFA46对HBV-感染的PHH的HBeAg释放的影响。

[0053] 图12A显示了在HEK-BlueTMCD40L报告细胞中,与亲代抗-CD40抗体相比,IFN γ 基IFA (IFA42和IFA43) 以剂量依赖性方式的CD40激动性活性。IFA42对应于IFN γ 通过肽接头向LC的融合,并且IFA43对应于IFN γ 通过肽接头向HC的融合。图12B显示了在HEK-Blue-hIFN γ 细胞中IFA42和IFA43以剂量依赖性方式的IFN活性。图12C:IFA42和IFA43对HBV-感染的PHH的HBeAg释放的影响。

[0054] 图13A显示了在HEK-BlueTMCD40L报告细胞中,与亲代抗-CD40抗体相比,IFN λ 基IFA (IFA44和IFA45) 以剂量依赖性方式的CD40激动性活性。IFA44对应于IFN λ 通过肽接头向LC的融合,并且IFA45对应于IFN λ 通过肽接头向HC的融合。图13B显示了在HEK-Blue-hIFN λ 报告细胞中IFA44和IFA45以剂量依赖性方式的IFN活性。图13C:IFN λ 基IFA (IFA44和IFA45) 对HBV-感染的PHH的HBeAg释放的影响。

[0055] 结合附图,根据下列说明性实施方式的详细说明,将更完整地理解本发明的上述

及其它特征和优势。

具体实施方式

[0056] 本发明部分基于以下疗法的发现,所述疗法基于包含(I)激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和(II)干扰素(IFN)或其功能性片段的“干扰素相关抗原结合蛋白”、其变体或衍生物在乙型肝炎病毒(HBV)疗法中的使用。所述干扰素相关抗原结合蛋白抑制HBV-感染的细胞中乙型肝炎病毒共价闭环DNA(cccDNA)向前基因组HBV RNA(pgRNA)的转录,抑制乙型肝炎e-抗原(HBeAg)从HBV-感染的细胞中的释放,以及在不感染和HBV感染肝细胞,具体地在不感染和HBV感染原代人肝细胞中并且以协同方式增强IFN通路。提供了包括向HBV-感染细胞或感染HBV的受试者施用干扰素相关抗原结合蛋白的HBV疗法。

[0057] 根据以下定义的所选术语,可以更容易地理解本发明。

[0058] 如本文所使用的,术语“CD40”是指“分化簇40”,它是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员。CD40是存在于抗原呈递细胞(例如,B细胞、树突状细胞、单核细胞)、造血前体、内皮细胞、平滑肌细胞、上皮细胞以及大部分人肿瘤上的共刺激蛋白(Grewal&Flavell, Ann.Rev.Immunol., 1996, 16:111-35; Toes&Schoenberger, Seminars in Immunology, 1998, 10(6):443-8)。T_H细胞上天然配体CD154(CD40L)与CD40的结合激活抗原呈递细胞并诱导多种下游效应。TNF-受体相关因子衔接蛋白TRAF1、TRAF2、TRAF6和TRAF5与CD40相互作用并用作信号转导介体。最终,CD40信号转导激活了典型和非典型NF- κ B通路两者。

[0059] 激动性抗-CD40抗体及其抗原结合片段

[0060] 如本文所使用的,术语“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的4条多肽链,两条重(H)链和两条轻(L)链的免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM)。每条重链包含重链可变区(缩写V_H或V_H)和重链恒定区(CH或C_H)。重链恒定区包含3个结构域,CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(缩写V_L或V_L)和轻链恒定区(CL或C_L)。轻链恒定区包括1个结构域(CL1)。V_H和V_L区可以进一步再分成高变区,称为“互补决定区(CDR)”,其散布着更保守的区域,称为“框架区”(FR)。每个V_H和V_L由3个CDR和4个FR组成,其从氨基-末端到羧基-末端按以下顺序布置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。框架区可以帮助维持CDR的正确构象以促进抗原结合区和抗原之间的结合。

[0061] 最常用于治疗应用的免疫球蛋白是免疫球蛋白G(或者IgG),它是四聚体糖蛋白。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由相同的两对多肽链组成,每对具有一条轻链(约25kDa)和一条重链(约50-70kDa)。每条链的氨基-末端部分包括约100至110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。每条链的羧基-末端部分定义了主要负责效应因子功能的恒定区。基于它们的重链的恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分成不同类型。

[0062] 将重链分类为缪(μ)、德尔塔(δ)、伽玛(γ)、阿尔法(α)和伊普西龙(ϵ)并且将抗体同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。这些中的几个可以进一步被分成亚类或同种型,例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同的同种型具有不同的效应因子功能;例如,IgG1和IgG3同种型具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。在优选的实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段属于IgG类。在更优选的实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段属于IgG1或IgG3亚类。在特别优选的实施方式

中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段属于IgG1亚类。在其它更优选的实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段属于IgG2或IgG4亚类。在特别优选的实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段属于IgG2亚类。

[0063] 将人轻链分为卡帕(κ)和拉姆达(λ)轻链。因此,在一些实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含 κ 类轻链。在其它实施方式中,包含在根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白中的激动性抗CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含 λ 类轻链。在轻链和重链内,通过约12个或更多氨基酸的“J”区连接可变区和恒定区,其中重链还包括约10个或更多氨基酸的“D”区。通常,参见,Fundamental Immunology,第7章(Paul,W.主编,第2版,Raven Press,N.Y.(1989))。

[0064] 术语“抗体”进一步包括但不限于单克隆抗体、双重特异性抗体、微抗体、域抗体、合成抗体(有时也称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体及其各自的片段。除非另外说明,否则术语“抗体”除了包含两条全长重链和两条全长轻链的抗体外,还包括其衍生物、变体、抗原结合片段和突变蛋白,以下描述了它们的实例。

[0065] 如本文所使用的,术语“激动性CD40抗体”或“激动性抗-CD40抗体”是指结合至CD40并介导CD40信号转导的抗体。在优选的实施方式中,它结合至人CD40。如以下所描述的,可以使用表面等离子共振,优选地使用BIAcore®系统确定对CD40的结合。当添加至表达CD40的细胞、组织或生物中时,激动性抗-CD40抗体可以将一种或多种CD40活性提高至少约20%。在一些实施方式中,抗体将CD40活性激活至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或者至少85%。可以使用全血表面分子上调测定或者使用体外报告细胞测定,例如,使用HEK-Blue™CD40L细胞(InvivoGen产品目录#:hkb-cd40)测量激动性抗-CD40抗体的CD40活性,如实施例I中更详细地描述的。通过用人CD40基因和NF κ B-诱导型分泌性胚胎碱性磷酸酶(SEAP)构建体稳定转染HEK293细胞产生这些报告细胞以测量CD40激动剂的活性。CD40的刺激导致NF κ B激活并因此产生SEAP,其可以使用发色底物,如QUANTI-Blue™在上清液中检测。

[0066] 在本发明的背景中,干扰素相关抗原结合蛋白激活CD40和IFN通路两者。在某些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白以小于400、300、200、150、100、70、60、50、40、30、25、20或15ng/mL的EC₅₀激活CD40通路。在更具体的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白以10至200ng/mL范围内的EC₅₀激活CD40通路。在更具体的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白以10至50ng/mL,优选10至30ng/mL范围内的EC₅₀激活CD40通路。

[0067] 表7中显示了激动性抗-CD40抗体CP870,893的示例性轻链和重链序列。

[0068] 如本文所使用的,术语激动性抗-CD40抗体的“激动性抗原结合片段”是指保留原始抗体的一种或多种功能性活性的激动性抗-CD40抗体的片段,所述功能性活性如结合至并起到细胞中CD40信号转导激动剂作用的能力,例如,它介导CD40通路信号转导。该片段可以与全抗体竞争对CD40的结合。

[0069] 可以通过重组DNA技术产生或者可以通过抗-CD40抗体的酶促或化学切割产生激动性抗-CD40抗体的激动性抗原结合片段。激动性抗原结合片段包括但不限于Fab片段、双链抗体(与轻链可变域相同的多肽上的重链可变域,通过太短而不允许相同链上的两个结

构域之间配对的短肽接头连接)、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、结构域抗体和单链抗体并且可以来源于任何哺乳动物来源,其包括但不限于人、小鼠、大鼠、骆驼科动物或兔。

[0070] 术语“可变区”或“可变域”是指抗体的轻链和/或重链部分,通常包括重链中约氨基-末端120至130个氨基酸和轻链中约100至110个氨基末端氨基酸。不同抗体的可变区在氨基酸序列中广泛不同,即使在来源于相同种或相同类的抗体中。表1中显示了激动性抗-CD40抗体CP870,893的示例性V_L和V_H域序列。因为它含有CDR,因此抗体的可变区通常确定特定抗体对其靶标的特异性。表1还显示了激动性抗-CD40抗体CP870,893的示例性CDR序列。

[0071] 表1. 激动性抗-CD40抗体CP870,893的抗-CD40抗体重/轻链可变区和CDR。粗斜体序列对应于根据Kabat定义的CDR区。

[0072]	抗 CD40 抗体区	序列
	抗 CD40 抗体 V _L 域 (SEQ ID NO 51)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGIYSW LAWY QQKPGKAPNLLIY TASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQANIFPLT FGGGTKVEIK
	抗 CD40 抗体 CDRL1 (SEQ ID NO 52)	RASQGIYSWLA
	抗 CD40 抗体 CDRL2 (SEQ ID NO 53)	TASTLQS
	抗 CD40 抗体 CDRL3 (SEQ ID NO 54)	QQANIFPLT
	抗 CD40 抗体 V _H 域 (SEQ ID NO 55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYMH WVRQAPGQGLEWMGW INPDSGGTNYAQKFQ GRVT MTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYC ARDQPLGY CTNGVCSYFDY WGQGLTVTVSS
[0073]	抗 CD40 抗体 CDRH1 (SEQ ID NO 56)	TGYMH
	抗 CD40 抗体 CDRH2 (SEQ ID NO 57)	WINPDSGGTNYAQKFQG
	抗 CD40 抗体 CDRH3 (SEQ ID NO 58)	DQPLGYCTNGVCSYFDY

[0074] 可以通过解出抗体结构和/或解出抗体-配体复合物的结构来完成CDR的示意图和包含抗体结合位点的残基的鉴定。这可以通过本领域技术人员已知的任何多种技术,如X射线晶体学来实现。可以使用多种分析方法来识别或近似CDR区。这些方法的实例包括但不限于Kabat定义、Chothia定义、AbM定义和接触定义。

[0075] Kabat定义是对抗体中残基编号的标准并且通常用于识别CDR区。参见,例如,Johnson&Wu,Nucleic Acids Res.,28:214-8(2000)。Chothia定义类似于Kabat定义,但是Chothia定义考虑了某些结构环区的位置。参见,例如,Chothia等人,J.Mol.Biol.,196:901-17(1986);Chothia等人,Nature,342:877-83(1989)。AbM定义使用了通过Oxford Molecular Group产生的对抗体结构建模的计算机程序集成套装。参见,例如,Martin等人,Proc Natl Acad Sci(USA),86:9268-9272(1989);“AbM™,对抗体的可变区建模的计算机程序(A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies)”Oxford,UK;Oxford Molecular,Ltd.AbM定义使用知识数据库和从头开始方法的组合从一级序列对抗体三级结构建模,如通过Samudrala等人,“使用组合的层级分析法从头预测蛋白结构(Ab

Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach)”在蛋白、结构、功能和遗传学附录 (PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.), 3:194-198 (1999) 中所述的那些。接触定义基于可得的复合物晶体结构的分析。参见, 例如, MacCallum 等人, J. Mol. Biol., 5:732-45 (1996)。

[0076] 在某些实施方式中, 可以将激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的轻链和重链可变区的互补决定区 (CDR) 移植到来自相同或另一个种的框架区 (FR)。在某些实施方式中, 可以将激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的轻链和重链可变区的 CDR 移植到共有人 FR。为了产生共有人 FR, 在某些实施方式中, 将来自几个人重链或轻链氨基酸序列的 FR 比对以识别共有氨基酸序列。在某些实施方式中, 用来自不同重链或轻链的 FR 替代激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的轻链或重链的 FR。在某些实施方式中, 不替换激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的轻链和重链的 FR 中的稀有氨基酸, 而替换其余 FR 氨基酸。稀有氨基酸是处于 FR 中它们通常不被发现的位置处的特定氨基酸。在某些实施方式中, 可以与不同于激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的恒定区的恒定区一起使用来自激动性抗-CD40 抗体或其激动性抗原结合片段的移植可变区。在某些实施方式中, 移植可变区是单链 Fv 抗体的一部分。在以下文献中描述了 CDR 移植, 例如, 美国专利号 6,180,370、6,054,297、5,693,762、5,859,205、5,693,761、5,565,332、5,585,089 和 5,530,101 和 Jones 等人, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 等人, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 等人, Science, 239:1534-1536 (1988); Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998), 其出于任何目的作为参考并入本文。

[0077] “Fc”区通常包含含有抗体的 C_H2 和 C_H3 域的两个重链片段。通过两个或更多个二硫键和通过 C_H3 域的疏水相互作用将所述两个重链片段保持在一起。

[0078] “Fab 片段”包含一条全长轻链以及一条重链的 C_H1 和可变区 (V_H 和 C_H1 区的组合在本文中被称为“fab 区重链”)。

[0079] “Fab’ 片段”包含一条轻链和含有 V_H 域和 C_H1 域以及 C_H1 和 C_H2 域之间的区域的一条重链的一部分, 从而可以在两个 Fab’ 片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成 F(ab’)₂ 分子。

[0080] “F(ab’)₂ 片段”含有两条轻链和含有 C_H1 和 C_H2 域之间的恒定区的一部分的两条重链, 从而在两条重链之间形成了链间二硫键。因此, F(ab’)₂ 片段由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个 Fab’ 片段组成。

[0081] “Fv 区”包含来自重链和轻链两者的可变区, 但是缺少恒定区。

[0082] “单链抗体”是其中已通过柔性接头连接重链和轻链可变区以形成单一多肽链的 Fv 分子, 其形成了抗原结合区。在国际专利申请公开号 WO 88/01649 和美国专利号 4,946,778 和美国专利号 5,260,203 中详细讨论了单链抗体, 以上专利的公开内容作为参考并入。

[0083] “域抗体”是仅含重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在一些情况下, 通过肽接头将两个或更多个 V_H 区共价连接在一起以产生二价域抗体。二价域抗体的两个 V_H 区可以靶向相同或不同的抗原。

[0084] 根据本发明的抗体或抗原结合蛋白, 如干扰素相关抗原结合蛋白优选地以 $\leq 10^{-7}$ M 的解离常数 (K_d) 结合至其靶标抗原。当 $K_d \leq 5 \times 10^{-9}$ M 时, 抗体或抗原结合蛋白以“高亲和力”结合其抗原, 并且当 $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$ M 时, 以“极高亲和力”结合其抗原。更优选地, 抗体或抗原

结合蛋白具有 $K_d \leq 10^{-9} \text{M}$ 。在一些实施方式中,解离速率(off-rate) $< 1 \times 10^{-5}$ 。在其它实施方式中,抗体或抗原结合蛋白将以约 10^{-9}M 至 10^{-13}M 之间的 K_d 结合至人CD40,并且在另一个实施方式中,抗体或抗原结合蛋白将以 $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$ 结合。如本领域技术人员将理解的,在一些实施方式中,任何或所有抗原结合片段可以结合至CD40。优选地,使用表面等离子共振,更优选地使用**BIAcore®**系统确定所述常数。

[0085] 术语“表面等离子共振”是指例如使用**BIAcore®**系统(BIAcore International AB, GE Healthcare公司,乌普萨拉,瑞典和皮斯卡塔韦(Uppsala, Sweden and Piscataway), N.J.)通过生物传感器基质内蛋白浓度变化的检测来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。对于进一步的描述,参见Jönsson等人(1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26。术语“ K_{on} ”表示结合蛋白(例如,抗体或抗原结合蛋白)结合至抗原以形成例如抗原结合蛋白/抗原复合物的结合速率常数(on rate constant)。术语“ K_{on} ”或“结合速率”还表示“结合速率常数(association rate constant)”或“ k_a ”,如在本文中可互换使用。还通过以下方程显示了表示结合蛋白与其靶标抗原的结合速率或者结合蛋白,例如,抗体或抗原结合蛋白与抗原之间的复合物形成速率的值:

[0086] 抗体(“Ab”) + 抗原(“Ag”) $\rightarrow$ Ab-Ag

[0087] 如本领域中已知的,术语“ K_{off} ”或“解离速率(off-rate)”表示结合蛋白(例如,抗体或抗原结合蛋白)从例如抗原结合蛋白/抗原复合物解离的解离速率常数(off rate constant)或“解离速率常数(dissociation rate constant)”。该值表示结合蛋白,例如,抗体或抗原结合蛋白从其靶标抗原的解离速率或者Ab-Ag复合物随时间分离成游离抗体和抗原的解离速率,如通过以下方程所示:

[0088] $\text{Ab} + \text{Ag} \leftarrow \text{Ab-Ag}$

[0089] 术语“ K_d ”和“平衡解离常数”表示在平衡滴定测量中所获得的值,或者通过用解离速率常数(K_{off})除以结合速率常数(K_{on})所得的值。结合速率常数、解离速率常数和平衡解离常数用于表示结合蛋白(例如,抗体或抗原结合蛋白)与抗原的结合亲和力。用于确定结合和解离速率常数的方法在本领域中是熟知的。使用荧光基技术提供了检验生理学缓冲液中处于平衡的样品的高灵敏度和能力。可以使用其它实验方法和仪器,如**BIAcore®**(生物分子互相作用分析)测定(例如,得自BIAcore International AB, GE Healthcare公司,乌普萨拉,瑞典的仪器)。另外,还可以使用得自Sapidyne Instruments (Boise, Id.)的**KinExA®**(动力学排除测定)测定。

[0090] 根据本发明的抗原结合蛋白可以以比对于第二靶标高至少一个数量级,优选地至少两个数量级的亲和力结合至一个靶标。

[0091] 术语“靶标”是指能够通过抗原结合蛋白结合的分子或分子部分。在某些实施方式中,靶标可以具有一个或多个表位。因此,将理解靶标可以用作本发明的“抗原结合蛋白”的“抗原”。

[0092] 术语“表位”包括能够通过抗原结合蛋白,如抗体结合的任何决定簇。表位是通过靶向抗原的抗原结合蛋白所结合的抗原区,并且当抗原是蛋白时,表位包括直接接触抗原结合蛋白的特定氨基酸。最通常,表位存在于蛋白上,但是在一些情况下可以存在于另一种分子,如核酸上。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面分组,如氨基酸、糖侧链、磷酸基

或磺酰基,并且可以具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。通常,对特定靶标抗原特异的抗体将优先/特异性识别蛋白和/或大分子的复杂混合物中的靶标抗原上的表位。

[0093] 在示例性实施方式中,形成本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的部分(I)的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列具有至少90%的同一性的3个轻链互补决定区(CDR);和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列具有至少90%的同一性的3个重链CDR。激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段还可以包含与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列相同的3个轻链互补决定区(CDR);和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列相同的3个重链CDR。在这些实施方式中,根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR;优选地其中根据CDR Kabat定义或者CDR Chothia定义来定义每个CDR。在具体的实施方式中,根据Kabat定义来定义每个CDR。在其它具体的实施方式中,根据Chothia定义来定义每个CDR。

[0094] 可替代地,形成本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的部分(I)的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含(a)重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的互补决定区(CDR)CDRH1、与SEQ ID NO 57具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的CDRH2和与SEQ ID NO 58具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的CDRH3;和(b)轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的CDRL1、与SEQ ID NO 53具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的CDRL2和与SEQ ID NO 54具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的CDRL3。

[0095] 在一些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含(a)重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56相同的互补决定区(CDR)CDRH1、与SEQ ID NO 57相同的CDRH2和与SEQ ID NO 58相同的CDRH3;和(b)轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52相同的CDRL1、与SEQ ID NO 53相同的CDRL2和与SEQ ID NO 54相同的CDRL3。

[0096] 更具体地,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链可变区 V_L ,其包含SEQ ID NO 51中所示序列,或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链可变区 V_H ,其包含SEQ ID NO 55中所示序列,或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0097] 本发明的干扰素相关抗原结合蛋白还可以包含激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段,其包含Fab区重链,所述Fab区重链包含SEQ ID NO 12中所示氨基酸序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0098] 在一些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含选自SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49、SEQ ID NO 12和SEQ ID NO 50组成的组的序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0099] 在更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含SEQ ID NO 6中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0100] 在更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含SEQ ID NO 9中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0101] 在其它更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含SEQ ID NO 49中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0102] 在其它更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含SEQ ID NO 12中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0103] 在其它更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含轻链(LC),所述轻链(LC)包含SEQ ID NO 3中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列;和/或重链(HC),所述重链(HC)包含SEQ ID NO 50中所示序列或者与之具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的序列。

[0104] 干扰素相关抗原结合蛋白或其组分的变体和衍生物

[0105] 多肽(例如,干扰素相关抗原结合蛋白、干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段、抗体、抗原结合蛋白或IFN或其组分)的“变体”包含其中相对于另一多肽序列,1、2、3、4、5或更多个氨基酸残基插入到氨基酸序列中,从氨基酸序列中缺失和/或替换到氨基酸序列中的氨基酸序列。优选地,变体包含多至10个插入、缺失和/或替换,更优选地多至8个插入、缺失和/或替换。更具体地,变体可以包含多至10,更优选地多至8个插入。变体还可以包含多至10,更优选地多至8个缺失。在更优选的实施方式中,变体包含多至10个替换,最优选地多至8个替换。在一些实施方式中,这些替换是如以下所描述的保守氨基酸替换。

[0106] 多核苷酸序列(例如,RNA或DNA)的“变体”包含多核苷酸序列内相对于另一多核苷酸序列的一个或多个突变,其中在核酸序列中插入,从核酸序列缺失和/或在核酸序列中取代1、2、3、4、5或更多个核酸残基。优选地,变体包含多至10个插入、缺失和/或替换,更优选地多至8个插入、缺失和/或替换。更具体地,变体可以包含多至10,更优选地多至8个插入。变体还可以包含多至10,更优选地多至8个缺失。在更优选的实施方式中,变体包含多至10个替换,最优选地多至8个替换。与另一氨基酸序列相比,所述1、2、3、4、5或更多个突变可以在变体所编码的氨基酸序列内引起1、2、3、4、5或更多个氨基酸交换(即“非沉默突变”)。变体还包括其中1、2、3、4、5或更多个密码子已被它们的同义密码子替换的核酸序列,所述同义密码子不引起氨基酸交换并因此被称为“沉默突变”。

[0107] 在多肽或核苷酸序列变体的背景中,术语“同一性”或“同源性”是指两个或更多个多肽分子或者两个或更多个核酸分子序列之间的关系,如通过序列比对和比较所确定的。“同一性百分比”表示所比较的分子中氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比,并且基于所比较的最小分子尺寸进行计算。优选地,对序列全长确定同一性。应理解“至少80%的同一性”的表达包括其中所要求保护的序列与参考序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至

少98%或至少99%的同一性的实施方式。表达“至少90%的同一性”包括其中所要求保护的序列与参考序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%的同一性的实施方式。

[0108] 对于同一性百分比的计算,优选地通过特定数学模型或计算机程序(即“算法”)来解决比对中的空位(如果有的话)。可以用于计算所比对的核酸或多肽的同一性的方法包括在Computational Molecular Biology, (Lesk A.M.主编),1988,纽约:牛津大学出版社;Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith,D.W.主编),1993,纽约:学术出版社;Computer Analysis of Sequence Data,第I部分, (Griffin,A.M.,和Griffin, H.G.主编),1994,美国新泽西州:胡马纳出版社(Humana Press);von Heinje,G.,1987, Sequence Analysis in Molecular Biology,纽约:学术出版社;Sequence Analysis Primer, (Gribskov,M.和Devereux,J.主编),1991,纽约:米斯托克顿出版社(M.Stockton Press);和Carillo等人,1988,SIAM J.Applied Math.48:1073中所述的那些。

[0109] 在计算同一性百分比时,通常以提供序列间最大匹配的方式比对要比较的序列。可以用于确定同一性百分比的计算机程序的一个实例为GCG程序包,其包括GAP (Devereux等人,1984,Nucl.Acids Res.12:387;遗传学计算机组(Genetics Computer Group),威斯康星大学,麦迪逊,WI)。将计算机算法GAP用于比对将确定其序列同一性百分比的两条多肽或多核苷酸。为了它们各自的氨基酸或核苷酸的最佳匹配(“匹配覆盖范围(matched span)”,如通过算法所确定的)来比对序列。结合算法使用空位开放罚分(将其计算为3x平均对角线,其中“平均对角线”是正在使用的比较矩阵的对角线的平均值;“对角线”是通过特定比较矩阵分配给每个完全氨基酸匹配的分值或数值)和空位延伸罚分(其通常为1/10倍空位开放罚分)以及比较矩阵,如PAM 250或者BLOsum 62。在某些实施方式中,还通过算法使用标准比较矩阵(对于PAM 250比较矩阵,参见,Dayhoff等人,1978,Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352;对于BLOsum 62比较矩阵,参见,Henikoff等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:10915-10919)。

[0110] 可以用于使用GAP程序确定多肽或核苷酸序列的同一性百分比的参数的实例如下:

[0111] ●算法:Needleman等人,1970,J.Mol.Biol.48:443-453

[0112] ●比较矩阵:来自Henikoff等人,1992,如上的BLOsum 62

[0113] ●空位罚分:12(但是对于末端空位无罚分)

[0114] ●空位长度罚分:4

[0115] ●相似性阈值:0

[0116] 用于比对两条氨基酸序列的某些比对方案仅可以使两条序列的较短区域匹配,并且这个小比对区域可以具有极高的序列同一性,即使两条全长序列之间不存在明显的关系。因此,如果需要产生覆盖靶标多肽的至少50个或至少100个,优选地整个长度的邻接氨基酸(contiguous amino acid,连续氨基酸)的比对,则可以调整所选的比对方法(GAP程序)。

[0117] 保守氨基酸替换可以涵盖非天然存在的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而非通过生物系统中的合成而掺入。这些包括拟肽及氨基酸部分的其它逆向或反向形式。

[0118] 天然存在的残基可以基于共同侧链性质进行分类:

[0119] 1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0120] 2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0121] 3) 酸性:Asp、Glu;

[0122] 4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0123] 5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;和

[0124] 6) 芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0125] 例如,非保守替换可以包括这些类中的一类的成员交换成另一类的成员。例如,可以将这些替换的残基引入与非人抗体同源的人抗体区域中或者引入所述分子的非同源区域中。

[0126] 根据某些实施方式,在对干扰素相关抗原结合蛋白作出改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。基于其疏水性及电荷特征对每个氨基酸分配亲水指数。它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0127] 在本领域中了解亲水氨基酸指数在对蛋白赋予相互作用性生物功能方面的重要性。Kyte等人,J.Mol.Biol.,157:105-131(1982)。已知某些氨基酸可以被替换成具有类似亲水指数或得分的其它氨基酸且仍然保留类似的生物活性。在某些实施方式中,在基于亲水指数作出改变时,包括亲水指数在 ± 2 内的氨基酸的替换。在某些实施方式中,包括亲水指数在 ± 1 内的那些,并且在某些实施方式中,包括亲水指数在 ± 0.5 内的那些。

[0128] 本领域还应理解可以基于亲水性有效进行类似氨基酸的替换。在某些实施方式中,如受其邻近氨基酸的亲水性所控制的,蛋白质的最大局部平均亲水性与其免疫原性和抗原性相关,即与蛋白质的生物性质相关。

[0129] 已将下列亲水性值分配给这些氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);蛋氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在基于类似亲水性值作出改变时,在某些实施方式中,包括亲水性值在 ± 2 内的氨基酸替换,在某些实施方式中,包括亲水性值在 ± 1 内的那些,并且在某些实施方式中,包括亲水性值在 ± 0.5 内的那些。

[0130] 表2显示了示例性氨基酸替换。

[0131] 表2.氨基酸替换。

[0132]	原始残基	示例性替换	优选的替换
	Ala	Val、Leu、Ile	Val
	Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
	Asn	Gln	Gln
	Asp	Glu	Glu
	Cys	Ser、Ala	Ser
	Gln	Asn	Asn
	Glu	Asp	Asp
	Gly	Pro、Ala	Ala
	His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
	Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu
	Leu	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
	Lys	Arg、1,4 二氨基-丁酸、Gln、Asn	Arg
	Met	Leu、Phe、Ile	Leu
	Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Leu
	Pro	Ala、Gly	Ala
	Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
	Thr	Ser	Ser
	Trp	Tyr、Phe	Tyr
	Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
	Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

