



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111094552 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 18

(21) 申请号 201880045576.6
 (22) 申请日 2018.05.08
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111094552 A
 (43) 申请公布日 2020.05.01
 (66) 本国优先权数据
 PCT/CN2017/083432 2017.05.08 CN
 PCT/CN2018/072469 2018.01.12 CN
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.01.07
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2018/085960 2018.05.08
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/205917 EN 2018.11.15
 (73) 专利权人 清华大学
 地址 100084 北京市海淀区双清路30号

(72) 发明人 鲁白 姚虹洋 郭炜
 (74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
 11517
 专利代理师 牡丹 张怡

(51) Int.Cl.
 C12N 5/078 (2006.01)
 C07K 16/00 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 103429615 A, 2013.12.04
 WO 2017015427 A1, 2017.01.26
 CN 105131126 A, 2015.12.09
 Shin-Ei Matsumoto等. In vitro immunization can elicit the expansion of diverse repertoire of B cells from peripheral blood mononuclear cells. 《Cytotechnology》. 2006, 第52卷 (第3期),

审查员 李丹阳

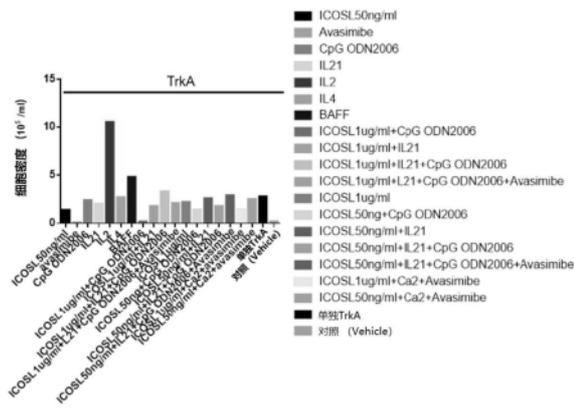
权利要求书2页 说明书29页 附图17页

(54) 发明名称

抗体制备新方法

(57) 摘要

本发明披露了一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在包含CD40L、ICOSL、ICOS和/或TLR激动剂的培养液中培养外周血单核细胞(PBMC)的步骤。本发明还提供一种诱导PBMC增殖、B细胞活化和分化和/或B细胞成熟的方法,涉及在含有IL2的培养液中培养PBMC的步骤。本发明还提供一种在产生抗体的PBMC中通过促进类别转换从而产生IgG的方法,该方法涉及在含有IL21的培养液中培养产生抗体的PBMC的步骤。



1. 一种产生IgG抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在培养液中培养PBMC的步骤,所述培养液包含IL2、IL21和TLR激动剂,以及抗原。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养液进一步包含ICOS。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养液进一步包含CD40L。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养液进一步包含ICOS和CD40L。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述TLR激动剂是TLR7激动剂、TLR8激动剂或者TLR9激动剂。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述TLR激动剂是TLR7和TLR8 (TLR7/TLR8) 激动剂。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述TLR7激动剂是咪喹莫特(imiquimod)。
8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述TLR9激动剂是CpG ODN。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PBMC是从人外周血中分离的。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PBMC包括B细胞和T_{FH}细胞 (follicular helper Tcell)。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PBMC包括B细胞和树突状细胞。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PBMC包括B细胞、T_{FH}细胞和树突状细胞。
13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述CpG ODN是CpG2006、D/KCpG或其任何组合。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养液进一步包含ICOSL。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其进一步包括从培养的PBMC中分离其分泌的抗体的步骤。
16. 根据权利要求15所述的方法,其进一步包括获得编码抗体可变区的核酸序列。
17. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包括将所述核酸序列引入宿主细胞,所述宿主细胞处在适于表达所述抗体或其抗原结合片段的条件下。
18. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述TLR激动剂以至少0.5 ng/ml或至少0.5 nM的浓度存在。
19. 根据权利要求2所述的方法,其中ICOS以至少0.5 ng/ml或至少0.5 nM的浓度存在。
20. 根据权利要求3所述的方法,其中CD40L以至少0.5 ng/ml或至少0.5 nM的浓度存在。
21. 根据权利要求14所述的方法,其中ICOSL以至少0.5 ng/ml或至少0.5 nM的浓度存在。
22. 根据权利要求1-14中的任一项所述的方法,其中IL2以至少0.5 ng/ml的浓度存在。
23. 根据权利要求1-14中的任一项所述的方法,其中IL21以至少0.5 ng/ml的浓度存在。
24. 根据权利要求18所述的方法,其中所述TLR激动剂存在至少1天。
25. 根据权利要求19所述的方法,其中ICOS存在至少1天。
26. 根据权利要求20所述的方法,其中CD40L存在至少1天。
27. 根据权利要求21所述的方法,其中ICOSL存在至少1天。
28. 根据权利要求22所述的方法,其中IL2存在至少1天。
29. 根据权利要求23所述的方法,其中IL21至少存在1天。
30. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体

或全人源抗体。

31. 一种诱导PBMC增殖、B细胞活化和分化和/或B细胞成熟以产生IgG抗体或其抗原结合片段的方法,包括在含有IL2、IL21和TLR激动剂以及抗原的培养液中培养PBMC的步骤。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述培养液进一步包含CD40L、ICOSL和ICOS中的至少一种。

33. 一种产生IgG抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:

- a) 在含有IL2的培养液中培养PBMC;
- b) 向所述培养液中添加CD40L、ICOSL和TLR激动剂以及抗原;以及
- c) 向所述培养液中添加IL21。

34. 根据权利要求33所述的方法,所述方法进一步包括:

获得编码抗体可变区的核酸序列;并且任选地将所述核酸序列引入宿主细胞,所述宿主细胞处在适于表达所述抗体或其抗原结合片段的条件下。

35. 根据权利要求34所述的方法,所述方法进一步包括分离所述宿主细胞分泌的抗体。

36. 一种生产嵌合抗原受体(CAR)的方法,所述方法包括:

- 在培养液中培养PBMC,所述培养液包含IL2、IL21和TLR激动剂,以及抗原;
- 从所述培养的PBMC中分离其分泌的抗体;
- 获得编码所述抗体或其抗原结合片段的可变区的核酸序列;
- 将所述核酸序列可操作地连接到编码T细胞信号结构域的第二核酸;
- 表达可操作地连接的所述核酸序列和第二核酸。

抗体制备新方法

发明领域

[0001] 本发明主要涉及制备抗体的新方法,尤其是适用于制备全人源抗体的体外方法。

[0002] 发明背景

[0003] 抗体的制备方法在实验室和临床上都有广泛的应用。抗体制备过程中涉及杂交瘤技术、转基因动物模型和体外免疫法。传统的杂交瘤技术已经是被大多数人接受的主流成熟技术手段,通常包括动物免疫、淋巴细胞分离、淋巴细胞与骨髓瘤等永生化细胞融合、抗体人源化和亲和力成熟等步骤。抗体也可以通过高通量筛选的方法制备,但也面临着成本高、生产周期长、亲和力低、重链和轻链可变区配对不可预测等缺点。转基因动物模型是一种相对较新的技术,通过目前尚未明确的机制对动物进行基因改造,来表达人类的易变区域。近年来人们对体外免疫技术进行了深入研究和发展,使得该技术不再需要动物免疫,因而降低了其成本,操作更加方便快捷,无需任何人源化步骤即可获得全人源抗体,然而,鲜有用上述方法制备成功的抗体被报道。因此,继续需要研发新型高效的体外免疫方法来制备全人源抗体有重要意义。

[0004] 发明简述

[0005] 在一个方面,本发明提供了一种基于体外免疫手段制备抗体的新方法。

[0006] 在某些实施方案中,所述制备抗体或与抗原结合片段的方法都涉及一个步骤:用含有以下至少一种刺激剂的培养液培养外周血单核细胞(PBMC):CD40配体(CD40L)、诱导性T细胞共刺激因子(T cell co-stimulator, ICOS)、ICOS配体(ICOSL)、和/或Toll样受体(Toll-like Receptor, TLR)激动剂。在某些实施方案中,所述制备抗体或抗原结合片段的方法涉及在同时含有CD40L和ICOSL的培养液中培养PBMC的步骤。

[0007] 在某些实施方案中,培养液还进一步含有IL2和/或IL21。在某些实施方案中,PBMC是从人的造血干细胞(HSCs)或脐带血分离出的。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和Tf细胞(T follicular cells)。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和树突状细胞(dendritic cells)。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞、Tf和树突状细胞。

[0008] 在某些实施方案中,其中所述抗体或抗原结合片段是人源抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0009] 在某些实施方案中,其中所述抗体或抗原结合片段可以是亲和力成熟抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组抗体、双特异性抗体、标记抗体、二价抗体或抗独特型抗体。重组抗体是用体外重组方法制备的抗体。

[0010] 本发明公布了与其他细胞因子或刺激剂(例如单独的CD40L)相比,使用本发明提供的体外免疫方法,CD40L、ICOSL、ICOS或TLR激动剂中的至少一种能够显著增加PBMC产生的抗体的产量。在某些实施方案中,TLR激动剂是TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8或TLR9激动剂中的一种。在某些实施方案中,TLR激动剂是TLR7和TLR8(TLR7/8或TLR7/TLR8)激动剂。在某些实施方案中,TLR7激动剂是咪喹莫特(imiquimod)。在某些实施方案中,TLR9激动剂是CpG-ODN。在某些实施方案中,所述培养液包括ICOS和TLR激动剂。在某些实施方案中,所述培养液含有CD40L和TLR激动剂。在某些实施方案中,所述培养液含有ICOS

和CD40L。在某些实施方案中,所述培养液含有ICOS、CD40L和TLR激动剂。

[0011] 在某些实施方案中,培养液进一步含有抗原。在培养开始,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21天或更长时间后,将抗原添加到培养液中。在某些实施方案中,抗原存在至少0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、1个月或更长时间。

[0012] 在某些实施方案中,其培养液进一步含有刺激剂,包括但不限于共刺激分子(costimulators)、CpG-ODN 2006(CpG-ODN)、白细胞介素(interleukins)、抗凋亡蛋白(anti-apoptotic proteins)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNFs)、干扰素(interferons, INFs)、TLR配体、脂类(lipids)、avasimid、EFNB1、EPHB4、Plexin B2、Semaphorin 4C、B淋巴细胞诱导成熟蛋白(B-lymphocyte-induced maturation protein, BLIMP-1)、干扰素调节因子4(interferon regulatory factor 4, IRF4)、抗原或其任何组合。在某些实施方案中,共刺激分子是CD40、CD40L、ICOS、ICOSL、增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)、肿瘤坏死因子家族的B细胞激活因子(BAFF)、OX40、OX40配体(OX40L)或其任何组合。在某些实施方案中,CpG ODN能够刺激Toll样受体9(TLR9),包括但不限于CpG ODN 2006、D/K CpG或其任何组合。

[0013] 在某些实施方案中,白细胞介素包括但不限于IL2、IL21、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL13、IL14、IL15、IL33或其任何组合。在某些实施方案中,抗凋亡蛋白为Bcl-2、Bcl-6、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1及其类似物或其任何组合,其可通过本领域已知方法导入PBMC中,例如病毒感染。在某些实施方案中,抗体可以是抗人IgG或抗人IgM。在某些实施方案中,该培养液进一步含有Ephrin-B1前体(EFNB1)和/或激活诱导的胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AICDA)。在某些实施方案中,刺激剂来自人类或非人类动物。在某些实施方案中,刺激剂在培养开始,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天后添加到培养液中。

[0014] 在某些实施方案中,将刺激剂在培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天后从培养液移除。在某些特定实例中,通过更换培养液或洗涤细胞的手段来去除。

[0015] 在某些实施方案中,CD40L、ICOSL、ICOS和TLR激动剂中的至少一种能诱导PBMC中的B细胞分化、和/或B细胞成熟来增强抗体产生。

[0016] 在某些实施方案中,该方法还进一步包含分离从培养的PBMC分泌的抗体的步骤。分离过程包括将产生抗体的PBMC与人骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞的步骤,或通过分离从人源性展示文库(例如噬菌体展示文库、酵母展示文库或哺乳动物细胞展示文库)中选择出的Fv克隆可变域基因序列。这样的可变域基因序列可通过技术操作连接到所需的人类恒定区基因序列,然后表达、获取以及从上清液中纯化抗体。在某些实施方案中,产生抗体的PBMC是B细胞。

