



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114026124 B

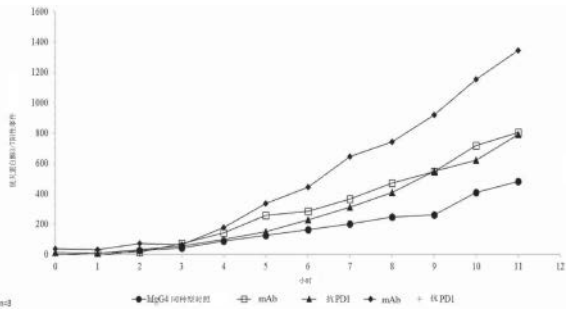
(45) 授权公告日 2025. 01. 10

(21) 申请号 202080045427.7
(22) 申请日 2020.04.28
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114026124 A
(43) 申请公布日 2022.02.08
(30) 优先权数据
62/839,841 2019.04.29 US
62/965,921 2020.01.26 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.21
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2020/050479 2020.04.28
(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/222235 EN 2020.11.05
(73) 专利权人 4C生物医学公司
地址 英国伦敦
专利权人 特哈休莫医学研究基础设施和服务公司

(72) 发明人 E·格林伯格
G·伽罗雷-哈斯克尔
E·梅哈维-肖厄姆 G·马尔克尔
J·沙赫特
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟
(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(56) 对比文件
US 2016090420 A1,2016.03.31
审查员 赵陆海
权利要求书2页 说明书26页
序列表7页 附图27页

(54) 发明名称
抗HVEM抗体及其用途

(57) 摘要
提供了结合HVEM、抑制HVEM-BTLA相互作用和激活下游HVEM信号的试剂。还提供了用那些试剂和包含那些试剂的试剂盒治疗疾病的方法。



1. 结合HVEM并且抑制所述HVEM与BTLA之间的相互作用的抗体或其抗原结合片段,包含三个重链CDR (CDR-H) 和三个轻链CDR (CDR-L),其中:CDR-H1由SEQ ID NO:1 (SYAMS) 中列出的氨基酸序列组成,CDR-H2由SEQ ID NO:2 (AISGSGGSTYYADSVKG) 中列出的氨基酸序列组成,CDR-H3由SEQ ID NO:3 (APGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列组成,CDR-L1由SEQ ID NO:4 (RASQSVSSYLA) 中列出的氨基酸序列组成,CDR-L2由SEQ ID NO:5 (GASSRAT) 中列出的氨基酸序列组成,并且CDR-L3由SEQ ID NO:6 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:7),所述轻链可变区包含序列ELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8)。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,包含:重链,所述重链包含序列MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTK VDKRVE SKYGPCCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:9);和轻链,所述轻链包含序列MGWSCIIILFLVATATGVHSELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。

4. 权利要求1-3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其在结合时激活通过所述HVEM的下游信号传导。

5. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述通过所述HVEM的下游信号传导包括核因子活化B细胞 κ -轻链增强子 (NF- κ B) 介导的转录。

6. 权利要求1-3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是单链抗体 (scFv)。

7. 权利要求1-3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包括IgG2或IgG4。

8. 药物组合物,其包含权利要求1至3中任一项的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。

9. 权利要求8所述的药物组合物,其用于生产用于治疗HVEM阳性癌症或癌前期病变的药物。

10. 根据权利要求8所述的药物组合物和抗PD-1/PD-L1阻断剂的组合,其用于生产用于治疗HVEM阳性癌症或癌前期病变的药物。

11. 根据权利要求8所述的药物组合物和抗PD-1阻断性抗体或抗PD-L1阻断性抗体的组合,其用于生产用于治疗HVEM阳性癌症或癌前期病变的药物。

12. 确定待用包括含有权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段的药物组合物的药物治疗的受试者的适合性的离体方法,所述方法包括接受来自从所述受试者的疾病样品并确定所述样品中的HVEM水平,其中HVEM的阳性表达表明所述受试者适合治疗。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中HVEM的阳性表达包括与健康样品或预定阈值相比升高的HVEM水平。

14. 检测样品中HVEM的方法, 所述方法包括将所述样品与权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触, 从而检测HVEM。

15. 试剂盒, 其包含权利要求8所述的药物组合物和以下中的至少一项:

- a. 抗PD-1/PD-L1阻断剂;
- b. 说明本发明所述的药物组合物是与抗PD-1/PD-L1阻断剂一起使用的标签; 和
- c. 第二检测分子, 所述第二检测分子用于检测权利要求1至3中任一项的所述至少一种抗体或其抗原结合片段。

抗HVEM抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月26日提交的美国临时专利申请号62/965,921和2019年4月29日提交的美国临时专利申请号62/839,841的优先权的权益,其内容均通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明属于免疫疗法领域。

背景技术

[0004] 被设计为增强免疫反应的免疫疗法被认为是激活免疫疗法并且处于癌症治疗的前沿。目前,免疫检查点阻断疗法成功地被用于晚期非小细胞肺癌(NSCLC)、转移性黑素瘤和晚期肾细胞癌(RCC)的治疗。由不同公司开发和生产的一些此类药物——包括针对免疫检查点程序性细胞死亡蛋白1受体(PD1)、程序性细胞死亡蛋白1配体(PDL1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抗体——已在不同癌症类型中显示出巨大前景并已获得FDA批准。然而,患者的反应率仍然不是最佳的,因为通常只有10%至40%的被治疗的患者受益,且同时患者可能会遭受免疫疗法治疗后的副作用(Post Immunotherapy Treatments Side-Effects)。此外,用这些试剂治疗可能会通过另外的免疫检查点的上调诱导抗性。与单一试剂相比,黑素瘤患者中抗PD1和抗CTLA-4疗法的组合显示出更高的反应率(60%),然而这种组合疗法还涉及严重的治疗相关不良反应。因此,对新的抗肿瘤免疫激活剂的需要是明确的。

[0005] 疱疹病毒入侵介质(Herpessvirus entry mediator)(HVEM)是在各种细胞类型(包括造血和非造血细胞)表面上发现的蛋白质。HVEM充当经典TNF相关配体(如LIGHT和LT α)的受体,因此充当信号传导受体。然而,它也充当免疫球蛋白(Ig)超家族分子(如抑制性受体BTLA和CD160)的配体。因此,双向信号传导对于HVEM介导的信号传导网络是可能的,HVEM介导的信号传导网络可以在不同情况下参与阳性或阴性免疫反应。此网络的调控异常涉及自身免疫性疾病、炎性疾病以及癌症的发病机理,从而使HVEM成为免疫疗法的靶标。

发明内容

[0006] 本发明提供了结合HVEM、抑制HVEM-BTLA相互作用、抑制下游BTLA信号传导和激活下游HVEM信号传导的试剂。还提供了用那些试剂和包含那些试剂的试剂盒治疗疾病的方法。

[0007] 根据第一方面,提供了与细胞上的疱疹病毒入侵介质(HVEM)特异性结合的试剂,

[0008] a.抑制HVEM与B-和T-淋巴细胞衰减子(BTLA)之间的相互作用;和

[0009] b.激活细胞内通过HVEM的下游信号传导。

[0010] 根据另一方面,提供了包含三个重链CDR(CDR-H)和三个轻链CDR(CDR-L)的抗体或其抗原结合片段,其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1(SYAMS)中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含

SEQ ID NO:2 (AISGSGGSTYYADSVKG) 中列出的氨基酸序列, CDR-H3 包含 SEQ ID NO:3 (APGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列, CDR-L1 包含 SEQ ID NO:4 (RASQSVSSYLA) 中列出的氨基酸序列, CDR-L2 包含 SEQ ID NO:5 (GASSRAT) 中列出的氨基酸序列, 并且 CDR-L3 包含 SEQ ID NO:6 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列。

[0011] 根据另一方面, 提供了药物组合物, 其包含本发明的试剂、或本发明的抗体或其抗原结合片段、和药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。

[0012] 根据另一方面, 提供了治疗以 HVEM 阳性细胞为特征的疾病或状况的方法, 该方法包括施用本发明的药物组合物, 从而治疗该疾病或状况。

[0013] 根据另一方面, 提供了治疗 HVEM 阳性疾病或状况的方法, 该方法包括:

[0014] a. 抑制 HVEM 和 BTLA 相互作用; 和

[0015] b. 激活免疫细胞、疾病细胞或两者中的 HVEM 信号传导;

[0016] 从而治疗 HVEM 阳性疾病或状况。

[0017] 根据另一方面, 提供了确定待通过本发明的方法治疗的受试者的适合性的方法, 包括从受试者获得疾病样品并测定样品中的 HVEM 水平, 其中 HVEM 的阳性表达表明受试者适合本发明的治疗方法。

[0018] 根据另一方面, 提供了检测样品中 HVEM 的方法, 该方法包括将样品与本发明的试剂或本发明的抗体或其抗原结合片段接触, 从而检测 HVEM。

[0019] 根据另一方面, 提供了试剂盒, 其包含本发明的药物组合物和以下中的至少一项:

[0020] a. 基于抗 PD-1/PD-L1 的免疫疗法;

[0021] b. 说明本发明的药物组合物是与基于抗 PD-1/PD-L1 的免疫疗法一起使用的标签; 和

[0022] c. 用于检测本发明的试剂或本发明的抗体或其抗原结合片段的第二检测分子 (secondary detection molecule)。

[0023] 根据一些实施方式, 试剂不大幅 (substantially) 抑制 HVEM 和肿瘤坏死因子超家族成员 14 (TNFSF14) 之间的相互作用。

[0024] 根据一些实施方式, 试剂抑制 HVEM 和 CD160、淋巴毒素 α (LT α) 或两者之间的相互作用。

[0025] 根据一些实施方式, 试剂在与表达 HVEM 的细胞所表达的 HVEM 结合后不直接诱导该细胞的细胞凋亡。

[0026] 根据一些实施方式, 试剂是抗体或其抗原结合片段。

[0027] 根据一些实施方式, 本发明的试剂包含 IgG2、IgG4 或对细胞没有细胞毒性的修饰的 IgG1 或 IgG3。

[0028] 根据一些实施方式, 试剂是单链抗体 (scFv)。

[0029] 根据一些实施方式, 通过 HVEM 的下游信号传导包括核因子活化 B 细胞 κ -轻链增强子 (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) (NF- κ B) 介导的转录。

[0030] 根据一些实施方式, 通过 HVEM 的下游信号传导包括表达 HVEM 的免疫细胞的增加的细胞毒性。

[0031] 根据一些实施方式, 增加的细胞毒性包括促炎细胞因子的增加的分泌。

- [0032] 根据一些实施方式,细胞是免疫细胞,并且信号传导诱导免疫激活。
- [0033] 根据一些实施方式,免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或外周血单核细胞(PBMC)。
- [0034] 根据一些实施方式,细胞是癌细胞,并且信号传导包括抗肿瘤作用。
- [0035] 根据一些实施方式,本发明的试剂用于治疗以表达HVEM的疾病细胞为特征的疾病。
- [0036] 根据一些实施方式,疾病是HVEM阳性癌症或癌前期病变。
- [0037] 根据一些实施方式,HVEM阳性癌症选自黑素瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌和头颈癌。
- [0038] 根据一些实施方式,疾病是传染病并且其中感染的细胞包含HVEM表达。
- [0039] 根据一些实施方式,抗体或其抗原结合片段包含三个重链CDR(CDR-H)和三个轻链CDR(CDR-L),其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1(SYAMS)中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:2(AISGSGGSTYYADSVKG)中列出的氨基酸序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:3(APGDYTAYFDY)中列出的氨基酸序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:4(RASQSVSSYLA)中列出的氨基酸序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:5(GASSRAT)中列出的氨基酸序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:6(QQYGSSPPYT)中列出的氨基酸序列。
- [0040] 根据一些实施方式,本发明的试剂包含重链,该重链包含序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:7)。
- [0041] 根据一些实施方式,本发明的试剂包含轻链,该轻链包含序列ELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8)。
- [0042] 根据一些实施方式,本发明的试剂包含:重链,该重链包含序列MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:9);和轻链,该轻链包含序列MGWSCIIILFLVATATGVHSELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。
- [0043] 根据一些实施方式,本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链,该重链包含序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:7)。
- [0044] 根据一些实施方式,本发明的抗体或其抗原结合片段包含轻链,该轻链包含序列ELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:8)。

[0045] 根据一些实施方式,本发明的抗体或抗原结合片段包含:重链,该重链包含序列MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:9);和轻链,该轻链包含序列MGWSCIILFLVATATGVHSELVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。

[0046] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括施用基于抗PD-1/PD-L1的免疫疗法。

[0047] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括施用过继性细胞疗法。

[0048] 根据一些实施方式,过继性细胞疗法包括过继性TIL疗法。

[0049] 根据一些实施方式,过继性细胞疗法包括施用表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞,其中CAR靶向表达HVEM的细胞的表面上的非HVEM蛋白。

[0050] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括抑制PD-1和PD-L1相互作用。

[0051] 根据一些实施方式,本发明的方法进一步包括不大幅抑制HVEM和TNFSF14相互作用。

[0052] 根据一些实施方式,疾病或状况是HVEM阳性癌症或癌前期病变。

[0053] 根据一些实施方式,HVEM阳性癌症选自黑素瘤和肾细胞癌。

[0054] 根据一些实施方式,疾病或状况是传染病并且其中感染的细胞包含HVEM表达。

[0055] 根据一些实施方式,免疫细胞是TIL或PBMC。

[0056] 根据一些实施方式,免疫细胞是CAR-T细胞。

[0057] 根据一些实施方式,本发明的方法包括施用本发明的药物组合物。

[0058] 根据一些实施方式,HVEM的阳性表达包括与健康样品或预定阈值相比升高的HVEM水平。

[0059] 通过下文给出的详细描述,本发明的进一步实施方式和全部适用范围将变得明显。然而,应当理解,详细描述和具体实例虽然表明了本发明的优选实施方式,但仅作为示例给出,因为通过此详细描述,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说将变得明显。

附图说明

[0060] 图1. 含有scFv的裂解物与过表达HVEM的CHO-K1细胞的结合:过表达人HVEM的CHO-K1细胞(CHO-K1 hrHVEM)、过表达小鼠HVEM的CHO-K1细胞(CHO-K1mrHVEM)、过表达短尾猴HVEM的CHO-K1细胞(CHO-K1 crHVEM)或过表达空载体的作为对照的CHO-K1细胞(CHO-K1空)与5 μ g/ml的含有HIS标记的scFv1-6的裂解物或对照裂解物在冰上一起孵育1小时,之后用抗HIS APC抗体(R&D Systems,美国)或同种型对照抗体(R&D系统,美国)染色。通过使用

CytoFLEX仪器(Beckman Coulter,美国)的流式细胞术和使用FCS Express 6软件(DeNovo软件,美国)的数据分析,评估了表达。黑色实线代表CHO-K1空细胞的背景染色(即,同种型对照抗体),灰色点划线代表CHO-K1空细胞的特异性抗体染色,黑色点划线代表CHO-K1 hrHVEM细胞的特异性抗体染色,灰色实线代表CHO-K1 mrHVEM细胞的特异性抗体染色,以及黑色虚线代表CHO-K1 crHVEM细胞的特异性抗体染色。

[0061] 图2A-图2B.在六种scFv存在下hrHVEM与(2A) hrBTLA和(2B) hrLIGHT的结合-ELISA的柱状图。

[0062] 图3. scFv2-IgG4 (S228P) 的SDS-PAGE和蛋白质印迹分析:通过SDS-PAGE(左图)和蛋白质印迹(右图)分析纯化的蛋白质以测量分子量和纯度。泳道M1和M2表示蛋白质标记物。泳道1和泳道2分别表示还原和非还原条件。泳道P表示作为阳性对照的人IgG1-k。

[0063] 图4A-图4B. (4A)通过ELISA测量的本发明的mAb与hrHVEM结合的柱状图。(4B)本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体与CHO-K1细胞上表达的hrHVEM、mrHVEM和crHVEM的结合的直方图。黑色和灰色实线分别代表hIgG4同种型对照抗体和本发明的mAb的背景染色(即,第二抗生物素FITC抗体)。灰色点划线和黑色虚线分别代表hIgG4同种型对照抗体和本发明的mAb的特异性抗体染色(即,抗人IgG Fc生物素抗体+抗生物素FITC抗体)。

[0064] 图5A-图5F. (5A)使用本发明的mAb对健康人结肠和脾脏组织样品进行HVEM染色的显微照片。(5B)商业可获得的抗HVEM抗体(R&D Systems AF356)与两种不同黑素瘤患者原代细胞样品的结合的直方图。黑色和灰色实线分别代表背景染色(即,第二抗小鼠APC抗体)和特异性抗体染色。(5C)本发明的mAb与三种不同的黑素瘤患者原代细胞样品的结合的直方图。实线和虚线分别代表背景染色(即,第二抗生物素FITC抗体)和特异性抗体染色(即,抗人IgG Fc生物素抗体+抗生物素FITC抗体)。(5D)与5B中相同,但对来自肾细胞癌(RCC)患者的细胞进行染色的直方图。(5E)与5C中相同,但对来自RCC患者的细胞进行染色的直方图。(5F)使用本发明的mAb测定的各种健康和肿瘤样品中HVEM表达的表。“NA”:因组织核心不存在/被破坏而“不适用”。

[0065] 图6A-图6D.在本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体存在下hrHVEM与(6A) hrBTLA和(6B) hrLIGHT的结合-ELISA、在MAB356或mIgG1同种型对照抗体存在下hrHVEM(6C)与商业可获得的抗HVEM mAb(R&D Systems, MAB356)和(6D) hrBTLA的结合-ELISA的柱状图。

[0066] 图7.在与本发明的mAb(左)和对照hIgG4(右)一起预孵育,之后与空CHO-K1细胞、表达hrBTLA的CHO-K1细胞和无细胞共孵育后,表达hrHVEM和NF-kB萤光素酶报道基因的Jurkat细胞的萤光素酶输出的柱状图。

[0067] 图8.柱状图,其显示了与来自两名单独患者的与本发明的mAb或hIgG4同种型对照一起预孵育的黑素瘤细胞共培养后TIL的IFN γ 分泌。

[0068] 图9A-图9E. (9A-9B).在与自体TIL共孵育期间的各个时间点,来自(9A)第一原代患者样品、(9B)第二原代患者样品的黑素瘤细胞和(9C)来自原代患者样品的RCC细胞的特异性杀伤的线图。黑色圆圈、白色正方形、黑色三角形和黑色菱形线分别代表与hIgG4同种型对照抗体、本发明的mAb、抗PD1 mAb或本发明的mAb+抗PD1 mAb的孵育。(9D-9E)在与自体TIL共孵育期间的各个时间点,来自原代患者样品的与(9D)本发明的mAb或(9E)MAB356一起预孵育的黑素瘤细胞的特异性杀伤的线图。黑色圆圈和白色正方形分别代表与同种型对照抗体和mAb的孵育。

[0069] 图10A-图10B. (10A) 在与来自健康供体的非自体PBMC共孵育期间的各个时间点, 来自原代患者样品的黑素瘤细胞的特异性杀伤的线图。黑色圆圈代表hIgG4同种型对照抗体并且白色正方形代表本发明的mAb。(10B) 来自单独培养的或与和hIgG4同种型对照抗体或本发明的mAb一起孵育的黑素瘤细胞一起培养的PBMC的IFN γ 分泌的柱状图。

[0070] 图11. 柱状图表, 其显示了15小时孵育后黑素瘤细胞总数中胱天蛋白酶3/7阳性事件的百分比, 反映了来自两个原代样品的与本发明的mAb和hIgG4同种型对照一起孵育的黑素瘤细胞的细胞凋亡。

[0071] 图12A-图12D. (12A) T细胞中41BB FACS染色作为激活的度量(measure)的直方图。黑色粗实线代表背景染色(即, APC偶联的同种型对照抗体), 黑色虚线代表用含有hIgG4同种型对照的培养基孵育的TIL的41BB染色, 黑色细实线代表用含有本发明的mAb的培养基孵育的TIL的41BB染色, 灰色虚线代表与和hIgG4同种型对照一起预孵育的黑素瘤细胞一起孵育的TIL的41BB染色, 以及灰色细实线代表与和本发明的mAb一起预孵育的黑素瘤细胞一起孵育的TIL的41BB染色。(12B-12C) 在来自黑素瘤患者的TIL与(12B) 本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体和(12C) MAB356或mIgG1同种型对照一起孵育20小时后观察到的T细胞簇平均数的柱状图。(12D) 在各个时间点通过显微术测量的与和hIgG4同种型对照或和本发明的mAb一起预孵育的黑素瘤细胞一起培养的PBMC上41BB的表达。

[0072] 图13. 使用本发明的mAb和两种商业可获得的抗体进行细胞因子释放测定后细胞因子分泌的表。

[0073] 图14. 用人黑素瘤细胞植入并用人自体TIL处理的小鼠中各个时间点的平均肿瘤体积的线图。黑色圆圈、白色正方形、黑色三角形和黑色菱形线分别代表与hIgG4同种型对照抗体、本发明的mAb、抗PD1 mAb或本发明的mAb+抗PD1 mAb的孵育。

具体实施方式

[0074] 本发明在一些实施方式中提供了结合HVEM、抑制HVEM-BTLA相互作用并且也是HVEM激动剂的试剂。本发明进一步涉及治疗HVEM阳性疾病的方法和包含这些试剂的试剂盒。

[0075] 众所周知, HVEM阳性癌症可以通过结合免疫细胞表面的BTLA来逃避免疫监视。BTLA的接合在免疫细胞内产生抑制信号, 其减少T细胞增殖并增加癌症存活。用结合HVEM的抗体或结合BTLA的抗体抑制这种信号传导是已知的。本发明基于令人惊奇的发现, 即特异性结合HVEM并激活HVEM信号传导的抗体为对抗癌症提供了另一个益处: 提高的免疫细胞激活。HVEM也在免疫细胞表面表达, 然而, 其作用知之甚少。本发明的抗体不仅通过结合病原细胞上的HVEM来阻断HVEM-BTLA相互作用而因此使免疫细胞不受抑制, 而且它还结合免疫细胞上的HVEM并在那些免疫细胞中诱导增强激活特性的NF- κ B信号传导。

[0076] 就第一方面来说, 提供了与疱疹病毒入侵介质(HVEM)结合、抑制HVEM与B-和T-淋巴细胞衰减子(BTLA)之间相互作用的试剂。

[0077] 在一些实施方式中, 试剂激活通过HVEM的下游信号传导。在一些实施方式中, 试剂抑制通过BTLA的下游信号传导。在一些实施方式中, 试剂激活通过HVEM的下游信号传导并抑制通过BTLA的下游信号传导。在一些实施方式中, 抑制HVEM和BTLA之间的相互作用抑制通过BTLA的下游信号传导。

[0078] 在一些实施方式中,HVEM是哺乳动物HVEM。在一些实施方式中,HVEM是啮齿动物HVEM。在一些实施方式中,HVEM是猴HVEM。在一些实施方式中,HVEM是人HVEM。在一些实施方式中,HVEM是小鼠、猴和人HVEM中的任一种。在一些实施方式中,HVEM是膜结合的HVEM。在一些实施方式中,HVEM是细胞上的HVEM。在一些实施方式中,HVEM是细胞表面上的HVEM。在一些实施方式中,HVEM是可溶性HVEM。

[0079] 在一些实施方式中,细胞是病原细胞。在一些实施方式中,细胞是癌细胞。在一些实施方式中,细胞是病原体的细胞。在一些实施方式中,细胞是细菌细胞。在一些实施方式中,细胞是真菌细胞。在一些实施方式中,细胞是被病原体感染的真核细胞。在一些实施方式中,细胞是被细菌感染的细胞。在一些实施方式中,细胞是被病毒感染的细胞。在一些实施方式中,病原体选自细菌、病毒和真菌。

[0080] 在一些实施方式中,细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,细胞是造血细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8阳性T细胞。在一些实施方式中,T细胞是细胞毒性CD8阳性T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4阳性T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4阳性辅助T细胞。在一些实施方式中,T细胞选自CD8阳性和CD4阳性T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞或两者。在一些实施方式中,免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在一些实施方式中,免疫细胞不是外周血免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是B细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是嗜中性白细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是树突细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是巨噬细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是髓系来源抑制细胞(myeloid derived suppressor cell)(MDSC)。在一些实施方式中,细胞选自T细胞、B细胞、NK细胞、嗜中性白细胞、树突细胞、MDSC和巨噬细胞。在一些实施方式中,细胞选自T细胞、B细胞、NK细胞、嗜中性白细胞、树突细胞和巨噬细胞。

