



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298219 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180021502.0

(22) 申请日 2021.01.21

(30) 优先权数据

272194 2020.01.22 IL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2021/050064 2021.01.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/149053 EN 2021.07.29

(71) 申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特市

(72) 发明人 罗尼·大汉 冉·所罗门

(74) 专利代理机构 深圳紫藤知识产权代理有限公司 44570

专利代理师 吕姝娟

(51) Int.Cl.

G07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页

序列表32页 附图37页

(54) 发明名称

多特异性抗体在治疗数个疾病方面的用途

(57) 摘要

提供了一种多特异性抗体。所述抗体包含一第一部分、一第二部分以及一第三部分，所述第一部分结合并激活CD40，所述第二部分特异性结合树突状细胞，所述第三部分包含所述多特异性抗体的一修饰Fc区域，用于增强与FcγRII结合的特异性及亲和力以及其用途。

1. 一种多特异性抗体,其特征在于,所述多特异性抗体包含一第一部分、一第二部分以及一第三部分,所述第一部分结合并激活CD40,所述第二部分特异性结合一树突状细胞,所述第三部分包含所述多特异性抗体的一修饰的Fc区域,用于增强与FcγRIIb结合的特异性及亲和力。

2. 如权利要求1所述的多特异性抗体,其特征在于,所述多特异性抗体是一三功能抗体。

3. 如权利要求1至2中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述第二部分结合一树突状细胞标记,所述树突状细胞标记选自自由CD11c、CD11b、DEC-205、BDCA-1、CD8、CD8α、CD103及MHCII型、CD141、FLT3、CD13、CD1c、Clec9a、PD-L1及XCR1所组成的群组,所述MHC II型例如为HLA-DR。

4. 如权利要求1至2中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述第二部分结合CD11c。

5. 如权利要求1至2中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述第二部分结合DEC-205。

6. 如权利要求1至2中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述第二部分结合Clec9a。

7. 如权利要求1至2中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述第二部分结合XCR1。

8. 如权利要求1至5中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述多特异性抗体包含一第一部分,所述第一部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号19至21所述的数个互补确定区域,并且在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号22至24所述的数个互补确定区域。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述修饰的Fc区包含如序列编号2所示的数个突变。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,包含桦-进入-柏的数个突变。

11. 如权利要求10所述的多特异性抗体,其特征在于,所述数个突变位于包含Y349C/T366S/L368A/Y407V的所述双特异性抗体的一第一抗体的一CH3结构域中,以及位于包含S354C/T366W的所述多特异性抗体的一第二抗体的一CH3结构域中。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的多特异性抗体,其特征在于,所述多特异性抗体包含序列编号5及6与序列编号37及38;序列编号39及40;序列编号15及16;或序列编号17及18中的任一者。

13. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含如权利要求1至11中任一项所述的多特异性抗体。

14. 一种核酸序列,其特征在于,所述核酸序列编码如权利要求1至11中任一项所述的多特异性抗体的一重链及/或一轻链。

15. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含如权利要求14所述的核酸。

16. 一种细胞,其特征在于,所述细胞以如权利要求15所述的表达载体进行转化。

17. 一种制备一多特异性抗体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

- (a) 在允许表达所述多特异性抗体的数个条件下培养如权利要求16所述的细胞;及
- (b) 从所述细胞中分离出所述多特异性抗体。

18. 一种在有需要的一受试者中刺激一免疫反应的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的如权利要求13所述的药物组合物,从而刺激所述受试者中的所述免疫反应。

19. 如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述受试者具有一肿瘤以及针对所述肿瘤的一免疫反应被刺激。

20. 如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述受试者具有一慢性病毒感染以及针对所述病毒感染的一免疫反应被刺激。

21. 一种治疗在有需要的一受试者中的癌症的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的如权利要求13所述的药物组合物,从而治疗所述受试者中的癌症。

22. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述癌症选自由膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠道癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症所组成的群组。

23. 一种治疗在有需要的一受试者中的一慢性病毒感染的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的如权利要求13所述的药物组合物,从而治疗所述受试者中的所述慢性病毒感染。

24. 如权利要求13所述的药物组合物的用途,用于治疗癌症及/或一慢性病毒感染。

25. 如权利要求23至24中任一项所述的方法的用途,其特征在于,还包括一检查点调制剂的用途或施用。

多特异性抗体在治疗数个疾病方面的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请主张在2020年1月22日提交的以色列专利申请案第272194号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列列表声明

[0004] ASCII文件(标题为85611 Sequence Listing.txt)创建于2021年1月21日,包含57172字节,与本申请同时提交,通过引用并入本文。

[0005] 技术领域与背景技术

[0006] 本发明在其一些实施例中涉及用于治疗数个疾病的数个多特异性抗体。

[0007] 通过阻断数个抑制性检查点分子(例如PD-1)或激活数个刺激性分子(例如CD40)(1)(2),可以达成免疫系统的激活以清除肿瘤细胞。当肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族的成员CD40的天然配体CD40L交联时,其刺激数个免疫反应,所述数个免疫反应包括产生数个细胞毒性T细胞(3)(4)。模拟CD40L的激动性抗CD40抗体(Agonistic anti-CD40 Abs)被认为是交联CD40的有效方法,从而促进数个树突状细胞的成熟及随后产生的数个肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞。从机制上而言,CD40激活是T细胞启动中的一个近端事件,因此,数个抗CD40抗体可能在将冷肿瘤转化为热肿瘤并产生有效的T细胞免疫中至关重要(3)。事实上,激动性抗CD40抗体的抗肿瘤活性已被证明在许多不同肿瘤的动物模型中是有效的(5)。

[0008] 一些先前的出版物表示出,抑制性Fc γ RIIB的参与是靶向小鼠CD40的激动性抗体以及TNFR家族的其他成员的体内抗肿瘤活性的一绝对要求。这是由于在邻近细胞上表达的Fc γ RIIB对于CD40抗体的高阶交联。这种交联增强了CD40在细胞表面上的聚集,并导致了增强的CD40信号(6)(7)。然而,最近几项研究对人体抗体具有类似要求提出了质疑。这些研究的局限性在于使用体外试验的实验系统。或者,在野生型小鼠中评估这些人类抗体,从而限制其能力去模拟人类Fc γ R的复杂及独特的细胞分布、结合亲和力及功能性。CP-870893是一种正在进行临床评估的人类抗CD40抗体,其是由人类IgG2亚型上的抗CD40克隆2141组成。其是一种有效的激动性抗人类CD40抗体,但令人惊讶的是,在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)或其他实体瘤患者中仅显示出适度的抗肿瘤活性(8)(9)。研究发现,CP-870893的适度体内活性可归因于其Fc结构域为人类IgG2亚型,并且仅与人类Fc γ RIIB弱相互作用(10)。特别重要的是,观察到激动性抗CD40抗体的抗肿瘤活性可以通过靶向Fc γ RIIB的Fc工程而增强。在先前劳动中,在缺乏这些受体的小鼠同源物的背景下,在完全人源化的CD40及Fc γ R等基因小鼠模型上测试2141的许多Fc工程变体,并选择“V11”Fc变体作为最佳临床候选者,所述“V11”Fc变体选择性地增强Fc γ RIIB结合。与2141的原始IgG2亚类相比,2141的经Fc工程的V11版本在体内具有显著增强的免疫刺激活性,在几种类型的小鼠肿瘤模型中转化为优越的抗肿瘤效力(10)。当以各自的最大耐受剂量(maximum tolerated dose, MTD)用于患者时,可以提高治疗性抗肿瘤免疫达成,然而与亲代IgG2版本相比,Fc工程2141-V11在人类中的任何亚类在用于各自的MTD时可能永远不会达到最佳剂量。在为2141抗体的Fc工程版本的临床研究做准备时,优化了施用及施

用方案,以产生最小的毒性及最佳的抗肿瘤活性。与亲代2141抗体及全身抗体施用相比,经口施用的Fc工程2141产生了这样的最大治疗窗口(11)。基于这些研究,开发了2141的第二代Fc工程版本(Fc工程“F11”),并通过实体瘤患者的肿瘤内注射进行施用(临床试验政府标识符:NCT04059588)。虽然对一些患者有希望,但肿瘤内施用并不适用于所有患者,可能仅限于局部或转移性皮肤实体瘤患者及可接受放射导向治疗的肿瘤患者。

[0009] 其他背景技术:

[0010] US.20160376371;

[0011] US.20170253659;

[0012] W02017004016;

[0013] W02018213747;

[0014] Mazor、Yariv等人。“使用新型单价双特异性IgG设计提高靶细胞特异性(Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design)”MABs,7卷,2号,Taylor及Francis,2015年。

发明内容

[0015] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种多特异性抗体,其包含一第一部分及一第二部分,所述第一部分结合并激活CD40,所述第二部分特异性结合树突状细胞(dendritic cell,DC)。

[0016] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体是双特异性抗体。

[0017] 根据本发明的一些实施例,第二部分结合选自CD11c、CD11b、DEC-205、BDCA-1、CD8、CD8 α 、CD103及MHC II型(例如,HLA-DR)、CD141、FLT3、CD13、CD1c、Clec9a及XCR1所组成的群组。

[0018] 根据本发明的一些实施例,第二部分结合CD11c。

[0019] 根据本发明的一些实施例,第二部分结合DEC-205。

[0020] 根据本发明的一些实施例,第二部分结合Clec9a。

[0021] 根据本发明的一些实施例,第二部分结合XCR1。

[0022] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体包含一第一部分,所述第一部分包含具有如序列编号19至21所述的一N到C取向的一重链中的数个互补决定区,;以及具有如序列编号22至24所述的一N到C方向的一轻链中的数个互补决定区。

[0023] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体是三功能抗体。

[0024] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体包含一第三部分,所述第三部分包含多特异性抗体的一修饰的Fc区域,用于增强与Fc γ R2b结合的特异性及亲和力。

[0025] 根据本发明的一些实施例,修饰的Fc区域包含如序列编号2所示的突变。

[0026] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体包括杵-进入-孔(knobs-into-holes)的突变。

[0027] 根据本发明的一些实施例,所述数个突变位于包含Y349C/T366S/L368A/Y407V的所述双特异性抗体的一第一抗体的一CH3结构域中,以及位于包含S354C/T366W的所述多特异性抗体的一第二抗体的一CH3结构域中。

[0028] 根据本发明的一些实施例,多特异性抗体包含序列编号5及6与序列编号37及38;

序列编号39及40;序列编号15及16;或序列编号17及18中的任一者。

[0029] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含所述多特异性抗体。

[0030] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种核酸序列,所述核酸序列编码所述多特异性抗体的一重链及/或一轻链。

[0031] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种表达载体,所述表达载体包含所述核酸序列。

[0032] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种细胞,所述细胞以所述表达载体进行转化。

[0033] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种制备一多特异性抗体的方法,包括以下步骤:

[0034] (a) 在允许表达所述多特异性抗体的数个条件下培养所述细胞;及

[0035] (b) 从所述细胞中分离出所述多特异性抗体。

[0036] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了有需要的一受试者中刺激一免疫反应的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的药物组合物,从而刺激所述受试者中的所述免疫反应。

[0037] 根据本发明的一些实施例,所述受试者具有一肿瘤以及针对所述肿瘤的一免疫反应被刺激。

[0038] 根据本发明的一些实施例,所述受试者具有一慢性病毒感染以及针对所述病毒感染的一免疫反应被刺激。

[0039] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种治疗在有需要的一受试者中的癌症的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的药物组合物,从而治疗所述受试者中的癌症。

[0040] 根据本发明的一些实施例,所述癌症选自由膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠道癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症所组成的群组。

[0041] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种治疗在有需要的一受试者中的一慢性病毒感染的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用一治疗有效量的药物组合物,从而治疗所述受试者中的所述慢性病毒感染

[0042] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了药物组合物的用途,用于治疗癌症及/或一慢性病毒感染。

[0043] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术及/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管在本发明实施例的实践或测试中可以使用与本文所述方法及材料类似或等效的方法及材料,但示例性方法及/或材料描述如下。如有冲突,以专利说明书(包括定义)为准。此外,所述材料、方法及示例仅为说明性的,不一定是限制性的。

附图说明

[0044] 本文仅以示例的方式,参考附图描述本发明的一些实施例。现在具体参考附图,需要强调的是,所示的细节是作为示例并用于对本发明实施例的说明性讨论。在这方面,利用附图进行的描述使本领域技术人员清楚地知道如何实施本发明的实施例。

[0045] 在图式中:

[0046] 图1A显示出根据本发明的一些实施例在多特异性抗体配置中使用的抗体(antibodie, Ab)的可变结构域序列。N418及HD-109抗体的可变重链(VH)及可变轻链(VL)结构域序列通过cDNA末端扩增法(“锚定”PCR)从各自的杂交瘤RNA中测序。2141的序列;之前已从所述抗体的专利申请案中确定。CDR序列带有下划线。序列列表标识为2141的序列编号78及38, N418的序列编号7及8, HD109的序列编号39及40, 10B4的序列编号15及16。

[0047] 图1B显示出根据本发明的一些实施例可以使用的抗体或其片段的序列。

[0048] 图2显示出为生产单特异性及双特异性抗体而生成的结构。如图所示,从杂交瘤的cDNA(N418及HD-109)或从头合成(2141)中扩增可变结构域,并在表达载体内与IgG1恒定结构域在框架中克隆。VH,可变域重链(Variable domain Heavy chain);VL,可变域轻链(Variable domain Light chain);CH1-3,恒定结构域重链1-3(Constant domain Heavy chains 1-3);CL,恒定结构域轻链(Constant domain Light chain);KiH,杵-进入-柏的数个突变(knobs-into-holes mutations)。

[0049] 图3A至图3B显示出单特异性及双特异性抗体的SDS-PAGE及分析尺寸排除色谱图。(图3A)五种抗体的SDS-PAGE分析。非还原样品的同质带证实了N418及HD-109与2141抗体组装成一个异二聚体。样品的减少证实双特异性异二聚体由四条抗体链组成,其中两条抗体链来自每个伙伴抗体。(图3B)单特异性及双特异性抗体的分析尺寸排除色谱图,数字表示抗体的分子量。

[0050] 图4A至图4D显示出双特异性抗体的双重抗原结合特性。(图4A)与hCD40结合的ELISA。抗CD40(红色)单特异性抗体及抗CD40/CD11c(黑色)-CD40/DEC-205(蓝色)双特异性抗体与重组huCD40蛋白的标准结合ELISA滴定分析。抗CD40/CD11c-CD40/DEC-205双特异性抗体识别huCD40,类似于亲本单特异性抗CD40抗体。(图4B)与DEC-205或CD11c结合的ELISA。抗CD40(红色)-DEC-205或CD11c(黑色)单特异性抗体及抗CD40/DEC-205或CD40/CD11c(蓝色)双特异性抗体与重组DEC-205或CD11c蛋白的标准结合ELISA滴定分析。抗CD40/DEC-205或CD40/CD11c双特异性抗体及亲本单特异性抗DEC-205或CD11c抗体(而非单特异性抗CD40抗体)分别识别DEC-205或CD11c。(图4C)与DEC-205或CD11c及huCD40同时结合的ELISA。同时结合夹心ELISA滴定分析抗CD40(红色)-DEC-205或CD11c(黑色)单特异性抗体及抗CD40/DEC-205或CD40/CD11c(蓝色)双特异性抗体与重组DEC-205或CD11c及huCD40蛋白。只有抗CD40/DEC-205及CD40/CD11c双特异性抗体分别同时与这两种蛋白质结合。(图4D)使用CD40/CD11c(2141/N418)双特异性抗体及2141对人源化CD40/FcγR小鼠的脾细胞进行染色。与亲代CD40单抗相比,双特异性抗体优先与树突状细胞结合,并减少与B细胞的结合,这是通过CD19门控测量的。

[0051] 图5显示出用抗人类CD40双特异性抗体体外刺激树突状细胞。人类树突状细胞被CD40/DEC-205-双特异性抗体激活。通过上调调节与所示双特异性抗体培养的未成熟人类树突状细胞的激活来检测激活。通过上调调节不同表面活化标记物(显示CD86及CD54)来确定激

活。代表性数据来自于四个捐助者。

[0052] 图6A至图6B显示出,CD40/DCs-双特异性抗体活性需要Fc γ R介导的交联。(A)未成熟的人类树突状细胞与增加剂量的抗人类CD40/DEC-205或CD40/CD11c双特异性抗体的指示Fc变体一起培养。流式细胞术分析CD86及CD54激活标记物的上调。显示出四个捐助者中的一个的代表性数据。(B)在CD40/DCs双特异性抗体的指定Fc变体存在下,用OVA免疫的hCD40/Fc γ R小鼠血液中OVA特异性CD8⁺T细胞通过流式细胞术分析确定的T细胞激活。每个点代表一个单独的鼠标。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。 $*p\leq 0.05$, $**p\leq 0.01$ 。

[0053] 图7A至图7D显示出,通过使用双特异性抗体降低肝毒性和增加活性而改善的治疗窗。(图7A)在指定的抗CD40单克隆抗体或双特异性抗体存在下用OVA免疫的人源化CD40/Fc γ R小鼠血液中的OVA特异性CD8⁺T细胞通过流式细胞术分析确定的剂量依赖性T细胞激活测定。每个点代表一个单独的鼠标。(图7B)肝转氨酶对抗CD40抗体水平升高的反应是否存在依赖性毒性。用增加剂量的抗CD40单克隆抗体或双特异性抗体治疗小鼠,并测量肝转氨酶(AST及ALT)。每个点代表一个单独的鼠标。(图7C)与单特异性2141CD40抗体相比,CD40/DC双特异性抗体具有改善的肝毒性特征。功效轴代表图A中所示的人源化CD40/Fc γ R小鼠血液中OVA特异性CD8⁺T细胞的平均值。肝毒性轴代表图B中所示的AST、ALT肝转氨酶的平均值。(图7D)与单特异性CD40单克隆抗体相比,针对人源化小鼠肝毒性的MTD可显著提高T细胞活性,而不会出现CD40/CD11c双特异性抗体的过度毒性。通过流式细胞术分析在指定的抗CD40单克隆抗体或双特异性抗体存在下用OVA免疫的人源化CD40/Fc γ R小鼠血液中的OVA特异性CD8⁺T细胞确定的T细胞激活测定。(上面板)。响应抗CD40抗体的肝转氨酶。用抗CD40单克隆抗体或双特异性抗体处理小鼠,并测量肝转氨酶(AST及ALT)。每个点代表一个单独的鼠标。(下面板)。

[0054] 图8A至图8H显示出调节CD40单抗的疗效及毒性的细胞群。(A,B)CD40单抗治疗后的T细胞激活通过OVA特异性CD8⁺的流式细胞术测定C57BL/6(绿色)及Batf3^{-/-}(蓝色)的血T细胞用OVA免疫的小鼠(A),或接种B16-OVA肿瘤的小鼠(B)。左:CD8⁺上选通的代表性流程图显示平均值 $\pm$ SEM的细胞。右:门控细胞百分比;每个点代表一个单独的鼠标。(C)C57BL/6及Batf3^{-/-}接种MC38或MCA-205肿瘤细胞并用CD40单抗治疗的小鼠。结果以平均值 $\pm$ 扫描电镜表示(每组n=8-13)。(D)在指定菌株中注射CD40单克隆抗体后的肝转氨酶血液水平。(E+F)在注射CD40单克隆抗体前24小时,向hCD40/Fc γ R小鼠注射氯膦酸脂质体(E)或抗CD42b(F)。测量血液AST及ALT水平(左),采集并分析肝脏(右,代表性肝脏H&E切片;比例尺=200 μ m)。(G)在CD40单抗注射前24小时,向hCD40/Fc γ R小鼠注射氯膦酸脂质体。24小时后的血小板计数。(H)用CD40单抗注射hCD40/Fc γ R小鼠,2.5小时后取LN及脾脏;通过流式细胞术分析单个细胞悬浮液中的细胞内IL-6表达。上图:代表性细胞分类图。下图:分组IL-6染色强度。数据代表平均值 $\pm$ SEM。 $*P\leq 0.05$, $**p\leq 0.01$, $***P\leq 0.001$, $****P\leq 0.0001$,ns;不重要。

[0055] 图8I显示出在MC38荷瘤小鼠的指示细胞上CD40的表达。取肿瘤、引流淋巴结(LN)、脾脏及肝脏进行流式细胞术分析。库普弗细胞(Kupffer cells,KC)、巨噬细胞(MFs)、树突状细胞(DC)、常规1型DC(cDC1)、常规2型DC(cDC2)。所示为Delta几何平均荧光强度(mean fluorescence intensities)(Δ MFI)。

[0056] 图8J至图8K显示出双特异性抗体目标选择。CD11c及DEC-205在荷瘤小鼠的MC38肿

瘤、引流淋巴结 (LN)、脾脏及肝脏中的指示细胞类型上的表达,以及在天真小鼠的血小板 (K) 上的表达。CD41 作为血小板的阳性对照标记物。显示了 DEC-205 几何平均荧光强度 (MFIs) 及 CD11c Δ 几何平均荧光强度 (Δ MFIs)。每个点代表一个单独的鼠标 (J)。代表性小鼠的 FACS 分析如 (K) 所示。

[0057] 图 8L 至图 8R 显示出调节 CD40 单抗疗效及毒性的细胞群。(L) C57BL/6 (绿色) 或 Batf3^{-/-} 肝脏中库普弗细胞 (Kupffer cells) 的数量通过流式细胞术分析 (蓝色) 小鼠。(M) C57BL/6 小鼠注射氯膦酸脂质体。24 小时后,取肝脏;通过流式细胞术分析单细胞悬浮液中指示细胞群的频率。(N) C57BL/6 小鼠在注射 CD40 单抗前 24 小时注射氯膦酸脂质体。24 小时后,测量血 AST 及 ALT 水平。(O-P) 在注射 CD40 单抗前 24 小时,向 hCD40/Fc γ R 小鼠注射抗 CD42b。24 小时后测量血小板 (O),采集肝脏并进行分析 (P)。代表性肝脏 H&E 部分;比例尺 = 100 μ m。(Q) 注射 CD40 单克隆抗体后的血清 IL-6 及 TNF- α 水平。用 2141 的 CD40 单抗注射 hCD40/Fc γ R 小鼠,3h 后收集血清。用 ELISA 法测定细胞因子水平。(R) 注射 CD40 单克隆抗体后细胞内 IL-6 的表达。向 hCD40/Fc γ R 小鼠注射 2141 的 CD40 单抗。2.5 小时后,用流式细胞仪分析血液。库普弗细胞 (KC)、巨噬细胞 (MFs)、树突状细胞 (DC)、常规 1 型 DC (cDC1)、常规 2 型 DC (cDC2)。每个点代表一个单独的鼠标,数据显示为平均值 $\pm$ SEM。* $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, ns; 不重要。

[0058] 图 9A 至图 9B 显示出,CD40/DCs-双特异性抗体活性需要 Fc γ R 介导的交联。(A) 通过流式细胞术分析 OVA 特异性 CD8 来确定 T 细胞活化用 OVA 免疫的 hCD40/Fc γ R 小鼠血液中的 T 细胞存在 CD40/DCs-双特异性抗体的指示 Fc 变体。每个点代表一个单独的鼠标。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ 。(B) 显示了人类双特异性抗体-Fc 变体与人类 Fc γ RIIB 的结合。通过 ELISA 评估抗 CD40/DC-双特异性抗体的指示 Fc 变体与重组 hFc γ RIIB 的结合。

[0059] 图 10A 至图 10E 显示出,当以安全剂量施用,CD40/CD11c-双特异性抗体的抗肿瘤反应优于 CD40 单抗。(A) 代表 H&E 用指定剂量的 CD40 单抗或 CD40/CD11c-bsAb (每组 4 只) 治疗的 hCD40/Fc γ R 小鼠的肝脏 E 染色。(B) CD40 单抗或 CD40/CD11c-双特异性抗体治疗后 IL-6 及 TNF- α 的分泌。(C) 通过流式细胞术分析在指定单克隆抗体或牛血清白蛋白存在下用 OVA 免疫的人源化 CD40/Fc γ R 小鼠血液中 OVA 特异性 CD8⁺ T 细胞来确定 T 细胞活化。(D) 用 MC38 或 B16-F10 肿瘤细胞接种 hCD40/Fc γ R 小鼠。一旦肿瘤建立并达到 50mm³ 的平均体积,用 CD40 单抗或 CD40/CD11c-bsAb 按其预先确定的 MTD 治疗小鼠。每隔 3-4 天通过卡尺测量肿瘤体积 (每组 9-11 个)。(E) 用 B16-F10 肿瘤细胞接种 hCD40/Fc γ R 小鼠。用指定的单克隆抗体/牛血清白蛋白治疗已建立肿瘤的小鼠。每隔 3-4 天通过卡尺测量肿瘤体积 (每组 9-10 个) 每个点代表一个单独的鼠标,数据显示为平均值 $\pm$ SEM。* $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ 。

具体实施方式

[0060] 本发明在其一些实施例中涉及数个多特异性抗体在治疗数个疾病的用途。

[0061] 在详细解释本发明的至少一实施例之前,应当理解,本发明的应用不一定局限于以下描述中阐述的细节或由所述数个范例所示的细节。本发明能够以各种方式实施或实现其他实施例。

[0062] 激动性抗 CD40 单克隆抗体 (agonistic anti-CD40 monoclonal antibody, mAb)

的治疗性用途是一种旨在利用免疫反应潜能来根除肿瘤的方法。这种方法已被证明在许多不同肿瘤的动物模型中是有效的。然而,人类抗CD40单抗在实体瘤患者中仅显示出适度的抗肿瘤活性。

[0063] 在构思本发明的数个实施例的同时,本发明人已设计出以一树突状细胞特异性方式(in a dendritic-cells specific manner)靶向所述CD40的一多特异性分子。还设计了具有Fc γ RIIb结合偏好的这种抗体。

[0064] 如下文及下面的所述数个范例部分所示,本发明人已经建立了介导抗CD40抗体的效力及毒性的所述数个细胞途径。本发明人通过降低剂量限制毒性设计了具有一最大抗肿瘤活性的数个CD40激动剂单克隆抗体(CD40agonist mAb)。本发明人以Fc工程的多特异性(双特异性)抗体的形式设计了数个新型分子,所述数个新型分子靶向CD40及一树突状细胞标记物。具体而言,一2141-V11变体(对Fc γ RIIb具有增强的特异性)特异于DC(即,介导其抗肿瘤活性并同时减少其与其他细胞群中CD40结合的细胞群)。为了实现这种特定的传递,本发明人设计了一种将所述数个双特异性抗体格式作为一整体IgG支架(whole IgG scaffold)来利用的一新策略。这种设计的优点是对定义的细胞群具有更高的特异性,同时保持其参与适当的Fc γ R通路的能力。目前的数个抗体具有许多有益的特性,包括(i)通过双重人类Fab识别(dual human Fab recognition)所介导的定义的细胞特异性及(ii)通过Fc工程所介导的增强的Fc γ RIIB结合。为了产生所需的双特异性抗体组合,必须正确组装两个现有抗体的两条重链及两条轻链。为此,本发明人合成了将形成每个双特异性抗体(bispecific antibody,bsAb)的四条链。利用杵-进入-柏(knob-into-holes)的技术(重链CH3结构域中的数个点突变)实现所需重链的异二聚(heterodimerization)(12)。交叉单抗(CrossMab)技术(组成双特异性抗体的两个抗体中的一者的重链CH1及轻链CL1域的交换)用于确保轻链及其同源重链的正确结合。2141的所述可变结构域从先前生成的单特异性2141抗体克隆到双特异性抗体结构中。抗DEC-205(HD-109)、CD11c(N418)、Clec9a及XRC1(MARX10)抗体的所述数个可变结构域分别从HD-109(13)及N418(14)杂交瘤中测序及克隆。Clec9a(10B4)及XRC1(MARX10)的所述数个可变结构域是分别根据专利申请案US20130273150A及EP2641915A1中描述的序列合成的。用野生型(WT)IgG及“V11”Fc支架构建的所述双特异性抗体(通过PCR定点突变引入点突变),以保持体内CD40激活所需的Fc γ RIIB的最佳高阶交联。

[0065] 本发明人已在CD40结合部分(CD40 binding moiety)、DC靶向性及体内Fc γ RIIB的结合之间建立了一协同作用,显示出最佳抗肿瘤活性以及通过检查点调节(例如抗PD-L1)的最低毒性及改善治疗。

[0066] 相信本发明的一些实施例的所述数个抗体具有改进的特异性,因此具有治疗功效,因此可以成功地用于临床。

[0067] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第一部分及一第二部分,所述第一部分结合并激活CD40,所述第二部分特异性结合一树突状细胞(dendritic cell,DC)。

[0068] 根据本发明的一方面,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第一部分、一第二部分及一第三部分,所述第一部分结合并激活CD40,所述第二部分特异性结合树突状细胞(DC),所述第三部分包含所述多特异性抗体的修饰Fc的区域,用于增强与

FcγRIIb结合的特异性及亲和力。

[0069] 如本文所用,“CD40”指“TNF受体超家族成员5”(TNFRSF5)。

[0070] 人类CD40的序列(NP_001241.1),包括20个氨基酸信号序列,提供于序列编号41中。

[0071] CD40与CD40配体(CD40 ligand,CD40L)相互作用,后者也称为TNFSF5、gp39及CD154。除非另有说明或上下文明确指出,本文中对CD40L的引用是指人类CD40L(“huCD40L”)。MIM:300386中进一步描述了人类CD40L。人类CD40L(NP_000065.1)序列提供于序列编号42。