[0017] 在某些实施方案中,该方法进一步涉及获得能够编码抗体可变区域的核酸序列。在某些实施方案中,该方法进一步包含在适合表达所述抗体或抗原结合片段的条件下将核酸序列引入宿主细胞的过程。在某些实施方案中,从生物样本(例如细胞、组织或血液样本,比如PBMC)中分离DNA或RNA片段来获得核酸序列。在某些实施方案中,核酸序列是通过反转

录获得的cDNA。

[0018] 本发明还提供了一种诱导PBMC增殖、B细胞分化、和/或B细胞成熟的方法,其中包含用含有IL2的培养液培养PBMC的步骤。在某些实施方案中,进一步需要存在CD40L、ICOSL、ICOS、TLR激动剂和/或IL21中至少一种。

[0019] 在某些实施方案中,培养液中可以不含IL2。在某些实施方案中,通过培养更多的PBMC来获得足够数量的B细胞。

[0020] 本发明还提供了一种在能够产生抗体的PBMC中,通过抗体类别转换产生IgG的方法,其中涉及到用含有IL21的培养液培养产生抗体的PBMC的步骤。在某些实施方案中,上述培养液进一步含有IL2和/或CD40L、ICOSL、ICOS和TLR激动剂中的至少一种。在某些实施方案中,产生抗体的PBMC是B细胞。

[0021] 在某些实施方案中,培养液中不含IL21。在某些实施方案中,产生抗体的PBMC中通过抗体类别转换产生IgG过程不能有IL21的存在。

[0022] 本发明还提供了一种产生抗体或抗原结合片段的方法,其中所述包括:在有IL2存在,以及含有CD40L、ICOSL、ICOS和TLR激动剂、抗原、IL21和/或其中的一种或任意组合的条件下培养PBMC。

[0023] 本发明还提供了一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,其中所述包括:a)在含有IL2的培养液中培养PBMC;b)向培养液中添加CD40L、ICOSL、ICOS和TLR激动剂和抗原中的至少一种;c)向培养液中添加IL21。在某些实施方案中,该培养液进一步含有刺激剂,其包括但不限于共刺激分子、CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODNs)、白细胞介素、抗凋亡蛋白、TNFs、干扰素(INFs)、TLR配体、脂类、avasimid、EFNB1、EPHB4、丛蛋白B2、Semaphorin 4C、BLIMP-1、IRF4、抗体或其任何组合。

[0024] 本发明还提供了一种制备抗体或抗原结合片段的方法,其中所述包括:a)在含有IL2的第一种培养液中培养PBMC;b)在包含CD40L、ICOSL、ICOS和TLR激动剂和抗原中至少一种物质的第二个培养液中培养在步骤a)中获得的PBMC;c)在含有IL21的第三个培养液中培养步骤b)中获得的PBMC。在某些实施方案中,第一、第二和/或第三培养液还进一步含有刺激剂,后者包括但不限于共刺激分子、CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODNs)、白细胞介素、抗凋亡蛋白、TNFs、干扰素(INFs)、TLR配体、脂类、avasimid、EFNB1、EPHB4、丛蛋白B2、Semaphorin 4C、BLIMP-1、IRF4、抗体或其任何组合。

[0025] 在某些实施方案中,共刺激剂为CD40、CD40L、ICOS、ICOSL、APRIL、TNF家族的B细胞激活因子(BAFF)、OX40、OX40L或其任何组合。在某些实施方案中,CpG odn能够刺激TLR9,包括但不限于CpG2006、D/K CpG或其任何组合。在某些实施方案中,白细胞介素包括但不限于IL2、IL21、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL13、IL14、IL15、IL33或其任何组合。在某些实施方案中,抗凋亡蛋白为Bcl-2、Bcl-6、Bcl-XL、Bcl-w、Mc1-1及其类似物或其任何组合,并可以通过本领域已知方法导入PBMC中,例如病毒感染法。在某些实施方案中,抗体可以是抗人IgG或抗人IgM。在某些实施方案中,该培养液还进一步含有Ephrin-B1前体(EFNB1)和/或激活诱导的胞苷脱氨酶(AICDA)。在某些实施方案中,刺激剂来自人类或非人类动物。

[0026] 在某些实施方案中,该方法进一步包括获得编码抗体可变区域的核酸序列;并且在适合表达所述抗体或抗原结合片段的条件下,可以选择性地将核酸序列引入宿主细胞。在某些实施方案中,该方法还包括分离宿主细胞分泌的抗体。

[0027] 本发明还提供了用所述方法制备的抗体。在某些实施方案中,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合TrkA。TrkA的完整cDNA序列的GENBANK收录号为AB019488.2,人TrkA的氨基酸序列的GENBANK收录号为BAA34355.1。

[0028] 本发明还提供了一种产生嵌合抗原受体(CAR)的方法,包括表达能够操作性地连接到第二核酸的第一核酸的步骤,其中所述第一核酸编码根据本发明描述的方法产生的抗体或其抗原结合片段衍生的抗原结合域、或本发明所描述的抗体,其中所述第二核酸编码T细胞信号结构域。

[0029] 本发明还提供了一种治疗癌症的方法,包括在T细胞中表达可以通过技术手段将第一核酸连接到第二核酸,其中所述第一核酸可以编码根据本发明所述抗体及方法制备的抗体或其抗原结合片段衍生的抗原结合域,其中所述第二核酸可以编码T细胞信号域;并且将该T细胞用于所述受试者。在某些实施方案中,可随意从任何受试者获得T细胞。

[0030] 在某些实施方案中,第一批含有一种或多种刺激剂的试剂在培养开始后的第一个时间段添加到培养液中,然后在第二个时间段向培养液中添加第二批含有一种或多种刺激剂的试剂。在某些实施方案中,所述第一批含有一种或多种刺激剂的试剂需要在添加第二批含有一种或多种刺激剂的试剂之前被移除。在某些实施方案中,在第二周期结束时移除所述第二批一种或多种刺激剂。在某些实施方案中,所述“第一时间段”或“第二时间段”是指,0小时、0.5小时、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、一个月或更长。在某些实施方案中,“第一时间段”或“第二时间段”具有相同或不同的长度(或时间跨度)。在某些实施方案中,同时添加第一批含有一种或多种刺激剂的试剂和第二批含有一种或多种刺激剂的试剂。在某些实施方案中,一种或多种刺激剂的第一批和第二批是相同或不同的刺激剂。在某些实施方案中,第一批含有一种或多种刺激剂的试剂是IL2,第二批含有一种或多种刺激剂的试剂是ICOS、ICOSL、CD40L以及ICOSL和/或TLR激动剂。

[0031] 在某些实施方案中,第一批一种或多种刺激剂在培养开始后的第一段时间添加到培养液中,然后在第二段时间向培养液中添加第二批一种或多种刺激剂,然后在培养液中加入第三批一种或多种刺激剂,持续第三段时间。在某些实施方案中,所述第一批一种或多种刺激剂在添加第二批一种或多种刺激剂之前被移除。在某些实施方案中,所述第二批一种或多种刺激剂在添加第三批一种或多种刺激剂之前被移除。在某些实施方案中,培养液中存在至少两批一种或多种刺激剂。在某些实施方案中,所述“第一时段”、“第二时段”或“第三时段”是指,0小时、0.5小时、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、2天、2天、2天、3天、4天、5天、2天、2天、7天、3天、8天、9天、9天、10天、11天、12天、13天、1天、16天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、1天、2天、2天、,22天,23天,24天,25天,一个月或更长。在某些实施方案中,“第一周期”、“第二周期”或“第三周期”具有相同或不同的长度(或时间跨度)。在某些实施方案中,一种或多种刺激剂的第一批、第二批和第三批是相同或不同的刺激剂。在某些实施方案中,第一批一种或多种刺激剂是IL2,第二批一种或多种刺激剂是ICOS、ICOSL、CD40L以及ICOSL和/或TLR激动剂,第三批一种或多种刺激剂是IL21。

[0032] 在某些实施方案中,刺激剂浓度至少要达到0.5、1、1、2、3、4、4、5、6、7、8、9、10、12、

15、20、25、30、35、40、45、50、55、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、250、300、350、400、450、450、500或更多ng/ml、亦或是0.5、1、2、3、4、5、5、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、35、50、35、40、45、50、50、55、55、55、9、9、9、10、10、10、10、10、10、10、10、45、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，亦或者0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000或更多nM。在某些实施方案中，IL2至少要达到0.5、1、2、2、3、3、4、5、6、6、7、8、9、10、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、350、400、450、500或更多ng/ml，或者0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、9、10、12、15、20、25、30、30、35、25、30、30、35、40、45、45、50、50、55、60、60、65、65、65、12、12、12、15、15、15、15、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，或者0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000或更多nM。在某些实施方案中，CD40L、ICOSL、ICOS和/或TLR激动剂至少要达到0.5、1、1、2、2、3、4、5、5、6、6、7、8、9、10、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、40、45、45、50、55、60、65、65、70、75、60、65、65、70、75、80、85、90、95、100、150、150、200、200、250、300、350、350、400、450、500、600、600、700、700、700、800或更多ng/ml，或者0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，或0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、35、35、25、25、25、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、75、80、85、90、95、95、95、95、50、35、35、35、35、35、35、35、35、35、900、1000或更多nM。在某些实施方案中，IL21浓度至少要达到0.5、1、2、2、3、3、4、5、6、6、7、8、9、10、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、150、200、250、300、350、350、400、450、500、600、600、700、800、1000或更多ng/ml，或者0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，或者0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、500、600、700、800、1000或更多ng/ml，或者0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500或更多 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，或者0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900、1000或更多nM。

[0033] 在某些实施方案中，IL2的浓度为10ng/ml。在某些实施方案中，IL21的浓度为50ng/ml。在某些实施方案中，ICOS的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在某些实施方案中，ICOSL的浓度为50ng/ml，和/或CD40L的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在某些实施方案中，TLR激动剂的浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或0.1nM、50nM或500nM。TLR激动剂为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的TLR9激动剂CpG-ODN、50nM或500nM的TLR7激动

剂咪喹莫特或合成的TLR7/8激动剂。

[0034] 在某些实施方案中,IL2和IL21使用比例为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100、1:150、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000或1:20000。在某些实施方案中,IL2、IL21与ICOS的使用比例为1:5:10、1:5:20、1:5:30、1:5:40、1:5:50、1:5:100、1:5:200、1:5:500、1:5:1000、1:5:1500、1:5:2000、1:5:5000、1:5:10000、1:5:20000、1:5:50000。在某些实施方案中,IL2、IL21与TLR激动剂使用比例为1:5:50、1:5:100、1:5:200、1:5:500、1:5:1000、1:5:1500、1:5:2000、1:5:5000、1:5:10000、1:5:20000、1:5:50000。在某些实施方案中,ICOSL与CD40L使用比例为1:1、1:2、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100、1:150、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:10000或1:20000。在某些实施方案中,IL2、IL21与CpG ODN 2006使用比例为1:5:10、1:5:20、1:5:30、1:5:40、1:5:50、1:5:100、1:5:200、1:5:500、1:5:1000、1:5:1500、1:5:2000、1:5:5000、1:5:10000、1:5:20000、1:5:50000。

[0035] 在某些实施方案中,刺激剂作用时间至少为0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、1个月或更长时间。

[0036] 在某些实施方案中,IL2作用时间至少为0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、1个月或更长时间。

[0037] 在某些实施方案中,ICOSL、CD40L、ICOS和/或TLR激动剂作用时间至少为0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天,一个月或更长。

[0038] 在某些实施方案中,IL21作用时间至少为0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、1个月或更长时间。

[0039] 附图简述

[0040] 图1说明IL2刺激PBMC增殖。用TrkA抗原(2 μ g/ml)体外免疫PBMC,在不同的刺激剂作用下作用14天。用血细胞仪测定细胞密度。值得注意的是,用IL2处理后细胞密度增加了15倍。添加的刺激剂浓度分别为:阿瓦斯米,10 μ M/ml;CpG-ODN,2 μ g/ml;IL21,50ng/ml;IL2,10ng/ml;IL4,10ng/ml;BAFF,50ng/ml。ICOSL浓度如图所示。

[0041] 图2A-2B说明,体外免疫后,ICOSL与CD40L共同作用能够强烈刺激PBMC的B细胞产生IgG抗体,而不是IgM。PBMC在不同刺激剂的培养液中培养7天。在第0天,将TrkA蛋白作为抗原与刺激剂一起加入培养液中。第7天检测抗TrkA抗体的IgG(图2A)或IgM(图2B)两种亚型的产生情况。注意,在IL2(10ng/ml)和IL21(50ng/ml)(也称为基础刺激剂(basic))加上CpG-ODN的存在下,CD40L和ICOSL对抗TrkA IgG(而不是IgM)的产生的刺激作用比CD40L或ICOSL单独作用强很多。刺激剂的添加浓度分别为:CD40L,2 μ g/ml;OX40L,如图所示;ICOSL,2 μ g/ml。所有其他刺激剂,与图1所示相同。