[0133] 根据本发明,技术人员将能够使用熟知的技术确定如本文所述的干扰素相关抗原结合蛋白的适合的变体。在某些实施方式中,本领域技术人员可以识别可以通过靶向据信对于活性不重要的区域来改变分子且不会破坏活性的适合区域。在某些实施方式中,技术人员可以识别在类似多肽中保守的分子的残基和部分。在某些实施方式中,可以对即使可以对于生物活性或对于结构重要的区域进行保守氨基酸替换且不会破坏生物活性或者不会不利地影响多肽结构。

[0134] 另外,本领域技术人员可以回顾结构-功能研究,从而识别对于活性或结构重要的类似多肽中的残基。参考这种比较,技术人员可以预测蛋白中对应于类似蛋白中对于活性或结构重要的氨基酸残基的氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可以为这些预测的重要氨基酸残基选择化学类似的氨基酸替换。

[0135] 本领域技术人员还可以相对于类似蛋白或蛋白结构域中的结构分析三维结构和氨基酸序列。参考这种信息,本领域技术人员可以相对于其三维结构预测如本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白、抗体或其抗原结合片段或干扰素或其功能性片段的氨基酸残基的排列。在某些实施方式中,本领域技术人员可以选择不对预测位于蛋白表面上的氨基酸

残基做出彻底改变,因此这些残基可以参与与其它分子的重要相互作用。此外,本领域技术人员可以在每个所期望的氨基酸残基处产生包含单个氨基酸替换的测试变体。然后,可以使用本领域技术人员已知的活性测定筛选所述变体。这些变体可以用于搜集有关适合的变体的信息。例如,如果技术人员发现特定氨基酸残基的改变导致活性破坏、不期望的降低或不适合的活性,则可以避免具有这种改变的变体。换言之,基于从这些实验所收集的信息,本领域技术人员可以容易地确定其中应避免单独或与其它突变组合的其它替换的氨基酸。

[0136] 根据某些实施方式,氨基酸替换为:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变对形成蛋白质复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和/或(5)赋予或改变这些多肽的其它物理化学或功能性质的那些。根据某些实施方式,可以在天然存在的序列(在某些实施方式中,在形成分子间接触的结构域以外的多肽部分中)中做出单一或多个氨基酸替换(在某些实施方式中,保守氨基酸替换)。在某些实施方式中,保守氨基酸替换通常可以不显著改变亲代序列的结构特性(例如,替代氨基酸不应倾向于打破亲代序列中存在的螺旋或者破坏表征亲代序列的其它类型的二级结构)。本领域承认的多肽二级和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton主编, W.H. Freeman and Company, 纽约(1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden & J. Tooze主编, 加兰德出版 (Garland Publishing), 纽约, N.Y. (1991)); 和 Thornton等人, Nature, 354:105 (1991), 以上文献分别作为参考并入本文。

[0137] 术语“衍生物”是指包括除氨基酸(或核酸)的插入、缺失或替换以外的化学修饰的分子。在某些实施方式中,衍生物包含共价修饰,其包括但不限于与聚合物、脂质或其它有机或无机部分的化学键合。在某些实施方式中,化学修饰的干扰素相关抗原结合蛋白可以具有比未化学修饰的干扰素相关抗原结合蛋白更长的循环半衰期。在某些实施方式中,化学修饰的干扰素相关抗原结合蛋白可以对所期望的细胞、组织和/或器官具有改善的靶向能力。在一些实施方式中,共价修饰衍生的干扰素相关抗原结合蛋白以包括一种或多种水溶性聚合物连接,其包括但不限于聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。参见,例如,美国专利号:4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192和4,179,337。在某些实施方式中,衍生的干扰素相关抗原结合蛋白包含一种或多种聚合物,其包括但不限于单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素或其它碳水化合物基聚合物、聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)及聚乙烯醇以及这些聚合物的混合物。

[0138] 在某些实施方式中,通过聚乙二醇(PEG)亚基共价修饰如本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白的衍生物。在某些实施方式中,可以在衍生物的一个或多个具体位置,例如,在氨基末端键合一个或多个水溶性聚合物。在某些实施方式中,可以将一个或多个水溶性聚合物随机连接至衍生物的一个或多个侧链。在某些实施方式中,将PEG用于改善干扰素相关抗原结合蛋白的治疗能力。某些这些方法讨论例如于美国专利号6,133,426,该专利出于任何目的作为参考并入本文。

[0139] 在某些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白变体包括糖基化变体,其中与亲代多肽的氨基酸序列相比,改变了糖基化位点的数目和/或类型。在某些实施方式中,蛋白变体包含比天然蛋白更多的N-连接的糖基化位点。在其它实施方式中,蛋白变体包含比天然蛋白更少的N-连接的糖基化位点。N-连接的糖基化位点的特征在于序列:Asn-X-Ser或者

Asn-X-Thr,其中表示为X的氨基酸残基可以是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基。产生该序列的氨基酸残基的替换提供了用于添加N-连接的碳水化合物链的可能的位点。可替代地,消除该序列的替换将除去已有的N-连接的碳水化合物链。还提供了N-连接的碳水化合物链的重排,其中消除1、2、3、4、5或更多个N-连接的糖基化位点(通常天然存在的那些)并且产生一个或多个新的N-连接的位点。其它优选的变体包括半胱氨酸变体,其中与亲代氨基酸序列相比,缺失一个或多个半胱氨酸残基或者用另一氨基酸(例如,丝氨酸)替换半胱氨酸残基。当抗体必须折叠成生物学活性构象时,如在不溶性包涵体的分离之后,半胱氨酸变体可以是有用的。半胱氨酸变体通常具有比天然蛋白更少的半胱氨酸残基,并且通常具有偶数以最大程度减小由未配对的半胱氨酸所产生的相互作用。

[0140] HBV和HBV标志物

[0141] 如本文所使用的,“乙肝病毒”或“HBV”是指导致乙型肝炎的双链DNA病毒,其属于被称为肝脱氧核糖核酸病毒的密切相关的DNA病毒家族。肝脱氧核糖核酸病毒对于感染肝细胞具有强烈偏好,但是少量肝脱氧核糖核酸病毒DNA可以存在于肾、胰脏和单核细胞中。然而,在这些位点的感染与其它肝病无关。

[0142] HBV病毒颗粒,即戴恩颗粒由外层脂质包膜和由蛋白组成的二十面核衣壳核心组成。核衣壳包裹病毒DNA和具有类似于反转录病毒的反转录酶活性的DNA聚合酶。外层包膜含有包埋蛋白,其参与敏感细胞的病毒结合和进入。所述病毒是最小的包膜动物病毒之一,其病毒颗粒直径为42nm,但是存在多形形式,包括缺少核心的丝状体和球形体。这些颗粒不具有传染性并且由脂质和构成病毒颗粒表面的一部分的蛋白组成,所述蛋白被称为表面抗原(HBsAg)并且在病毒生命周期期间过量产生。HBV包含HBsAg、HBcAg(及其剪接变体HBeAg)、DNA聚合酶和Hbx。HBV是少数已知的非反转录病毒之一,其使用逆转录作为其复制过程的一部分。

[0143] HBV核衣壳含有相对小且部分双螺旋的3.2kb环状DNA、病毒聚合酶和核心蛋白。基因组仅具有4个长开放阅读框。基因组的pre-S-S(前-表面-表面)区通过3个框内起始密码子中每一个处的差异翻译起始来编码3个病毒表面抗原。

[0144] HBV最丰富的蛋白是24kD S蛋白(其被称为HBsAg)。pre-C-C(前-核心-核心)区编码HBcAg(HBV核心抗原)和HBeAg(HBV e抗原)。病毒复制不需要HBeAg并且HBeAg在病毒组装不起作用,但是尽管如此,HBeAg是活性病毒复制的有用指示。由于通过HBV-感染的肝细胞分泌HBeAg,因此可以通过标准诊断测试(如ELISA)检测血液中的HBeAg,并因此将HBeAg用作病毒血症HBV感染的实验室标志物(Testoni等人, Serum hepatitis B core-related antigen(HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA. J. Hepatol. 2019, 70, 615-625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.030>)。

[0145] P-编码区对病毒聚合酶特异,所述病毒聚合酶是参与DNA合成和RNA衣壳化的多功能酶。X开放阅读框编码病毒X蛋白(HBx),其调节宿主-细胞信号转导并且可以直接和间接影响宿主和病毒基因表达。

[0146] 据信当病毒通过其包膜蛋白连接至宿主细胞膜时,HBV的生命周期开始。已表明HBV结合至主要通过大包膜蛋白的前-S1结构域在人肝细胞上表达的质膜上的受体,如在HBV感染的起始步骤中。然而,受体的性质仍有争议。然后,病毒膜与细胞膜融合,并将病毒基因组释放到细胞中。

[0147] 可以通过多种因素,包括激素、生长因子和细胞因子调节HBV的复制。在病毒基因组到达核之后,细胞DNA修复机制将部分双链DNA(dsDNA;也称为松弛环状HBV DNA(rcDNA))基因组转化成共价闭环DNA(cccDNA)。所产生的cccDNA是用于前基因组RNA和亚基因组RNA的进一步转录的宿主RNA Pol-II的模板(Allweiss L和Dandri M, The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses* 2017, 9(6):156; doi:10.3390/v9060156; Nur K. Mohd-Ismail, Zijie Lim, Jayantha Gunaratne和Yee-Joo Tan, Mapping the Interactions of HBV cccDNA with Host Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(17):4276; doi:10.3390/ijms20174276)。

[0148] 前基因组RNA是双功能的,其用作病毒DNA合成的模板和前-C、C和P翻译的信使。亚基因组RNA仅起到包膜和X蛋白翻译的作用。所有病毒RNA被转运至细胞质,在此其翻译得到病毒包膜、核心和聚合酶蛋白以及HBx和HBcAg。

[0149] HBV核心颗粒在胞液中组装,并在该过程期间,前基因组RNA的单个分子被引入组装的病毒核心。一旦病毒RNA衣壳化,则逆转录开始。两条病毒DNA链的合成是顺序的。第一DNA链由衣壳化RNA模板制成;在该链的合成期间或之后, RNA模板降解并且通过使用新制备的第一DNA链作为模板,第二DNA链的合成继续。具有成熟基因组的一些核心被转运回核,在此它们新制成的DNA基因组可以被转化为cccDNA以维持转录模板稳定的核内混合池。

[0150] 起初,合成了HBV表面抗原(HBsAg)蛋白并在糙面内质网中聚合。将这些蛋白转运至后-ER和前-高尔基体区室,在此继续核衣壳出芽。将组装的HBV病毒颗粒和亚病毒颗粒转运至高尔基体以进一步修饰表面蛋白的聚糖,然后从宿主细胞中分泌出来以完成生命周期。

[0151] 在具体的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系、方法和组合物可以用于治疗HBV感染。如本文所使用的,“治疗HBV感染”和“HBV感染的治疗”是指以下中的一种或多种:(i)降低HBV病毒载量/病毒滴度;(ii)降低cccDNA的转录;(iii)降低细胞中前基因组RNA的水平;(iv)减少一种或多种HBV-相关病症;以及(v)减少受试者中的一种或多种HBV-相关症状。

[0152] 术语“病毒载量”和“病毒滴度”表示细胞、器官或体液,如血液或血清中病毒颗粒的数目。基于测定类型,病毒载量或病毒滴度通常被表示为病毒颗粒或者传染性颗粒/mL。目前,通常使用国际单位每毫升(IU/mL)测量病毒载量。作为另外一种选择,可以将病毒载量或病毒滴度确定为所谓的病毒基因组当量。更高的病毒负荷、滴度或病毒载量通常与活性病毒感染的严重程度相关。因此,减少病毒载量或病毒滴度与例如血清中的传染性病毒颗粒数目的减少相关。通常使用核酸扩增基测试(NATs或NAATss)确定病毒载量。NAT/NAAT测试使用例如PCR(定量)逆转录聚合酶链反应(RT-PCR或qRT-PCR)、核酸序列基扩增(NASBA)或者探针-基测定。用于乙型肝炎病毒DNA定量的实时PCR测定描述于例如Liu等人, *Virology* 14, 94(2017) doi:10.1186/s12985-017-0759-8。由于使用PCR时病毒DNA检测的容易性,因此病毒载量在临床环境中监测治疗期间的成功是有用的。独立于HBeAg状态,>10.000拷贝/mL(2.000IU/mL)的病毒载量是肝细胞癌的强风险预测因子。

[0153] 术语“患者”和“受试者”是可互换使用的并且包括人和非人动物受试者,优选地人受试者,以及正式诊断患有病症的那些、尚未正式认识到病症的那些,接受医学关注的那些、处于发生病症风险的那些等。

[0154] 在具体的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系、方法和组合物可以用于减少HBV-感染细胞中(如细胞培养物、HBV-感染的器官或者HBV-感染患者中)的HBV病毒载量/病毒滴度。与未治疗的HBV-感染的细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,HBV病毒载量/病毒滴度可以减少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一些实施方式中,HBV病毒载量/病毒滴度减少了至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或者至少95%。优选地,HBV病毒载量/病毒滴度减少了至少35%,更优选地减少了至少50%。在一些实施方式中,通过PCR或qRT-PCR确定病毒载量/病毒滴度。

[0155] 在具体的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系、方法和组合物可以用于降低HBV-感染细胞中(如细胞培养物、HBV-感染的器官或者HBV-感染患者中)的HBV cccDNA的转录。与未治疗的HBV-感染的细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,cccDNA转录可以减少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一些实施方式中,HBV cccDNA的转录减少了至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或者至少95%。优选地,HBV cccDNA的转录减少了至少35%,更优选地减少了至少50%。在一些实施方式中,通过PCR或qPCR确定HBV cccDNA的转录。

[0156] 在具体的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系、方法和组合物可以用于减少HBV-感染细胞中(如细胞培养物、HBV-感染的器官或者HBV-感染患者中)的前基因组HBV RNA的水平。与未治疗的HBV-感染的细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,前基因组HBV RNA水平可以减少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一些实施方式中,前基因组HBV RNA的水平减少了至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或者至少95%。优选地,前基因组HBV RNA的水平减少了至少35%,更优选地减少了至少50%。在一些实施方式中,通过qRT-PCR确定前基因组HBV RNA的水平。

[0157] 如本文所使用的,“HBV-相关病症”是指由HBV对受试者的感染所产生的病症。HBV-相关病症包括但不限于急性肝炎、慢性肝炎、黄疸性肝炎、暴发性肝炎、亚暴发性肝炎和由任何这些病症所造成的症状和/或并发症。

[0158] 如本文所使用的,“HBV-相关症状”、“HBV感染的症状”或“HBV-相关并发症”包括与HBV感染相关的一种或多种身体功能障碍。HBV症状和并发症包括但不限于肝硬化、肝细胞癌(HCC)、膜性肾小球肾炎(MGN)、死亡、急性坏死性脉管炎(多发性结节性动脉炎)、膜性肾小球肾炎、儿童丘疹肢皮炎(奇柯二氏综合征)、HBV-相关肾病(例如,膜性肾小球肾炎)、免疫-介导的血液学病症(例如,特发性混合性冷球蛋白血症、再生障碍性贫血)、门静脉高压症、腹水、脑病、黄疸、瘙痒、粪便发白、脂肪痢、多发性结节性动脉炎、肾小球疾病、异常ALT水平、异常AST水平、异常碱性磷酸酶水平、胆红素水平升高、厌食症、不适、发烧、恶心、呕吐等。

[0159] 干扰素

[0160] 如本文所使用的,“干扰素”或“IFN”是指细胞因子或其衍生物,其通常通过细胞对病原体或肿瘤细胞的存在响应而产生并释放。IFN包括I型IFN(例如,IFN α 、IFN β 、IFN ϵ 、IFN κ 、IFN τ 、IFN ζ 和IFN ω)、II型IFN(例如,IFN γ)和III型IFN(例如,IFN λ 1、IFN λ 2和IFN λ 3)。术语“干扰素”或“IFN”无限制地包括全长IFN、其变体或衍生物(例如,化学(例如,PEG化)修饰的衍生物或突变蛋白)或其功能活性片段,其保留了全长IFN的一个或多个信号转导活性。

[0161] 如本文所使用的,术语“功能性片段”是指保留原始物质的一个或多个功能活性的物质的片段。例如,干扰素的功能性片段是指保留如本文所描述的IFN功能的干扰素片段,例如,它介导IFN通路信号转导。

[0162] 当添加至表达同源IFN受体(IFN α 的IFNAR、IFN β 的IFNBR等)的细胞、组织或生物时,IFN可以将一种或多种IFN受体活性提高至少约20%。在一些实施方式中,干扰素将IFN受体活性激活至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或者至少85%。如实施例I中更详细地描述的,可以例如使用体外报告细胞测定,例如,使用HEK-BlueTMIFN- α/β 细胞(InvivoGen,产品目录#:hkb-ifn $\alpha\beta$)、HEK-BlueTMIFN- λ (InvivoGen,产品目录#:hkb-ifn λ)或者HEK-BlueTMDual IFN- γ 细胞(InvivoGen,产品目录#:hkb-ifn γ)测量IFN的活性(即“IFN活性”)。通过用人IFN受体基因和IFN-刺激的响应元件-控制的分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)构建体稳定转染HEK293细胞产生这些报告细胞以测量IFN的活性。设计HEK-BlueTMIFN-细胞以监测通过I型、II型或III型干扰素诱导的JAK/STAT/ISGF3通路的激活。这些通路的激活诱导SEAP的生产和释放。

[0163] 在本发明的背景中,干扰素相关抗原结合蛋白激活CD40和IFN通路两者。在某些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白以小于100、60、50、40、30、20、10或1ng/mL的EC₅₀,优选地以小于11ng/mL的EC₅₀,更优选地以小于6ng/mL的EC₅₀激活IFN通路。在这些实施方式的一些中,IFN通路为IFN α (干扰素 α)、IFN β (干扰素 β)、IFN ϵ (干扰素 ϵ)、IFN ω (干扰素 ω)、IFN γ (干扰素 γ)或IFN λ (干扰素 λ)通路。

[0164] 根据某些示例性实施方式,如本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白包括全长IFN、其变体或衍生物(例如,化学(例如,PEG化)修饰的衍生物或突变蛋白)或其功能活性片段,其保留了全长IFN的一种或多种信号转导活性。在某些实施方式中,IFN为人IFN。

[0165] 在某些实施方式中,如本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白包括选自I型IFN、II型IFN和III型IFN或其功能性片段组成的组的IFN或其功能性片段。

[0166] 在具体的实施方式中,IFN或其功能性片段是I型IFN或其功能性片段。在具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段是IFN α 、IFN β 、IFN ω 或IFN ϵ 或其功能性片段。在更具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段是IFN α 或IFN β 或其功能性片段。在其它更具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段是IFN α 或其功能性片段。在其它更具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段为IFN β 或其功能性片段。在其它更具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段为IFN ω 或其功能性片段。在其它更具体的实施方式中,I型IFN或其功能性片段为IFN ϵ 或其功能性片段。

[0167] 在具体的实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IFN λ 、IFN ϵ 或者IFN ω 或其功能性片段。在具体的实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN α 或IFN β 或其功能性片段。

[0168] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN α 或其功能性片段。在更具体的实施

方式中,IFN或其功能性片段为IFN α 2a或其功能性片段。IFN α 2a可以包含SEQ ID NO 17中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0169] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN β 或其功能性片段。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。IFN β 或其功能性片段可以相对于SEQ ID NO 14包含一个或两个氨基酸替换,其选自C17S和N80Q。在一些实施方式中,IFN β 或其功能性片段相对于SEQ ID NO 14包含氨基酸替换C17S。在一些实施方式中,IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示的氨基酸序列。在其它实施方式中,IFN β 相对于SEQ ID NO 14包含氨基酸替换C17S和N80Q。在其它实施方式中,IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示的氨基酸序列。

[0170] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN γ 或IFN λ 或其功能性片段。在具体的实施方式中,IFN或其功能性片段是IFN γ 或其功能性片段。在更具体的实施方式中,IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。在其它具体的实施方式中,IFN或其功能性片段是IFN λ 或其功能性片段。在更具体的实施方式中,IFN λ 或其功能性片段为IFN λ 2或其功能性片段。IFN λ 2可以包含SEQ ID NO 18中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0171] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN ϵ 或其功能性片段。IFN ϵ 可以包含SEQ ID NO 61中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0172] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段为IFN ω 或其功能性片段。IFN ω 可以包含SEQ ID NO 60中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0173] 在某些实施方式中,在用本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白处理的HBV-感染细胞中改变,即上调或下调了一种或多种IFN信号转导通路生物标志物的表达水平。根据某些示例性实施方式,在用本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白处理的HBV-感染细胞中上调了一种或多种IFN通路生物标志物的表达水平。在本上下文中,“生物标志物”将被理解为作为正常生物过程、致病过程或治疗干预的药理学反应的指示进行客观测量和评价的特征。

[0174] 根据某些实施方式,本文中重要的适合的IFN通路生物标志物为趋化因子,例如,C-X-C趋化因子,其选自CXCL9、CXCL10和CXCL11组成的组。在某些示例性实施方式中,通过IFN通路诱导的适合的生物标志物为CXCL9、CXCL10和/或CXCL11,以及干扰素刺激的基因ISG20。可以使用本领域中已知的技术,如ELISA定量细胞因子诱导或释放。作为另外一种选择,还可以使用RNA-基测定,如RNAseq或qRT-PCR确定诱导。在某些实施方式中,上调可以表示这些细胞因子的表达或分泌提高至少1.5-倍、至少2-倍、至少2.5-倍、至少3-倍、至少4-倍、至少5-倍或至少10-倍。

[0175] 在这些或在其它示例性实施方式中,通过本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在人全血细胞中促炎细胞因子,例如,IL10、IL1 β 和/或IL2的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在人全血细胞中IL10的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在人全血细胞中IL1 β 的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在HBV-感染细胞中IL2的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在HBV-感染细胞中IL10和IL1 β 的表达水平

未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在HBV-感染细胞中IL10和IL2的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在HBV-感染细胞中IL1 β 和IL2的表达水平未显著上调。在一些实施方式中,通过用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白处理,在HBV-感染细胞中IL10、IL1 β 和IL2的表达水平未显著上调。

[0176] 干扰素相关抗原结合蛋白

[0177] 如本文所使用的,术语“结合的”一般是指两种(或更多)分子的共价或非共价键合。通过将两种或更多种不同的肽或蛋白连接产生了结合的蛋白,从而导致产生了具有来自于每种原始蛋白的一种或多种功能性质的蛋白。在本发明的背景中,干扰素相关抗原结合蛋白激活CD40和IFN通路两者。结合的蛋白涵盖了单体和多聚体,例如,二聚体、三聚体、四聚体等,不同结合或融合蛋白的复合物。在这方面,由两个蛋白的表面区域之间的强相互作用,通常通过离子、范德华力和/或氢键相互作用产生了非共价键。另一方面,共价键需要真实化学键,如肽键、二硫桥等的存在。如本文所使用的,术语“融合的”一般是指以共价形式通过肽键连接两种或更多种不同的肽或蛋白。因此,“融合蛋白”是指通过具有来源于每种初始蛋白的一种或多种功能性质的肽键连接两种或更多种不同的肽或蛋白所产生的单个蛋白。在某些实施方式中,可以通过一个或多个肽接头(“L”)将两种或更多种不同的肽或蛋白彼此融合。

[0178] 在本发明的所有方面,干扰素相关抗原结合蛋白是包含激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和IFN或其功能性片段的蛋白。

[0179] 在一些实施方式中,IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段非共价结合。在更具体的实施方式中,IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段通过离子、范德华力和/或氢键相互作用非共价结合。

[0180] 在其它实施方式中,IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段共价结合。在优选的实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段。IFN或其功能性片段可以融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在一些实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端。在其它实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。IFN或其功能性片段还可以融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的重链。在一些实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的重链的N-末端。在其它实施方式中,IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的重链的C-末端。在任何这些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和IFN或其功能性片段可以通过接头彼此融合。

[0181] 如本文所使用的,术语“接头”或“L”是指将一个或多个激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段共价连接至一个或多个干扰素或其功能性片段的任何部分。在示例性实施方式中,接头为肽接头。如本文所使用的,术语“肽接头”是指适合于连接两个或更多个部分的肽。在本文中所提及的肽接头可以具有以下所列的一种或多种性质。表7中显示了根据某些示例性实施方式的肽接头的序列。

[0182] 肽接头可以具有任何长度,即包含任何数目的氨基酸残基。在示例性实施方式中,

接头包含至少1、至少2、至少3、至少4、至少5个氨基酸。接头可以包含至少4个氨基酸。接头可以包含至少11个氨基酸。接头可以包含至少12个氨基酸。接头可以包含至少13个氨基酸。接头可以包含至少15个氨基酸。接头可以包含至少20个氨基酸。接头可以包含至少21个氨基酸。接头可以包含至少24个氨基酸。

[0183] 接头通常足够长以提供足够的灵活程度以防止所连接的部分彼此妨碍活性,例如,部分结合至受体的能力。在示例性实施方式中,接头包含多至10、多至20、多至30、多至40、多至50、多至60、多至70、多至80、多至90或者多至100个氨基酸。接头可以包含多至80个氨基酸。接头可以包含多至40个氨基酸。接头可以包含多至24个氨基酸。接头可以包含多至21个氨基酸。接头可以包含多至20个氨基酸。接头可以包含多至15个氨基酸。接头可以包含多至13个氨基酸。接头可以包含多至12个氨基酸。接头可以包含多至11个氨基酸。接头可以包含多至4个氨基酸。

[0184] 在一些实施方式中,接头选自包括刚性、柔性和/或螺旋-形成接头的组。应理解螺旋-形成接头也可以是刚性接头,因为 α -螺旋具有比认为具有更无规卷曲构象的肽的自由度更低。在一些实施方式中,接头是刚性接头。示例性刚性接头包含SEQ ID NO 20中所示序列。其它示例性刚性接头包含SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。在相关实施方式中,接头是螺旋-形成接头。示例性螺旋-形成接头包含SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。在其它实施方式中,接头是柔性接头。示例性柔性接头包含SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。

[0185] 接头还可以具有不同的化学性质。接头可以选自酸性、碱性或中性接头。通常,酸性接头含有一个或多个酸性氨基酸,如Asp或Glu。碱性接头通常含有一个或多个碱性氨基酸,如Arg、His和Lys。这两类氨基酸都是非常亲水的。在一些实施方式中,接头是酸性接头。示例性酸性接头包含SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。在其它实施方式中,接头是碱性接头。在其它实施方式中,接头是中性接头。示例性中性接头包含SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。

[0186] 在优选的实施方式中,接头是由多个甘氨酸、丝氨酸并且在适用情况下,苏氨酸残基组成的Gly-Ser或Gly-Ser-Thr接头。在这些实施方式的一些中,接头包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在更具体的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25、SEQ ID NO 26中所示序列。在一些实施方式中,接头还包括氨基酸苏氨酸。在更具体的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 21中所示序列。

[0187] 在本发明的示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含接头,所述接头包含选自SEQ ID NO 20至26中所示序列,优选地SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或SEQ ID NO 26中所示序列的序列。在优选的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 24中所示序列。在另一个优选的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 25中所示序列。在另一个优选的实施方式中,接头包含SEQ ID NO 26中所示序列。

[0188] 在根据本发明的方面中的任一个的多个实施方式中,除了形成(I)所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和(II)所述IFN或其功能性片段的那些以外,干扰素相关抗原结合蛋白不包含氨基酸。在相关实施方式中,除了形成(I)所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段、(II)所述IFN或其功能性片段和(III)所述接头的那些以外,干扰素相关抗原结合蛋白不包含氨基酸。

[0189] 以下列出了代表(I)激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段、(II)干扰素(IFN)或其功能性片段和(III)接头的多种不同配置的示例性实施方式。

[0190] 在某些优选的实施方式中,将IFN或其功能性片段通过接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的C-末端,如表3A或表3B中所示。在这些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链可以包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48或SEQ ID NO 49中所示序列。IFN α 2a可以包含SEQ ID NO 17中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14中所示序列。IFN β _C17S可以包含SEQ ID NO 15中所示序列。IFN β _C17S,N80Q可以包含SEQ ID NO 16中所示序列。IFN γ 可以包含SEQ ID NO 19中所示序列。IFN λ 2可以包含SEQ ID NO 18中所示序列。IFN ϵ 可以包含SEQ ID NO 61中所示序列。IFN ω 可以包含SEQ ID NO 60中所示序列。所提及的接头是表7中所列的那些。

[0191] 在其中将IFN融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的C-末端的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白还包括激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在更具体的实施方式中,重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48或SEQ ID NO 49中所示序列并且轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。表3. 融合至抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的C-末端的干扰素或其功能性片段。

[0192]