[0072] 可理解的是,CD40抗体结合人类CD40及/或小鼠CD40。结合人类及小鼠的抗体通常被称为“泛特异性抗体”(pan-specific antibodies)。

[0073] 如前所述,所述第一部分结合并激活CD40(模拟CD40L),因此被称为“激动剂”(agonistic)。激动活性(agonistic activity)可以通过检测人类类树突状细胞中CD54或CD86的上调及/或通过检测体内T细胞活化试验来测定(例如,通过ELISA确认与CD40的结合)。

[0074] 根据本发明的一些实施例,可在以下列出的抗体中找到可用于多特异性抗体的第一部分互补确定序列(complementary determining sequence,CDR):

[0075] 抗CD40 2141(也称为CP870893)以序列编号5、6、11及12所示。

[0076] 因此,根据本发明的一实施例,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第一部分,所述第一部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号19-21所述的数个互补确定区域,并在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号22-24所述的数个互补确定区域。包括优化FcγRIIb结合及双特异性组装的数个突变的CD40 V11提供于序列编号5及6中(分别为V_H及V_L)。

[0077] 抗CD40抗体:12D6及5F11在W020170253659中描述,其全文通过引用并入本文。

[0078] APX005M(Apexigen)-Johnson M、Fakih M、Bendell J等人,2017年。首次在实体瘤受试者中使用CD40激动性单克隆抗体APX005M进行人体研究。J.免疫疗法(J.ImmunoTher.),癌症5(Cancer 5)(补充3):89(摘要)。

[0079] SGN-40-C.-L.Law等人,“人源化抗CD40单克隆抗体SGN-40的临床前抗淋巴瘤活性(Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody,SGN-40.)”,癌症研究(Cancer Res.),卷65,18号,8331-8338页,9月,2005年。

[0080] SEA-CD40-DOI:10.1200/JCO.15_补充3093临床肿瘤学杂志(Journal of Clinical Oncology)36,15号_补充(2018年5月20日)3093-3093。

[0081] 其他CD40激动性抗体也可用于本领域。

[0082] 如前所述,所述多特异性抗体包含一第二部分,所述第二部分特异性结合树突状细胞(DC)。

[0083] 本文所用的“特异性”(specifically)是指与其他细胞或血小板(例如外周血细胞)相比,对树突状细胞的结合偏好。根据一些实施例,“特异性”是指不与巨噬细胞(库普弗(Kupffer)或非库普弗(non-Kupffer))及血小板结合,因为靶点不在树突状细胞上表达或以较低密度表达,这是通过流式细胞术分析确定的。

[0084] 如本文所用,术语“特异性结合”(specific binding)、“选择性结合”(selective

binding)、“选择性结合”(selectively binds)及“特异性结合”(specifically binds)是指抗体与预定抗原上的一表位(epitope)结合,而不是与其他抗原结合。通常,抗体(i)与平衡解离常数(K_D)大约小于10M、例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M甚至更低结合,这是在例如由使用预定抗原(例如重组DC标记物)作为分析物、使用抗体作为配体的一BIACORE® 2000表面等离子体共振仪中的表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术所确定,在或Scatchard分析抗体与抗原阳性细胞的结合所确定,及(ii)与预定抗原结合的亲和力至少是其与除预定抗原或密切相关抗原外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力的两倍。因此,“特异性结合人类CD40”或DC标记物的一抗体是指结合具有 10^{-6} M或更小、例如大约小于 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M甚至更低的 K_D 的可溶性或细胞结合的人类CD40或DC标记物。

[0085] 如本文所用,“一树突状细胞”(dendritic cell, DC)或复数“树突状细胞”(dendritic cells, DCs)是指属于称为数个专业抗原呈现细胞(professional antigen presenting cells, APC)的一细胞群组的数个细胞。树突状细胞具有特征性的形态,具有从树突状细胞体向多个方向延伸的薄片(片状)。一些表型标准也很典型,但可能因树突状细胞的来源而异。这些包括高水平的MHC分子(如I类及II类MHC)及共刺激分子(如B7-1及B7-2),以及缺乏针对粒细胞、NK细胞、B细胞及T细胞的特异性标记。许多树突状细胞表达某些标记物,如下面所列。树突状细胞能够在体外及体内启动初级T细胞反应。这些反应是抗原特异性的。与外周血白细胞、脾细胞、B细胞及单核细胞相比,树突状细胞具有强烈的混合白细胞反应(mixed leukocyte reaction, MLR)。树突状细胞选择性地以所述细胞的细胞因子表达模式为特征(Zhou及Tedder (1995) Blood 3295-3301)。根据一具体实施例,所述多特异性抗体结合数个未成熟树突状细胞,并可能介导其成熟及激活。

[0086] 根据一具体实施例,所述数个树突状细胞为cDC1或cDC2。

[0087] 根据一具体实施例,所述数个树突状细胞为cDC1及cDC2。

[0088] 根据一具体实施例,所述数个树突状细胞的特征在于从以下群组中选择的一标记物表达,其中所述第二部分结合从CD11c、CD11b、Clec9a、XCR1、DEC-205、BDCA-1、CD8、CD8 α 、CD103及MHC II类(例如HLA-DR)、CD141、FLT3、CD13及CD1c组成的群组中选择的一DC标记物。

[0089] 根据一具体实施例,所述数个树突状细胞是数个人类树突状细胞。

[0090] 根据一具体实施例,所述第二部分结合一DC标记物,所述DC标记物选自由CD141、FLT3、CD13、CD1c及HLA-DR(MHC II)所组成的群组。

[0091] 根据一具体实施例,所述第二部分结合一DC标记物,所述DC标记物选自由CD11c、CD11b、Clec9a、XCR1、DEC-205、BDCA-1、CD8、CD8 α 、CD103、MHC II类(例如,HLA-DR)、CD141、CD13及CD1c、LI LRA4、LAMP5、CLEC4C、I L3RA及SIGLEC6所组成的群组。

[0092] 根据一具体实施例,所述DC标记物不是LI LRA4、LAMP5、CLEC4C、I L3RA、CLEC9A、XCR1、FLT3或SIGLEC6。

[0093] 根据一具体实施例,所述第二部分结合CD11c或DEC-205。

[0094] 根据一具体实施例,所述第二部分结合CD11c。

[0095] 因此,根据本发明的一实施例,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第二部分,所述第二部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号25-27所述的数

个互补确定区域,在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号28-30所述的数个互补确定区域。

[0096] 根据一具体实施例,所述第二部分结合DEC-205。

[0097] 因此,根据本发明的一实施例,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第二部分,所述第二部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号31-33所述的数个互补确定区域,在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号34-36所述的数个互补确定区域。

[0098] 根据一具体实施例,所述第二部分结合Clec9a。

[0099] 因此,根据本发明的一实施例,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第二部分,所述第二部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号52-54所述的数个互补确定区域,在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号55-57所述的数个互补确定区域。(10B4的数个CDR)。

[0100] 根据一具体实施例,所述第二部分结合XCR1。

[0101] 因此,根据本发明的一实施例,提供了一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含一第二部分,所述第二部分在具有一N到C方向的一重链中包含如序列编号58-60所述的数个互补确定区域,在具有一N到C方向的一轻链中包含如序列编号61-63所述的数个互补确定区域。(MARX10的数个CDR)。

[0102] 能够结合CD11c的抗体为本领域众所周知的。N418可从ATCC获得(14)。

[0103] 能够结合DEC-205的抗体为本领域众所周知的。HD-109可从洛克菲勒大学(Rockefeller University)(13)HD-20、HD-24、HD-71、HD-73、HD-77及HD-83获得。

[0104] 能够结合Clec9a的抗体为本领域众所周知的。10B4及其他等描述于美国专利申请案US20130273150A(15)中(例如,1F6、397及7H11描述于文献(16)中)。

[0105] 能够结合XCR1的抗体为本领域众所周知的。MARX10描述于EP案EP2641915A1(17)中。

[0106] 可理解的是,所述数个部分(moieties)中的任一者可包括增加与Fc γ RIIB结合的数个Fc修饰,例如但不限于V11突变(序列编号2)、S267E(“SE”)、S267E/L382F(“SELF”)、G237D/P238D/P271G/A330R(“V9”)及/或对应于人类IgG1序列(对应序列编号1的数个位置)的E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R(“V12”)。

[0107] 根据一具体实施例,所述多特异性抗体包含序列编号5及6以及序列编号37及38。

[0108] 根据一具体实施例,所述多特异性抗体包含序列编号5及6以及序列编号39及40。

[0109] 根据一具体实施例,所述多特异性抗体包含序列编号5及6以及序列编号15及16。

[0110] 根据一具体实施例,所述多特异性抗体包含序列编号5及6以及序列编号17及18。

[0111] 本发明中使用的术语“抗体”包括完整的分子及其功能片段(能够与一抗原的一表位(epitope)结合)。

[0112] 如本文所用,术语“表位”(epitope)是指一抗体的对位(paratope)所结合的一抗原上的任何抗原决定簇(antigenic determinant)。数个表位决定簇通常由氨基酸或碳水化合物侧链等分子的化学活性表面基团组成,通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0113] 根据一具体实施例,所述数个抗体片段包括但不限于单链、Fab、Fab'及F(ab')₂片

段、Fd、Fcab、Fv、dsFv、单链抗体、双价抗体(diabodies)、微型抗体(minibodies)、奈米抗体(nanobodies)、Fab表达库或单域分子(例如VH及VL),能够以一HLA限制的方式结合到一抗原的一表位。

[0114] 用于实施本发明的一些实施例的数个合适抗体片段包括一免疫球蛋白轻链(本文称为“轻链”)的一互补性决定区(complementarity-determining region,CDR)、一免疫球蛋白重链(本文称为“重链”)的一互补性决定区、一轻链的一可变区、一重链的一可变区、一轻链、一重链、一Fd片段及包括轻链及重链的基本完整可变区域,例如Fv、单链Fv(scFv)、二硫键稳定的Fv(dsFv)、Fab、Fab'及F(ab')₂的数个抗体片段或包括一抗体的Fc区域的数个抗体片段。

[0115] 如本文所用,术语“互补性决定区(complementarity-determining region)”或“CDR”可互换地用于指代在重链及轻链多胜肽的可变区内发现的抗原结合区。通常,抗体包括每个VH中的三个CDR(CDR H1或H1;CDR H2或H2;及CDR H3或H3)及每个VL中的三个(CDR L1或L1;CDR L2或L2;及CDR L3或L3)。

[0116] 组成一可变区或一CDR的一特定抗体中的所述数个氨基酸残基的身份可以使用本领域众所周知的方法来确定,包括Kabat等人定义的序列可变性等方法(例如,参见Kabat等人,1992年,免疫学相关蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,公共卫生服务(Public Health Service),NIH,华盛顿特区)、Chothia等人定义的结构环区域的位置(例如,参见Chothia等人,自然(Nature),342:877-883,1989年)、使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的Kabat及Chothia之间的折衷(现在的Accelrys®,参见Martin等人,1989年,美国国家科学院院刊(Proc.Natl Acad Sci USA., 86:9268;及万维网网站www(dot)bioinf org(dot)uk/abs)、由接触定义所定义的可获得的复杂晶体结构(参见MacCallum等人,J.Mol.,生物学(Biol.),262:732-745,1996年)及“构象定义”(conformational definition)(参见Makabe等人,生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry),283:1156-1166,2008年)。

[0117] 如本文所用,“可变区域”(variable regions)及“CDR”可指由本领域已知的任何方法(包括数个方法的数个组合)定义的可变区域及CDR。

[0118] 包含轻链及重链的全部或基本上全部可变区域的功能性抗体片段定义如下:

[0119] (i) Fv,定义为一种基因工程片段,由表达为两条链的轻链可变区(light chain, VL)及重链可变区(heavy chain,VH)组成;

[0120] (ii) 单链抗体(“single chain Fv,scFv”),一种基因工程单链分子,包括轻链可变区及重链可变区,通过一合适的多胜肽连接物连接以作为基因融合的单链分子。

[0121] (iii) 二硫稳定Fv(“disulfide-stabilized Fv,dsFv”),一种基因工程抗体,包括轻链可变区及重链可变区,通过一基因工程二硫键连接。

[0122] (iv) Fab,包含一抗体分子的一单价抗原结合部分(monovalent antigen-binding portion)的一抗体分子片段,可通过用木瓜蛋白酶处理整个抗体获得,以产生完整的轻链及由其可变结构域及CH1结构域组成的重链的Fd片段;

[0123] (v) Fab',包含一抗体分子的一单价抗原结合部分的一抗体分子片段,可通过用胃蛋白酶处理整个抗体,然后还原获得(每个抗体分子获得两个Fab'片段);

[0124] (vi) F(ab')₂,包含一抗体分子的一单价抗原结合部分的一抗体分子片段,可通过

用胃蛋白酶处理整个抗体获得(即,通过两个二硫键连接在一起的Fab'片段的二聚体);

[0125] (vii) 数个单域抗体(single domain antibodies)或数个纳米体(nanobodies)由一单个VH或VL域组成,其对抗原具有足够的亲和力;及

[0126] (viii) Fcab, 一种抗体分子片段, 包含一抗体的Fc部分, 通过将抗原结合能力引入抗体的Fc区域而开发为抗原结合域。

[0127] 生产多克隆及单克隆抗体及其片段的方法在本领域是众所周知的(例如, 参见Harlow及Lane, 抗体: 实验室手册(Antibodies: a Laboratory Manual), 纽约冷泉港实验室, 1988年, 通过引用并入本文)。

[0128] 产生抗体的数个示例性方法采用诱导体内产生抗体分子、筛选免疫球蛋白库(Orlandi D.R. 等人, 1989年, 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86: 3833-3837; Winter G. 等人, 1991年, 自然(Nature), 349: 293-299)或通过培养中的连续细胞系产生单克隆抗体分子。这些包括但不限于杂交瘤技术、人类B细胞杂交瘤技术及爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV) - 杂交瘤技术(Kohler G. 等人, 1975年, 自然256: 495-497; Kozbor D., 等人, 1985年, J. Immunol. Methods, 81: 31-42; Cote RJ 等人, 1983年, 美国国家科学院院刊, 80: 2026-2030; Cole SP. 等人, 1984年, Mol. Cell. Biol., 62: 109-120)。

[0129] 在体内产生抗体时, 如果目标抗原太小而无法引发足够的免疫原性反应, 则此类抗原(半抗原)可以耦接到抗原中性载体, 例如锁孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)或血清白蛋白(serum albumin)(例如, 牛血清白蛋白(bovine serum albumine, BSA))载体(例如, 参见美国专利案5189178及5239078)。可以使用本领域众所周知的方法实现半抗原与载体的耦接。例如, 可以影响与氨基的直接耦接, 并且可选地随后减少所形成的亚氨基键。或者, 可以使用冷凝剂(例如二环己基碳二亚胺(dicyclohexyl carbodiimide))或其他碳二亚胺脱水剂)耦接载体。连接剂化合物(linker compounds)也可用于影响耦接; 同双功能(homobifunctional)及异双功能(heterobifunctional)连接器均可从伊利诺伊州罗克福德(Rockford, Ill)的皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Company)获得。然后可以将所得免疫原性复合物注射到适当的哺乳动物受试者中, 例如小鼠、兔子等。合适的方案包括根据时间表在佐剂存在下重复注射免疫原, 以促进血清中抗体的产生。免疫血清的效价可以使用本领域众所周知的免疫测定程序而轻易地测量。

[0130] 获得的抗血清可以直接使用, 也可以如上所述获得单克隆抗体。

[0131] 根据本发明的一些实施例的抗体片段可以通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌中表达来制备。编码所述片段的DNA的大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养或其他蛋白质表达系统)。

[0132] 抗体片段可以通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶通过常规方法消化整个抗体获得。例如, 抗体片段可以通过用胃蛋白酶来酶切抗体而产生, 以提供表示为F(ab')₂的5S片段。所述片段可以使用硫醇还原剂(thiol reducing agent)进一步裂解, 并且可选地使用由二硫键裂解产生的巯基的阻断基, 以产生3.5SFab' 单价片段。或者, 使用胃蛋白酶的酶切直接产生两个单价Fab' 片段及一个Fc片段。例如, 这些方法被描述于Goldenberg、美国专利号4036945及4331647、以及其中包含的引用文件, 这些专利通过引用全部并入本文。另参见Porter, R.R. (生物化学杂志(Biochem. J.), 73: 119-126 (1959))。也可以使用其他切割抗体

的方法,例如分离重链以形成单价轻-重链片段、进一步切割片段或其他酶、化学或遗传技术,只要片段与完整抗体识别的抗原结合即可。

[0133] 如上文所述,Fv片段包含VH链及VL链的一关联(association)。如Inbar等人所述,这种关联可能是非共价的(美国国家科学院院刊,69:2659-62(19720)。或者,可变链可以通过分子间二硫键连接或通过戊二醛(glutaraldehyde)等化学物质交联。优选地,Fv片段包含通过胜肽连接物连接的VH链及VL链。这些单链抗原结合蛋白(single-chain antigen binding proteins,sFv)是通过构建包含编码由寡核苷酸连接的VH及VL结构域的DNA序列的结构基因来制备的。将结构基因插入表达载体,随后将其导入宿主细胞(例如大肠杆菌)。重组宿主细胞通过连接两个V结构域的连接胜肽合成单个多胜肽链。例如,参见Whitlow及Filpula,方法(Methods),2:97-105(1991);Bird等人,科学(Science),242:423-426(1988);Pack等人,生物/技术(Bio/Technology),11:1271-77(1993);及美国专利案第4946778号,其全部内容通过引用并入本文。

[0134] 抗体片段的另一种形式是编码单个互补决定区(CDR)的胜肽。CDR胜肽(“最小识别单元”)可以通过构建编码感兴趣抗体CDR的基因获得。例如,通过使用聚合酶链反应从抗体产生细胞的RNA合成可变区来制备此类基因。例如,参见Larrick及Fry(方法(Methods),2:106-10(1991))。

[0135] 如前所述,抗体片段可包含称为“Fcab”的抗体的Fc区。此类抗体片段通常包含抗体的CH2-CH3结构域。FCAb被设计成在抗体的结构环区域,即在重链的CH3区域中包含至少一种修饰。例如,可以如下生成此类抗体片段:提供编码包含至少一个结构环区域(例如Fc区域)的抗体的核酸,修饰至少一个结构环区域的至少一个核苷酸残基,在表达系统中转移修饰的核酸,表达修饰的抗体,将表达的修饰抗体与表位接触,并确定修饰抗体是否与表位结合。例如,参见美国专利号9045528及9133274全部通过引用并入本文。

[0136] 非人类(例如,小鼠)抗体的人源化形式是免疫球蛋白的嵌合分子、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab).sub.2或其他抗体的抗原结合子序列),其中包含来自非人类免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中形成受体互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力及容量的非人类类物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠或兔子)的CDR残基取代。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人类残基取代。人源化抗体还可包含在受体抗体中或在导入的CDR或框架序列中均未发现的残基。一般而言,人源化抗体将基本上包含至少一个且通常为两个可变域中的所有可变域,其中所有或几乎所有CDR区域对应于非人类免疫球蛋白的区域,并且所有或几乎所有FR区域是人类免疫球蛋白共有序列的区域。最佳情况下,人源化抗体还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人类免疫球蛋白的部分(Jones等人,自然(Nature),321:522-525(1986);Riechmann等人,自然,332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992))。

[0137] 人源化非人类抗体的方法在本领域是众所周知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人类来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为导入残基(import residues),通常取自导入可变域(import variable domain)。通过用啮齿动物CDR或CDR序列替换人类抗体的相应序列,基本上可以按照Winter及其同事的方法进行人源化(Jones等人,自然(Nature),321:522-525(1986);Riechmann等人,自然(Nature),332:323-327

(1988);Verhoeyen等人,科学(Science),239:1534-1536(1988))。因此,这种人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号4816567),其中非人类物种的相应序列替换了实质上小于完整人类可变域的序列。实际上,人源化抗体通常是人类抗体,其中一些CDR残基及可能的一些FR残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0138] 人类抗体也可以使用本领域已知的各种技术生产,包括噬菌体展示库(Hoogenboom及Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991))。Cole等人及Boerner等人的技术也可用于制备人类单克隆抗体(Cole等人,单克隆抗体及癌症治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),Alan R.Liss,第77页(1985年)及Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991年))。类似地,可以通过将人类免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如内源性免疫球蛋白基因部分或完全失活的小鼠,来制备人类抗体。在激发后,观察到人类抗体的产生,这在所有方面都与在人类中看到的非常相似,包括基因重排、组装及抗体库。例如,美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5661016中描述了这种方法,并在以下科学出版物中发表: Marks等人,生物/技术10(Bio/Technology 10):779-783(1992);Lonberg等人,自然(Nature)368:856-859(1994);Morrison,自然(Nature)368 812-13(1994年);Fishwild等人,自然生物技术(Nature Biotechnology)14:45-51(1996年);Neuberger,自然生物技术14:826(1996年);还有Lonberg及Huszar,Intern.Rev.Immunol.13,65-93(1995年)。

[0139] 除非另有说明,否则免疫球蛋白可以来自任何常见的已知同型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG及IgM。在某些物种中,IgG亚型分为亚类:人类的IgG1、IgG2、IgG3及IgG4,以及小鼠的IgG1、IgG2a、IgG2b及IgG3。免疫球蛋白,例如人类IgG1,存在于几种异源型中,它们在至多几个氨基酸上彼此不同。

[0140] 根据一具体实施例,所述抗体为IgG1同种型。一旦获得抗体,可通过ELISA、西方墨点法(Western blotting)、FACS、斑点杂交(dot blot)及任何其他抗体鉴定方法测试其活性。

[0141] 根据一具体实施例,所述抗体在其与Fc γ 、CD40及dc的结合中具有三功能(trifunctional)。

[0142] 如本文所述,“多特异性抗体”(multispecific antibody)是一种抗体,可同时结合到至少两个不同结构的靶点、两种不同的抗原或两个不同的表位,一个在CD40上,另一个在DC上,如前所述。

[0143] 特异性表示出抗体能够结合多少抗原或表位;即,双特异性(bispecific)、三特异性(trispecific)、四特异性(quatraspecific)。根据一具体实施例,所述抗体为双特异性抗体。

[0144] 使用这些定义,一天然抗体(例如一IgG)是二价的,因为它有两个结合臂,但所述天然抗体是单特异性的,因为它结合一个表位。

[0145] “双特异性抗体”(bispecific antibody)是一种可以同时结合到两个结构不同的靶标的抗体,一个在CD40上,另一个至少在DC上。

[0146] 效价(valency)表示抗体与单个抗原或表位有多少结合臂或结合位点;即,单价、二价、三价或多价。抗体的多价性意味着它可以利用与抗原结合的多种相互作用,从而提高与抗原结合的亲和力。

[0147] 多特异性多价抗体是具有一个以上不同特异性结合位点的结构。例如，糖尿病，其中一个结合位点与一个抗原反应，另一个与另一个抗原反应。

[0148] 如本文所用，“部分”(moiety)是指能够结合所示靶标的多特异性(例如，双特异性)抗体的抗体成分(antibody component)。

[0149] 为了产生本发明一些实施例的多特异性抗体，本部分可以在Fc区域进行修饰，例如本领域众所周知的CH3结构域(根据kabat)。这种修饰确保了通过重链来正确地组装多特异性抗体。

[0150] 因此，改变一重链的所述CH3结构域，以使在一重链的所述CH3结构域的所述原始界面(original interface)内，所述重链的所述CH3结构域的所述原始界面(original interface)与多特异性抗体内另一重链的CH3结构域的原始界面相遇，用一侧链体积较大的一氨基酸残基替换一氨基酸残基，从而在一重链的所述CH3结构域的所述界面内产生突起，所述突起可定位在另一重链的所述CH3结构域的所述界面内的一空腔中；以及改变另一重链的所述CH3结构域，以使在所述三价双特异性抗体内与所述第一CH3结构域的所述原始界面相遇的所述第二CH3结构域的所述原始界面内，氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基取代，从而在第二CH3结构域的界面内产生一空腔，其中第一CH3结构域界面内的突起可定位(Genentech也称为“杵-进入-柏(knobs-into-holes)”方法)。

[0151] 根据一具体实施例，具有较大侧链体积的氨基酸残基选自自由精氨酸(arginine, R)、苯丙氨酸(phenylalanine, F)、酪氨酸(tyrosine, Y)、色氨酸(tryptophan, W)组成的群组。

[0152] 根据一具体实施例，具有较小侧链体积的氨基酸残基选自自由丙氨酸(alanine, A)、丝氨酸(serine, S)、苏氨酸(threonine, T)、缬氨酸(valine, V)组成的群组。

[0153] 根据一具体实施例，通过在每个CH3结构域的相应位置引入半胱氨酸(cysteine, C)作为氨基酸来进一步改变两个CH3结构域，从而可以在两个CH3结构域之间形成二硫键。

[0154] 在一具体实施例中，所述双特异性包含“杵链(knobs chain)”CH3结构域中的T366W突变及“柏链(hole chain)”CH3结构域中的T366S、L368A、Y407V突变。还可以使用CH3结构域之间的额外链间二硫键(Merchant, A.M. 等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681)，例如，通过将Y349C突变引入“杵链”的CH3结构域，并将E356C突变或S354C突变引入“柏链”的CH3结构域。因此，在另一优选实施例中，所述双特异性抗体包含两个CH3结构域中的一者中的Y349C、T366W突变及两个CH3结构域中的另一者中的E356C、T366S、L368A、Y407V突变，或者所述双特异性抗体包含两个CH3结构域中的一者中的Y349C、T366W突变及两个CH3结构域中的另一者中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变(一个CH3结构域中的额外Y349C突变及另一个CH3结构域中形成链间二硫键的额外E356C或S354C突变)(始终根据Kabat的欧盟指数进行编号)。但也可以替代或额外使用EP 1870459A1所述的其他杵-进入-柏(knobs-into-holes)技术。所述双特异性抗体的一具体示例为R409D；“杵链”及D399K的CH3结构域中的K370E突变；“柏链”CH3结构域中的E357K突变(始终根据Kabat的欧盟指数进行编号)。

[0155] 在另一实施例中，双特异性抗体包括“杵链”的CH3结构域中的T366W突变及“柏链”的CH3结构域中的T366S、L368A、Y407V突变以及另外的R409D；“杵链”及D399K的CH3结构域中的K370E突变；“柏链”CH3结构域中的E357K突变。

[0156] 在另一实施例中，双特异性抗体包含两个CH3结构域中的一者中的Y349C、T366W突

变及两个CH3结构域中的另一者中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变,或者双特异性抗体包含两个CH3结构域中的一者中的Y349C、T366W突变及两个CH3结构域中的另一者中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变及另外的R409D;“杵链”及D399K的CH3结构域中的K370E突变;“柏链”CH3结构域中的E357K突变。

[0157] 根据一具体实施例,针对第一单抗(例如抗DC)引入Y349C/T366S/L368A/Y407V突变,针对第二单抗(例如抗CD40)引入S354C/T366W突变(Merchant等人,1998年;Ridgway等人,1996年)。

[0158] 或者,为了正确的重-轻链配对,至少一个部分可以用交叉单抗(CrossMab)格式表示(CH1-CL交换)。

[0159] 交叉单抗(CrossMab)技术的基础是双特异性IgG抗体的一个臂内抗体域的交叉,从而实现正确的链结合,而重链的正确异二聚(heterodimerization)可以是达成通过上述杵-进入-柏(knobs-into-holes)技术或电荷相互作用。这可能是达成通过Fab片段内不同结构域的交换而达成。Fab结构域(在交叉单抗^{Fab}格式中),或仅可变VH-VL域(交叉单抗^{VH-VL}格式)或恒定CH1-CL域(交叉单抗^{CH1-CL}格式),可以为此交换Fab片段。事实上,对于交叉单抗^{CH1-CL}格式,各自的原始轻链及新型VL-CH1轻链不会导致与各自的原始重链及含有VH-CL的重链的非期望的相互作用,并且不能形成理论副产物。相反地,在交叉单抗^{Fab}格式的情况下,可以形成非功能性单价抗体(non-functional monovalent antibody, MoAb)以及非功能性Fab片段。这些副产物可以通过色谱技术(chromatographic techniques)去除。在交叉单抗^{VH-VL}格式的情况下,在含有重链的VL-CH1及原始未改性的VL-CL轻链之间,可能会出现含有Bence-Jones蛋白中已知的VL-CH1/VL-CL结构域结合的不良副产物。将基于野生型抗体框架中现有保守电荷对的排斥电荷对引入野生型非交叉Fab片段的恒定CH1和CL结构域,可以克服交叉单抗^{VH-VL+/-}格式中类似Bence-Jones的副产物的形成。有关交叉单抗技术的更多详细信息,请参阅Klein等人的Methods 154,2019年2月1日,第21-31c页。