[0042] 图3A-3B显示,在所有被单独测试的刺激剂中,只有IL21刺激了抗体IgG的产生,但不会产生IgM。用TrkA抗原和所示的各种刺激剂对PBMC免疫作用7天。用ELISA法检测第7天时抗TrkA抗体中以IgG(图3A)或IgM(图3B)形式存在的水平。添加的刺激剂浓度与图2相同。

胆固醇浓度为5 μ g/ml。

[0043] 图4A-4B显示体外免疫过程中,CD40L或ICOS能够促进抗原诱导的抗体IgG(图4A)或IgM(图4B)的产生。用卵清蛋白(OVA)或TrkA抗原免疫PBMC,然后在不同条件下培养。用ELISA法测定IgG(图4A)或IgM(图4B)形式的抗体(抗OVA或抗TrkA)的产生水平。对照组添加PBS。注意,无论是OVA还是TrkA作为抗原,ICOS都比CD40L更有效地刺激IgG抗体的产生。

[0044] 图5A-5C的流式细胞术结果显示体外免疫后B细胞呈现生发中心(GC)样特征(CD3⁻,CD19⁺,GL7⁺,Fas⁺)。图5A显示,在缺乏抗原或刺激剂的情况下,呈现GC样的B细胞数量非常少。图5B和图5C显示CD40L和ICOS均能显著增了GC样B细胞的生成。在这两种情况下,PBMC均用OVA抗原(2 μ g/ml)免疫,并在IL2+IL21(基础刺激剂/basic)存在下培养。将CD40L(55nM)或ICOS(55nM)与基础刺激剂同时加入培养液中。细胞用流式细胞仪分类计数。

[0045] 图6A和6B显示,toll样受体(TLR)激动剂在刺激抗体产生方面远优于CD40L。在基础刺激剂/basic(IL2和IL21)存在下用OVA抗原免疫PBMC,将CD40L(55nM)或合成的TLR7/8激动剂(50nM或500nM)与基础刺激剂一起加入培养液中。用ELISA法测定抗OVA抗体,包括IgG(图6A)或IgM(图6B)形式抗体。对照组添加PBS。

[0046] 图7A和7B显示了在不同供体中通过体外免疫产生的抗体。在IL2和IL21存在下用OVA抗原刺激PBMC 14天,同时有CD40L或合成的TLR7/8激动剂存在。图7A显示IgG的产生水平,图7B显示IgM的产生水平。

[0047] 图8显示合成的TLR7/8激动剂增强了AICDA(活化诱导的胞苷脱氨酶,一种已知的会参与抗体亲和力成熟化的基因)的表达。分别用OVA抗原(2 μ g/ml)和CD40L(55nM)或合成的TLR7/8激动剂(500nM)对供体3和供体4的PBMC进行免疫14天。采集细胞,RT-PCR检测AICDA水平。对照组添加PBS。

[0048] 图9显示了各种刺激剂对AICDA和BLIMP-1表达水平的影响。用OVA抗原免疫PBMC,然后用所示刺激剂培养,再用RT-PCR方法检测AICDA和BLIMP-1表达水平。

[0049] 图10A和图10B显示,TLR9激动剂在刺激PBMC中的抗OVA抗体产生方面具有与CD40L相似的效果。按照图6所示的方法进行操作,并在第14天通过ELISA测定抗体产生量。图10A显示IgG的产生水平,图10B显示IgM的产生水平。

[0050] 图11A-11G显示合成的TLR7/8激动剂和TLR9拮抗剂在刺激PBMC产生抗OVA抗体方面的相互作用。在低浓度(0.02-0.2 μ M)时,TLR9拮抗剂E6446增强了合成TLR7/8的作用效果,而在高浓度(10 μ M)时,E6446抑制了这种作用效果。在刺激孵育7天或14天后,用酶联免疫吸附试验(ELISA)分析OVA-特异性抗体IgG(图11A和11D)和IgM(图11B和11E)。细胞增殖(图11C和11F)用CellTiter-glo kit测定。收集细胞后,用流式细胞仪(G)检测。滤泡树突状细胞(FDCs)被区分为CD3-CD19-CD21+/CD35+细胞。注:CD35和CD21是树突状细胞(DC)标记物,可能代表树突状细胞的两个亚群。CD21亚型被高浓度的E6446抑制。在此基础刺激剂(basic)代表OVA+IL2+IL21。数据表示3次重复的平均值;误差条表示标准误差。图示结果显示了3个独立实验的代表性数据。用基础刺激剂+TLR7/8激动500nM+E6446-0.2 μ M刺激IgG反应,与单纯用基础刺激剂+TLR7/8激动剂500nM刺激IgG反应相比,*p<0.05。用基础刺激剂+TLR7/8激动剂500nM刺激与用基础刺激剂在刺激IgG反应比较,**p<0.01。在IgG和IgM反应中,用基础刺激剂+TLR7/8激动剂500nM+E6446 10 μ M刺激与用基础刺激剂+TLR7/8激动剂500nM刺激相比,***p<0.001。

[0051] 图12A-12I显示了不同刺激剂对IgG和IgM表达水平的协同和互补作用。刺激剂孵育7天或14天后,对OVA特异性抗体的IgG(图12B、12E和12H)和IgM(图12A、12D和12G)形式的表达水平进行ELISA分析。细胞增殖(图12C、12F和12I)用CellTiter-glo试剂盒测定。在此基础刺激剂(basic)是指OVA+IL2+IL21。图12A-12C显示:ICOS能够增强IL2或IL21对IgG表达水平的作用效果。图12D-12F显示:CD40L能够增强IL2或IL21对IgG表达水平的作用效果。图12G-12I显示:TLR7/8能够增强IL2或IL21对IgG表达水平的作用效果。数据为3次独立实验重复得到的平均值;误差条表示标准误差。给出了3个独立实验的代表性数据。在产生IgG反应中,用基础刺激剂刺激与用基础刺激剂+24nM ICOS刺激比较,* $p < 0.05$ 。在产生IgG反应中,用基础刺激剂刺激与用基础刺激剂+55nM CD40L或500nM合成的TLR7/8激动剂刺激相比,** $p < 0.01$ 。在第14天的IgG产生反应中,用基础刺激剂刺激与用基础刺激剂+24nM ICOS或500nM合成的TLR7/8激动剂刺激相比,**** $p < 0.0001$ 。

[0052] 图13A-13F显示ICOS、CD40L、合成的TLR7/8激动剂对IgG和IgM表达水平的调节作用存在剂量依赖效性。刺激剂孵育7天或14天后,产生的OVA特异性抗体中的IgG(图13B、13D和13F)和IgM(图13A、13C和13E)水平用ELISA进行分析。细胞增殖(图13C、13F和13I)用CellTiter-glo试剂盒测定。在此基础刺激剂(basic)是指OVA+IL2+IL21。展示的数据为3次重复实验的平均值;误差条表示标准误差。图中显示了三次独立实验中最具代表性意义的一个个数据。在刺激IgG产生反应中,分别用基础刺激剂和基础刺激剂+100nM ICOS或500nM合成的TLR7/8激动剂相比;或者在刺激IgM产生反应中,基础刺激剂和基础刺激剂+24nM CD40L相比,** $p < 0.01$ 。在刺激IgM产生反应中,用基础刺激剂与基础刺激剂+24nM CD40L相比,**** $p < 0.001$ 。在IgM产生反应中,用基础刺激剂刺激与用基础刺激剂+100nM ICOS或合成的TLR7/8激动剂(50nM和500nM)刺激相比,***** $p < 0.0001$ 。

[0053] 发明详述

[0054] 以下对本发明的描述仅仅是为了说明本发明的各种实施方案。因此,所讨论的具体修改不应被解释为对本发明的范围的限制。对于本领域技术人员来说,显而易见的是,可以在不脱离本发明的范围的情况下进行各种等同、改变和修改,并且可以理解,此类等同实施方案也在此被包含在内。本发明引用的所有参考文献,包括出版物和专利,全部通过引用并入本发明。

[0055] 发明术语

[0056] 本发明中使用的术语“抗体”包括任何免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体或与特定抗原结合的双特异性(二价)抗体或其功能部分。一种天然完整抗体,包括两条重链(H)和两条轻链(L),二硫键相互连接。每个重链由可变区(VH)和第一、第二和第三恒定区(分别为CH1、CH2和CH3)组成,而每个轻链由可变区(VL)和恒定区(CL)组成。哺乳动物重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,哺乳动物轻链分为 λ 或 κ 。

[0057] 轻链和重链的可变区域负责抗原结合。两个链中的变量区域通常被细分为三个高变异区域,称为互补决定区域(CDR)(轻(L)链CDR包括LCDR1、LCDR2和LCDR3,重(H)链CDR包括HCDR1、HCDR2和HCDR3)。本发明公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可以由Kabat、Chothia或Al-Lazikani的约定来定义或识别(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273(4), 927(1997); Chothia, C.等人, J Mol Biol. Dec 5; 186(3): 651-63(1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901(1987); Chothia, C.等人,

Nature. Dec 21-28; 342(6252): 877-83 (1989); Kabat E.A. 等人, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

[0058] 这三个CDRs位于称为框架区域 (framework regions, FRs) 的两侧延伸之间, FRs比CDRs更为保守, 并形成一个支架来支持高变异度的环状结构。因此, 每个VH和VL由三个CDR和四个FRs组成, 顺序如下 (N末端到C末端的氨基酸残基): FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的恒定区域不参与抗原结合, 但具有多种效应功能。抗体根据其重链恒定区的氨基酸序列分为五大类: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 其特征分别为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。几类主要抗体的亚类是IgG1 (γ 1重链)、IgG2 (γ 2重链)、IgG3 (γ 3重链)、IgG4 (γ 4重链)、IgA1 (α 1重链) 或IgA2 (α 2重链)。

[0059] 本发明中的“单克隆抗体”是指从基本相同的抗体群体中获得的抗体, 即, 包含该群体的单个抗体是相同的或结合相同的表位, 除了可能的变异抗体, 例如, 含有自然发生的突变或在单克隆抗体制备过程中产生的, 这种变异通常存在量很少。与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂不同, 单克隆抗体制剂的每一单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此, “单克隆”表明抗体是从基本上均匀的抗体群中获得的, 并且不应被解释为要求通过任何特定方法生产抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术产生, 包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法。

[0060] “人源抗体”是指具有氨基酸序列的抗体, 该氨基酸序列与从人或者人类细胞产生的抗体或利用人源抗体库或其他人源抗体编码序列的非人类来源衍生的抗体的氨基酸序列相对应。人源抗体的这一定义特别排除了包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。

[0061] 本发明中使用的“人源化抗体”是指来自非人类动物的CDRs、来自人类的FR区域以及 (如适用) 来自人类的恒定区域的抗体或抗原结合片段。

[0062] 如本发明所使用的, “双特异性”抗体是指具有来自两种不同单克隆抗体的片段并且能够结合两种不同表位的人工抗体。两个表位可能出现在同一抗原上, 也可能出现在两种不同的抗原上。

[0063] 本发明中的术语“二价”是指具有两个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段; “一价”是指仅具有一个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段; “多价”是指具有多个抗原结合位点。在一些实施例中, 其中所述抗体或抗原结合片段是二价的。

[0064] 如本发明所使用的, “双特异性”抗体是指具有来自两种不同单克隆抗体的片段并且能够结合两种不同表位的人工抗体。两个表位可能出现在同一抗原上, 也可能出现在两种不同的抗原上。

[0065] 本发明中使用的术语“嵌合”是指具有来自某个物种的重链和/或轻链的一部分, 以及来自不同物种的重链和/或轻链的其余部分抗体或抗原结合片段。在一个说明性示例中, 嵌合抗体可包括从人类衍生的恒定区域和从非人类动物 (例如从小鼠或大鼠) 衍生的可变区域。在一些实施例中, 非人类动物是哺乳动物, 例如, 小鼠、大鼠、兔子、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

[0066] “亲和力成熟”抗体是指在一个或多个高变区 (HVRs), 有一个或多个氨基酸残基的改变或替代的抗体, 例如互补性决定区 (CDRs), 与没有这种改变或替代的亲本抗体相比, 提高了抗体对抗原的亲和力。