[0081] 在一些实施方式中,免疫细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞。在一些实施方式中,CAR是CAR-T细胞。在一些实施方式中,CAR是CAR-NK细胞。如本文所用,术语“CAR”是指对至少一种感兴趣的蛋白质(例如由表达HVEM的细胞表达的蛋白质)具有特异性并被移植到免疫效应细胞(如T细胞或NK细胞)上的工程化受体。在一些实施方式中,CAR-T细胞具有移植到T细胞上的单克隆抗体的特异性。在一些实施方式中,CAR-NK细胞具有移植到NK细胞上的单克隆抗体的特异性。在一些实施方式中,T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞和调节性T细胞。MART1是在靶细胞上与HVEM共表达的靶蛋白的实例。在一些实施方式中,CAR靶向由表达HVEM的细胞表达的蛋白质。在一些实施方式中,该蛋白质不是HVEM。在一些实施方式中,CAR靶向表达HVEM的细胞的表面上的蛋白质。在一些实施方式中,该蛋白质是抗体。在一些实施方式中,CAR靶向抗体。在一些实施方式中,CAR靶向本发明的抗体。在一些实施方式中,CAR靶向细胞毒性抗体。在一些实施方式中,CAR靶向抗体恒定结构域。在一些实施方式中,CAR靶向Fc结构域。在一些实施方式中,CAR疗法进一步包括施用靶向表达HVEM的细胞的抗体。在一些实施方式中,被CAR靶向的抗体不是本发明的抗体。

[0082] CAR-T和CAR-NK细胞及其载体是本领域公知的。这样的细胞靶向受体结合的蛋白质并且对其具有细胞毒性。在一些实施方式中,CAR-T或CAR-NK细胞靶向至少一种癌症蛋白。在一些实施方式中,CAR-T或CAR-NK细胞靶向多种癌症蛋白。

[0083] CAR-T细胞的构建是本领域公知的。在一个非限制性实例中,可以制备针对癌症蛋

白的单克隆抗体,然后将构建编码该抗体的载体。载体还将包括共刺激信号区。在一些实施方式中,共刺激信号区包含已知T细胞或NK细胞刺激分子的胞内结构域。在一些实施方式中,胞内结构域选自以下中的至少一个:CD3Z、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、和与CD83特异性结合的配体。在一些实施方式中,载体还包含CD3Z信号传导结构域。然后此载体例如通过慢病毒感染被转染到T细胞中。

[0084] 在一些实施方式中,HVEM是肿瘤坏死因子受体超家族成员14 (TNFRSF14)。在一些实施方式中,HVEM是CD270。在一些实施方式中,HVEM是BTLA的受体。在一些实施方式中,HVEM是BTLA的配体。在一些实施方式中,BTLA是CD272。在一些实施方式中,HVEM是肿瘤坏死因子超家族成员14 (TNFSF14) 的受体。在一些实施方式中,HVEM是TNFSF14的配体。在一些实施方式中,TNFSF14是LIGHT。在一些实施方式中,TNFSF14是CD258。在一些实施方式中,HVEM是CD160的受体。在一些实施方式中,HVEM是CD160的配体。在一些实施方式中,HVEM是淋巴毒素 α (LT α) 的受体。在一些实施方式中,HVEM是LT α 的配体。在一些实施方式中,LT α 是TNF- β 。

[0085] 在一些实施方式中,试剂特异性结合HVEM。在一些实施方式中,试剂不结合除HVEM之外的其它蛋白质。在一些实施方式中,试剂结合HVEM的胞外结构域。在一些实施方式中,试剂结合在HVEM的配体结合结构域中。在一些实施方式中,试剂结合在HVEM的BTLA结合结构域中。在一些实施方式中,试剂阻塞(occludes)HVEM的BTLA结合结构域。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM和BTLA之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂阻断HVEM和BTLA之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM介导的、BTLA诱导的免疫抑制。在一些实施方式中,试剂结合HVEM并阻止结合的HVEM进一步结合BTLA。在一些实施方式中,试剂抑制通过BTLA的下游信号传导。在一些实施方式中,试剂减少通过BTLA的下游信号传导。

[0086] 在一些实施方式中,试剂不抑制HVEM和TNFSF14之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM和TNFSF14之间的相互作用。在一些实施方式中,TNFSF14是膜TNFSF14 (mTNFSF14)。在一些实施方式中,TNFSF14是可溶性TNFSF14 (sTNFSF14)。在一些实施方式中,该试剂不抑制HVEM与mTNFSF14和sTNFSF14中的一个之间的相互作用,但确实抑制与另一个的相互作用。在一些实施方式中,该试剂不抑制mTNFSF14和sTNFSF14两者与HVEM之间的相互作用。在一些实施方式中,抑制是大幅抑制。在一些实施方式中,抑制是至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、99或100%的减少。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,试剂不阻断HVEM和TNFSF14之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂不大幅阻断HVEM和TNFSF14之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂不阻断/抑制TNFSF14介导的信号传导。在一些实施方式中,试剂不阻断/抑制TNFSF14介导的细胞存活。

[0087] 在一些实施方式中,试剂激活通过HVEM的信号传导。在一些实施方式中,试剂是HVEM激动剂。在一些实施方式中,试剂诱导通过HVEM的信号传导。在一些实施方式中,通过HVEM的信号传导是HVEM下游信号传导。在一些实施方式中,试剂结合细胞上的HVEM并激活/诱导细胞中的HVEM信号传导。在一些实施方式中,HVEM信号传导包括核因子活化B细胞 κ -轻链增强子 (NF- κ B) 的激活。在一些实施方式中,NF- κ B信号传导包括对基因的控制,在该基因的启动子中具有NF- κ B反应元件。在一些实施方式中,信号传导包括细胞的增加的细胞毒性。在一些实施方式中,信号传导包括被试剂接触的表达HVEM的细胞的增加的细胞毒性。在

一些实施方式中,增加的细胞毒性包括促炎细胞因子的增加的分泌。在一些实施方式中,促炎细胞因子选自IL-1、IL-1B、IL-4、IL-6、TNF α 、IFN γ 、MCP1、IL-12、IL-18、IL-23和CM-CSF。在一些实施方式中,促炎细胞因子是IFN γ 。在一些实施方式中,增加是与未被本发明的试剂接触的细胞相比。在一些实施方式中,增加是至少10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、95、100、110、120、130、140、150、200、250、300、350、400、450或500%的增加。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0088] 在一些实施方式中,细胞是免疫细胞并且信号传导包括免疫激活。在一些实施方式中,免疫细胞是淋巴细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是CD8+T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是CD4+T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞不是 γ/δ T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是 γ/δ T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是NK细胞。在一些实施方式中,激活HVEM信号传导包括激活免疫细胞。在一些实施方式中,免疫激活包括增加的增殖。在一些实施方式中,免疫激活包括增加的细胞毒性。在一些实施方式中,免疫激活包括增加的迁移。在一些实施方式中,免疫激活包括增加的归巢。在一些实施方式中,免疫激活包括增加的细胞成簇。在一些实施方式中,免疫激活是T细胞激活。在一些实施方式中,免疫激活包括Th1 T细胞数量的增加。在一些实施方式中,增加是与Th2 T细胞相比的相对增加。在一些实施方式中,免疫激活包括CD8+T细胞的增加。在一些实施方式中,免疫激活包括T调节细胞的减少。在一些实施方式中,免疫激活包括选自:41BB、CD69、CD25、CD107a、HLA-DR的标记物的表达和细胞因子的分泌的增加。在一些实施方式中,细胞因子是促炎细胞因子。在一些实施方式中,T细胞激活包括增加的T细胞成簇。

[0089] 在一些实施方式中,细胞是癌细胞并且信号传导包括抗肿瘤作用。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括增加的细胞凋亡。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括减少的增殖。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括增加的化疗敏感性。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括减少的机动性。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括减少的侵入。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括减少的转移。在一些实施方式中,抗肿瘤作用包括减少的自我更新。在一些实施方式中,该作用是与未被本发明的试剂接触的癌细胞相比。在一些实施方式中,减少是至少10、20、25、30、40、50、60、70、75、80、90、95、97、99或100%的减少。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0090] 在一些实施方式中,试剂不诱导细胞凋亡。在一些实施方式中,诱导细胞凋亡是直接诱导细胞凋亡。在一些实施方式中,试剂不直接诱导细胞凋亡。如本文所用,“直接诱导”是指作为试剂结合的直接结果而发生的结果,并且不以经结合的细胞内的下游信号传导为特征。在一些实施方式中,试剂没有细胞毒性。在一些实施方式中,试剂其本身没有细胞毒性。在一些实施方式中,试剂不诱导抗体导向的细胞毒性(antibody-directed cell cytotoxicity) (ADCC)。在一些实施方式中,试剂不诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方式中,试剂不包含细胞毒性部分。在一些实施方式中,试剂在与表达HVEM的细胞所表达的HVEM结合后不诱导该细胞的细胞凋亡。在一些实施方式中,试剂不经由与另一细胞的相互作用诱导细胞凋亡。在一些实施方式中,试剂不直接诱导表达HVEM的细胞的杀伤。在一些实施方式中,试剂不靶向细胞进行杀伤。在一些实施方式中,试剂确实诱导间接细胞凋亡。在一些实施方式中,间接细胞凋亡是由导致细胞凋亡的通过HVEM受体的下游信号传导所诱导的细胞凋亡。在一些实施方式中,间接细胞凋亡是需要信号传导的细胞凋亡。在一些

实施方式中,间接细胞凋亡是不需要第二细胞参与的细胞凋亡。在一些实施方式中,试剂不诱导免疫细胞中的细胞凋亡。在一些实施方式中,试剂诱导癌细胞中的细胞凋亡。

[0091] 在一些实施方式中,试剂抑制HVEM和CD160之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM和LT α 之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM和单纯疱疹病毒1型糖蛋白D(HSV1-gD)之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制HVEM与CD160、HSV1-gD和LT α 中的至少两种之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂阻断HVEM和CD160之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂阻断HVEM和LT α 之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂阻断HVEM和HSV1-gD之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂阻断HVEM与CD160、HSV1-gD和LT α 中的至少两种之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂抑制/阻断HVEM与CD160、HSV1-gD和LT α 中的全部之间的相互作用。在一些实施方式中,试剂不抑制或阻断HVEM与CD160、HSV1-gD和LT α 中的至少一种之间的相互作用。

[0092] 在一些实施方式中,试剂是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其片段是fab片段。在一些实施方式中,抗体或其片段是单链抗体(scFv)。在一些实施方式中,抗体或其片段是单结构域抗体。在一些实施方式中,抗体是人抗体。在一些实施方式中,抗体是人源化抗体。在一些实施方式中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中,抗体是封闭性抗体。

[0093] 如本文所用,术语“抗体”是指包含至少一个结合结构域的多肽或多肽组,所述结合结构域由具有三维结合空间的多肽链折叠形成,所述三维结合空间的内部表面形状和电荷分布与抗原的抗原决定簇的特征互补。抗体通常具有四聚体形式,包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”链和一条“重”链。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点。抗体可以是寡克隆抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、骆驼形(camelised)抗体、CDR移植抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、催化性抗体、人源化抗体、完全人抗体、抗独特型抗体以及可以以可溶性形式或结合形式标记的抗体以及片段,包括单独地或与其它氨基酸序列组合的表位结合片段、其变体或衍生物。抗体可以来自任何物种。术语抗体还包括结合片段,包括但不限于Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂单链抗体(svFC)、二聚体可变区(双抗体)和二硫化物连接的可变区(dsFv)。具体地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性片段,即含有抗原结合位点的分子。抗体片段可以或可以不与另一个免疫球蛋白结构域融合,所述另一个免疫球蛋白结构域包括但不限于Fc区或其片段。技术人员将进一步理解,可以产生其它融合产物,包括但不限于scFv-Fc融合、可变区(例如,VL和VH)~Fc融合和scFv-scFv-Fc融合。

[0094] 免疫球蛋白分子可以是任意类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方式中,抗体包含IgG2或IgG4。在一些实施方式中,抗体包含IgG2。在一些实施方式中,抗体包含IgG4。在一些实施方式中,抗体包含IgG1。在一些实施方式中,抗体包含IgG3。在一些实施方式中,抗体包含具有降低的毒性的修饰的IgG1或IgG3。

[0095] 天然存在的抗体结构的基本单位是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白复合物,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成,通过非共价键缔合和通过二硫键两者连接在一起。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。存在五种人抗体类别(IgG、IgA、IgM、IgD和IgE),并且在这些类别中,根据结构上的差异(如单个抗体分子中免疫球蛋白单

位的数量、独立单位的二硫键结构、以及链长和序列的差异)认识到了各种亚类。抗体的类别和亚类是其同种型。

[0096] 重链和轻链的氨基末端区域在序列上比羧基末端区域更具多样性,因此被称为可变结构域。抗体结构的这部分赋予抗体的抗原结合特异性。重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域一起形成单个抗原结合位点,因此,基础的免疫球蛋白单位具有两个抗原结合位点。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面(Chothia等人, *J.Mol.Biol.* 186, 651-63 (1985); Novotny和Haber, (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 824592-4596)。

[0097] 重链和轻链的羧基末端部分形成恒定结构域,即CH1、CH2、CH3、CL。尽管这些结构域的多样性要少得多,但一种动物种属与另一种却有所不同,此外,在同一个体内,存在若干种不同的抗体同种型,每种同种型都具有不同的功能。

[0098] 术语“构架区”或“FR”是指抗体的可变结构域中不同于本文所定义的高变区氨基酸残基的氨基酸残基。如本文所用,术语“高变区”是指抗体的可变结构域中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。CDR主要负责与抗原的表位结合。FR和CDR的范围已被精确定义(参见Kabat等人)。

[0099] 免疫球蛋白可变结构域也可以使用IMGT信息系统([www://imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/))(IMGT®/V-Quest)进行分析,以识别可变区区段,包括CDR。参见,例如,Brochet,X.等人, *Nucl.Acids Res.* J6:W503-508(2008)。

[0100] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指来自非人种属的抗体,其蛋白质序列已被修饰以提高与人抗体的相似性。人源化抗体可以通过产生编码被类似于人抗体的序列包围的非人抗体的CDR的重组DNA来产生。在一些实施方式中,人源化抗体是嵌合抗体。在一些实施方式中,人源化包括将本发明的CDR插入人抗体支架或骨架中。人源化抗体是本领域公知的,并且可以使用保留本发明CDR的产生这些抗体的任意方法。

[0101] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“mAb”是指从基本上均质的抗体群体中获得的抗体,即,除了在单克隆抗体的产生过程中可出现的可能的变体以外,这种变体通常少量存在,构成所述群体的各个抗体都是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对(directed against)不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们不受其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上均质的抗体群体获得的,并且不应解释为通过任何特定的制备方法产生。根据本文提供的方法使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人, *Nature* 256:495(1975)最先描述的杂交瘤法来制备,或者可以通过重组DNA法来制备(参见,例如,美国专利号4,816,567)。还可以使用例如Clackson等人, *Nature* 352:624-628(1991)和Marks等人, *J.Mol.Biol.* 222:581-597(1991)中描述的技术,从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0102] 本发明的mAb可以是包括IgG、IgM、IgD、IgE或IgA的任意免疫球蛋白类别。产生mAb的杂交瘤可以在体外或体内培养。可以在体内产生中获得高滴度的mAb,在体内产生中将来自单独的杂交瘤的细胞腹膜内注射到降植烷致敏的(pristine-primed) Balb/c小鼠中,以产生含有高浓度所需mAb的腹水。可以使用本领域技术人员公知的柱色谱法,从这样的腹水或从培养物上清液中纯化同种型IgM或IgG的mAb。

[0103] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;串联双抗体(taDb)、线性抗体(例如,美国专利号5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));和单臂(one-armed)抗体、单可变结构域抗体、微型抗体(minibodies)、单链抗体分子;由抗体片段形成的多特异性抗体(例如,包括但不限于Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH₃、(scFV)₄-Fc、di-scFv、bi-scFv、或串联(双、三)-scFv);和双特异的T细胞衔接子(BiTE)。

[0104] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段都有单个抗原结合位点,以及一个残留的“Fc”片段,其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理获得具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0105] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最微型抗体片段。此区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的以紧密方式的二聚体(非共价缔合)构成。正是在这种构型中,VH-VL二聚体的三个表面。六个高变区共同赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对抗原具有特异性的三个高变区的Fv的一半)具有识别和结合抗原的能力,其亲和力也低于整个结合位点。

[0106] Fab片段还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH₁)。Fab'片段与Fab片段的区别在于,在重链CH₁结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中Fab'的名称(designation),其中恒定结构域的半胱氨酸残基(一个或多个)带有至少一个游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初是以成对的Fab'片段产生的,它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0107] 根据抗体的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物种属的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”指定为被称为 κ 和 λ 的两种明显不同的类型中的一个。

[0108] 根据抗体的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体指定为不同的类别。完整抗体有五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA₂。对应于不同类别的抗体的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是公知的。

[0109] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方式中,Fv多肽在VH和VL结构域之间进一步包含使scFv能够形成所需的抗原结合结构的多肽连接体。有关scFv的综述,参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)。

[0110] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小的抗体片段,所述片段包含与同一条多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对的连接体,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体产生是本领域已知的,并且在Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)中有所描述。

[0111] 可以使用本领域公知的方法来制备本发明的单克隆抗体。实例包括各种技术,诸如Kohler,G.和Milstein,C,Nature 256:495-497(1975);Kozbor等人,Immunology Today 4:72(1983);Cole等人,pg.77-96in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Alan R.Liss,Inc.(1985)中的那些技术。

[0112] 除了在体内产生抗体的常规方法外,还可以使用噬菌体展示技术在体外产生抗体。与常规抗体产生相比,这种重组抗体的产生要快得多,并且可以针对大量抗原产生这种重组抗体。此外,当使用常规方法时,许多抗原被证明是非免疫原性或极具毒性的,因此不能用于在动物中产生抗体。此外,重组抗体的亲和力成熟(即,提高亲和力和特异性)非常简单并且相对较快。最后,可以在一种选择程序中产生针对特异性抗原的大量不同的抗体。为了产生重组单克隆抗体,人们可以使用全都基于展示文库的各种方法来产生大量具有不同抗原识别位点的抗体。这样的文库可以用几种方法来制备:人们可以通过在重链种系基因库中克隆合成的CDR3区来产生合成的库,从而产生大量的抗体库,从中可以选择具有各种特异性的重组抗体片段。人们可以使用人的淋巴细胞库作为构建抗体文库的起始材料。可以构建人IgM抗体的幼稚库(naive repertoires),从而创建多样性很大的人类文库。此方法已被广泛成功地用于选择大量针对不同抗原的抗体。噬菌体文库构建和重组抗体选择的方案在公知的参考文献文本Current Protocols in Immunology, Colligan等人(Eds.), John Wiley&Sons, Inc. (1992-2000), 第17章, 第17.1节中提供。

[0113] 非人抗体可以通过本领域已知的任何方法人源化。在一种方法中,将非人互补决定区(CDR)插入人抗体或共有抗体构架序列中。然后可以将进一步的改变引入抗体构架以调节亲和力或免疫原性。

[0114] 在一些实施方式中,抗体及其部分包括但不限于:抗体、抗体的片段、Fab和F(ab')₂、单结构域抗原结合重组片段和天然纳米抗体。在一些实施方式中,抗原结合片段选自Fv、Fab、F(ab')₂、scFv或scFv₂或scFv₄片段。

[0115] 在一些实施方式中,本发明提供了编码本发明的抗体或抗原结合部分的核酸序列。

[0116] 例如,多核苷酸可以编码完整的免疫球蛋白分子链,如轻链或重链。完全的重链不仅包括重链可变区(VH),还包括重链恒定区(CH),重链恒定区通常将包含三个恒定结构域:CH1、CH2和CH3;和“铰链”区。在某些情况下,期望存在恒定区。

[0117] 可以由多核苷酸编码的其它多肽包括抗原结合抗体片段,如单结构域抗体(“dAb”)、Fv、scFv、Fab'和CHI以及CK或CL结构域已被切除。由于微型抗体比常规抗体小,因此它们在临床/诊断应用中应达到更好的组织渗透性,但由于是二价的,因此与单价抗体片段(如dAb)相比,它们应保留更高的结合亲和力。因此,除非上下文另有指示,否则本文所用的术语“抗体”不仅涵盖完整的抗体分子,而且涵盖上面讨论的类型的抗原结合抗体片段。相对于相应的人受体构架,存在于编码的多肽中的每个构架区可包含至少一个氨基酸取代。因此,例如,相对于受体构架区,构架区可总共包含三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个氨基酸取代。考虑到构成所公开的蛋白质产物的各个氨基酸的特性,本领域技术人员将认识到一些合理的取代。可以例如基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性、和/或两亲性质的相似性来进行氨基酸取代,即“保守取代”。

[0118] 适当地,本文所述的多核苷酸可以被分离和/或纯化。在一些实施方式中,多核苷酸是分离的多核苷酸。

[0119] 如本文所用,术语“非天然存在的”物质、成分、实体和/或物质、成分、或实体的任意组合、或其任意的语法上的变体是条件术语,明确地排除但也仅排除那些本领域普通技

术人员熟知为“天然存在”的,或是由法官或行政或司法机构确定或解释为可能在任何时间都“天然存在”的物质、成分、实体和/或物质、成分或实体的任意组合的形式。

[0120] 在一些实施方式中,抗体包含IgG4。在一些实施方式中,抗体包含IgG2。在一些实施方式中,抗体包含IgG2或IgG4。在一些实施方式中,抗体包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方式中,抗体不包含IgG1。在一些实施方式中,抗体不包含IgG3。在一些实施方式中,抗体不包含IgG1或IgG3。在一些实施方式中,抗体包含突变的IgG1和/或IgG3,其中突变抑制ADCC、CDC或两者的诱导。在一些实施方式中,突变是在FcR γ 结合基序中。

[0121] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包含三个重链CDR (CDR-H) 和三个轻链CDR (CDR-L),其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1 (SYAMS) 中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:2 (AISGSGGSTYYADSVKG) 中列出的氨基酸序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:3 (APGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:4 (RASQSVSSYLA) 中列出的氨基酸序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:5 (GASSRAT) 中列出的氨基酸序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:6 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列。在一些实施方式中,CDR是根据KABAT编号系统的。

[0122] 就另一方面而言,提供了抗体或其抗原结合片段,其包含三个重链CDR (CDR-H) 和三个轻链CDR (CDR-L),其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1 (SYAMS) 中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:2 (AISGSGGSTYYADSVKG) 中列出的氨基酸序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:3 (APGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:4 (RASQSVSSYLA) 中列出的氨基酸序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:5 (GASSRAT) 中列出的氨基酸序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:6 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列。在一些实施方式中,CDR是根据KABAT编号系统的。

[0123] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包含三个重链CDR (CDR-H) 和三个轻链CDR (CDR-L),其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:11 (GFTFSSYA) 中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:12 (ISGSGGST) 中列出的氨基酸序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:13 (AKAPGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:14 (QSVSSY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:15 (GAS) 中列出的氨基酸序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:16 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列。在一些实施方式中,CDR是根据IMGT编号系统的。

[0124] 就另一方面而言,提供了抗体或其抗原结合片段,其包含三个重链CDR (CDR-H) 和三个轻链CDR (CDR-L),其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:11 (GFTFSSYA) 中列出的氨基酸序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:12 (ISGSGGST) 中列出的氨基酸序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:13 (AKAPGDYTAYFDY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:14 (QSVSSY) 中列出的氨基酸序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:15 (GAS) 中列出的氨基酸序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:16 (QQYGSSPPYT) 中列出的氨基酸序列。在一些实施方式中,CDR是根据IMGT编号系统的。

[0125] 在一些实施方式中,抗体包含重链,该重链包含序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7)。在一些实施方式中,重链由SEQ ID NO:7的序列组成。在一些实施方式中,抗体包重链,该重链包含序列MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAPGDYTAYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG

ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVTLHQDWLNG
KEYCKKVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:9)。在一些实施方式中,重链由SEQ ID NO:9的序列组成。

[0126] 在一些实施方式中,抗体包含轻链,该轻链包含序列ELVLTQSPATLSLSPGERATLSCR
ASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTFG
QGTKVEIK (SEQ ID NO:8)。在一些实施方式中,轻链由SEQ ID NO:8的序列组成。在一些实施方式中,抗体包含轻链,该轻链包含序列MGWSCIILFLVATATGVHSELVLTQSPATLSLSPGERATLSC
RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPYTF
GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。在一些实施方式中,轻链由SEQ ID NO:10的序列组成。

[0127] 在一些实施方式中,重链和轻链通过连接体结合。在一些实施方式中,连接体是氨基酸连接体。在一些实施方式中,连接体为至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、16、18、20、22、24或25个氨基酸长。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,连接体为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、16、18、20、22、24或25个氨基酸长。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,连接体介于1-25、5-25、10-25、15-25、20-25、1-20、5-20、10-20、15-20、1-15、5-15、10-15、1-10、5-10或1-5个氨基酸长。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0128] 就另一方面而言,提供了包含本发明的试剂的药物组合物。

[0129] 在一些实施方式中,药物组合物进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。在一些实施方式中,药物组合物治疗有效量的本发明的试剂。