A	IFN α 2a	IFN β	IFN β _C17S	IFN β _C17S,N80Q	IFN γ	IFN λ 2
RL 接头	抗 CD40_HC-- RL--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- RL--IFN β	抗 CD40_HC-- RL--IFN β _C17S	抗 CD40_HC--RL-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- RL--IFN γ	抗 CD40_HC-- RL--IFN λ 2
GST 接头	抗 CD40_HC-- GST--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- GST--IFN β	抗 CD40_HC-- GST-- IFN β _C17S	抗 CD40_HC-- GST-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- GST--IFN γ	抗 CD40_HC-- GST--IFN λ 2
HL 接头	抗 CD40_HC-- HL--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- HL--IFN β	抗 CD40_HC-- HL--IFN β _C17S	抗 CD40_HC--HL-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- HL--IFN γ	抗 CD40_HC-- HL--IFN λ 2
HL2 接头	抗 CD40_HC-- HL2--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- HL2--IFN β	抗 CD40_HC-- HL2-- IFN β _C17S	抗 CD40_HC--HL2-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- HL2--IFN γ	抗 CD40_HC-- HL2--IFN λ 2
(G4S)2 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN β	抗 CD40_HC-- (G4S)2-- IFN β _C17S	抗 CD40_HC-- (G4S)2-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN γ	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN λ 2
(G4S)3 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN β	抗 CD40_HC-- (G4S)3-- IFN β _C17S	抗 CD40_HC-- (G4S)3-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN γ	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN λ 2
(G4S)4 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN α 2a	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN β	抗 CD40_HC-- (G4S)4-- IFN β _C17S	抗 CD40_HC-- (G4S)4-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN γ	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN λ 2

[0193]

B	IFN ϵ	IFN ω
RL 接头	抗 CD40_HC-- RL--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- RL--IFN ω
GST 接头	抗 CD40_HC-- GST--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- GST--IFN ω
HL 接头	抗 CD40_HC-- HL--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- HL--IFN ω
HL2 接头	抗 CD40_HC-- HL2--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- HL2--IFN ω
(G4S)2 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- (G4S)2--IFN ω

[0194]

(G4S)3 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- (G4S)3--IFN ω
(G4S)4 接头	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN ϵ	抗 CD40_HC-- (G4S)4--IFN ω

[0195] 在某些优选的实施方式中,将IFN或其功能性片段通过接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的N-末端,如表4A或表4B中所示。在这些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链可以包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或者SEQ ID NO 50中所示序列。IFN α 2a可以包含SEQ ID NO 17中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14中所示序列。IFN β _C17S可以包含SEQ ID NO 15中所示序列。IFN β _C17S,N80Q可以包含SEQ ID NO 16中所示序列。IFN γ 可以包含SEQ ID NO 19中所示序列。IFN λ 2可以包含SEQ ID NO 18中所示序列。IFN ϵ 可以包含SEQ ID NO 61中所示序列。IFN ω 可以包含SEQ ID NO 60中所示序列。所提及的接头是表7中所列的那些。

[0196] 在其中将IFN融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的N-末端的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白还包括激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在更具体的实施方式中,重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或SEQ ID NO 50中所示序列并且轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。

[0197] 表4.融合至抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的N-末端的干扰素或其功能性片段。

[0198]

A	IFN α 2a	IFN β	IFN β _C17S	IFN β _C17S,N80Q	IFN γ	IFN λ 2
RL 接头	IFN α 2a--RL-- 抗 CD40_HC	IFN β --RL-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- RL-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- RL--抗 CD40_HC	IFN γ --RL-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--RL-- 抗 CD40_HC
GST 接头	IFN α 2a--GST-- 抗 CD40_HC	IFN β --GST-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- GST-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- GST--抗 CD40_HC	IFN γ --GST-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--GST-- 抗 CD40_HC
HL 接头	IFN α 2a--HL-- 抗 CD40_HC	IFN β --HL-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- HL-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- HL--抗 CD40_HC	IFN γ --HL-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--HL-- 抗 CD40_HC
HL2 接头	IFN α 2a--HL2-- 抗 CD40_HC	IFN β --HL2-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- HL2-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- HL2--抗 CD40_HC	IFN γ --HL2-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--HL2-- 抗 CD40_HC
(G4S)2 接头	IFN α 2a-- (G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN β --(G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- (G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN γ --(G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--(G4S)2-- 抗 CD40_HC

[0199]

(G4S)3 接头	IFN α 2a-- (G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN β --(G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- (G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN γ --(G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--(G4S)3-- 抗 CD40_HC
(G4S)4 接头	IFN α 2a-- (G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN β --(G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S-- (G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN γ --(G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN λ 2--(G4S)4-- 抗 CD40_HC

[0200]

B	IFNϵ	IFNω
RL 接头	IFN ϵ --RL-- 抗 CD40_HC	IFN ω --RL-- 抗 CD40_HC
GST 接头	IFN ϵ --GST-- 抗 CD40_HC	IFN ω --GST-- 抗 CD40_HC
HL 接头	IFN ϵ --HL-- 抗 CD40_HC	IFN ω --HL-- 抗 CD40_HC
HL2 接头	IFN ϵ --HL2-- 抗 CD40_HC	IFN ω --HL2-- 抗 CD40_HC
(G4S)2 接头	IFN ϵ --(G4S)2-- 抗 CD40_HC	IFN ω --(G4S)2-- 抗 CD40_HC
(G4S)3 接头	IFN ϵ --(G4S)3-- 抗 CD40_HC	IFN ω --(G4S)3-- 抗 CD40_HC
(G4S)4 接头	IFN ϵ --(G4S)4-- 抗 CD40_HC	IFN ω --(G4S)4-- 抗 CD40_HC

[0201] 在某些优选的实施方式中,将IFN通过接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端,如在表5A或表5B中所示。在这些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链可以包含SEQ ID NO 3中所示序列。IFN α 2a可以包含SEQ ID NO 17中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14中所示序列。IFN β _C17S可以包含SEQ ID NO 15中所示序列。IFN β _C17S,N80Q可以包含SEQ ID NO 16中所示序列。IFN γ 可以包含SEQ ID NO 19中所示序列。IFN λ 2可以包含SEQ ID NO 18中所示序列。IFN ϵ 可以包含SEQ ID NO 61中所示序列。IFN ω 可以包含SEQ ID NO 60中所示序列。所提及的接头是表7中所列的那些。

[0202] 在其中将IFN融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白还包括激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链。在更具体的实施方式中,轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列并且重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 50或者SEQ ID NO 12中所示序列。

[0203] 表5.融合至抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端的干扰素或其功能性片段。

[0204]

A	IFNα2a	IFNβ	IFNβ_C17S	IFNβ_C17S,N80Q	IFNγ	IFNλ2
RL 接头	抗 CD40_LC-- RL--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- RL--IFN β	抗 CD40_LC-- RL-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC--RL-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- RL--IFN γ	抗 CD40_LC-- RL--IFN λ 2
GST 接头	抗 CD40_LC-- GST--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- GST--IFN β	抗 CD40_LC-- GST-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC--GST-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- GST--IFN γ	抗 CD40_LC-- GST--IFN λ 2
HL 接头	抗 CD40_LC-- HL--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- HL--IFN β	抗 CD40_LC-- HL-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC--HL-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- HL--IFN γ	抗 CD40_LC-- HL--IFN λ 2
HL2 接头	抗 CD40_LC-- HL2--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- HL2--IFN β	抗 CD40_LC-- HL2-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC--HL2-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- HL2--IFN γ	抗 CD40_LC-- HL2--IFN λ 2
(G4S)2 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN β	抗 CD40_LC-- (G4S)2-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC-- (G4S)2-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN γ	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN λ 2
(G4S)3 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN β	抗 CD40_LC-- (G4S)3-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC-- (G4S)3-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN γ	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN λ 2
(G4S)4 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN α 2a	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN β	抗 CD40_LC-- (G4S)4-- IFN β _C17S	抗 CD40_LC-- (G4S)4-- IFN β _C17S,N80Q	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN γ	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN λ 2

[0205]

B	IFNϵ	IFNω
RL 接头	抗 CD40_LC-- RL--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- RL--IFN ω
GST 接头	抗 CD40_LC-- GST--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- GST--IFN ω
HL 接头	抗 CD40_LC-- HL--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- HL--IFN ω
HL2 接头	抗 CD40_LC-- HL2--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- HL2--IFN ω
(G4S)2 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFN ω
(G4S)3 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFN ω
(G4S)4 接头	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN ϵ	抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN ω

[0206] 在某些优选的实施方式中,将IFN通过接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端,如在表6A或表6B中所示。在这些实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链可以包含SEQ ID NO 3中所示序列。IFN α 2a可以包含SEQ ID NO 17中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。IFN β 可以包含SEQ ID NO 14中所示序列。IFN β _C17S可以包含SEQ ID NO 15中所示序列。IFN β _C17S,N80Q可以包含SEQ ID NO 16中所示序列。IFN γ 可以包含SEQ ID NO 19中所示序列。IFN λ 2可以包含SEQ ID NO 18中所示序列。IFN ϵ 可以包含SEQ ID NO 61中所示序列。IFN ω 可以包含SEQ ID NO 60中所示序列。所提及的接头是表7中所列的那些。

[0207] 在其中将IFN融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白还包括激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在更具体的实施方式中,轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列并且重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 12或者SEQ ID NO 50中所示序列。

[0208] 表6.融合至抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端的干扰素或其功能性片段。

A	IFN α 2a	IFN β	IFN β _C17S	IFN β _C17S,N80Q	IFN γ	IFN λ 2
RL 接头	IFN α 2a--RL-- 抗 CD40_LC	IFN β --RL-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- RL-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- RL--抗 CD40_LC	IFN γ --RL-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--RL-- 抗 CD40_LC
GST 接头	IFN α 2a--GST-- 抗 CD40_LC	IFN β --GST-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- GST-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- GST--抗 CD40_LC	IFN γ --GST-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--GST-- 抗 CD40_LC
HL 接头	IFN α 2a--HL-- 抗 CD40_LC	IFN β --HL-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- HL-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- HL--抗 CD40_LC	IFN γ --HL-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--HL-- 抗 CD40_LC
[0209] HL2 接头	IFN α 2a--HL2-- 抗 CD40_LC	IFN β --HL2-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- HL2-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- HL2--抗 CD40_LC	IFN γ --HL2-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--HL2-- 抗 CD40_LC
(G4S)2 接头	IFN α 2a-- (G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN β --(G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- (G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN γ --(G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--(G4S)2-- 抗 CD40_LC
(G4S)3 接头	IFN α 2a-- (G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN β --(G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- (G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN γ --(G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--(G4S)3-- 抗 CD40_LC
(G4S)4 接头	IFN α 2a-- (G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN β --(G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S-- (G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN β _C17S,N80Q-- (G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN γ --(G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN λ 2--(G4S)4-- 抗 CD40_LC

B	IFN ϵ	IFN ω
[0210] RL 接头	IFN ϵ --RL-- 抗 CD40_LC	IFN ω --RL-- 抗 CD40_LC

[0211] GST 接头	IFN ϵ --GST-- 抗 CD40_LC	IFN ω --GST-- 抗 CD40_LC
HL 接头	IFN ϵ --HL-- 抗 CD40_LC	IFN ω --HL-- 抗 CD40_LC
HL2 接头	IFN ϵ --HL2-- 抗 CD40_LC	IFN ω --HL2-- 抗 CD40_LC
(G4S)2 接头	IFN ϵ --(G4S)2-- 抗 CD40_LC	IFN ω --(G4S)2-- 抗 CD40_LC
(G4S)3 接头	IFN ϵ --(G4S)3-- 抗 CD40_LC	IFN ω --(G4S)3-- 抗 CD40_LC
(G4S)4 接头	IFN ϵ --(G4S)4-- 抗 CD40_LC	IFN ω --(G4S)4-- 抗 CD40_LC

[0212] 表7列出了包含在本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或其前体中的示例性序列。

[0213] 在示例性优选实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有选自SEQ ID NO 28-47的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。在其它示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有选自SEQ ID NO 62-69的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。在示例性优选实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有选自SEQ ID NO 28-47的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。在其它示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有选自SEQ ID NO 62-69的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0214] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 62中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 62中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0215] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 63中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 63中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0216] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 64中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 64中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0217] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 65中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 65中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0218] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 66中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 66中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0219] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 67中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 67中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0220] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 68中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 68中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0221] 在某些示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 69中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个示例性实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 69中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0222] 在更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有选自SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。在更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有选自SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43的序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0223] 在更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 38中所示

序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 38中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0224] 在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 39中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 39中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0225] 在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 40中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 40中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0226] 在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 41中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 41中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0227] 在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 42中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 42中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0228] 在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO 43中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。在另一个更优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白是含有SEQ ID NO 43中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性结合片段。

[0229] 表7.基于抗CD40抗体CP870,893的示例性干扰素相关抗原结合蛋白及其组分的序列。斜体序列对应于信号肽。SEQ ID NO 3和6中的粗斜体序列对应于CDR区。粗非斜体序列对应于接头。对突变的氨基酸加下划线。

[0230]

名称/SEQ ID 编号	序列
信号肽 1 (SEQ ID NO 1)	<i>MGWSCILFLVATATGVHS</i>
信号肽 2 (SEQ ID NO 2)	<i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC</i>
抗 CD40 抗体轻链 (SEQ ID NO 3)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIY TASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQ ANIFPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
具有信号肽 1 的抗 CD40 抗体轻链 (SEQ ID NO 4)	<i>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQ</i> <i>GIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFT</i> <i>LTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI</i> <i>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</i> <i>ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP</i> <i>VTKSFNRGEC</i>
具有信号肽 2 的抗 CD40 抗体轻链 (SEQ ID NO 5)	<i>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC</i> <i>RASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGS</i> <i>GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAP</i> <i>SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG</i> <i>NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL</i> <i>SSPVTKSFNRGEC</i>
抗 CD40 抗体重链 hIgG2 dK (SEQ ID NO 6)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYM HWVRQAPG QGLEWMG WINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNR LRSDDTAVYYCARD QPLGYCTNGVCSYFDY WGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNT KVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPG
具有信号肽 1 的抗 CD40 抗体重链 hIgG2 dK (SEQ ID NO 7)	<i>MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG</i> <i>YTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR</i> <i>VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVC</i> <i>SYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV</i> <i>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS</i> <i>NFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPS</i> <i>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE</i> <i>VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSN</i>

[0231]

	KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
具有信号肽 2 的抗 CD40 抗体重链 hIgG2 dK (SEQ ID NO 8)	<i>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</i> KASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCT NGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDWLNKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
抗 CD40 抗体重链 hIgG2 (SEQ ID NO 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQYTCNVDHKPSN TKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST RVVSVLTVDVHVDWLNKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
具有信号肽 1 的抗 CD40 抗体重链 hIgG2 (SEQ ID NO 10)	<i>MGWSCHILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</i> KASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVC SYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS NFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDWLNKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
具有信号肽 2 的抗 CD40 抗体重链 hIgG2 (SEQ ID NO 11)	<i>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC</i> KASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCT NGVCSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDVHVDWLNKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0232]

抗 CD40 抗体 hIgG1 重链-NNAS (SEQ ID NO 48)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
抗 CD40 抗体 hIgG1 重链-NNAS-dK (SEQ ID NO 49)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
抗 CD40 抗体 hIgG2 Fab 区重链 (SEQ ID NO 12)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCVE
具有信号肽 1 的抗 CD40 抗体 hIgG2 Fab 区重链 (SEQ ID NO 13)	MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVC SYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKCCVE
抗 CD40 抗体 hIgG2 Fab 区重链 --TEV--6His 标签 (SEQ ID NO 50)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCVEENLYFQSHHHHHH
IFN β (SEQ ID NO 14)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIQRDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGylRN
IFN β C17S (SEQ ID NO 15)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIQRDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYL

[0233]

	KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
IFN β C17S,N80Q (SEQ ID NO 16)	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWQETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRLHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
IFN α 2a (SEQ ID NO 17)	CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEK KYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
IFN λ 2 (SEQ ID NO 18)	VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLL LKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALATLKVLEAT ADTDPALVDVLDQPLHTLHHLSQFRACIQPQPTAGPRTGRRLHH WLYRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLTRDLNCVASGDLCV
IFN γ (SEQ ID NO 19)	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRK IMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKK RDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRS QMLFRGRRASQ
IFN ω (SEQ ID NO 60)	LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRDFRFPQEM VKGSQQLKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAAWNMTLLDQL HTGLHQQLQHLETCLLQVVGESESAGAISSPALTLRRYFQGIRV YLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQERLRSKDRDLGSS
IFN ϵ (SEQ ID NO 61)	LDLKLIFQQRQVNQESLKLNLKLTLSIQQCLPHRKNFLLPQKSL SPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQ LHQQLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRQLVKMYFRRIHDYL ENQDYSTCAWAIQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQE LTTEFRSPR
RL 接头 (SEQ ID NO 20)	PAPA
GST 接头 (SEQ ID NO 21)	SGGTSGSTSGTGS
HL 接头 (SEQ ID NO 22)	AEAAAKEAAAAA
HL2 接头 (SEQ ID NO 23)	AEAAAKEAAAAAAEAAAKEAAAAA
(G4S)2 接头 (SEQ ID NO 24)	GGGSGGGGS
(G4S)3 接头 (SEQ ID NO 25)	GGGSGGGSGGGGS
(G4S)4 接头 (SEQ ID NO 26)	GGGSGGGSGGGSGGGGS
TEV-6His 标签 (SEQ ID NO 27)	ENLYFQSHHHHHH

[0234]

抗 CD40_LC-- HL--IFN β (SEQ ID NO 28)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC AEAAAKEAA AK AMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI PEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVEN LLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
抗 CD40_LC-- HL--IFN β _C17S (SEQ ID NO 29)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC AEAAAKEAA AK AMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI PEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVEN LLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIL HYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--RL--IFN β (SEQ ID NO 30)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVDHWDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG PAP AMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQL NGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIF FRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR GKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFI NRLTGYLRLN
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--RL--IFN β _C17S (SEQ ID NO 31)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG QGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVDHWDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG PAP AMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLN GRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIF RQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRG KLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINR

[0235]

	LTGYLRN
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--HL--IFN β (SEQ ID NO 32)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVQHVDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGAEAAAKEAAAKAMSYNLLGFLQRSSNFQ CQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIY EMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEK LEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVE ILRNIFYFINRLTGYLRN
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--HL--IFN β _C17S (SEQ ID NO 33)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVQHVDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGAEAAAKEAAAKAMSYNLLGFLQRSSNFQ SQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIY EMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEK LEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVE ILRNIFYFINRLTGYLRN
抗 CD40_LC-- RL--IFN β (SEQ ID NO 34)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC PAPAMSYNL LGFLQRSSNFQ CQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQ FQKEDAALTIY EMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQ INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
抗 CD40_LC-- RL--IFN β _C17S (SEQ ID NO 35)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC PAPAMSYNL LGFLQRSSNFQ SQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQ FQKEDAALTIY EMLQNIFAIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQ

[0236]

	INHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKEY SHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
抗 CD40_LC-- GST--IFN β _C17S (SEQ ID NO 36)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SGGTSGSTS GTGSM SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFD IPPEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVE NLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN
抗 CD40_LC-- HL2--IFN β _C17S (SEQ ID NO 37)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC AEAAAKEAA AKAAEAAAKEAAK AMSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGR LEYCLKDRMNFDIPPEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQ DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKL MSSLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLT GYLRN
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--(G4S)2--IF N α 2a (SEQ ID NO 38)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGG SCDLPQTHSLGSRRLMLL AQMRSKISLFCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQI FNLFTSKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTE TPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKE
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--(G4S)3--IF N α 2a (SEQ ID NO 39)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGG SCDLPQTHSLGSRR

[0237]

	TLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQG VGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAE IMRSFSLSTNLQESLSRKE
抗 CD40_hIgG2_ dK_HC--(G4S)4--IF Nα2a (SEQ ID NO 40)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSSGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGGTLTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSCDLPQTH SLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKA ETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE
抗 CD40_LC-- (G4S)2--IFNα2a (SEQ ID NO 41)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG GSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEF GNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE
抗 CD40_LC-- (G4S)3--IFNα2a (SEQ ID NO 42)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGG GSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFG FPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLD KFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE
抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFNα2a (SEQ ID NO 43)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAW DETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE

[0238]

IFN β --(G4S)3-- 抗 CD40_LC) (SEQ ID NO 44)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR GGGGS GGGGS GGGGS DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQ KPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN β (SEQ ID NO 45)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGS GGG GSGGGSGGGGS MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEY CLKDRMNFDIPEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL R N
IFN β --(G4S)3-- 抗 CD40_HC_IgG1 NNAS-dK (SEQ ID NO 46)	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEI KQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLA NVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYL KAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR GGGGS GGGGS GGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHW VRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
抗 CD40_HC_Ig G1_NNAS_dK--(G4 S)4--IFN β (SEQ ID NO 47)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS YNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEIKQ LQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANV

[0239]

	YHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKA KEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
抗 CD40_hIgG2 dK_HC--HL--IFN α 2 A (SEQ ID NO 62)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLLTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG AEAAAKEAAKAC DLPQTHSLGSRRTLM LLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSLNLQESLSRKE
抗 CD40_LC-衍生物--HL--IFN α 2A (SEQ ID NO 63)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEKSLSLSPG AEAAAKEAAKAC DLPQTHSLGSRRTLM LLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMR SFSLSLNLQESLSRKE
抗 CD40_LC-- (G4S)4--IFN γ (SEQ ID NO 64)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGSGGGG GSGGGSGGGGS QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFL GILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMA ELSPAAGTGKRKRSQMLFRGRRASQ
抗 CD40_hIgG2 dK_HC--(G4S)4--IFN γ (SEQ ID NO 65)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLLTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVRKCCECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS QDPYVKE

[0240]

	AENLKKEYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVS FYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTKGRKRSQMLFRG RRASQ
抗 CD40 _{LC} -- (G4S)4--IFN λ 2 (SEQ ID NO 66)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGG GSGGGSGGGGS VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQA FKRAKDALEESLLKDCRCHSRLFPRTWDLRQLQVRERPMAL AELALTLKVLEATADTDPALVDVLDQPLHTLHHLSQFRACIQPQ PTAGPRTRGRLHHWLYRLQEAPKKESPGCLEASVTNLFRLLTR DLNCVASGDLCV
抗 CD40 _{hIgG2} dK _{HC} --(G4S)4--IF N λ 2 (SEQ ID NO 67)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYMHWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVDHWDNLNGKEYCKVKSNKGLPAIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS VPVARLH GALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLKDCRCH SRLFPRTWDLRQLQVRERPMALAEALALTLKVLEATADTDPALV DVLDQPLHTLHHLSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLYRLQE APKKESPGCLEASVTNLFRLLTRDLNCVASGDLCV
抗 CD40 _{LC} -- (G4S)4--IFN ω (SEQ ID NO 68)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGG GSGGGSGGGGS LGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLC LKDRRDFRFPQEMVKGSQQLQKAHVMSVLHEMLQIFSLFHTERS SAAWNMTLLDQLHTGLHQQLQHLETCLLQVVGEGESAGAISSP ALTLLRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSLFLSTNMQ ERLRSKDRDLGSS
抗 CD40 _{hIgG2} dK _{HC} --(G4S)4--IF N ϵ (SEQ ID NO 69)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYMHWRQAPG QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF

[0241]

RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEHA LHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLDLKLIIF QQRQVNQESLKLNLKLTLSIQQLPHRKNFLLPQKSLSPQQYQ KGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQLE YLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRQLQVKMYFRRIHDYLENQDYS TCAWAIVQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRS PR

[0242] 在优选的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白是包含来源于下表8,具体地表8A或表8B,更具体地表8A中所指明的那些的多肽,并且具体地来源于以上SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43所示多肽的多肽的干扰素融合的抗原结合蛋白。在优选的实施方式中,本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白是由来源于下表8,具体地表8A或表8B,更具体地表8A中所指明的那些的多肽,并且具体地来源于以上SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43所示多肽的多肽所组成的干扰素融合的抗原结合蛋白。在更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 38和SEQ ID NO 3中所示序列。在其它更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 39和SEQ ID NO 3中所示序列。在其它更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 40和SEQ ID NO 3中所示序列。在其它更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 41和SEQ ID NO 9中所示序列。在其它更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 42和SEQ ID NO 9中所示序列。在其它更优选的实施方式中,干扰素融合的抗体包含SEQ ID NO 43和SEQ ID NO 9中所示序列。

[0243] 表8.存在于本发明优选的干扰素融合的抗原结合蛋白中的多肽组合,它们相对于CD40和IFN-通路的激活的平均 EC_{50} 值和它们的生产能力(即每升培养物的得率)。在各自IFA中包含两次如所指示的每种序列组合。SN:上清液。

[0244] A

[0245]

干扰素融合 的抗体(IFA)	序列组合	CD40 EC_{50} (ng/mL)	IFN β EC_{50} (ng/mL)	IFN α EC_{50} (ng/mL)	生产能力 (mg/L)
IFA1	(SEQ ID NO 28) +(SEQ ID NO 9)	74,1	1,64		16,7
IFA2	(SEQ ID NO 29) +(SEQ ID NO 9)	111	0,14		17,8

[0246]

IFA8	(SEQ ID NO 30) +(SEQ ID NO 3)	39,7	2,9		6,45
IFA9	(SEQ ID NO 31) +(SEQ ID NO 3)	42,6	0,7		3,4
IFA10	(SEQ ID NO 32) +(SEQ ID NO 3)	26,5	4,5		6,9
IFA11	(SEQ ID NO 33) +(SEQ ID NO 3)	42,8	1,78		5,1
IFA12	(SEQ ID NO 34) +(SEQ ID NO 9)	105	3,64		21,2
IFA13	(SEQ ID NO 35) +(SEQ ID NO 9)	192	0,7		11,5
IFA19	(SEQ ID NO 36) +(SEQ ID NO 9)	110	1,3		5,6
IFA20	(SEQ ID NO 37) +(SEQ ID NO 9)	182	2,34		4,2
IFA25	(SEQ ID NO 38) +(SEQ ID NO 3)	13,3		5,1	21
IFA26	(SEQ ID NO 39) +(SEQ ID NO 3)	15,35		4	8,6
IFA27	(SEQ ID NO 40) +(SEQ ID NO 3)	17		2,4	9,3
IFA28	(SEQ ID NO 41) +(SEQ ID NO 9)	12,8		4,5	75
IFA29	(SEQ ID NO 42) +(SEQ ID NO 9)	11,1		2	56,6
IFA30	(SEQ ID NO 43) +(SEQ ID NO 9)	11,3		1,6	46,6
IFA34	(SEQ ID NO 44) +(SEQ ID NO 49)	活性(SN)	活性(SN)		无明显产生
IFA35	(SEQ ID NO 45) +(SEQ ID NO 49)	活性(SN)	活性(SN)		无明显产生
IFA36	(SEQ ID NO 46) +(SEQ ID NO 3)	活性(SN)	活性(SN)		无明显产生
IFA37	(SEQ ID NO 47) +(SEQ ID NO 3)	活性(SN)	活性(SN)		无明显产生

[0247] B

[0248]	干扰素融合的 抗体(IFA)	序列组合	CD40 EC ₅₀ (ng/mL)	IFN α EC ₅₀ (ng/mL)	IFN λ EC ₅₀ (ng/mL)	IFN γ EC ₅₀ (ng/mL)	IFN ϵ EC ₅₀ (ng/mL)	IFN ω EC ₅₀ (ng/mL)	生产能力 (mg/L)
	IFA38	(SEQ ID NO 62) +(SEQ ID NO 3)	22.7	3.77					1.32
	IFA39	(SEQ ID NO 63) +(SEQ ID NO 9)	17.5	2.95					1.25
	IFA42	(SEQ ID NO 64) +(SEQ ID NO 9)	65.6			15.4			0.72
	IFA43	(SEQ ID NO 65) +(SEQ ID NO 3)	50.8			<0.001			0.55
	IFA44	(SEQ ID NO 66) +(SEQ ID NO 9)	41.4		0.153				0.91
	IFA45	(SEQ ID NO 67) +(SEQ ID NO 3)	25.8		<0.001				1.09
	IFA46	(SEQ ID NO 68) +(SEQ ID NO 9)	86.3					0.493	0.89
	IFA49	(SEQ ID NO 69) +(SEQ ID NO 3)	65.8				78.2		0.61
	IFA50	(SEQ ID NO 41) +(SEQ ID NO 50)	128	1.36					0.57
	IFA51	(SEQ ID NO 42) +(SEQ ID NO 50)	123	1.43					0.48

[0249] 核酸和表达载体

[0250] 在一个方面,提供了编码干扰素相关抗原结合蛋白的多核苷酸的组合。还提供了制备干扰素相关抗原结合蛋白的方法,其包括表达这些多核苷酸。

[0251] 在一些实施方式中,提供了如本文所公开的编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段的核酸。在某些示例性实施方式中,根据SEQ ID NO 62至69中所示的任何序列或者与编码任何这些序列的核酸具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的核酸序列,所述核酸编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段。在某些示例性实施方式中,所述核酸与编码任何SEQ ID NO 62至69的核酸具有至少95%、至少98%或至少99%的同一性。在优选的实施方式中,根据SEQ ID NO 28至47中所示的任何序列或者与编码任何这些序列的核酸具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的同一性的核酸序列,所述核酸编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段。在更具体的实施方式中,所述核酸与编码任何SEQ ID NO 28至47的核酸具有至少95%、至少98%或至少99%的同一性。