[0160] 或者,可以通过使用本领域已知的方法接合所述数个部分来制备本文所述的多特异性抗体,例如双特异性抗体。例如,可以单独生成多特异性抗体的每一部分,然后彼此结合。各种耦接剂或交联剂可用于共价共轭。交联剂的数个示例包括蛋白质A、碳二亚胺(carbodiimide)、N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫醋酸盐(N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, SATA)、5,5'-二硫双酚(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(o-phenylenedimaleimide, oPDM)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)丙酸盐(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP)及磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, sulfo-SMCC)(参见例如Karpovsky等人,1984年,J.Exp.Med.160:1686;Liu,M等人,1985年,美国国家科学院院刊(美国)82:8648)。其他方法包括那些描述于以下的方法:Paulus,1985年,Behring-Ins.Mitt.第78,118-132号;Brennan等人,1985年,自然(Science)229:81-83)以及Glennie等人,1987年,J.Immunol.139:2367-2375)。首选的共轭剂是SATA及sulfo-SMCC,均可从Pierce Chemical Co.(伊利诺伊州罗克福德)获得。

[0161] 替代地,或额外地,可以通过两条重链的C末端铰链区域的巯基键来实现多特异性抗体的每一部分的共轭。在一具体实施例中,在共轭之前,将铰链区域改性为包含奇数个疏

基残基,优选一个。

[0162] 根据一具体实施例,第三部分赋予Fc γ RIIb受体增强的特异性。

[0163] “Fc受体”(Fc receptor)或“FcR”是与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。与IgG抗体结合的FCR包括Fc γ R家族的受体,包括这些受体的等位变体及选择性剪接形式。Fc γ R家族由三个激活受体(小鼠的Fc γ RI、Fc γ RIII及Fc γ RIV;人类的Fc γ RIA、Fc γ RIIA及Fc γ RIIIA)及一个抑制性受体(Fc γ RIIb,或等效的Fc γ RIIb)组成。US20170253659(及其中的表1)总结了人类Fc γ Rs的各种特性。

[0164] 大多数先天效应细胞类型共同表达一种或多种激活的Fc γ R及抑制性Fc γ RIIb,而自然杀伤(NK)细胞选择性表达一种激活的Fc受体(小鼠的Fc γ RIII及人类的Fc γ RIIIA),但在小鼠及人类中不表达抑制性Fc γ RIIb。人类IgG1与大多数人类Fc受体结合,就其结合的激活Fc受体的类型而言,被认为与小鼠IgG2a相当。

[0165] 人Fc γ RIIB与人类IgG的亲合力较低。如上所述,一些先前的出版物表示出,抑制性Fc γ RIIB的参与是靶向小鼠CD40的激动性抗体以及其他成员体内抗肿瘤活性的绝对要求TNFR家族。这是由于Fc γ RIIB对CD40抗体的高阶交联在邻近细胞上表达。这种交联增强了CD40在细胞表面上的聚集,导致增强的CD40信号(6)(7)中。

[0166] 因此,根据本发明的一实施例,所述多特异性抗体包含一第三部分,所述第三部分包含所述多特异性抗体的一修饰的Fc区域,用于增强与Fc γ RIIB结合的特异性及亲和力。

[0167] 所述修饰(突变)的Fc区具有一个或多个突变,对应于从N297A、S267E(“SE”)、S267E/L382F(“SELF”)、G237D/P238D/P271G/A330R(“V9”)或G237D/P238D/H268D/P271G/A330R(“V11”) (序列编号2)或(“V12”)组成的群组中选择的人类IgG重链(序列编号1)中的一个或多个突变。

[0168] 根据一具体实施例,经修饰的Fc为V11突变体。如下面的示例部分所示,体外及体内实验表示出,多特异性抗体受益于Fc γ RIIB结合,以便有效地激活DC及T细胞(图6)。

[0169] 本文所述的另一方面涉及编码本文所述抗体的核酸分子。核酸可以存在于整个细胞、细胞裂解物中,或以部分纯化或基本纯净的形式存在。当通过标准技术(包括碱性(alkaline)/SDS处理、CsCl显带、柱层析、限制性内切酶、琼脂糖凝胶电泳及本领域众所周知的其他技术)从其他细胞成分或其他污染物(例如其他细胞核酸(例如,其他染色体DNA,例如与自然界中分离的DNA相连的染色体DNA))或蛋白质中纯化时,核酸被“分离出”或“变得基本纯净”。参见F.Ausubel等人编辑,1987年,分子生物学最新方案(Current Protocols in Molecular Biology),格林出版社及威利国际科学出版社(Greene Publishing and Wiley Interscience),纽约。本文所述的核酸可以是例如DNA或RNA,并且可以包含也可以不包含内含子序列。在某些实施例中,核酸是cDNA分子。

[0170] 本文所述核酸可使用标准分子生物学技术获得。对于杂交瘤表达的抗体(例如,从携带人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如下文所述),可通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得编码杂交瘤制备的抗体轻链及重链的cDNA。对于从免疫球蛋白基因库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),可以从库(library)中回收编码抗体的核酸。

[0171] 编码V_H及V_L获得片段后,可以通过标准重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段,例如将可变区基因转换为全长抗体链基因、Fab片段基因或单链抗体基因。在这些操作中,一V_L-或V_H-编码DNA片段可操作地连接到编码另一蛋白质的另一DNA片段,例如抗体恒定区或柔

性连接器在本文中使用的术语“操作连接 (operatively linked)”意指两个DNA片段连接,使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框架中。

[0172] 编码VH区域的分离DNA可通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区(铰链、CHI、CH2及/或CH3)的另一DNA分子进行操作性连接而转化为全长重链基因。人类重链恒定区基因的序列在本领域是已知的(参见例如Kabat, E. A. 等人, 1991年, 免疫学相关蛋白质序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第五版, 美国卫生及公众服务部 (Department of Health and Human Services), NIH出版物第91-3242号), 并可通过标准PCR扩增获得包含这些区域的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区, 例如, IgG1区。对于Fab片段重链基因, 编码VH的DNA可以操作性地连接到另一个仅编码重链CHI恒定区的DNA分子。

[0173] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子进行操作性连接, 编码V_L区域的分离DNA可以转化为一全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列在本领域是已知的(参见例如Kabat, E. A. 等人, 1991年, 免疫相关蛋白质序列, 第五版, 美国卫生与公共服务部, NIH出版物第91-3242号)及包含这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是kappa或lambda恒定区。

[0174] 多种原核或真核细胞可以用作宿主表达系统来表达本发明一些实施例的抗体。这些包括但不限于微生物, 例如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌; 用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母; 感染重组病毒表达载体(例如, 花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV); 烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统。哺乳动物表达系统也可用于表达本发明一些实施例的抗体。培养物中的表达条件取决于使用的表达系统。

[0175] 在培养物中的适当时间后, 从培养物中回收抗体。短语“回收重组抗体”是指收集包含抗体的整个发酵培养基, 不需要暗示额外的分离或纯化步骤。尽管如此, 本发明的一些实施例的抗体可以使用多种标准蛋白质纯化技术进行纯化, 例如但不限于亲和色谱 (affinity chromatography)、离子交换色谱、过滤、电泳、疏水作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography)、凝胶过滤色谱、反相色谱 (reverse phase chromatography)、伴刀豆球蛋白a色谱 (concanavalin a chromatography)、色差聚焦 (chromatofocusing) 及微分增溶 (differential solubilization)。

[0176] 本文所述的抗体、抗体组合物及方法具有许多体外及体内实用性, 涉及例如通过刺激CD40信号增强免疫反应。在一优选实施例中, 本文所述抗体为人类或人源化抗体。例如, 本文所述的多特异性抗体可施用于培养中的体外或离体细胞, 或施用于人体受试者(例如体内), 以增强各种疾病的免疫力。

[0177] 因此, 本文提供了修改受试者免疫反应的方法, 包括向一受试者施用本文所述的多特异性抗体, 以增强、刺激或上调所述受试者的免疫反应。

[0178] 如本文所用, 术语“受试者”包括哺乳动物, 例如任何年龄患有疾病(例如癌症、慢性病毒感染)的人类。根据一具体实施例, 所述术语包括处于发展所述障碍风险中的个体。

[0179] 根据一具体实施例, 受试者包括希望增强免疫反应的人类患者。这些方法特别适用于治疗具有可以通过增强免疫反应(例如, T细胞介导的免疫反应)来治疗的疾病的人类

患者。在一具体实施例中,所述方法特别适合于癌症的治疗。为了实现抗原特异性免疫增强,本文所述的多特异性抗体可以与感兴趣的抗原一起施用,或者抗原可能已经存在于待治疗的受试者(例如,携带肿瘤或病毒的受试者)中。当CD40抗体与另一种药物一起施用,可以单独或同时施用这两种药物。

[0180] 还包括增强一受试者中的一免疫反应(例如,T细胞介导的抗肿瘤免疫)的数个方法,包括向所述受试者施用本文所述的多特异性抗体,以增强受试者的免疫反应。在一优选实施例中,所述受试者是携带肿瘤的受试者,并且针对肿瘤的免疫反应为增强的。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤,例如血液系统恶性肿瘤。在某些实施例中,肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施例中,肿瘤是非免疫原性的。在某些实施例中,肿瘤为PD-L1阳性。在某些实施例中,肿瘤为PD-L1阴性。受试者也可能是携带病毒的受试者,针对所述病毒的免疫反应为增强的。

[0181] 进一步提供了抑制一受试者中的数个肿瘤细胞生长的数个方法,包括向受试者施用本文所述的多特异性抗体,从而抑制所述受试者中的所述肿瘤的生长。还提供了治疗一受试者中的数个慢性病毒感染的数个方法,包括向受试者施用本文所述的多特异性抗体,以便在所述受试者中治疗所述慢性病毒感染。

[0182] 在某些实施例中,将本文所述的多特异性抗体施用于一受试者,以作为一辅助治疗。使用本文所述的多特异性抗体治疗患有癌症的受试者可能会导致相对于当前护理标准的长期持久反应;长期生存至少1年、2年、3年、4年、5年、10年或以上,无复发生存至少1年、2年、3年、4年、5年或10年或以上。在某些实施例中,使用本文所述的多特异性抗体治疗患有癌症的受试者可防止癌症复发或将癌症复发延迟例如1年、2年、3年、4年、5年或10年以上。抗CD40治疗可作为一级或二级治疗。

[0183] 本文提供了治疗具有癌症的一受试者的数个方法,包括向受试者施用本文所述的多特异性抗体,以使所述受试者得到治疗,例如,抑制或减少癌性肿瘤的生长及/或肿瘤消退。本文所述的多特异性抗体可单独用于抑制癌性肿瘤的生长。或者,本文所述的多特异性抗体可以与另一试剂(例如,其他免疫原性试剂、标准癌症治疗或其他抗体)结合使用,如下所述。

[0184] 因此,本文提供了治疗癌症的数个方法,例如通过抑制一受试者体内肿瘤细胞的生长,包括向受试者施用一治疗有效量的本文所述多特异性抗体。

[0185] 可使用本发明抗体抑制生长的癌症包括通常对免疫治疗有反应的癌症。用于治疗癌症的数个非限制性示例包括鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、小细胞肺癌(small-cell lung cancer)、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)、鳞状非小细胞肺癌(squamous non-small cell lung cancer, NSCLC)、非NSCLC、胶质瘤(glioma)、胃肠道癌(gastrointestinal cancer)、肾癌(renal cancer)(例如透明细胞癌(clear cell carcinoma))、卵巢癌(ovarian cancer)、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌(hormone refractory prostate adenocarcinoma))、甲状腺癌、神经母细胞瘤(neuroblastoma)、胰腺癌、胶质母细胞瘤(glioblastoma)(多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme))、宫颈癌、胃癌(stomach cancer)、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌及头颈癌(或癌(carcinoma))、胃癌(gastric cancer)、生殖细胞瘤、小儿肉瘤(pediatric sarcoma)、鼻腔

自然杀伤细胞(sinonasal natural killer)、黑色素瘤(melanoma)(例如转移性恶性黑色素瘤,例如皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,包括由石棉诱发的癌症、病毒相关癌症(例如,人类乳头状瘤病毒(human papilloma virus,HPV)相关肿瘤)及来自两个主要血细胞谱系中的一个的血液恶性肿瘤,即,髓细胞系(产生粒细胞、红细胞细胞、血小板、巨噬细胞及肥大细胞)或淋巴细胞系(产生B、T、NK及浆细胞),例如所有类型的白血病、淋巴瘤及骨髓瘤,例如急性、慢性、淋巴细胞及/或髓系白血病,例如急性白血病(acute leukemia,ALL)、急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia,AML)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)、慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML)、未分化急性髓细胞白血病(undifferentiated AML,M0)、成髓细胞白血病(myeloblastic leukemia,M1)、成髓细胞白血病(myeloblastic leukemia,M2;细胞成熟)、早幼粒细胞白血病(promyelocytic leukemia,M3或M3变体(M3V))、单核细胞白血病(myelomonocytic leukemia,M4或M4变体伴嗜酸性粒细胞增多(M4E))、单核细胞白血病(monocytic leukemia,M5)、红白血病(erythroleukemia,M6)、巨核细胞白血病(megakaryoblastic leukemia,M7)、孤立性粒细胞肉瘤(isolated granulocytic sarcoma)及绿细胞瘤(chloroma);淋巴瘤,如霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma,HL)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma,NHL)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue,MALT)淋巴瘤、间变性(anaplastic)(如Ki 1+大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠道T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴细胞淋巴瘤、T淋巴细胞性;淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴增生性疾病、真组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(lymphoblastic lymphoma,LBL)、淋巴系造血肿瘤、急性淋巴母细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞性淋巴瘤(diffuse histiocytic lymphoma,DHL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T-cell lymphoma,CTLC)(也称蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)或Sezary综合征)及具有华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)的淋巴浆细胞样淋巴瘤(lymphoplasmacytoid lymphoma,LPL);骨髓瘤,如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、阴燃性骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤(indolent myeloma))、孤立性浆细胞瘤(solitary plasmocytoma)及多发性骨髓瘤(multiple myelomas)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)、毛细胞淋巴瘤;骨髓系造血肿瘤,间充质来源的肿瘤,包括纤维肉瘤(fibrosarcoma)及横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma);精原细胞瘤(seminoma)、畸胎瘤(teratocarcinoma)、中枢及外周神经肿瘤,包括星形细胞瘤(astrocytoma)、神经鞘瘤(schwannomas);间充质来源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤及骨肉瘤(osteosarcoma);以及其他肿瘤,包括黑色素瘤(melanoma)、着色性干皮病(xeroderma pigmentosum)、角化

棘皮瘤 (keratoacanthoma)、精原细胞瘤 (seminoma)、甲状腺滤泡癌及畸胎瘤 (teratocarcinoma)、淋巴系造血肿瘤 (例如T细胞及B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞疾病,例如T淋巴细胞白血病 (T-prolymphocytic leukemia, T-PLL), 包括小细胞 (small cell) 及脑形细胞 (cerebriform cell) 类型;大颗粒淋巴细胞白血病 (large granular lymphocyte leukemia, LGL), 优选为T细胞型;a/d T-NHL肝脾淋巴瘤 (a/d T-NHL hepatosplenic lymphoma);外周/胸腺后T细胞淋巴瘤 (多形性及免疫母细胞亚型);血管中心性 (鼻) T细胞淋巴瘤 (angiocentric (nasal) T-cell lymphoma);头颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性髓样淋巴瘤,以及上述癌症的任何组合。本文所述方法也可用于治疗转移性癌症、难治性癌症 (例如,对先前免疫治疗难治的癌症,例如,使用阻断性CTLA-4或PD-1抗体) 及复发性癌症。

[0186] 根据一具体实施例,癌症选自以下所组成的群组:膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠道癌、胰腺癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症。

[0187] 本文所述的多特异性抗体可作为单一疗法或唯一的免疫刺激疗法施用,或可与癌症疫苗策略中的免疫原性剂组合,例如癌细胞、纯化的肿瘤抗原 (包括重组蛋白质、胜肽及碳水化合物分子)、细胞、以及转染了编码免疫刺激细胞因子的基因的细胞 (He等人,2004年, *J. Immunol.*, 173:4919-28)。可使用的肿瘤疫苗的非限制性示例包括黑色素瘤抗原的胜肽,例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1及/或酪氨酸酶的胜肽,或转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。已经设计了许多针对肿瘤的疫苗接种实验策略 (参见Rosenberg, S., 2000年,癌症疫苗的开发 (Development of Cancer Vaccines), ASCO教育书籍春季:60-62; Logothetis, C., 2000年, ASCO教育书籍春季:300-302; Khayat, D., 2000年, ASCO教育书籍春季:414-428; Foon, K., 2000年, ASCO教育书籍春季:730-738; 另参见Restifo, N. 及Sznol, M., 癌症疫苗 (Cancer Vaccines), 第61章, 第3023-3043页, DeVita等人 (编辑), 1997年, 癌症:肿瘤学原理与实践 (Cancer: Principles and Practice of Oncology), 第五版)。在其中一种策略中,使用自体或异体肿瘤细胞制备疫苗。当肿瘤细胞转化为表达GM-CSF时,这些细胞疫苗已被证明是最有效的。GM-CSF已被证明是肿瘤疫苗接种的抗原呈现的有效激活剂。Dranoff等人, 1993年, 美国国家科学院院刊 (美国) 90:3539-43。

[0188] 其他肿瘤疫苗可以包括与人类癌症有关的病毒的蛋白质,如人类乳头瘤病毒 (Human Papilloma Viruses, HPV)、肝炎病毒 (Hepatitis Viruses, HBV及HCV) 及卡波西疱疹肉瘤病毒 (Kaposi's Herpes Sarcoma Virus, KHSV)。另一种可与CD40活化结合使用的肿瘤特异性抗原是从肿瘤组织本身分离的纯化热休克蛋白 (purified heat shock proteins, HSP)。这些热休克蛋白包含来自肿瘤细胞的蛋白质片段,这些热休克蛋白能够高效地传递到抗原呈现细胞,以诱导肿瘤免疫 (Suot&Srivastava (1995年) 自然 (Science) 269:1585-1588; Tamura等人。 (1997年) 科学 (Science) 278:117-120)。

[0189] 树突状细胞 (DC) 是有效的抗原呈现细胞,可用于激发抗原特异性反应。DC可以在体外产生,并装载各种蛋白质及胜肽抗原以及肿瘤细胞提取物 (Nestle等, 1998年, 自然医学 (Nature Medicine) 4:328-332)。树突状细胞也可以通过遗传方式转导来表达这些肿瘤抗原。为了免疫目的,树突状细胞也直接与肿瘤细胞融合 (Kugler等人, 2000年, 自然医学 6: 332-336)。作为一种疫苗接种方法,DC免疫可以与CD40激动剂有效地结合,以激活 (释放) 更

有效的抗肿瘤反应。本文所述的多特异性抗体也可与标准癌症治疗(例如手术、放疗及化疗)结合。CD40激动剂可以有效地与化疗方案相结合。在这些情况下,可能会减少施用的化疗试剂的剂量(Mokyr等人,1998年,癌症研究(Cancer Research) 58:5301-5304)。这种组合的一个例子是抗人CD40抗体(anti-huCD40antibody)与去卡巴嗪(decarbazine)组合用于治疗黑色素瘤。这种组合的另一个示例是本文所述的多特异性抗体与白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)组合用于治疗黑色素瘤。组合使用CD40激动剂及化疗的科学依据是,细胞死亡是大多数化疗药物的细胞毒性作用的结果,应导致抗原呈现途径中的肿瘤抗原水平升高。其他可能通过细胞死亡与CD40激动剂协同作用的组合治疗包括放射、手术及激素剥夺。这些方案中的每一个都会在宿主体内产生肿瘤抗原源。血管生成抑制剂也可以与CD40激动剂结合。抑制血管生成导致肿瘤细胞死亡,这可能将肿瘤抗原输入宿主抗原呈现途径。

[0190] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。其中许多机制可以通过肿瘤表达的免疫抑制蛋白失活来克服。其中包括TGF- β (Kehrl等人,1986年,J.Exp.Med.163:1037-1050)、IL-10 (Howard及O'Garra,1992年,今日免疫学(Immunology Today) 13:198-200)及Fas配体(Hahne等人,1996年,科学(Science) 274:1363-1365)。针对这些实体的抗体可与抗人类CD40抗体结合使用,以抵消免疫抑制剂的作用,并有利于宿主的肿瘤免疫反应。

[0191] 本文所述的多特异性抗体能够有效替代T细胞辅助活性。Ridge等人,1998年,自然393:474-478。激活针对T细胞共刺激分子的抗体,如CTLA-4(例如,美国专利号5811097)、OX-40 (Weinberg等人,2000年,免疫学(Immunol) 164:2160-2169)、CD137/4-1BB (Melero等人,1997年,自然医学3:682-685,1997年)、及ICOS (Hutloff等人,1999年,自然397:262-266)也可能提高T细胞活化水平。PD1或PD-L1的抑制剂也可与本文所述的多特异性抗体结合使用。

[0192] 还有一些实验治疗方案涉及抗原特异性T细胞的体外激活及扩增,以及将这些细胞过继转移到受体中,以刺激抗原特异性T细胞对抗肿瘤 (Greenberg&Riddell,1999年,自然285:546-51)。这些方法也可用于激活T细胞对CMV等传染源的反应。在本文所述的多特异性抗体存在下的体外激活可以增加过继转移T细胞的频率及活性。

[0193] 在另一方面,本文所述的本发明提供了一种治疗一受试者中的一传染病的方法,包括向一受试者施用本文所述的多特异性抗体,从而治疗所述受试者的所述传染病。

[0194] 与上文讨论的其在肿瘤中的应用类似,抗体介导的CD40激动剂可单独使用,或作为佐剂与疫苗组合使用,以增强对病原体、毒素及自身抗原的免疫反应。这种治疗方法特别有用的病原体示例包括目前没有有效疫苗的病原体、或常规疫苗不完全有效的病原体。这些包括但不限于HIV、肝炎(A、B及C)、流感、疱疹(Herpes)、贾第虫(Giardia)、疟疾(Malaria)、利什曼原虫(Leishmania)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)。CD40激动剂对于在感染过程中呈现改变抗原的HIV等病原体引起的既定感染尤其有用。这些新的表位在服用抗人类CD40抗体时被认为是外来的,因此引起强烈的T细胞反应。

[0195] 可通过本文所述方法治疗的引起感染的致病性病毒的一些示例包括HIV、肝炎(A、B或C)、疱疹病毒(herpes virus)(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II及CMV、Epstein-Barr病毒)、腺病毒(adenovirus)、流感病毒、黄病毒(flaviviruses)、回声病毒(echovirus)、鼻病

毒(rhinovirus)、柯萨奇病毒(coxsackie virus)、冠状病毒(coronavirus)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)、腮腺炎病毒(mumps virus)、轮状病毒(rotavirus)、麻疹病毒(measles virus)、风疹病毒(rubella virus)、细小病毒(parvovirus)、痘苗病毒(vaccinia virus)、HTLV病毒、登革热病毒(dengue virus)、乳头状瘤病毒(papillomavirus)、软体动物病毒(molluscum virus)、脊髓灰质炎病毒(poliovirus)、狂犬病病毒(rabies virus)、JC病毒及虫媒病毒性脑炎病毒(arboviral encephalitis virus)。

[0196] 可通过本文所述方法治疗的引起感染的病原菌的一些示例包括衣原体(chlamydia)、立克次体细菌(rickettsial bacteria)、分枝杆菌(mycobacteria)、葡萄球菌(staphylococci)、链球菌(streptococci)、肺炎球菌(pneumococci)、脑膜炎球菌(meningococci)及淋球菌(gonococci)、克雷伯菌(klebsiella)、变形杆菌(proteus)、沙雷菌(serratia)、假单胞菌(pseudomonas)、军团菌(legionella)、白喉(diphtheria)、沙门氏菌(salmonella)、杆菌(bacilli)、霍乱(cholera)、破伤风(tetanus)、肉毒中毒(botulism)、炭疽(anthrax)、鼠疫(plague)、钩端螺旋体病(leptospirosis)及莱姆病细菌(Lyme disease bacteria)。

[0197] 可通过本文所述方法治疗的引起感染的致病真菌的一些示例包括念珠菌(Candida)(白色念珠菌((albicans)、krusei、光滑念珠菌(glabrata)、热带念珠菌(tropicalis)等)、新生隐球菌(Cryptococcus neoformans)、曲霉(Aspergillus)(熏蒸菌(fumigatus)、尼日尔(niger)等)、粘液属(Genus Mucorales)(毛霉(mucor)、absidia、根霉(rhizopus))、申克孢子丝菌(Sporothrix schenckii)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、巴西副球虫(Paracoccidioides brasiliensis)、球虫病(Coccidioides immitis)及组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)。

[0198] 可通过本文所述方法治疗的引起感染的致病性寄生虫的一些示例包括溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、大肠杆菌(Balantidium coli)、奈格里亚福列里(Naegleria fowleri)、棘阿米巴(Acanthamoeba sp.)、贾第鞭毛虫赞比亚(Giardia Zambia)、隐孢子虫(Cryptosporidium sp.)、卡氏肺孢子虫(Pneumocystis carinii)、间日疟原虫(Plasmodium vivax)、微小巴贝斯虫(Babesia microti)、布氏锥虫(Trypanosoma brucei)、克鲁兹锥虫(Trypanosoma cruzi)、杜氏利什曼原虫(Leishmania donovani)、弓形虫(Toxoplasma gondii)、巴西尼伯龙线虫(Nippostrongylus brasiliensis)。

[0199] 在上述所有方法中,CD40激动剂可以与其他形式的免疫治疗相结合,例如细胞因子治疗(例如干扰素、GM-CSF、g-CSF、IL-2)或双特异性抗体治疗,其提供增强的肿瘤抗原呈现。例如,参见Holliger(1993年)美国国家科学院院刊(美国)90:6444-6448;Poljak(1994年)结构(Structure)2:1121-1123。

[0200] 本文所述的多特异性抗体可用于通过将本文所述的多特异性抗体与感兴趣的抗原(例如疫苗)共同施用来增强抗原特异性免疫反应。因此,本文提供了在一受试者中增强对一抗原的一免疫反应的数个方法,包括向受试者施用:(i)抗原;及(ii)本文所述的多特异性抗体,从而增强所述受试者对所述抗原的一免疫反应。例如,抗原可以是肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。此类抗原的非限制性示例包括上述章节中讨论的那些,例如上述肿瘤抗原(或肿瘤疫苗),或来自上述病毒、细菌或其他病原体的抗原。

[0201] 如前所述,本文所述的多特异性抗体可与一种或其他多种治疗剂(例如细胞毒性剂、放射毒性剂)共同施用。抗体可以与试剂连接(作为免疫复合物),也可以与试剂分开施用。在后一种情况下(单独施用),抗体可以在药剂之前、之后或与药剂同时施用,或者可以与其他已知疗法(例如抗癌疗法,例如放射疗法)共同施用。除其他之外,此类治疗剂包括抗肿瘤剂,例如阿霉素(doxorubicin)(阿霉素(adriamycin))、硫酸顺铂博莱霉素(cisplatin bleomycin sulfate)、卡莫司汀(carmustine)、氯氨苄(chlorambucil)、达卡巴嗪(dacarbazine)及环磷酰胺羟基脲(cyclophosphamide hydroxyurea),其本身仅在对患者有毒或亚毒性的水平下有效。顺铂(Cisplatin)每四周静脉注射一次,剂量为100毫克/毫升,阿霉素(adriamycin)每21天静脉注射一次,剂量为60-75毫克/毫升。本文所述的多特异性抗体与化疗药物的共同施用提供了两种通过不同机制发挥作用的抗癌药物,其对人类肿瘤细胞产生细胞毒性作用。这种共同施用可以解决由于对药物产生耐药性或肿瘤细胞抗原性改变而导致其与抗体不反应的问题。

[0202] 多特异性抗体(multispecific antibody)(复数也称为“多特异性抗体(multispecific antibodies)”)可提供给受试者本身,或在其与合适载体或赋形剂混合的药物组合物中提供。

[0203] 如本文所用,“药物组合物”是指本文所述的一种或多种活性成分与其他化学成分(例如生理上合适的载体及赋形剂)的制备。药物组合物的目的是促进向生物体施用化合物。

[0204] 此处术语“活性成分”是指对生物效应负责的多特异性抗体。

[0205] 在下文中,可以互换使用的短语“生理上可接受的载体”及“医药上可接受的载体”指的是不会对生物体造成显着刺激并且不会消除施用化合物的生物活性及性质的载体或稀释剂。这些短语中包括佐剂。

[0206] 在此,术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。赋形剂的示例(但不限于)包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖及类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油及聚乙二醇。

[0207] 药物的处方及施用技术可在“雷明顿制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版本”中找到,通过引用将其并入本文。

[0208] 例如,合适的施用途径可以包括口服、直肠、跨粘膜,尤其是经鼻、肠或肠外施用,包括肌肉注射、皮下注射及髓内注射以及鞘内、直接脑室内、心内施用,例如进入右心室或左心室腔、进入总冠状动脉、静脉内施用、经皮施用、经鼻施用、或眼内注射。

[0209] 向中枢神经系统(CNS)输送药物的传统方法包括:神经外科策略(例如,脑内注射或脑室内输注);试剂的分子操作(例如,生产包含对内皮细胞表面分子具有亲和力的运输胜肽的嵌合融合蛋白,与自身不能穿过BBB的试剂结合),以尝试利用BBB的所述数个内源性运输途径中的一者;设计成增加制剂的脂溶性的药理学策略(例如,水溶性制剂与脂质或胆固醇载体的结合);以及通过高渗破坏(由于将甘露醇溶液注入颈动脉或使用生物活性剂,如血管紧张素胜肽)暂时破坏血脑屏障的完整性。然而,这些策略中的每一种都有局限性,例如与侵入性手术相关的固有风险、由内源性转运系统固有的局限性施加的尺寸限制、与系统施用由可能在中枢神经系统外活跃的载体基序组成的嵌合分子相关的潜在不良生物副作用,此外,BBB被破坏的大脑区域内可能存在脑损伤的风险,这使得它成为一种次优的