[0130] 如本文所用,术语“载体”、“赋形剂”或“佐剂”是指药物组合物中不是活性剂的任何组分。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指无毒的惰性的固体、半固体、液体填料、稀释剂、包封材料、任意类型的配制助剂,或仅仅是无菌水性介质,如盐水。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例是糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖,淀粉类,如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸钠纤维素,粉末状黄芪胶;麦芽、明胶、滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇类,如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯、琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水、林格氏溶液;乙醇溶液和磷酸盐缓冲溶液,以及药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。在本文中可以作为载体的物质的一些非限制性实例包括糖、淀粉、纤维素及其衍生物、粉末状黄芪胶、麦芽、明胶、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、硫酸钙、植物油、多元醇类、海藻酸、无热原水、等渗盐水、磷酸盐缓冲溶液、可可脂(栓剂基质(base))、乳化剂,以及用于其它药物制剂中的其它无毒药学上相容性物质。也可以存在润湿剂和润滑剂,如月桂硫酸酯钠,以及着色剂、调味剂、赋形剂、稳定剂、抗氧化剂和防腐剂。任何无毒、惰性和有效的载体均可用于配制本文考虑的组合物。在这方面,适合的药学上可接受的载体、赋形剂和稀释剂是本领域技术人员公知的,诸如在The Merck Index,第十三版,Budavari等人,

Eds., Merck&Co., Inc., Rahway, N.J. (2001); the CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association) International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 第十版 (2004); 和 “Inactive Ingredient Guide,” U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Office of Management (其通过引用以其全部内容整体并入本文) 中描述的那些。用于本组合物中的药学上可接受的赋形剂、载体和稀释剂的实例包括蒸馏水、生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、Hank's 溶液和 DMSO。这些另外的非活性组分以及有效的制剂和施用程序是本领域公知的, 并在标准教科书中进行了描述, 如 Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Gilman 等人 Eds. Pergamon Press (1990); Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990); 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., (2005) (其每一个均通过引用以其整体并入本文)。本文描述的组合物也可以包含在人工产生的结构中, 如脂质体、ISCOMs、缓慢释放颗粒和其它增加血清中肽或多肽的半衰期的媒介物 (vehicles)。脂质体包括乳液、泡沫、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、层状层等。与本文描述的肽一起使用的脂质体由标准的形成囊泡的脂质形成, 该脂质通常包括中性和带负电荷的磷脂和固醇, 如胆固醇。脂质的选择通常取决于诸如血液中脂质体大小和稳定性的考虑。例如, Coligan, J.E. 等人, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., New York 综述了可用于制备脂质体的各种方法, 以及还参见美国专利号 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369。

[0131] 载体可总共占本文提出的药物组合物重量的约 0.1% 至约 99.99999%。

[0132] 术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物疾病或障碍的药物的量。在一些实施方式中, 治疗有效量是以必要的剂量并持续必要的时间段而有效实现所期望的治疗或预防结果的量。确切的剂型和方案将由医师根据患者的状况确定。

[0133] 在一些实施方式中, 试剂用于治疗疾病或状况。在一些实施方式中, 药物组合物用于治疗疾病或状况。在一些实施方式中, 疾病或状况以表达 HVEM 的细胞为特征。在一些实施方式中, 细胞是以表达 HVEM 为特征的疾病细胞。在一些实施方式中, 细胞以过表达 HVEM 为特征。在一些实施方式中, 过表达是与健康细胞相比。在一些实施方式中, 健康细胞是非患病细胞。在一些实施方式中, 过表达是增加的表达。在一些实施方式中, 疾病或状况是 HVEM 阳性疾病或状况。在一些实施方式中, 疾病或状况是 BTLA 阳性疾病或状况。

[0134] 在一些实施方式中, 疾病或状况是 HVEM 阳性癌症。在一些实施方式中, 疾病或状况是 BTLA 阳性癌症。在一些实施方式中, 疾病或状况是 HVEM 阳性癌前期病变。在一些实施方式中, 癌症是黑素瘤。在一些实施方式中, 癌症是肾细胞癌。在一些实施方式中, 癌症选自黑素瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌和头颈癌。在一些实施方式中, 肾癌是肾细胞癌。技术人员将理解, 任何表达 HVEM 的癌症都可以是治疗靶标。在一些实施方式中, 疾病是传染病。在一些实施方式中, 感染细胞包含 HVEM 表达。在一些实施方式中, 受感染的细胞包含 HVEM 表达。在一些实施方式中, 传染病是细菌并且细菌细胞包含 HVEM 表达。在一些实施方式中, 传染病是真菌感染并且真菌细胞包含 HVEM 表达。在一些实施方式中, 传染病是病毒并且病毒感染的受试者细胞包含 HVEM 表达。在一些实施方式中, 病毒是疱疹病毒。在一些实施方式中, HVEM 表达是 HVEM 过表达。在一些实施方式中, HVEM 表达是增加

的HVEM表达。

[0135] 就另一方面而言,提供了治疗HVEM阳性疾病或状况的方法,该方法包括抑制HVEM和BTLA相互作用并激活免疫细胞、疾病细胞或两者中的HVEM信号传导。

[0136] 在一些实施方式中,方法包括施用本发明的试剂。在一些实施方式中,方法包括施用本发明的药物组合物。

[0137] 就另一方面而言,提供了治疗HVEM阳性疾病或状况的方法,该方法包括施用本发明的试剂。

[0138] 就另一方面而言,提供了治疗HVEM阳性疾病或状况的方法,该方法包括施用本发明的药物组合物。

[0139] 在一些实施方式中,方法进一步包括不抑制HVEM-TNFSF14相互作用。在一些实施方式中,方法进一步包括不大幅抑制HVEM-TNFSF14相互作用。

[0140] 在一些实施方式中,方法进一步包括抑制PD-1与其配体中的一种之间的相互作用。在一些实施方式中,PD-1配体选自PD-L1和PD-L2。在一些实施方式中,方法进一步包括抑制PD-1、PD-L1或PD-L2。在一些实施方式中,方法进一步包括抑制PD-1与PD-L1的相互作用。在一些实施方式中,方法进一步包括抑制PD-1与PD-L2的相互作用。在一些实施方式中,方法进一步包括抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的相互作用。在一些实施方式中,抑制相互作用包括施用抑制PD-1与PD-L1相互作用或PD-1与PD-L2相互作用的试剂。在一些实施方式中,抑制相互作用包括施用抑制PD-1与其配体中的至少一种之间的相互作用的试剂。在一些实施方式中,至少一种配体是两种配体。在一些实施方式中,抑制相互作用包括PD-1/PD-L1阻断。在一些实施方式中,抑制相互作用包括PD-1/PD-L1或PD-L2阻断。在一些实施方式中,抑制相互作用包括抗PD-1/PD-L1疗法。在一些实施方式中,抑制相互作用包括抗PD-1/PD-L1或PD-L2疗法。在一些实施方式中,疗法是免疫疗法。在一些实施方式中,抑制相互作用的试剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体。在一些实施方式中,抑制相互作用的试剂是抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2抗体。在一些实施方式中,抑制相互作用的试剂是PD-1/PD-L1抑制剂。在一些实施方式中,抑制相互作用的试剂是PD-1/PD-L1/PD-L2抑制剂。在一些实施方式中,抗体是封闭性抗体。PD-L1/L2和PD-1疗法是本领域公知的并且包括但不限于纳武单抗(nivolumab)(Opdivo)、派姆单抗(pembrolizumab)(Keytruda)、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿维单抗(avelumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、西米普利单抗(cemiplimab)(Libtayo)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、AMP-224、AMP-514和PDR001。

[0141] 在一些实施方式中,治疗方法进一步包括针对表达HVEM的细胞施用另一种治疗剂(therapeutic)。在一些实施方式中,其它治疗剂是抗癌治疗剂。在一些实施方式中,治疗剂是非自体免疫细胞。在一些实施方式中,其它治疗剂是自体免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是CAR表达免疫细胞。在一些实施方式中,CAR是CAR-T。在一些实施方式中,CAR是CAR-NK。在一些实施方式中,自体免疫细胞是TIL疗法。在一些实施方式中,非自体免疫细胞是过继性细胞疗法。在一些实施方式中,自体免疫细胞是过继性细胞疗法。在一些实施方式中,过继性细胞是CAR细胞。在一些实施方式中,过继性细胞是TIL。

[0142] 在一些实施方式中,本发明的组合物和另一种治疗剂同时施用。在一些实施方式中,本发明的组合物在另一种治疗剂之前、之后或同时施用。

[0143] 就另一方面而言,提供了确定待通过本发明的方法治疗的受试者的适合性的方

法,该方法包括从受试者获得样品并测定样品中的HVEM水平,其中HVEM的阳性表达表明受试者适合本发明的治疗方法。

[0144] 就另一方面而言,提供了检测样品中HVEM的方法,该方法包括将样品与本发明的试剂、或本发明的抗体或其抗原结合片段接触,从而检测HVEM。

[0145] 在一些实施方式中,接触是在适合结合的条件下进行的,结合是试剂或抗体或其抗原结合片段与HVEM的结合。在一些实施方式中,条件适合与HVEM特异性结合。在一些实施方式中,结合是杂交。抗体/试剂结合的条件将取决于样品。技术人员将理解与组织样品结合所需的条件(取决于固定的方法/类型)不同于在液体溶液(如全细胞裂解液)中结合的那些条件。这种结合条件是本领域公知的,且技术人员可以针对给定的样品选择合适的条件。

[0146] 在一些实施方式中,样品是组织样品。在一些实施方式中,样品是石蜡包埋的样品。在一些实施方式中,样品是灌注样品。在一些实施方式中,样品来自受试者。在一些实施方式中,样品是健康样品。在一些实施方式中,样品是患病样品。在一些实施方式中,样品是诊断样品。

[0147] 在一些实施方式中,方法进一步包括检测本发明的试剂、或本发明的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,检测是免疫组织化学检测。在一些实施方式中,检测是免疫荧光检测。在一些实施方式中,检测是FACS检测。在一些实施方式中,检测进一步包括将样品与识别本发明的试剂或抗体的二抗接触。在一些实施方式中,检测包括检测二抗。在一些实施方式中,检测包括显微术。

[0148] 在一些实施方式中,受试者患有疾病或状况。在一些实施方式中,受试者疑似患有疾病或状况。在一些实施方式中,受试者处于发展疾病或状况的风险中。在一些实施方式中,受试者患有可包括增加的HVEM表达的疾病或状况。在一些实施方式中,受试者患有可以以增加的HVEM表达为特征的疾病或状况。在一些实施方式中,受试者患有癌症。在一些实施方式中,癌症是对一线疗法没有反应的癌症。在一些实施方式中,癌症是癌症复发。在一些实施方式中,癌症是对PD-1/PD-L1疗法没有反应的癌症。

[0149] 在一些实施方式中,样品是疾病样品。在一些实施方式中,样品是生物流体。在一些实施方式中,生物流体选自血液、血清、血浆、尿液、粪便、胆汁、精液、肿瘤流体、和脑脊髓液。在一些实施方式中,样品是血液样品。在一些实施方式中,样品是细胞样品。在一些实施方式中,样品包含细胞。在一些实施方式中,样品包含疾病细胞。在一些实施方式中,样品是肿瘤样品。在一些实施方式中,样品是活组织检查。

[0150] 在一些实施方式中,HVEM的阳性表达包括HVEM表达。在一些实施方式中,HVEM的阳性表达包括升高的HVEM水平。在一些实施方式中,HVEM的阳性表达包括提高的HVEM水平。在一些实施方式中,HVEM的阳性表达包括HVEM的过表达。在一些实施方式中,HVEM的阳性表达是与健康样品相比。在一些实施方式中,健康样品来自与疾病组织和/或细胞相邻的健康组织和/或细胞。在一些实施方式中,健康样品包含未感染的细胞。在一些实施方式中,健康样品用于健康供体。在一些实施方式中,HVEM的阳性表达是与预定阈值相比。

[0151] 就另一方面而言,提供了包含本发明的药物组合物或本发明的试剂的试剂盒。

[0152] 在一些实施方式中,试剂盒进一步包括基于PD-1的疗法。在一些实施方式中,试剂盒进一步包括基于PD-L1的疗法。在一些实施方式中,疗法是免疫疗法。在一些实施方式中,疗法是抗PD-1疗法。在一些实施方式中,疗法是抗PD-L1疗法。在一些实施方式中,疗法是

PD-1/PD-L1阻断疗法。在一些实施方式中,疗法是封闭性抗体。在一些实施方式中,疗法是抗PD-1抗体。在一些实施方式中,疗法是抗PD-L1抗体。在一些实施方式中,抗体是封闭性抗体。

[0153] 在一些实施方式中,试剂盒进一步包括说明本发明的药物组合物是与基于PD-1和/或PD-L1的疗法一起使用的标签。在一些实施方式中,试剂盒进一步包括说明本发明的试剂是与基于PD-1和/或PD-L1的疗法一起使用的标签。

[0154] 在一些实施方式中,试剂盒进一步包含第二检测分子。在一些实施方式中,检测分子用于检测本发明的试剂。在一些实施方式中,第二检测分子是结合本发明的试剂的抗体。在一些实施方式中,检测分子包含可检测部分。可检测部分的实例包括但不限于荧光部分、标签、放射性标记、染料和化学发光部分。在一些实施方式中,可检测部分是荧光部分。荧光部分的实例包括但不限于GFP、RFP、YFP、APC、CY5、CY7和太平洋蓝(Pacific Blue)。第二检测分子是本领域公知的,并且可以使用将检测本发明的试剂的任何此类分子。

[0155] 如本文所用,术语“约”当与值组合时是指参考值的正负10%。例如,约1000纳米(nm)的长度是指1000nm+-100nm的长度。

[0156] 注意,如本文和所附权利要求中使用的,单数形式“一”、“一个/种”和“该/所述”包括复数指代,除非上下文另外明确指出。因此,例如,对“多核苷酸”的提及包括多个这样的多核苷酸,而对“多肽”的提及包括本领域技术人员已知的一个或多个多肽及其等同物,等等。还应注意,权利要求可撰写为排除任意任选的要素。由此,此声明旨在充当诸如“仅仅”、“只有”等排他性术语与权利要求要素的叙述结合使用,或“负”限定的使用的先行基础。

[0157] 在那些使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的协定(convention)的情况下,这样的结构(construction)通常意图是在本领域技术人员会理解该协定的意义上(例如,“具有A、B和C中至少一个的系统”将包括但不限于仅具有A、仅具有B、仅具有C、具有A和B一起、具有A和C一起、具有B和C一起、和/或具有A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员将进一步理解,实际上,无论是在说明书、权利要求书还是附图中,呈现两个或更多个可选术语的任何反意连接词和/或短语都应理解为考虑了包括术语中的一个、术语中的任一个、或这两个术语的可能。例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能。

[0158] 应当理解,为清楚起见,在单独的実施方式的背景下描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见,在单个實施方式的背景下描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任意适合的子组合来提供。与本发明有关的實施方式的所有组合都被本发明具体地涵盖并在本文中公开,就像每一个组合都被单独地并且明确地公开一样。另外,各种实施方式及其要素的所有子组合也被本发明具体地涵盖并在本文中被公开,就像每一个这样的子组合在本文中被单独地并且明确地公开一样。

[0159] 在考查以下实施例后,本发明的其它目的、优点和新颖特征对于本领域普通技术人员将变得显而易见,而这些实施例并非旨在进行限制。另外,如上文所述和如以下权利要求部分中所要求保护的,本发明的各种實施方式和方面中的每一个在以下实施例中均得到实验支持。

[0160] 如上文所述和如以下权利要求部分所要求保护的本发明的各种實施方式和方面在以下实施例中均得到实验支持。

[0161] 实施例

[0162] 总体上,本文所用的命名法和本发明中所用的实验室程序包括分子、生化、微生物学和重组DNA技术。文献中对这样的技术进行了详尽的解释。参见,例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook等人,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley和Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson等人,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等人(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,第1-4卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);美国专利号4,666,828;4,683,202;4,801,531;5,192,659和5,272,057中阐述的方法学;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,第I-III卷Cellis,J.E.,ed.(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”by Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),第三版;“Current Protocols in Immunology”第I-III卷Coligan J.E.,ed.(1994);Stites等人(eds),“Basic and Clinical Immunology”(第八版),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(eds),“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);所有这些都通过引用并入。贯穿本文件提供了其它一般性参考。

[0163] 材料和方法

[0164] 通过噬菌体展示产生针对HVEM的scFv:将幼稚的人scFv文库与合成/重组标签一起孵育以减去标签特异性克隆,并与对照CHO-K1空细胞一起孵育以减去CHO-K1细胞结合克隆。然后,通过与过表达hrHVEM的CHO-K1细胞一起孵育,对噬菌体进行三轮生物淘选(biopanning)。克隆被挑选(picked),在辅助噬菌体的帮助下拯救并通过针对hrHVEM、mrHVE和crHVEM的噬菌体ELISA进行筛选。克隆被测序并且阳性的独特克隆被亚克隆到pET25b蛋白表达载体中。从200ml的诱导培养物中制备了裂解物。将细菌细胞沉淀,用PBS洗涤并通过弗氏压碎器裂解。通过高速离心去除不溶性碎片并收集含有可溶性蛋白质(包括scFv)的裂解物。scFv被克隆并具有HIS标签。

[0165] 转染的CHO-K1细胞的产生:将CHO-K1细胞以200K个细胞/孔的密度接种在6孔板中用10%FBS(Biological Industries,以色列)补充的含L-谷氨酰胺的Nutrient Mixture F-12(Ham's)培养基(Biological Industries,以色列)中并在37°C下孵育过夜。孵育后,根据制造商的说明,使用4μl jetPRIME转染试剂(Polyplus-transfection,法国)转染2μg质粒DNA。转染后两天用1mg/ml G418硫酸盐抗生素(Millipore,德国)进行选择并在添加抗生素的情况下常规培养细胞。

[0166] 流式细胞术:使用在FACS缓冲液(PBS,0.02%叠氮化钠,0.5%BSA)中稀释的适当纯的特异性抗体在冰上对 $\leq 1 \times 10^5$ 个细胞进行表面细胞染色30分钟。孵育后,在4°C下以500g将细胞离心5分钟并去除上清液。细胞覆盖在冰上与荧光团缀合的适当二抗一起孵育30分钟。在荧光团缀合的一抗的情况下,在没有二抗的情况下进行直接染色。孵育后,细胞被洗涤并重悬于200μl FACS缓冲液中用于流式细胞术分析。

[0167] mAb产生:

[0168] a. 萤光素酶报道基因测定:根据制造商的说明,使用Bright-Glo萤光素酶测定系

统(Bright-Glo Luciferase Assay System) (Promega,美国) 测量萤光素酶活性。简而言之,通过组合和混合一瓶缓冲液(Buffer)和一瓶底物(Substrate) 制备萤光素酶测定试剂(Luciferase Assay Reagent)。将等体积的试剂和样品混合,并在添加试剂后3或10分钟利用适当的仪器设置测量发光。

[0169] b. 质粒制备:将scFv2转化为含有S228P突变的全IgG4抗体。设计、优化和合成靶DNA序列。完整的序列被亚克隆到pcDNA3.4载体中。大量制备(maxi-prepared) 转染级质粒用于Expi293F细胞表达。

[0170] c. 细胞培养和瞬时转染:使Expi293F细胞在无血清Expi293FTM表达培养基(Thermo Fisher Scientific,美国) 中生长。在定轨振荡器(VWR Scientific,美国) 上使细胞维持在锥形瓶(Corning Inc.,美国) 中,处于37°C,8%CO₂下。转染前一天,将细胞以适当的密度接种在Corning锥形瓶中。在转染当天,将DNA和转染试剂以最佳比例混合然后添加到含有准备用于转染的细胞的烧瓶中。将编码靶蛋白的重组质粒瞬时转染到悬浮Expi293F细胞培养物中。转染后第6天收集的细胞培养上清液用于纯化。

[0171] 纯化和分析:将细胞培养液离心,之后过滤。以适当的流速将过滤的细胞培养上清液加载到亲和纯化柱上。在用适当的缓冲液洗涤和洗脱后,合并洗脱的级分,并将缓冲液更换为最终的制剂缓冲液。通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析对纯化后的蛋白质进行分子量和纯度测量分析。通过A280法(抗体) 测定浓度。

[0172] 细胞毒性测定:接种核RFP染色的黑素瘤细胞进行过夜孵育以允许它们粘附。然后,将黑素瘤细胞与20μg/ml本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体(Invivogen,法国) 一起预孵育,并将TIL与20μg/ml抗PD1 mAb(Nivolumab,BMS) 或hIgG4同种型对照抗体(Invivogen,法国) 一起预孵育。将预孵育的TIL或仅含抗PD1或hIgG4同种型对照mAb的培养基与CellEvent胱天蛋白酶-3/7绿色检测试剂(CellEvent Caspase-3/7Green Detection Reagent) (Invitrogen,美国) 一起添加到黑素瘤细胞中。将板置于Incucyte ZOOM系统(ESSEN Bioscience,美国) 中并且每小时扫描。对反映黑素瘤的特异性杀伤的胱天蛋白酶3/7阳性事件进行计数。类似的方案用于RCC细胞的细胞毒性测定实验和用于MAB356的细胞毒性测定实验。

[0173] 通过流式细胞术进行的T细胞激活测定:在37°C下将黑素瘤细胞或仅培养基与20μg/ml本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体(Invivogen,法国) 一起孵育1小时。1小时后,TIL被添加到黑素瘤细胞或培养基中并在37°C下共培养4小时。4小时后,用抗CD3(Biolegend,美国) 和抗41BB(Biolegend,美国) 对细胞进行表面染色,并使用CytoFLEX仪器(Beckman Coulter,美国) 通过流式细胞术以及使用FCS Express 6软件(DeNovo Software,美国) 进行数据来分析评估表达。

[0174] 通过Incucyte ZOOM系统进行的T细胞激活测定:将核RFP染色的黑素瘤细胞接种进行过夜孵育以允许它们粘附。过夜孵育后,将黑素瘤细胞与20μg/ml本发明的mAb或hIgG4同种型对照在37°C下一起孵育1小时。将MART-1电穿孔的PBMC或培养基与用FabFlour-488标记试剂(ESSEN Bioscience,美国) 标记的抗41BB(Biolegend,美国) 一起添加到黑素瘤细胞中。将板置于Incucyte ZOOM系统中并且每小时扫描。

[0175] T细胞簇测定:通过Incucyte ZOOM系统获取图像。通过用图像J版本1.52a的图像分析计算簇的数量。对图像进行平滑处理,增强对比度,然后转换为8位图像。图像二值化

后,通过应用“关闭”、“填洞”和“腐蚀”命令来处理图像。然后使用以下参数:500mm²-无穷的大小和0.1-1之间的圆度应用“颗粒分析”命令。

[0176] 实施例1:将HVEM鉴定为免疫阻断靶标

[0177] 由约8,300个基因组成的高通量全基因组初级siRNA筛选在2个患者来源的黑素瘤细胞系统上运行。通过与TIL过夜共培养进行siRNA转染后96小时,利用基于LDH的细胞毒性测定来评估杀伤作用。通过FACS评估阳性对照的成功敲低。利用与初级筛选相同的设计——其中阳性命中(positive hits)是基于它们的Z得分和杀伤增强百分比来定义的——在8个黑素瘤细胞系统上验证由360个基因组成的确认筛选,针对siRNA对增殖的影响进行校正。最后,在5个黑素瘤细胞系统上进行由54个基因组成的验证筛选。HVEM被发现作为潜在的免疫治疗靶标具有很强的阳性命中。

[0178] 实施例2:针对HVEM的scFv的选择

[0179] 已将HVEM确立为癌症治疗中用于治疗性免疫阻断的潜在靶标,分离和测定可以结合HVEM的单链抗体片段(scFv)。scFv如上文所述(材料和方法)被分离。对6种经选择的scFv关于与重组人、小鼠和短尾猴HVEM结合进行筛选(见表1)。如通过细胞ELISA测量的,六种中的五种显示出与CHO-K1细胞中表达的人重组HVEM(hrHVEM)的强结合。CHO-K1-空细胞被用作阴性对照。这五种中的两种显示出与小鼠重组HVEM(mrHVEM)的非常强的结合,而其它三种展示出弱得多的结合。五种中的一种还显示出与猴(短尾猴)HVEM的强结合,而其它中的三种显示出弱得多的结合。FACS分析被用于确认这些结果。scFv含有HIS标签并且抗HIS第二APC缀合抗体被用于检测表面结合。如ELISA预测的,发现scFv中的五种与CHO-K1 HVEM过表达细胞中的表面hrHVEM结合,尽管scFv中的两种的表现很差(图1)。

[0180] 表1.使用含有scFv的裂解物对过表达HVEM的CHO-K1细胞进行细胞ELISA。数字代表OD值。

[0181]