[0067] 本发明所用关于氨基酸残基的术语“替代”是指肽、多肽或蛋白质中一种或多种氨

基酸与另一种氨基酸的自然发生或诱导的替代。多肽的替代可能导致多肽功能的减弱、增强或消除。

[0068] 参照氨基酸序列,替代也可以是“保守替代”,是指替代具有类似物理化学性质但侧链不同的氨基酸残基,或替代那些对多肽活性不重要的氨基酸。例如,可以在具有非极性侧链的氨基酸残基(例如Met、Ala、Val、Leu和Ile、Pro、Phe、Trp)之间、具有未带电极性侧链的残基(例如Cys、Ser、Thr、Asn、Gly和Gln)之间、具有酸性侧链的残基(例如Asp、Glu)之间进行保守替代,在具有碱性侧链的氨基酸(例如His、Lys和Arg)、具有 β 支链的氨基酸(例如Thr、Val和Ile)、具有含硫侧链的氨基酸(例如Cys和Met)或具有芳香侧链的残基(例如Trp、Tyr、His和Phe)之间。在某些实施方案中,替代、删除或添加也可被视为“保守替代”。插入或删除的氨基酸数量可以在1到5之间。保守替代通常不会引起蛋白质构象结构的显著变化,因此可以保持蛋白质的生物活性。

[0069] 如本发明所用,术语“抗原结合片段”是指由包含一个或多个CDRs的抗体片段形成的抗体片段,或与抗原结合但不包含完整的天然抗体结构的任何其他抗体部分。在某些实施方案中,本发明提供的抗体是抗原结合片段。抗原结合片段的实例包括但不限于双体抗体(diabody)、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、抗体可变区(Fv)片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、 $(dsFv)_2$ 、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双链双体抗体(ds diabody)、单链抗体可变区片段(scFv)、scFv二聚体(二价diabody),一种多特异性抗体、骆驼化单域抗体、纳米体、域抗体、分离出的CDR和二价域抗体。抗原结合片段能够与亲本抗体结合的同一抗原结合。在某些实施方案中,抗原结合片段可包含来自特定人源抗体的一个或多个CDRs。

[0070] 本发明中使用的“抗原”或“Ag”是指在细胞培养或动物体内能够刺激抗体产生或T细胞反应的化合物、组分、肽、多肽、蛋白质、RNA、DNA等物质,包括添加到细胞培养物(如杂交瘤)或注入或吸收到动物体内的成分(如包含癌症特异性蛋白质的成分)。抗原与特异性体液或细胞免疫(如抗体)的产物发生反应,包括由异源抗原诱导的产物。

[0071] “Fab”关于抗体是指抗体的一价抗原结合片段,由通过二硫键结合到单个重链的可变区和第一恒定区的单个轻链(可变区和恒定区)组成Fab可通过木瓜蛋白酶消化在铰链区重链之间的二硫键的N-末端的残基处的抗体。

[0072] “Fab”是指包含铰链区域一部分的Fab片段,可以通过在铰链区域的重链的二硫键的C-末端近端残基的胃蛋白酶消化获得抗体,因此在铰链区域的少量残基(包括一个或多个半胱氨酸)中与Fab不同。

[0073] “ $F(ab')_2$ ”是指Fab'的二聚体,包括两条轻链和两条重链的一部分。

[0074] 抗体的“Fc”是指由通过二硫键与第二重链的第二和第三恒定区域结合的第一重链的第二和第三恒定区域组成的抗体部分。IgG和IgM-Fc区域包含三个重链恒定区域(每个链中的第二、第三和第四重链恒定区域)。它可以通过木瓜蛋白酶消化抗体获得。抗体的Fc部分负责各种效应器功能,如ADCC和CDC,但在抗原结合中不起作用。

[0075] 抗体的“Fv”是指带有完整抗原结合位点的抗体的最小片段。Fv片段由单个轻链的可变区与单个重链的可变区结合而成。“dsFv”是指单链轻链可变区和单链重链可变区通过二硫键稳定的Fv片段,二者通过二硫键连接。

[0076] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由一个轻链可变区和一个重链可变区组成的工程抗体,这些轻链可变区直接或通过肽连接序列连接在一起(Huston JS等人Proc Natl Acad

Sci USA, 85:5879(1988))。单链抗体二聚体是指由两个重链可变区和两个轻链可变区组成的带有连接体的单链。在某些实施方案中,“单链抗体二聚体”是一种二价体或二价单链抗体(BsFv),包括与另一个 V_H-V_L 部分二聚的 V_H-V_L (通过肽连接体连接),使得一个部分的 V_H 与另一个部分的 V_L 协调,并形成两个结合位点,可针对相同抗原(或epitope)或不同抗原(或epitope)。在其他实施方案中,“单链抗体二聚体”是包含与 $V_{L1}-V_{H2}$ (也由肽连接体连接)相关联的 $V_{H1}-V_{L2}$ (由肽连接体连接)的双特异性双体抗体,使得 V_{H1} 和 V_{L1} 与 V_{H2} 和 V_{L2} 配位,并且每个配位对具有不同的抗原特异性。

[0077] “单链Fv-Fc抗体”或“单链Fv-Fc”是指由连接到抗体Fc区的单链Fv组成的工程抗体。

[0078] “骆驼化单结构域抗体”、“重链抗体”、“纳米体”或“HCAb”是指含有两个VH结构域且没有轻链的抗体(Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10; 231(1-2): 25-38(1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun; 74(4): 277-302(2001); W094/04678; W094/25591; U.S. Patent No. 6,005,079)。重链抗体最初从骆驼科(骆驼、单峰骆驼和美洲驼)获得。虽然没有轻链,骆驼化抗体有一个真正的结合抗原的全部能力(Hamers-Casterman C. 等人, Nature. Jun 3; 363(6428): 446-8(1993); Nguyen VK. 等人, “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” Immunogenetics. Apr; 54(1): 39-47(2002); Nguyen VK. 等人, Immunology. May; 109(1): 93-101(2003))。

[0079] 重链抗体的可变结构域(VHH结构域)代表由适应性免疫反应生成的最小已知抗原结合单元(Koch-Nolte F. 等人, FASEB J. Nov; 21(13): 3490-8. Epub 2007 Jun 15)。“双体抗体(Diabodies)”包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述片段包括连接到单个多肽链(V_H-V_L or V_L-V_H)中的 V_L 结构域的 V_H 结构域(参见Holliger P. 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15; 90(14): 6444-8(1993); EP404097; W093/11161)。同一链上的两个结构域不能配对,因为连接子太短,因此,这些结构域被迫与另一链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。抗原结合位点可能针对不同抗原(或表位)。

[0080] “结构域抗体”是指仅包含重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些实施方案中,两个或更多 V_H 结构域与肽连接物共价连接以形成二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的两个 V_H 结构域可能针对相同或不同的抗原。

[0081] 本发明中使用的术语“价(valent)”是指给定分子中存在指定数量的抗原结合位点。因此,术语“二价”、“四价”和“六价”表示抗原结合分子中分别存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。如果两个结合位点都用于同一抗原或同一表位的特异性结合,则二价分子可以是单特异性的。类似地,三价分子可以是双特异性的,例如,当两个结合位点对第一抗原(或表位)是单特异性的,而第三个结合位点对第二抗原(或表位)是特异性的。

[0082] “表位”或“抗原决定簇”是指结合剂(如抗体)与抗原结合的区域。表位可以由相邻氨基酸(也称为线性或顺序表位)或通过蛋白质的三级折叠并列的非相邻氨基酸(也称为构型或构象表位)形成。由邻接氨基酸形成的表位通常沿蛋白质上的一级氨基酸残基线性排列,邻接氨基酸的小片段可从与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原中消化或在暴露于变性溶剂中保留,而由三级折叠通常在用变性溶剂处理时丢失。一个表位通常包括

至少3个,或5个,或7个,或约8-10个氨基酸,具有独特的空间构象。

[0083] 在某些实施方案中,一个“(dsFv)₂”包含三个肽链:两个V_H部分通过肽连接剂连接并通过二硫键连接到两个V_L部分。

[0084] 在某些实施方案中,“双特异性ds-双体抗体”包括通过V_{H1}和V_{L1}之间的二硫化物桥与V_{L1}-V_{H2}(也由肽连接器连接)结合的V_{H1}-V_{L2}(由肽连接器连接)。

[0085] 在某些实施方案中,“双特异性dsFv”或“dsFv-dsFv”包括三个肽链:V_{H1}-V_{H2}部分,其中所述重链由肽连接器(例如,长柔性连接物)结合,并通过二硫键与V_{L1}和V_{L2}部分配对。每个二硫键对重链和轻链都有不同的抗原特异性。

[0086] 本发明中的术语“全人源”相关的抗体或者抗原结合片段,是指人体或人源免疫细胞产生的抗体相应的氨基酸序列,或非人类来源,例如利用人源抗体库或其他人源抗体编码序列的转基因非人类动物。在某些实施方案中,全人源抗体不包括源自非人源类抗体的氨基酸残基(特别是抗原结合残基)。

[0087] “基本上”、“基本上相同”是指两个数值之间具有高度相似性,并且本专业领域人员不认为这两个值之间存在显著差异,亦或是指在这些值所指代的统计或生物活性方面几乎没有差异。相比之下,“实质上较低”意味着作为参考值的指标,数值小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%左右。

[0088] 本发明中使用的术语“特异结合”或者“特异性结合”是指两个分子之间的非随机结合反应,例如抗体和抗原之间的非随机结合反应。在某些实施方案中,本发明提供的抗体或抗原结合片段以约0.01nM至约100nM、约0.1nM至约100nM、约0.01nM至约10nM、约0.1nM至约5nM、约0.1nM至约5nM、约0.01nM至约1nM的结合亲和力(KD)特异性地结合人类和/或非人类抗原纳米,约0.1纳米至约1纳米或约0.01纳米至约0.1纳米)。这里使用的KD是指离解率与缔合率的比率(koff/kon),可以使用表面等离子体共振方法来确定,例如Biacore的仪器。

[0089] “癌症”或“癌变状态”指由肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移介导的任意生理状态,包括实体癌和非实体癌,如白血病。此处所用的“肿瘤”是指肿瘤和/或恶性细胞的固体肿块。

[0090] 本发明中使用的某种状况下的“治疗”、“治疗手段”或“诊治”可以互换使用,并且包括临床治疗、预防性药物或预防措施,例如预防或缓解条件、减缓条件的发生或发展速度、降低发展条件的风险,预防或延缓与疾病相关的症状的发展,减少或结束与疾病相关的症状,使得疾病状态的完全或部分回复,治疗疾病或其任意组合。关于癌症,“治疗”或“治疗手段”可指抑制或减缓肿瘤或恶性细胞的生长、增殖或转移,防止或延缓肿瘤或恶性细胞的生长、增殖或转移或其任意组合的发展。对于肿瘤,“治疗”或“治疗手段”包括根除肿瘤的全部或部分,抑制或减缓肿瘤生长和转移,防止或延缓肿瘤的发展,或其一些任意组合。

[0091] 一种“分离出的(isolated)”物质被人从自然状态中通过修饰而改变。如果一种“分离出的”成分或物质在自然界中出现,它已经改变或从其原始环境中移除,或者两者都发生了。例如,“分离出的”多核苷酸或多肽是分别不含其他多核苷酸或多肽的多核苷酸或多肽,并且与在自然状态下具有多核苷酸或多肽的天然成分无关。在某些实施方案中,通过至少一步纯化“分离出的”抗体,使其纯度达到至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%(例如使用考马斯蓝或银染色的SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳),

色谱法(如离子交换色谱法或反相高效液相色谱法)或洛瑞法。

[0092] 术语“载体”是指编码蛋白质的多核苷酸可操作地插入和运输以在宿主细胞中表达该蛋白质的工具。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞,以使其携带的遗传元素在宿主细胞内表达。示范性载体类型包括但不限于质粒(例如噬菌体、cosmids、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生人工染色体(PAC))、病毒载体(噬菌体例如lambda噬菌体或M13噬菌体或动物病毒)、细菌载体或非上位哺乳动物载体。

[0093] 用作载体的动物病毒包括逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头状瘤病毒和丘疹病毒(例如SV40)。载体可包含多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择元件和报告基因。此外,该载体(例如细菌载体或上位哺乳动物载体)可包含复制起源。载体还可包括有助于其进入细胞的材料,包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白质涂层。