[0252] 在其中核酸编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的那些实施方式中,所述核酸还可以编码激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或SEQ ID NO 50中所示序列或者与编码任何这些序列的核酸具有至少80%、至少85%、至少90%、至少

95%、至少98%或至少99%的同一性的核酸序列。在更具体的实施方式中,所述核酸与编码SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或SEQ ID NO 50的核酸具有至少95%、至少98%或至少99%的同一性。

[0253] 在其中核酸编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的IFN或其功能性片段的那些实施方式中,所述核酸还可以编码激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。在更具体的实施方式中,激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 5中所示序列,或者与编码任何这些序列的核酸具有至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或者至少99%的同一性的核酸序列。在更具体的实施方式中,所述核酸与编码SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4或者SEQ ID NO 5的核酸具有至少95%、至少98%或至少99%的同一性。

[0254] 在某些实施方式中,本文所描述的核酸可以包含编码提高得率(例如,溶解度标签)或者帮助所表达的蛋白纯化(即纯化标签)的序列的序列。纯化标签是本领域技术人员已知的并且可以选自谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签、调钙蛋白结合肽(CBP)标签、内含肽(intein)-几丁质结合域(内含肽-CBD)标签、抗生蛋白链菌素/生物素基标签(如生物素化信号肽(BCCP)标签)、抗生蛋白链菌素-结合肽(SBP)标签、His-patch ThioFusion标签、串联亲和纯化(TAP)标签、小泛素样调节剂(SUMO)标签、**HaloTag®** (Promega)、Profinity eXact™系统(Bio-Rad)。在一些实施方式中,纯化标签可以是多组氨酸标签(例如,His₆-、His₇-、His₈-、His₉-或His₁₀-标签)。在其它实施方式中,纯化标签可以是Strep-标签(例如,Strep-tag®或者Strep-tag II®; IBA Life Sciences)。在其它实施方式中,纯化标签可以是麦芽糖结合蛋白(MBP)标签。

[0255] 在一些实施方式中,核酸序列还可以包含编码用于除去纯化标签的切割位点的序列。这些切割序列是本领域技术人员已知的并且可以选自内切蛋白酶或外切蛋白酶识别和切割的序列。在一些实施方式中,用于除去纯化标签的内切蛋白酶可以选自:肠肽酶、凝血酶、因子Xa、TEV蛋白酶或鼻病毒3C蛋白酶。在一些实施方式中,用于除去纯化标签的外切蛋白酶可以选自:羧肽酶A、羧肽酶B或者DAP酶。在优选的实施方式中,用于除去纯化标签的蛋白酶为TEV蛋白酶。在更具体的优选实施方式中,核酸包含编码His₆-标签和TEV切割位点的序列。在更具体的优选实施方式中,所述核酸包含编码SEQ ID NO 27中所示序列的序列。

[0256] 本发明的核酸分子还可以包含编码信号肽的序列。技术人员知道对于将所表达的蛋白引导至所期望的折叠位点、组装和/或成熟以及引起最终蛋白向培养基中的分泌以辅助下游过程可用的多种信号肽。因此,在一些实施方式中,信号肽是分泌性信号肽。所编码的信号肽可以包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中所示序列。在一些实施方式中,信号肽包含SEQ ID NO:1中所示序列。在其它实施方式中,信号肽包含SEQ ID NO:2中所示序列。

[0257] 将信号肽1(SEQ ID NO 1)用于合成如以下所示的多肽序列:SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 30、SEQ ID NO 31、SEQ ID NO 32、SEQ ID NO 33、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 35、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 37、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 45、SEQ ID NO 46、SEQ ID NO 47或SEQ ID NO 50。在合成期间切割初始存在于各自多肽序列的N-末端的这些信号肽。

[0258] 将信号肽2(SEQ ID NO 2)用于合成SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42和SEQ ID NO 43中所示的多肽序列。在合成期间切割初始存

在于相应多肽序列的N-末端的这些信号肽。

[0259] 对于SEQ ID NO 62、SEQ ID NO 63、SEQ ID NO 64、SEQ ID NO 65、SEQ ID NO 66、SEQ ID NO 67、SEQ ID 68和SEQ ID NO 69中所示的多肽序列的合成,使用了信号肽MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO 1)。在合成期间切割初始存在于各自多肽序列的N-末端的这些信号肽。

[0260] 通常将编码融合至如本文所公开的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段的多核苷酸插入表达载体以用于引入到可以用于产生所期望的量的所要求保护的干扰素相关抗原结合蛋白的宿主细胞中。因此,在某些方面,本发明提供了包含本文所公开的多核苷酸的表达载体和包含这些载体和多核苷酸的宿主细胞。

[0261] 在本文中,出于说明书和权利要求的目的使用术语“载体”或“表达载体”以表示根据本发明作为引入到并在细胞中表达所期望的基因的媒介物使用的载体。如本领域技术人员已知的,这些载体可以容易地选自由质粒、噬菌体、病毒和反转录病毒组成的组。通常,与本发明相容的载体将包含选择标志物、适合的限制性位点以有助于所期望的基因的克隆以及进入和/或在真核或原核细胞中复制的能力。

[0262] 多种表达载体体系可以用于本发明的目的。例如,一类载体利用来源于动物病毒,如牛乳头状瘤病毒、多形瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、反转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或者SV40病毒的DNA元件。其它包括具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统的使用。另外,可以通过引入允许选择转染的宿主细胞的一种或多种标志物来选择已将DNA整合到它们的染色体中的细胞。标志物可以为营养缺陷型宿主提供原养,提供杀生物剂耐受性(例如,抗生素)或者对重金属,如铜的耐受性。可以将可选择标志物基因直接连接至要表达的DNA序列,或者通过共转化引入相同细胞。对于mRNA的最优合成,还可以需要其它元件。这些元件可以包括信号序列、剪接信号和转录启动子、增强子和终止信号。在一些实施方式中,将克隆的可变区基因(它们中的一个与编码IFN或其功能性片段的基因融合)与如以上所讨论的合成的重链和轻链恒定区基因(如人基因)一起插入表达载体。

[0263] 在其它实施方式中,本发明的载体体系可以包含多于一种载体。在一些实施方式中,载体体系可以包含用于融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的表达的第一载体和用于激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的表达的第二载体。作为另外一种选择,这种载体体系可以包含用于融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的表达的第一载体和用于激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的表达的第二载体。

[0264] 在其它实施方式中,可以使用多顺反子构建体表达如本文所描述的干扰素相关抗原结合蛋白。在这些表达系统中,可以从单一多顺反子构建体产生所关心的多基因产物,如编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段和编码所述抗体的轻链的那些,或者编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段和编码所述抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的那些。这些系统有利地使用了内部核糖体进入位点(IRES)以在真核宿主细胞中提供相对高水平的多肽。在美国专利号6,193,980中公开了相容的IRES序列,该专利作为参考并入本文。本领域技术人员将理解这些表达系统可以用于有效产生在本申请中所公开的完整的多肽范围。

[0265] 更一般地,一旦制备了编码本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的载体或DNA序列,则可以将表达载体引入适合的宿主细胞。也就是说,可以转化宿主细胞。可以通过本领域技术人员熟知的多种技术来完成质粒向宿主细胞的引入。这些包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、细胞与包膜DNA的融合、微注射和用完整病毒感染。参见,例如,Ridgway,A.A.G. “Mammalian Expression Vectors” 第24.2章,第470-472页, Vectors,Rodriguez和Denhardt主编 (Butterworths,Boston,MA 1988)。将转化的细胞在适合于产生轻链和重链的条件下生长,并对于重链和/或轻链蛋白质合成进行测定。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或者荧光-激活的细胞分选分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0266] 如本文所使用的,术语“转化”应以广泛含义使用以表示DNA向受体宿主细胞的引入,这改变了受体细胞的基因型并因此导致受体细胞改变。

[0267] 沿着相同思路,“宿主细胞”表示已用使用重组DNA技术构建并且编码至少一种异源基因的载体转化的细胞。除非明确指明,否则在用于从重组宿主分离多肽的方法的描述中,术语“细胞”和“细胞培养物”是可互换使用的以表示干扰素相关抗原结合蛋白的来源。换言之,从“细胞”回收多肽可以表示从旋转沉淀的完整细胞或者从含有培养基和混悬细胞两者的细胞培养物回收。

[0268] 在一个实施方式中,用于干扰素相关抗原结合蛋白的表达的宿主细胞系是真核或原核来源的。如本文所使用的,术语“表达”可以包括多于一种多肽链(如干扰素相关抗原结合蛋白的抗体部分的重链和轻链)的转录和翻译,它们结合以形成最终的干扰素相关抗原结合蛋白。在一个实施方式中,用于干扰素相关抗原结合蛋白的表达的宿主细胞系是细菌来源的。在一个实施方式中,用于干扰素相关抗原结合蛋白的表达的宿主细胞系是哺乳动物来源的;本领域技术人员可以确定最适合于在其中表达所期望的基因产物的具体的宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于来自Horizon的CHO K1 GS敲除(knockout)细胞系、DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系、DHFR减)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(具有SV40 T抗原的CVI的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、HEK 293(人肾)。在优选的实施方式中,可以使用HEK FS S11/254细胞。在另一个优选的实施方式中,可以使用来自Horizon的CHO K1 GS。在一个实施方式中,细胞系提供了由此表达的抗体的改变的糖基化,例如,岩藻糖基化(例如, **PER.C6®** (CruCell) 或者FUT8-敲除(knock-out)CHO细胞系(POTELLIGENT™细胞)(Biowa,Princeton,NJ))。在一个实施方式中,可以使用NS0细胞。宿主细胞系通常得自商业服务、美国组织培养物收藏中心或者发表的文獻。

[0269] 在一个实施方式中,用于干扰素相关抗原结合蛋白的表达的宿主是非人转基因动物或转基因植物。

[0270] 还可以通过产生对于所关心的序列转基因的非人动物(例如,哺乳动物)或植物并由此产生处于可回收形式的干扰素相关抗原结合蛋白来转基因产生本发明的干扰素相关抗原结合蛋白。结合哺乳动物中的转基因生产,可以在山羊、牛或其它哺乳动物的乳汁中生产和回收干扰素相关抗原结合蛋白。参见,例如,美国专利号5,827,690、5,756,687、5,750,172和5,741,957。示例性植物宿主为烟草、拟南芥、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等。对于在植物

中表达抗体的方法,包括启动子和载体的描述以及植物转化在本领域中是已知的。参见,例如,美国专利6,517,529,其作为参考并入本文。在一些实施方式中,通过使用标准转基因技术将编码本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的一种或多种核酸分子引入动物或植物来产生非人转基因动物或植物。参见Hogan和美国专利6,417,429。用于制备转基因动物的转基因细胞可以是胚胎干细胞或体细胞。转基因非人生物可以是嵌合、非嵌合杂合子和非嵌合纯合子。参见,例如,Hogan等人,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual 第2版,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press)(1999);Jackson等人,Mouse Genetics and Transgenics:A Practical Approach,牛津大学出版社(2000);和Pinkert, Transgenic Animal Technology:A Laboratory Handbook,学术出版社(1999)。在一些实施方式中,转基因非人动物通过编码所关心的序列的靶向构建体具有靶向破裂和替换。可以在任何转基因动物中制备干扰素相关抗原结合蛋白。在优选的实施方式中,非人动物为小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。非人转基因动物在血液、乳汁、尿液、唾液、泪液、粘液及其它体液中表达所述干扰素相关抗原结合蛋白。

[0271] 体外生产允许放大以提供大量所期望的干扰素相关抗原结合蛋白。在组织培养条件下用于哺乳动物细胞培养的技术在本领域中是已知的并且包括均匀悬浮培养,例如,在气升式反应器中或者在连续搅拌反应器中,或者固定化或包埋细胞培养,例如,在中空纤维、微胶囊中、琼脂糖微珠或陶瓷柱上。如有必要和/或如果期望,可以通过常规色谱方法,例如,凝胶过滤、离子交换色谱、在DEAE-纤维素上的色谱法和/或(免疫)亲和色谱法纯化干扰素相关抗原结合蛋白的溶液。

[0272] 还可以在非哺乳动物细胞,如细菌或酵母或植物细胞中表达编码干扰素相关抗原结合蛋白的一个或多个基因。在这方面,将理解还可以转化多种单细胞非哺乳动物微生物,如细菌;即能够在培养物或发酵中生长的那些。对转化敏感的细菌包括肠杆菌科的成员,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或者沙门氏菌(*Salmonella*)的株;芽孢杆菌科(Bacillaceae),如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。还将理解当在细菌中表达时,根据本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或其组分(即激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和IFN或IFN的功能性片段)可以成为包涵体的一部分。然后,可能需要分离,任选地还需要重折叠和纯化所期望的干扰素相关抗原结合蛋白。

[0273] 除原核生物之外,还可以使用真核微生物。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常见的面包酵母是真核微生物中最常用的,尽管一些其它株通常是可用的。对于酵母菌(*Saccharomyces*)中的表达,例如,质粒YRp7(Stinchcomb等人,Nature,282:39(1979);Kingsman等人,Gene,7:141(1979);Tschemper等人,Gene,10:157(1980))是常用的。该质粒已含有TRP1基因,其为缺少在色氨酸中生长的能力的酵母突变株提供了选择标志物,例如,ATCC No.44076或者PEP4-1(Jones,Genetics,85:12(1977))。然后,作为酵母宿主细胞基因组的特征的trp1病变的存在通过在不存在色氨酸的情况下的生长提供了检测转化的有效环境。

[0274] 治疗性载体

[0275] 可以将编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列插入载体并用作治疗性载体,例如,表达本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的载体。适合的功能性表达构建体和治疗性表

达载体的构建是本领域的技术人员已知的。因此,在某些实施方式中,可以通过使用编码干扰素相关抗原结合蛋白的RNA或DNA序列、载体或载体体系的基因递送,向受试者施用干扰素相关抗原结合蛋白。

[0276] 可以通过例如静脉内注射、局部施用(参见美国专利号5,328,470)或者通过立体定向注射(参见,例如,Chen等人,PNAS 91:3054-3057(1994))将治疗性载体递送至受试者。治疗性载体的药物制剂可以包括处于可用的稀释剂中的载体。

[0277] 可以将一种或多种干扰素相关抗原结合蛋白编码核酸引入基因构建体以用做治疗法规程的一部分以递送编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸。提供了用于干扰素相关抗原结合蛋白的体内转染和表达的表达载体。

[0278] 如本领域技术人员已知的,可以在任何生物学有效的载体,例如,能够将组成核酸序列体内有效递送至细胞的任何制剂或组合物中施用这些组分的表达构建体。方法包括但不限于主题核酸序列在病毒载体中的插入,所述病毒载体包括但不限于重组反转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒和单纯疱疹病毒-1、重组细菌或真核质粒等。

[0279] 反转录病毒载体和腺相关病毒载体可以用作外源核酸序列,具体地向人中体内转移的重组递送系统。这些载体提供了基因向细胞的有效递送,并且所转移的核酸可以稳定整合到宿主的染色体DNA中。

[0280] 仅产生复制-缺陷型反转录病毒的特化细胞系(称为“包装细胞”)的开发提高了反转录病毒用于基因疗法的应用,并且缺陷型反转录病毒的特征在于出于基因疗法目的在基因转移中的使用(有关综述,参见,例如,Miller,Blood 76:271-78(1990))。可以将复制-缺陷型反转录病毒包装到病毒颗粒中,其可以通过标准技术,通过使用辅助病毒感染靶细胞。用于产生重组反转录病毒以及使用这些病毒体外或体内感染细胞的规程可见于Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等人(主编)Greene Publishing Associates,(1989),第9.10-9.14节,及其它标准实验室手册。适合的反转录病毒的非限制性实例包括pLJ、pZIP、pWE和pEM,这是本领域那些技术人员已知的。适合的包装病毒系的实例包括*Crip、*Cre、*2和*Am。(参见,例如,Eglitis等人,Science 230:1395-1398(1985);Danos and Mulligan,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460-6464(1988);Wilson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:3014-3018(1988);Armentano等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:6141-6145(1990);Huber等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8039-8043(1991);Ferry等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8377-8381(1991);Chowdhury等人,Science 254:1802-1805(1991);van Beusechem等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7640-7644(1992);Kay等人,Human Gene Therapy 3:641-647(1992);Dai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10892-10895(1992);Hwu等人,J.Immunol.150:4104-4115(1993);美国专利号4,868,116;美国专利号4,980,286;PCT申请WO 89/07136;PCT申请WO 89/02468;PCT申请WO 89/05345;和PCT申请WO 92/07573)。

[0281] 在另一个实施方式中,提供了腺病毒来源的递送载体。可以操纵腺病毒基因组,从而它编码和表达所关心的基因产物,但是就其在正常溶胞病毒生命周期中的复制能力而言失活。参见,例如,Berkner等人,BioTechniques 6:616(1988);Rosenfeld等人,Science 252:431-434(1991);和Rosenfeld等人,Cell 68:143-155(1992)。来源于腺病毒株Ad 5型d1324或者其它腺病毒株(例如,Ad2、Ad3、Ad7等)的适合的腺病毒载体是本领域那些技术人

员已知的。在某些情况下,重组腺病毒可以是有利的,其中它们不能够感染非分裂细胞并且可以用于感染多种细胞类型,包括上皮细胞(Rosenfeld等人,(1992),如上)。此外,病毒颗粒是相对稳定的并且能够进行纯化和浓缩,并且如上所述,可以改变以影响感染性谱。另外,所引入的腺病毒DNA(和其中所含的外源DNA)不能整合到宿主细胞基因组中,而仍是游离基因,借此避免可以由于其中所引入的DNA整合到宿主基因组(例如,反转录病毒DNA)的原位插入诱变所造成的潜在问题。此外,相对于其它递送载体,用于外源DNA的腺病毒基因组的携带容量较大(多至8千碱基)(Berkner等人,(1998),如上;Haj-Ahmand和Graham, J.Virol.57:267(1986))。

[0282] 用于编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列的递送的另一种病毒载体体系是腺病毒相关病毒(AAV)。AAV是天然存在的缺陷病毒,其需要另一种病毒,如腺病毒或疱疹病毒作为有效复制和生产性生命周期的辅助病毒。(有关综述,参见Muzyczka等人, Curr.Topics in Micro.and Immunol.158:97-129(1992))。它还是可以将其DNA整合到非分裂细胞中的少数病毒之一,并且显示出高稳定整合频率(参见,例如Flotte等人, Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.7:349-356(1992);Samulski等人, J.Virol.63:3822-3828(1989);和McLaughlin等人, J.Virol.62:1963-1973(1989))。可以包装含有AAV少至300个碱基对的载体并且它可以整合。外源DNA的空间受限于约4.5kb。AAV载体,如Tratschin等人, Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985)中所述的载体可以用于将DNA引入细胞。已使用AAV载体将多种核酸引入不同细胞类型(参见,例如,Hermonat等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6466-6470(1984);Tratschin等人, Mol.Cell.Biol.4:2072-2081(1985);Wondisford等人, Mol.Endocrinol.2:32-39(1988);Tratschin等人, J.Virol.51:611-619(1984);和Flotte等人, J.Biol.Chem.268:3781-3790(1993))。

[0283] 除病毒转移法之外,非病毒方法也可以用于引起编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列在受试者组织中的表达。大部分基因转移的非病毒方法依赖于哺乳动物细胞用于吸收和胞内转运大分子的正常机制。在一些实施方式中,非病毒递送系统依赖于靶细胞吸收主题基因的内吞途径。这种类型的示例性递送系统包括脂质体来源的系统、聚赖氨酸缀合物和人工病毒包膜。其它实施方式包括质粒注入系统,如Meuli等人, J.Invest.Dermatol.116(1):131-135(2001);Cohen等人, Gene Ther 7(22):1896-905(2000);或Tam等人, Gene Ther.7(21):1867-74(2000)中所描述的。

[0284] 在临床环境中,可以通过任何一些方法将递送系统引入受试者,每种方法在本领域中均是常见的。例如,可以全身,例如,通过静脉内注射引入递送系统的药物制剂。蛋白在靶细胞中的特异性转导主要因递送媒介物所提供的转染特异性、由于控制受体基因表达的转录调控序列所造成的细胞类型或组织类型表达或它们的组合而发生。在其它实施方式中,由于向动物中的引入处于相当小的范围,因此重组基因的初始递送更受限。例如,可以通过导管(参见,美国专利号5,328,470)或者通过立体定向注射(例如,Chen等人, PNAS 91:3054-3057(1994))引入递送媒介物。

[0285] 治疗构建体的药物制备可以基本由处于可用的稀释剂中的递送系统组成或者可以包含其中包埋递送媒介物的缓释基质。作为另外一种选择,当可以从重组细胞完整产生整个递送系统,例如,反转录病毒载体时,药物制剂可以包含一个或多个细胞,其产生递送系统。

[0286] 治疗方法

[0287] 在一个方面,如本文所公开的,本发明提供了治疗对其有需要的患者(例如,感染HBV的患者)的方法,其包括施用有效量的干扰素相关抗原结合蛋白或者编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列(例如,mRNA)。如本文所公开的,本发明还提供了干扰素相关抗原结合蛋白或者编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列(例如,mRNA)在药物制备中的使用。更具体地,如本文所公开的,本发明提供了干扰素相关抗原结合蛋白或编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列(例如,mRNA)在用于治疗病症和/或症状,例如,HBV-相关病症和/或HBV-相关症状的药物制备中的使用。在某些实施方式中,本发明提供了用于治疗需要这种治疗的哺乳动物受试者中的病症和/或症状,例如,HBV相关病症和/或HBV-相关症状的试剂盒和方法。在某些示例性实施方式中,受试者是人。

[0288] 本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列在一些不同应用中是有用的。例如,在一个实施方式中,主题干扰素相关抗原结合蛋白或编码它们的核酸序列在减少HBV-感染细胞的HBeAg释放中是有用的。在一些实施方式中,本发明的干扰素相关抗原结合蛋白将原代肝细胞的体外HBeAg释放在1ng/mL时减少了至少10%,在1ng/mL时减少了至少20%,在1ng/mL时减少了至少30%,在1ng/mL时减少了至少40%,在1ng/mL时减少了至少50%,在1ng/mL时减少了至少60%,在1ng/mL时减少了至少70%,在1ng/mL时减少了至少80%或者在1ng/mL时减少了至少85%。在一些实施方式中,本发明的干扰素相关抗原结合蛋白将原代肝细胞的体外HBeAg释放在1ng/mL时减少了至少12%。在一些实施方式中,本发明的干扰素相关抗原结合蛋白将原代肝细胞的体外HBeAg释放在1ng/mL时减少了多至90%。在相关实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白以小于30ng/mL的EC₅₀,优选地以小于10ng/mL的EC₅₀,更优选地以小于1ng/mL的EC₅₀减少HBeAg释放。

[0289] 在另一个实施方式中,主题干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列对于减少HBV-感染细胞中cccDNA的pgRNA转录是有用的。

[0290] 在另一个实施方式中,如本文(下文)所描述的,主题干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列对于减少与HBV感染有关的一种或多种症状和/或并发症是有用的。

[0291] 在某些实施方式中,主题干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列对减少与慢性HBV感染有关的一种或多种病症、症状和/或并发症是有用的,例如,肝脏的慢性炎症(慢性肝炎),其在几年内导致肝硬化;肝细胞癌(HCC);膜性肾小球肾炎(MGN)的出现;死亡风险;急性坏死性脉管炎(多发性结节性动脉炎)、膜性肾小球肾炎和儿童丘疹肢皮炎(奇柯二氏综合征);HBV相关肾病(例如,膜性肾小球肾炎);免疫-介导的血液学病症(例如,特发性混合性冷球蛋白血症、再生障碍性贫血)等。

[0292] 在某些实施方式中,主题干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列对于减少与急性HBV感染有关的一种或多种症状和/或并发症是有用的,例如,急性病毒性肝炎(其开始是一般的不适、食欲不振、恶心、呕吐、身体疼痛、微热和小便黄赤,然后发展出现黄疸、暴发性肝衰竭和/或血清-疾病样综合征);食欲不振;关节和肌肉疼痛;微热;胃疼;恶心;呕吐;黄疸;胃胀等。

[0293] 因此,本发明还涉及通过向这些人或动物施用有效、无毒的量的干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它的核酸序列,治疗人或其它动物中与HBV感染有关的一种或多种病症、症状和/或并发症的方法。本领域技术人员将能够通过常规实验来确定出于治疗HBV感染的

目的的干扰素相关抗原结合蛋白或编码它的核酸序列的有效、无毒的量。

[0294] 例如,可以根据以下因素改变本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的“治疗活性的量”,如疾病阶段(例如,急性与慢性)、年龄、性别、医学并发症(例如,HIV共感染、免疫抑制病况或疾病)和受试者体重以及干扰素相关抗原结合蛋白在受试者中引起所期望的反应的能力。可以调节剂量方案以提供最优的治疗反应。例如,可以每天施用几个划分剂量,或者可以如治疗情况的紧急性所指示的,按比例降低剂量。

[0295] 通常,本发明所提供的组合物可以用于预防性治疗非感染细胞或者治疗性治疗任何包含允许通过干扰素相关抗原结合蛋白靶向HBV-感染细胞的抗原标志物的HBV-感染细胞。

[0296] 药物组合物及其施用

[0297] 在某些实施方式中,在药物组合物中包含了本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或编码它们的核酸序列(包括载体或载体体系)。制备和向受试者施用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或编码它们的核酸序列的方法是本领域技术人员熟知的或者使用本说明书和本领域中的知识作为指导可以容易地确定的。本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列的施用途径可以是口服、肠胃外、通过吸入或局部施用。如本文所使用的,术语“肠胃外”包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道施用。尽管将所有这些施用形式明确考虑为在本发明的范围内,但是用于施用的形式将是注射溶液,具体地用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。通常,适合于注射的药物组合物可以包含缓冲剂(例如,乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯),任选地稳定剂(例如,人白蛋白)等。在一些实施方式中,缓冲剂是乙酸盐。在另一个实施方式中,缓冲剂为甲酸盐。在另一个实施方式中,缓冲剂为柠檬酸盐。在相关实施方式中,表面活性剂可以选自包括普卢兰尼克(pluronic)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇和泰洛沙泊(tyloxapol)的列表。在优选的实施方式中,表面活性剂为聚山梨醇酯。在更优选的实施方式中,表面活性剂为聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80或者聚山梨醇酯100,优选地聚山梨醇酯20或者聚山梨醇酯80。

[0298] 在一些实施方式中,可以将干扰素相关抗原结合蛋白或者编码它们的核酸序列直接递送至不利细胞群体(例如,肝脏)位点,借此提高患病组织对治疗剂的暴露。

[0299] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水或非水溶液、混悬液和乳液。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油,如橄榄油和可注射有机酯,如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲媒介物。在本发明的组合物和方法中,药学上可接受的载体包括但不限于0.01-0.1M,例如,0.05M磷酸盐缓冲液,或者0.8%盐水。其它常见的肠胃外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐林格氏液或者固定油类。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些等。还可以存在防腐剂及其它添加剂,诸如,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。更具体地,适合于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(当水溶性时)或分散系和用于无菌可注射溶液或分散系的即时制备的无菌粉末。在这些情况下,所述组合物必须是无菌的并且在存在易于可注射性的程度上应是流体。它在生产和储存条件下应是稳定的,并且通常将以抵抗微生物,如细菌和真菌的污染作用而保存。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适合的混合物的溶剂或分散媒介。

可以例如通过使用涂层,如卵磷脂,就分散系来说通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0300] 可以通过多种抗细菌和抗真菌剂,例如,对羟苯甲酸、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现对微生物作用的防止。在多数情况下,在所述组合物中将包括等张剂,例如,糖、多元醇,如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠。可以通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂,例如,单硬脂酸铝和明胶来造成可注射组合物的延长吸收。

[0301] 在任何情况下,可以根据需要通过在具有本文所列举的一种成分或成分组合的适合溶剂中以所需的量单独或与其它活性剂结合引入活性化合物,如本发明的干扰素相关抗原结合蛋白或编码所述干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列,然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过在无菌媒介物中掺入活性化合物来制备分散系,所述媒介物包含基本的分散媒介和来自以上列举的那些的所要求的其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,示例性制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,这些干燥方法从其先前的无菌-过滤溶液中获得活性成分加任何其它所期望的成分的粉末。根据本领域中已知的方法,处理用于注射的制剂,将其填充到容器,如安瓿、袋、瓶、注射器或小瓶中,并在无菌条件下密封。此外,可以将制剂包装并以试剂盒的形式出售。这些制品通常将具有指示相关组合物对于治疗患有HBV感染的受试者有用的标签或包装说明书。