组	对照	人	小鼠	短尾猴
1	0.044	1.194	0.140	0.049
2	0.045	1.507	1.366	1.112
3	0.042	1.052	0.403	0.209
4	0.048	1.110	0.161	0.140
5	0.055	0.395	0.057	0.046
6	0.044	1.207	0.951	0.486

[0182] 接下来对scFv就它们抑制HVEM与其配体中的两种:BTLA和LIGHT(TNFSF14)之间的相互作用的能力进行检查。ELISA板用2.5μg/ml hrHVEM涂覆并在4℃下孵育过夜。然后洗涤板并在室温下用2%BSA封闭1小时。将scFv1-6裂解物 and 对照裂解物添加到ELISA板并在室温下孵育1小时。洗涤板并封闭10分钟,之后多次洗涤。将hrBTLA-Fc或hrLIGHT-HIS添加到ELISA板并在室温下孵育2小时。将板洗涤、封闭并与小鼠抗BTLA生物素mAb或山羊抗LIGHT pAb在室温下一起孵育1小时。洗涤板并与链霉抗生物素蛋白过氧化物酶或牛抗山羊HRP抗体在室温下一起孵育30分钟。最后,洗涤板并且TMB之后添加硫酸终止溶液。使用Spark 10M读板器在450nm和570nm处读取吸光度。出乎意料的是,尽管scFv 1、3、4和6已结合hrHVEM,但这些抗体并未抑制HVEM-BTLA结合。相比之下,scFv2几乎完全抑制BTLA结合(图2A)。值得注意的是,没有一种抗体显著抑制LIGHT与HVEM的结合(图2B)。由于其与人、小鼠和猴rHVEM

结合,以及其阻断HVEM-BTLA相互作用的能力,scFv2被选择用于所有未来的工作。

[0183] 实施例3:抗HVEM IgG抗体

[0184] 尽管单链抗体scFv2在阻断HVEM-BTLA相互作用上是有效的,但从scFv2轻链和重链——具体是CDR——设计出完整的IgG单克隆抗体(mAb)。scFv2被测序并且轻链和重链被克隆到IgG4骨架(不包括S228P突变)中。此mAb重链的完整序列存在于SEQ ID NO:9中,并且轻链存在于SEQ ID NO:10中。通过SDS-PAGE和蛋白质印迹确认完整IgG抗体的存在(图3)。

[0185] 接下来,如前评估新的mAb与来自人、小鼠和猴的重组HVEM的结合。如前通过ELISA评估与hrHVEM的结合。新的mAb强烈结合hrHVEM(图4A)。还如前通过FACS评估结合。将CHO-K1空、CHO-K1 hrHVEM、CHO-K1 mrHVEM和CHO-K1 crHVEM细胞与20 μ g/ml抗体或hIgG4同种型对照抗体在冰上一起孵育1小时,之后用抗人IgG FC生物素和抗生物素FITC染色。通过利用CytoFLEX仪器进行流式细胞术和使用FCS Express 6软件进行数据分析来评估表达。新的mAb与来自所有三个物种的rHVEM强烈结合(图4B)。

[0186] 由于新的mAb可以结合重组人HVEM,因此测试其与健康细胞和癌细胞表面上的内源性HVEM结合的能力。用本发明的mAb对健康的人结肠和脾脏组织进行第一次免疫组织化学,其中观察到稳固的(robust)染色(图5A)。接下来,使来自三个原代患者样品的已知表达HVEM的黑素瘤细胞(图5B)与20 μ g/ml本发明的mAb在冰上一起孵育1小时,之后用抗人IgG FC生物素和抗生物素FITC染色。如前通过FACS评估表达。新的mAb与所有三个测试的黑素瘤样品结合(图5C)。还测试了与肾细胞癌(RCC)患者样品的结合。再一次,使用商业可获得的抗HVEM抗体(R&D Systems AF356)确认癌细胞表达的HVEM(图5D)。新的mAb与这些的表面的结合与商业抗体相当(图5E)。最后,用本发明的mAb探测肿瘤微阵列(图5F)。测试了12个不同的指征(indications),包括每个指征1个健康组织样品和5个不同的肿瘤样品。健康的胰腺、肺、胸、膀胱和卵巢呈HVEM阴性;而淋巴结、喉/口腔/舌、脑、肾、肝、胃均呈不同程度的阳性。尽管并非所有肿瘤都表达HVEM,但每种器官类型中至少有一个肿瘤样品呈阳性。

[0187] 还如前评估完整的mAb抑制BTLA与HVEM结合的能力。在本发明的mAb存在下,如通过ELISA所测量的,BTLA不与HVEM结合(图6)。同种型对照IgG的添加充当阳性对照,其中BTLA强烈结合HVEM。关于scFv还可以看出,mAb不抑制LIGHT与HVEM的结合(图6B)。相比之下,商业可获得的抗HVEM mAb,MAB356,能够如预期的那样强烈结合hrHVEM(图6C),但与添加mIgG1同种型对照抗体相比,MAB356的存在仅略微扰乱HVEM和BTLA相互作用(图6D)。因此,本发明mAb在抑制BTLA-HVEM相互作用方面大大优于MAB356。

[0188] 接下来检查通过HVEM的下游信号传导。通过配体结合进行的HVEM激活诱导NF- κ B信号传导。为评估本发明的mAb对HVEM信号传导的影响,将表达hrHVEM和NF- κ B萤光素酶报道基因的Jurkat T细胞与20 μ g/ml的mAb或hIgG4同种型对照在冰上一起预孵育1小时。洗涤细胞然后在37 $^{\circ}$ C下与CHO-K1-空、CHO-K1-hrBTLA或根本无细胞共孵育6小时。使用Bright-Glo萤光素酶测定系统测试萤光素酶活性,并在添加试剂10分钟后使用Spark 10M读板器测量发光。仅当CHO细胞表达BTLA时,萤光素酶才在与对照抗体一起预孵育的Jurkat细胞中被诱导(图7,右)。这是将要预料到的,因为NF- κ B信号传导只应当由HVEM的配体诱导。有趣的是,当与本发明的mAb进行预孵育时,并未看到当与CHO-K1-hrBTLA细胞进行共孵育时非常强的萤光素酶诱导(图7,左侧中间柱)。这是由于mAb阻断HVEM-BTLA相互作用。然而,与mAb一起预孵育后的萤光素酶水平也不处于基线水平。确切地说,mAb自身诱导HVEM和NF- κ B信

号传导的轻度激活(图7,左)。无论CHO细胞是否被共孵育,都可以看到相同水平的激活,这确认了此激活是由mAb自身而不是由细胞引起的。

[0189] 实施例4:本发明的mAb增大T细胞对癌细胞的细胞毒性。

[0190] 由于mAb结合HVEM并阻断其与BTLA的结合,因此理论上它会减轻BTLA信号传导对T细胞的抑制作用。为测试这一点,将粘附的黑素瘤细胞与20 μ g/ml本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体在37 $^{\circ}$ C下一起孵育1小时。1小时后,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)添加到黑素瘤细胞中并在37 $^{\circ}$ C下共孵育24小时。孵育后,从共培养样品中收集上清液或从仅TIL样品中收集上清液作为背景IFN γ 分泌的对照。使用人IFN γ ELISA Max Deluxe试剂盒通过ELISA测量IFN γ 分泌。与本发明的mAb一起预孵育导致在一个黑素瘤细胞系统中IFN γ 分泌量几乎翻倍,并且在第二个系统中尽管较低但仍然显著增加(图8),表明T细胞抑制确实被抗体缓解。

[0191] 接下来,测量在自体TIL存在下对原代患者黑素瘤细胞的特异性杀伤。将来自两名患者的粘附的黑素瘤细胞与本发明的mAb或同种型对照一起预孵育。同时,将TIL与抗PD-1抗体或同种型对照一起预孵育。然后将黑素瘤细胞和TIL以所有可能的组合共孵育,并每小时测量黑素瘤细胞的特异性杀伤,持续11小时(图9A-图B)。在第一细胞系统中,与用同种型对照处理的细胞相比,添加本发明的mAb导致11小时后总细胞杀伤提高近30%。用抗PD1处理观察到相似的杀伤水平(提高33%)。两种抗体的组合处理导致总体杀伤加成提高(additive increase)60%。组合作用通过利用来自第二位患者的细胞所获得的结果而被加强。再一次,本发明的mAb和抗PD1具有相似的作用,将杀伤分别提高67%和64%。出乎意料的是,两种抗体的组合处理具有协同作用,与对照共培养物相比,总杀伤提高180%。这证明这两种抗体一起可以对免疫检查点抑制产生协同作用。

[0192] 接下来,在同一系统中对MAB356进行测试。用来自第一位患者的黑素瘤细胞如上所述测试TIL对黑素瘤细胞的杀伤。将黑素瘤细胞与MAB356或本发明的mAb或适当的同种型对照一起预孵育然后与自体TIL混合。每小时测量对黑素瘤细胞的特异性杀伤,持续15小时。与用hIgG4同种型对照处理的细胞相比,本发明的mAb的添加导致15小时后总细胞杀伤提高22%(图9D),而与用mIgG1同种型对照处理的细胞相比,商业MAB356的添加导致总细胞杀伤降低9%(图9E)。这清楚地显示出本发明的mAb优于MAB356。

[0193] 使用来自RCC患者的细胞进行类似的实验。使癌细胞粘附过夜,与本发明的mAb或同种型对照一起预孵育1小时,之后与来自同一患者的TIL共培养。癌细胞中的细胞死亡通过胱天蛋白酶3/7阳性事件测量,并且在26小时后发现本发明的mAb与同种型对照相比,提高总细胞杀伤47%(图9C)。

[0194] 实施例5:本发明的mAb增大非自体免疫细胞对癌细胞的细胞毒性。

[0195] 已经显示出使用本发明的mAb可以增强来自癌症患者的TIL的细胞毒性,测试增强非自体免疫细胞的能力。收集来自健康供体的PBMC并使其表达人MART1 TCR的 α 和 β 链。使表达MART1的核RFP染色的黑素瘤细胞粘附过夜,与本发明的mAb或同种型对照一起预孵育一小时,之后与PBMC共培养。癌细胞中的细胞死亡通过胱天蛋白酶3/7阳性事件测量,并且在26小时后发现本发明的mAb与同种型对照相比,提高总细胞杀伤28%(图10A)。

[0196] 还测量了来自PBMC的促炎细胞因子分泌。具体地,在来自用含有本发明的mAb或同种型对照的培养基培养,或与和本发明的mAb或同种型对照一起预孵育的黑素瘤细胞一起培养的PBMC的培养基中测量干扰素 γ (IFN γ) 分泌。在培养开始后24小时测量IFN γ 水平。

如预期的,与黑素瘤细胞一起孵育大大提高了IFN γ 分泌,但与和同种型对照一起预孵育的黑素瘤细胞相比,与和本发明的mAb一起预孵育的黑素瘤细胞一起孵育进一步提高分泌32% (图10B)。

[0197] 为排除增加的细胞毒性直接是由抗体引起的,而不是由于增加的T细胞杀伤的可能性,测量mAb的直接细胞毒性作用。将核RFP染色的粘附的黑素瘤细胞在37°C下与20 μ g/ml的本发明的mAb或hIgG4同种型对照抗体一起孵育1小时。1小时后,将CellEvent 胱天蛋白酶-3/7绿色检测试剂添加到黑素瘤细胞中。将板置于Incucyte ZOOM系统 (ESSEN Bioscience, 美国) 中并且每小时扫描,持续15小时。在与mAb一起孵育的两种不同黑素瘤细胞中未观察到细胞死亡增加 (图11), 表明抗体自身没有细胞毒性,并且在上一个实验中观察到的癌症杀伤增加则是由于增加的T细胞的细胞毒性。

[0198] 实施例6: 本发明的mAb诱导TIL的基础轻度激活。

[0199] 在减轻BTLA诱导的T细胞抑制的同时,本发明的mAb还结合T细胞自身上的HVEM。由于mAb经由HVEM信号传导增加NF- κ B诱导的转录,因此mAb的直接结合可直接增加T细胞激活。为测试这一点,用mAb或同种型对照刺激TIL——在单独地和存在自体黑素瘤细胞这两种情况下,并监测T细胞的激活 (图12A)。在具有和不具有黑素瘤细胞这两种情况下,激活的T细胞的百分比在mAb的存在下都增加。这表明抗体与T细胞上的HVEM的结合确实靠其自身诱导激活。因此,抗体至少具有双重作用,既阻断癌细胞的免疫监视逃逸机制,同时又直接激活T细胞。

[0200] 还通过测量T细胞成簇来测试通过HVEM的信号传导。细胞成簇是激活的T细胞的标志。将来自两名不同黑素瘤患者的TIL与本发明的mAb或hIgG4同种型对照一起孵育20小时然后测量簇数。对于测试的两个样品,本发明的mAb显著增加T细胞成簇 (图12B)。当测试MAB356时,与mIgG1对照相比,没有观察到T细胞成簇的变化 (图12C)。这表明虽然本发明的mAb与T细胞上的HVEM结合诱导信号传导和低水平激活,但商业可获得的MAB356的结合不诱导。

[0201] 还测量了存在黑素瘤细胞时PBMC的激活。如前, PBMC表达MART-1特异性TCR,以便靶向黑素瘤细胞。对于这些非自体细胞也是, mAb大大地增加了激活,如通过细胞上的41BB表达测量的 (图12D)。

[0202] 在施用免疫检查点抑制剂时,细胞因子释放综合征始终是一个问题。如上文所示,甚至在癌细胞不存在的情况下,本发明的mAb也能够诱导TIL的轻度激活。为进一步阐明这种激活的程度,进行了细胞因子释放测定。从10个健康供体收集全血,并在0.1、1、10和100 μ g/ml的浓度下测试本发明的mAb。24小时后,对样品进行五种细胞因子: IL-6、IL-8、IL-10、IFN γ 和TNF α 的表达的测量。两种商业可获得的抗癌抗体Erbix (EGFR抑制剂) 和Lemtrada (抗CD52) 被用作对照。分析结果总结在图13中。与诱导强劲细胞因子反应的Lemtrada不同,本发明的mAb仅产生与Erbix相当的轻度反应。

[0203] 实施例7: 使用本发明的mAb的体内癌症治疗。

[0204] 将人黑素瘤细胞皮下植入SCID-NOD小鼠的胁腹中 (第0天)。当肿瘤达到约45mm³时 (第17天), 将小鼠分配到四个处理组 (3只小鼠/组) 并静脉内施用人自体TIL。在第34天再次施用TIL。在第17天,在TIL施用的同时,皮下施用hIL-2连续五天,然后一周两次。在第18天,然后一周两次,对小鼠静脉内施用hIgG4同种型对照 (黑色圆圈)、本发明的mAb (白色正

方形)、抗PD1(黑色三角形)或两种抗体的组合(黑色菱形)。与用同种型对照处理相比,用本发明的mAb处理导致31%的肿瘤生长抑制(TGI),而用抗PD1处理导致仅11%的TGI。组合处理具有导致TGI为48%的协同作用(图14)。在任何小鼠中均未观察到不良副作用。这些结果证明本发明的抗体对于癌症的体内治疗是有效的,并且与抗PD1抗体的组合处理具有增强治疗的协同作用。

[0205] 尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明,但很明显,对于本领域技术人员而言,许多可选方案、修改和变型将是显而易见的。因此,意图涵盖落入所附权利要求的精神和广泛范围内的所有此类可选方案、修改和变型。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 4C生物学公司
- [0003] 特哈休莫医学研究基础设施和服务公司
- [0004] <120> 抗HVEM抗体及其用途
- [0005] <130> 4CB-P-001-PCT
- [0006] <150> 62/965,921
- [0007] <151> 2020-01-26
- [0008] <150> 62/839,841
- [0009] <151> 2019-04-29
- [0010] <160> 16
- [0011] <170> PatentIn版本3.5
- [0012] <210> 1
- [0013] <211> 5
- [0014] <212> PRT
- [0015] <213> 人工的
- [0016] <220>
- [0017] <223> 合成的
- [0018] <400> 1
- [0019] Ser Tyr Ala Met Ser
- [0020] 1 5
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 17
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 人工的
- [0025] <220>
- [0026] <223> 合成的
- [0027] <400> 2
- [0028] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [0029] 1 5 10 15
- [0030] Gly
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 11
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> 人工的
- [0035] <220>
- [0036] <223> 合成的
- [0037] <400> 3
- [0038] Ala Pro Gly Asp Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Tyr

[0039]	1	5	10
[0040]	<210>	4	
[0041]	<211>	11	
[0042]	<212>	PRT	
[0043]	<213>	人工的	
[0044]	<220>		
[0045]	<223>	合成的	
[0046]	<400>	4	
[0047]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala		
[0048]	1	5	10
[0049]	<210>	5	
[0050]	<211>	7	
[0051]	<212>	PRT	
[0052]	<213>	人工的	
[0053]	<220>		
[0054]	<223>	合成的	
[0055]	<400>	5	
[0056]	Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr		
[0057]	1	5	
[0058]	<210>	6	
[0059]	<211>	10	
[0060]	<212>	PRT	
[0061]	<213>	人工的	
[0062]	<220>		
[0063]	<223>	合成的	
[0064]	<400>	6	
[0065]	Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Tyr Thr		
[0066]	1	5	10
[0067]	<210>	7	
[0068]	<211>	120	
[0069]	<212>	PRT	
[0070]	<213>	人工的	
[0071]	<220>		
[0072]	<223>	合成的	
[0073]	<400>	7	
[0074]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0075]	1	5	10 15
[0076]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0077]		20	25 30

[0078]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0079]	35 40 45
[0080]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0081]	50 55 60
[0082]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0083]	65 70 75 80
[0084]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0085]	85 90 95
[0086]	Ala Lys Ala Pro Gly Asp Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[0087]	100 105 110
[0088]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0089]	115 120
[0090]	<210> 8
[0091]	<211> 108
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> 人工的
[0094]	<220>
[0095]	<223> 合成的
[0096]	<400> 8
[0097]	Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0098]	1 5 10 15
[0099]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[0100]	20 25 30
[0101]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0102]	35 40 45
[0103]	Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
[0104]	50 55 60
[0105]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
[0106]	65 70 75 80
[0107]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro
[0108]	85 90 95
[0109]	Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0110]	100 105
[0111]	<210> 9
[0112]	<211> 466
[0113]	<212> PRT
[0114]	<213> 人工的
[0115]	<220>
[0116]	<223> 合成的

[0117]	<400> 9
[0118]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[0119]	1 5 10 15
[0120]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[0121]	20 25 30
[0122]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
[0123]	35 40 45
[0124]	Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0125]	50 55 60
[0126]	Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
[0127]	65 70 75 80
[0128]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
[0129]	85 90 95
[0130]	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
[0131]	100 105 110
[0132]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Pro Gly Asp Tyr Thr Ala Tyr Phe Asp Tyr
[0133]	115 120 125
[0134]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0135]	130 135 140
[0136]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
[0137]	145 150 155 160
[0138]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0139]	165 170 175
[0140]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0141]	180 185 190
[0142]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0143]	195 200 205
[0144]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
[0145]	210 215 220
[0146]	Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
[0147]	225 230 235 240
[0148]	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
[0149]	245 250 255
[0150]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0151]	260 265 270
[0152]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
[0153]	275 280 285
[0154]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0155]	290 295 300

[0156]	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
[0157]	305					310					315					320
[0158]	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
[0159]					325					330						335
[0160]	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
[0161]					340					345					350	
[0162]	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
[0163]					355					360					365	
[0164]	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
[0165]					370					375					380	
[0166]	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
[0167]	385					390					395					400
[0168]	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
[0169]					405					410						415
[0170]	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp
[0171]					420					425					430	
[0172]	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
[0173]					435					440					445	
[0174]	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
[0175]					450					455					460	
[0176]	Gly	Lys														
[0177]	465															
[0178]	<210>	10														
[0179]	<211>	234														
[0180]	<212>	PRT														
[0181]	<213>	人工的														
[0182]	<220>															
[0183]	<223>	合成的														
[0184]	<400>	10														
[0185]	Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
[0186]	1				5					10					15	
[0187]	Val	His	Ser	Glu	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu
[0188]					20					25					30	
[0189]	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val
[0190]					35					40					45	
[0191]	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg
[0192]					50					55					60	
[0193]	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg
[0194]	65					70						75				80

[0195]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
[0196]	85 90 95
[0197]	Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
[0198]	100 105 110
[0199]	Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[0200]	115 120 125
[0201]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0202]	130 135 140
[0203]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0204]	145 150 155 160
[0205]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0206]	165 170 175
[0207]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0208]	180 185 190
[0209]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[0210]	195 200 205
[0211]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[0212]	210 215 220
[0213]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0214]	225 230
[0215]	<210> 11
[0216]	<211> 8
[0217]	<212> PRT
[0218]	<213> 人工的
[0219]	<220>
[0220]	<223> 合成的
[0221]	<400> 11
[0222]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
[0223]	1 5
[0224]	<210> 12
[0225]	<211> 8
[0226]	<212> PRT
[0227]	<213> 人工的
[0228]	<220>
[0229]	<223> 合成的
[0230]	<400> 12
[0231]	Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
[0232]	1 5
[0233]	<210> 13