[0094] “核酸”或“核酸序列”或“多核苷酸”可在本发明中互换使用,都是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其单链或双链形式的聚合物。除非特别限定,否则该术语包括已知天然核苷酸类似物的多核苷酸,其具有与参考核酸相似的结合特性,并且以类似于天然核苷酸的方式代谢。除非另有说明,否则特定的多核苷酸序列还包含其保守修饰的变体(例如,简并密码子替代)、等位基因、直系同源基因、单核苷酸多态性和互补序列以及显式指示的序列。具体地说,简并密码子替代可以通过生成序列来实现,其中一个或多个被选定的(或所有)密码子的第三位置被混合碱和/或脱氧核糖残基替代(参见文献Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);and Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0095] 本发明中使用的“宿主细胞”是指已将外源多核苷酸和/或载体引入其中以表达一种或多种外源蛋白质的细胞。它既指代特定的受试细胞,也指代其子细胞。宿主细胞可以是原核生物、真核生物、植物细胞、动物细胞或杂交瘤。它可以是一个细胞虽然并未按照预期水平表达蛋白质,但是若将调节剂引入该细胞或将调节序列引入宿主细胞并使其与核酸可操作地连接时,包含的是该核酸。

[0096] 术语“单核细胞(mononuclear cells,MCs)”是指新生儿脐血单核细胞(CBMC)和/或成人外周血单核细胞(PBMC)。术语“人外周血单核细胞总数量、总PBMC数量、PBMC数量、总PBMC数量或人PBMC数量”是指具有圆形细胞核的任何外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞)和单核细胞。PBMC可以通过本领域的常规技术从全血中提取,例如使用ficoll(一种分离血液层的亲水性多糖)进行密度梯度离心,上层为血浆,然后是一层PBMC,底部为多形核细胞(如中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)和红细胞。PBMC的增殖可通过本领域已知的方法在体外检测或确认,例如,通过MTT分析(一种显色法)、AO/PI(吖啶橙和碘化丙啶)染色或细胞计数。

[0097] 在某些实施方案中,PBMC包括B细胞。在某些实施方案中,PBMC包括至少一种类型的B细胞、T细胞(例如Tf细胞/T滤泡细胞/T follicular cell)、树突状细胞、NK细胞、单核细胞及其任何组合。例如,在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和T细胞(例如Tf细胞)。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和树突状细胞。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞、T细胞(例如Tf细胞)和树突状细胞。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和NK细胞。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞和单核细胞。在某些实施方案中,PBMC包括B细胞、T细胞(例如Tf细胞)

和NK细胞。在某些实施方案中，PBMC包括B细胞、T细胞(例如Tf细胞)、树突状细胞和NK细胞。

[0098] 本发明所用术语“B细胞”是指B淋巴细胞，一种属于淋巴细胞亚型的白细胞。它们通过分泌抗体在适应性免疫系统的体液免疫成分中发挥作用。B细胞也提供抗原和分泌细胞因子。在哺乳动物中，B细胞在骨髓中成熟；之后，通过血液迁移到脾脏和淋巴结等次级淋巴器官(SLOs)，在这里B细胞通过循环淋巴获得恒定的抗原供应。与其它两类淋巴细胞(即T细胞和自然杀伤细胞)不同，B细胞在其细胞膜上表达B细胞受体(BCR)，这使得B细胞能够结合某种特定的抗原，并对其启动抗体反应。

[0099] 在三个B细胞亚群中，FO B细胞优先进行T细胞依赖性(TD)激活，而边缘区(MZ)B细胞和B1 B细胞优先进行T细胞独立性(TI)激活。被TI抗原激活的B细胞在淋巴滤泡外增殖，但仍在SLOs中，可能经历免疫球蛋白类转换，并分化为短寿命的浆细胞，产生早期微弱的抗体，这些大部分属于IgM类，也有一些长寿命的不产生抗体的浆细胞群。B细胞的活化是通过CD21的活化来增强的，CD21是一种与表面蛋白CD19和CD81形成复合物的表面受体(这三者统称为B细胞共受体复合物，简称BCR)。当BCR与标记了C3补体蛋白片段的抗原结合时，CD21与C3片段结合，再与结合的BCR共同结合，并通过CD19和CD81转导信号以降低细胞的激活阈值。在某些实施方案中，B细胞是自然存在于来自健康供体的PBMC中的细胞。

[0100] 术语“初始B淋巴细胞(naive B lymphocytes)”是指从未通过其表面免疫球蛋白与抗原结合位结合的B淋巴细胞(B细胞)。这些B细胞直接来自从未接触过抗原的受试者的外周血。因此，这些受试者的血清表现出与所述抗原相关的阴性状态，即他们将检测不到针对上述抗原的抗体。

[0101] “B细胞发育”在这里是指淋巴前体细胞分化为最早的特异性B细胞(祖B细胞(pro-B细胞))，其在小鼠中表达跨膜酪氨酸磷酸酶CD45R(或B220)。pro-B细胞转化为前B细胞(pre-B细胞)的增殖和分化需要骨髓基质细胞提供的微环境，它与pro-B和pre-B细胞直接相互作用，并分泌各种细胞因子，特别是IL-7能否促进发育过程。

[0102] 本发明所用的“B细胞成熟”是指依赖于淋巴干细胞中免疫球蛋白DNA重排的时期。在B细胞发育过程中，顺序Ig-give重排将pro-B细胞转化为表达mIgM的未成熟B细胞，后者具有单一的抗原特异性。未来会产生成熟的初始(naive)B细胞，其仍然具有单一的特异性，同时表达mIgM和mIgD。只有能够表达能与膜结合的 μ 重链和替代轻链的pre-B细胞才能逐渐成熟。在产生有效的pre-B细胞受体之后，每个pre-B细胞经历多个细胞分裂，可能是6到8次，产生多达256个后代。然后，这些子代pre-B细胞中的每一个都可以重新排列不同的轻链基因片段，从而增加抗体库的总体多样性。

[0103] 在某些实施方案中，B细胞成熟发生在外周。B细胞成熟可以通过本领域已知的方法在体外检测或确认，例如，通过检测B细胞表面标记、未成熟B细胞表达mIgM和mIgD，成熟B细胞表达mIgG、mIgA和mIgD等。本领域研究人员熟知可以使用针对上述标记的标记抗体的细胞染色和细胞分类等方法。本发明所提到的B细胞活化与分化，是指外周B淋巴细胞经抗原诱导活化与分化的过程。活化的B细胞可以产生分泌抗体的浆细胞或记忆B细胞。类别转换发生在浆细胞阶段。B细胞可能首先分化为浆细胞样细胞，然后分化为浆细胞，浆细胞在感染后期产生，与浆细胞相比，由于在生发中心(GC)中的亲和力成熟，抗体对其目标抗原具有更高的亲和力，并产生更多抗体(参见Nutt等人, Nature Reviews Immunology. 2015, 15(3):160)。

[0104] 浆细胞通常由B细胞的T细胞依赖性(TD)激活引起的生发中心反应产生,但也可由B细胞的T细胞非依赖性(TI)激活引起(见Bortnick等人,The Journal of Immunology.188(11):5389-5396)。B细胞的激活或分化可以通过本领域已知的方法在体外检测或确认,例如,通过用CD19、IgM、IgD、IgA抗体标记细胞和使用FACS进行细胞分类。记忆性B细胞可被确定为 $CD19^+IgM^-IgA^-IgD^-$,而产生IgG的B细胞可被识别为 $CD19^+IgG^+$ 。

[0105] “生发中心(Germinal centers,GCs)”是淋巴结和脾脏内的部位,其中所述成熟B细胞通过体细胞超突变增殖、分化和突变其抗体基因以获得更高的亲和力,并在免疫应答期间将抗体类别从IgM转换为IgG。GCs作为亲和力成熟B细胞和持久记忆B细胞产生的中心,在B细胞体液免疫应答中起着重要作用。在GCs中,B细胞在暗区(称为中心细胞)经历快速和突变的细胞分裂,并迁移到光区(称为中心细胞),在那里它们在滤泡树突状细胞的存在下由滤泡辅助T细胞(follicular helper T cells,Tfh细胞)进行选择。这些选择的B细胞返回暗区,进一步进行分裂和突变。同时,少量的记忆B细胞和浆细胞离开GCs。在某些实施方案中,体外类GC B细胞为 $CD3^-CD19^+GL7^+Fas^+$,其可由FACS识别和分类。

[0106] 本发明所称T细胞,是指来源于胸腺,主要参与细胞免疫的淋巴细胞。T细胞包括 $CD4^+$ T细胞(T辅助细胞、Th细胞)、 $CD8^+$ T细胞(细胞毒性T细胞、CTL)、记忆T细胞、调节性T细胞(Treg细胞,如激活的Treg和未激活的Treg)、凋亡T细胞、NA T细胞或其他T细胞群体。

[0107] “T辅助细胞/辅助性T细胞(T helper cells,Th cell)”是一种通过释放T细胞因子参与适应性(即针对特定病原体)免疫系统的T细胞,从而抑制或调节免疫反应。T辅助细胞参与B细胞抗体类的转换、细胞毒性T细胞的活化和生长,并最大程度地吞噬吞噬细胞如巨噬细胞的杀菌活性。成熟的T辅助细胞是CD4阳性的,通过细胞因子释放和细胞间相互作用(如CD40(在APC上)和CD40L(在Tfh细胞上))的结合,帮助抗原提呈细胞(APC,如树突状细胞)在MHC II类上表达抗原。辅助性T细胞可以发展成两种主要亚型:Th1和Th2细胞。Th1辅助细胞参与细胞内细菌和原生动物的免疫系统,由IL-12触发,释放 $IFN-\gamma$ 和IL-2。Th1辅助细胞有助于增强巨噬细胞的杀伤作用、 $CD8^+$ T细胞的增殖、B细胞的IgG生成和 $IFN-\gamma$ 分泌 $CD4^+$ T细胞。Th2辅助细胞参与细胞外寄生虫的体液免疫系统,由IL-4和IL-2触发,释放IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13和IL-25。

[0108] Th2辅助细胞帮助嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、刺激B细胞增殖并产生抗体,以及分泌IL-4/IL-5的 $CD4^+$ T细胞。Tfh细胞存在于淋巴结、脾脏和派尔斑等次级淋巴器官的B细胞滤泡外周,由B细胞滤泡归巢受体CXCR5的组成性表达确定。TFH细胞通过CD40L的表达和IL-21、IL-4的分泌触发生发中心的形成和维持。

[0109] 术语“细胞毒性T细胞”、“T-杀伤细胞”或“CTL”在这里是可交换的,是指一种识别由癌细胞、病毒感染的细胞或以其他方式受损的细胞产生的特异性抗原的T细胞类型。抗原通过MHC I类被带到细胞表面,在CD8的帮助下,其被细胞毒性T细胞上的TCR结合。因此,细胞毒性T细胞是CD8阳性的。

[0110] 记忆性T细胞是T细胞的一个子集,这些T细胞以前经历过(遇到并反应过)癌细胞、细菌或病毒的抗原。记忆T细胞可以是 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ T细胞,也可以是记忆性细胞毒性T细胞。当再次暴露于抗原时,长寿命记忆T细胞可以介导更快速和更有效的二级反应。这种记忆功能可以由 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 记忆T细胞提供。长寿命记忆T细胞不同于寿命短的效应细胞,它们通常在免疫反应后通过激活诱导细胞死亡(AICD)而死亡。然而,在这两种细胞类型之

间,存在过渡形式,例如效应记忆细胞。与效应细胞一样,它们能够在全身巡逻,并在抗原接触时发挥效应细胞的功能,它们可以增殖,而且比效应细胞寿命更长。

[0111] “调节性T细胞”或“Treg”在这指调节免疫系统、保持对自身抗原的耐受性和防止自身免疫反应的T细胞亚群。Treg是非抑制性的,参与抑制自身反应性免疫反应。Treg是CD4、CLTA4、GITR、neuropilin-1和CD25阳性的细胞。Treg通过接触依赖机制和细胞因子的产生对激活的T细胞起抑制作用(Fehervari,Z.&Sakaguchi,Curr Opin Immunol 16203-8(2004))。Treg还通过与树突状细胞(DC)上配体的直接相互作用调节免疫应答,例如CTLA4与DC上B7分子的相互作用,引起吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)和CD40L连接(Fallarino,F.等人,Nat Immunol 41206-12(2003);Serra,P.等人,Immunity 19877-89(2003))。