[0302] 基于多种不同因素,包括施用方式、靶标位点、患者生理状态、患者是人还是动物、所施用的其它药物治疗和治疗是预防性的还是治疗性的,改变本发明的组合物用于治疗上述HBV感染-相关病况的有效剂量。通常,患者是人,但是还可以治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物,具体地非人灵长类动物。可以使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和效力。

[0303] 对于使用干扰素相关抗原结合蛋白的治疗,剂量可以在例如约0.0001至约100mg/kg,并且更通常地约0.01至约5mg/kg(例如,约0.02mg/kg、约0.25mg/kg、约0.5mg/kg、约0.75mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg等)宿主体重的范围内。例如,剂量可以是约1mg/kg体重或者约10mg/kg体重或者在约1至约10mg/kg的范围内,例如,至少约1mg/kg。上述范围中的剂量中间值也旨在处于本发明的范围内。可以每天、每隔一天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它时间表向受试者施用这些剂量。示例性治疗导致在例如至少6个月的持续期内以多个剂量进行施用。其它示例性治疗方案导致大约每两周施用一次或者大约每个月施用一次或者每3至6个月施用一次。示例性剂量时间表包括连续每天约1至约10mg/kg或约15mg/kg,每隔一天约30mg/kg或者每周约60mg/kg。

[0304] 可以在多种情况下施用干扰素相关抗原结合蛋白或者表达任何这些的核酸序列。单次剂量之间的间隔可以是每周、每个月或每年。如通过测量患者中干扰素相关抗原结合蛋白或其组分的血液水平所指示的,间隔还可以是不定期的。作为另外一种选择,可以作为缓释制剂施用干扰素相关抗原结合蛋白或者表达任何这些的核酸序列,在此情况下需要不太频繁的施用。基于干扰素相关抗原结合蛋白在患者中的半衰期来改变剂量和频率。

[0305] 如本文所提及的,术语“半衰期”或“ $t_{1/2}$ ”表示化合物,如本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的稳定性和/或排泄速率。实际上,通常测量血清中化合物的半衰期并将其表示为施用后血清浓度为施用时血清浓度的50%时的时间。本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的特征在于在小鼠中的长血清半衰期。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的半衰

期为至少50h、至少60h、至少70h、至少80h、至少90h或至少100h。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的半衰期为至少100h。在优选的实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白在小鼠中的半衰期在116至158h的范围内。

[0306] 蛋白的半衰期与其清除有关。如本文所使用的,术语“清除”或“清除率”是指每单位时间清除所述蛋白的血浆容积。本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的清除较低。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的清除低于10mL/h/kg、低于5mL/h/kg、低于2.5mL/h/kg、低于1mL/h/kg或低于0.5mL/h/kg。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的清除低于5mL/h/kg。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的清除低于1mL/h/kg。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白在小鼠中的清除在0.28至0.49mL/h/kg的范围内。

[0307] 如本文所使用的,术语“分布容积”、“ V_D ”、“ V_{ss} ”或“表观分布容积”是指以在血浆中所观察到的相同浓度含有所施用的化合物,如本发明的干扰素相关抗原结合蛋白的总量所必需的理论容积,并且表示在口服或肠胃外剂量施用后所述化合物在血浆和身体其它部分之间的分布。在某些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的分布容积 V_{ss} 低于500mL/kg、低于400mL/kg、低于300mL/kg、低于200mL/kg或低于100mL/kg。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的分布容积 V_{ss} 低于100mL/kg。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白在小鼠中的分布容积 V_{ss} 在50至98mL/kg的范围内。

[0308] 另一个相关药物动力学参数是全身暴露。如本文所使用的,术语“全身暴露”、“AUC”或者“曲线下面积”表示浓度-时间曲线的积分。全身暴露可以由母体化合物和/或代谢产物的血浆(血清或血液)浓度或AUC表示。本发明的干扰素相关抗原结合蛋白以大于它们的亲代抗体(CP870,893)的全身暴露(AUC(0-inf))在血液中循环。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白的全身暴露为至少600 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$,至少700 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$,至少800 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$,至少900 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 或至少1000 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$,优选地至少1000 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 。在一些实施方式中,干扰素相关抗原结合蛋白在小鼠中的全身暴露在1033 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 至1793 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 的范围内。

[0309] 如先前所讨论的,可以以药物有效量施用本发明的干扰素相关抗原结合蛋白以用于哺乳动物病症的体内治疗。在这方面,将理解如公开的,配制干扰素相关抗原结合蛋白以帮助活性剂的施用和促进活性剂的稳定性。

[0310] 根据本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的、无毒、无菌载体,如生理盐水、无毒缓冲剂、防腐剂等。干扰素相关抗原结合蛋白的药物有效量通常是足以介导以下中的一种或多种的量:从HBV-感染细胞的HBeAg释放的减少;HBV-感染细胞中pgRNA转录的减少;和IFN信号转导通路在感染细胞中的刺激。当然,可以在单一或多个剂量中施用本发明的药物组合物以提供干扰素相关抗原结合蛋白的药物有效量。

[0311] 与本发明的范围一致,可以根据上述治疗方法以足以产生治疗效果的量将干扰素相关抗原结合蛋白或者表达它们中任一种的核酸序列施用于人或其它动物。可以根据已知技术,通过将干扰素相关抗原结合蛋白或表达它们中的任一种的核酸序列与常规药学上可接受的载体或稀释剂混合所制备的常规剂量形式,将干扰素相关抗原结合蛋白或表达它们中的任一种的核酸序列施用于这些人或其它动物。本领域技术人员将认识到药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特征由它将混合的活性成分的量、施用途径及其它熟知的变量决定。本领域技术人员将进一步理解包含在本发明中所描述的干扰素相关抗原结合蛋白或表达它们中的任一种的核酸序列的一种或多种物质的混合物可以经证明是有效的。

[0312] 应理解在本发明中所描述的方法不局限于本文所公开的具体方法和实验条件,因为这些方法和条件可以改变。还应理解本文所使用的术语仅出于描述具体的实施方式的目的,并且其不意欲进行限制。

[0313] 此外,除非另外说明,否则本文所描述的实验使用本领域技术范围内的常规分子和细胞生物学和免疫学技术。这些技术对于技术工人是熟知的,并且在文献中充分解释。参见,例如,Ausubel等人主编,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), 包括所有增刊、MR Green和J. Sambrook和Harlow等人的分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第4版)、抗体:实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual), 第14章,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),冷泉港(Cold Spring Harbor) (2013, 第2版)。

[0314] 除非另外定义,否则本文所使用的科学和技术术语具有本领域那些技术人员通常所理解的含义。如果存在任何潜在歧义,则本文所提供的定义优先于任何词典或外部定义。除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用表示“和/或”。术语“包括(including)”以及其它形式诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。除非另有说明,否则术语“包含”的使用应包括术语“由...组成”。

[0315] 一般地,本文所描述的结合细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白和核酸化学和杂交使用的术语是本领域中熟知且常用的。除非另外说明,否则一般地,根据在本领域中熟知的和如在整个本说明书中所引用和讨论的多个一般且更具体的参考文献中所述的常规方法实施本文所提供的方法和技术。如本领域中通常所完成的和如本文所描述的,根据生产商的说明实施酶促反应和纯化技术。本文所描述的结合分析化学、合成有机化学以及药学和药物化学使用的术语以及这些领域的实验方法和技术是本领域中熟知且常用的那些。将标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂和递送以及患者的治疗。

[0316] 本文所使用的小节标题仅是出于组织的目的,并且不应将其视为对所述主题的限制。将本文所提及或引用的论文、专利和专利申请以及所有其它文档和可电子获得的信息的内容以每个单个出版物具体并单独指明作为参考并入的相同程度以其全部内容作为参考并入本文。申请人保留了将来自任何这些论文、专利、专利申请或其它物理和电子文档的任何和所有材料和信息物理引入本发明申请的权利。

[0317] 尽管已参考其具体的实施方式描述了本发明,但是本领域技术人员应理解使用本发明公开作为指导,在不背离本发明的真正精神和范围的情况下可以做出多种改变并且可以替代等价形式。通过目前详细描述某些实施方式,通过参考下列实施例将更清楚地理解相同内容,仅出于说明的目的包括所述实施例并且其不意欲限制。

[0318] 实施例

[0319] 实施例I

[0320] 干扰素融合的抗体(IFA)的产生和对报告细胞的鉴定

[0321] I.a- IFA设计

[0322] 表7和表8中列出了设计使用CP870,893激动性抗-CD40抗体作为主链抗体,具有IFN位置和接头性质的示例性IFA的序列组合。如表7所示,IFN通过接头在轻链(LC)或重链

(HC)的N-或C-末端部分融合。通过优化的哺乳动物表达密码子合成了编码HC、LC或融合的核酸并将其克隆至真核表达载体,如pcDNA3.1 (Invitrogen)。图2A显示了受pCMV启动子控制的编码Seq ID NO 32的pcDNA3.1质粒的示例性图谱。

[0323] I.b-IFA产生

[0324] 用以4/6的HC/LC比编码HC和LC两者的质粒瞬时共转染Freestyle293-F细胞 (Invitrogen)。转染后6天,收集上清液、离心并通过0.22 μ m过滤器过滤。在两个纯化步骤中,在AktaExpress色谱系统 (GE Healthcare) 上,使用蛋白A MabSelect Sure 5mL 1.6/2.5cm柱 (GE Healthcare),以5mL/min的流速实施纯化方法。在D-PBS1X pH 7.5缓冲液中进行样品结合,并用甘氨酸/HCl 0.1M pH 3.0缓冲液洗脱。将洗脱峰保存在环中,然后以10mL/min的流速,在D-PBS1XpH 7.5缓冲液中进行进样到HiTrap脱盐26/10柱上 (GE Healthcare)。在96-孔微板上收集洗脱峰 (2mL部分)。根据UV峰谱图进行混合。在0.22 μ m过滤器 (Sartorius MiniSart) 上过滤后,进行质量控制,包括使用Endosafe®nexgen-PTS™ (Charles River) 的细菌内毒素,排阻色谱:使用SEC 200Increase 10/300柱 (GE Healthcare) 以确定纯度和低聚物,以及在还原和非还原条件下在NuPAGE凝胶系统 (Invitrogen) 上在MESDS运行缓冲液中的SDS-PAGE。表8中显示了产品得率。对于一些IFA,产品得率极低。在那种情况下,直接使用含有IFA的上清液评价激动性CD40活性和IFN活性而无任何进一步纯化。

[0325] 纯化的IFA的还原性SDS-PAGE分析表明对应于HC和LC的两个主要条带的存在。当将IFN (无论哪个IFN家族成员) 融合至HC时,观察到其分子量的改变并且对于与任何IFN融合的LC观察到了相同现象 (图2B)。

[0326] I.c-对报告细胞的IFA鉴定

[0327] 将HEK-Blue™CD40L细胞 (InvivoGen产品目录#:hkb-cd40) 或HEK-Blue™IFN- α/β 细胞 (InvivoGen,产品目录#:hkb-ifn $\alpha\beta$) 分别用于监测通过CD40激动剂对NF κ B通路的激活或者通过I型-IFN诱导的IFN通路的激活。

[0328] 通过用人CD40基因和NF κ B-诱导型分泌性胚胎碱性磷酸酶 (SEAP) 构建体 (Invivogen) 稳定转染HEK293细胞产生HEK-Blue™CD40L细胞以测量CD40激动剂的生物活性。CD40的刺激导致NF κ B诱导,然后导致SEAP产生,使用QUANTI-Blue™ (Invivogen,产品目录#rep-qbs2) 在上清液中检测到了SEAP。

[0329] 设计HEK-Blue™IFN-细胞以监测通过I型-IFN诱导的JAK/STAT/ISGF3通路的激活。这种通路激活引起了SEAP的产生和释放。SEAP水平是使用QUANTI-Blue™在上清液中易于可评价的。

[0330] 将HEK-Blue™IFN- α/β 用于监测人IFN α 或IFN β 的活性。

[0331] 将细胞接种到96-孔板 (50,000个细胞每孔) 中并用每种IFA或对照的指定浓度刺激并在37℃培育24h。然后收集上清液,在将上清液与QuantiBlue™培育约30min后定量SEAP水平,并在620nm在EnSight酶标仪或PheraStar (Lab Biotech) 上评价光密度 (O.D.)。

[0332] HEK-Blue™Dual IFN- γ 细胞 (InvivoGen,产品目录#:hkb-ifng) 或者HEK-Blue™IFN- λ (InvivoGen,产品目录#:hkb-ifnl) 分别可以用于监测II型-和III型-IFN的活性。设计HEK-Blue™IFN- λ 细胞以监测IFN λ 的活性。HEK-Blue™Dual IFN- γ 细胞允许检测生物活性人IFN γ 。

[0333] I.d-IFN α / β 基IFA对报告细胞的功能性活性

[0334] 图3显示了IFA在HEK-BlueTMCD40L(图3A-图3B)和HEK-BlueTMIFN- α / β 细胞(图3C-图3D)上的剂量反应的实例,其中如表7所示,将如表7中所指明的IFN β 或其突变形式融合至HC。在表8中总结了IFA的激动性抗-CD40活性并且在图3A和图3B中显示了实例。结果表明所有测试的IFA具有功能性,其以剂量依赖性方式激活CD40通路和IFN- α / β 通路两者。对于向HC或LC的C-末端的融合,激动性CD40的EC₅₀值在11.1ng/mL至192ng/mL的范围内(表8)。在图3A至图3D所示的实验中,亲代抗体的平均EC₅₀值是48ng/mL和57ng/mL。具有融合至HC或LC的N-末端的IFN的IFA也能够激活CD40通路,但是对于这些IFA不可以确定准确的EC₅₀值,因为直接从上清液确定活性与非使用纯化蛋白确定(图3B)。

[0335] 在表8中总结了多种IFA的IFN活性并且在图3C至图3D中显示了实例。对于IFN β 或突变IFN β (如表7所指明的)向HC或LC的C-末端的融合,基于接头序列,IFN活性是可变的,其EC₅₀值在0.14ng/mL至4.5ng/mL的范围内(图3C和表8)。图3D显示了具有融合至N末端部分的IFN β 的IFA显示出高IFN活性。用作阴性对照的亲代抗体不显示任何活性,然而重组IFN β 的确显示出强剂量-依赖性反应。总体而言,这些结果表明不考虑位置,如表7中所指明的IFN β 或其突变形式与抗体的融合维持了两种生物学功能,尽管就效力而言具有差异。

[0336] 图4显示了IFA在HEK-BlueTMCD40L(图4A和图4C)和HEK-BlueTMIFN- α / β 细胞(图4B和图4D)上的剂量反应的实例,其中如表7所示,将IFN α 融合至HC或LC。结果表明所有测试的IFA具有功能性,其以剂量-依赖性方式激活CD40通路和IFN α / β 通路两者。意外地,对于所有IFN α 基IFA,对CD40通路的效力可重复地高于亲代抗体。IFN α -基IFA的EC₅₀值在11.1ng/mL至22.7ng/mL的范围内,而CP870,893的EC₅₀在30ng/mL至80ng/mL的范围内(平均EC₅₀值:48ng/mL)。

[0337] 基于接头序列,IFA的IFN活性是可变的,其EC₅₀值在1.6ng/mL至5.1ng/mL的范围内。在相同测定中,PEG化的IFN α 2a(Pegasys®)也以剂量-依赖性方式具有活性,其EC₅₀值为约1ng/mL。

[0338] I.e-无Fc区的IFA的产生和鉴定

[0339] 根据本发明的适合的构建体也可以是无Fc区的干扰素相关抗原结合蛋白。设计了编码融合至TEV-His标签的CP870,893的fab片段的重链的构建体(SEQ ID NO 50)并将其克隆至表达质粒pcDNA3.1。如先前所述,在HEK细胞中共转染该构建体,其中LC通过不同接头融合至不同的IFN,如SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 35、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 37、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43。在报告细胞中评价蛋白和/或上清液和/或它们对PHH中HBV感染的影响。本领域技术人员将理解用于疗法的构建体将不再含有TEV-His标签。这些构建体同样地是本发明的实施方式。无Fc部分的干扰素相关抗原结合蛋白将相对于HBV感染具有活性。然后,产生了两种IFA并且在实施例V中描述了它们的功能性鉴定:IFA50:(SEQ ID NO 41)+(SEQ ID NO 50)和IFA51:(SEQ ID NO 42)+(SEQ ID NO 50)。

[0340] 实施例II

[0341] IFA对HBV感染的原代肝细胞的影响

[0342] II.a-IFA对原代人肝细胞中HBV感染的影响

[0343] 研究了IFA对原代人肝细胞(PHH)中HBV感染的影响。将PHH细胞在96-孔板(70,000

个细胞/孔)中的补充有10%胎牛血清(FCS)(SH30066.02,Hyclone)、胰岛素(19278-5ML, Sigma)、氢化可的松(H2270-100MG, Sigma)和青霉素/链霉素(15140, Gibco)的William's E GlutaMAX培养基(32551-020, Gibco)中铺板。4小时后,漂洗细胞并替换培养基。第二天,用含有matrigel的培养基(0.25mg/mL;356231, Corning)替换培养基。在以500至1,000vge/细胞(病毒基因组当量)的MOI(感染复数)在补充有5% FCS、4% PEG 8000(81268, Sigma)、2% DMSO(DMSO-100ML, Sigma)和1%青霉素/链霉素的InVitroGRO HI培养基(Z99009, Bioreclamation IVT)中铺板后,将细胞感染48小时。感染后16小时,用PBS清洗细胞三次。感染后4天,将细胞保持未处理或用依次稀释的IFA处理,如图所示。处理后3天,收集培养上清液并在-80℃保持以用于进一步蛋白检测。

[0344] II.b.-HBV e-抗原(HBeAg)释放评价

[0345] 如生产商所述,使用ELISA测量细胞培养上清液中的HBV e-抗原(HBeAg)水平,并且结果以PEI单位(HBeAg CLIA 96T/K:CL0312-2;Autobio)或者发光表示。

[0346] II.c.-HBV s-抗原(HBsAg)释放评价

[0347] 按照AutoBio HBsAg CLIA试剂盒(#CL0310-2)的规程,实施上清液中HBsAg的定量,主要步骤为:首先,将样品在1X PBS中1/5稀释。然后,将50μL标准品、对照和稀释样品置于孔中。将50μL“酶缀合物”溶液加入至每个孔中,然后在37℃培育1小时。随后,使用洗板器用300μL来自试剂盒的清洗溶液清洗板6次。然后,将50μL“底物溶液”(试剂A和B中的体积-比-体积混合)加入每个孔中并避光进行10分钟培育。然后,在PHERASTAR酶标仪(BMG Labtech)上以发光模式读取板。

[0348] II.d.-pgRNA定量

[0349] 将qPCR技术用于比较来自用测试化合物处理的感染细胞的pgRNA的表达水平。使用QuantStudio 12K Flex,在96-孔板中进行来自感染细胞的pgRNA定量。通过RT获得cDNA,随后用TaqMan快速病毒测定一步进行qPCR(ThermoFisher cat#4444434)。通过 $\Delta\Delta C_t$ 法处理结果并用管家基因GUSB归一化,重复两次。使用下列引物和探针:(正向:CCTCACCATACTGCACTCA,反向:GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG, AGTGTGGATTGCACTCCTCCAGC作为探针)扩增pgRNA。使用来自Thermo Fisher(Hs99999908-m1)的TaqMan测定扩增GUSB基因。

[0350] II.e.-CXCL10释放

[0351] 根据生产商的说明,使用ELISA试剂盒评价CXCL10释放(BioLegend439904)。1/50稀释样品,并在EnSight酶标仪上在450nm评价发光。

[0352] II.f-IFN α /β基IFA对HBV感染的影响

[0353] 测试了几种IFA在用HBV感染PHH后降低HBeAg分泌的能力。在图5中,使用了具有在LC的C-末端融合的IFNβ或其突变形式的IFA。结果指示所有所测试的IFA强烈减少HBeAg释放。的确,即使处于所测试的最低浓度(1ng/mL),基于IFA,观察到了70%至90%的HBeAg释放抑制,从而证明它们具有有效抗-病毒作用。值得注意的是在该实验中无法达到100%抑制,因为在感染后4天开始处理并且此时已有的HBeAg混合池(mRNA和蛋白)已存在于细胞中并且在此后继续产生。

[0354] 还在HBV-感染的PHH中测试了融合至IFN α 的IFA的影响。图6A至图6H显示这些IFA对于HBV感染非常有效,其中对于具有在HC的C-末端融合的IFN α 2a的IFA,其EC₅₀值在0.06ng/mL至0.2ng/mL的范围内(IFA25:0.16ng/mL; IFA26:0.1ng/mL; IFA27:0.06ng/mL;和

IFA38: ~ 0.2ng/mL (~ 2.2pM); 图6A和图6C) 并且对于具有在LC的C-末端融合的IFN α 2a的 IFA, EC₅₀ 值在0.15ng/mL至0.36ng/mL的范围内 (IFA28: 0.36ng/mL; IFA29: 0.15ng/mL; IFA30: 0.31ng/mL; 和 IFA39: ~ 0.3ng/mL (~ 3pM); 图6B和图6C)。为了将Pegasys的抗病毒作用与IFA38和IFA39相比较, 以pM表示结果并且结果表明Pegasys的EC₅₀为~ 250pM, 相比之下 IFA38的为~ 2.2pM且IFA39的为~ 3pM, 表明IFA比Pegasys更有效。

[0355] II.g-短期处理足以诱导有效的抗-病毒活性

[0356] 为了评价HBV感染的原代肝细胞的短期IFA处理的影响, 感染细胞并培育4天, 以剂量依赖性方式用IFA25、IFA27、IFA28、IFA30或用Pegasys处理24h, 清洗并且然后与无任何处理的新鲜培养基培育。3天后, 收集上清液以评价HBeAG (图6E)、HBsAG (图6F) 和CXCL10 (图6H) 释放水平并且将细胞裂解并提取RNA以定量pgRNA (图6G)。结果表明所有所测试的IFA能够以剂量依赖性方式抑制HbeAG和HBsAG释放以及pgRNA表达。单独的Pegasys仅能够抑制HBeAG释放并降低pgRNA水平。在这方面, IFA对病毒参数的活性比Pegasys至少高2log。意外地, 尽管所有所测试的IFA显示出对HBsAg释放的剂量依赖性抑制, 但是即使在最高浓度, 使用Pegasys未观察到降低。CXCL10 (IFN通路的生物标志物) 分析显示IFA也比Pegasys更有效。

[0357] 实施例III

[0358] 细胞因子释放

[0359] III.a-来自人全血细胞的细胞因子释放评价 (CRA)

[0360] 将全血细胞 (WBC) 离体刺激测定用于研究IFA刺激后细胞因子的释放。从4位健康供体收集WBC, 在RPMI1640 (72400-021, Gibco) 中1/3稀释并分布在无菌反应管中 (300 μ l)。将细胞保持未刺激, 作为阳性对照用10ng/mL的LPS (脂多糖) K12 (tlr1-eklps, Invivogen) 或者用1 μ g/mL的IFA刺激并在37 $^{\circ}$ C培育24h。然后收集上清液, 并在-20 $^{\circ}$ C冷冻直至分析当天。

[0361] 使用测量肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、白介素 (IL) -1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12/IL-23p40和IFN γ 的多重MSD测定 (K15067L-4) 分析人促炎细胞因子。在1300MESO QuickPlex SQ120设备 (MSD) 上分析MSD板。

[0362] 图7显示了来自未刺激、用LPS或用IFA1处理的人WBC的体外细胞因子释放评价的示例性结果。

[0363] 在表9a和表9b中总结了测试IFN β - /突变IFN β -和IFN α -基IFA的其它结果。结果显示对于所有供体, LPS诱导了极高的炎性细胞因子 (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-12p40和IFN γ) 水平。它还诱导了作为IFN通路的生物标志物的IP10 (CXCL10) 和中等水平的IL-10。测试了两个IFN β - (表9a) 和6个IFN α - (表9b) 基IFA。它们全部诱导生物标志物IP10。然而, 它们不诱导IL-10、IL-1 β 和IL-2, 并且它们仅诱导极低至中等水平的IFN γ 、IL-6和TNF- α , 因此表明对于炎性细胞因子的诱导具有良好的安全性谱。

[0364] 实施例IV

[0365] 药物动力学研究

[0366] IV.a-用于IFA定量的ELISA测定开发

[0367] 对于ELISA定量, 在4 $^{\circ}$ C, 用100 μ l, 0.5 μ g/mL在碳酸钠 (0.05M, pH9.6, C-3041, Sigma) 中的重组人CD40/TNFRSF5 Fc嵌合蛋白 (由融合至人IgG1的Fc部分的人CD40的胞外

域组成(CD40-Fc;R&D Systems;1493-CDB-050))溶液涂覆96-孔板(96孔板(PLATES 96wells)Maxisorp,THERMO Scientifique;442404)过夜。在通过翻转清空后,将板随后在37℃与PBS-0.05% Tween 20-1%牛奶(SIGMA;70166-500g)培育1小时,然后用PBS-0.05% Tween 20清洗。然后,将样品和对照(100 μ L的1/2连续稀释)在37℃培育90分钟,随后清洗3次(PBS-0.05% Tween 20)并与第二抗-IgG2-缀合物HRP(1/5000,ab99779,Abcam)抗体或者抗-IFN α 缀合物HRP(1/1000,eBioscience/Invitrogen;BMS216MST)在PBS-0.05% Tween 20-1%牛奶中培育。在用PBS、0.05% Tween 2清洗3次后,加入TMB(四甲基联苯胺,Tebu Bio;TMBW-1000-01)并将板避光培育20分钟。通过添加1M HCl终止反应。用Ensign酶标仪(Perkin Elmer)在450-650nm读板。使用类似的规程步骤,但是使用来自eBioscience/Invitrogen的人IFN- α 匹配的抗体对评价Pegasys的定量。使用100 μ L,1 μ g/mL人抗-IFN α 抗体(eBioscience/Invitrogen;BMS216MST)在碳酸钠(0.05M,pH9.6,C-3041,Sigma)中的溶液进行捕获。对于检测,应用第二抗-IFN α 缀合物HRP抗体(1/1000,Affymetrix eBioscience/BMS216MST;15501707)在PBS-0.05% Tween20-1%牛奶中的溶液。

[0368] IV.b-在小鼠中的体内生物利用度

[0369] 为了确定PK参数,将CP870,893、IFA25、IFA26、IFA27、IFA28、IFA29和IFA30以0.5mg/kg并且将Pegasys以0.3mg/kg与推注施用于雄性CD1-Swiss小鼠并在不同时间点收集血液样品。在图8A和8B中显示了使用以上所描述的并且使用抗-IFN α -缀合的HRP所显示的ELISA法的循环分子定量的实例,而在图8C中显示了用抗-IgG2-缀合的HRP显示的定量实例;图8D显示了Pegasys定量。在表10A中总结的一组实验中,在7-天实验中研究了CP870,893的PK参数并且在10-天实验中研究了IFA27、IFA29和IFA30的那些PK参数(使用2种不同的ELISA方法进行IFA27定量)。在表10B中所总结的另一组实验中,在21-天实验中研究了CP870,893和IFA25、IFA26、IFA28和Pegasys的PK参数(使用2种不同的ELISA方法进行IFA25定量)。

[0370] 在短分布相后,IFA的药物动力学谱的特征在于116至218h的范围内的长血清半衰期(表10A和表10B)。对于6种所测试的IFA获得了非常类似的PK谱,其即使在单一剂量施用后10天仍具有高循环水平。表10A/表10B中所总结的药物动力学参数表明这些IFA意外地在血液中以1033 μ g.h/mL至2552 μ g.h/mL的范围内的更高的全身暴露(AUC(0-inf))循环,相比之下亲代抗体CP870,893分别为590或797 μ g.h/mL(多至3.2倍),这也反映了IFA较低的清除值。分布容积V_{ss}较低并且在50至105mL/kg之间排列,稍高于该物种中的血浆血管容积(50mL/kg)。对于所有IFA,将清除排列为低(0.28至0.49mL/h/kg)。有趣地,Pegasys的清除(1.4mL/h/kg)比IFA的清除(例如,对于IFA27,0.2mL/h/kg)高多达7倍,从而证明了IFA更高的全身暴露。

[0371] 实施例V

[0372] V.a-无Fc区的IFA对报告细胞和HBV感染的功能活性

[0373] 为了确定IFA的Fc部分是否是活性所需的,设计并产生了IFN α 向与HC的Fab片段结合的LC的C末端部分的融合。使用(G4S)2(IFA50)或者(G4S)3(IFA51)接头将IFN α 连接至LC部分。