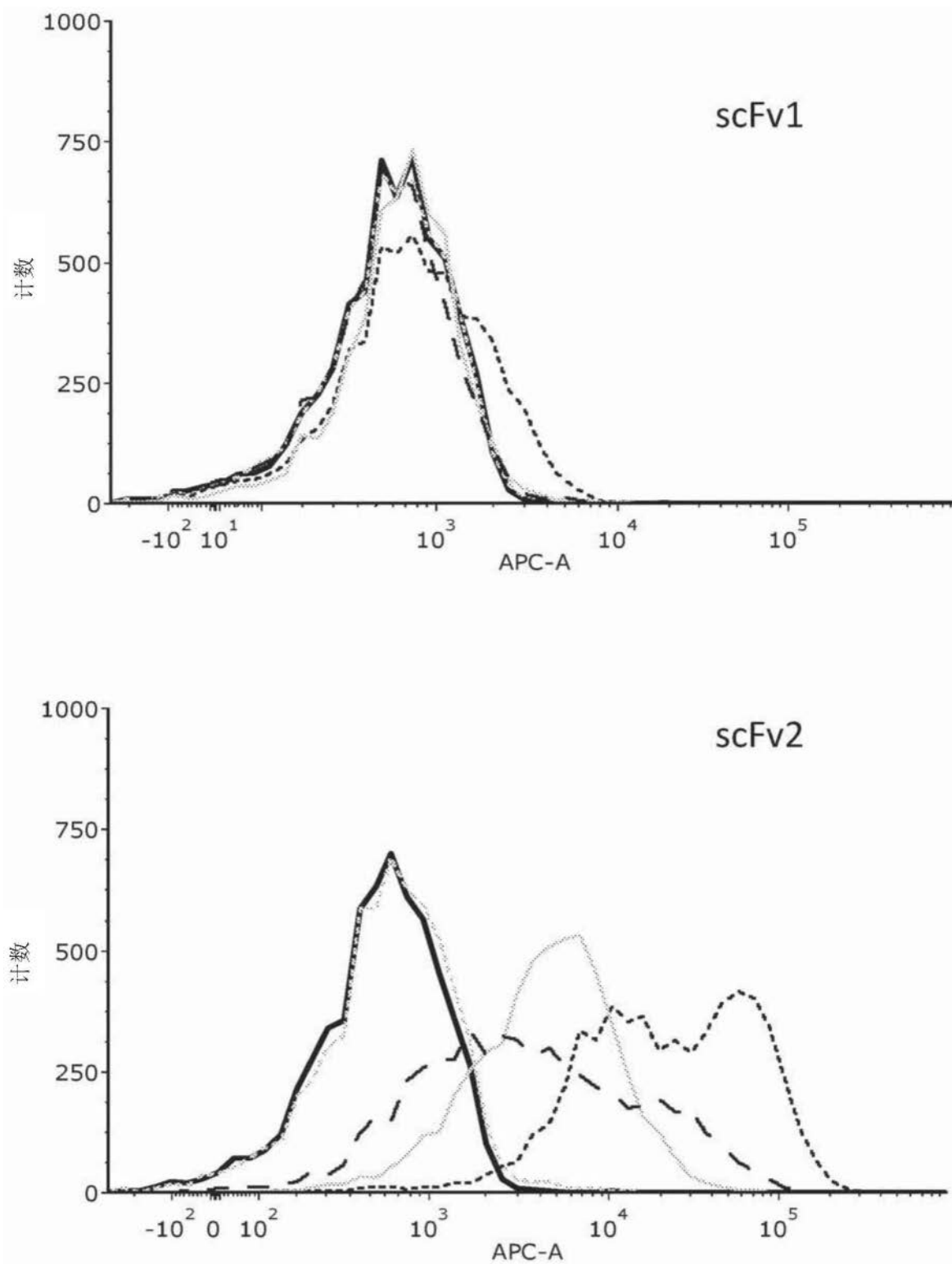


图1

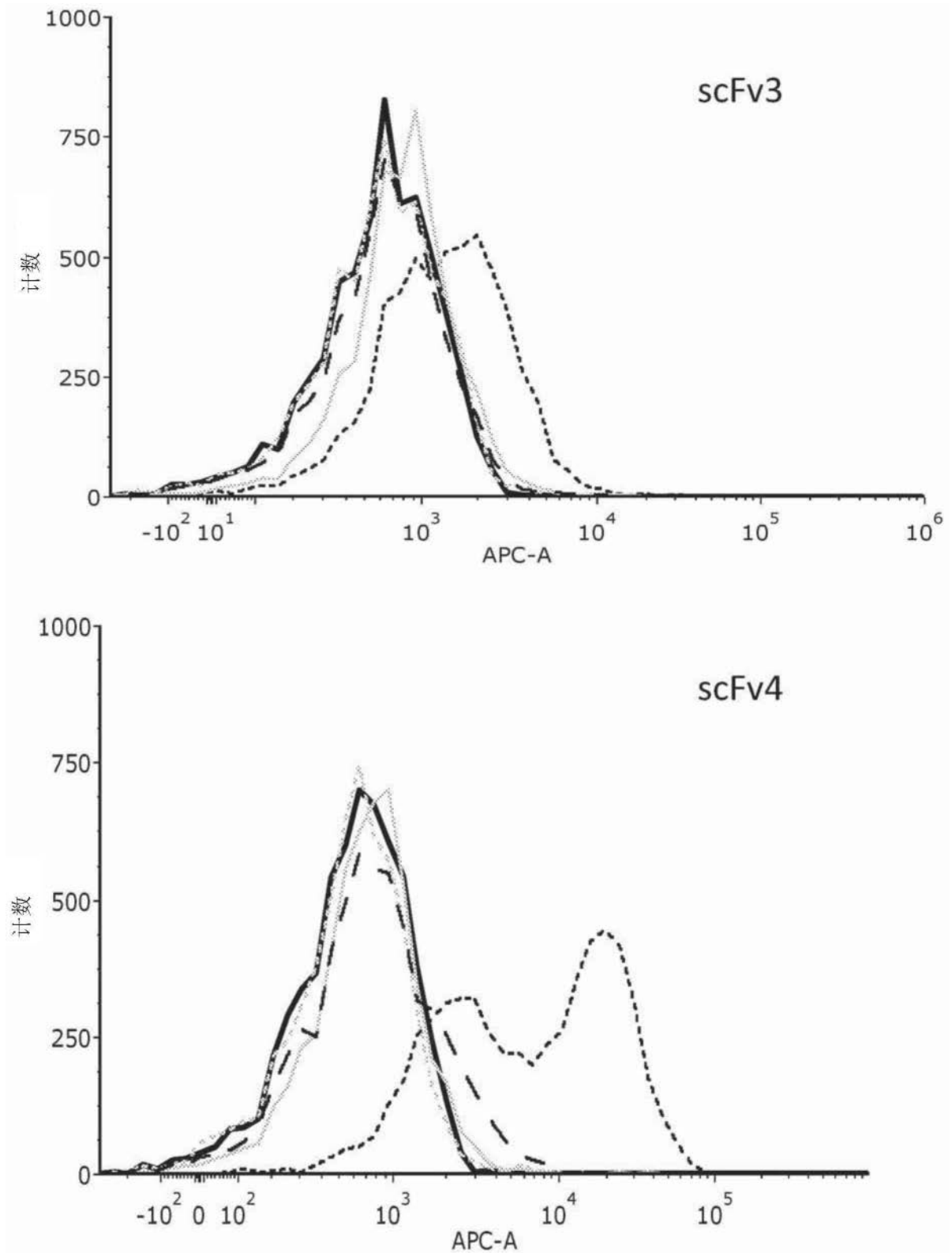


图1续1

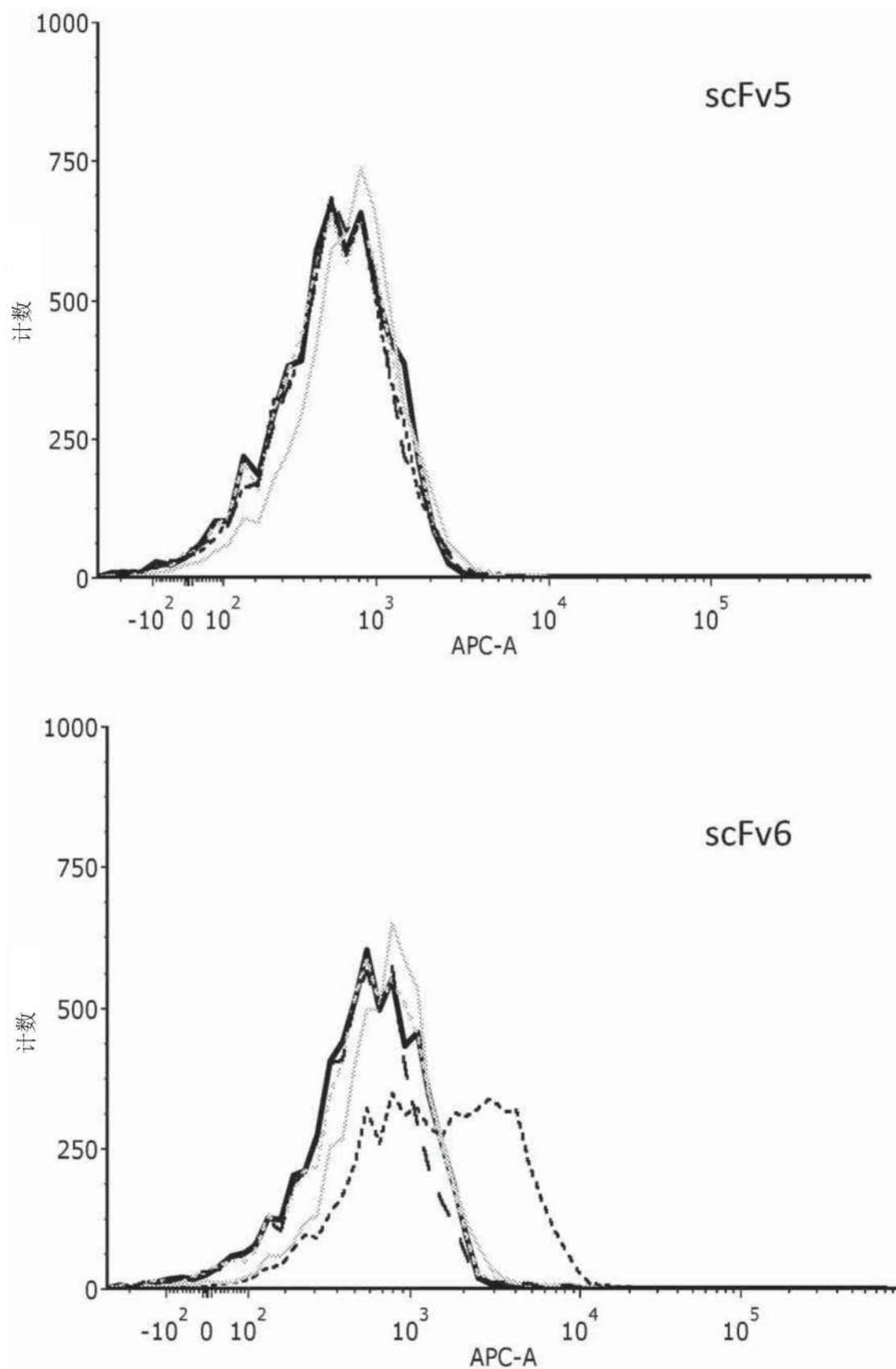


图1续2

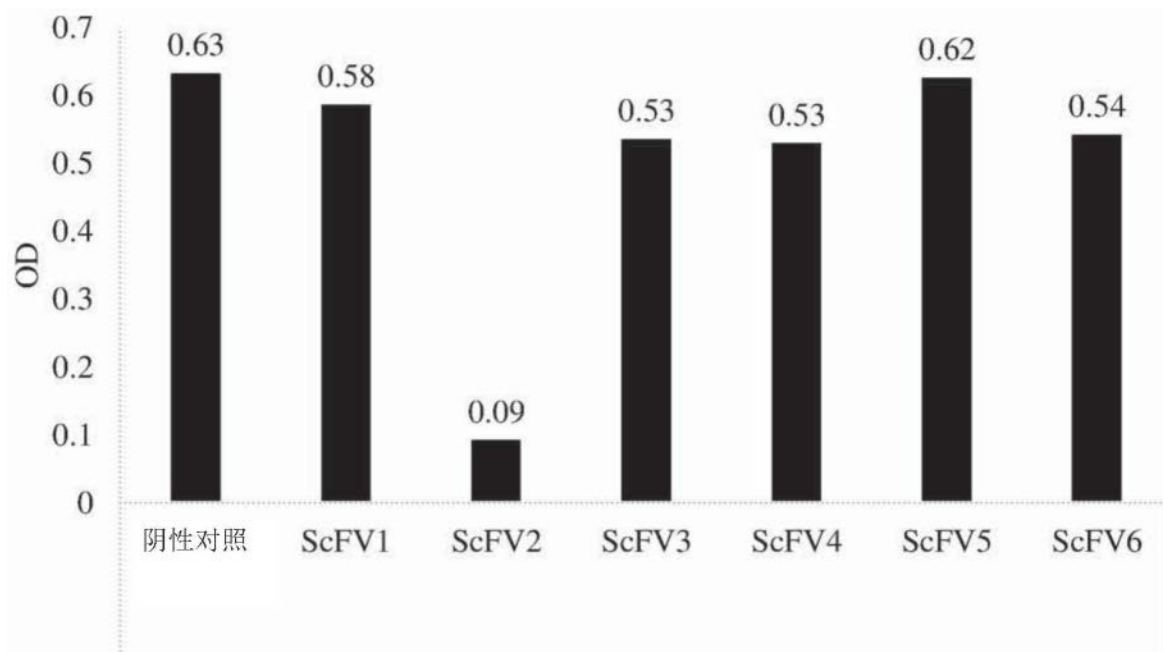


图2A

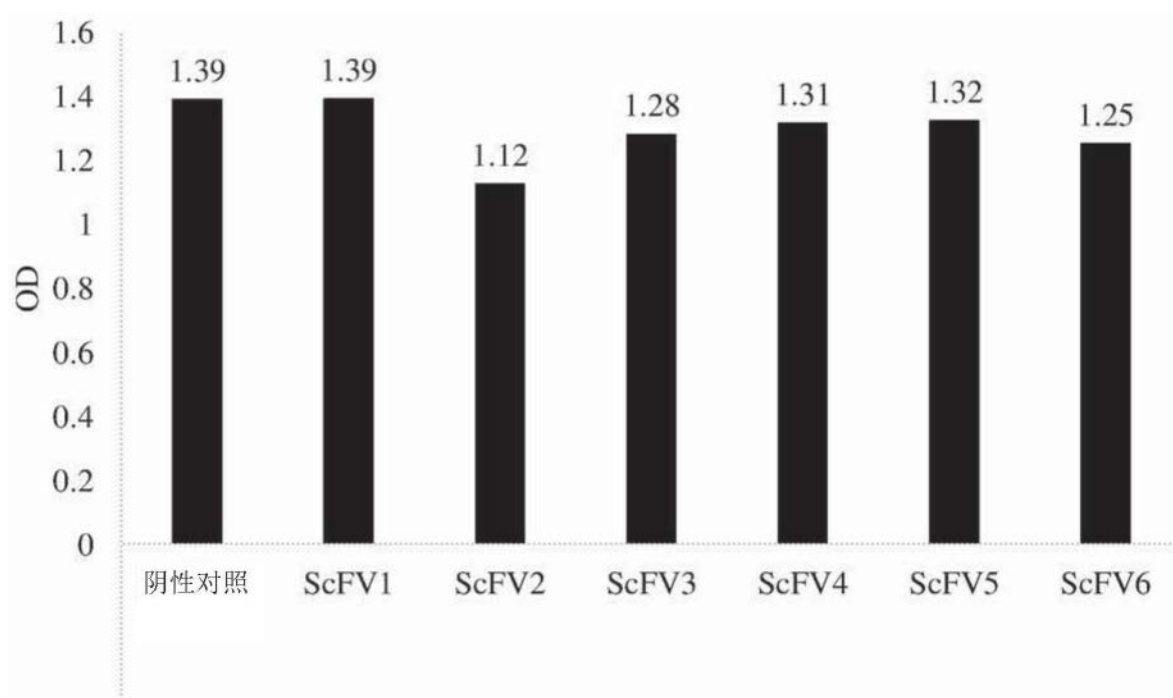


图2B

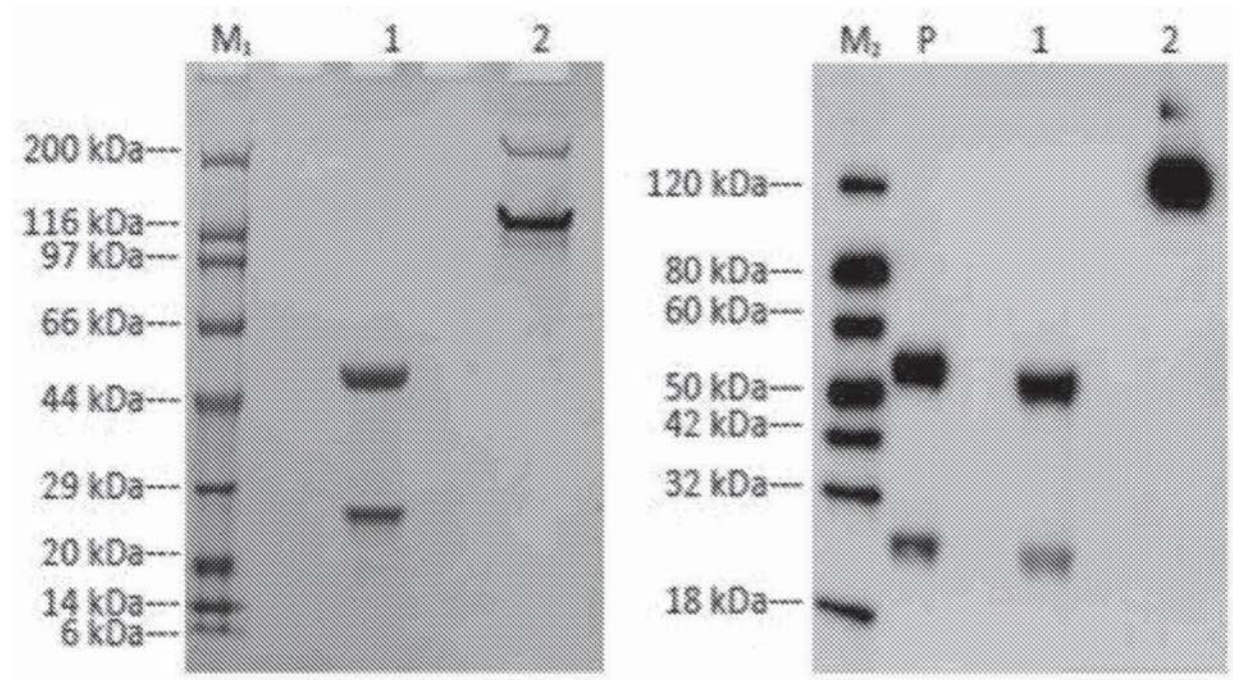


图3

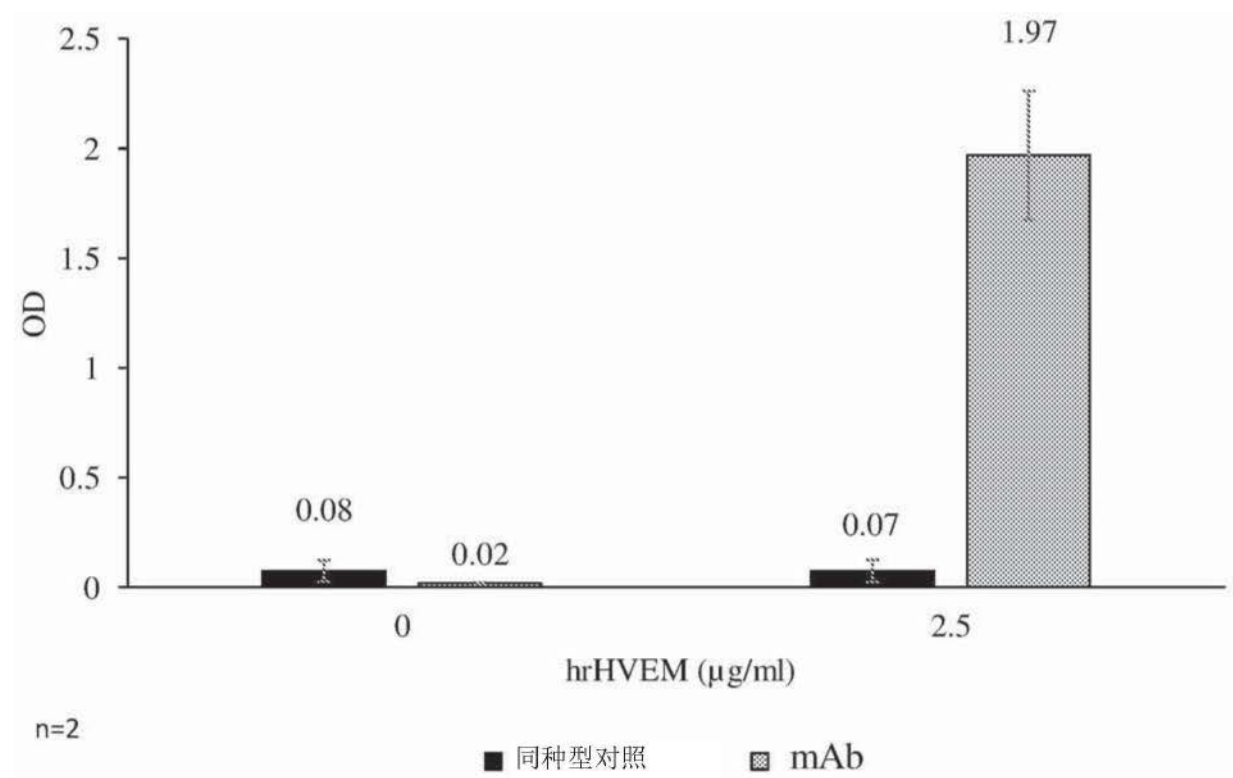


图4A

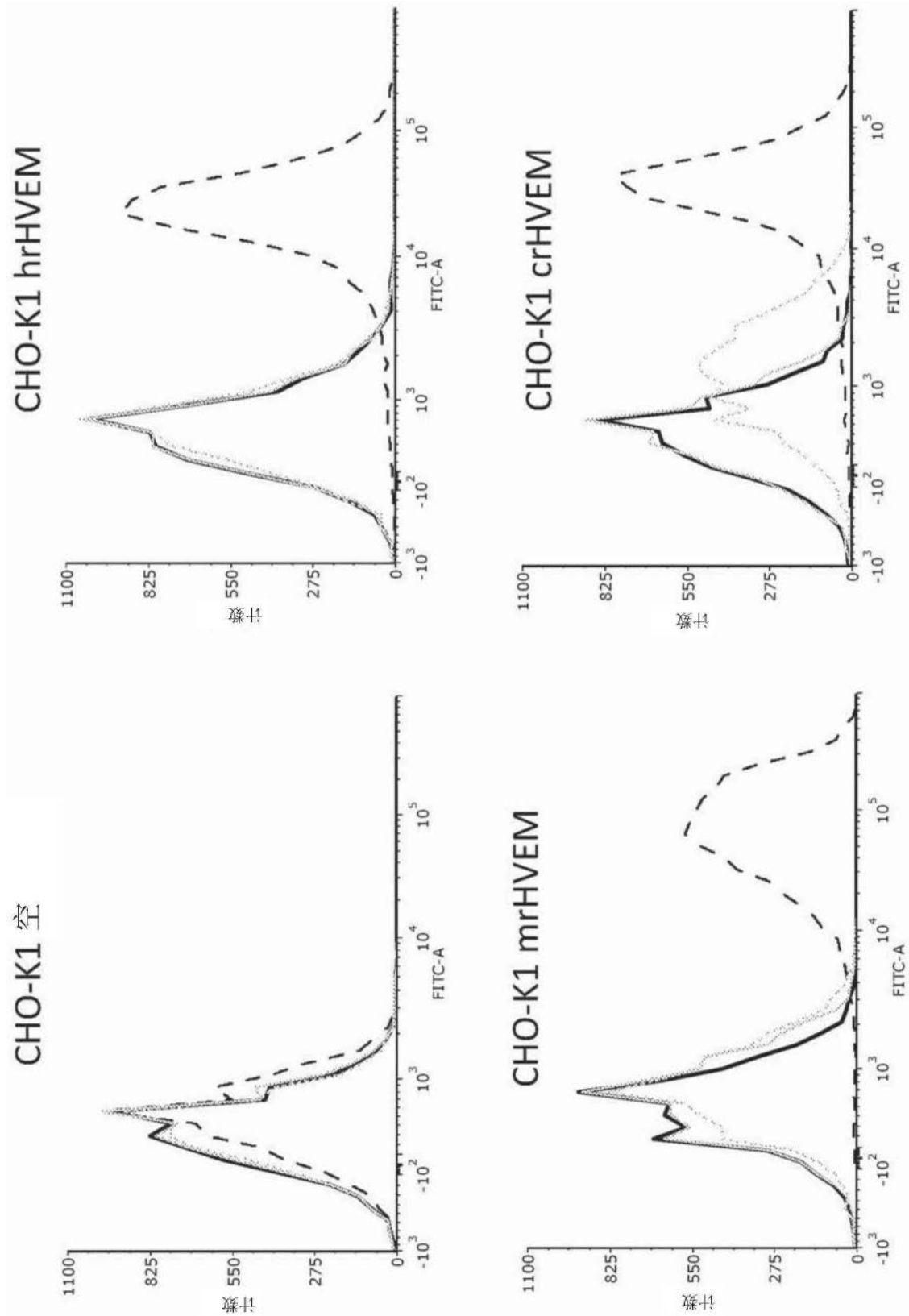


图4B

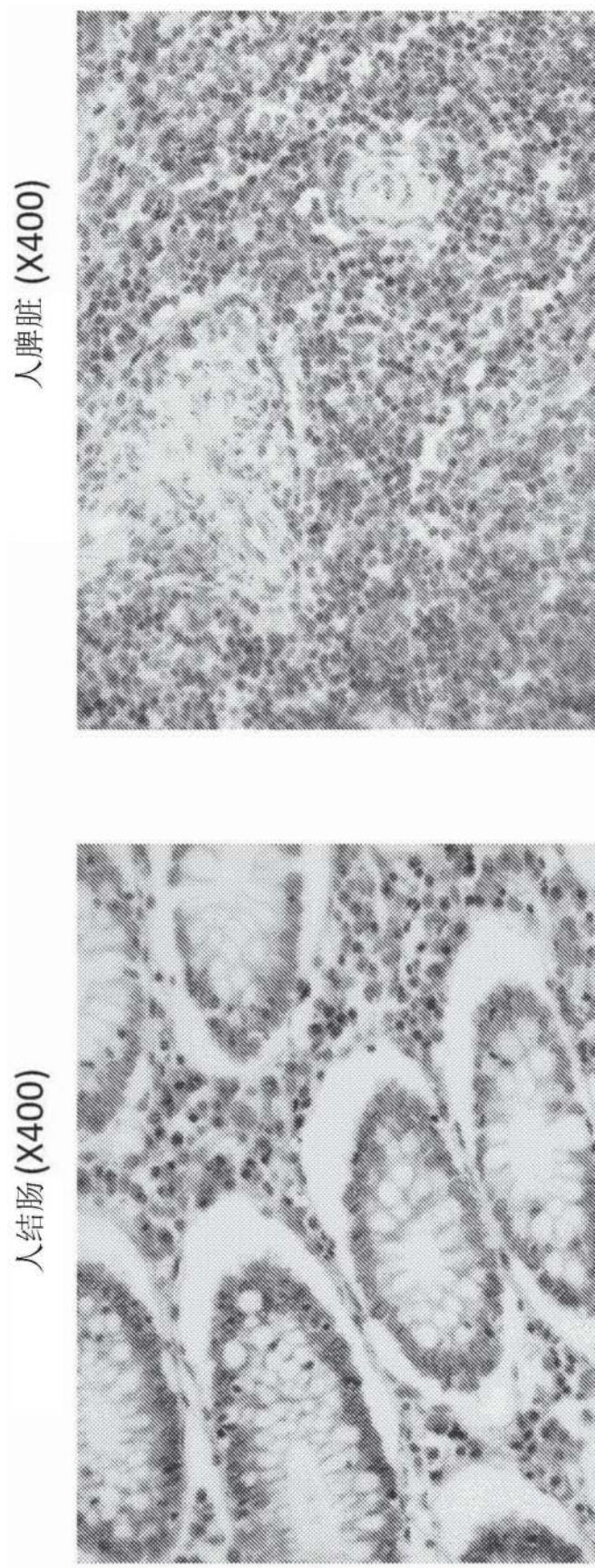


图5A

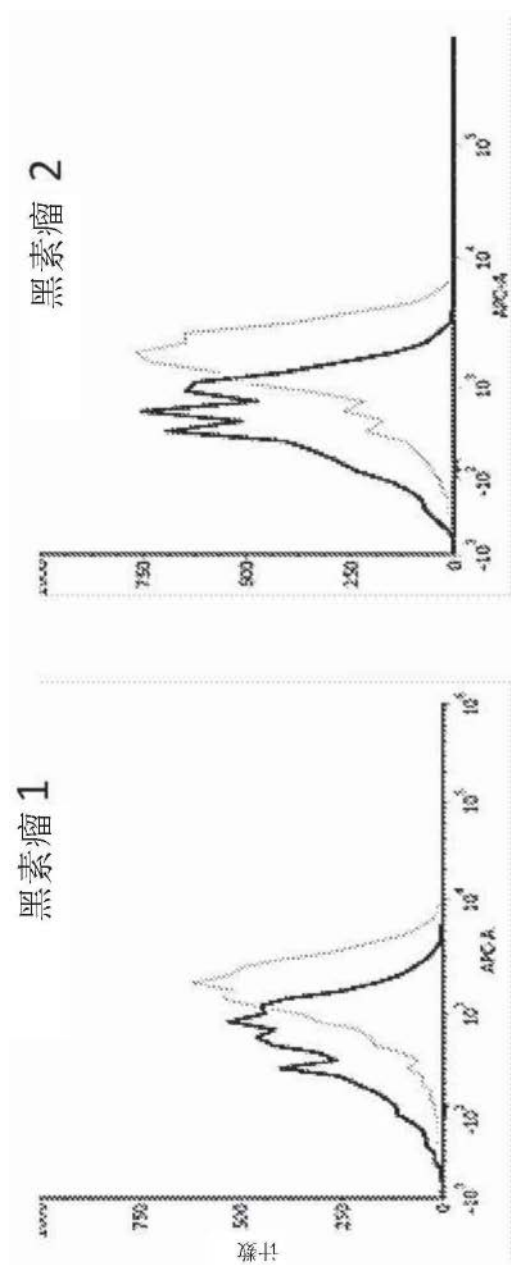