[0112] “自然杀伤(NK)细胞”是指通常具有CD16和/或NCAM和/或CD56分子表达为细胞表面标记但不表达CD3的淋巴细胞。NK细胞是指存在于哺乳动物体内或以纯化细胞群形式存在于体外的细胞。NK细胞是一种对先天免疫系统至关重要的细胞毒性淋巴细胞。NK细胞的作用类似于细胞毒性T细胞的作用。

[0113] “树突状细胞(Dendritic cells,DCs)”是处理抗原材料并将其呈现在细胞表面给T细胞的强效抗原呈现细胞(“APCS”)。在活化过程中,树突状细胞迁移到淋巴瘤结点,在那里它们与T细胞和B细胞相互作用,引发并形成自适应免疫应答。人树突细胞选择性表达CD83。树突状细胞具有多样性的表面受体,其能够鉴别各种病原体。另外,树突状细胞可以感知到各种内源信使,例如细胞因子和趋化因子,以及免疫系统其他细胞的表面分子。树突状细胞通过细胞内信号路径处理各种信号,其中触发各种分化程序。树突细胞可在体外和体内引发初始T细胞反应。DCS可以间接体内方法(*ex vivo*)产生,并承载各种蛋白和多肽抗原,以及肿瘤细胞提取物(Nestle,F.等人,Nat.Med.,4:328-332(1998))。树突状细胞也可以通过遗传手段的转化来表达这些肿瘤抗原。树突状细胞也可以直接融合到肿瘤细胞上用于免疫(Kugler,A.等人,Nat.Med.,6:332-336(2000))。

[0114] 至少一种单核细胞,如B细胞、T细胞(如Tf细胞/T滤泡细胞)、树突状细胞、NK细胞、单核细胞,可从受试者全血中分离,和/或从造血干细胞(HSC)、骨髓、新生脐带血(即脐带血单核细胞(CBMCs))中重建,羊水或多能干细胞(hPSCs,包括胚胎干细胞(ESCs)和诱导多能干细胞(iPSCs))。在某些实施方案中,至少一种类型的单核细胞可以来自成人、青少年或儿童。

[0115] 造血干细胞(HSC)位于红骨髓中,在造血过程中产生各种类型的成熟血细胞,包括骨髓细胞(单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、树突状细胞和巨核细胞或血小板)和淋巴细胞(T细胞、B细胞和自然杀伤细胞)。

[0116] “骨髓”是指骨中由造血细胞(髓系和淋巴系)、骨髓脂肪组织、间充质干细胞(MSCs)和支持性基质细胞组成的海绵状或松质半固态组织。人类骨髓通常每天产生约5000亿个血细胞,这些血细胞通过髓腔内可渗透的血管窦进入血液循环。淋巴细胞成熟于其它淋巴器官,如胸腺。

[0117] 脐带血由许多免疫未成熟的新生儿脐带血单核细胞(UCBMCs)组成,也被报道为造血干细胞的来源(见Gluckman E等人,Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling.N Engl J Med.1989Oct26;321(17):1174-8.)。在体外,人类多能干细胞(hPSCs包

括人胚胎干细胞 (ESCs) 和诱导多能干细胞 (iPSCs)) 分化为单核细胞和/或造血干细胞,如原始的血内皮前体细胞、成熟的髓系细胞、红系细胞和淋巴系细胞 (Melinda K.Hexum等人, *In Vivo Evaluation of Putative Hematopoietic Stem Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells, Human Pluripotent Stem Cells*, 2011. pp 433-447)。羊水还含有单核细胞和具有造血活性的细胞 (见Ditadi A等人, *Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin-cells display hematopoietic activity, Blood*. 2009Apr 23; 113(17):3953-60)。

[0118] 激活诱导的胞苷脱氨酶 (Activation-induced cytidine deaminase), 也称为AICDA和AID, 是一种24kDa酶, 编码人类AICDA基因。AID是cytidine脱氨酶家族的一员, 参与B细胞免疫球蛋白基因的体细胞超突变和类开关重组, 被认为是二级抗体多样化的主要调节因子。AID产生DNA突变并将胞嘧啶转化为尿嘧啶 (在DNA复制过程中被认为是胸腺嘧啶), 在B淋巴细胞生发中心发育过程中将C:G转化为T:A或A:T碱基对。在体细胞超突变过程中, 抗体发生突变, 产生具有各种亲和力的抗体变体库。

[0119] 本发明所用的“类别转换”也指亚型转换 (isotype switching)、亚型交换 (isotypic commutation) 或类别转换重组 (class-switch recombination, CSR)。它是一种生物学机制, 能改变B细胞产生免疫球蛋白 (抗体) 的类型, 如从亚型IgM到亚型IgG和IgE。在此过程中, 抗体重链的恒定区部分发生变化, 但重链的可变区保持不变。由于可变区不改变, 类转换不影响抗原特异性; 相反, 抗体保留对相同抗原的亲和力, 但可以与不同的效应分子相互作用 (见Honjo等人, *Immunity*, 01Jun 2004, 20(6):659-668)。本领域已有用于检测IgG和IgM及其水平的方法, 例如, 使用特异针对不同亚型的抗体, 通过ELISA检测。

[0120] PR结构域锌指蛋白1 (PR domain zinc finger protein 1) 也被称为BLIMP-1, 是人类PRDM1基因编码的转录抑制蛋白BLIMP-1与 β -干扰素 (beta-IFN) 基因启动子的PRDI (正调控域I元件) 特异性结合, 抑制 β -IFN的基因表达。B淋巴细胞、T淋巴细胞、NK细胞和其他免疫细胞中BLIMP-1蛋白的增加, 通过分泌抗体的浆细胞的增殖和分化, 引起免疫应答。

[0121] 本发明所用的“杂交瘤”是指杂交瘤技术过程中的融合杂交细胞, 它是生产大量单克隆抗体的方法。产生抗体的B细胞对免疫反应作出反应, 然后与不朽的B细胞癌细胞 (骨髓瘤) 融合, 产生一种称为杂交瘤的杂交细胞系, 该杂交细胞系既具有B细胞的抗体产生能力, 又具有骨髓瘤无限的增殖能力。杂交瘤可以在培养液中生长, 每个培养从一个活的杂交瘤细胞开始, 产生由含有相同基因的杂交瘤培养物, 每个杂交瘤培养物产生一种抗体 (单克隆), 而不是不同抗体的混合物 (多克隆)。与产生许多产生不同抗体分子混合物的多克隆抗体不同, 每个杂交瘤系产生的单克隆抗体在化学上都是相同的。

[0122] 选择“噬菌体展示文库”的技术是指用聚合酶链反应 (PCR) 方法分别克隆VH和VL基因库, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后根据Winter, G. 等人描述的抗原结合噬菌体的方法进行筛选 (Winter, G. 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455)。噬菌体通常以单链抗体 (scFv) 或Fab片段的形式显示抗体片段。来自免疫源的库 (例如通过本发明提供的方法制备的产生抗体的PBMC) 提供对免疫原的高亲和力抗体, 而无需构建杂交瘤。或者, 可以克隆 (例如, 从人类) 天然全文库抗体, 以提供一个单一来源的抗体, 用于广泛的非自身和自身抗原, 而无需进行任何免疫。(见Griffiths, A.D. 等人, *EMBO J.* 12 (1993) 725-734)。

[0123] 最后, 还可以通过克隆干细胞中未重排的V基因片段, 并使用包含随机序列的PCR

引物对高度可变的CDR3区域进行编码,并在体外完成重排,来合成天然文库,如在“Hoogenboom,H.R.and Winter,G.,J.Mol.Biol.227(1992)381-388”中所描述。描述人源抗体噬菌体库的专利出版物包括,例如:美国专利。编号5750373和US 2005/0079574、US 2005/0119455、US 2005/0266000、US 2007/0117126、US 2007/0160598、US 2007/0237764、US 2007/0292936和US 2009/0002360。类似的展示文库包括核糖体展示、酵母展示、细菌展示、杆状病毒展示、哺乳动物细胞展示或mRNA展示文库(参见U.S.Pat.No.7,244,592;Chao等人,Nature Protocols.1:755-768,2006)。这些展示方法都是本领域的常规技术,其具体操作可以在相应的教科书或操作手册中找到(例如Mondon P等人,Front.Biosci.13:1117-1129,2008)。

[0124] 在某些实施方案中,通过展示文库生成单克隆抗体,包括以下步骤:1)使用本发明所述的体外免疫,用感兴趣的抗原对单个PBMC进行免疫;2)从上述免疫的PBMC中分离抗原特异性B细胞,并通过PCR克隆抗体并表达抗体;3)通过筛选特异性和亲和力高的抗体,利用上述各种展示文库获得抗体。

[0125] 本发明中使用的术语“培养基/培养液”是指固体、液体或半固体,其设计用于支持微生物或细胞的生长,为微生物或细胞提供必需的营养(氨基酸、碳水化合物、维生素、矿物质)、生长因子、激素和气体(CO₂、O₂),并调节物理化学环境(pH缓冲液,渗透压,温度)。本领域已知用于培养哺乳动物细胞的常用培养液,包括但不限于Dulbecco的DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media,Gibco)、最低需求培养液(Minimum Essential Medium, MEM, Gibco)、RPMI 1640培养液(Gibco)、培养液199(Media 199,Gibco)、Earles、McCoy5A(Hyclone,Thermo Scientific)、DMEM/营养混合物F-12(DMEM/Nutrient Mixture F-12, DMEM/F12,Gibco)等。

[0126] 在某些实施方案中,刺激剂包括有丝分裂刺激剂和抗体生成刺激剂。在某些实施方案中,培养液还进一步含有刺激剂,包括但不限于CD40-和CD40L相互作用化合物、ICOS-和ICOS-L相互作用化合物、TLR激动剂、OX40、OX40L、APRIL(一种增殖诱导配体)、BAFF、CR2、CXCL9、CXCL12(SDF-1)、CXCL13、CXCL16、Flt-3L、白细胞介素-1(α/β)、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-7、白细胞介素-10、白细胞介素-14、白细胞介素-21、SAP(SLAM相关蛋白)、葡萄球菌A株Cowan 1颗粒(SAC;热灭活,福尔马林固定)、TLR配体如脂多糖(LPS),不同CpG-ODNs或瑞喹莫德(Resiquimod,R-848)、TSLP、肿瘤坏死因子(TNF) α 、I型干扰素(如IFN α/β)、II型干扰素(如IFN γ)、脂类、avasimid、EFNB1、EphB4(Lu等人,Science,2017,eaai9264)、丛蛋白(Plexin)B2、Semaphorin 4C(Hu等人,Cell Reports,2017,19,995-1007)、BLIMP-1和Irf4。

[0127] B细胞活化也可通过抗IgG、抗CD20和/或抗CD27抗体诱导。在某些实施方案中,刺激剂在培养开始时或培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21天后添加到培养液中。在某些实施方案中,刺激剂在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21天后从介质中移除。在某些实施方案中,两种或两种以上的刺激剂在刺激体外抗体产生方面表现出协同效应。例如,在某些实施方案中,包括ICOS和TLR激动剂在内的两种或两种以上的刺激剂。在某些实施方案中,包括CD40L和TLR激动剂在内的两种或两种以上的刺激剂。在某些实施方案中,包括ICOS和CD40L在内的两种或两种以上的刺激剂。在某些实施方案中,包括ICOS、CD40L和TLR激动剂在内的两种或两种以上的刺激剂。

[0128] 本发明中使用的术语“IL2”是指白细胞介素-2,免疫系统中的一种细胞因子信号分子。它是一种调节负责免疫的白细胞(白细胞,通常是淋巴细胞,如B细胞)的活动的蛋白质。IL2通过与淋巴细胞表达的IL2受体结合介导其作用。据报道,IL2可诱导T细胞(Lan,等人,Journal of Autoimmunity,2008,31(1):7-12),B细胞增殖(Karray,等人,J Exp Med.1988July 1;168(1):85-94)。1988年7月1日;168(1):85-94)和树突状细胞增殖。IL2的完整cDNA序列的GENBANK登记号为AH002842.2,人IL2的氨基酸序列的GENBANK登记号为AAD48509.1。

[0129] 本发明中使用的术语“IL21”是指白细胞介素-21,它也是一种细胞因子,协同刺激T细胞和自然杀伤(NK)细胞的增殖和功能,调节B细胞的存活和分化以及树突状细胞的功能(见Croce等人,J Immunol Res.2015;2015:696578)。IL21的完整cDNA序列的GENBANK登记号为NM_021803.3,人IL21的氨基酸序列的GENBANK登记号为NP_068575.1。