施用方法。

[0210] 或者,可以局部而非全身地施用药组合物,例如,通过将药物组合物直接注射到患者的组织区域中。

[0211] 本发明的一些实施例的药物组合物可以通过本领域众所周知的方法来制造,例如通过传统的混合、溶解、造粒、制备凝胶、征税、乳化、封装、包埋或冻干方法。

[0212] 因此,根据本发明一些实施例使用的药物组合物可以使用一种或多种生理上可接受的载体(包括赋形剂及助剂)以常规方式配制,这些载体有助于将活性成分加工成可用于医药的制剂。正确的配方取决于选择的施用途径。

[0213] 对于注射,药物组合物的活性成分可以在水溶液中配制,优选在生理相容的缓冲液中,例如汉克溶液(Hank's solution)、林格溶液(Ringer's solution)或生理盐缓冲液。对于透粘膜施用,配方中使用适合待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中是众所周知的。

[0214] 对于口服施用,可通过将活性化合物与本领域公知的医药上可接受的载体结合来容易地配制药组合物。这种载体使药物组合物能够配制成片剂、药丸、制剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,以供患者口服。可使用固体赋形剂制备口服药理学制剂,可选地研磨所获得的混合物,并在添加合适的助剂(如需要)后处理颗粒混合物,以获得片剂或糖衣核(dragee core)。合适的赋形剂尤其是填充剂,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芩胶(gum tragacanth)、甲基纤维素(methyl cellulose)、羟丙基甲基纤维素(hydroxypropylmethyl-cellulose)、羧甲基纤维素钠(sodium carbomethylcellulose);及/或生理上可接受的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,PVP)。如果需要,可以添加崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮(cross-linked polyvinyl pyrrolidone)、琼脂或褐藻酸或其盐,例如海藻酸钠(sodium alginate)。

[0215] 数个糖衣核(dragee cores)配有合适的数个涂层。为此,可使用浓缩糖溶液,其可任选包含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone)、卡波姆凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇、二氧化钛、油漆溶液及合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可添加到片剂或糖衣涂层中以进行识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0216] 可口服的药物组合物包括由明胶制成的推入式胶囊以及由明胶及增塑剂(例如甘油或山梨醇)制成的软密封胶囊。推装胶囊可包含与填料(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)、润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)及稳定剂(可选)混合的活性成分。在软胶囊中,活性成分可以溶解或悬浮在适当的液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,可以添加稳定剂。所有口服制剂的剂量应适合所选的施用途径。

[0217] 对于口腔施用,所述数个组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0218] 对于经鼻吸入施用,根据本发明一些实施例使用的活性成分以气溶胶喷雾形式方便地从加压包装或雾化器中输送,使用合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷(dichlorodifluoromethane)、三氯氟甲烷(trichlorofluoromethane)、二氯四氟乙烷(dichloro-tetrafluoroethane)或二氧化碳。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供一个阀门来提供计量量来确定。用于分配器中的明胶等胶囊及药筒可配制为包含化合物的粉末混合物及适当的粉末基质,例如乳糖或淀粉。

[0219] 本文所述的药物组合物可配制用于肠外施用,例如通过团注或连续输注。注射用制剂可以单位剂型呈现,例如在安瓿中或在多剂量容器中(可选)添加防腐剂。所述数个组合物可以是油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液,并且可以包含配方剂,例如悬浮剂、稳定剂及/或分散剂。

[0220] 用于肠外施用的药物组合物包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。此外,活性成分的悬浮液可根据需要制备油基或水基注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油(如芝麻油)、或合成脂肪酸酯(如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体)。含水注射悬浮液可能含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。可选地,悬浮液还可包含适当的稳定剂或药剂,其增加活性成分的溶解度以允许制备高浓度溶液。

[0221] 或者,活性成分可以是粉末形式,以便在使用前与适当的载体(例如无菌、无热原的水基溶液)组成。

[0222] 本发明的一些实施例的药物组合物也可以使用传统的栓剂基质(例如可可脂或其他甘油酯)在直肠组合物(例如栓剂或保留灌肠)中配制。

[0223] 适于在本发明的一些实施例中使用的药物组合物包括其中活性成分的含量有效地达到预期目的的组合物。更具体而言,一治疗有效量是指有效预防、缓解或改善疾病(例如癌症)症状或延长受治疗者生存期的活性成分(多特异性抗体)的量。

[0224] 一治疗有效量的测定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文提供的详细公开。

[0225] 对于本发明方法中使用的任何制剂,治疗有效量或剂量可最初从体外及细胞培养分析中估计。例如,可以在动物模型中制定剂量,以达到所需的浓度或滴度。这些信息可用于更准确地确定人体的有效剂量。

[0226] 本文所述活性成分的毒性及治疗效果可通过体外、细胞培养或实验动物中的标准药物程序确定。从这些体外及细胞培养试验以及动物研究中获得的数据可用于制定一系列用于人体的剂量。剂量可能因使用的剂型及使用的施用途径而异。具体的处方、施用途径及剂量可由个体医生根据患者的情况选择。(例如,参见Fingl等人,1975年,在“治疗学的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics)”一文中,第1章第1页)。

[0227] 剂量及间隔可以单独调整,以提供组织水平的活性成分足以诱导或抑制生物效应(最小有效浓度(minimal effective concentration),MEC)。每种制剂的MEC不同,但可以根据体外数据进行估计。实现MEC所需的剂量将取决于个体特征及施用途径。检测分析可用于确定血浆浓度。

[0228] 由于其靶向特异性,多特异性抗体的使用剂量可高于单特异性CD40抗体的使用剂量(参见图7A至图7D)。

[0229] 根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-100mg/kg。

[0230] 根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-100mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-80mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-60mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-50mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-40mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-30mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-20mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为0.1-10mg/kg。根据一具体实施例,多特异性抗体的剂量可为1-

100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为10-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为20-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为30-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为40-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为50-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为60-100mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为70-100mg/kg。

[0231] 根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为1-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为1-15mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为1-10mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为1-5mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为2-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为4-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为6-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为8-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为10-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为12-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为15-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为18-20mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为1-5mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为2-10mg/kg。根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量可为5-10mg/kg。

[0232] 根据一具体实施例，多特异性抗体的剂量至少是抗CD40单特异性抗体耐受剂量的5倍、10倍、15倍、20倍或更多。

[0233] 根据待治疗疾病的严重程度及反应性，可以单次或多次施用，疗程从几天到几周，或者直到治愈或疾病状态减轻达成。

[0234] 当然，服用成分的量取决于所治疗的受试者、痛苦的严重程度、服用方式、处方医生的判断等。

[0235] 如果需要，本发明的一些实施例的组合物可以在包装或分配器装置中呈现，例如FDA批准的试剂盒，其可以包含一个或多个包含活性成分的单位剂型。例如，所述包装可以包括金属或塑料箔，例如泡罩包装。包装或分配器装置可随附施用说明。所述包装或分配器也可通过与容器相关的通知进行调节，通知的格式由管制药品制造、使用或销售的政府机构规定，所述通知反映了所述机构对成分或人类或兽医管理形式的批准。例如，此类通知可能是美国食品及药物管理局批准的处方药标签或批准的产品说明书。如上文所述，还可以制备包含在兼容药物载体中配制的本发明制剂的组合物，将其放置在适当的容器中，并对其进行标记，以处理指示的条件。

[0236] 还考虑了与本教导的多特异性抗体的药物组合，例如与免疫检查点调节剂，例如抗CTLA4、抗CD40、抗41BB、抗OX40、抗PD1或抗PDL1。根据一具体实施例，免疫检查点调制剂为抗PD1或抗PDL1。

[0237] 预计在本申请到期的专利有效期内，将开发许多相关的激动性CD40抗体，抗CD40抗体一词的范围旨在先验地包括所有此类新技术。

[0238] 如本文所用，术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0239] 术语“包括”、“包含”、“包括”（例如“comprises”、“comprising”、“includes”）、“具有”及其共轭物是指“包括但不限于”。

[0240] “由...组成”一词是指“包括并限于”。

[0241] 术语“基本上由...组成”是指组合物、方法或结构可以包括额外的成分、步骤及/或

部分,但前提是额外的成分、步骤及/或部分不会实质性地改变所要求的组合物、方法或结构的基本及新特征。

[0242] 如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一”及“所述”包括复数引用。例如,术语“化合物”或“至少一化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0243] 在本申请中,本发明的各种实施例可以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅为方便及简洁,不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,范围的描述应被视为已具体公开了所述范围内所有可能的子范围以及单个数值。例如,对范围(例如1到6)的描述应被视为具有具体公开的子范围(例如1到3、1到4、1到5、2到4、2到6、3到6等)以及所述范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5及6。这适用于范围的宽度。

[0244] 每当本文指示数字范围时,其意味着包括任何引用的数字(分数或整合式)在指示范围内。短语“在”第一指示数及第二指示数“之间的范围”及“从”第一指示数“到”第二指示数之间的“范围”在本文中互换使用,并意味着包括第一及第二指示数以及所有小数及整合式其中的数字。

[0245] 如本文所用,术语“方法”指完成给定任务的方式、方法、技术及程序,包括但不限于化学、药理学、生物、生物化学及医学领域的从业者已知的或从已知的方式、方法、技术及程序发展而来的那些方式、方法、技术及程序。

[0246] 如本文所用,术语“治疗”包括消除、实质上抑制、减缓或逆转疾病的进展,实质上改善疾病的临床或美学症状,或实质上防止疾病的临床或美学症状的出现。

[0247] 当提及特定序列列表时,此类提及应理解为还包括基本上与其互补序列对应的序列,包括由例如测序错误、克隆错误或导致碱基替换、碱基删除或碱基添加的其他改变引起的微小序列变化,前提是此类变异的频率小于50个核苷酸中的1个,或者小于100个核苷酸中的1个,或者小于200个核苷酸中的1个,或者小于500个核苷酸中的1个,或者小于1000个核苷酸中的1个,或者小于5000个核苷酸中的1个,或者小于10000个核苷酸中的1个。

[0248] 应理解,为清楚起见,在单独实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中组合提供。相反地,为简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独提供,或者在任何合适的子组合中提供,或者在本发明任何其他描述的实施例中提供。除非不具有这些元件时所述实施例不起作用的情况,在各种实施例的上下文中描述的某些特征不应被视为这些实施例的基本特征。

[0249] 如上所述及在下面的权利要求部分中所述的本发明的各种实施例及方面在以下范例中找到了实验性支持。

[0250] 数个范例

[0251] 现在请参照以下范例,其与上述描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施例。

[0252] 通常,本文使用的术语及本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物及重组DNA技术。这些技术在文献中有详细解释。例如,参见“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:a laboratory Manual)”,Sambrook等人(1989年);“分子生物学中的当前协议(Current Protocols in Molecular Biology)”卷I-III Ausubel,R.M.编辑(1994年);Ausubel等人,“分子生物学的当前方案(Current Protocols in Molecular Biology)”,John Wiley及Sons,马里兰州巴尔的摩(1989年);Perbal,“分子克隆实用指南

(A Practical Guide to Molecular Cloning)”, John Wiley及Sons, 纽约(1988年); Watson等人, 重组DNA (Recombinant DNA), 美国科学出版社 (Scientific American Books), 纽约; Birren等人编辑“基因组分析: 实验室手册系列 (Genome Analysis: a Laboratory Manual Series)”, 卷1-4, 冷泉港实验室出版社 (Spring Harbor Laboratory Press), 纽约(1998年); 美国专利号4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5192659及5272057所述的方法; “细胞生物学: 实验室手册 (Cell Biology: a Laboratory Handbook)”, 卷I-III, Cellis, J.E. 编辑(1994年); 动物细胞培养-基本技术手册 (Culture of Animal Cells-a Manual of Basic Technique), Freshney, Wiley Liss, 纽约(1994年), 第三版; “免疫学中的当前协议 (Current Protocols in Immunology)”, 卷I-III, Coligan J.E. 编辑(1994年); Stites等人编辑, “基础及临床免疫学 (Basic and Clinical Immunology)” (第8版), Appleton及兰格, 诺沃克, 康涅狄格州(1994年); Mishell及Shiigi编辑, “细胞免疫学中的选定方法 (Selected Methods in Cellular Immunology)”, W.H. Freeman及Co., 纽约(1980年); 专利及科学文献中广泛描述了可用的免疫分析, 例如, 参见美国专利。号3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5011771及5281521; “寡核苷酸合成 (Oligonucleotide Synthesis)”, Gait, M.J. 编辑(1984年); “核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization)” Hames, B.D. 及 Higgins S.J. 编辑(1985年); “转录与转译 (Transcription and Translation)” Hames, B.D. 及 Higgins S.J. 编辑(1984年); “动物细胞培养 (Animal Cell Culture)” Freshney, R.I. 编辑(1986年); “固定化细胞及酶 (Immobilized Cells and Enzymes)”, IRL出版社, (1986年); “分子克隆实用指南 (A Practical Guide to Molecular Cloning)” Perbal, B. (1984年) 及 “酶学方法 (Methods in Enzymology)”, 卷1-317, 学术出版社; “PCR协议: 方法及应用指南 (PCR Protocols: a Guide To Methods And Applications)”, 学术出版社, 加利福尼亚州圣地亚哥(1990年); Marshak等人, “蛋白质纯化及表征策略-实验室课程手册 (Strategies for Protein Purification and Characterization-a Laboratory Course Manual)”, CSHL出版社(1996年); 所有这些内容均通过引用合并, 如同在本文中完全阐述一样。本文件提供了其他一般参考。其中的程序被认为是本领域众所周知的, 并且是为了方便读者而提供的。此处包含的所有信息通过引用并入本文。

[0253] 范例1

[0254] 数个材料及数个方法

[0255] 小鼠

[0256] 如前所述(10)(15)生成并表征了含有人类Fc受体 (Fc γ R α null、hFc γ RI+, Fc γ RII α R131+, Fc γ RIIb+, Fc γ RIII α F158+, Fc γ RIIIIB+) 及人类CD40的人源化小鼠。所有实验均使用8-10周龄的小鼠。所有小鼠均在魏茨曼科学研究所动物设施中心饲养。

[0257] 抗CD40/DC单特异性或双特异性抗体Fc变体的产生

[0258] 抗人类CD40抗体2141为专利US7338660 (ATCC登录号PTA-3605, 天然Fc) 中提到的克隆21.4.1, 合成了2141的可变重区及轻区 (Genewiz)。产生杂交瘤的亲代小鼠IgG1抗人类/小鼠DEC-205抗体、克隆HD-109及亲代亚美尼亚仓鼠IgG抗小鼠CD11c抗体、克隆N418分别由洛克菲勒大学及ATCC提供。根据制造商的说明, 使用RLM-RACE (ThermoFisher) 通过

cDNA末端扩增法(“锚定(anchored)”PCR)从杂交瘤RNA中测序HD-109及N418的可变重区及轻区序列。对于可变重区及轻区的扩增,使用外部及内部寡核苷酸进行PCR:克隆HD-109重链的外部小鼠IgG1重链5'-TCATTACCAGAGAGTGG(序列编号43)及内部小鼠IgG1重链5'-AGAGGCTCTCAGATGGTGC(序列编号44)、克隆N418重链的外仓鼠IgG重链5'-GCTCACGCATGT(序列编号45)及内仓鼠IgG重链5'-GAATAGCCTTGACCAGCATCC(序列编号46)、克隆HD-109轻链的外部小鼠IgG1 kappa轻链5'-AACATCATTCCCTCCTGTGAAG(序列编号47)及内部小鼠IgG1 kappa轻链5'-GCTCTTGAGATGTGTGAGTTGAGTC(序列编号48)、克隆N418轻链的外仓鼠IgG轻链5'-CTAACACTCATTCTGTTCAGGTCTTG(序列编号49)及内仓鼠IgG轻链5'-GCTGCTCAGCTAGGGTGCTGTC(序列编号50)。从杂交瘤中克隆亲本抗体的可变区序列,并将其插入具有单克隆人类IgG1或人类kappa Fc骨干的哺乳动物表达载体或先前描述的双特异性载体(Merchant等人,1998年;Ridgway等人,1996年;Schaefer等人,2011年)。为了正确的重轻链配对,其中一个亲本单抗以交叉单抗格式表达(CH1-CL交换),而对于另一个单抗,保持野生型结构域结构(Schaefer等人,2011年)。对于重链异二聚体,在CH3结构域中引入点突变:Y349C/T366S/L368A/Y407V,用于第一单抗(抗DC标记抗体);S354C/T366W用于第二单抗(抗CD40)(Merchant等人,1998年;Ridgway等人,1996年)。为了产生人类IgG1的Fc结构域变体(N297A/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R(V11)N297(不招募受体),根据制造商的说明,在通过PCR(安捷伦技术(Agilent Technologies))进行定点突变的基础上,使用特异性引物进行定点突变。通过直接测序(魏茨曼科学研究所生命科学核心设施(Life science core facility,Weizmann Institute of Science))验证突变质粒序列。为了产生抗体,将抗体重链及轻链表达载体瞬时转染到Expi293细胞(ThermoFisher)。上清液中分泌的抗体通过蛋白质G Sepharose 4Fast Flow(GE Healthcare)纯化。纯化抗体在PBS中透析并无菌过滤(0.22μm)。通过SDS-PAGE及考马斯染色评估纯度,估计纯度为90%以上。在Äkta纯25FPLC系统上,使用Superse 6Increase 10/300GL柱(GE Healthcare)进行尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography,SEC)。

[0259] CD40、DEC-205及CD11c结合ELISA

[0260] 使用重组人类CD40(SINO-BIOLOGICAL)、人类DEC-205(SINO-BIOLOGICAL)及小鼠CD11c(R&D系统)通过ELISA测定单特异性及双特异性抗体的结合特异性及亲和力。将人类CD40或人类DEC-205(1μg/mL/孔)或小鼠CD11c(5μg/mL/孔)的重组胞外结构域在4℃下包被ELISA板(Nunc)过夜。所有连续步骤均在室温下进行。洗涤后,用含有2%牛血清白蛋白的1xPBS将平板封闭1小时,然后用连续稀释的IgG(在含有2%牛血清白蛋白的1xPBS中连续稀释1:5)培育1小时。对于双结合ELISA测定,将平板与生物素化的人类CD40(Acrobiosystems)一起培育1小时。洗涤后,用辣根过氧化物酶结合抗人类IgG(horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG)(Jackson ImmunoResearch)或辣根过氧化物酶结合链霉亲和素(horseradish peroxidase-conjugated Streptavidin)(Biolegend)将培养皿培育1小时。使用单组分基质溶液(TMB)进行检测,并添加0.18M硫酸停止反应。使用SpectraMax Plus分光光度计(分子装置)立即记录450nm处的吸光度,并减去阴性对照样品的背景吸光度。

[0261] 流式细胞术

[0262] 如上所述制备单细胞悬浮液。对于表面染色,细胞被镀在U形96孔板

(ThermoFisher) 中, 在100 μ l PBS中浓度为0.2-1 $\times 10^6$ 个细胞。首先用LIVE/DEADTM可固定的蓝色死细胞 (ThermoFisher) 来将细胞染色, 然后用PBS洗涤两次, 然后用人类或小鼠 TruStain Fc块 (BioLegened) 重新悬浮在25 μ lFACS缓冲液中, 并在室温下培育15分钟。表面抗原在FACS缓冲液中在冰上染色30分钟。然后用流式细胞仪缓冲液洗涤细胞两次, 再悬浮在150 μ l的流式细胞仪缓冲液中, 并通过流式细胞仪进行分析。对于细胞内IL-6染色, 使用 True-NuclearTM进行额外的染色步骤。根据制造商的说明, 转录因子缓冲液集试剂盒 (BioLegened) 及抗IL-6 (MP5-20F3) (BioLegened)。所有样本均在CytoFLEX LX (Beckman Coulter) 上进行分析。除非另有说明, 否则细胞群由以下标记物 (BioLegened) 定义: 树突状细胞: CD45⁺ (30F11)、CD11c⁺ (N418)、MHC II⁺ (M5/11415.2)、F4/80⁻ (BM8)。巨噬细胞: CD45⁺、CD11b⁺ (M1/70)、MHC II⁺、F4/80⁺、Ly6C⁻ (HK1.4)、Ly6G⁻ (1A8)。单核细胞: CD45⁺、CD11b⁺、Ly6C⁺、F4/80⁻、CD11c⁻。B细胞: CD45⁺、CD19⁺ (1D3)。cDC1: CD45⁺、MHC II⁺、CD11c⁺、XCR1⁺ (ZET)、CD19⁻、CD64⁻ (10.1)、F4/80⁻、SIRP α ⁻ (P84)。cDC2: CD45⁺、MHC II⁺、CD11c⁺、SIRP α ⁺、CD19⁻、CD64⁻、F4/80⁻、XCR1⁻。如前所述 (Sierro等人, 2017年), 使用以下表面标记物对肝脏 cDC1、cDC2、库普弗细胞 (Kupffer cell) 及非库普弗细胞巨噬细胞 (non-Kupffer cell macrophages) 进行闸控 (gated): CD45、MHC II、CD11b、CD11c、CD64 (X54-5/7.1)、F4/80、Ly6C、Tim4 (RMT4-54)、CX3CR1 (SA011F11)。对于CD40、CD86、CD80及DEC-205的表达, 使用以下克隆: CD40 (3/23)、CD86 (GL-1)、CD80 (16-10A1) 及DEC-205 (NLDC-145)。

[0263] DC优先结合试验

[0264] 如上所述, 从人源化CD40/Fc γ R小鼠中获取脾脏, 并制备单细胞悬液。使用表面CD19或CD11b标记物以及CD40单抗或CD40/CD11c-bsAb对脾细胞进行染色。在流式细胞仪分析之前, 用FACS缓冲液洗涤细胞两次, 并在冰上的FACS缓冲液中用PE结合抗人类IgG (Jackson ImmunoResearch) 染色。

[0265] 人类树突状细胞激活试验

[0266] 通过Ficoll分离 (GE Healthcare) 从健康献血者的新鲜全血中分离PBMC。根据制造商的说明 (Miltenyi Biotec), 使用CD14微珠阳性选择来分离出人类单核细胞 (CD14⁺)。在含有10%热灭活FBS、1%Pen Strep、100ng/mL GM-CSF (PeproTech) 及100ng/mL IL-4 (PeproTech) 的RPMI培养基中, 在6孔板中每孔培育4 $\times 10^6$ 个细胞单核细胞。在第2天及第5天补充培养基。第7天采集单核细胞衍生的未成熟树突状细胞。为了进行CD54及CD86的上调分析, 单核细胞衍生的未成熟树突状细胞以1 $\times 10^5$ 个细胞/孔涂覆于U形96孔组织培养板中 (ThermoFisher)。将图3A及图4B中所示的抗体添加到孔中, 并在37 $^{\circ}$ C下培育过夜。收集细胞并用以下标记物染色: CD86 (BU63)、CD54 (HA58)。流式细胞仪分析样本。

[0267] OVA特异性T细胞反应

[0268] 在存在或不存在5mg/kg大鼠抗小鼠CD40单克隆抗体 (FGK4.5) (BioXCell) 或0.1-10mg/kg抗人类CD40单抗或双特异性抗体的情况下, 小鼠 (图8A+B中的WT或BATF3^{-/-}, 所有其他中的hCD40/Fc γ R) 通过腹腔注射50mg/kg卵清蛋白 (Ovalbumin) (Sigma) 进行免疫。7天后, 收集外周血并用APC结合的抗CD8 α (53-6.7) (BioLegened) 及PE结合的OVA胜肽SIINFEKL H-2b四聚体 (Tet-OVA, MBL国际公司) 染色, 并通过流式细胞术进行分析。对于表达OVA的B16肿瘤模型 (B16-OVA) 中的特定T细胞反应, 将2 $\times 10^5$ 个B16-OVA细胞皮下植入小鼠。肿瘤形成时 (肿瘤长度及宽度的总合约为50mm³) 用5mg/kg大鼠抗小鼠CD40单抗治疗小鼠, 3天后重复

治疗。第7天,收集外周血并按上述方法处理。

[0269] 血清转氨酶及H&E染色

[0270] 小鼠(WT、BATF3^{-/-}、CD11c-DTR或hCD40/Fc γ R)通过腹腔注射5mg/kg大鼠抗小鼠CD40单抗或0.1-10mg/kg抗人类CD40单抗或双特异性抗体来治疗。24小时后,将外周血收集到凝块激活剂血清管中(Becton Dickinson)。让血液在室温下凝结30分钟,然后在3500rpm下离心10分钟,并由商业实验室(美国医学实验室(American Medical Laboratories, AML),以色列)测定血清中的肝转氨酶(ALT/AST)水平。采集治疗动物的肝脏,放置在4%多聚甲醛(PFA)中过夜,然后进行石蜡处理,在魏茨曼科学研究所组织学及病理学单位魏茨曼科学研究所病理科(Histology&Pathology unit of the Weizmann Institute of Science)检查时用苏木精及伊红(H&E)染色。使用全景扫描II扫描器(Pannoramic scan II scanner)(3DHISTECH)扫描载玻片,并使用CaseViewer软件获得图像。

[0271] 血清及细胞内细胞因子分析

[0272] 通过腹腔将0.1-10mg/kg抗人类CD40单特异性或双特异性抗体注射给hCD40/Fc γ R小鼠,并在3小时后放血以收集血清。使用根据制造商的说明(BioLegend)提供的ELISA MAXTM豪华套组(ELISA MAXTM Deluxe Set kits)来定量IL-6及TNF- α 水平。为了检测细胞内IL-6,给小鼠注射2.5mg/kg或0.5mg/kg的抗人类CD40单克隆抗体,并在2.5小时后放血进行细胞内IL-6染色。如上所述,通过流式细胞仪对样品进行评估。

[0273] 肿瘤挑战与治疗

[0274] 肿瘤细胞系在37℃及5%CO₂的加湿培养箱中培育,并在含有25mM HEPES、1%L-谷氨酰胺、10%FBS、1%Pen-Strep、1%非必需氨基酸及1%丙酮酸的完整RPMI培养基中培育。将MC38(2 $\times$ 10⁶)、B16-F10(4 $\times$ 10⁵)、B16-OVA(2 $\times$ 10⁵)及MCA-205(5 $\times$ 10⁵)植入小鼠右侧皮下,每隔2-3天用电子卡尺盲测肿瘤体积。体积使用公式(L2²*L1)/2报告,其中L1是最长直径,L2是最短直径。肿瘤接种后7至10天,当肿瘤长度及宽度的总合达到约50mm³时,根据肿瘤大小将小鼠随机分组(第0天),并按照每个实验所述接受腹腔注射治疗。在第0、3及6天,用100 μ g大鼠抗小鼠CD40单抗或对照PBS来治疗WT及BATF3^{-/-}。在第0、2、4及6天,用CD40单抗或CD40/CD11c-bsAb在其各自的MTD(分别为0.175mg/kg及2.5mg/kg)及/或在第0、3及6天用10mg/kg PD-1IgG1-N297A单抗(克隆RMP-1-14)或对照PBS来治疗hCD40/Fc γ R小鼠。在治疗开始后8-20天内对小鼠进行监测,或直到由于魏茨曼科学研究所IACUC对肿瘤大小的限制而不得不处死大多数未经治疗的对照组。

[0275] 血小板计数

[0276] 对收集到K2E EDTA管(Becton Dickinson)中的小鼠外周血进行血小板计数分析。使用Sysmex XP-300TM自动血液分析器(Sysmex)来分析样本。

[0277] 细胞耗竭研究

[0278] 在CD40治疗前24小时,通过侧尾静脉向小鼠静脉注射10 μ l/g体重的氯膦酸盐脂质体(Clodronate liposomes)(或对照PBS脂质体)(Liposoma BV)以耗尽巨噬细胞,或注射2 μ g/g体重的抗CD42b抗体(R300)(EMFRET Analytics)以耗尽血小板。为了从CD11c-DTR小鼠消耗的耗尽CD11c⁺DC,在CD40治疗前4天及前2天,以4 μ g/kg的剂量腹腔注射白喉毒素(diphtheria toxin,DT)(Sigma)。通过流式细胞术分析或血小板计数评估耗尽效率。