图5B

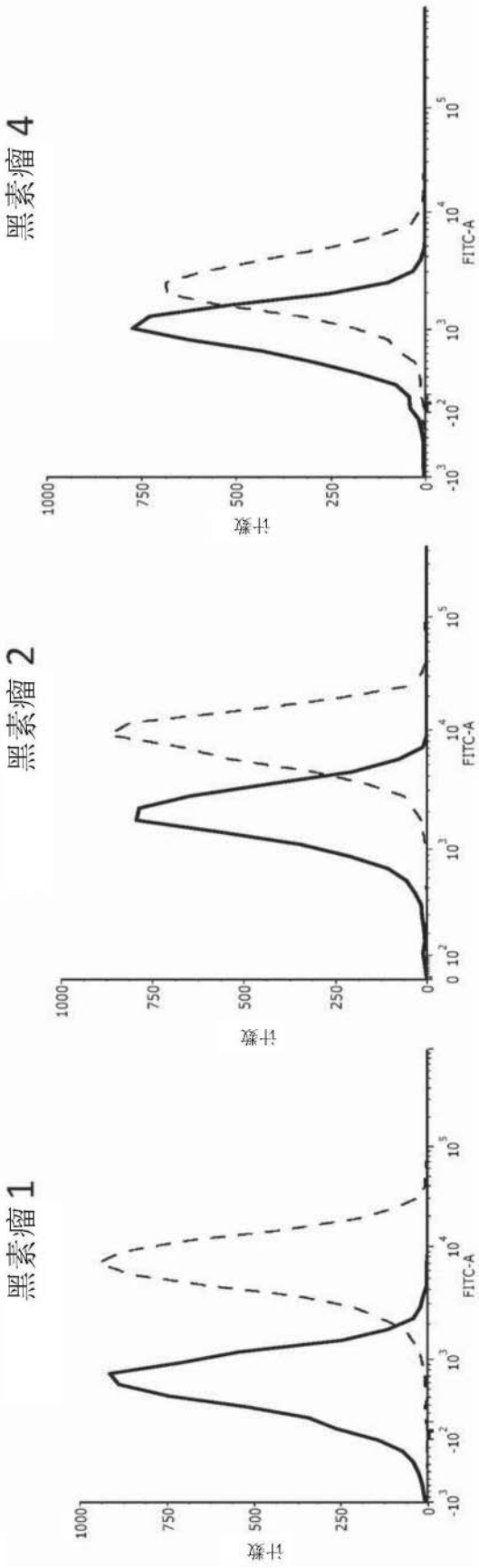


图5C

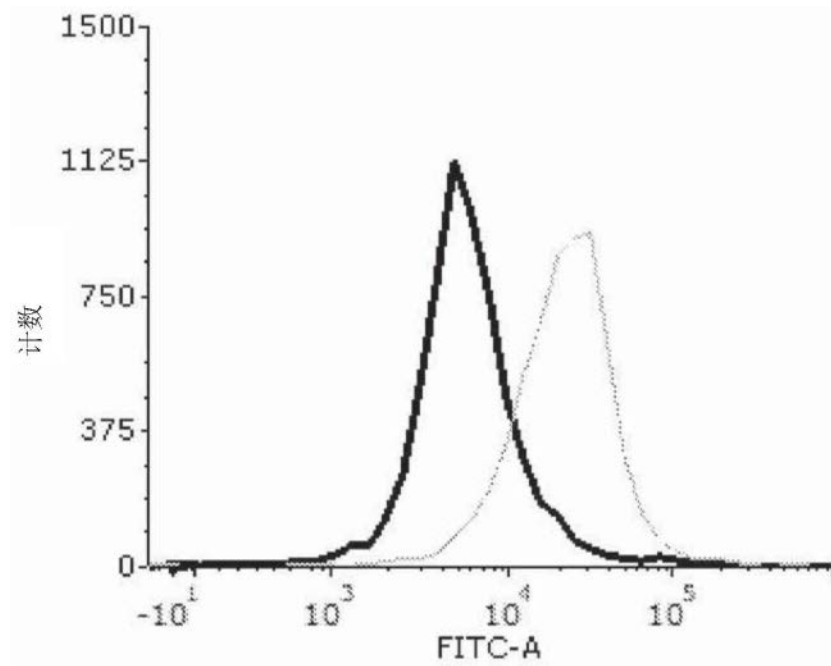


图5D

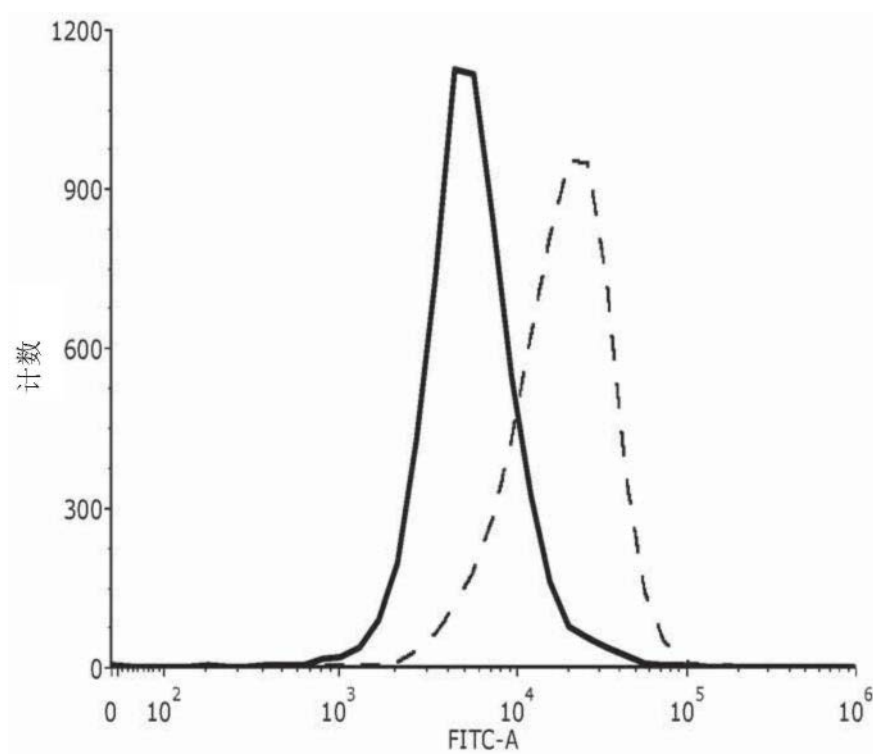


图5E

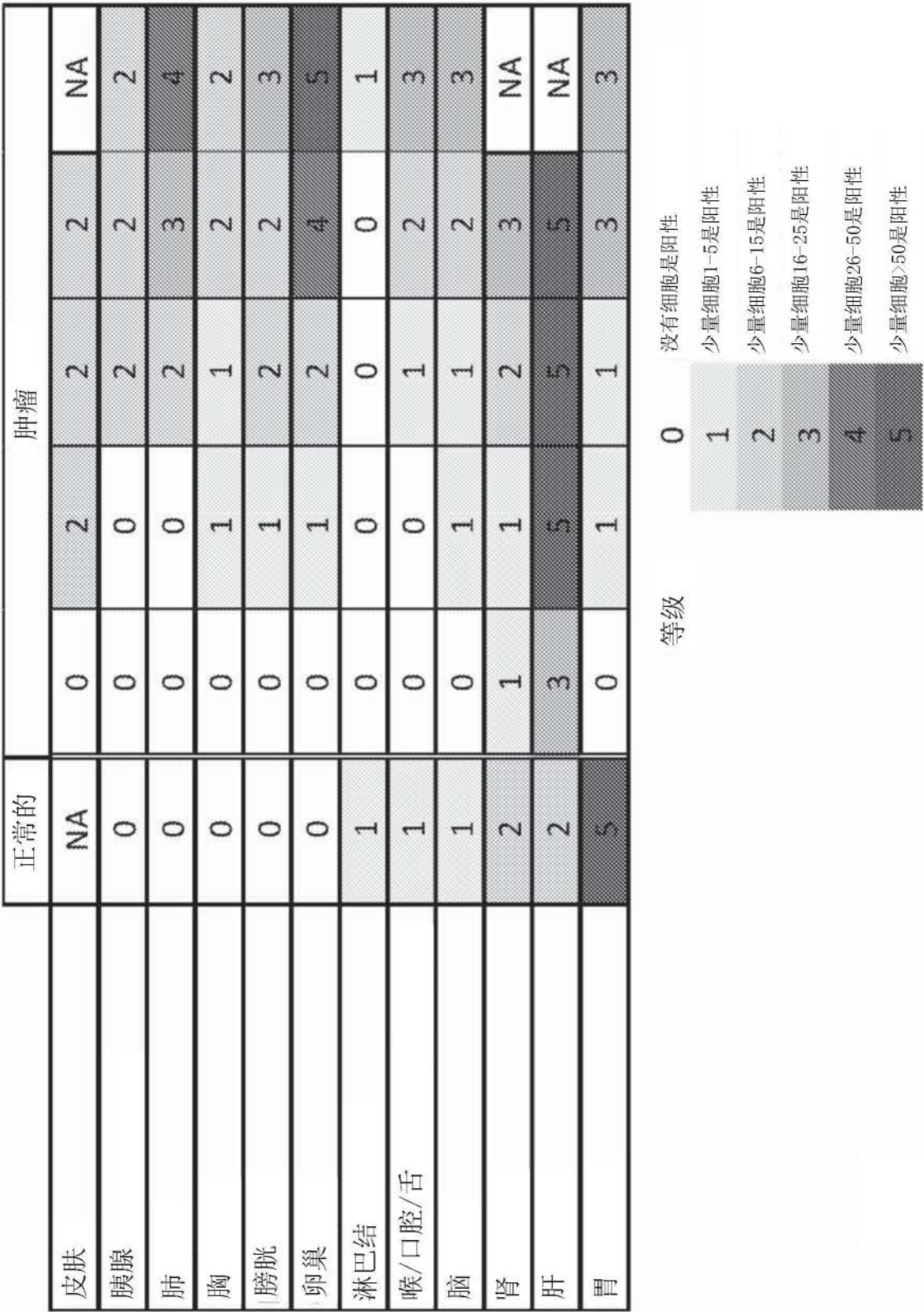


图5F

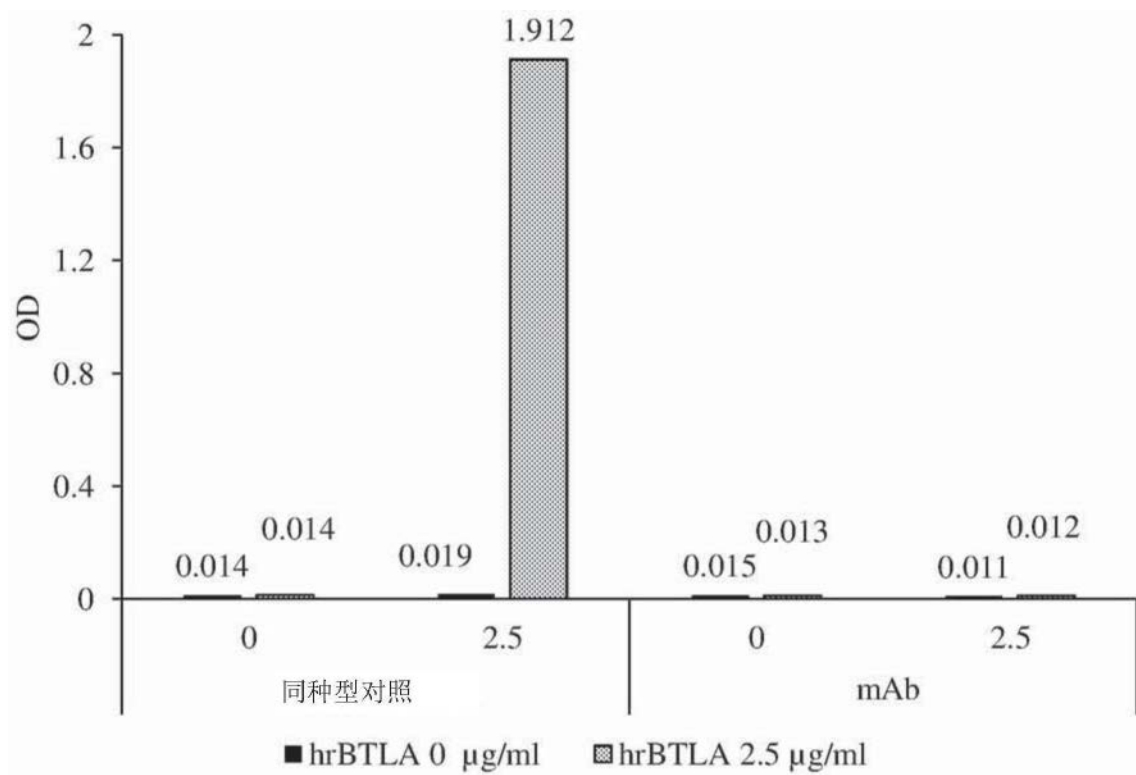


图6A

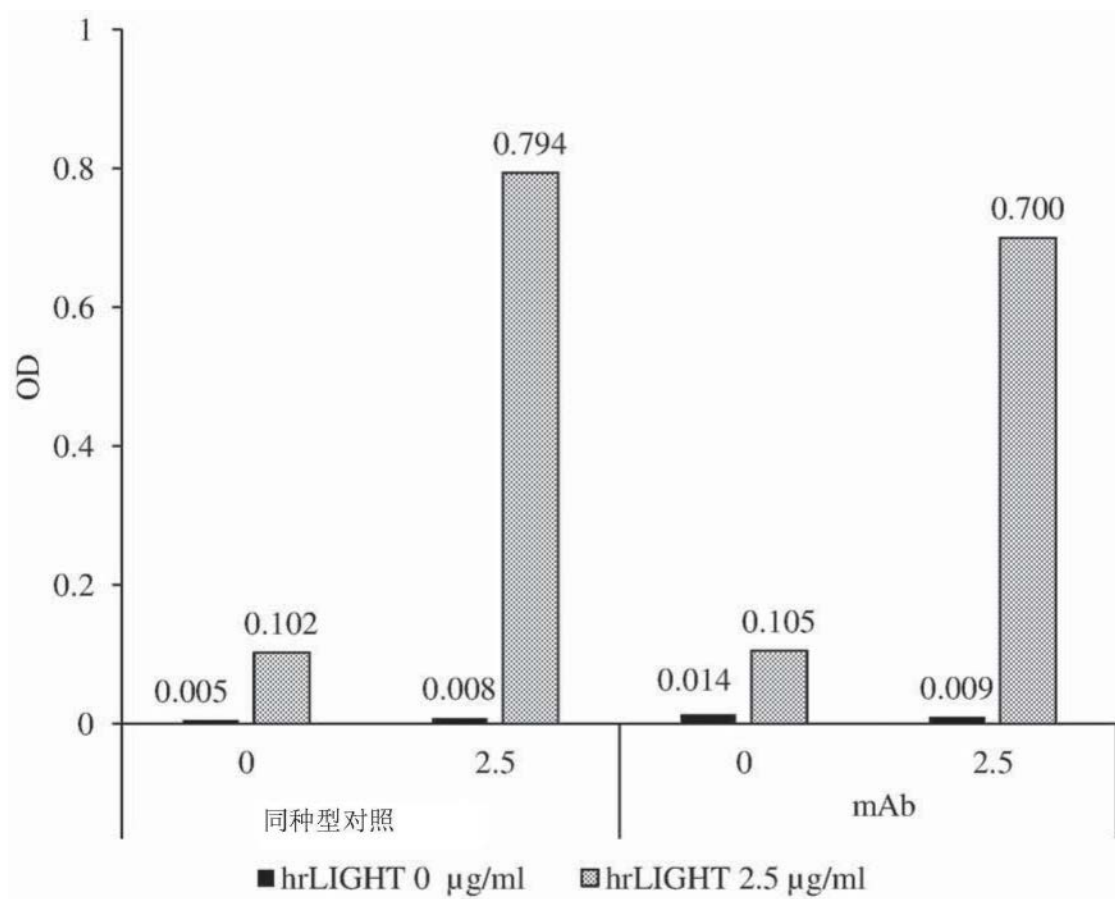


图6B

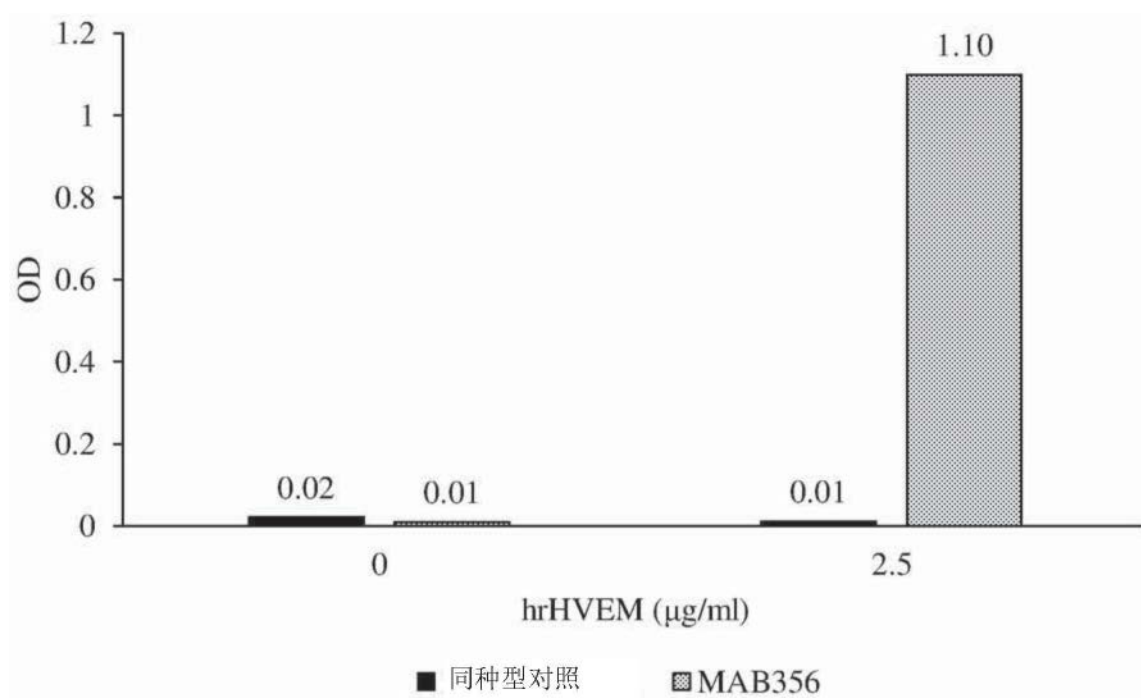


图6C

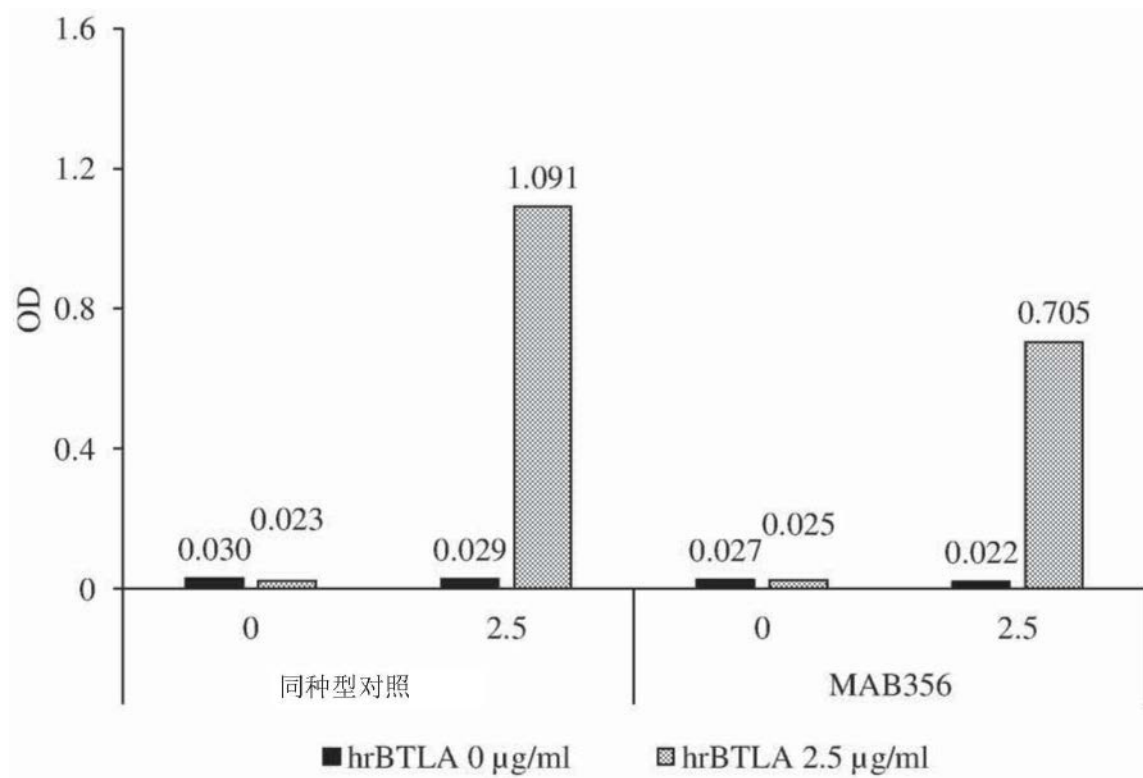


图6D

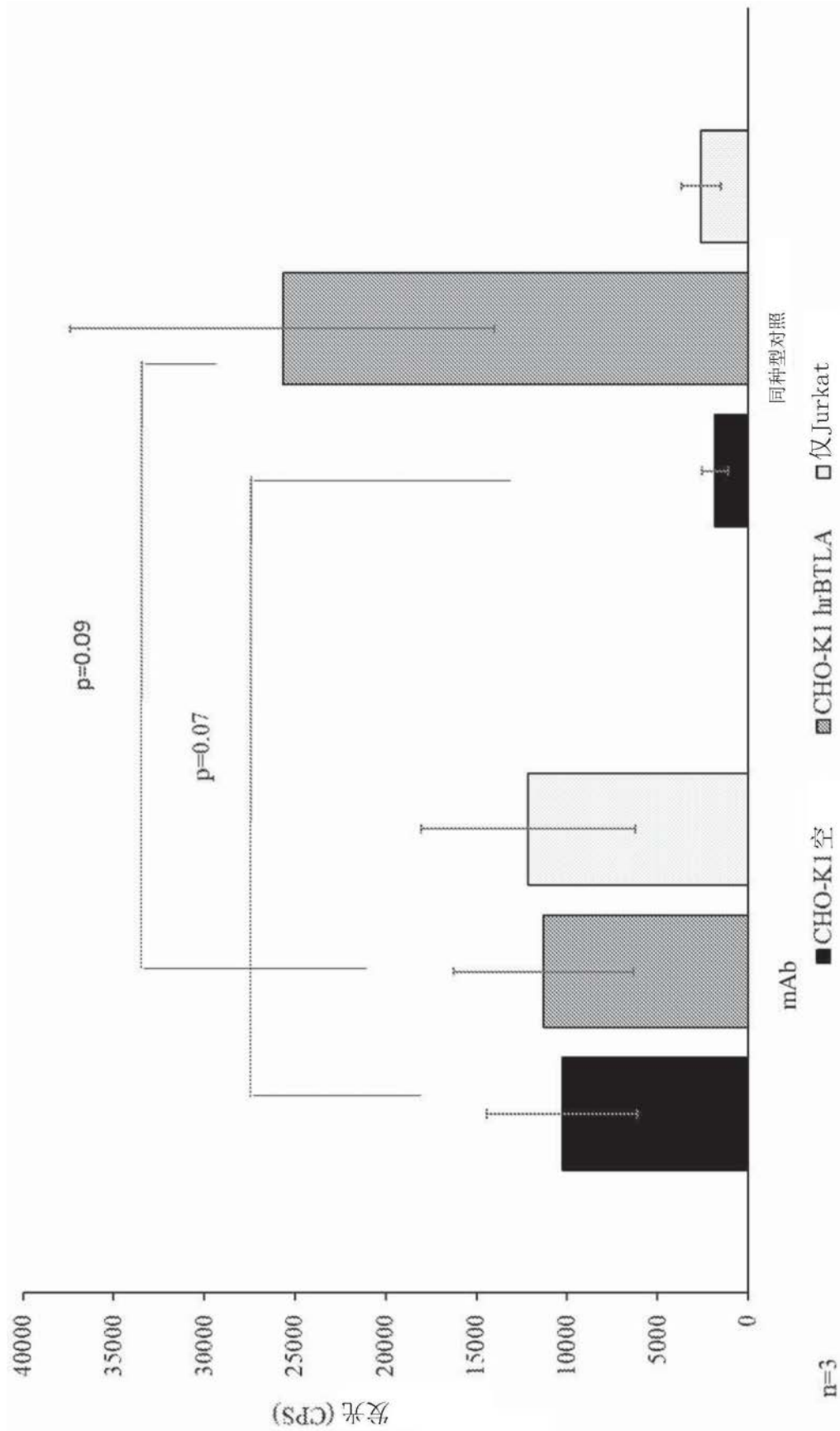


图7