[0130] “诱导性T细胞共刺激因子(ICOS)”也称为“AILIM”、“CD278”和“MGC39850”。ICOS的完整cDNA序列的GENBANK登记号为NM_012092.3,人ICOS的氨基酸序列的GENBANK登记号为NP_036224。ICOS属于CD28和CTLA-4细胞表面受体家族,与CD28和CTLA-4同源。它通过二硫键形成同二聚体,并通过PI3K和AKT途径在生发中心形成、T/B细胞协作和免疫球蛋白类转换过程中,在细胞信号传导、免疫应答和细胞增殖调控中发挥重要作用。与CD28和CTLA-4一样,ICOS在活化的CD4和CD8 T细胞上表达,并在调节适应性T细胞反应中发挥潜在作用。

[0131] T细胞活化和增殖。与CD28不同,ICOS是在T细胞上组成性表达的,它为静息T细胞的充分激活提供了必要的共刺激信号,而ICOS是在T细胞初始激活后才表达的。ICOS在其他T细胞亚群(包括Th1、Th2和Th17)的发育和功能中也起着重要作用。ICOS共刺激与Th1和Th2细胞相关的T细胞增殖和细胞因子分泌。ICOS基因敲除(KO)小鼠在糖尿病(Th1)、气道炎症(Th2)和EAE神经炎症模型(Th17)等多种疾病模型中表现出自身免疫表型的发育受损。

[0132] ICOS除了调节T效应器(Teff)细胞功能外,还调节了调节性T细胞(Treg)。此外,ICOS在Treg上高水平表达,并参与Treg的稳态和功能(见美国专利申请US20160304610)。ICOS在促进CD4+T细胞增殖中的作用与IL-2信号转导无关(见Wikenheiser DJ and Stumhofer JS,ICOS Co-Stimulation:Friend or Foe?Front Immunol.2016;7:304)。

[0133] ICOS的激动剂(如ICOSL)与ICOS的胞外结构域结合,激活ICOS信号,从而增加T细胞的活化和增殖。

[0134] 本发明中使用的术语“ICOS配体(ICOS L)”也称为“B7 H2”、“GL50”、“B7-H2”、“B7RP1”、“CD275”、“ICOSLG”、“LICOS”、“B7RP-1”、“ICOS-L”和“KIAA0653”,这是B7超家族的一种共刺激分子,在免疫应答中起阳性信号作用。ICOSL的完整cDNA序列的GENBANK登录号为NM_015259.5,人ICOSL的氨基酸序列的GENBANK登录号为NP_056074.1。ICOSL与CD80/CD86共有19-20%的序列同源性,并以细胞表面蛋白的形式分泌或表达。

[0135] 人ICOSL有两个剪接变异体(hGL50和B7-H2/B7RP-1/hLICOS),它们都具有相同的胞外结构域,但在胞质区域的羧基末端不同。在人类中,ICOSL在B细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞和T细胞上表达。与CD80/CD86不同,ICOSL不与CD28或CTLA-4(CD152)相互作用,但在细胞表面起非共价连接的同二聚体作用,并与ICOS结合。据报道,人ICOSL也与人CD28和CTLA-4结合(见美国专利申请US20160304610)。

[0136] ICOS/ICOS-L相互作用参与T细胞介导的体内免疫应答。此外,ICOS体内缺陷导致

生发中心(GC)形成受损(GCs的数量和大小减少),T细胞依赖性B细胞反应中的亚型类别转换缺陷,以及IL-4和IL-13产生缺陷(见Khayyamian等人,ICOS-ligand,expressed on human endothelial cells,costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4 T cells,PNAS,Vol.9,No.9,2002,6198-6203)。在GC中,长寿浆细胞(long-lived plasma cells,LLPCs)和记忆B细胞(memory B cells,MBCs)经历类别转换和体细胞超突变以提高抗体亲和力。

[0137] 在某些实施方案中,在ICOS存在下培养PBMC可增加所述PBMC产生的抗体或抗原结合片段的总量。

[0138] ICOS的激动剂可以通过测定其结合的亲和力和特异性来筛选。本领域已知结合亲和力和特异性的测定方法,例如竞争性和非竞争性结合试验,包括ELISA、RIA、流式细胞术等。ICOS激动剂的作用可通过ICOS检测T细胞活化的功能性试验来确定。通过检测CD4+T细胞增殖、细胞周期进展、IL-2等细胞因子的释放、CD25和CD69的上调等指标,可以检测T细胞的活化程度。

[0139] ICOS激动剂包括化合物或蛋白质,例如激动型剂抗体JTX-2011(Jounce Therapeutics Inc)和GSK 3359609(GSK),以及美国专利US20160304610、US 20170174767和WO 2012/131004中描述的抗体。

[0140] CD40L,如本发明所用,也被称为CD40配体或CD154,一种主要表达在活化的T细胞上的蛋白质(其表达已经在多种细胞上被发现,包括血小板、肥大细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、NK细胞、B淋巴细胞,以及非造血细胞),是肿瘤坏死因子超家族分子的一员。它与抗原呈递细胞(APC)上的CD40结合,并作为一种共刺激分子,在T细胞亚群T滤泡辅助细胞(Tfh细胞)上尤为重要。在Tfh细胞上,CD40L通过与B细胞表面的CD40结合促进B细胞成熟和功能,从而促进细胞间的通讯。CD40L的完整cDNA序列的GENBANK登录号为NM_000074.2,人CD40L的氨基酸序列的GENBANK登录号为NP_000065.1。

[0141] 本发明中使用的短语“B-细胞激活因子”或“BAFF”或“BAFF”是指肿瘤坏死家族配体,例如TNF家族配体。BAFF在细胞表面表达,是免疫细胞(如B细胞)膜表面蛋白相互作用的调节蛋白。分泌BAFF是一种高效的B细胞生长因子,有助于B细胞的增殖和共刺激作用。据报道,BAFF对记忆细胞分泌抗体细胞的存活至关重要(Avery DV等人,J Clin Invest,2003,112:286-97)。

[0142] “OX40L”是OX40(CD134)的配体,在DC2s(树突状细胞的一个亚型)等细胞上表达,可促进Th2细胞分化。OX40L也被命名为CD252(分化簇252)。已有报道OX40与ICOS在T滤泡辅助细胞(Tfh)中共表达,影响生殖中心(GC)中Tfh细胞与B细胞的相互作用,从而影响B细胞的发育、分化和成熟。

[0143] 术语“Toll样受体(Toll-like receptor,TLR)”是在先天免疫系统(非特异性免疫)中起关键作用的一类蛋白质。它们是单一的、跨膜的、非催化的受体,通常表达在前哨细胞(sentinel cells)上,如巨噬细胞和树突状细胞,它们识别来自微生物的结构保守分子。除了细胞外和跨膜结构域外,TLR还包括细胞质Toll-白介素1受体拮抗(Toll-interleukin1 receptor-resistance,TIR)结构域。一旦这些微生物突破了皮肤或肠道粘膜等物理屏障,它们就会被激活免疫细胞反应的TLRs识别。

[0144] TLRs识别高度保守的结构构象,即病原菌相关分子模式(pathogen-associated

molecular patterns, PAMPs), 它们是由微生物病原体专一的表达, 例如来源于革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS)、来源于革兰氏阳性菌的脂磷壁酸(LTA)、以及鞭毛蛋白等, 或者是危险相关的分子模式(danger-associated molecular patterns, DAMPs), 它们是从坏死或死亡细胞释放的内源性分子。许多肿瘤细胞在免疫系统介导下发生坏死, 并可能通过TLRs进一步激活炎症反应。人TLR家族包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和TLR10, 它们在多种免疫细胞类型上表达。鼠TLR家族包括TLR1-9和TLR 11-13。

[0145] 在人类抗原呈递细胞(APCs)中, TLR7、9和10在浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)上表达, 而除TLR9外的所有TLRs均在骨髓来源的树突状细胞(myeloid derived DCs, mDCs)上表达。在人类适应性免疫系统中, TLR1、2、3、4、5、7和9在T细胞上表达, TLR5和8在调节性T细胞(Treg)上表达, 调节性T细胞是维持免疫稳态的关键细胞类型。最后, 活化和记忆B细胞表达TLR1、6、7、9和10的水平显著升高, 但TLR2的表达水平较低(见Deng S1等人, Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma, Protein Cell 2014, 5(12):899-911)。TLRs 1、2和4-6表达在细胞表面和感受细菌、真菌和原生动物的产品中, TLRs 3和7-9则在内质体和感受病毒核酸中表达(见Maisonneuve C等人, Unleashing the potential of NOD-and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 26; 111(34):12294-9)。

[0146] “Toll样受体配体”指Toll样受体的激动剂或拮抗剂。在某些实施方案中, TLR配体是激动剂, 例如病原体相关分子模式(PAMPs)。激活TLR的TLR激动剂包括但不限于咪喹莫特、GS-9620(Gilead, 见Roethle等人, 2013)、化合物32(GSK2245035, GSK, 见Biggadike等人, 2016)和resiquimod(R848)、咪唑啉、包含未甲基化的CpG二核苷酸(例如ODN2216)和聚I:C、单磷酸脂A(MPLA)的核酸或其他脂多糖衍生物、单链或双链RNA、鞭毛蛋白、胞壁酰二肽、TSLP、肿瘤坏死因子(TNF) α 、I型干扰素(例如IFN α/β)、II型干扰素(例如IFN γ)、脂类、asimimid、EFNB1、EphB4、丛蛋白B2、Semaphorin 4C、BLIMP-1和Irf4。(见Roethle等人, 2013. J. Med. Chem. Identification and Optimization of Pteridinone Toll-like Receptor 7 (TLR7) Agonists for the Oral Treatment of Viral Hepatitis; 以及Biggadike等人, 2016. J. Med. Chem. 59, 1711-1726. Discovery of 6-Amino-2-[(1S)-1-methylbutyl]oxy}-9-[5-(1-piperidinyl)pentyl]-7,9-dihydro-8H-purin-8-one (GSK2245035), a Highly Potent and Selective Intranasal Toll-Like Receptor 7 Agonist for the Treatment of Asthma.)

[0147] 特异识别各类TLR的激动剂已有报道, 例如BCG(TLR1、2、4和6)、脂肽(TLR1、2和6)、单磷酸脂A(MPL)、LPS、RC529、AS01、AS02、AS04和葡萄糖基脂佐剂(GLA-SE)(TLR4)、聚(I:C)(TLR3)、鞭毛蛋白(TLR5)、单链RNA和R484/树脂基模(TLR7和TLR8)或双链(ds)RNA(TLR3)、咪喹莫特和I型干扰素(TLR7)以及含有CpG基序AS15和IC31(TLR9)的DNA。从应激或死亡细胞释放的内源性分子, 如热休克蛋白(HSP; TLR2和TLR4)和HMGB1(high mobility group box 1; TLR2和TLR4)也被报道为重要的TLR激动剂(参见Deng S1等人, Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma, Protein Cell 2014, 5(12):899-911)。

[0148] TLRs 1、2和4-6表达在细胞表面, 用于感受细菌、真菌和原生动物的相关产物, 而

TLRs 3和7-9在内涵体(endosomes)中表达,用于感受病毒核酸(参见Maisonneuve C等人, Unleashing the potential of NOD-and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 26; 111(34):12294-9)。

[0149] TLR的激活主要通过配体结合时TLR的同源二聚化作用发生,在这个过程中TLR2与TLR1和TLR6同时形成异二聚体。TLR激动剂可以激活固有先天性和后天适应性免疫系统。两种不同的信号通路都能作用TLRs激活信号,这两种信号通路是骨髓分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖(除TLR3外的所有TLRs)和MyD88非依赖(TLR3)。前者涉及MyD88和TIRAP,导致NF- κ B、MAPK的早期激活,促炎细胞因子、趋化因子和胞浆酶的转录,后者涉及受体TRIF和TRAM,导致晚期NF- κ B和干扰素(IFN)调节因子激活,致使I型IFN表达(参见文献Deng S1等人, Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma, Protein Cell 2014, 5(12): 899-911; 文献MacLeod H and Wetzler LM. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. Sci STKE. 2007 Sep 4; 2007(402):pe48.)。

[0150] 本发明揭示,与单独的CD40L相比,体外激活ICOSL和CD40L可使抗体(例如IgM和IgG)在体外产生至1.2、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25倍或更多。

[0151] 本发明揭示,与单独的CD40L相比,体外激活TLR7(通过添加TLR激动剂,例如咪喹莫特)可使抗体(例如IgM和IgG)在体外产生增加到1.2、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25倍或更多。