[0279] 范例2

[0280] 结果

[0281] 传统的1型树突状细胞(cDC1)专门用于启动肿瘤特异性CD8⁺T细胞及其在肿瘤中的频率及功能状态与提高癌症患者的生存率及对检查点阻断的反应有关。由于CD40途径在cDC1引发T细胞中起到重要作用,并且cDC1被认为是CD40单克隆抗体的主要靶点,因此本发明人使用cDC1缺陷型Batf3小鼠评估cDC1在不同体内CD40激动性单克隆抗体的活性。用卵清蛋白(ovalbumin,OVA)及CD40单克隆抗体对野生型小鼠进行免疫,可有效激活CD8并使其系统性扩增特异于来自OVA抗原的胜肽的T细胞。Batf3^{-/-}小鼠中OVA特异性T细胞的扩增明显地受损,表示出cDC1在CD40激动性单克隆抗体的佐剂体内T细胞启动活性中的主要作用(图8A)。为了模拟对肿瘤抗原的反应,用表达OVA的B16黑色素瘤细胞接种小鼠,并用CD40单克隆抗体来治疗它们(图8B)。当在治疗开始后7天进行测试时,本发明人观察到野生型血液(但不包括Batf3^{-/-}小鼠)中的OVA特异性CD8⁺的T细胞,表示出cDC1是CD40单克隆抗体治疗中的启动肿瘤特异性CD8⁺T细胞所必需的。与外周组织中的DC相比以及与TME中的其他细胞类型(如巨噬细胞及单核细胞)相比(图8I),TME中的DC上调其CD40表面表达,进一步表示出肿瘤cDC1是CD40单克隆抗体治疗的主要靶标。为了评估cDC1对CD40单克隆抗体治疗的整体抗肿瘤效果的影响,使用了两种对抗CD40单药治疗(anti-CD40 monotherapy)反应良好的肿瘤模型。用CD40单克隆抗体治疗携带MC38结肠腺癌或MCA-205纤维肉瘤的小鼠,并观察其肿瘤生长情况。在野生型小鼠中(但并非在Batf3^{-/-}动物中),肿瘤体积显著地减少(图8C)。因此,cDC1被确定为介导肿瘤特异性CD8⁺T细胞启动及CD40靶向免疫治疗的整体抗肿瘤作用所需的必要细胞群。

[0282] 然后,本发明人评估了树突状细胞在与CD40单抗治疗相关的肝毒性中的作用。通过检测在野生型、cDC1缺陷型Batf3^{-/-}、甚至在CD40单克隆抗体注射前CD11c⁺细胞耗尽的小鼠(pan-DC缺陷型CD11c-DTR老鼠)(图8D)中的肝转氨酶的血液浓度的显著升高,来检测CD40单克隆抗体注射后的肝损伤。因此,树突状细胞不是促进与CD40单克隆抗体治疗相关的肝毒性的细胞群。因此,其他表达CD40的肝常驻细胞群可能介导CD40单抗诱导的肝毒性。由于库普弗细胞(Kupffer cells)及非库普弗肝巨噬细胞(non-Kupffer liver macrophages)不表达CD11c(图8J)且在CD11c-DTR小鼠中并未耗尽,以及库普弗细胞(Kupffer cells)在Batf3^{-/-}小鼠中并未耗尽(图8L),因此它们存在于所有这些小鼠模型中并可能与观察到的毒性有关。因此,决定进一步探讨这些巨噬细胞在肝毒性中的作用。

[0283] 为了鉴定介导与CD40免疫疗法相关的毒性的CD40⁺细胞群,使用了一个小鼠模型,该模型对CD40和所有Fc受体(hCD40/Fc γ Rs)完全人源化;该菌株概括了临床环境中报道的人类CD40单克隆抗体的剂量限制毒性和其他生物活性。为了评估CD40介导的肝毒性,hCD40/Fc γ R小鼠被注射了完全人类Fc工程改造的CD40激动剂(2141-V11),这是Selicrelumab的第二代Fc优化版本,其中人类IgG1 Fc被突变以选择性地增强结合对人类抑制性Fc γ R、Fc γ RIIB,从而提供最佳CD40激动所需的交联。该分子目前正在早期临床试验中进行评估(ClinicalTrials.gov鉴定:NCT04059588、NCT04547777)。正如先前报导的那样,单次CD40单克隆抗体注射导致血清肝转氨酶水平快速升高,表明肝损伤以肝细胞凝固性坏死和肝窦血栓形成为特征(图8E)。当巨噬细胞和吞噬细胞(包括肝巨噬细胞和库普弗细胞,但不包括DCs(图8M))在CD40 mAb注射前使用氯膦酸盐脂质体诱导时,肝毒性被消除(图8E和图8N)。本发明人假设巨噬细胞在介导肝毒性中的核心作用可能是由库普弗细胞表

达Fc γ RIIB引起的,导致CD40单克隆抗体的局部交联和随后肝窦中的血小板活化,和/或通过直接CD40途径激活肝巨噬细胞。

[0284] 识别出介导与CD40免疫治疗相关的毒性的CD40⁺细胞群,利用了一种对CD40及所有Fc完全人源化的小鼠模型Fc γ 受体(hCD40/Fc γ Rs);所述菌株概括了临床环境中报告的人类CD40单克隆抗体的剂量限制毒性及附加生物活性。为了评估CD40介导的肝毒性,向hCD40/Fc γ R小鼠注射一完全的人类Fc工程的CD40激动剂(2141-V11),这是第二代Fc优化版本的Selicrelumab,其中人类IgG1 Fc突变以选择性增强与人类抑制性Fc γ R、Fc γ RIIB的结合,从而提供最佳CD40激动剂所需的交联。所述分子目前正在早期临床试验(ClinicalTrials.gov Identification:NCT04059588,NCT04547777)中进行评估。如前所述,单次注射CD40单克隆抗体可导致血清肝转氨酶水平快速升高,表示出肝损伤以肝细胞凝固性坏死及窦性血栓形成为特征(图8E)。当巨噬细胞及吞噬细胞(包括肝巨噬细胞及库普弗细胞(Kupffer cells),但不包括树突状细胞)的系统性耗尽时(图8M),在注射CD40单克隆抗体之前使用氯膦酸脂质体诱导,肝脏毒性被消除(图8E及图8N),本发明人类假设,巨噬细胞在介导肝毒性中的这种中心作用可能是由库普弗细胞(Kupffer cells)的Fc γ RIIB表达而导致CD40单克隆抗体的局部交联及肝窦中随后的血小板活化所引起的,及/或由肝巨噬细胞的直接CD40途径活化引起的。

[0285] 接下来,本发明人希望评估巨噬细胞在抗CD40介导的血小板减少症中的作用。注射CD40单克隆抗体24小时后,血小板计数显着减少;当巨噬细胞在注射CD40单克隆抗体之前耗尽时,这种表型被消除(图8G)。这些结果表示出巨噬细胞在介导抗CD40相关血小板减少中的作用,并表示出肝毒性及血小板减少之间的因果关系,两者均由血小板及巨噬细胞诱导。

[0286] 最后,我们希望评估参与CRS(临床观察到的第三种CD40单抗诱导毒性)的细胞的特性。单次注射CD40 2141-V11单克隆抗体导致血清白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)迅速升高(图8Q),类似于临床试验中报导的Selicrelumab及其他CD40单抗。细胞内IL-6染色鉴定出血液中的单核细胞淋巴结(LN)及脾脏,与在CD40单克隆注射后快速上调其IL-6表达的细胞的一罕见LN巨噬细胞群体一起作为注射CD40单克隆抗体(图8H,图8R),这表示出单核细胞在介导CD40单抗诱导的CRS中起主要作用。总之,这些实验确定了与CD40激动剂相关的剂量限制毒性的主要细胞群。目前的数据表示出,巨噬细胞及血小板在介导肝毒性及血小板减少中起主要作用,单核细胞在介导IL-6相关CRS中起主要作用。

[0287] 通过将抗CD40人类抗体2141与树突状细胞的抗体靶向标记耦接,产生对于树突状细胞(DC)具有选择性的靶向CD40的双特异性抗体。为了克隆所需的抗体,从这些杂交瘤克隆获得的RNA中对抗体的可变区域进行测序。一旦确定了抗体可变结构域序列(图1A),如上文所述,在预先生成的单特异性及双特异性重链及轻链载体中,将其克隆到所需的IgG恒定区。生成的DNA结构包含抗CD40(2141)、-CD11c(N418)、-DEC-205(HD109)单特异性、-CD40/CD11c及-CD40/DEC-205双特异性抗体的转译序列(图2)。用DNA载体组合转染HEK293细胞以产生单特异性及双特异性抗体。制备并纯化了这五种抗体。形成CD40/CD11c及CD40/DEC-205BSAb所需的正确异二聚体组合的形成通过SDS-PAGE及分析尺寸排斥色谱进行验证(图3)。验证了这些双特异性抗体同时与CD40及CD11c/DEC205结合,并且与其他对DEC-205/CD11c阴性的细胞类型相比,它们优先与DC结合(图4)。接下来,本发明人测定了这些双特异

性抗体激动活性以及体外人类树突状细胞(图5)及体内小鼠T细胞(图7)的激活。通过比较在几种Fc支架(包括WT-IgG1、IgG1-V11(选择性增强与Fc γ RIIB的结合)或IgG1-N297A(去糖基化Fc,不与Fc γ Rs结合)中表达的每个双特异性抗体的活性,以确定对双特异性抗体活性的Fc γ RIIB要求。体外及体内实验表示出,这些双特异性抗体需要Fc γ RIIB结合,才能有效激活DC及T细胞(图6A至图6B)。具体而言,野生型IgG1介导DC的轻度激活,与IgG1-V11相比,强度显著降低(图6A)。类似地,hCD40/Fc γ R小鼠中由CD40/CD11c-V11及CD40/DEC-205-V11诱导的体内T细胞激活分别地被这些双特异性抗体的IgG1或N297A-Fc沉默版本显著地减少或完全消除(图6B)。总之,目前的结果表示出CD40/DC-双特异性抗体的活性是Fc依赖性的,并且证明增加的活性是达成通过增强Fc γ RIIB结合的Fc工程的双特异性抗体。因此,hIgG1-V11被选为CD40/DC-双特异性抗体的最佳IgG支架,用于进一步表征使用所述Fc变体的Fc工程CD40/DC-双特异性抗体的体内特性。最后,结果表示出,与单特异性2141CD40抗体相比,这些双特异性抗体具有更好的毒性特征,使其能够在最佳抗肿瘤活性所需的高剂量下使用。上述药效实验中使用的不同剂量的牛血清白蛋白。其安全性特征为:以具有活性的剂量施用的牛血清白蛋白被评估为诱导肝毒性。将每种双特异性抗体的治疗指数与亲本单体2141-V11抗体的治疗指数进行比较。确定了最佳CD40/DC-双特异性抗体的最大安全剂量,并且本发明人将所述安全剂量的治疗效果与单特异性亲本2141-V11的预先确定的MTD进行了比较(图7A至图7D)。从这项研究可以得出结论,2141的DC靶向双特异性抗体格式至少在肝脏毒性方面能够实现增加的治疗窗口。

[0288] 本发明人基于三种不同的Fc支架生成了每种双特异性抗体的变体,这些支架表现出与人类Fc γ R不同的结合特性:野生型hIgG1、hIgG1-N297A(去糖基化Fc,不与Fc γ R结合)及hIgG1-V11(增强与抑制性hFc γ RIIB结合的Fc点突变)(图9A至图9B)。

[0289] 为了确定当以无毒剂量施用,与CD40单抗相比,CD40/CD11c-双特异性抗体是否可以介导治疗效果的提高,本发明人根据其肝毒性程度确定其MTD。他们确定CD40单抗及CD40/CD11c-双特异性抗体的最大剂量分别为0.175mg/kg及2.5mg/kg,不会导致血清ALT/AST升高超过标准稳态值(图7B),且没有肝坏死及血栓迹象(图10A)。在下一个更高的测试剂量下,两种试剂均诱导显著毒性,表现为ALT/AST水平升高,肝组织学显示治疗小鼠出现广泛的肝细胞坏死及纤维蛋白血栓。本发明人评估了这些MTD的血清IL-6及TNF- α 水平,发现与CD40单抗相比,注射CD40/CD11c-双特异性抗体后这些CRS相关细胞因子的升高显著降低(图10B)。在其MTD中,与亲代CD40单抗相比,CD40/CD11c-双特异性抗体诱导的T细胞活化显著增强(图10C),支持双特异性抗体设计的治疗指数增加。

[0290] 接下来,本发明人希望确定T细胞启动的这种改善是否转化为增加治疗性抗肿瘤活性。为此,他们在各自的MTD处用CD40/CD11c-双特异性抗体及CD40-单克隆抗体治疗荷瘤小鼠(图10D)。在MC38结肠及B16-F10黑色素瘤模型中,与CD40单抗治疗相比,CD40/CD11c-bsAb治疗显著改善了对肿瘤生长的控制。在治疗过程结束时,在接受治疗的小鼠中未检测到肝毒性迹象,验证了这些治疗方案的安全性。这些结果表示出,当以最大安全剂量施用时,CD40/CD11c-双特异性抗体比CD40-单克隆抗体具有更好的抗肿瘤效力。

[0291] 在几个临床前模型中,CD40激动性单克隆抗体显示出与PD-1阻断协同作用(20)(21);这种组合在早期试验(22)中证明了转移性导管腺癌(pancreatic adenocarcinoma,PDAC)患者的临床活性,并正在评估其他临床适应症。因此,他们评估了

CD40/DC11c-双特异性抗体是否保留这种协同活性。用PD-1单抗、CD40/CD11c-双特异性抗体或其组合治疗携带B16黑色素瘤的hFc γ R/CD40小鼠(图10E)。与每种单一疗法相比,联合疗法诱导的抗肿瘤活性增加,支持联合CD40/DC-双特异性抗体及抗PD1/L1以增强治疗的潜力。

[0292] 尽管已经结合本发明的具体实施例描述了本发明,但显而易见,许多替代方案、修改及变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。因此,本发明旨在包含属于所附权利要求的精神及广泛范围内的所有此类替代、修改及变体。

[0293] 本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请案通过引用全部并入本说明书,其程度与每个单独的出版物、专利或专利申请案通过引用明确且单独地指示并入本说明书相比而有所相同。此外,在本申请中引用或识别任何引用不应解释为承认此类引用可作为本发明的现有技术使用。在使用章节标题的情况下,不应将其解释为必然的限制。此外,本申请的任何优先权文件全部通过引用并入本文。

[0294] 参考文献

[0295] (本申请书中引用了其他参考文献)

[0296] (1) P.Sharma,“免疫检查点疗法的未来(The future of immune checkpoint therapy)”,科学(Science) (80-),348卷,6230号,第56至61页,2014年。

[0297] (2) M.K.Callahan、M.A.Postow及J.D.Wolchok,“癌症治疗的靶向T细胞共受体(Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy)”,免疫(Immunity),44卷,5号,第1069至1078页,2016年

[0298] (3) R.H.Vonderheide,“免疫革命:启动而非检查点的案例(Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours)”,癌症细胞(Mol.Immunol.),33卷,4号,第563至569页,2018年。

[0299] (4) A.B.Alexandroff等人,“CD40-CD40配体相互作用在实体瘤免疫反应中的作用(Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours),分子免疫(Mol.Immunol.),37卷,9号,第515至526页,2000年。

[0300] (5) R.H.Vonderheide及M.J.Glennie,“激动性CD40抗体及癌症治疗(Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy)”,临床癌症研究(Clin.Cancer Res.),19卷,5号,第1035至1043页,2013年。

[0301] (6) L.P.Richman及R.H.Vonderheide,“交联激动性CD40单克隆抗体作为癌症免疫治疗的作用(Role of Crosslinking for Agonistic CD40 Monoclonal Antibodies as Immune Therapy of Cancer)”,癌症免疫杂志资源(Cancer Immunol.Res.),2卷,1号,第19至26页,2014年。

[0302] (7) A.L.White等人,“与Fc RIIB的相互作用对抗CD40单克隆抗体的激动活性至关重要(Interaction with Fc RIIB is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody),”免疫杂志(J.Immunol.),187卷,4号,第1754至1763页,2011年。

[0303] (8) R.H.Vonderheide等人,“CD40激动剂抗体CP-870893联合卡铂及紫杉醇治疗晚期实体瘤患者的一期研究(Phase i study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid

tumors),”*Oncoimmunology*,2卷,1号,第1至10页,2013年。

[0304] (9) R.H.Vonderheide等人,“新型CD40激动剂单克隆抗体CP-870893治疗癌症患者的临床活性及免疫调节 (Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893,a novel CD40 agonist monoclonal antibody),”*J.Clin.Oncol.*,25卷,7号,第876至883页,2007年。

[0305] (10) R.Dahan、B.C.Barnhart、F.Li、A.P.Yamniuk、A.J.Korman及J.V.Ravetch,“激动性人抗CD40单克隆抗体的治疗活性需要选择性Fc γ R参与 (Therapeutic Activity of Agonistic,Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fc γ R Engagement)”,*癌症细胞 (Cancer Cell)*,29卷,6号,第820至831页,2016年。

[0306] (11) D.A.Knorr、R.Dahan及J.V Ravetch,“通过瘤内注射消除Fc工程化抗CD40抗体的毒性,并产生持久的抗肿瘤免疫 (Toxicity of an Fc-engineered anti-CD40 antibody is abrogated by intratumoral injection and results in durable antitumor immunity) (免疫学及炎症),”*美国国家科学院院刊*,第2至7页,2018年。

[0307] (12) Y.Mazor等人,“使用新型单价双特异性IgG设计提高靶细胞特异性 (Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design),”*MAbs*,7卷,2号,第377至389页,2015年。

[0308] (13) C.G.Park等人,“识别不同哺乳动物中保守表位的抗人DEC205/CD205单克隆抗体的产生 (Generation of anti-human DEC205/CD205monoclonal antibodies that recognize epitopes conserved in different mammals)”,*免疫组化方法杂志 (J.Immunol.Methods)*,377卷,1-2号,第15至22页,2012年。

[0309] (14) C.Demangel、J.Zhou、A.B.H.Choo、G.Shoebridge、G.M.Halliday及W.J.Britton,“抗原选择性靶向树突状细胞的单链抗体片段 (Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells)”,*分子免疫 (Mol.Immunol.)*,42卷,8号,第979至985页,2005年。

[0310] (15) I.Caminschi等人,“树突状细胞亚型限制性C型凝集素Clec9A是疫苗增强的靶点 (The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement)”,*血液 (Blood)*,112卷,8号,第3264至3273页,2008年。

[0311] (16) D.Sancho等人,“通过抗原靶向新型DC限制性C型凝集素的小鼠肿瘤治疗 (Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel,DC-restricted C-type lectin)”,*J.Clin.Invest.*,118卷,6号,第2098至2110页,2008年。

[0312] (17) A.Bachem等人,“XCR1的表达表征了能够抗原交叉呈现的依赖Batf3的树突状细胞谱系 (Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation)”,*Front.Immunol.*,3卷,7月号,第1至12页,2012年。

[0313] (18) R.Daha、B.C.Barnhar、F.Li、A.P.Yamniuk、A.J.Korman及J.V.Ravetch,“激动性人抗CD40单克隆抗体的治疗活性需要选择性FcR参与 (Therapeutic Activity of Agonistic,Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcR Engagement)”,*癌症细胞*,29卷,6号,第820至831页,2016年。

[0314] (19) P.Smith、D.J.DiLillo、S.Bournazos、F.Li及J.V.Ravetch,“概括人类Fc γ 受

体结构及功能多样性的小鼠模型(Mouse model recapitulating human Fc γ receptor structural and functional diversity)”,美国国家科学院院刊,109卷,16号,第6181至6186页,2012年。

[0315] (20) H.S.Ma等人,“CD40激动剂及PD-1拮抗剂抗体重新编程非免疫原性肿瘤的微环境,以允许T细胞介导的抗癌活性(A CD40 Agonist and PD-1Antagonist Antibody Reprogram the Microenvironment of Nonimmunogenic Tumors to Allow T-cell-Mediated Anticancer Activity)”,癌症免疫资源(Cancer Immunol.Res.),2019年。

[0316] (21) S.F.Ngiow等人,“激动性CD40单克隆抗体驱动的IL12逆转富含T细胞肿瘤中对抗PD1的耐药性(Agonistic CD40 mAb-driven IL12 reverses resistance to anti-PD1 in a T-cell-rich tumor)”,Cancer Res.,2016年。

[0317] (22) M.H.O.Hara等人,“具有或不具有nivolumab CD40激动性单克隆抗体APX005M(sotigalimab)及的化疗,以用于治疗转移性胰腺癌:开放标签、多中心、1b期研究(CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M(sotigalimab) and chemotherapy,with or without nivolumab,for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label,multicentre,phase 1bstudy),22卷,1月号,2021年。

序列表

<110> 耶达研究及发展有限公司 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.)

罗尼·大汉 (DAHAN, Rony)

冉·所罗门 (SALOMON, Ran)

<120> 多特异性抗体在治疗数个疾病方面的用途 (MULTISPECIFIC ANTIBODIES FOR USE IN TREATING DISEASES)