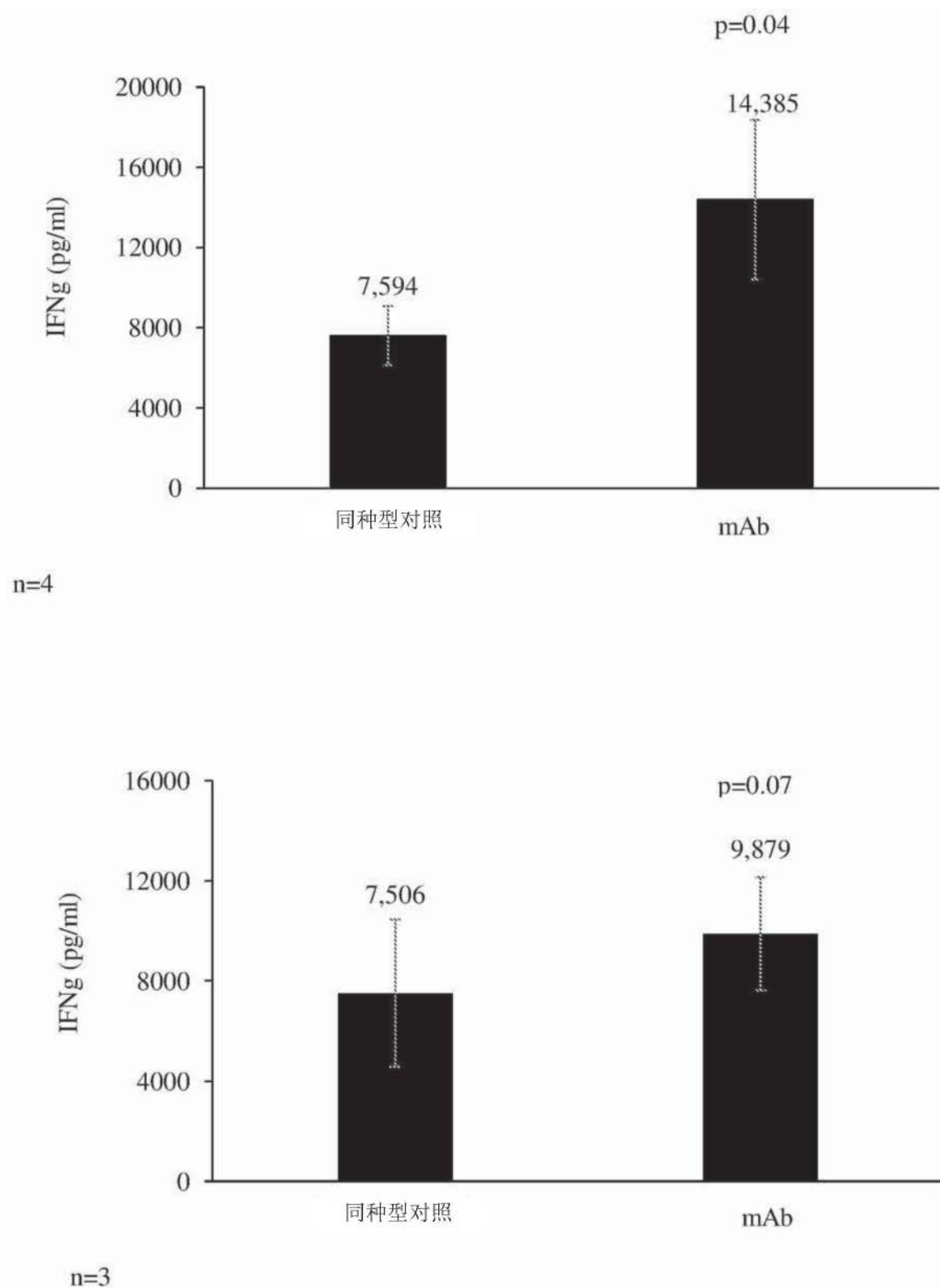


图8

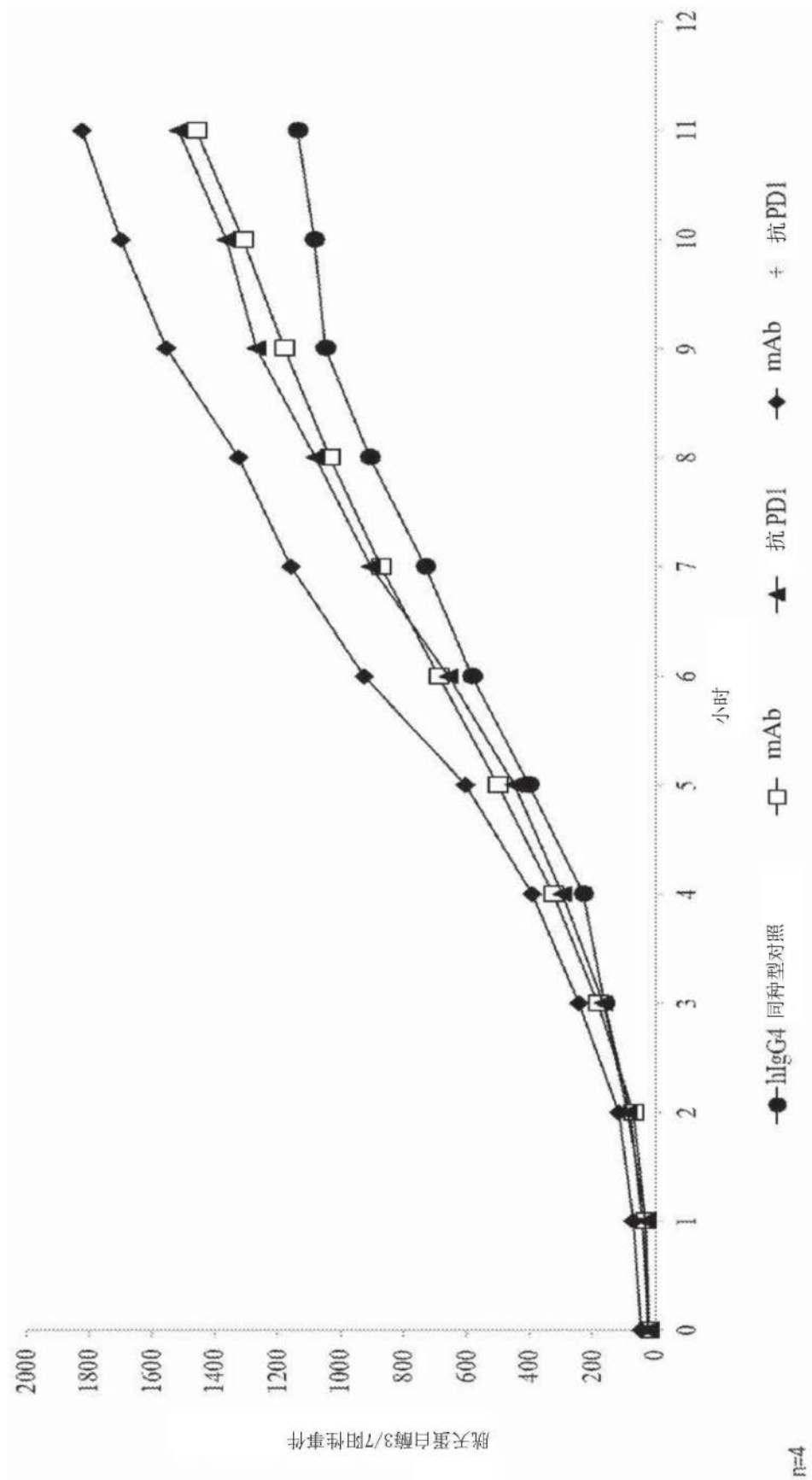


图9A

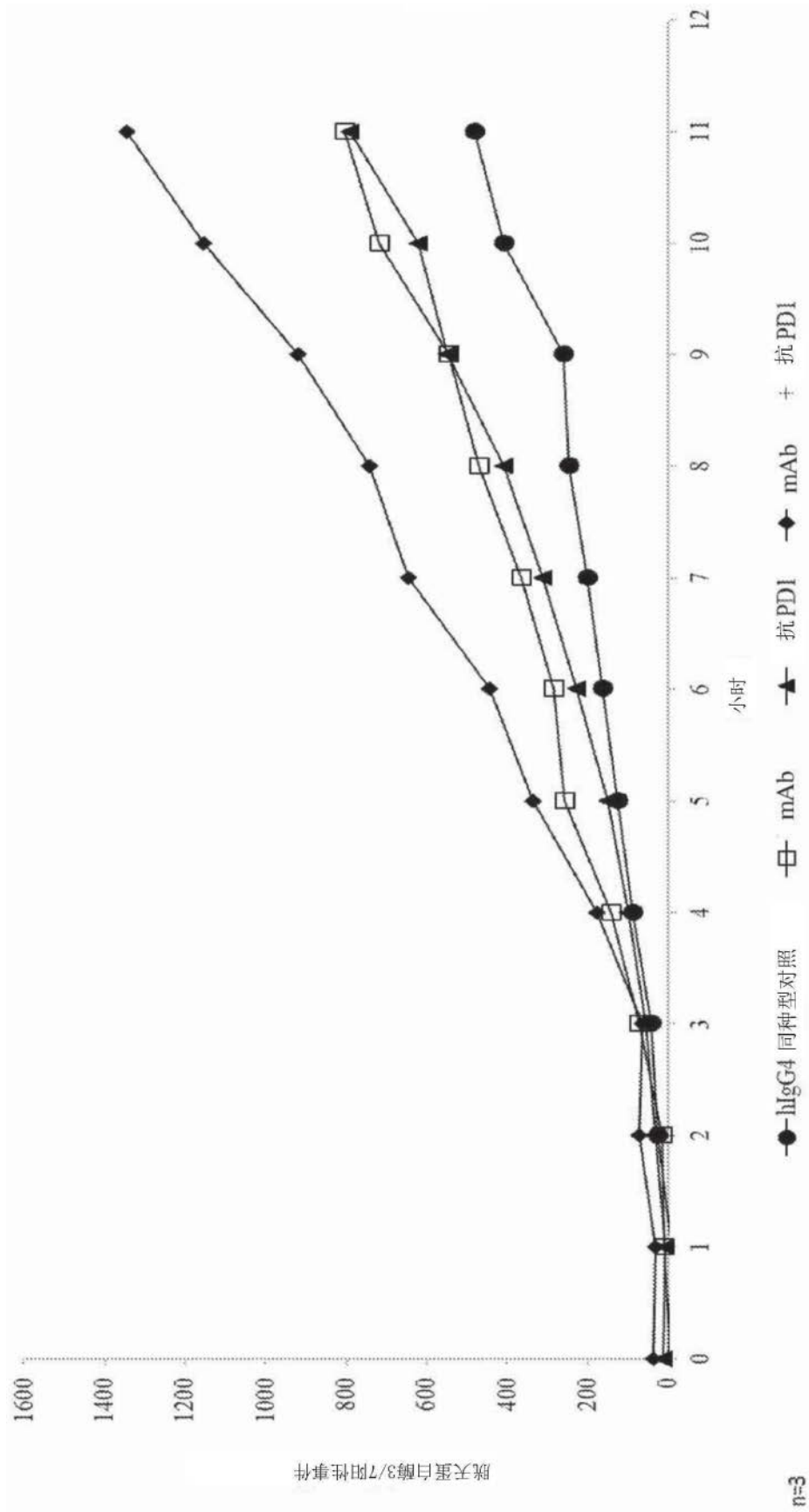


图9B

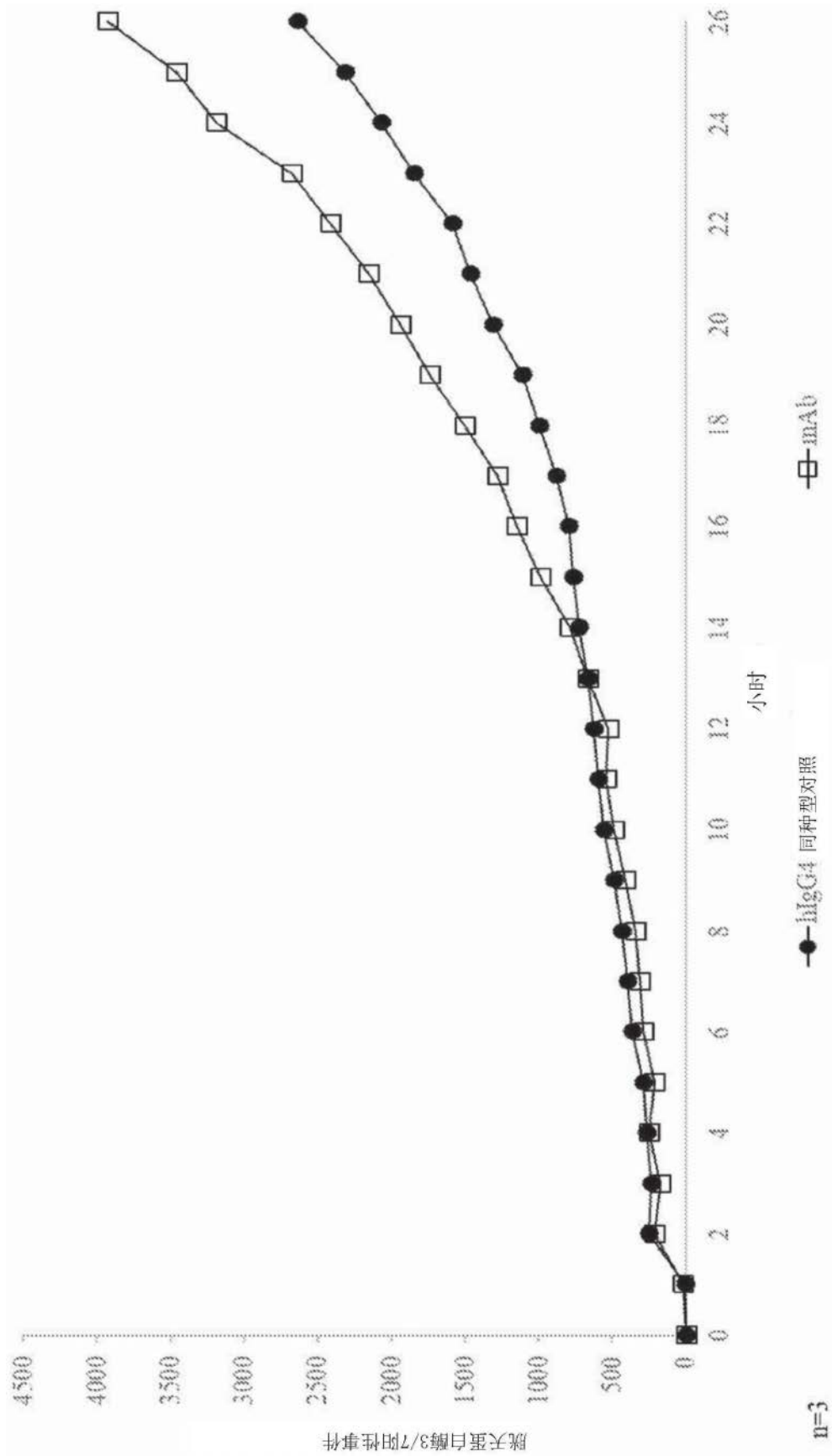


图9C

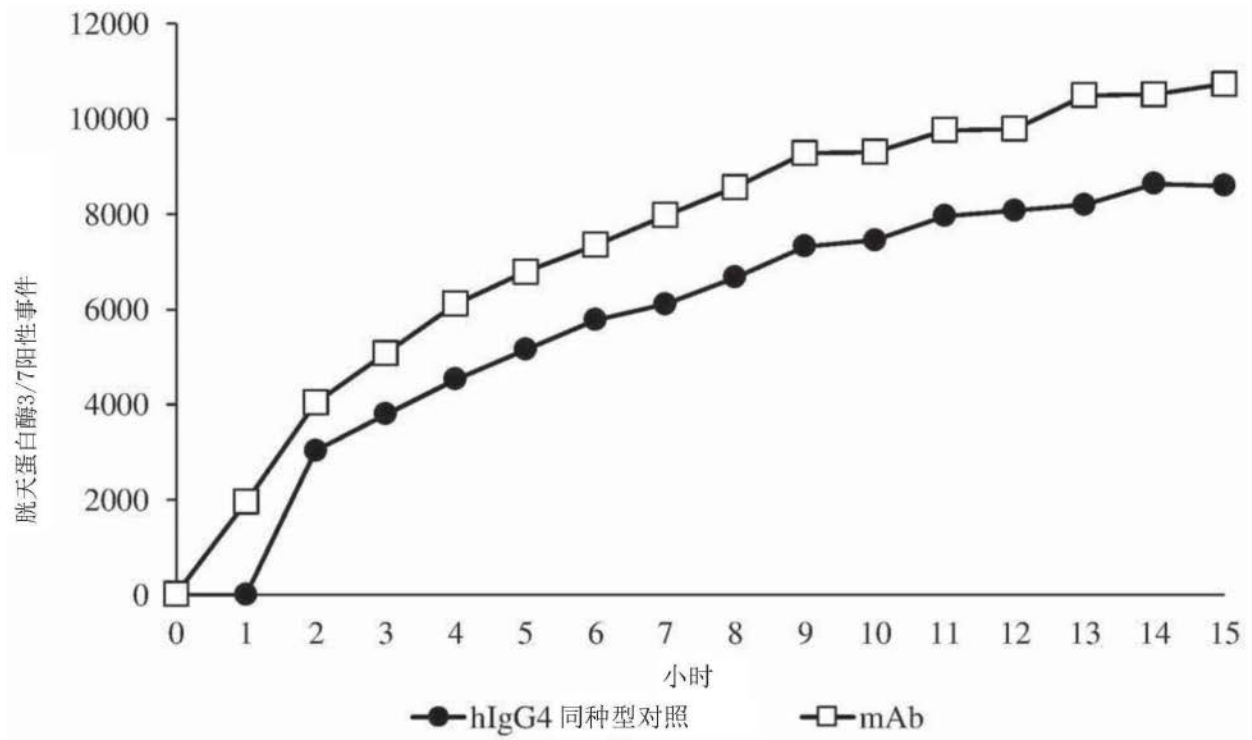


图9D

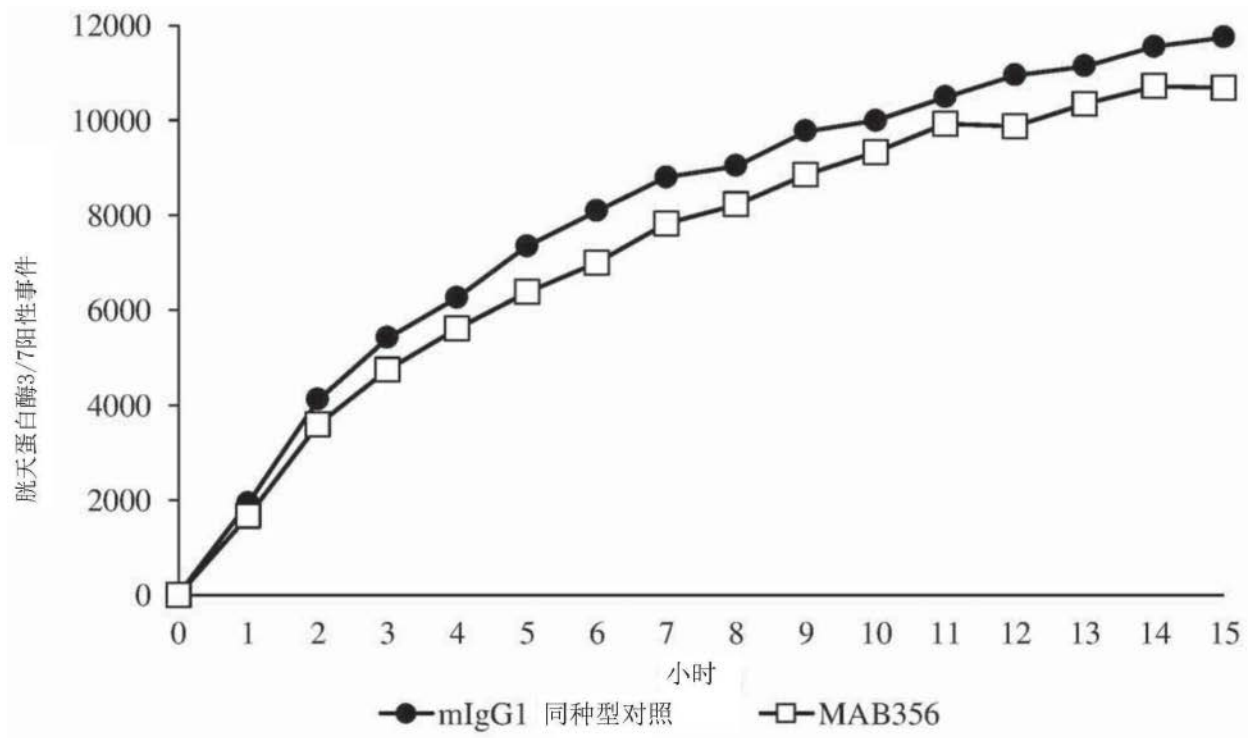


图9E

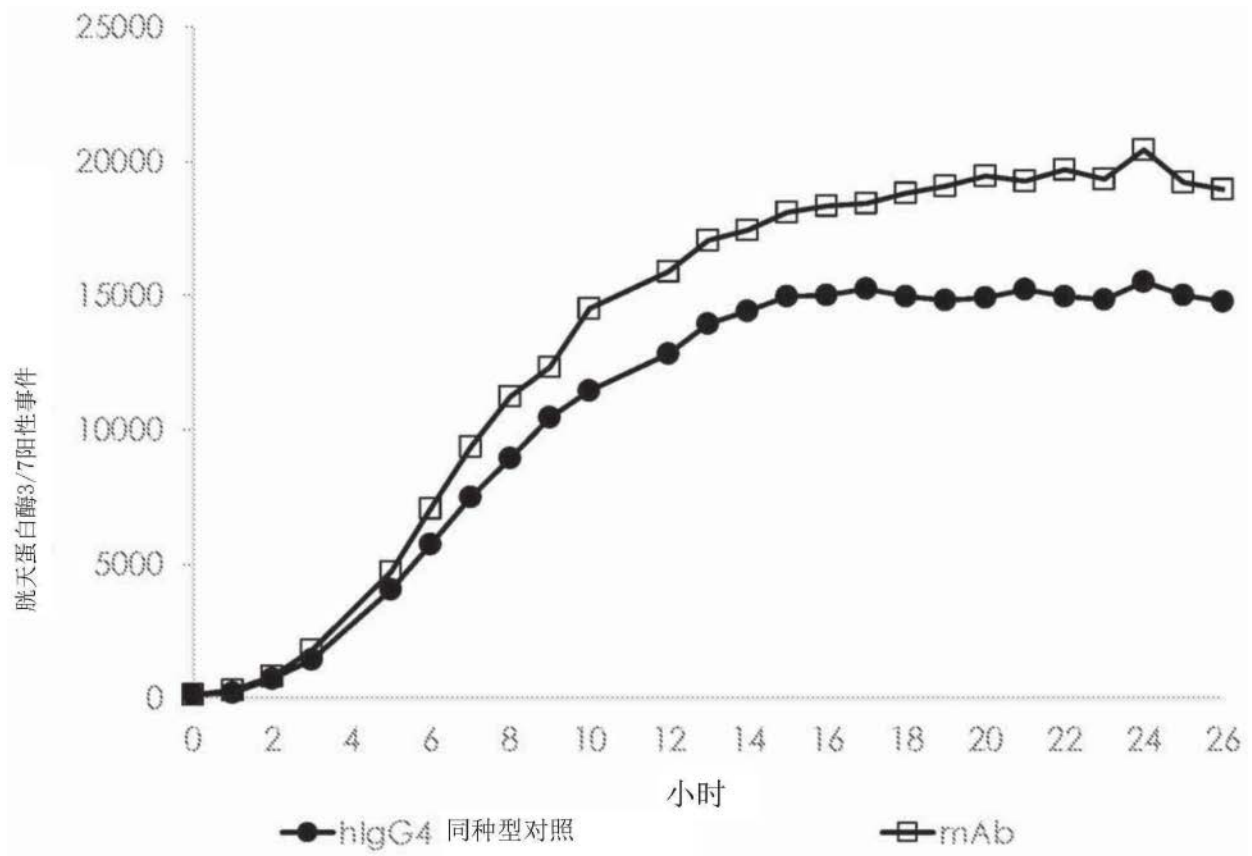


图10A

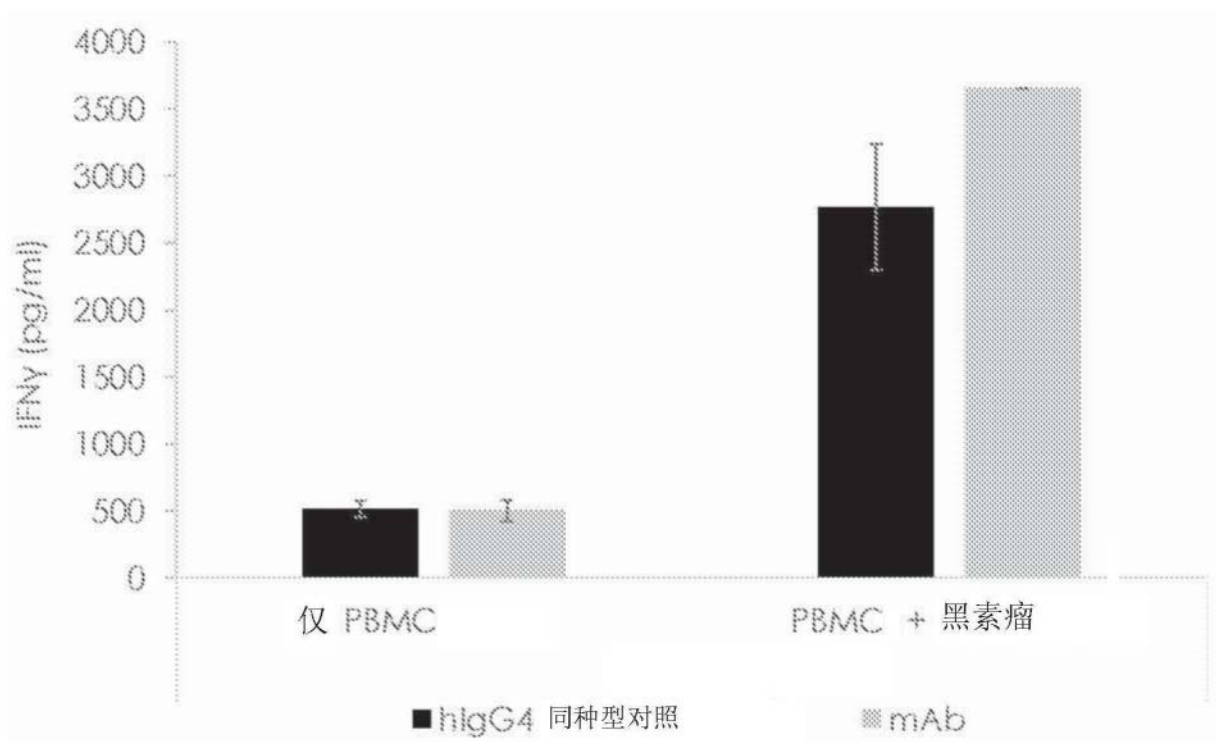


图10B

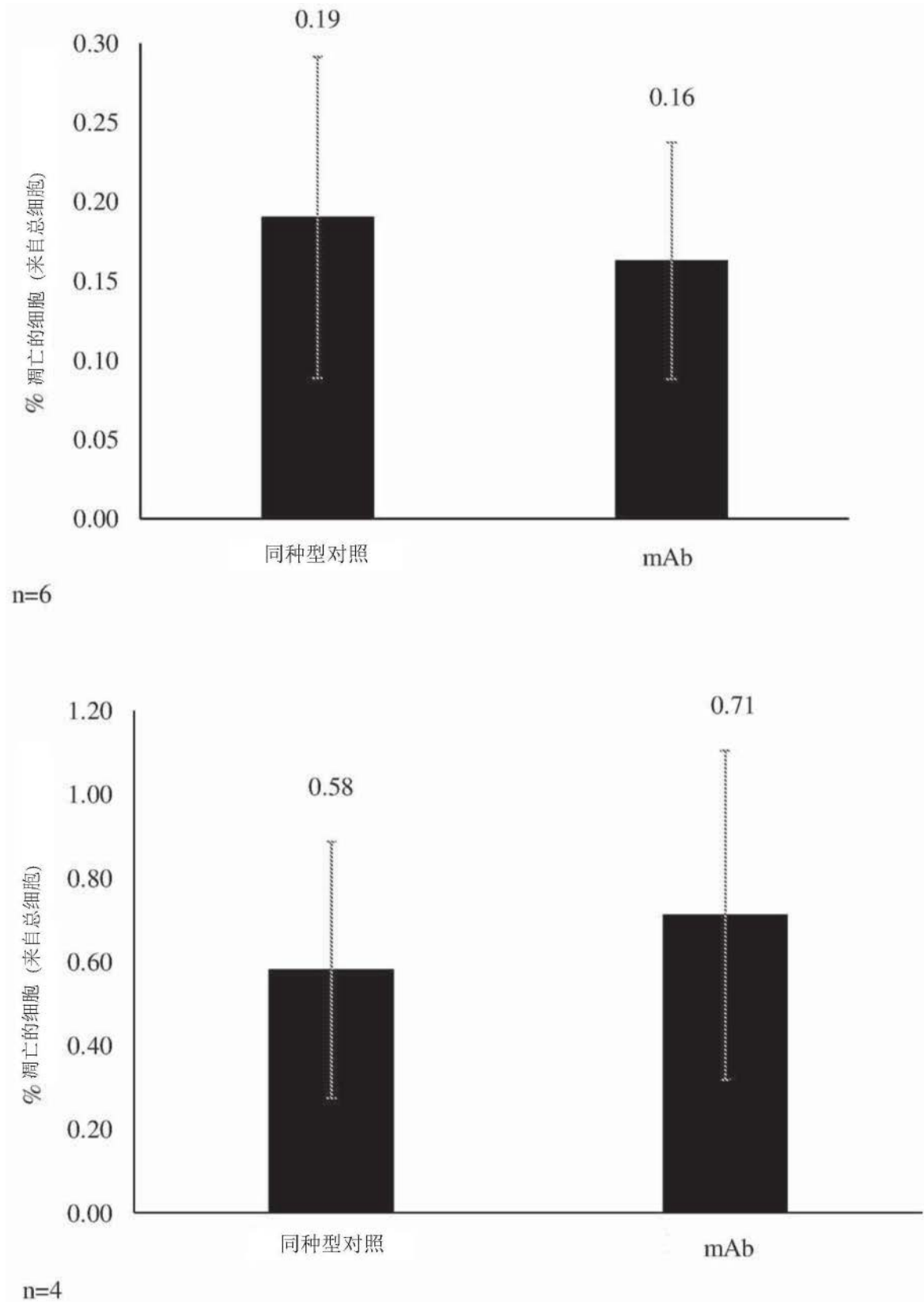


图11

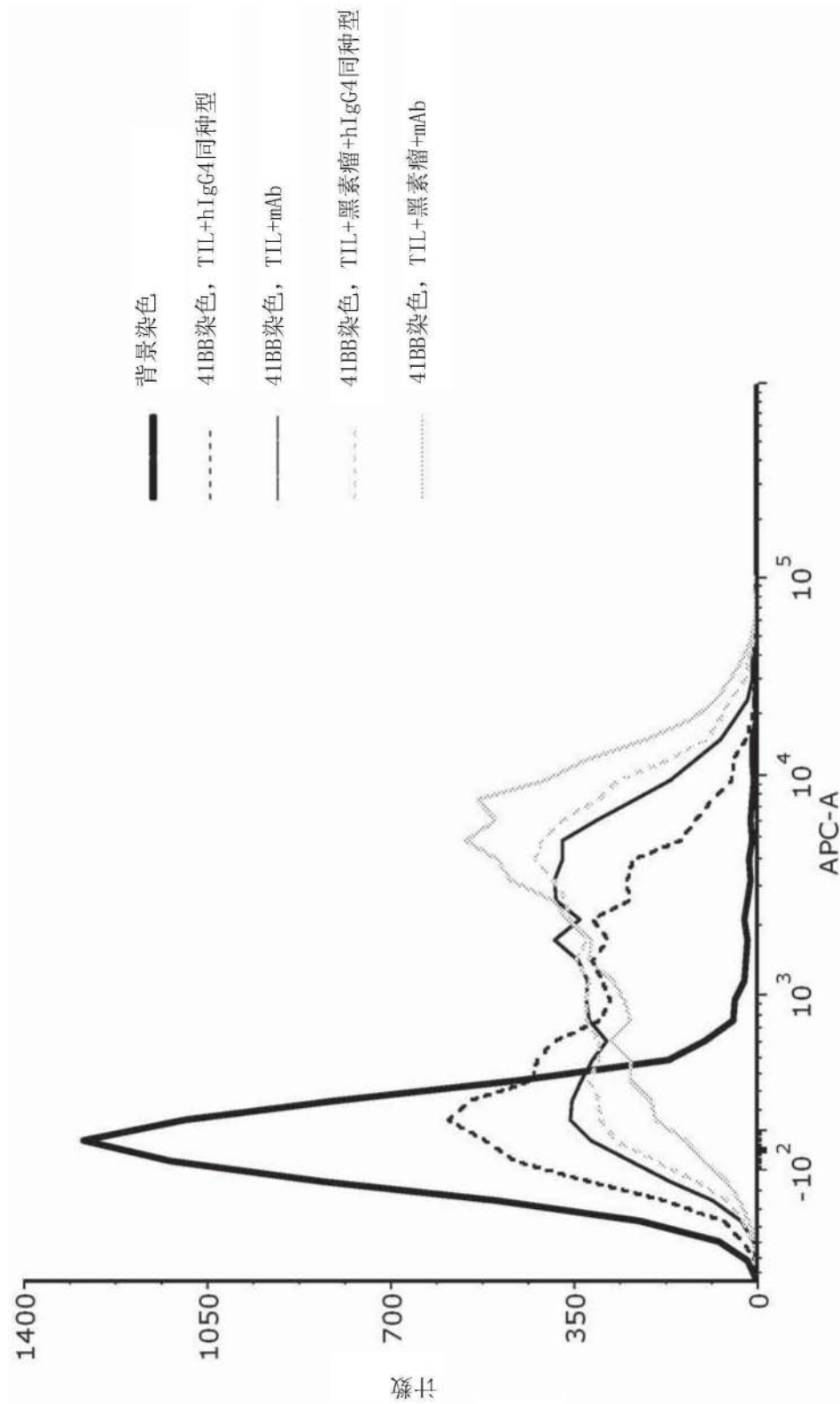