[0374] 对HEK-Blue™CD40L细胞的评价证明这些IFA仍显示出激动性CD40活性(图9A)并且激活CD40通路,其EC₅₀值分别为约128ng/mL(IFA 50)和123ng/mL(IFA51)。

[0375] 对HEK-Blue™IFN- α/β 细胞的IFN活性的评价显示两种所测试的IFA显示出IFN活性(图9B)。在表8B中报告了EC₅₀值并且IFA50的EC₅₀值为约1.36ng/ml,而IFA51的为1.43ng/mL。

[0376] 如先前所述,对HBV感染测试了两种IFA,并且两种IFA显示出有效的抗-病毒活性,其EC₅₀值分别为约4.1pM(IFA50)和2.7pM(IFA51)。

[0377] V.b-IFN ϵ 基IFA对报告细胞和HBV感染的功能活性

[0378] 还设计并产生了CP870,893向第三I型干扰素(IFN伊普西龙;IFN ϵ)的融合。对HEK-Blue™CD40L细胞测试了这些IFA并且可以证实它们维持激动性CD40活性。图10A中显示了一种这种IFA(IFA49)的结果。对HEK-Blue™hIFN- α/β 细胞(事实上,其通过任何I型干扰素激活)的评价显示IFA49也能够激活IFN-I-通路(图10B)。表8B报告了EC₅₀值。另外,还对原代肝细胞中的HBV感染测试了IFA49并且显示出与Pegasys类似的活性(图10C)。

[0379] 这些结果证实了具有IFN ϵ 的IFA维持了IFN和激动性CD40活性两者(即是双功能的)并且具有抗病毒活性。

[0380] V.c-IFN ω 基IFA对报告细胞和HBV感染的功能活性

[0381] 还设计并产生了CP870,893向第四I型干扰素(IFN欧米茄;IFN ω)的融合。对HEK-Blue™CD40L细胞测试了这些IFA并且结果证实它们维持激动性CD40活性。图11A中显示了一种这种IFA(IFA46)的结果。对HEK-Blue™hIFN- α/β 细胞(事实上,其通过任何I型干扰素激活)的评价显示IFA46也能够激活IFN-I-通路(图11B)。表8B报告了EC₅₀值。另外,还对原代肝细胞中的HBV感染测试了IFA46并且显示出与Pegasys类似的活性(图11C)。

[0382] 这些结果证实了具有IFN ω 的IFA维持了IFN和激动性CD40活性两者(即是双功能的)并且具有抗病毒活性。

[0383] V.d-IFN γ 基IFA对报告细胞和HBV感染的功能活性

[0384] 还设计并产生了CP870,893向II型干扰素(IFN伽玛;IFN γ)的融合。这些IFA对HEK-Blue™CD40L细胞的评价证明它们维持激动性CD40活性,而不考虑IFN γ 是否连接至LC(IFA42)或HC(IFA43)的C末端部分(图12A)。这些IFA对HEK-Blue™-IFN γ 细胞的评价(图12B)显示它们也能够激活IFN γ -通路。在IFA42(EC₅₀:15ng/ml)和IFA43(EC₅₀:<0.01ng/ml)之间IFN γ 活性稍有不同。表8B报告了EC₅₀值。另外,如先前所述,以剂量依赖性方式对原代肝细胞中的HBV感染测试了IFA42和IFA43。结果表明两种IFA以剂量依赖性方式减少HbeAg释放(图12C),其表明具有II型-IFN的IFA对HBV感染具有活性。

[0385] 总体而言,这些结果表明具有IFN γ 的IFA维持了IFN和激动性CD40活性两者(即是双功能的)并且具有抗-病毒活性。

[0386] V.e-IFN λ 基IFA对报告细胞和HBV感染的功能活性

[0387] 还设计并产生了CP870,893向III型干扰素(IFN拉姆达;IFN λ)的融合。对HEK-Blue™CD40L细胞测试了这些IFA并且结果证明它们也维持激动性CD40活性,而不考虑IFN λ 是否连接至LC(IFA44)或HC(IFA45)的C末端部分(图13A)。这些IFA对HEK-Blue™-IFN λ 细胞的评价显示它们也能够激活IFN λ -通路(图13B)。表8B报告了EC₅₀值。这些结果也证实具有IFN λ 的IFA维持了IFN和激动性CD40活性两者(即是双功能的)。

[0388] 如先前所述,与Pegasys相比,对于原代肝细胞中的HBV感染,以单一剂量测试了IFA44和IFA45。结果表明两种类型的IFA分别将HbeAg释放降低了65%和78%。在这些条件

下,Pegasys将HbeAg释放抑制了81%。这些结果表明具有III型IFN的IFA对于HBV感染具有活性,对于两种所测试的IFA,EC₅₀值<10nM(图13C)。

[0389] 等价形式

[0390] 在不背离其精神或基本特征的情况下,可以在其它具体形式中体现本发明。因此,认为上述实施方式在所有方面是说明性的,而不是对本发明的限制。因此,通过所附权利要求,而不是通过上述描述指明了本发明的范围,并因此来自权利要求的等价形式的含义和范围内的所有变化旨在包含在本文中。

[0391] 项目

[0392] 考虑以上内容,将理解本发明还涉及以下项目:

[0393] 1.一种干扰素相关抗原结合蛋白,其包含

[0394] (I) 激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段,和

[0395] (II) 干扰素 (IFN) 或其功能性片段,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段包含

[0396] (a) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列具有至少90%的同一性的3个轻链互补决定区(CDR);和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列具有至少90%的同一性的3个重链CDR;其中根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR;优选地其中根据CDR的Kabat定义或者CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

[0397] (b) 与SEQ ID NO 3内的CDRL1、CDRL2和CDRL3序列相同的3个轻链互补决定区(CDR);和与SEQ ID NO 6内的CDRH1、CDRH2和CDRH3序列相同的3个重链CDR;其中根据CDR的Kabat定义、Chothia定义、AbM定义或接触定义来定义每个CDR;优选地其中根据CDR的Kabat定义或者CDR的Chothia定义来定义每个CDR;

[0398] (c) 重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56具有至少90%的同一性的互补决定区(CDR) CDRH1、与SEQ ID NO 57具有至少90%的同一性CDRH2和与SEQ ID NO 58具有至少90%的同一性的CDRH3;和轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52具有至少90%的同一性的CDRL1、与SEQ ID NO 53具有至少90%的同一性的CDRL2和与SEQ ID NO 54具有至少90%的同一性的CDRL3;

[0399] (d) 重链或其片段,其包含与SEQ ID NO 56相同的互补决定区(CDR) CDRH1、与SEQ ID NO 57相同的CDRH2和与SEQ ID NO 58相同的CDRH3;和轻链或其片段,其包含与SEQ ID NO 52相同的CDRL1、与SEQ ID NO 53相同的CDRL2和与SEQ ID NO 54相同的CDRL3;

[0400] (e) 包含SEQ ID NO 51中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的轻链可变区V_L;和/或包含SEQ ID NO 55中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的重链可变区V_H;

[0401] (f) 包含SEQ ID NO 12中所示氨基酸序列或与之具有至少90%的同一性的序列的Fab区重链;或者

[0402] (g) 包含SEQ ID NO 3中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列的轻链(LC);和/或包含选自SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49和SEQ ID NO 48的序列或与之具有至少90%的同一性的序列的重链(HC)。

[0403] 2.根据项目1的干扰素相关抗原结合蛋白,其中HC包含SEQ ID NO 6中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

- [0404] 3. 根据项目1的干扰素相关抗原结合蛋白,其中HC包含SEQ ID NO 9中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。
- [0405] 4. 根据项目1的干扰素相关抗原结合蛋白,其中HC包含SEQ ID NO 49中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。
- [0406] 5. 根据项目1的干扰素相关抗原结合蛋白,其中HC包含SEQ ID NO 48中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。
- [0407] 6. 根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是人干扰素。
- [0408] 7. 根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段选自I型IFN、II型IFN和III型IFN或其功能性片段组成的组。
- [0409] 8. 根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是I型IFN或其功能性片段。
- [0410] 9. 根据项目8的干扰素相关抗原结合蛋白,其中I型IFN或其功能性片段是IFN α 、IFN β 、IFN ω 或IFN ϵ 或其功能性片段。
- [0411] 10. 根据项目8的干扰素相关抗原结合蛋白,其中I型IFN或其功能性片段是IFN α 或IFN β 或其功能性片段。
- [0412] 11. 根据项目8的干扰素相关抗原结合蛋白,其中I型IFN或其功能性片段是IFN ω 或其功能性片段。
- [0413] 12. 根据项目8的干扰素相关抗原结合蛋白,其中I型IFN或其功能性片段是IFN ϵ 或其功能性片段。
- [0414] 13. 根据项目1至6中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IFN λ 、IFN ω 或者IFN ϵ 或其功能性片段。
- [0415] 14. 根据项目13的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN α 或IFN β 或其功能性片段。
- [0416] 15. 根据项目14的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN α 或其功能性片段。
- [0417] 16. 根据项目15的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或者其功能性片段是IFN α 2a或其功能性片段。
- [0418] 17. 根据项目16的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。
- [0419] 18. 根据项目14的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN β 或其功能性片段。
- [0420] 19. 根据项目18的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。
- [0421] 20. 根据项目18的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 或其功能性片段相对于SEQ ID NO 14包含一个或两个氨基酸替换,其选自C17S和N80Q。
- [0422] 21. 根据项目20的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 或其功能性片段相对于SEQ ID NO 14包含氨基酸替换C17S。
- [0423] 22. 根据项目21的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示

的氨基酸序列。

[0424] 23. 根据项目20的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 或其功能性片段相对于SEQ ID NO 14包含氨基酸替换C17S和N80Q。

[0425] 24. 根据项目23的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示的氨基酸序列。

[0426] 25. 根据项目13的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN γ 或IFN λ 或其功能性片段。

[0427] 26. 根据项目25的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN γ 或其功能性片段。

[0428] 27. 根据项目26的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0429] 28. 根据项目25的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段是IFN λ 或其功能性片段。

[0430] 29. 根据项目28的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN λ 或其功能性片段是IFN λ 2或其功能性片段。

[0431] 30. 根据项目29的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN λ 2包含SEQ ID NO 18中所示序列或与之具有至少90%的同一性的序列。

[0432] 31. 根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段非共价结合。

[0433] 32. 根据项目31的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段通过离子、范德华力和/或氢键相互作用非共价结合。

[0434] 33. 根据项目1至30中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段与激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段共价结合。

[0435] 34. 根据项目33的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段。

[0436] 35. 根据项目34的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。

[0437] 36. 根据项目35的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端。

[0438] 37. 根据项目35的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

[0439] 38. 根据项目34的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。

[0440] 39. 根据项目38的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端。

[0441] 40. 根据项目38的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN或其功能性片段融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

[0442] 41. 根据项目34至40中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中将激动性抗-CD40

抗体或其激动性抗原结合片段和IFN或其功能性片段通过接头彼此融合。

[0443] 42. 根据项目41的干扰素相关抗原结合蛋白,其中除了形成(I)所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段,(II)所述IFN或其功能性片段和(III)所述接头的那些以外,所述干扰素相关抗原结合蛋白不包含氨基酸。

[0444] 43. 根据项目1至41中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中除了形成(I)所述激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段和(II)所述IFN或其功能性片段的那些以外,所述干扰素相关抗原结合蛋白不包含氨基酸。

[0445] 44. 根据项目41至42中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是肽接头。

[0446] 45. 根据项目44的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个氨基酸。

[0447] 46. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少4个氨基酸。

[0448] 47. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少11个氨基酸。

[0449] 48. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少12个氨基酸。

[0450] 49. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少13个氨基酸。

[0451] 50. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少15个氨基酸。

[0452] 51. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少20个氨基酸。

[0453] 52. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少21个氨基酸。

[0454] 53. 根据项目45的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含至少24个氨基酸。

[0455] 54. 根据项目44的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至10、多至20、多至30、多至40、多至50、多至60、多至70、多至80、多至90或者多至100个氨基酸。

[0456] 55. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至80个氨基酸。

[0457] 56. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至40个氨基酸。

[0458] 57. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至24个氨基酸。

[0459] 58. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至21个氨基酸。

[0460] 59. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至20个氨基酸。

[0461] 60. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至15个氨基酸。

[0462] 61. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至13个氨基酸。

[0463] 62. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至12个氨基酸。

[0464] 63. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至11个氨基酸。

[0465] 64. 根据项目54的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含多至4个氨基酸。

[0466] 65. 根据项目44至64中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头选自包括酸性、碱性和中性接头的组。

[0467] 66. 根据项目65的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是酸性接头。

[0468] 67. 根据项目65或66的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。

[0469] 68. 根据项目65的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是碱性接头。

[0470] 69. 根据项目65的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是中性接头。

[0471] 70. 根据项目65或69的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。

- [0472] 71.根据项目44至70中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头选自刚性、柔性和螺旋-形成接头。
- [0473] 72.根据项目71的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是刚性接头。
- [0474] 73.根据项目71或72的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。
- [0475] 74.根据项目71的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是柔性接头。
- [0476] 75.根据项目71或74的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。
- [0477] 76.根据项目71的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头是螺旋-形成接头。
- [0478] 77.根据项目71或76的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 22或SEQ ID NO 23中所示序列。
- [0479] 78.根据项目44至66、68、69、71、72、74或76中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。
- [0480] 79.根据项目78的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或者SEQ ID NO 26中所示序列。
- [0481] 80.根据项目78的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头还包括氨基酸苏氨酸。
- [0482] 81.根据项目80的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 21中所示序列。
- [0483] 82.根据项目44的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含选自如SEQ ID NO 20至26中所示序列的序列。
- [0484] 83.根据项目82的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含选自SEQ ID NO 24、SEQ ID NO 25或SEQ ID NO 26中所示序列的序列。
- [0485] 84.根据项目83的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 24中所示序列。
- [0486] 85.根据项目83的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 25中所示序列。
- [0487] 86.根据项目83的干扰素相关抗原结合蛋白,其中接头包含SEQ ID NO 26中所示序列。
- [0488] 87.根据项目41、42或44至86中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中将IFN或其功能性片段通过表3,具体地表3A或表3B,更具体地表3A中所示的接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的C-末端。
- [0489] 88.根据项目87的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 49、SEQ ID NO 48或者SEQ ID NO 12中所示序列。
- [0490] 89.根据项目87或88的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列。
- [0491] 90.根据项目87或88的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。
- [0492] 91.根据项目90的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示

序列。

[0493] 92. 根据项目90的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示序列。

[0494] 93. 根据项目90的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示序列。

[0495] 94. 根据项目87或88的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列。

[0496] 95. 根据项目87或88的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN λ 2包含SEQ ID NO 18中所示序列。

[0497] 96. 根据项目87至95中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白还包含激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。

[0498] 97. 根据项目96的干扰素相关抗原结合蛋白,其中轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。

[0499] 98. 根据项目41、42或44至86中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中将IFN或其功能性片段通过表4,具体地表4A或表4B,更具体地表4A中所示的接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端。

[0500] 99. 根据项目98的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或者SEQ ID NO 50中所示序列,优选地SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48或SEQ ID NO 49中所示序列。

[0501] 100. 根据项目98或99的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列。

[0502] 101. 根据项目98或99的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。

[0503] 102. 根据项目101的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列。

[0504] 103. 根据项目101的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示序列。

[0505] 104. 根据项目101的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示序列。

[0506] 105. 根据项目98或99的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列。

[0507] 106. 根据项目98或99的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN λ 2包含SEQ ID NO 18中所示序列。

[0508] 107. 根据项目98至106中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白还包含激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。

[0509] 108. 根据项目107的干扰素相关抗原结合蛋白,其中轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。

[0510] 109. 根据项目41、42或44至86中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中将IFN或

其功能性片段通过表5,具体地表5A或表5B,更具体地表5A中所示的接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的C-末端。

[0511] 110.根据项目109的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。

[0512] 111.根据项目109或110的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列。

[0513] 112.根据项目109或110的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。

[0514] 113.根据项目112的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列。

[0515] 114.根据项目112的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示序列。

[0516] 115.根据项目112的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示序列。

[0517] 116.根据项目109或110的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列。

[0518] 117.根据项目109或110的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN λ 2包含SEQ ID NO 18中所示序列。

[0519] 118.根据项目109至117中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白还包含激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链。

[0520] 119.根据项目118的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体的重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或者SEQ ID NO 50中所示序列,优选地SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48或SEQ ID NO 49中所示序列。

[0521] 120.根据项目41、42或44至86中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中将IFN通过表6,具体地表6A或表6B,更具体地表6A中所示的接头融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的N-末端。

[0522] 121.根据项目120的干扰素相关抗原结合蛋白,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 3中所示序列。

[0523] 122.根据项目120或121的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN α 2a包含SEQ ID NO 17中所示序列。

[0524] 123.根据项目120或121的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14、SEQ ID NO 15或SEQ ID NO 16中所示序列。

[0525] 124.根据项目123的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 14中所示序列。

[0526] 125.根据项目123的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 15中所示序列。

[0527] 126.根据项目123的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN β 包含SEQ ID NO 16中所示序列。

[0528] 127. 根据项目120或121的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中IFN γ 包含SEQ ID NO 19中所示序列。

[0529] 128. 根据项目120或121的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中IFN λ 2包含SEQ ID NO 18中所示序列。

[0530] 129. 根据项目120至128中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白还包含抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链。

[0531] 130. 根据项目129的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中激动性抗-CD40抗体的重链包含SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或者SEQ ID NO 50中所示序列, 优选地SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 48或SEQ ID NO 49中所示序列。

[0532] 131. 根据项目1至130中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白包含选自下列的序列: SEQ ID NO 28、SEQ ID NO 29、SEQ ID NO 30、SEQ ID NO 31、SEQ ID NO 32、SEQ ID NO 33、SEQ ID NO 34、SEQ ID NO 35、SEQ ID NO 36、SEQ ID NO 37、SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42、SEQ ID NO 43、SEQ ID NO 44、SEQ ID NO 45、SEQ ID NO 46和SEQ ID NO 47。

[0533] 132. 根据项目131的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白包含选自下列的序列: SEQ ID NO 38、SEQ ID NO 39、SEQ ID NO 40、SEQ ID NO 41、SEQ ID NO 42或SEQ ID NO 43。

[0534] 133. 根据项目131或132的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含表8, 具体地表8A或表8B, 更具体地表8A中所公开的序列组合之一的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0535] 134. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 38和SEQ ID NO 3中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0536] 135. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 39和SEQ ID NO 3中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0537] 136. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 40和SEQ ID NO 3中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0538] 137. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 41和SEQ ID NO 9中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0539] 138. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 42和SEQ ID NO 9中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0540] 139. 根据项目133的干扰素相关抗原结合蛋白, 其中干扰素相关抗原结合蛋白是包含SEQ ID NO 43和SEQ ID NO 9中所示序列的干扰素融合的激动性抗-CD40抗体或干扰素融合的其激动性抗原结合片段。

[0541] 140.根据项目1至139中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白激活CD40和IFN通路两者。

[0542] 141.根据项目140的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用全血表面分子上调测定或体外报告细胞测定确定CD40活性。

[0543] 142.根据项目141的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用体外报告细胞测定,任选地使用HEK-Blue™CD40L细胞确定CD40活性。

[0544] 143.根据项目140至142中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于400、300、200、150、100、70、60、50、40、30、25、20或15ng/mL的EC₅₀激活CD40通路。

[0545] 144.根据项目143的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以10至200ng/mL的范围内的EC₅₀激活CD40通路。

[0546] 145.根据项目144的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以10至50ng/mL,优选地10至30ng/mL的范围内的EC₅₀激活CD40通路。

[0547] 146.根据项目140至145中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于100、60、50、40、30、20、10或1ng/mL的EC₅₀激活IFN通路。

[0548] 147.根据项目140至146中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于11ng/mL,优选地小于6ng/mL的EC₅₀激活IFN通路。

[0549] 148.根据项目140至147中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN通路是IFN α 、IFN β 、IFN ϵ 、IFN γ 、IFN ω 或者IFN λ 通路。

[0550] 149.根据项目148的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用体外报告细胞测定,任选地使用HEK-Blue™IFN- α/β 细胞确定IFN β 活性。

[0551] 150.根据项目148的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用体外报告细胞测定,任选地使用HEK-Blue™IFN- α/β 细胞确定IFN α 活性。

[0552] 151.根据项目148的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用体外报告细胞测定,任选地使用HEK-Blue™Dual IFN- γ 细胞确定IFN γ 活性。

[0553] 152.根据项目148的干扰素相关抗原结合蛋白,其中使用体外报告细胞测定,任选地使用HEK-Blue™IFN- λ 细胞确定IFN λ 活性。

[0554] 153.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中以1ng/mL,干扰素相关抗原结合蛋白将原代肝细胞的体外HBeAg释放降低了至少12%。

[0555] 154.根据项目153的用于用途的干扰素相关抗原结合蛋白,其中在1ng/mL时,干扰素相关抗原结合蛋白将原代肝细胞的体外HBeAg释放减少了多至90%。

[0556] 155.根据项目153的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于30ng/mL的EC₅₀降低HBeAg释放。

[0557] 156.根据项目155的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于10ng/mL的EC₅₀降低HBeAg释放。

[0558] 157.根据项目156的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于1ng/mL的EC₅₀降低HBeAg释放。

[0559] 158.根据项目156的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白以小于0.1ng/mL的EC₅₀降低HBeAg释放。

[0560] 159.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白能够将HBV-感染细胞中的一种或多种IFN通路生物标志物的表达水平上调优选地至少1.5-倍,更优选地至少2-倍,最优选地至少3-倍。

[0561] 160.根据项目159的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN通路生物标志物是趋化因子。

[0562] 161.根据项目160的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN通路生物标志物是干扰素刺激的基因ISG20。

[0563] 162.根据项目160的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN通路生物标志物是C-X-C趋化因子,其选自CXCL9、CXCL10和CXCL11。

[0564] 163.根据项目162的干扰素相关抗原结合蛋白,其中IFN通路生物标志物是CXCL10。

[0565] 164.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白不显著上调HBV-感染细胞中IL10、IL1 β 和IL2中的一种或多种的表达水平。

[0566] 165.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中与抗体CP870,893相比,干扰素相关抗原结合蛋白的全身暴露提高,优选地提高至少10%,更优选地提高至少15%,最优选地提高至少25%。

[0567] 166.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的全身暴露为至少1000 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 。

[0568] 167.根据项目166的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的全身暴露在1033 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 至1793 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 的范围内。

[0569] 168.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的半衰期为至少100h。

[0570] 169.根据项目168的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的半衰期在116至158h的范围内。

[0571] 170.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的清除率低于0.5 $\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$ 。

[0572] 171.根据项目170的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的清除在0.28至0.49 $\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$ 的范围内。

[0573] 172.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的分布容积Vss低于100 mL/kg 。

[0574] 173.根据项目172的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白的分布容积Vss在50至98 mL/kg 的范围内。

[0575] 174.根据以上项目中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白,其中干扰素相关抗原结合蛋白适合于通过使用编码干扰素相关抗原结合蛋白的核酸序列或者编码干扰素相关抗原结合蛋白的载体或载体体系的基因递送,向对其有需要的受试者施用。

[0576] 175.核酸,其编码如以上项目中任一项所列举的干扰素相关抗原结合蛋白。

[0577] 176.核酸,其编码如项目34至174中任一项所列举的融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段。

[0578] 177.根据项目176的核酸,其编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合

片段的轻链的IFN或其功能性片段,并且还编码激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链。

[0579] 178.根据项目177的核酸,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链包含以下所示的序列:SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 11、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO 13、SEQ ID NO 48、SEQ ID NO 49或SEQ ID NO 50,或者与编码任何这些序列的核酸具有至少95%的同一性的核酸序列。

[0580] 179.根据项目176的核酸,其编码融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的IFN或其功能性片段,并且还编码激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链。

[0581] 180.根据项目179的核酸,其中激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链包含SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4或SEQ ID NO 5中所示序列,或者与编码任何这些序列的核酸具有至少95%的同一性的核酸序列。

[0582] 181.核酸,其编码根据任何SEQ ID NO 28至47中所示的序列融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的IFN或其功能性片段,或者与编码任何这些序列的核酸具有至少95%的同一性的核酸序列。

[0583] 182.根据项目175至181的核酸,其中核酸还编码纯化标签。

[0584] 183.根据项目182的核酸,其中纯化标签是His-标签。

[0585] 184.根据项目182或183的核酸,其中核酸还编码切割位点以切掉纯化标签。

[0586] 185.根据项目184的核酸,其中核酸包含编码SEQ ID NO 27中所示的氨基酸序列的序列。

[0587] 186.根据项目175至185的核酸,其中核酸还编码信号肽。

[0588] 187.根据项目186的核酸,其中信号肽是分泌性信号肽。

[0589] 188.根据项目186或187的核酸,其中信号肽包含SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2中所示序列。

[0590] 189.根据项目188的核酸,其中信号肽包含SEQ ID NO:1中所示序列。

[0591] 190.根据项目188的核酸,其中信号肽包含SEQ ID NO:2中所示序列。

[0592] 191.载体或载体体系,其包含根据项目175至190中任一项的核酸。

[0593] 192.载体体系,其包含

[0594] (I) 第一载体,其包含编码融合至根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的核酸,和第二载体,其包含编码根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的核酸;或者

[0595] (II) 第一载体,其包含编码融合至根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的IFN或其功能性片段的核酸,和第二载体,其包含编码根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的核酸。

[0596] 193.载体体系,其包含

[0597] (I) 用于融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的IFN或其功能性片段的表达的根据项目191的第一载体,和用于激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结

合片段的重链的表达的第二载体;或者

[0598] (II) 用于融合至激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的重链的IFN或其功能性片段的表达的根据项目191的第一载体,和用于激动性抗-CD40抗体或其激动性抗原结合片段的轻链的表达的第二载体。

[0599] 194.组合物,其包含根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体或者根据项目191至193中任一项的载体体系。

[0600] 195.根据项目194的组合物,其中组合物是药物组合物。

[0601] 196.根据项目195的组合物,其中药物组合物适合于口服、肠胃外或局部施用或者通过吸入施用。

[0602] 197.根据项目196的组合物,其中药物组合物适合于口服。

[0603] 198.根据项目196的组合物,其中药物组合物适合于局部施用。

[0604] 199.根据项目196的组合物,其中药物组合物适合于通过吸入施用。

[0605] 200.根据项目196的组合物,其中药物组合物适合于肠胃外施用。

[0606] 201.根据项目200的组合物,其中药物组合物适合于静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道施用。

[0607] 202.根据项目201的组合物,其中药物组合物适合于注射,优选地静脉内或动脉内注射或滴注。

[0608] 203.根据项目195至202中任一项的组合物,其包含至少一种缓冲剂。

[0609] 204.根据项目203的组合物,其中缓冲剂为乙酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐。

[0610] 205.根据项目204的组合物,其中缓冲剂是乙酸盐。

[0611] 206.根据项目204的组合物,其中缓冲剂为甲酸盐。

[0612] 207.根据项目204的组合物,其中缓冲剂为柠檬酸盐。

[0613] 208.根据项目195至207中任一项的组合物,其中药物制剂包含表面活性剂。

[0614] 209.根据项目208的组合物,其中表面活性剂选自普卢兰尼克(pluronic)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇和泰洛沙泊(tyloxapol)。

[0615] 210.根据项目209的组合物,其中表面活性剂为聚山梨醇酯。

[0616] 211.根据项目210的组合物,其中表面活性剂为聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯100。

[0617] 212.根据项目211的组合物,其中表面活性剂为聚山梨醇酯20。

[0618] 213.根据项目211的组合物,其中表面活性剂为聚山梨醇酯80。

[0619] 214.根据项目195至213中任一项的组合物,其包含稳定剂,任选地其中稳定剂为白蛋白。

[0620] 215.宿主细胞,其包含根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体或者根据项目191至193中任一项的载体体系。

[0621] 216.制备根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的方法,其包括培养根据项目215的宿主细胞和回收干扰素相关抗原结合蛋白。

[0622] 217.非人转基因动物或转基因植物,其包含根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体或者根据项目191至193中任一项的载体体系,其中非人转基因动物或

转基因植物表达核酸。

[0623] 218. 制备根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白的方法,其包括从根据项目217的非人转基因动物或转基因植物分离干扰素相关抗原结合蛋白的步骤。

[0624] 219. 用作药物的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或根据项目195至214中任一项的组合物。

[0625] 220. 用于治疗患者中乙型肝炎病毒 (HBV) 感染和/或减少一种或多种HBV感染症状的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或根据项目195至214中任一项的组合物。

[0626] 221. 用于根据项目220的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中治疗乙型肝炎病毒 (HBV) 感染包括减少患者中一种或多种HBV感染症状。

[0627] 222. 与未处理的HBV-感染细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,用于减少HBV-感染细胞培养物或HBV-感染患者中的HBV病毒载量的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或者根据项目195至214中任一项的组合物。