<130> 85611

<150> IL 272194

<151> 2020-01-22

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1           5           10           15
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
          20           25           30
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
          35           40           45
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
          50           55           60
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65           70           75           80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
          85           90           95
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
          100          105          110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
          115          120          125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          130          135          140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145          150          155          160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

```

$\langle 400 \rangle$ 2

43

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

1	5	10	15
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
20	25	30	
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
35	40	45	
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
50	55	60	
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr			
65	70	75	80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys			
85	90	95	
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
100	105	110	
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
115	120	125	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
130	135	140	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
145	150	155	160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
165	170	175	
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
180	185	190	
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
195	200	205	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
210	215	220	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu			
225	230	235	240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
245	250	255	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
260	265	270	
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
275	280	285	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
290	295	300	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
305	310	315	320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 4

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1氨基酸序列,具有柏(Hole)突变

(Y349C/T366S/L368A/Y407V)

<400> 4

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

1 5 10 15

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

225	230	235	240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	245	250	255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	260	265	270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	275	280	285
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	290	295	300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
305	310	315	320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325		

<210> 5

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 2141 (抗-CD40) 重链氨基酸序列

<400> 5

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
1	5	10	15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys			
	20	25	30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
	35	40	45
Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu			
	50	55	60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala			
65	70	75	80
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser			
	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val			
	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val			
	115	120	125
Cys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
	130	135	140
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			

145	150	155	160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
	165	170	175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
	180	185	190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
	195	200	205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
	210	215	220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
225	230	235	240
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
	245	250	255
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro			
	260	265	270
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	275	280	285
Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn			
	290	295	300
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
305	310	315	320
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
	325	330	335
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
	340	345	350
Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
	355	360	365
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu			
	370	375	380
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe			
385	390	395	400
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	405	410	415
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	420	425	430
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
	435	440	445
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
450	455	460	

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 2141 (抗-CD40)轻链氨基酸序列
 <400> 6
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile
 100 105 110
 Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> n418 vh氨基酸序列

<400> 7

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Lys
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Glu	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Gly	Val	Ile	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser
65				70					75					80	
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr
				85				90					95		
Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Trp	Glu	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 8

<211> 231

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> n418 vl氨基酸序列

<400> 8

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

65						70						75						80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser			
					85						90						95	
Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Tyr	Asp			
					100						105						110	
Tyr	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Ser	Ser			
					115						120						125	
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys			
					130						135						140	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr			
145						150						155						160
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser			
					165						170						175	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser			
					180						185						190	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr			
					195						200						205	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys			
					210						215						220	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys												
225						230												
<210> 9																		
<211> 494																		
<212> PRT																		
<213> 人工序列																		
<220>																		
<223> hd109_vh氨基酸序列																		
<400> 9																		
Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly			
1						5						10						15
Gln	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln			
					20						25						30	
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr			
					35						40						45	
Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu			
					50						55						60	
Gly	Ile	Ile	Trp	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Lys			
65						70						75						80
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu			

				85					90					95			
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				100					105					110			
Arg	Val	Ser	His	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly		
				115				120						125			
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser		
				130				135						140			
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu		
145					150				155					160			
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro		
				165					170					175			
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly		
				180					185					190			
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr		
				195				200						205			
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His		
				210				215						220			
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val		
225					230				235					240			
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Arg	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser		
				245					250					255			
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
				260					265					270			
Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				275				280						285			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
				290				295						300			
Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
305					310				315					320			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
				325					330					335			
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
				340					345					350			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro		
				355					360					365			
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
				370					375					380			
Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
385					390					395				400			

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 405 410 415
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 420 425 430
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 435 440 445
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 450 455 460
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 465 470 475 480
 Ser Pro Gly Lys Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 485 490

<210> 10

<211> 231

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hd109 v1氨基酸序列

<400> 10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile
 35 40 45
 Asn Val Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser
 100 105 110
 Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> cp870 vh氨基酸序列

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> cp870 vl氨基酸序列

<400> 12