图12A

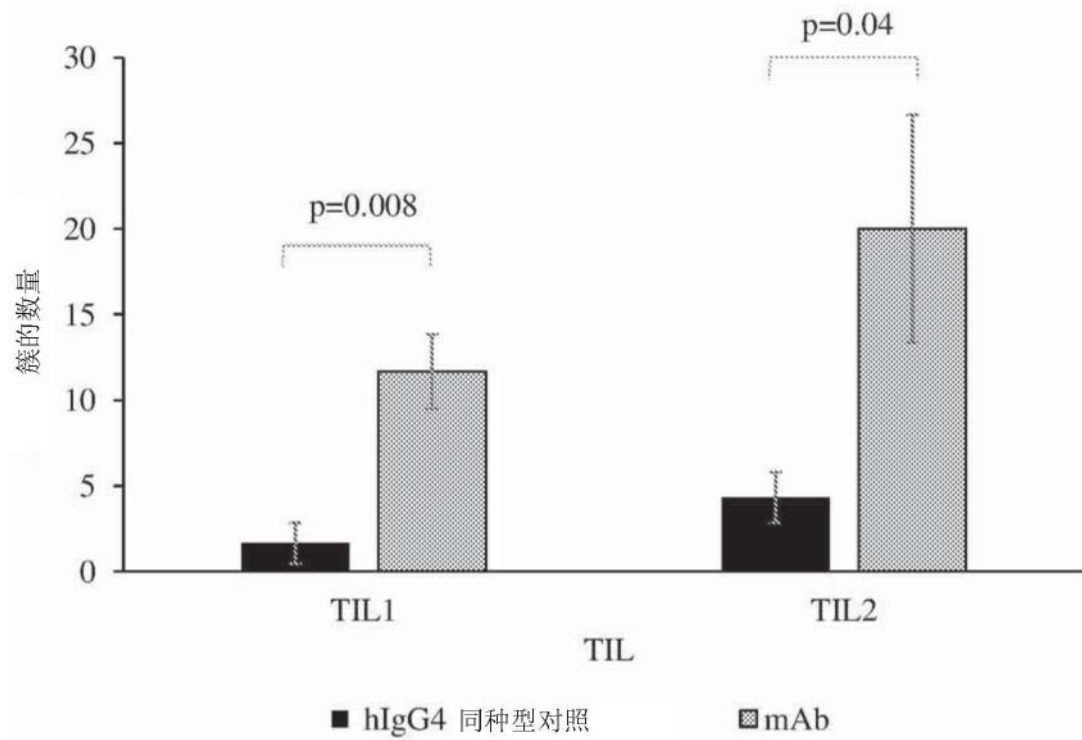


图12B

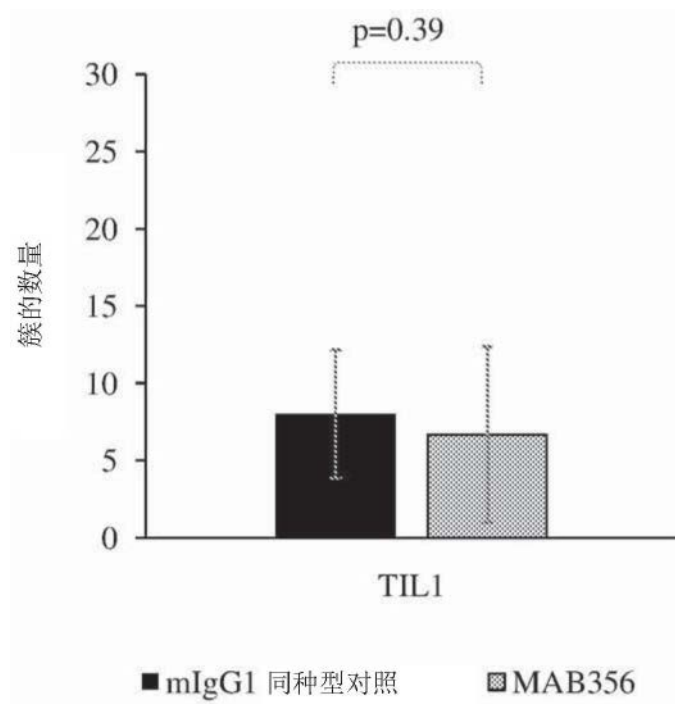


图12C

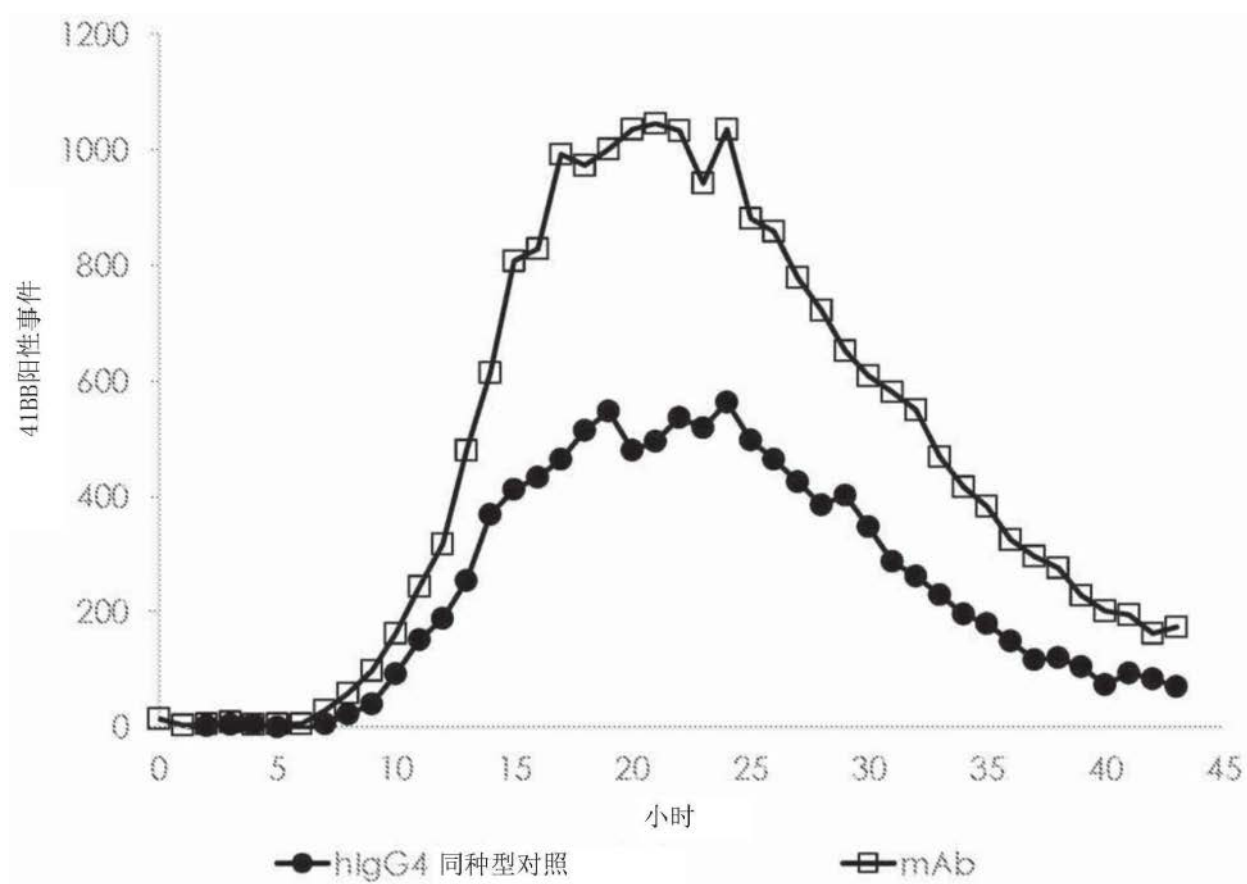


图12D

条件	最终样品浓度 (μ g/ml)	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF- α
抗 4CB1	100	7.4	134.7	10.0	8.0	2.8
	10	7.2	74.6	6.6	6.9	2.3
	1	6.2	68.5	6.9	6.5	1.9
	0.1	5.5	60.4	8.2	5.9	2.0
Erbitux®	100	7.3	103.5	8.9	7.3	2.6
Lemtrada®	10	72.6	616.6	9.9	38.1	32.0

图13

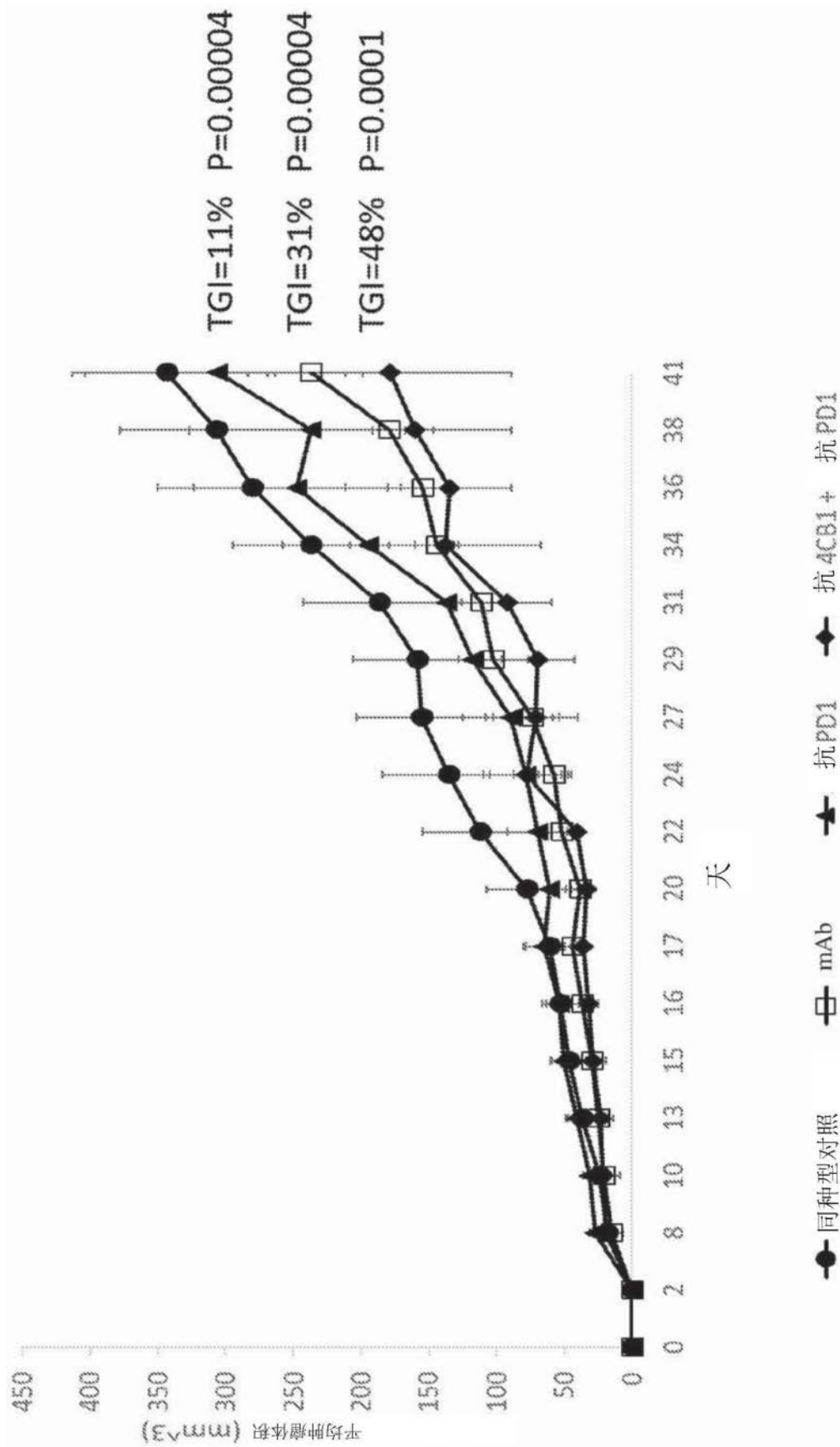


图14