[0628] 223. 用于根据项目222的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中HBV病毒载量减少了约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0629] 224. 用于根据项目222或223的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中通过PCR或qRT-PCR确定HBV病毒载量。

[0630] 225. 与未处理的HBV-感染细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,用于减少HBV-感染细胞培养物或HBV-感染患者中的HBV病毒滴度的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或者根据项目195至214中任一项的组合物。

[0631] 226. 用于根据项目225的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中HBV病毒滴度减少了约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0632] 227. 用于根据项目225或226的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中通过PCR或qRT-PCR确定HBV病毒滴度。

[0633] 228. 与未处理的HBV-感染细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,用于减少HBV-感染细胞培养物或HBV-感染患者中的HBV cccDNA的转录的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或者根据项目195至214中任一项的组合物。

[0634] 229. 用于根据项目228的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中cccDNA的转录减少了约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0635] 230. 用于根据项目228或229的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中通过qPCR确定cccDNA转录。

[0636] 231. 与未处理的HBV-感染细胞培养物或者治疗前的相同患者相比,用于减少HBV-感染细胞培养物或HBV-感染患者中的前基因组HBV RNA水平的根据项目1至174中任一项的干扰素相关抗原结合蛋白、根据项目175至190中任一项的核酸、根据项目191的载体、根据项目191至193中任一项的载体体系或者根据项目195至214中任一项的组合物。

[0637] 232. 用于根据项目231的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中前基因组HBV RNA的水平减少了约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0638] 233. 用于根据项目231或232的用途的干扰素相关抗原结合蛋白、核酸、载体、载体体系或组合物,其中通过qRT-PCR确定了前基因组HBV RNA的水平。

表 9a: IFN- β 基 IFA		IFN- γ	IL10	IL12p40	IL1 β	IL2	IL6	IP10	TFN α
NT	供体 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	457.0	nd
	供体 2	nd	nd	101.4	nd	nd	nd	672.7	4.6
	供体 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	302.3	nd
	供体 4	nd	nd	104.0	nd	nd	nd	648.2	nd
LPS	供体 1	2023.0	148.0	7757.1	5116.0	nd	20709.6	6646.7	1706.3
	供体 2	4675.6	57.2	6265.6	6263.7	20.7	11070.1	39539.4	2987.1
	供体 3	1537.3	192.9	1750.0	3137.6	nd	16837.7	6141.0	944.9
	供体 4	2360.7	299.7	1676.5	6423.0	18.6	20654.0	22848.2	1107.2
IFA1	供体 1	98.1	nd	nd	nd	nd	16.3	46033.6	43.7
	供体 2	nd	nd	118.8	nd	nd	11.8	43545.5	36.6
	供体 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23562.1	34.0
	供体 4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31922.5	57.1
IFA2	供体 1	nd	nd	nd	nd	nd	18.6	43382.3	41.0
	供体 2	nd	nd	114.2	nd	nd	17.4	43283.4	33.8
	供体 3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25961.4	32.2
	供体 4	109.4	nd	nd	nd	nd	nd	38445.0	66.0

[0639]

表 9b: IFN- α 基 IFA		IFN- γ	IL10	IL12p40	IL1 β	IL2	IL6	IP10	TFN α
NT	供体 5	12.6	0.6	91.6	0.9	0.9	3.9	270.3	2.1
	供体 6	5.0	1.1	129.9	19.9	#DIV/0!	423.2	1052.7	16.0
	供体 7	16.5	2.0	143.7	22.1	2.1	426.9	1025.0	12.6
	供体 8	9.7	0.1	58.3	1.8	#DIV/0!	2.6	594.2	2.2
LPS	供体 5	10848.1	46.6	8463.3	8712.3	10.5	30713.2	20538.9	1738.3
	供体 6	2467.1	175.6	5364.9	6557.9	3.3	31735.5	17262.6	2583.3
	供体 7	3310.1	248.6	6814.8	9123.9	16.6	39139.8	59939.2	6270.1
	供体 8	2555.6	138.5	2942.9	6767.5	9.6	31756.7	20062.7	1265.5
FA25	供体 5	495.5	1.5	99.5	1.9	5.5	30.5	39637.5	30.4
	供体 6	312.2	2.0	129.8	16.5	4.0	51.8	61963.8	71.4
	供体 7	271.2	2.9	130.3	9.1	4.4	75.0	133442.5	30.3
	供体 8	441.6	1.9	74.8	6.8	3.2	44.3	95647.9	87.4
FA26	供体 5	330.4	2.0	98.1	2.1	6.4	29.3	37880.2	32.1
	供体 6	303.7	3.3	150.8	17.1	3.1	53.0	72944.8	45.7
	供体 7	180.3	2.0	135.6	9.2	4.9	75.2	154696.3	29.7
	供体 8	421.4	2.8	95.7	6.8	4.1	42.1	79768.5	89.1
FA27	供体 5	430.7	2.2	127.8	3.1	7.1	32.9	40214.1	61.3
	供体 6	286.5	2.0	148.5	16.8	2.1	66.0	83445.0	70.1
	供体 7	350.3	4.7	117.6	9.3	4.4	73.5	195844.6	105.6
	供体 8	440.1	2.6	68.6	8.9	0.6	46.9	102676.8	43.4
FA28	供体 5	620.1	2.7	127.3	3.4	8.7	35.0	40958.5	24.6
	供体 6	264.7	2.0	170.3	13.6	2.4	45.7	62333.3	33.0
	供体 7	289.6	2.7	144.8	13.7	3.9	77.1	176521.8	59.6
	供体 8	436.2	2.5	74.4	4.9	2.3	36.8	79217.6	37.6
FA29	供体 5	692.7	1.3	108.7	2.3	3.7	33.9	55062.8	30.3
	供体 6	183.1	2.2	158.8	11.6	0.4	44.4	58665.4	44.3
	供体 7	235.5	2.6	127.6	9.6	2.0	65.6	136893.2	90.5
	供体 8	301.1	3.0	77.7	5.8	0.6	33.8	69226.3	48.0
FA30	供体 5	709.7	1.2	110.6	2.9	5.5	38.0	63040.7	36.5
	供体 6	122.9	2.0	153.0	14.9	1.7	46.1	67861.2	37.4
	供体 7	64.6	1.0	114.0	10.0	2.9	75.5	149093.0	32.7
	供体 8	206.0	1.9	71.1	6.8	1.8	37.9	85986.9	40.5

[0640] 表10A

[0641]

基质	化合物	剂量 生命阶段	方法	C ₀ (µg/mL)	AUC (0-最后) (µg.h/mL)	T _{最后} (h)	AUC (0- inf) (µg.h/mL)	外推 %	T _{1/2t} (h)	CI (mL/hr/kg)	V ₀ (mL/kg)
血清	CP870,893	0,5 mg/kg 168h	ELISA- IgG2	7,15	241	168	590	59	264 (长)	0,35 (低)	296 (低)
血清	IFA27	0,5 mg/kg 240h	ELISA- IgG2	14,7	1501	240	2552	41	218 (长)	0,20 (低)	55 (低)
血清	IFA27	0,5 mg/kg 240h	ELISA-IFN	16,9	1318	240	1793	26	125 (长)	0,28 (低)	50 (低)
血清	IFA29	0,5 mg/kg 240h	ELISA-IFN	11,6	804	240	1033	22	116 (长)	0,49 (低)	78 (低)
血清	IFA30	0,5 mg/kg 240h	ELISA-IFN	8,12	741	240	1089	31	158 (长)	0,46 (低)	98 (低)

[0642] 表10B

[0643]

基质	化合物	剂量 生命阶段	方法	C ₀ (µg/mL)	AUC (0-最后) (µg.h/mL)	T _{最后} (h)	AUC (0- inf) (µg.h/mL)	外推 %	T _{1/2t} (h)	CI (mL/hr/kg)	V ₀ (mL/kg)
血清	IFA25	0,5 mg/kg 504h	ELISA-IFN	7,45	1328	504	1500	11	154 (长)	0,34 (低)	73 (低)
血清	IFA26	0,5 mg/kg 504h	ELISA-IFN	8,20	988	336	1027	3,8	59 (长)	0,49 (低)	57 (低)
血清	IFA28	0,5 mg/kg 504h	ELISA-IFN	9,38	1048	504	1264	17	213 (长)	0,40 (低)	105 (低)
血清	Pegasys	0,3 mg/kg 504h	ELISA- IFNα 特异性	8,3	210	168	215	2	30 (中等)	1,4 (低)	62 (低)
血清	CP870,893	0,5 mg/kg 504h	ELISA- IgG2	11,9	527	168	797	34	116 (长)	0,63 (低)	96 (低)
血清	IFA25	0,5 mg/kg 504h	ELISA- IgG2	11,8	1292	240	1971	34	155 (长)	0,26 (低)	56 (低)

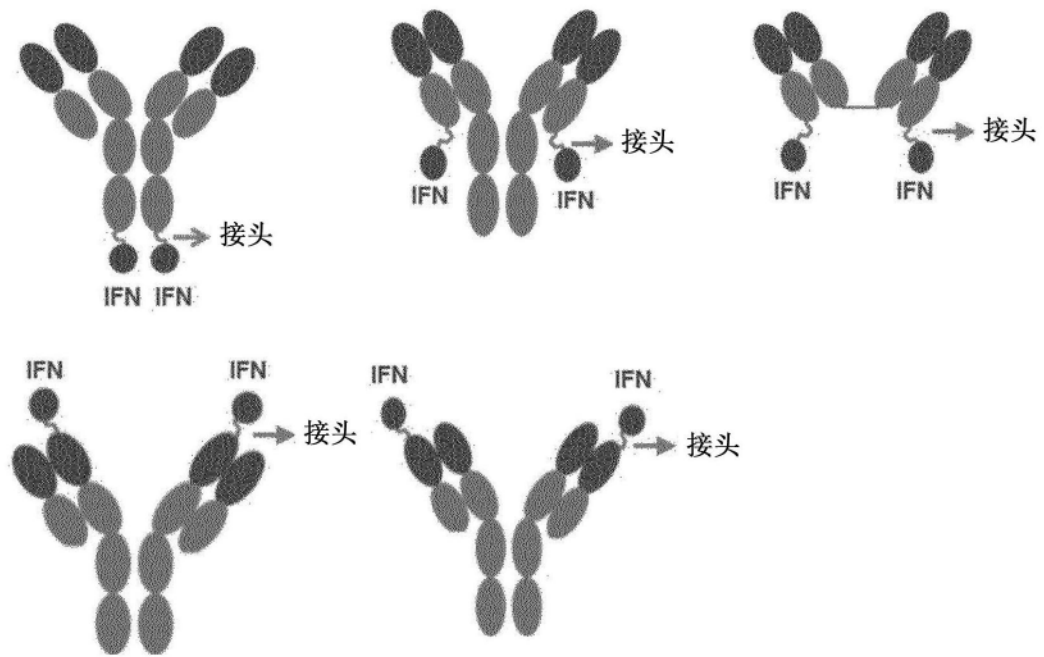
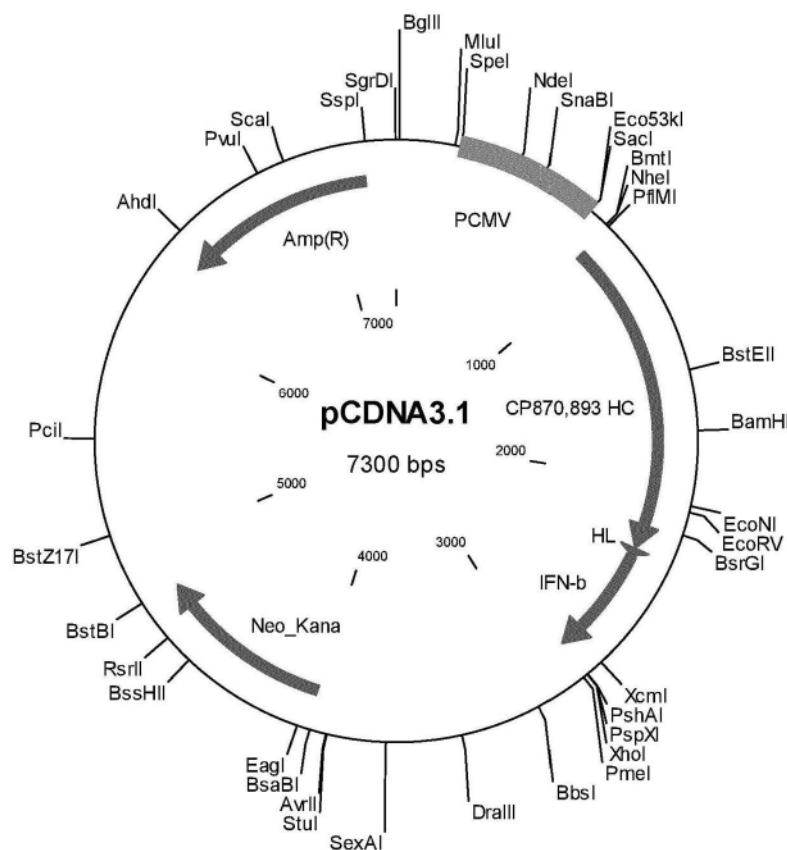


图1



编码 seq ID NO 32 的核酸序列

ATGGGCTGGTCTGCATCATTCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACAGGCGTGCCTCTCAGGTTCAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGA
 AGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGCTCTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGCTACTACATGCCTGGGTCCG
 ACAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCTGGATCAATCCTGACAGCGCGGCGACCAACTACGCCAGAAATCCAGG
 GCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGCATCAGACCGCTACATGGAATGAACCGGCTGAGATCCGACGACACCGCGTGT
 ACTATTGCGCCAGAGATCAGCCTCTGGGCTACTGCACAAATGGCGTGTGCAGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGG
 TTACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCTCCGTTTTCTCTGGCTCCTTGTCTAGAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCTC
 TGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTCTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCCGGCGTGCACACATT
 TCCAGCTGTCTGCAGAGCAGCGCCTGTACTCTCTGTCTAGCGTGGTCAACCGTGCCTAGCAGCAATTTCCGGACCCAGACCTAC
 ACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAAACGGAAGTGTCTGCGTGAATGCCCTCCTGT
 CCTGCTCCTCCAGTGGCCGACCTTCCGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAAACCCCTGAAGT
 GACCTGCGTGGTGGTGGATGTCTCACGAGGATCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGCGTGAAGTGACAACG
 CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTTCAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGACTGGCTGA
 ACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCTGCTCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGCCAGC
 CTCGCGAGCCTCAGTTTACACTGCCTCCAAGCCGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGG
 GCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCAACCTCTATGCTGGA
 CAGCGACGGCTCATTCTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGTTCTGT
 GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCTGAGCCCTGGCGCTGAAGCCGCTGCTAAAGAAGCTGCC
GCCAAGGCCATGAGCTACAACCTGCTGGGCTTTCTGCAGCGGAGCAGCAACTCCAGTGCCAGAACTGCTGTGGCAGCTGAA
TGGCCGCTGGAATACTGCTGAAGGACCGGATGAACCTTCGACATCCCCGAGGAAATCAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAA
GAGGACGCGCTCTGACCATCTACGAGATGCTGCAGAACATCTTCGCCATCTTCGGCAGGATAGCAGCAGCACCGGATGGAA
CGAGACAATCGTGGAATACTGCTGGCAACGTGTACCACGAGATCAACCACTGAAAACCGTGTGGAAGAGAAGCTGGAA
AAAGAGGACTTCAACCGGGCAAGCTGATGAGCAGCTGCACCTGAAGCGGTACTACGGCAGAACTCTGCACTACCTCAAGG
CCAAAGAGTATAGCACTGCGCTGGACCATGTGCGGTGGAAATCTGCGGAACTTCTACTTCATCAACAGACTGACCGGCT
ACCTGCGCAACTGA

图2A

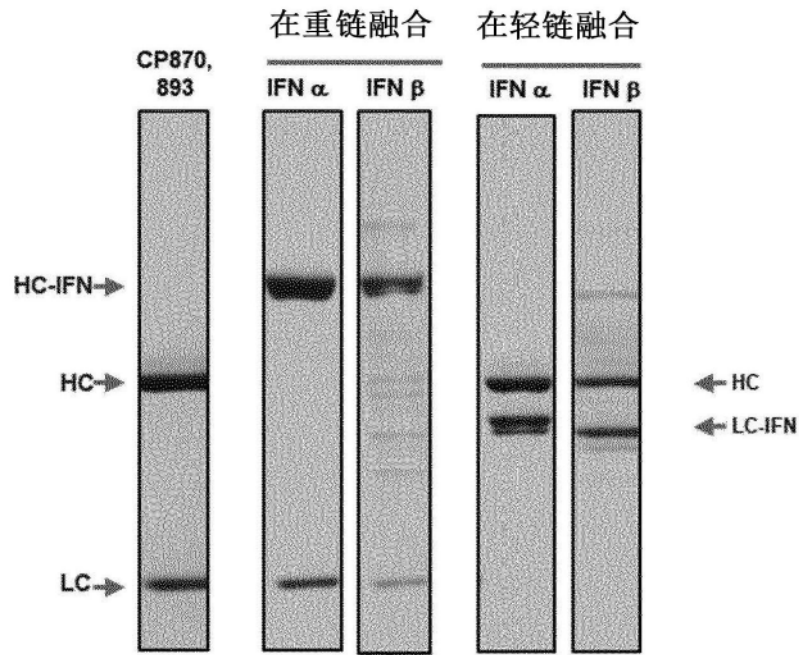


图2B

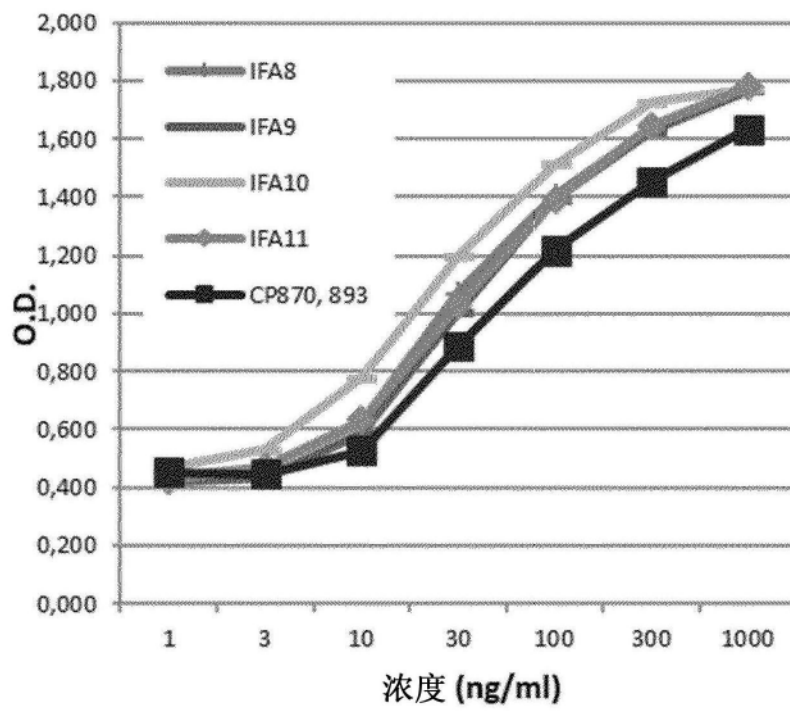


图3A

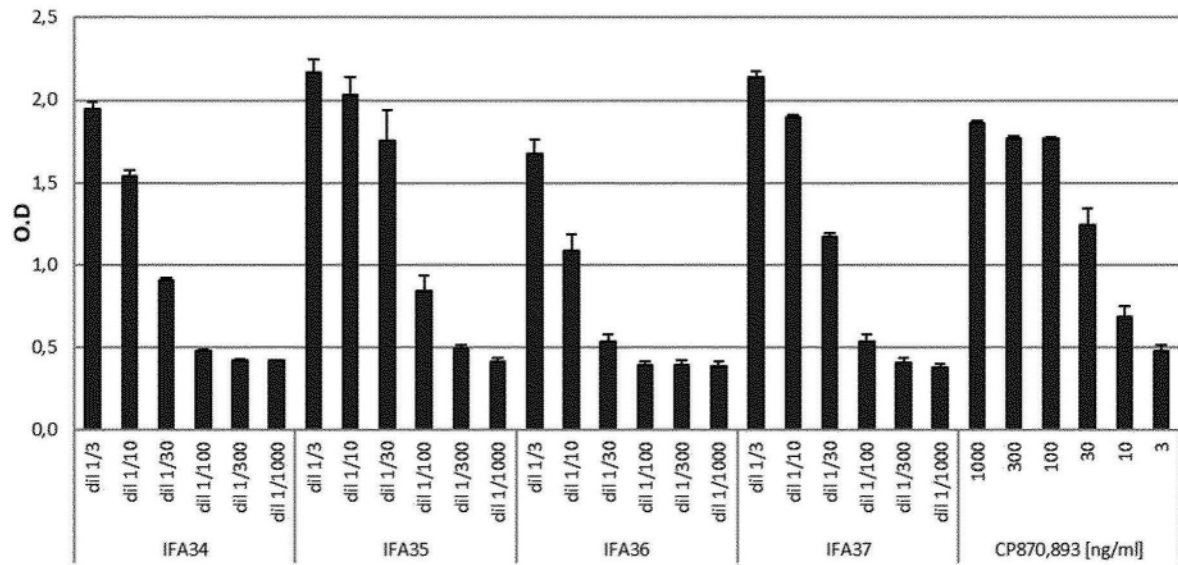


图3B

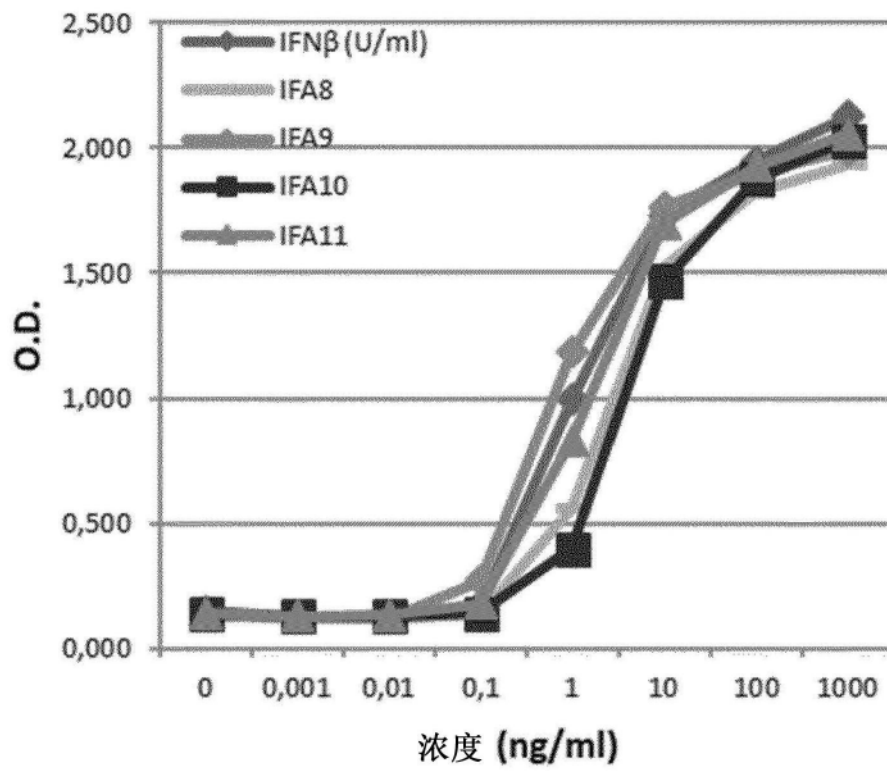
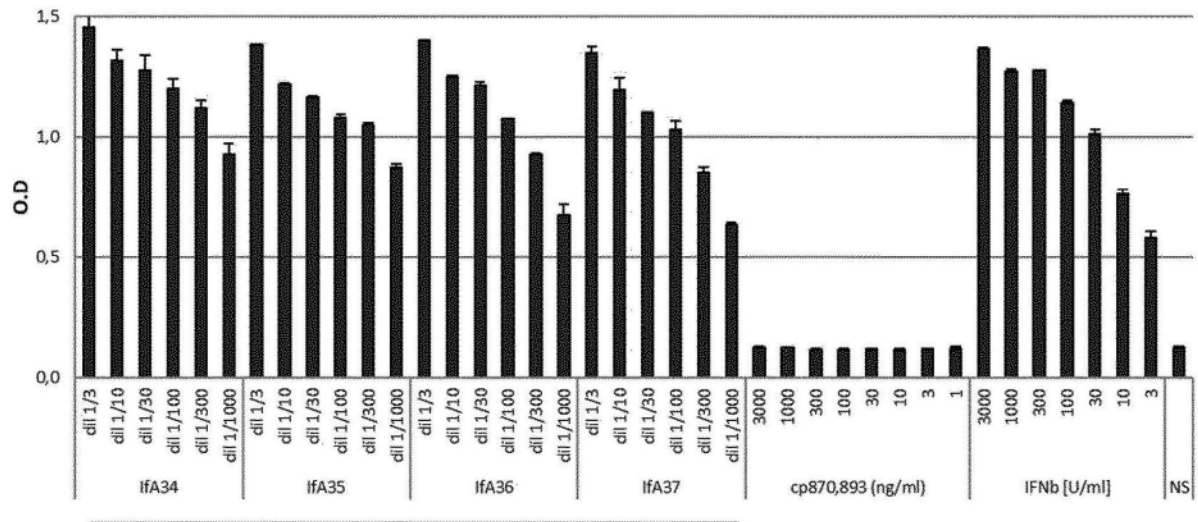