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Tyr	Ser	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ile	Phe	Pro	Leu
				85				90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				100				105							

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 19g3 vh氨基酸序列

<400> 13

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Glu	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
	50					55				60					
Thr	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Glu	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95		
Ala	Ser	Arg	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				100				105					110		

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 19g3 v1氨基酸序列

<400> 14

Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
		20					25					30			
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
			85					90						95	
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100						105						110	

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10b4 vh氨基酸序列

<400> 15

Gln	Ile	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu
1				5				10					15		
Lys	Ile	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Ala	Ala	Ile
			20					25				30			
Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg
		35					40					45			
Ile	Arg	Thr	Arg	Pro	Ser	Lys	Tyr	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Met	Val	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asp	Asn	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Thr	Pro	Arg	Ala	Thr	Glu	Asp	Val	Pro	Phe	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val
		100						105					110		

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10b4 vh氨基酸序列

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Gln Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asp

20 25 30

Glu Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mrx10 vh氨基酸序列

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mrx10 vh氨基酸序列

<400> 18

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 20

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 21

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 22

Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

1 5

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 23

Thr Ala Ser

1

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 24
Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr Phe
1 5 10
<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 25
Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Trp
1 5
<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 26
Ile Lys Tyr Lys Tyr Ser Asn Tyr Ala Thr
1 5 10
<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 27
Ala Arg Thr Trp Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Phe
1 5 10
<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 28
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5
<210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 29
Glu Thr Asn
1
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 30
Gln His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Arg Thr
1 5
<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 31
Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Ala
1 5
<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 32
Trp Thr Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 33

Ala Arg Val Ser His Asp Tyr Phe Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Met Asp Tyr

20

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 34

Gln Asn Ile Asn Val Trp

1 5

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 35

Lys Val Ser

1

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 36

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 37

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> n418 vh氨基酸序列

<400> 37

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Lys
			20					25					30		
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	50					55					60				
Gly	Val	Ile	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Thr	Glu	Tyr	Ala	Glu
65				70					75					80	
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser
				85					90				95		
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr
		100						105					110		
Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Trp	Glu	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
	130						135					140			
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
145					150					155				160	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
			165						170				175		
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
			180						185				190		
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
		195					200					205			
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
	210						215				220				
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
225					230					235				240	
Gly	Glu	Cys	Asp	Arg	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
			245						250				255		
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe

260	265	270
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
275	280	285
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val		
290	295	300
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
305	310	315
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
325	330	335
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
340	345	350
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
355	360	365
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
370	375	380
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
385	390	395
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
405	410	415
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
420	425	430
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
435	440	445
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
450	455	460
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Ala		
465	470	475
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
485		

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> n418 v1氨基酸序列

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile His Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			

20	25	30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Glu Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser		
65	70	75
Glu Asp Val Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hd109 vh氨基酸序列

<400> 39

Gln Val Gln Leu Thr Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln		
1	5	10
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr		
20	25	30
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
35	40	45
Gly Ile Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu		
65	70	75
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Val Ser His Asp Tyr Phe Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly		
100	105	110
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
115	120	125

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hd109 v1氨基酸序列

<400> 40

Asp	Ile	Gln	Met	Asn	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Asp	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asn	Val	Trp
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Pro	Trp
				85				90							95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 41

<211> 277

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 41

Met	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Cys	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr
1				5				10					15		
Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu
			20					25					30		
Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val
			35				40						45		
Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu
			50				55					60			
Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His
65					70					75					80
Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr
			85					90							95
Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
			100					105					110		
Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
			115					120					125		
Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu
			130					135							140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 145 150 155 160
 Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
 165 170 175
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
 180 185 190
 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
 195 200 205
 Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
 210 215 220
 Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
 225 230 235 240
 Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
 245 250 255
 Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
 260 265 270
 Val Gln Glu Arg Gln
 275

<210> 42

<211> 261

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 42

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45
 Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60
 Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110
 Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly
130							135					140			
Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln
145					150					155				160	
Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr
				165					170					175	
Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser
				180					185					190	
Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala
			195				200					205			
Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His
			210				215				220				
Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn
225					230					235					240
Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe
				245					250					255	
Gly	Leu	Leu	Lys	Leu											
				260											

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 43

tcatttacca ggagagtgg 19

<210> 44

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 44

agaggctctt ctcagtatgg tggttgtgc 29

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单链DNA寡核苷酸
<400> 45
gctcacgtcc accaccacac atgt 24
<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 单链DNA寡核苷酸
<400> 46
gaaatagccc ttgaccaggc atcc 24
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 单链DNA寡核苷酸
<400> 47
aacactcatt cctgttgaag 20
<210> 48
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 单链DNA寡核苷酸
<400> 48
gctcttgaca atgggtgaag ttgatgtc 28