图3C



来自 HEK 转染细胞的上清液

图3D

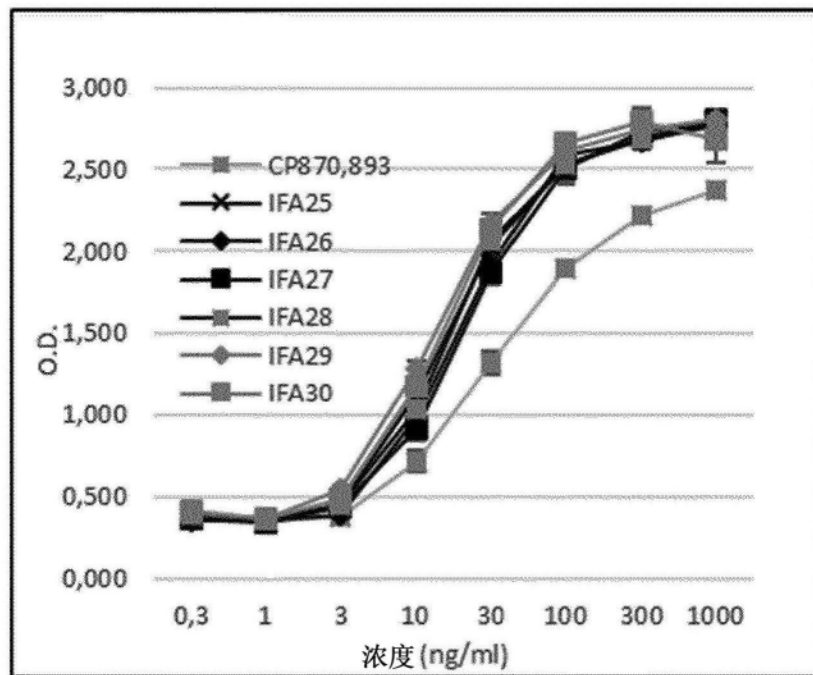


图4A

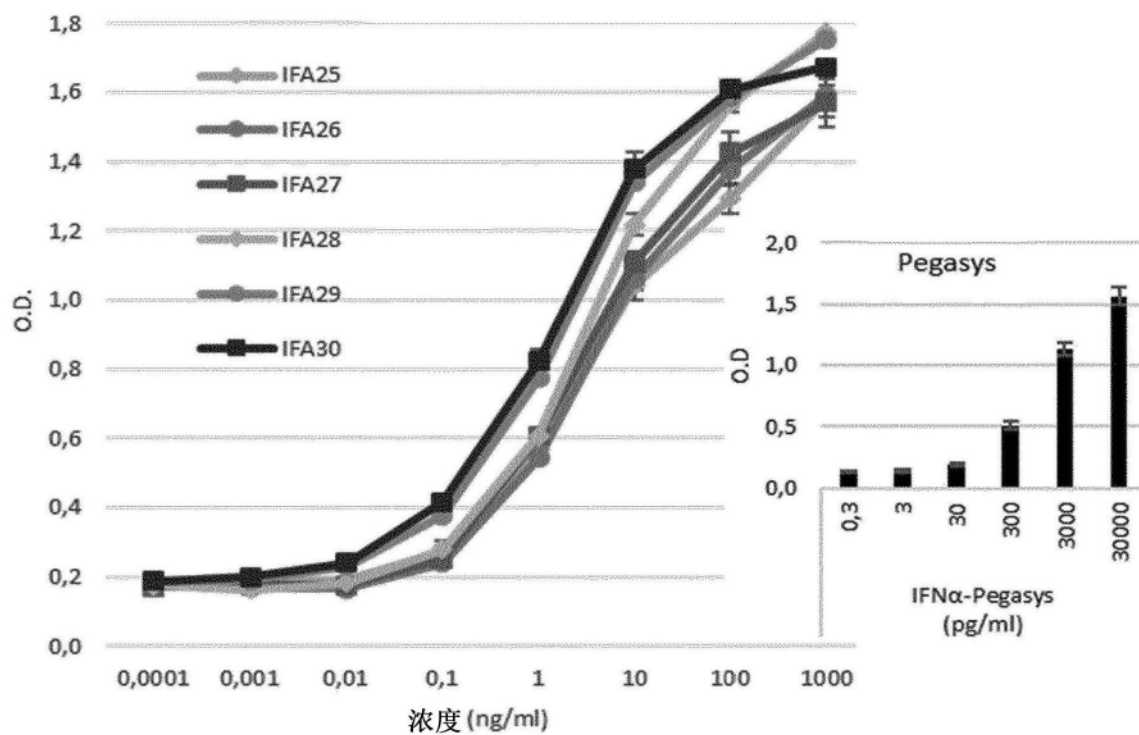


图4B

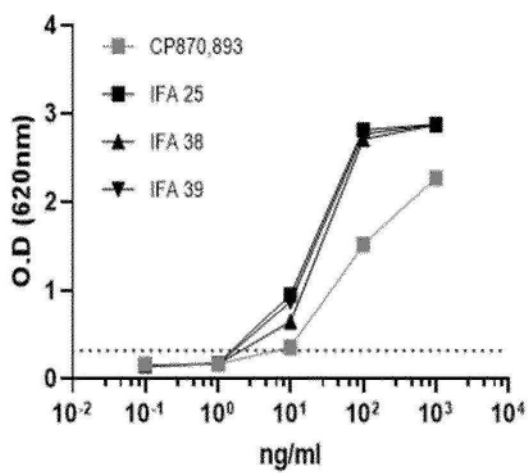


图4C

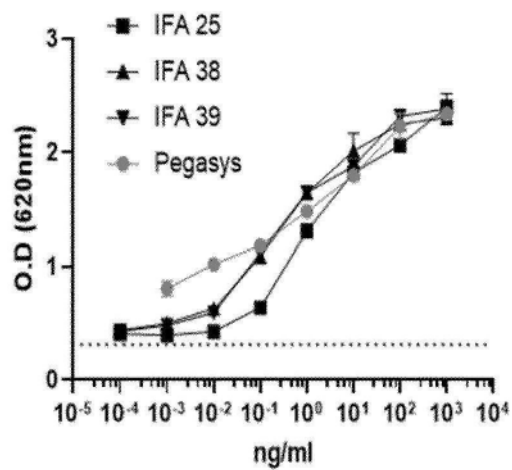


图4D

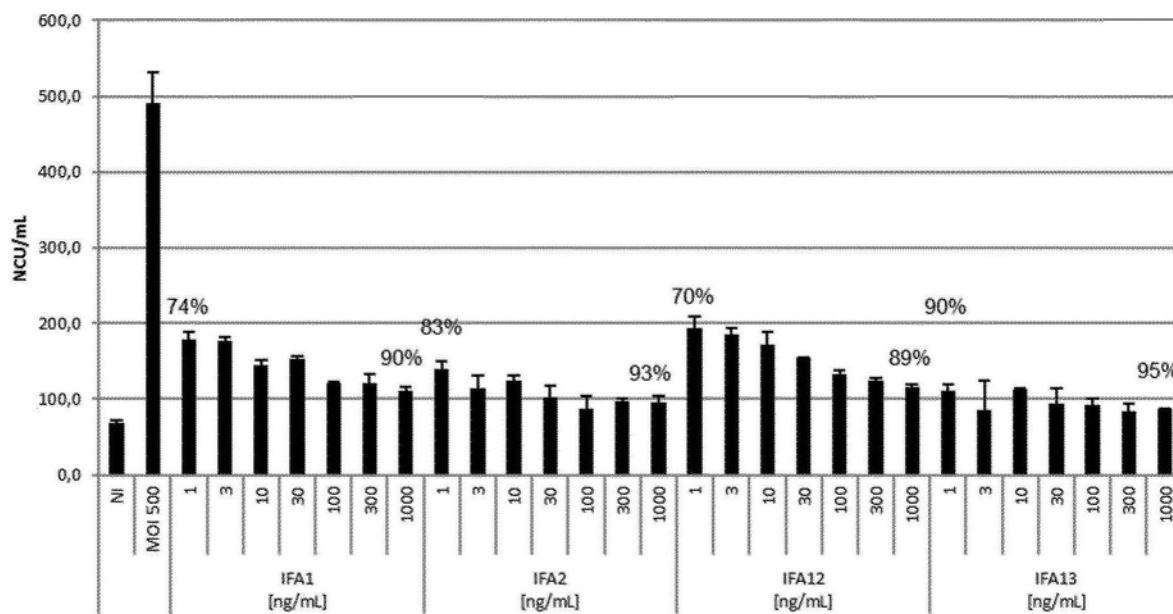


图5

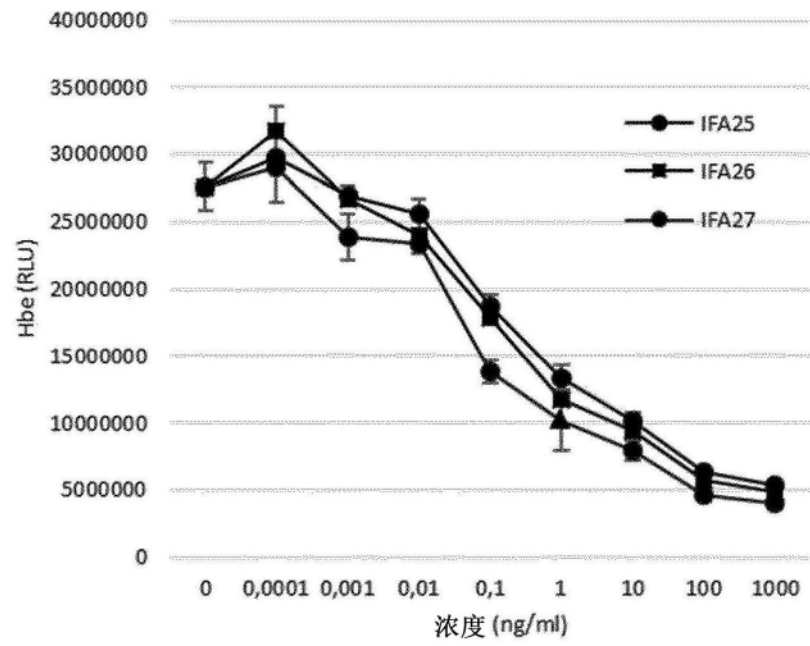


图6A

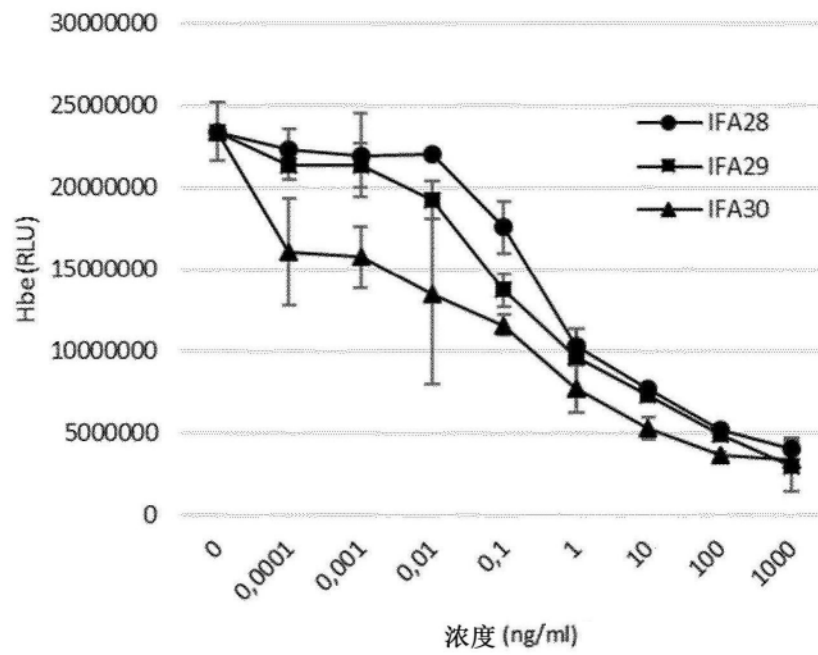


图6B

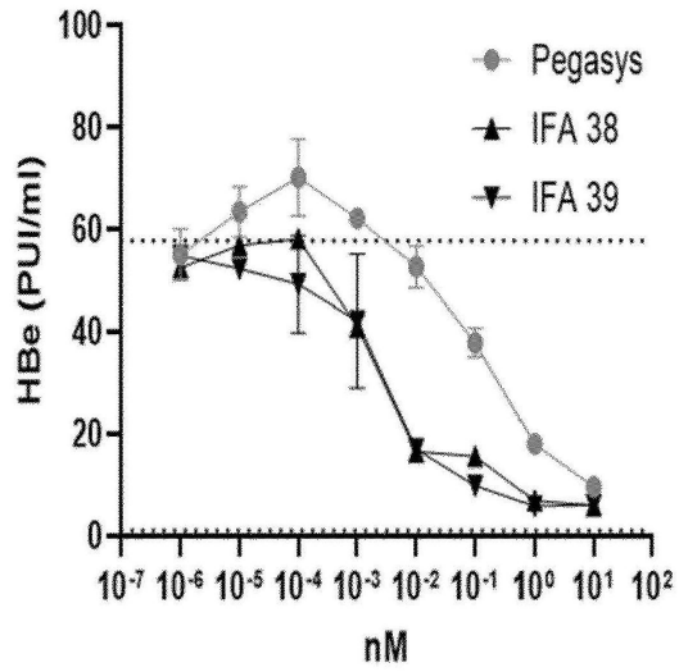


图6C

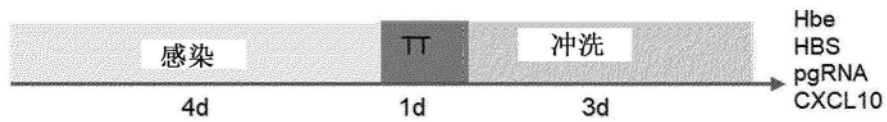


图6D

HBeAg 释放

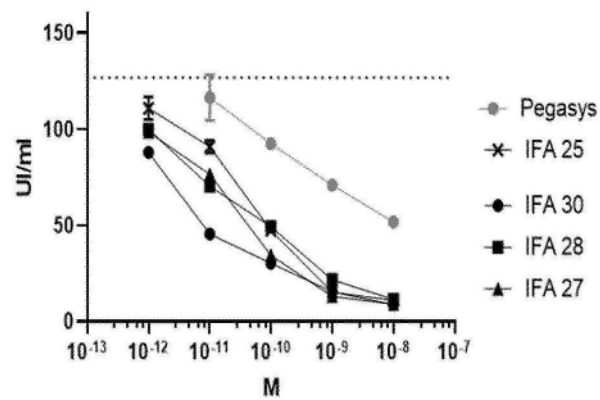


图6E

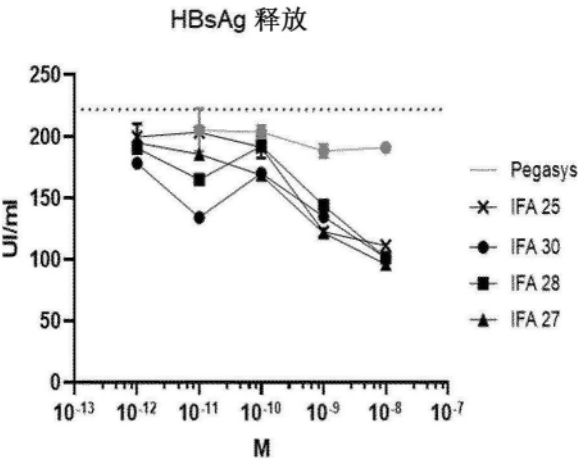


图6F

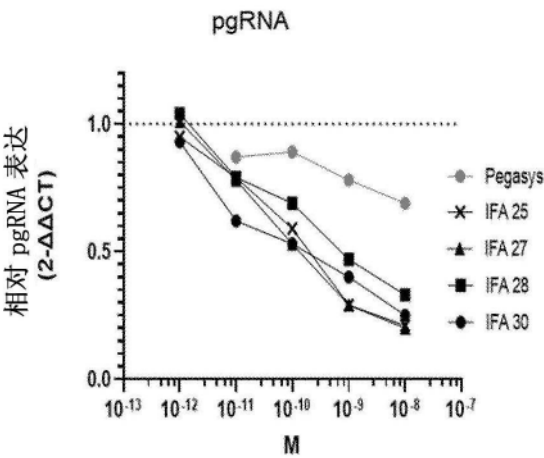


图6G

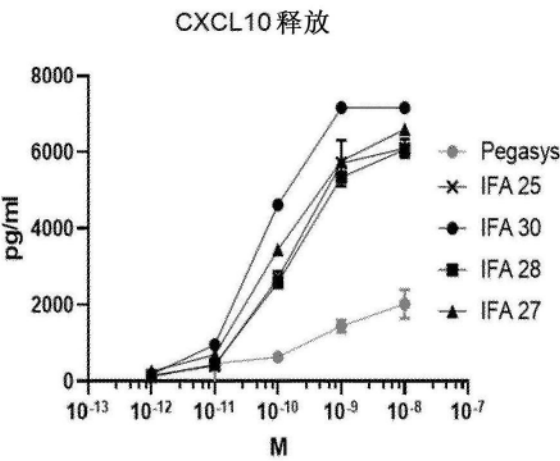


图6H

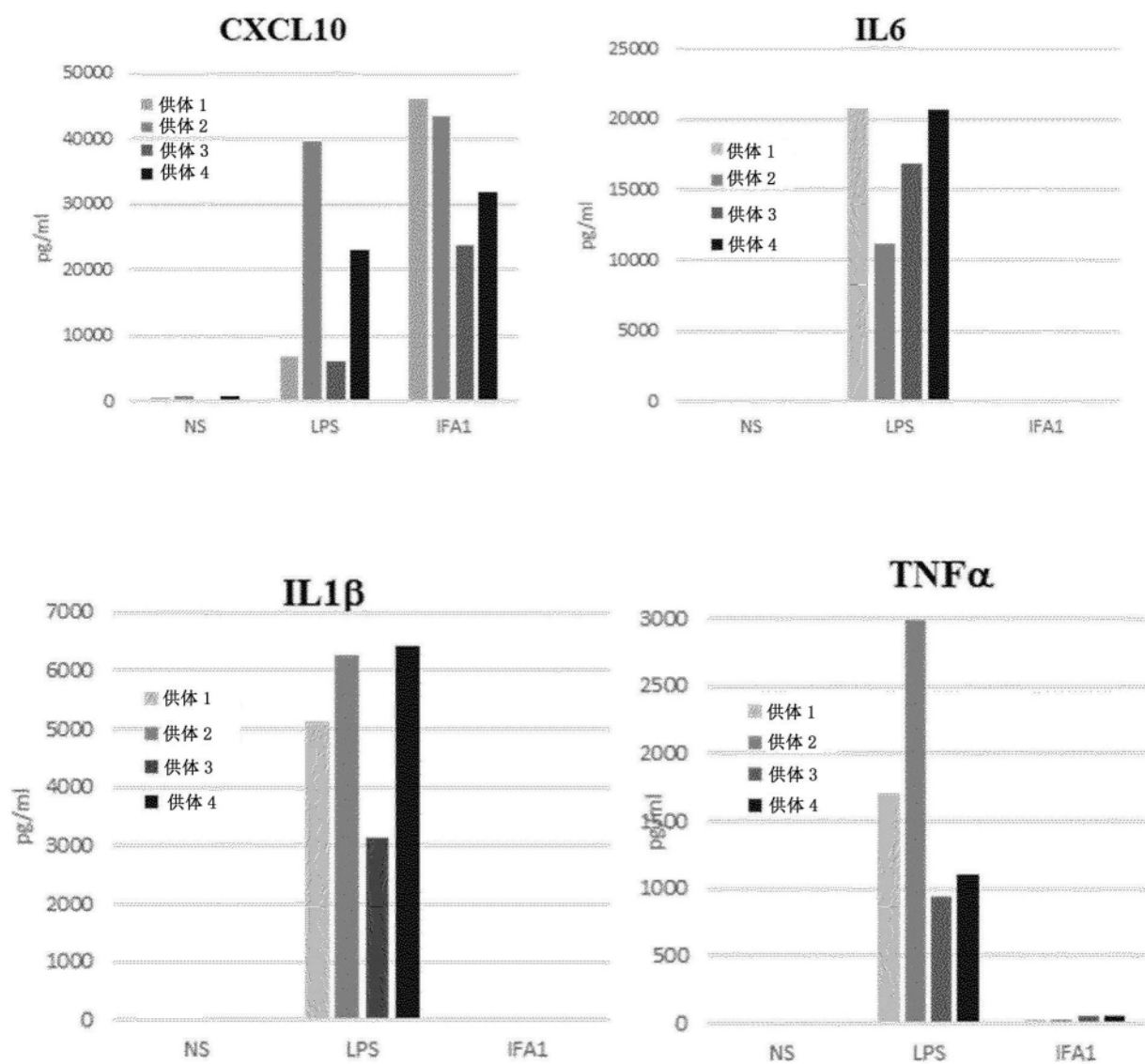


图7

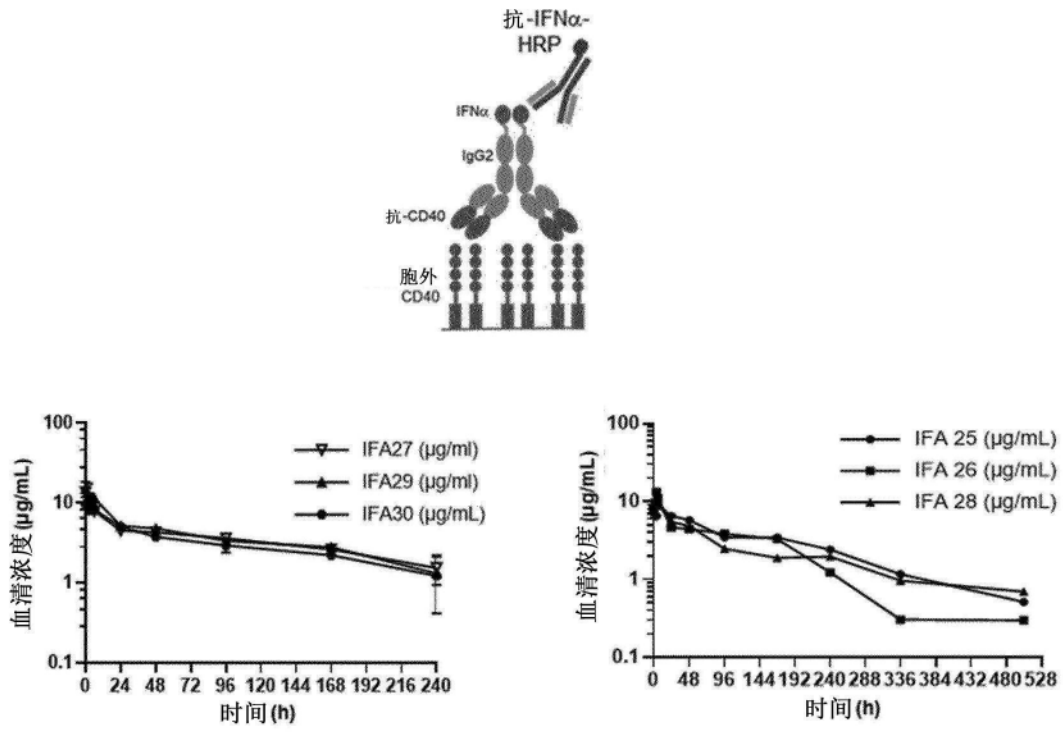


图8A

图8B

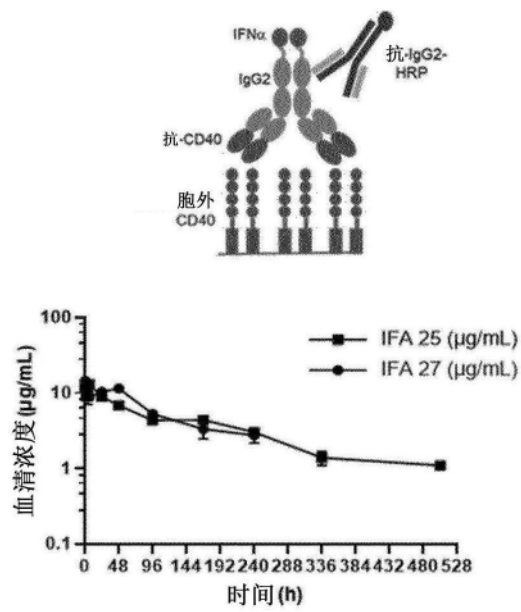


图8C

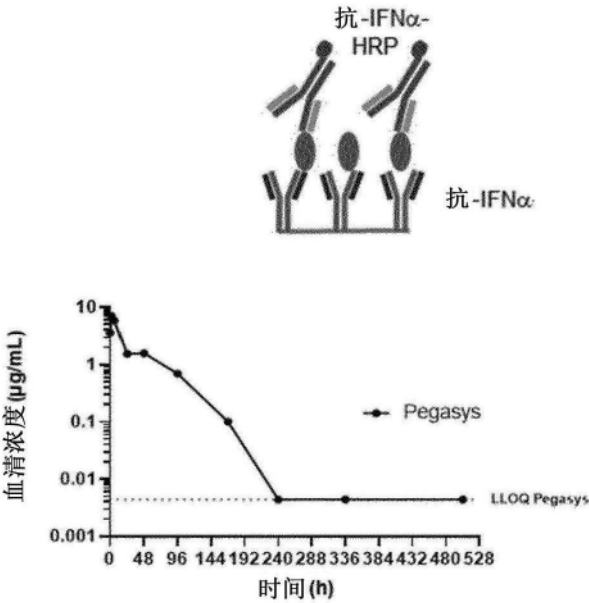


图8D

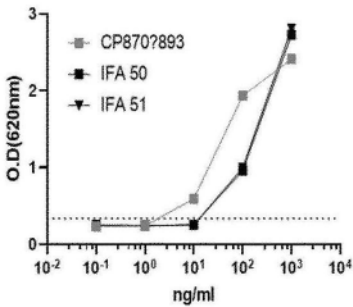


图9A

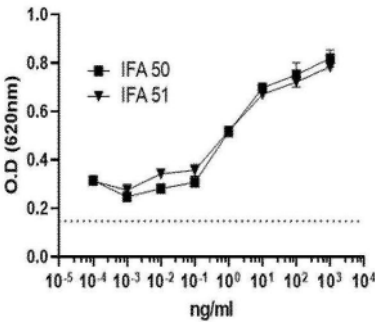


图9B

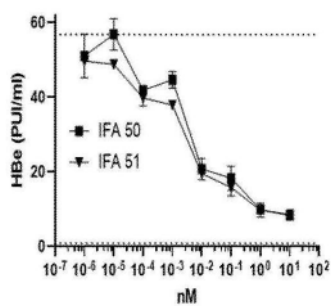


图9C

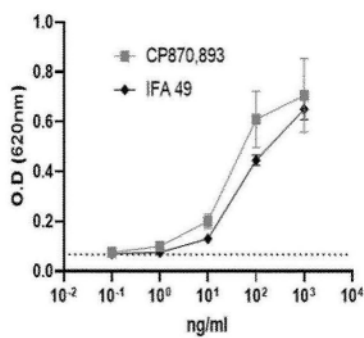


图10A

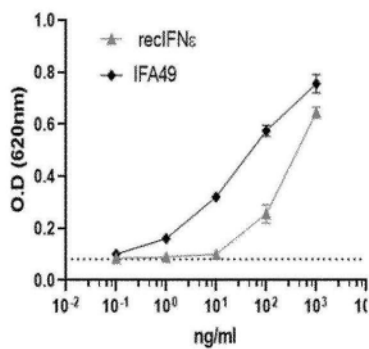


图10B

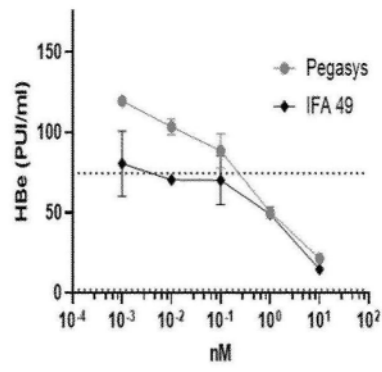


图10C

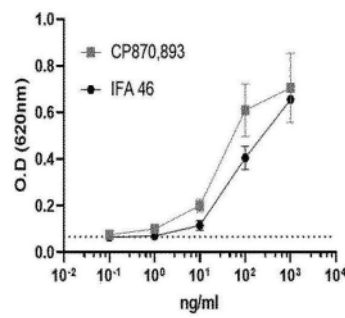


图11A

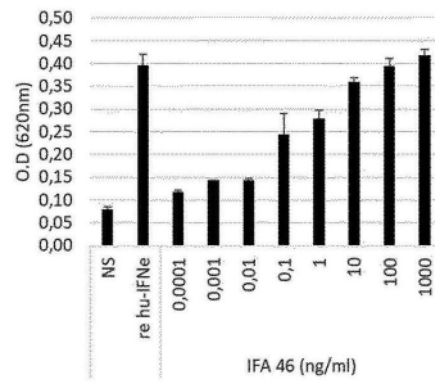


图11B

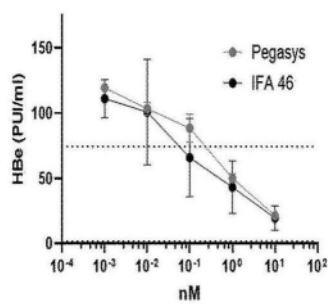


图11C

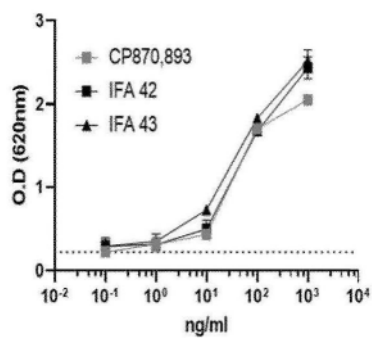


图12A

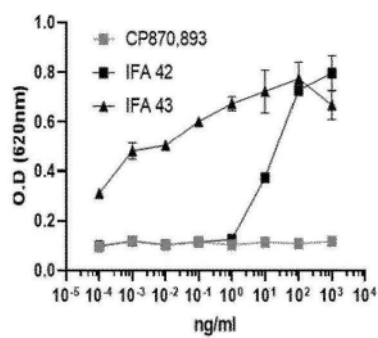


图12B

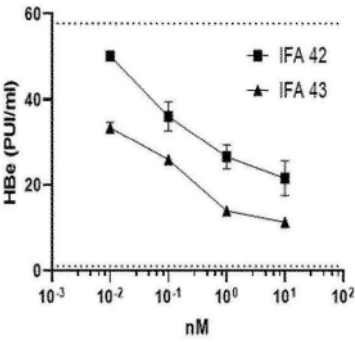


图12C

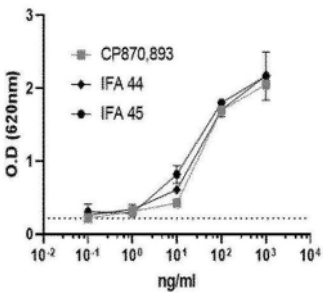


图13A

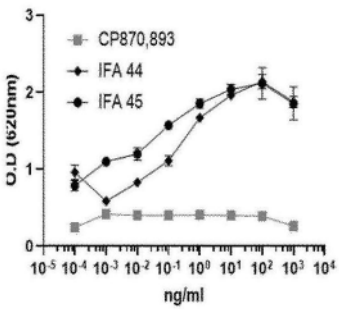


图13B

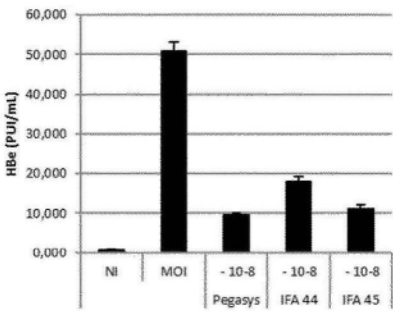


图13C