<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 单链DNA寡核苷酸
<400> 49
ctaactca ttctgttca gggctcttg 28
<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 50

gctgctcagg ctgtaggtgc tgtc 24

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 短合成胜肽

<400> 51

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Ala

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 53

Ile Arg Thr Arg Pro Ser Lys Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 54

Thr Pro Arg Ala Thr Glu Asp Val Pro Phe Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 55
Gln Ser Val Leu Tyr Asp Glu Asn Lys Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 56
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 56
Trp Ala Ser
1
<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 57
Gln Gln Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr
1 5
<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 58
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5
<210> 59
<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 59
Trp Ala Ser
1
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 60
Gln Gln Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr
1 5
<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 61
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10
<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 互补决定区 (CDR)
<400> 62
Lys Ile Ser
1
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 63

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Tyr Thr

1

5

2141 (抗-CD40) VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLLTVSS

2141 (抗-CD40) VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKA
PNLLIYIASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
QQANIFPLTFGGGTKVEIK

N418 (抗-CD11c) VH

EVQLVEKGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFSEYWMNWVRQAPG
KGLEWVGVIKYKYSNYATEYAESVKGRFTISRDDSKSSVYL
QMNNLRAEDTAIYYCARTWENWYFDFWGQGTQVTVSS

N418 (抗-CD11c) VL

DIQMTQSPSSLPASLGDRVITHCQASQDISNYLTWYQQKPGKA
PKLLIYETNKLADGVPSRFSGSGSGRDYSFTISSELESDVGSYY
CQHYYDYPRTFGPGTKLEIK

HD-109 (抗-DEC-205) VH

QVQLTESGPGLVAPSQSLITCSVSGFSLTNYAINWVRQPPGKG
LEWLGIIWTGGGTNYNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTARYYCCARVSHDYFYGSSPYYYGMDYWGQGTSTVTVSS

HD-109 (抗-DEC-205) VL

DIQMNQSPSSLASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIP
KLLIYKVSNLHGTGVPSPRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIATYYCQ
QGQSYPWTFGGGTKLEIK

10B4 (抗-Clec9a) VH

QIVESGGGLVQPKESLKISCTASGFTFSNAAIYWVRQTPGKGLE
WVGRIRTRPSKYATDYADSVRGRFTISRDDSKSMVYLLQMDNLR
TEDTAMYYCIPRATEDVPFYWGQGVMTVTVSS

图1A

10B4 (抗-Clec9a) VL

DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMNCKSSQSVLYDENKKNYLAWY
QQKSGQSPKLLIYWASTGESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQA
EDLAVYYCQQYYDFPPTFGGGTKLELK

MARX10 (抗-XCR1) VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWMKQRPG
QGLEWIGMIHPNSDNTKYNEKFKAKAILTVDKSSSTAYMQLSS
LTSEDSAVYYCCARFANDGAYWGQGTLVTVSS

MARX10 (抗-XCR1) VL

DVVVTQTPLSLPVSLGDPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ
KPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
GVYFCSQNTHPYTFGGGTKLEIK

图1A续1

抗CD40部分:2141 (抗-CD40)-重链 (序列编号5)

前导 Leader

可变 Variable

恒定 Constant (铰链, CH1, CH2, CH3)

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“杵 (Knob)”突变 (S354C/T366W)

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY
TFTGYMHWRQAPGGGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTM
TRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGDDSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPCREEMTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

2141 (抗CD40)-轻链 (序列编号6)

前导 Leader

可变 Variable

恒定 Constant (CL)

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQ
GIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DC 靶向臂 (抗-DEC-205.-CD11c.-Clec9a.-XCR1):N418重链 (抗-CD11c)-交叉单抗 (序列编号37)

前导 Leader

可变 Variable

恒定 Constant (CL)

恒定 Constant (铰链, CH2, CH3)

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“柏 (Hole)”突变 (Y349C/T366S/L368A/Y407V)

图1B

MGWSCIILFLVATATGEVQLVEKGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFSE
 YWMNWVRQAPGKGLEWVGVIKYKYSNYATEYAESVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNNLRAEDTAIYYCARTWENWYFDFWGGGTQVTVSS
 SVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGECDSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRLPIEKTISKAKGQ
 PREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALNH
 YTQKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

N418轻链(抗-CD11c)-交叉单抗(序列编号38)

前导 Leader
 可变 Variable
 恒定 Constant (CH1)

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLPASLGDRVTIHCQASQ
 DISNYLTWYQQKPGKAPKLLIYETNKLADGVPSRFSGSGSGGRDYSFT
 ISSLESEDVGSYYCQHYYDYPRTFGPGTKLDLSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

HD-109重链(抗-DEC-205)-交叉单抗(序列编号39)

前导 Leader
 可变 Variable
 恒定 Constant (CL)
 恒定 Constant (铰链, CH2, CH3)

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*"柏(Hole)"突变 (Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIILFLVATATGQVQLTESGPGLVAPSQSLITCSVSGFSLTNY
 AINWVRQPPGKGLEWLGIIWTGGGTNYNSTLKSRLSISKDNSKSQV
 FLKMNSLQTDDTARYYCARVSHDYFYGSSPYYYGMDYWGGGTSTV
 VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGECDSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGDDSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRLPIEKTISK
 AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

图1B续1

HD-109轻链(抗-DEC-205)-交叉单抗(序列编号40)

前导 Leader
可变 Variable
恒定 Constant (CH1)

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNIINW
LSWYQQKPGNIPKLLIYKVSNIHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIA
TYYCQQGQSYPWTFGGGKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10B4重链(抗-C1ec9a)-交叉单抗(序列编号15)

前导 Leader
可变 Variable
恒定 Constant (C1)
恒定 Constant (铰链,CH2,CH3)

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)
*“柏(Hole)”突变(Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIILFLVATATGQIVESGGGLVQPKESLKISCTASGFTFSNAAI
YWVRQTPGKGLEWVGRIRTRPSKYATDYADSVRGRFTISRDDSKS
MVYQLQMDNLRTEDTAMYYCTPRATEDVPFYWGQGVMVTVSS (SV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGECDS) EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGD(SVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSDDEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQV(TLPPSREEMTKNQVSL(CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

10B4轻链(抗-C1ec9a)-交叉单抗(序列编号16)

前导 Leader
可变 Variable
恒定 Constant (CH1)

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMNCKSSQ
SVLYDENKKNYLAWYQQKSGQSPKLLIWASTGESGVPRFIGSGS
GTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYDFPPTFGGGTKLEIKSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSC

图1B续2

MARX10重链(抗-XCR1)-交叉单抗(序列编号17)

前导 Leader

可变 Variable

恒定 Constant (CL)

恒定 Constant (铰链, CH2, CH3)

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“柏(Ho1e)”突变 (Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIILFLVATATGQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT
 NYWIHWKQRPQGGLWIGMIHPNSDKAILTVDKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARFANDGAYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECDS
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSDEDEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPDSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSA
 WSHPQFEK

MARX10轻链(抗-XCR1)-交叉单抗(序列编号18)

前导 Leader

可变 Variable

恒定 Constant (CH1)

MGWSCIILFLVATATGVHSDVVVTQTPLSLPVSLGDPASISCKSSQSL
 VHSNGNTYLHWYLRKPGQSPKLLIYKIFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
 DLGVYFCSQNTHPVPTFGGGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

根据Kabat系统-野生型(序列编号1)的人IgG1(CH1, 绞链, CH2, CH3)的序列

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

图1B续3

根据Kabat系统与本发明相关突变的人IgG1 (CH1, 绞链, CH2, CH3) 的序列

*V11 突变 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) 序列编号2

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDEGEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

*“杵 (Knob)”突变 (S354C/T366W) 序列编号3

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

*“柏 (Hole)”突变 (Y349C/T366S/L368A/Y407V) 序列编号4

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL
PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图1B续4

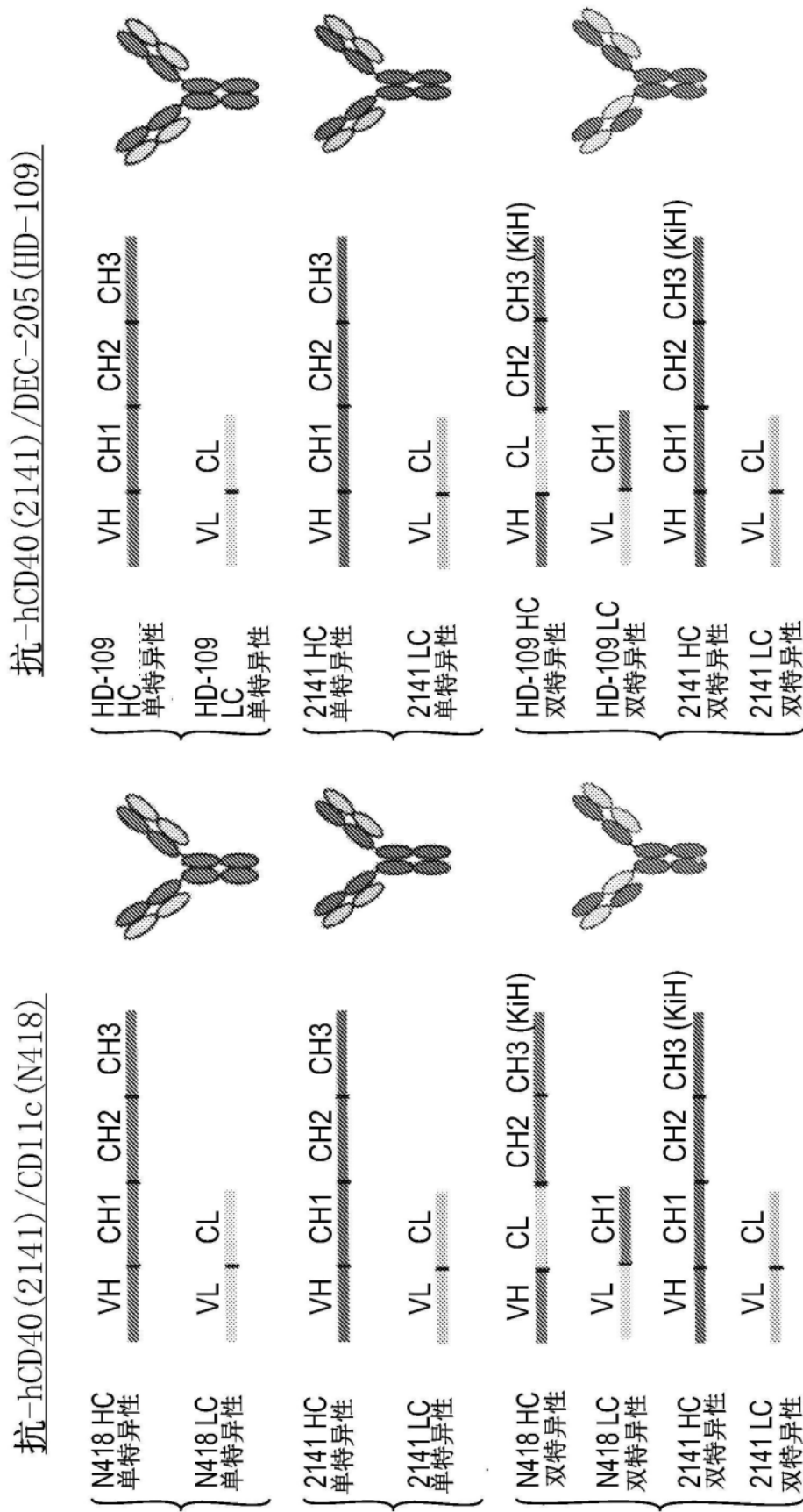
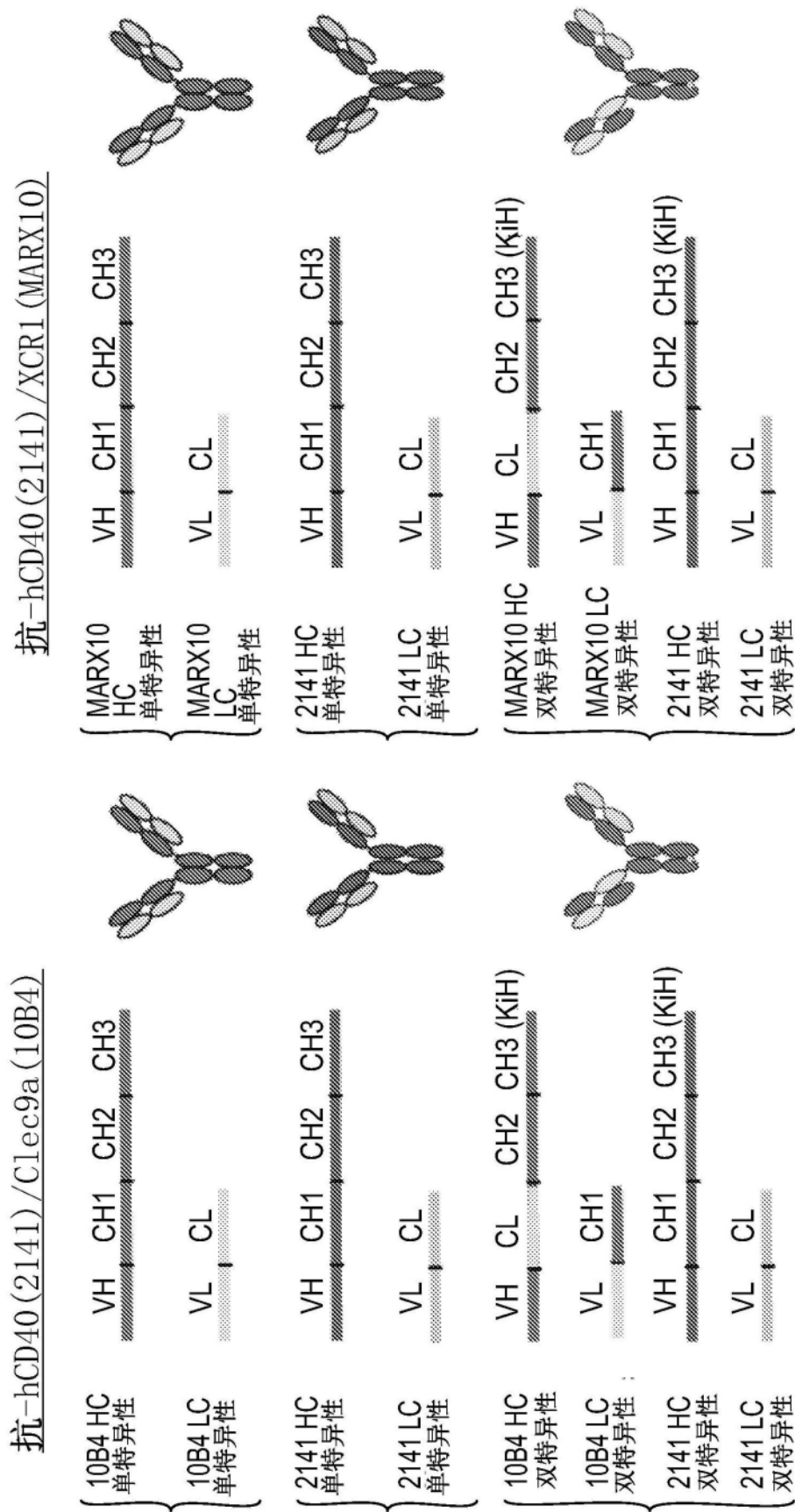


图2



* KiH-栓-进入-柏(knobs-into-holes)突变

图2续

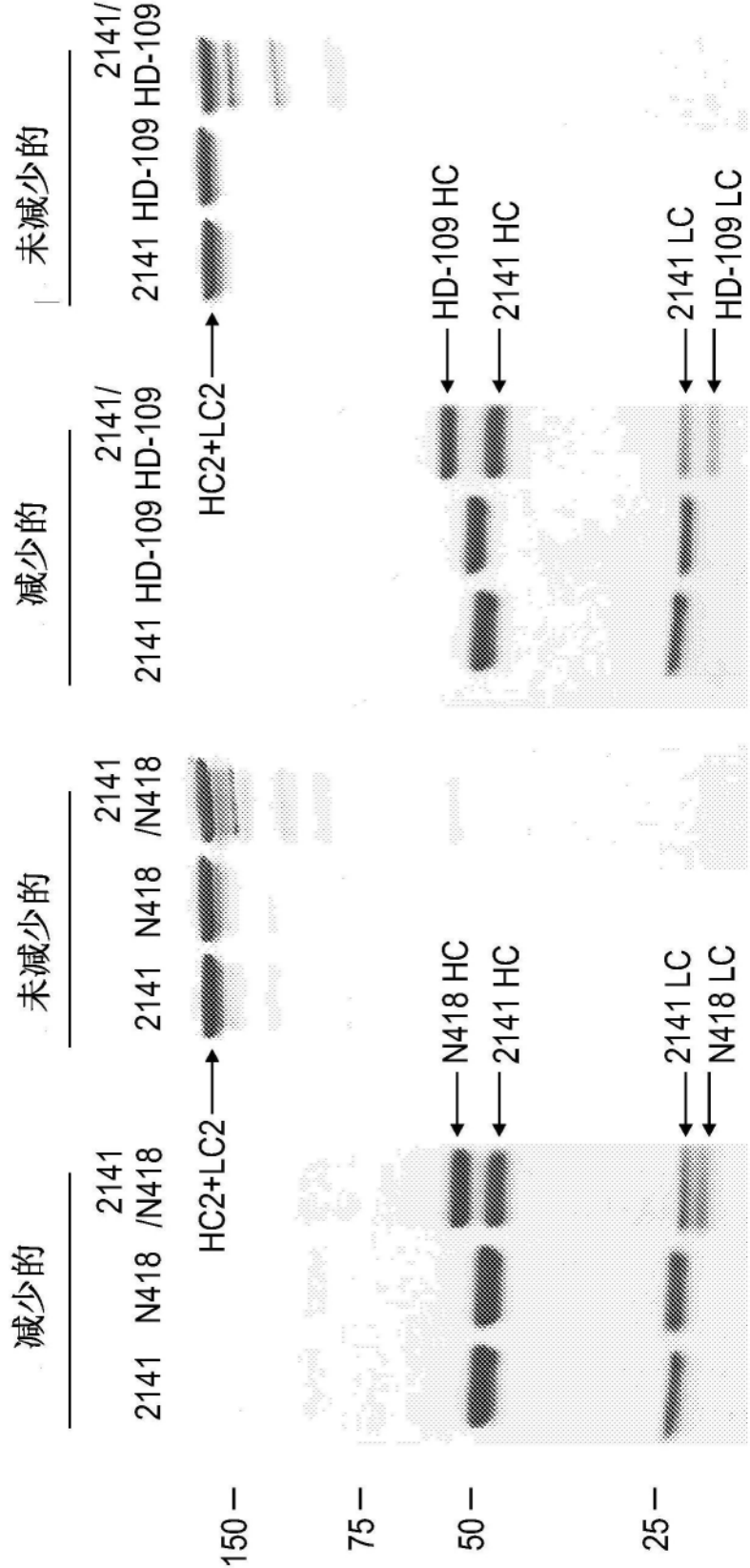


图3A

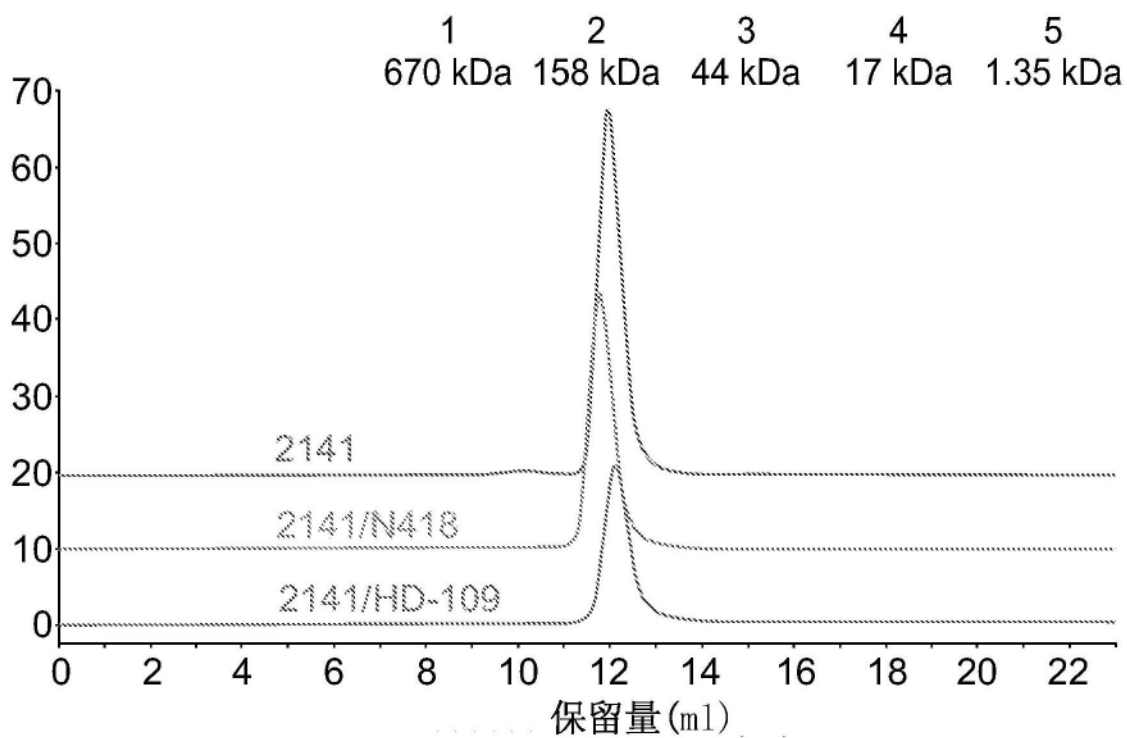


图3B

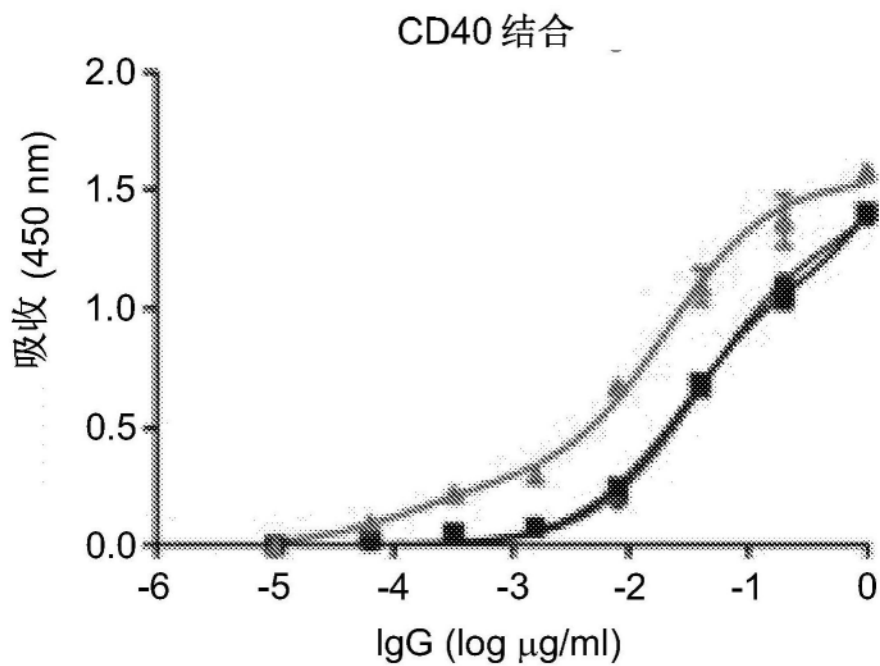


图4A

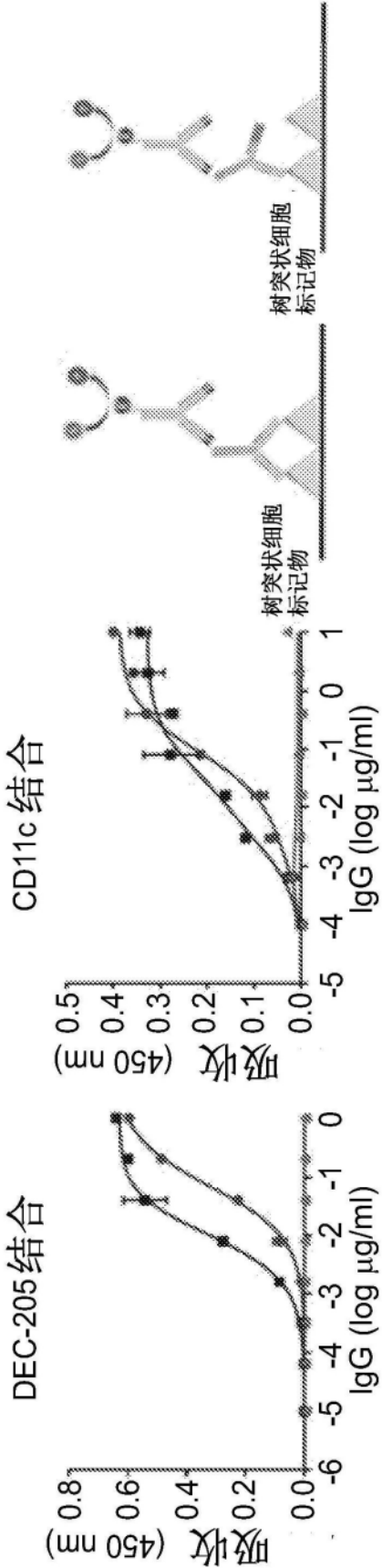


图4B

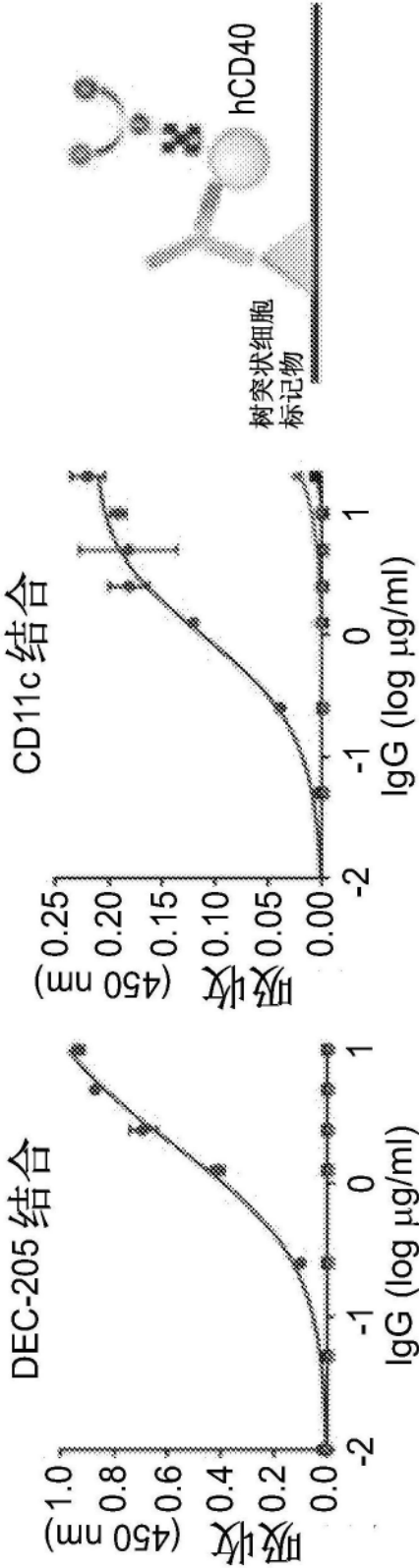


图4C

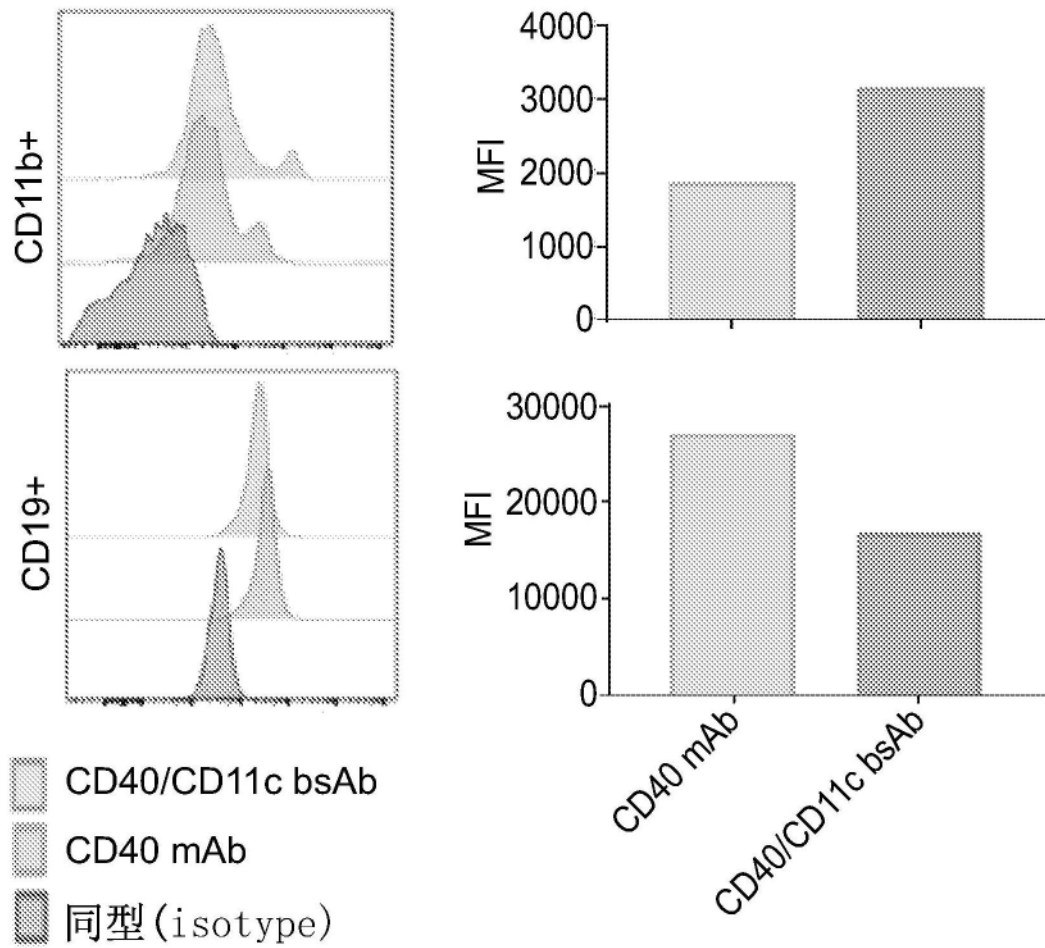


图4D

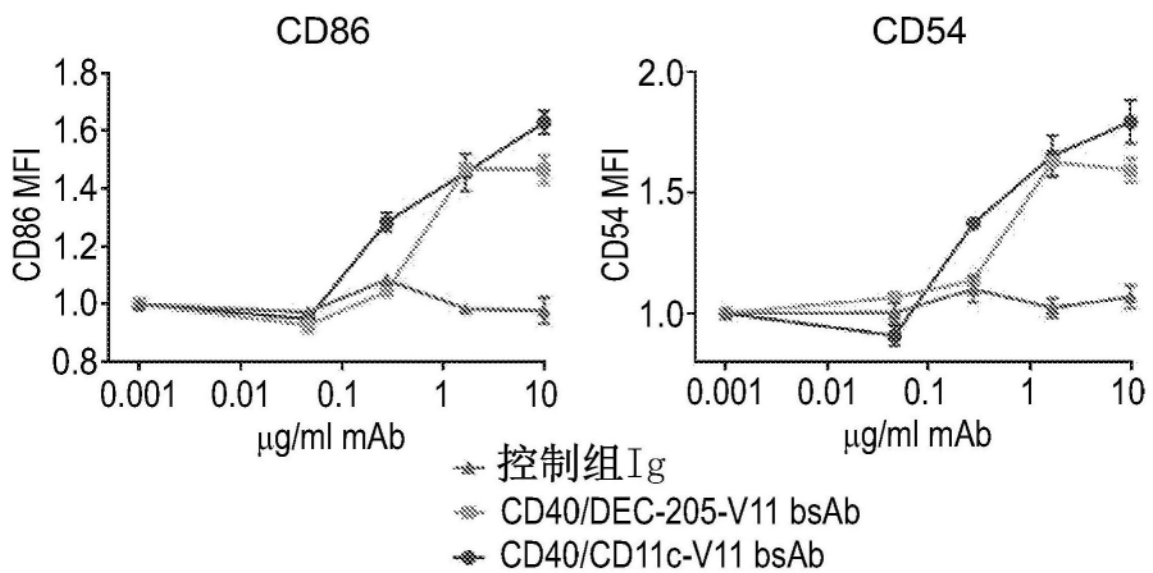


图5

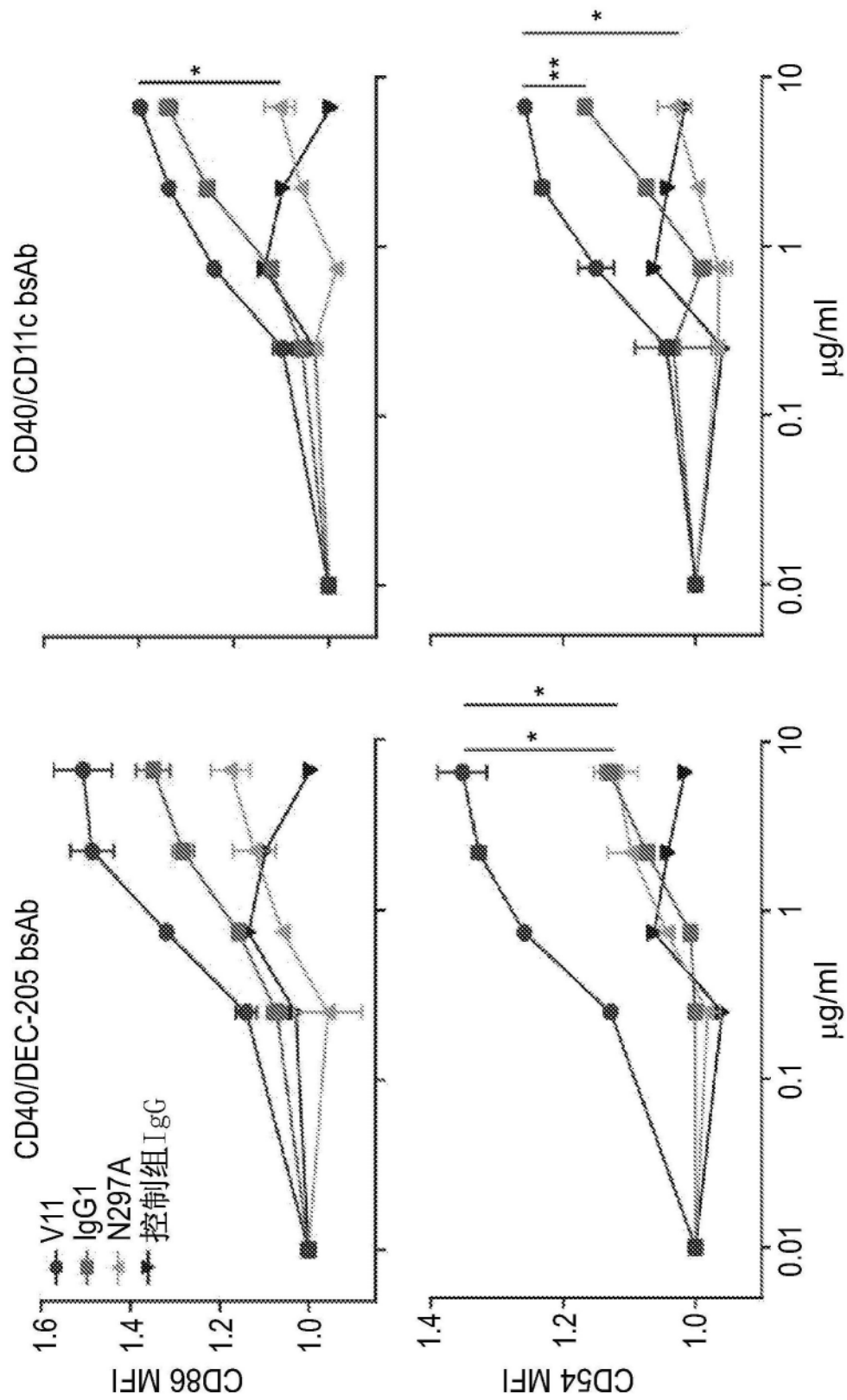


图6A

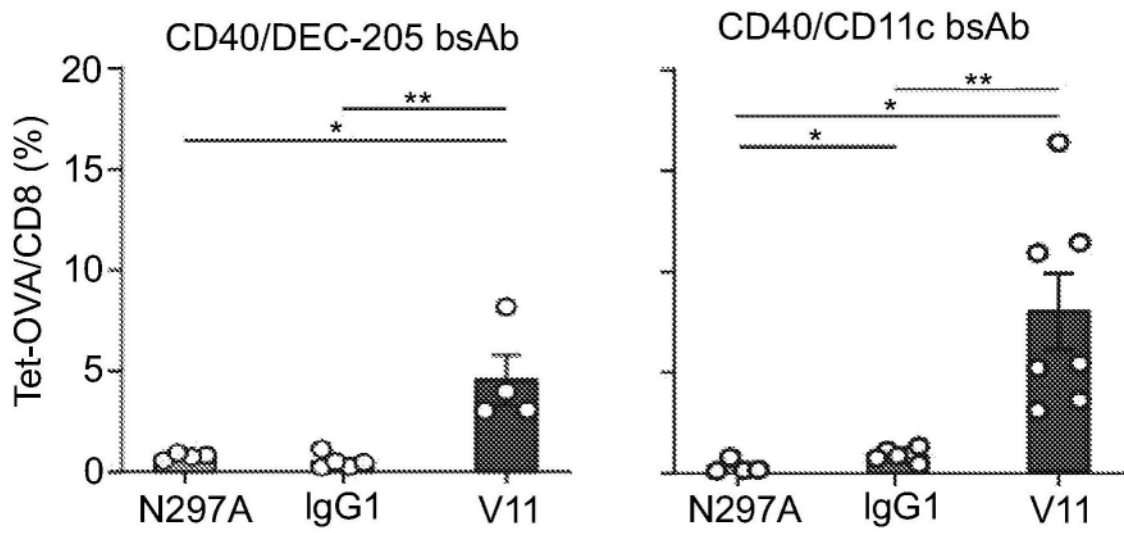


图6B

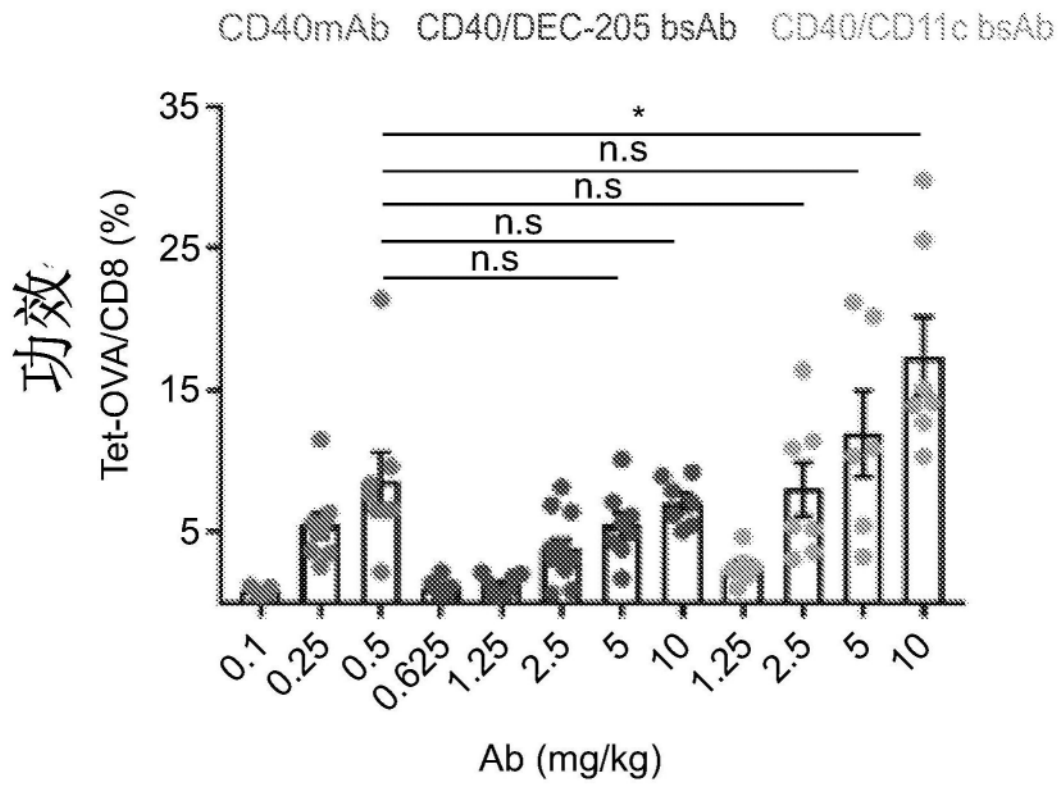


图7A

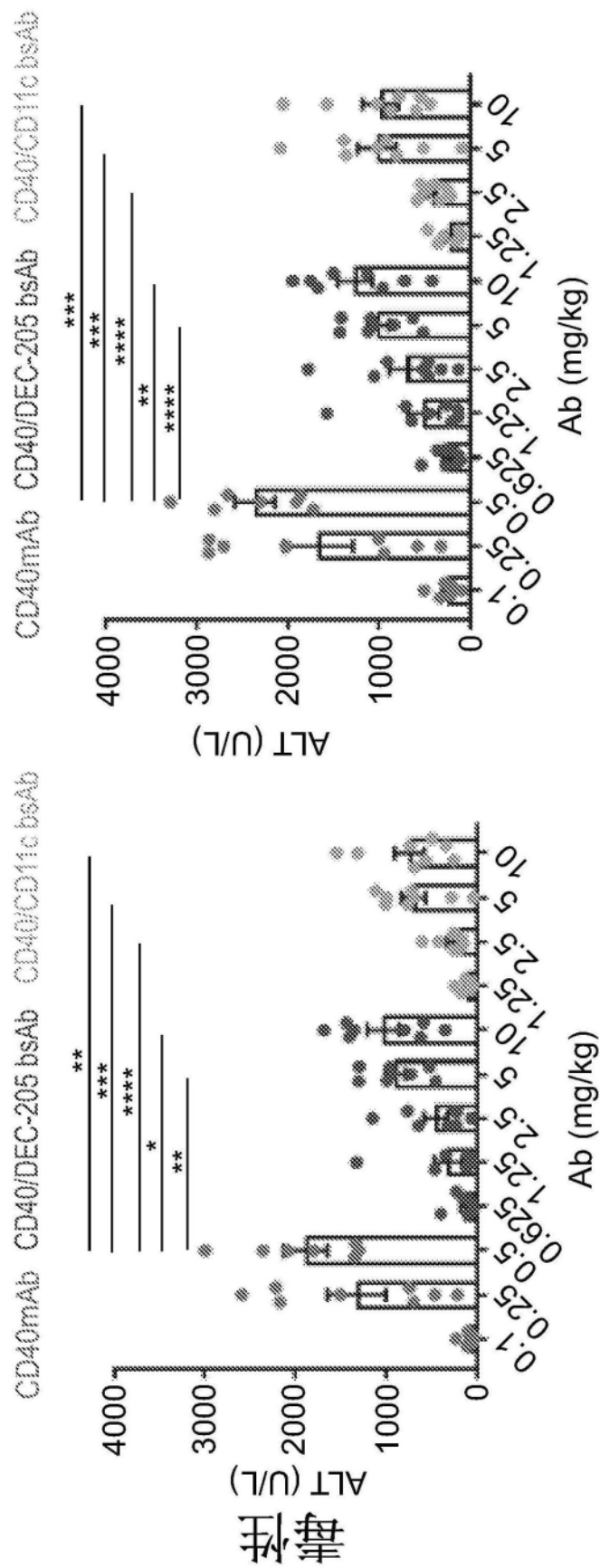


图7B

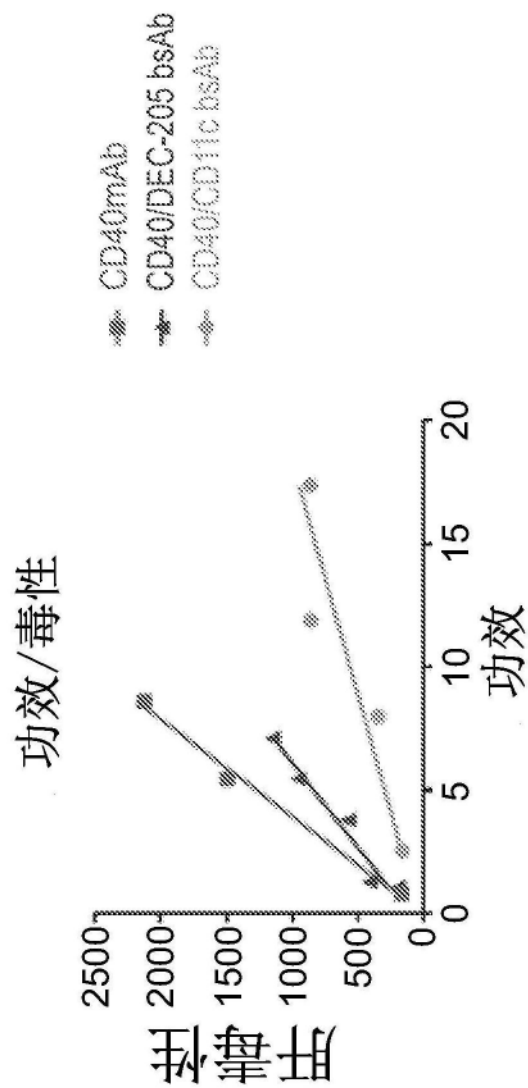


图7C

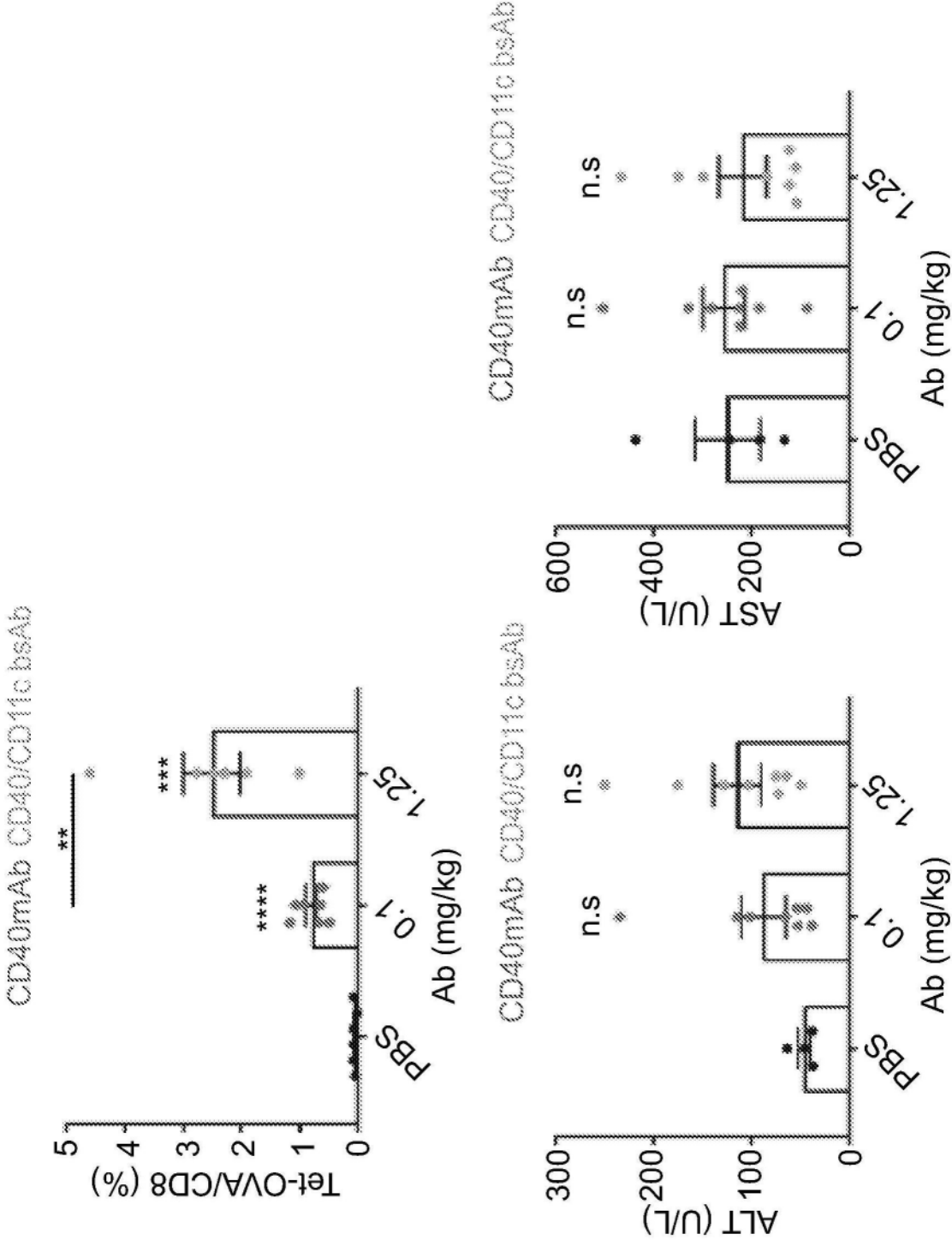


图7D

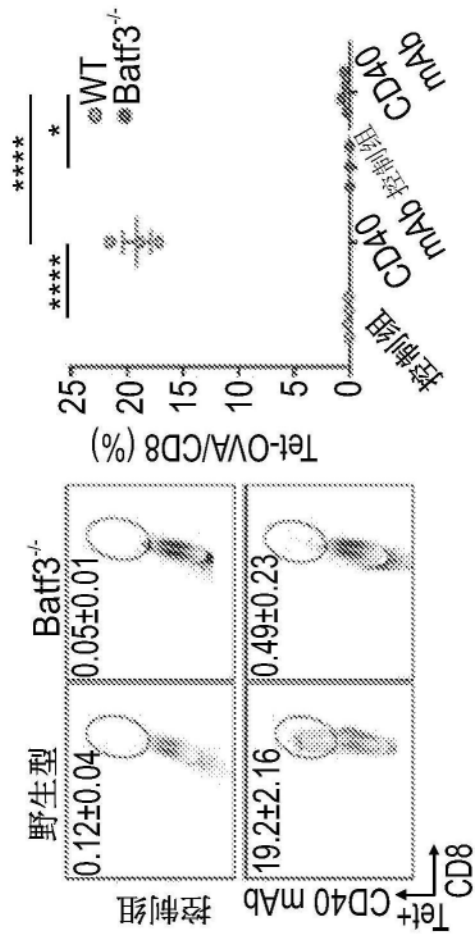


图8A

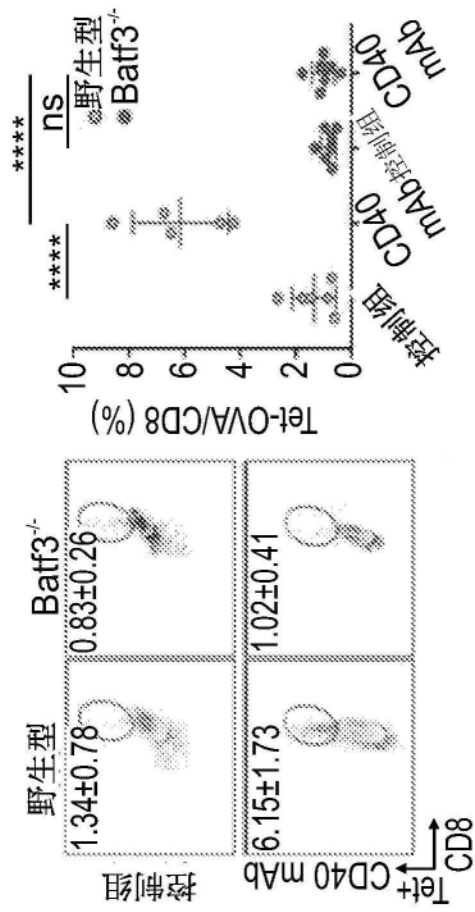


图8B

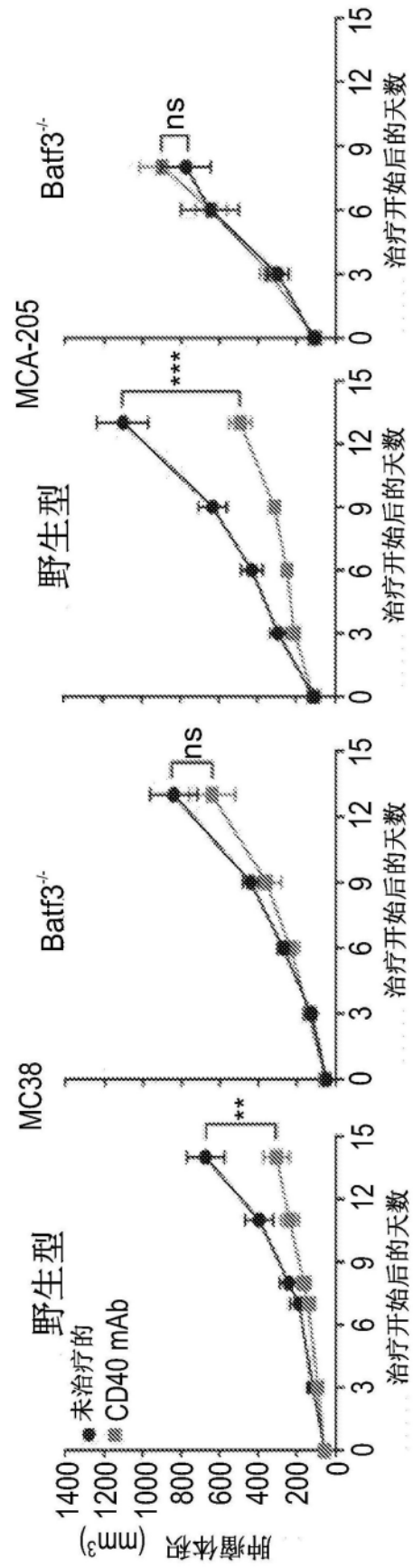


图8C

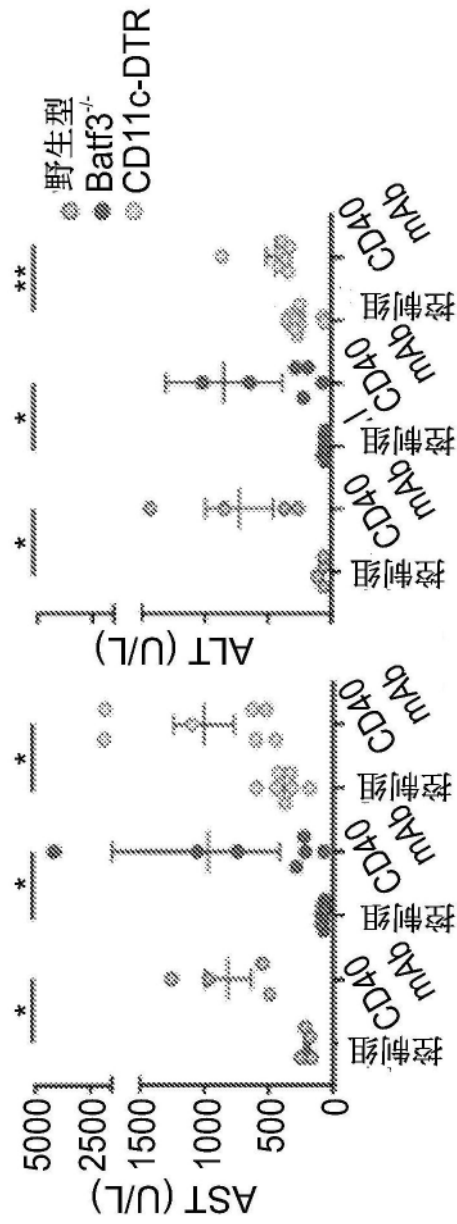


图8D

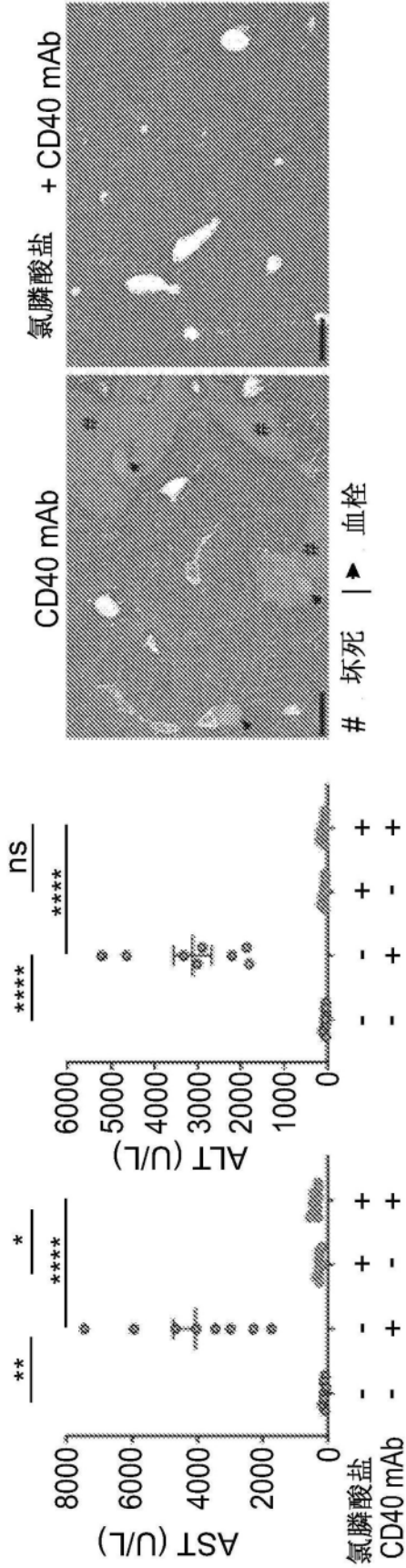


图8E

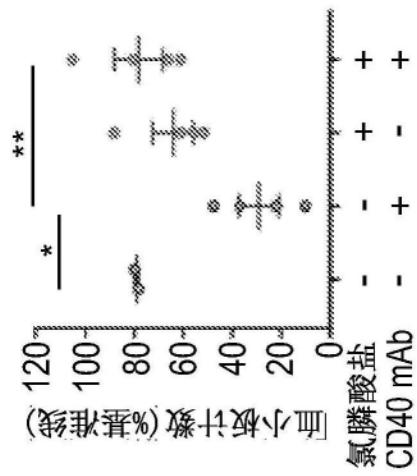


图8G

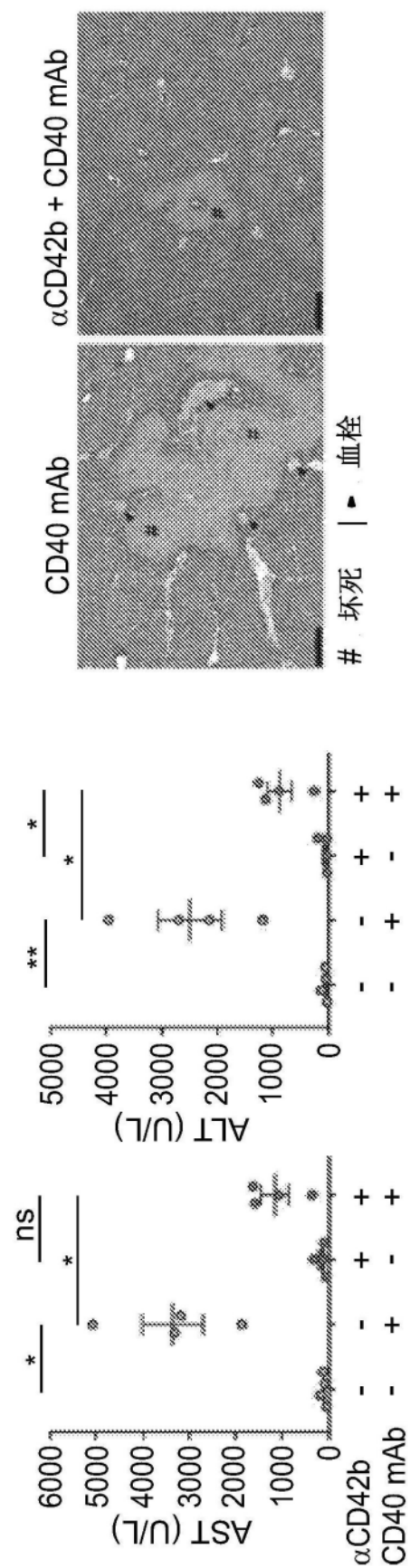


图8F

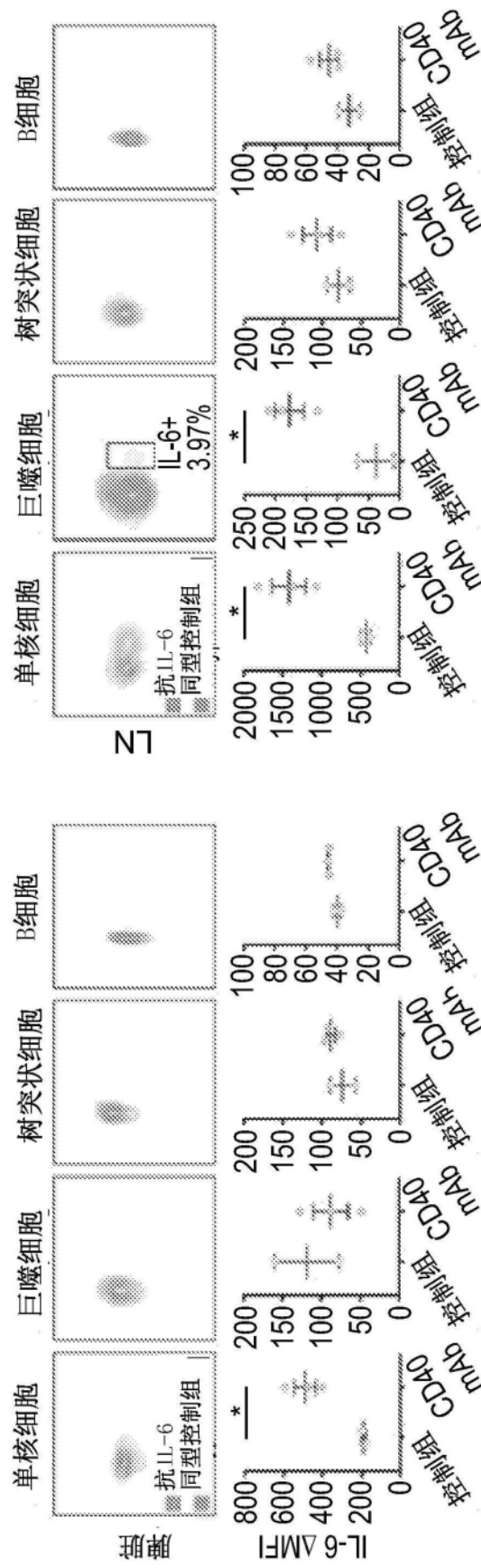


图8H

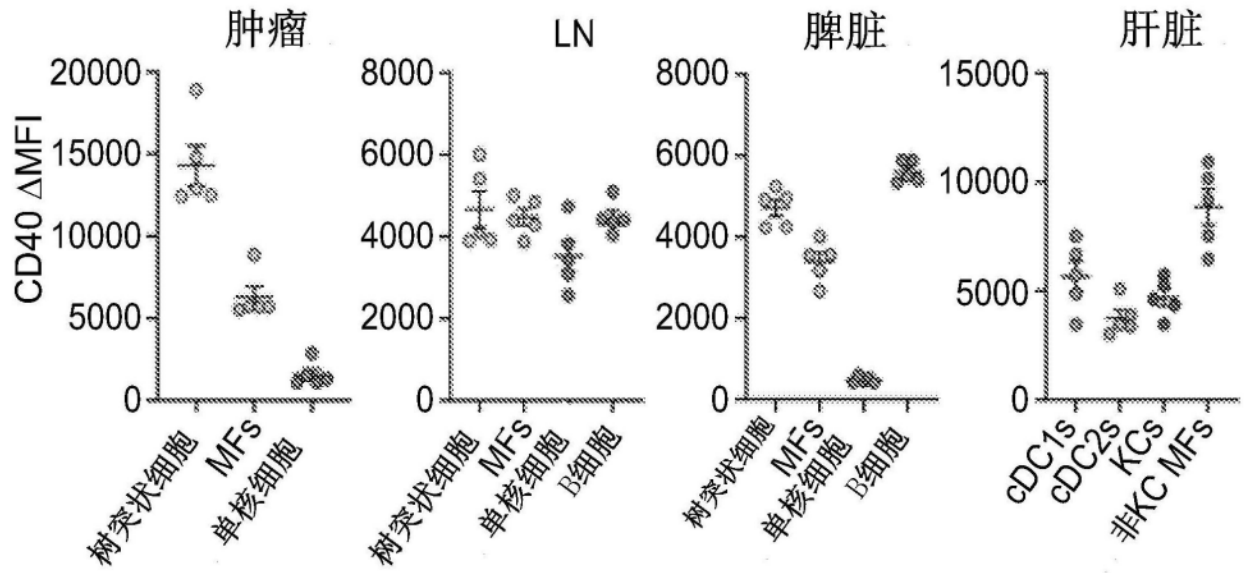


图8I

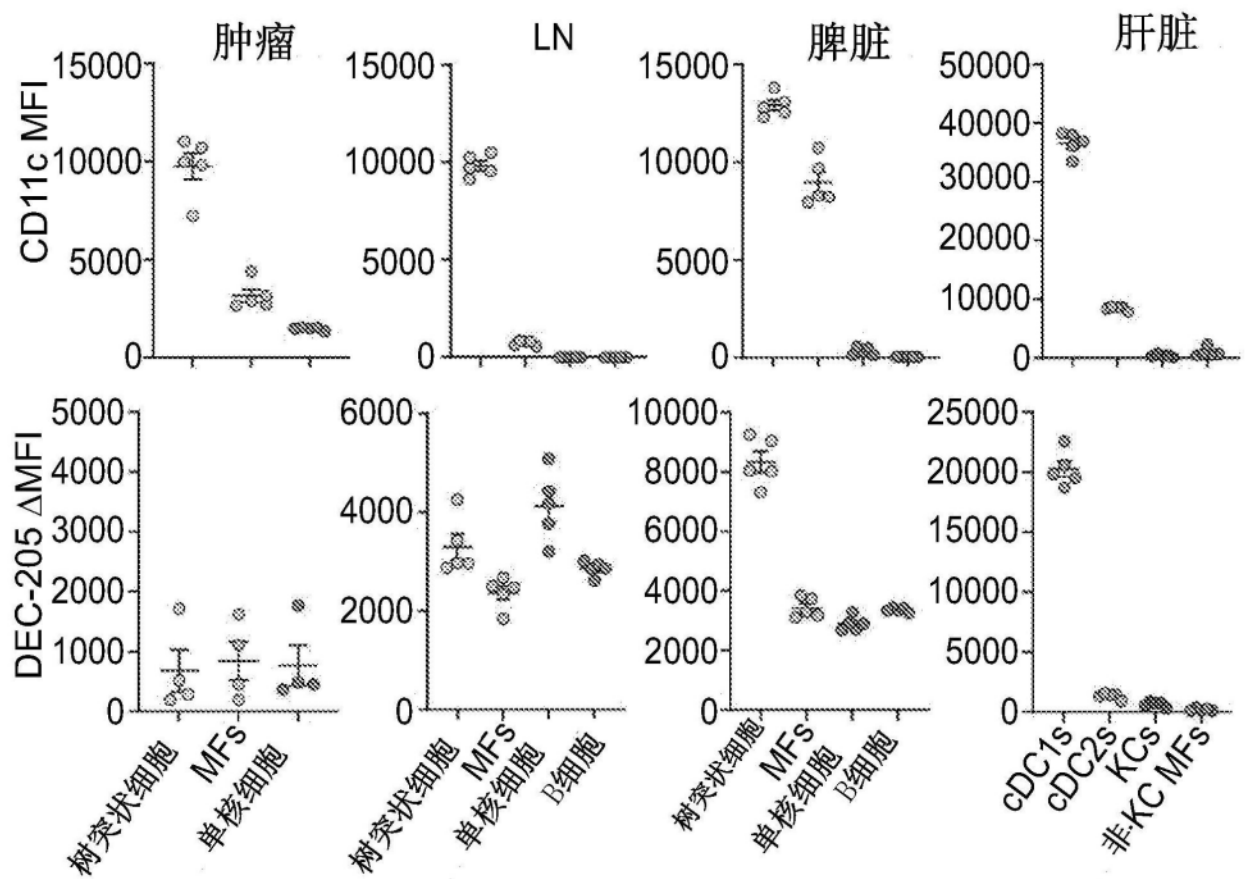


图8J

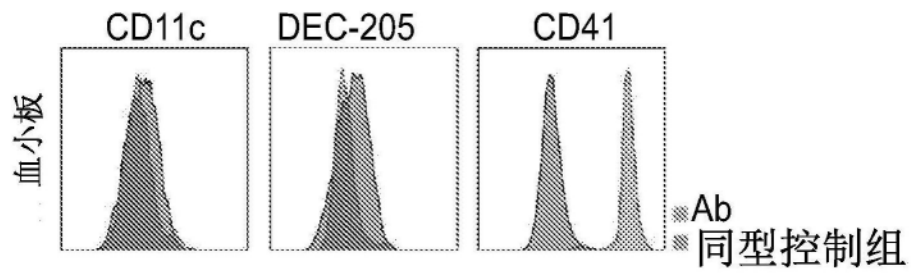


图8K

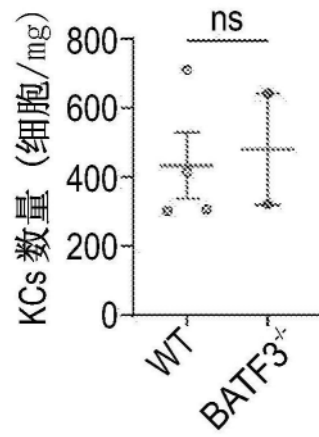


图8L

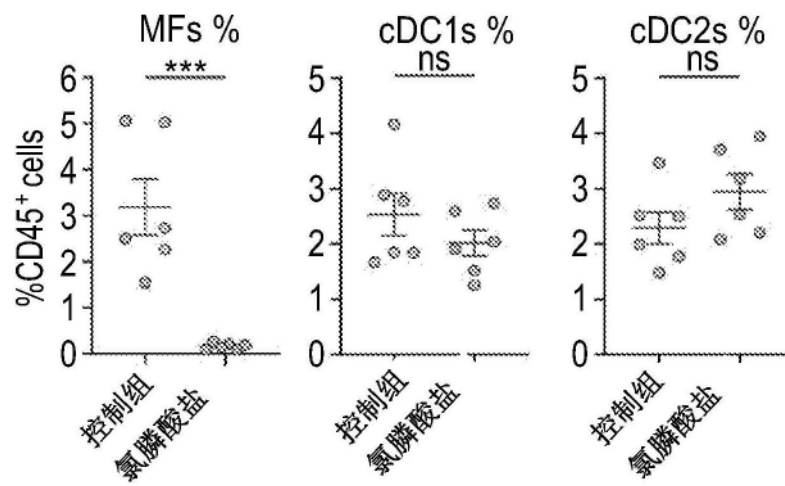


图8M

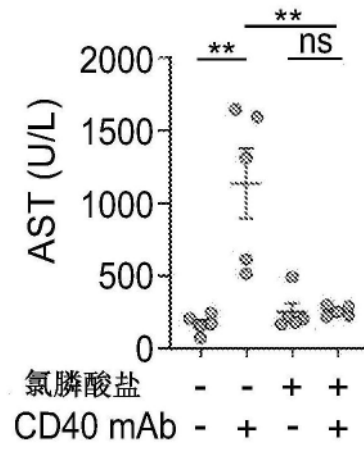


图8N

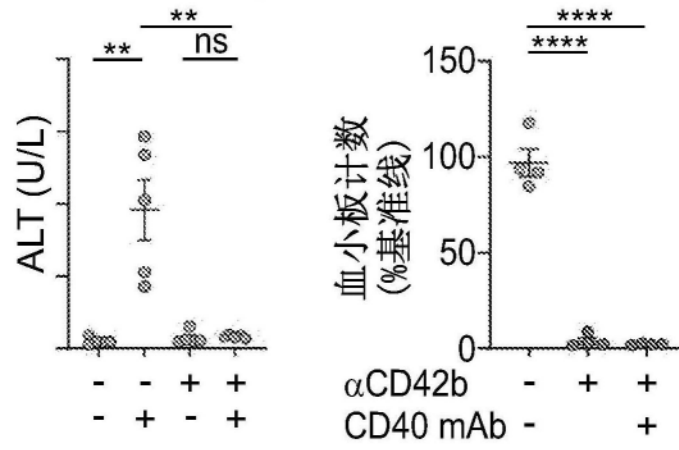


图8O

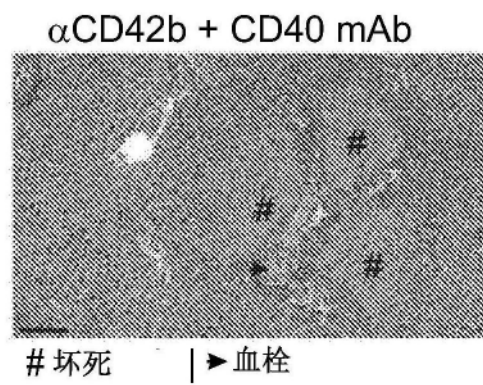


图8P

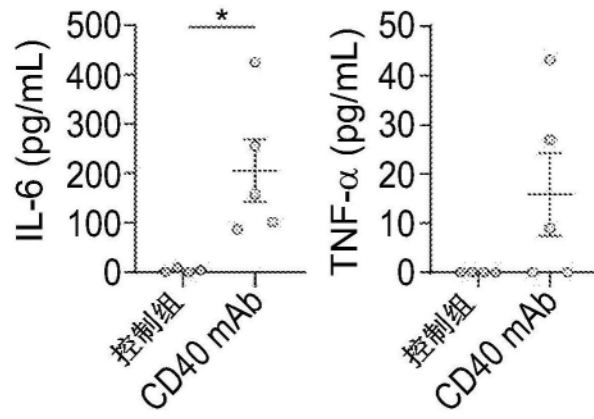


图8Q

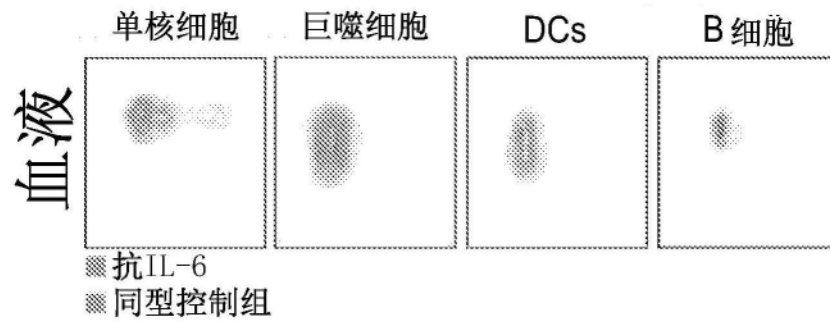


图8R

变体	FC γ RIIB	FC γ RIIA ^{131R}	FC γ RIIA ^{158F}
V11	++++	++	+
IgG1	++	++	++
N297A	n.d.b	n.d.b	n.d.b

图9A

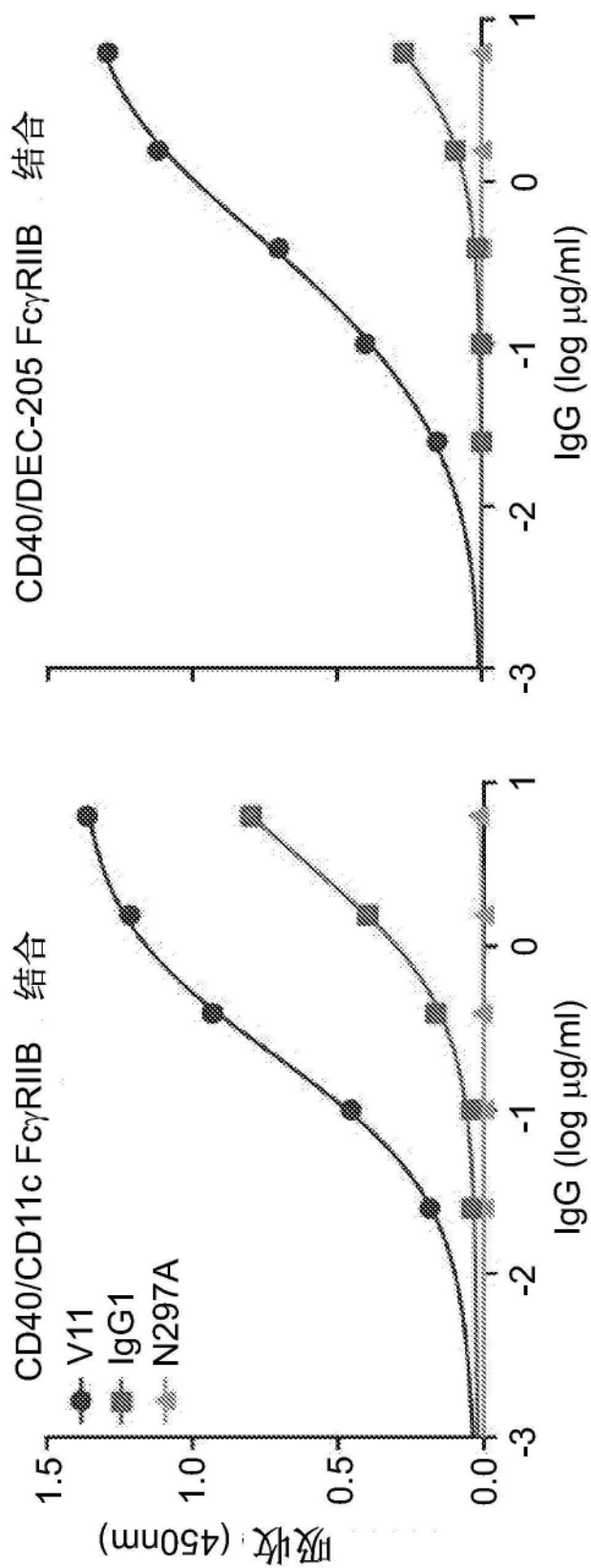


图9B

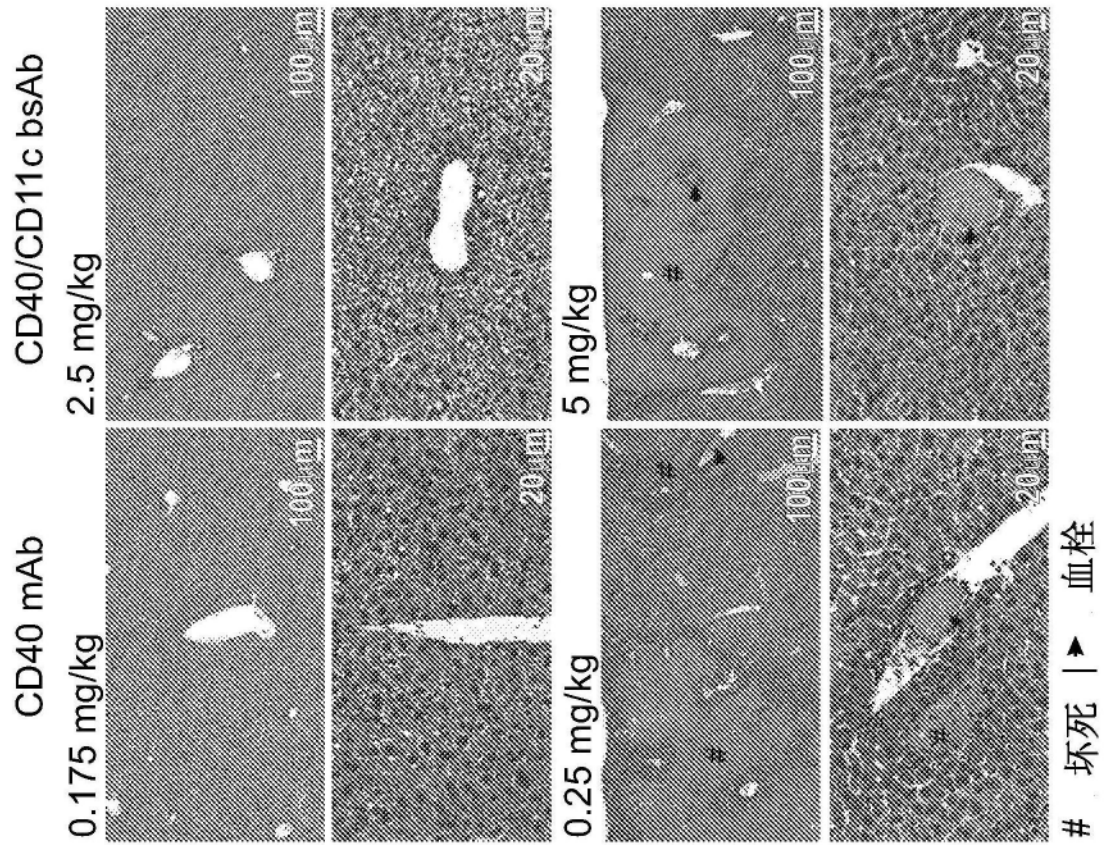


图10A

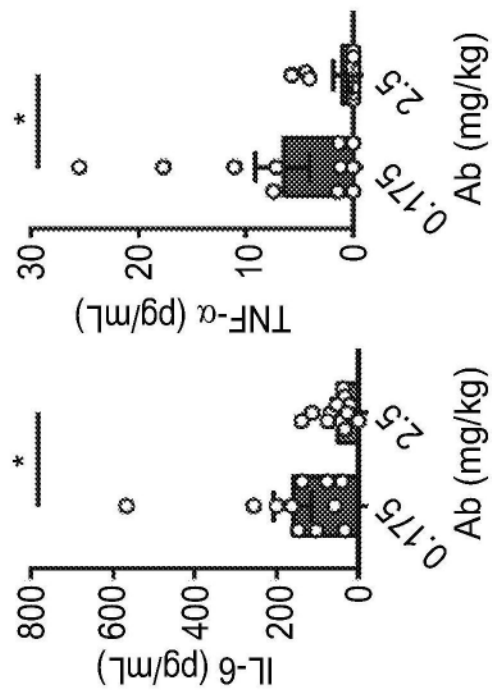


图10B

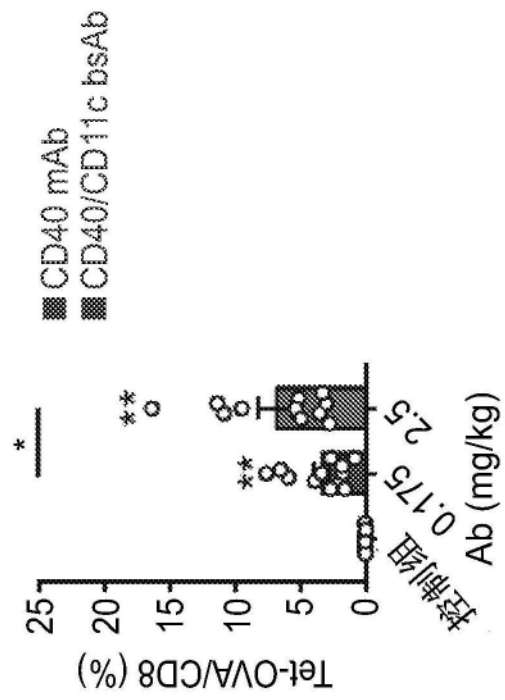


图10C

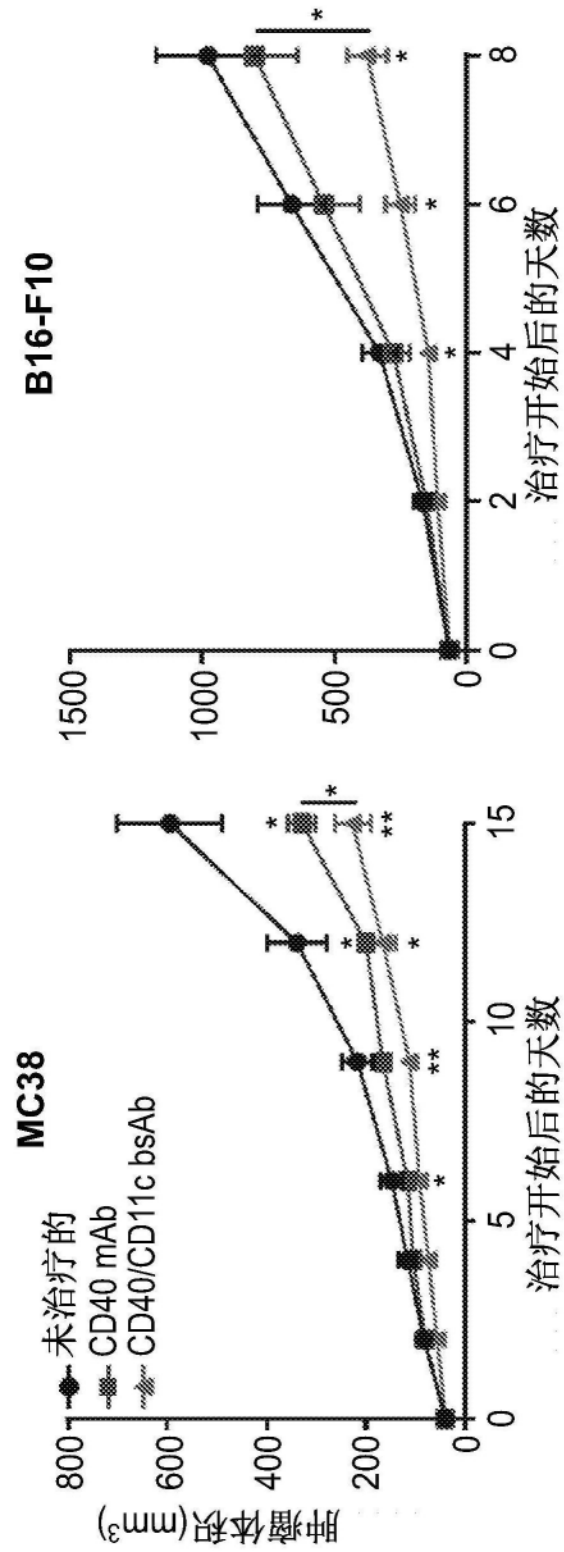


图10D

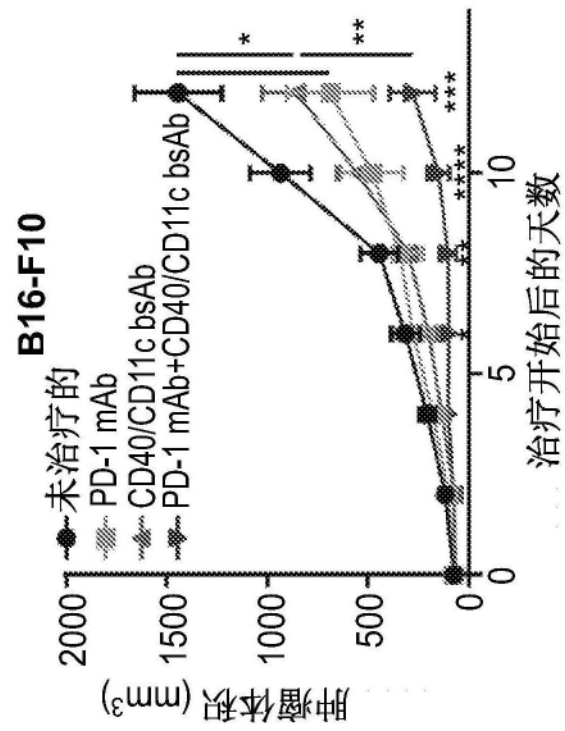


图10E