[0152] 本发明揭示,与单独的CD40L相比,体外激活ICOS可使抗体(例如IgM和IgG)在体外产生增加到1.2、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25倍或更多。

[0153] 术语“体外免疫”是指在体外诱导体液免疫,即在体外产生抗原特异的人源抗体,这是由在体外和抗原一起培养的天然人B淋巴细胞表面表达的免疫球蛋白识别所述抗原而产生。Tomimatsu等人(参见Tomimatsu等人 Methods Mol Biol. 2014; 1060:297-307)描述了本领域中用于产生单克隆抗体或其抗原结合片段的体外免疫(IVI)方法。通常包括:利用离心法从健康供体分离人外周血单核细胞,收集淋巴细胞;用LLME处理分离的外周血单核细胞(即淋巴细胞),以去除免疫抑制细胞,并使其能够用抗原进行体外致敏;用存在于细胞因子(IL-2、IL-4)、D型和K型CpG-ODN培养一周,用ELISA等免疫分析方法检测细胞产生的抗体,分离淋巴细胞产生的抗体RNA,并将抗体编码序列构建到噬菌体展示文库中。

[0154] 术语“抗原提呈细胞”或APC,意指表达一类和二类主要组织相容性复合物(MHC)(人类中的一类和二类HLA分子)中的一个或多个分子,并且能够将抗原提呈给针对该抗原的CD4+T和CD8+T淋巴细胞的细胞。作为抗原提呈细胞,可特别指代树突状细胞(DC)、外周血单核细胞(PBMC)、单核细胞、巨噬细胞、B淋巴细胞、淋巴母细胞系和表达I类和II类MHC分子的转基因人或动物细胞系,特别是表达HLA I和HLA II分子。

[0155] 术语“抗原细胞表面分子”意指在抗原呈递细胞表面表达的分子。术语“抗原呈递细胞特异的表面分子”意指仅在抗原呈递细胞上表达的表面分子或基本上在抗原呈递细胞上表达的分子,即在抗原呈递细胞上表达的表面分子,以及除了抗原呈递细胞以外,在数量非常有限的其他细胞上也表达的表面分子,其结果是对抗原提呈细胞也具有高特异性的表达,即实际上对其具有特异性的分子。

[0156] 本发明中使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工构建的杂合蛋白或多肽,

其包含与T细胞信号传导或T细胞激活结构域相连的抗体的抗原结合结构域(例如,单链可变片段(scFv))(参见文献Kershaw等人, supra, Eshhar等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(2):720-724(1993), 以及Sadelain等人, Curr. Opin. Immunol. 21(2):215-223(2009))。CAR能够利用单克隆抗体的抗原结合特性,以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性重新定向到选定的靶点。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的T细胞非抗原依赖性处理和识别抗原的能力,从而回避了肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR能够有利地不与内源性的T细胞受体(TCR)α和β链发生二聚化。

[0157] 在某些实施方案中,CAR序列包括抗原结合域,例如根据本发明提供的方法制备的抗体的VH和VL基因片段,以及T细胞信号域,其包括例如铰链-CH2-CH3、跨膜域和一个或多个胞质信号域。在某些实施方案中,跨膜结构域包括但不限于来自CD8α、CD4、CD45、PD1和CD152的跨膜结构域。在某些实施方案中,胞质信号域包括但不限于来自CD28、CD54(ICAM)、CD134(OX40)、CD137(41BB)、CD152(CTLA4)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)和CD278(ICOS)的胞内共刺激信号域以及来自CD3 zeta或FcR-gamma的主信号域。

[0158] 本发明进一步提供了在免疫治疗中所产生的CAR的应用,例如应用于嵌合抗原受体T细胞治疗(CAR-T)。

[0159] 提供以下示例是为了更好地说明所要求保护的发明,同时不限制本发明的范围。下文所述全部或部分特定成分、材料和方法均属于本发明的范围。这些特定的组成、材料和方法不是为了限制本发明,而是为了说明属于本发明范围内的特定实施方案。本领域技术人员可以在不需运用发明能力和不脱离本发明范围的情况下开发等同的组成、材料和方法。应当理解,在仍然保持在本发明的范围内的同时,可以在本发明描述的过程中进行许多变化。发明人的意图是将这种变化包括在本发明的范围内。

实施例

[0160] 实施例1:材料和方法

[0161] 材料

[0162] 淋巴分离液:LSM,Lymphocyte Separation Medium(MP,cat.V0111A)

[0163] L-亮氨酸甲酯:LLME,L-leucyl-L-leucine methyl ester(BacheM,cat.G-2550.0001)

[0164] Ham's F-12营养混合物:Ham's F-12Nutrient Mixture(Gibco,cat.11765047)

[0165] 肝素抗凝管:Heparin anticoagulation tube(BD,cat.367878)

[0166] 一次性采血针:Disposable blood collecting needle(BD,cat.367237)

[0167] IL2/白细胞介素-2/淋巴因子/TCGF:IL2/Interleukin-2/lymphokine/TCGF(sinobiological,cat.11848-HNAY1-50)

[0168] BCGF-1/BCGF1/BSF-1/BSF1/IL-4/白细胞介素-4:BCGF-1/BCGF1/

[0169] BSF-1/BSF1/IL-4/Interleukin-4(sinobiological,cat.GMP-11846-HNAE-100)

[0170] CD154/CD40配体:CD154/CD40 Ligand(sinobiological,cat.10239-H01H-50)

[0171] OX40L(sinobiological,cat.13127-H04H-100)

[0172] 人ICOS配体/B7-H2/ICOSLG(组氨酸标签):Human ICOS Ligand/B7-H2/ICOSLG

[0173] (Histag)(sinobiological,cat.11559-H08H-100)

- [0174] 人ICOS/AILIM/CD278蛋白(His&Fc标签):Human ICOS/AILIM/CD278 Protein (His&Fc Tag) (sinobiological,cat.10344-H03H-100)
- [0175] 人白介素-21/IL21:Human Interleukin-21/IL21 (sinobiological,cat.GMP-10584-HNAE-20)
- [0176] 人BLyS/TNFSF13B/BAFF:Human BLyS/TNFSF13B/BAFF (sinobiological, cat.10056-HNCH-5)
- [0177] Ephrin-B1 (sinobiological,cat.10894-H08H)
- [0178] 羊抗人IgG-Fc (HRP) Goat anti-Human IgG-Fc (HRP) (sinobiological, cat.SSA001-1)
- [0179] 羊抗人IgM mu链 (HRP):Goat anti-Human IgM mu chain (HRP) (Abcam, cat.ab97205)
- [0180] 谷氨酰胺补充剂:GlutaMAXTM Supplement (Gibco,cat.35050-061)
- [0181] MEM NEAA (Gibco,cat.11140-050)
- [0182] 丙酮酸钠:Sodium pyruvate (Gibco,cat.11360-070)
- [0183] DMEM(no Glutamine,no Sodium Pyruvate,no HEPES) (Gibco,cat.11960-051)
- [0184] 青霉素-链霉素,液体:Penicillin-Streptomycin,Liquid (Gibco,cat.15140122)
- [0185] RPMI 1640培养液:MediumRPMI 1640Medium (Gibco,cat.21875091)
- [0186] DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole;stock:5mg/ml in dH2O;Thermo Fisher,cat.no.D1306)
- [0187] TMB显色液:TMB substrate (TIANGEN,cat.PA107-01)
- [0188] FBS (GIBCO,cat.10099141)
- [0189] PBS (8117158)
- [0190] E6446二氯化氢:E6446 dihydrochloride (MCE,cat.HY-12756A)
- [0191] 抗人CD3 PE-Cy7:Anti-Human CD3 PE-Cy7 (eBioscience,cat.BG-05121-77-100)
- [0192] 抗人CD21 PE:Anti-Human CD21 PE (eBioscience,cat.85-12-0219-42)
- [0193] 鼠抗人CD35-FITC:Mouse Anti-Human CD35-FITC (eBioscience,cat.05-9600-02)
- [0194] 抗人CD19 PerCP-Cy5.5:Anti-Human CD19 PerCP-Cy5.5 (eBioscience,cat.BG-11211-70-100)
- [0195] 读板机/酶标仪:Imaging reader (Biotek,cat.Cytation 5)
- [0196] 96孔Elisa板:96well Elisa plate (Corning,cat.9018)
- [0197] 方法
- [0198] 人外周血单核细胞(PBMC)的制备
- [0199] 准备PBMC培养液:(RPMI1640:DMEM:Ham's F12=1:1:2) (eRDF)添加10%FBS。新鲜PBMC从几个健康志愿者中采集(约40毫升/次/人)。如同人单克隆抗体手册所述,PBMC通过密度梯度离心分离,用血细胞仪计数细胞数。
- [0200] 体外免疫(In vitro immunization,IVI)
- [0201] 用10%FBS+eRDF稀释清洗后的PBMC,调整细胞密度至 1×10^7 个/ml。用0.25mM LLME液处理细胞约20分钟。去掉上清液,用10%FBS+eRDF重新悬浮细胞。将细胞密度调整到 9×10

5细胞/ml。将细胞悬液转入96孔板,分别加入2 μ g/ml 抗原、10ng/ml IL2、2 μ g/ml CD40L、2 μ g/ml ICOS、TLR7激动剂(市售的咪喹莫特或合成)。在37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳下培养7天,在第7天更换一半培养液,并添加含有10ng/ml IL2和50ng/ml IL21的细胞因子/激活剂混合物。在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养细胞7-21天,在第7天、第14天或第21天收集上清液,用ELISA分析抗体产生,而细胞聚集成的小球用PCR或RT-PCR检测基因表达;收集的细胞也可同时用于FACS分析。在所有实验中,抗原OVA或TrkA以2 μ g/ml添加,IL2以10ng/ml添加,IL21以50ng/ml添加,其中IL2、IL21和抗原单独或者联合添加。

[0202] 添加ICOSL的示范性体外免疫步骤:

[0203] 1. 制备PBMC并用LLME处理。

[0204] 2. 培养、扩增IL2(10ng/ml)处理过的PBMC 2-3周。

[0205] 3. 收集细胞,以6*10⁴/孔的密度种入96孔板。

[0206] 4. 用ICOSL(50ng/ml)、CD40L(50ng/ml)、IL21(50ng/ml)和抗原混合液处理细胞14天,在第7天时更换一半培养液。

[0207] 5. 去除混合因子后,将单因子IL2和抗原加入培养板中刺激产生IgG 7-14天。

[0208] 6. ELISA法检测IgG和IgM水平。

[0209] 对于人杂交瘤细胞,其方法还进一步包括以下步骤:

[0210] 7. 收集处理过的PBMC并与人骨髓瘤细胞系融合,并用次黄嘌呤氨基蝶呤胸苷(HAT)培养液筛选细胞株。

[0211] 8. 培养杂交瘤细胞14天,第7天换一半培养液。

[0212] 9. 取培养液上清,ELISA法检测抗体效价。

[0213] 测定刺激剂孵育后抗体表达水平

[0214] 在第7天或第14天添加细胞因子或刺激因子和抗原后,收集上清液并添加到抗原(分别为OVA或TrkA)涂布过培养板中。孵育2小时后,加入HRP结合的抗人IgG或抗人IgM的抗体,以TMB为底物测定抗原特异的抗体的含量。展示数据为两个重复检测的平均值,误差线为标准误差,每个代表性数据包含了3次独立实验。

[0215] 流式细胞术

[0216] 我们用流式细胞仪(aireII,BD)分析染色细胞,并使用FlowJo软件(Tree Star)处理数据。将PBMC收集到Snap-lock微量离心管中。对于T细胞或B细胞的分析,除非另有说明,离心管应保持在4 $^{\circ}$ C。离心后,细胞被洗涤并在PBS中重新悬浮。为分析Tfh(T follicular helper)细胞,PBMC分别用CD3-FITC(BD公司)、CD4-PerCP CyTM5.5(BD公司)、CXCR5-PE/Cy7(Biolegend公司)和CD45RA-PE(eBioscience公司)抗体染色,CD3、CD4和CXCR5阳性以及CD45RA阴性(CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁻)细胞被鉴定为Tfh细胞。用CD19-PE(eBioscience公司)、GL7-Alexa-Fluor 488(eBioscience公司)、Fas-APC(eBioscience公司)抗体染色PBMC用于分析GC样B细胞,GC样B细胞被标记为CD19、GL7、以及FasCD阳性(CD19⁺GL7⁺Fas⁺)细胞。

[0217] 反转录PCR

[0218] 使用BioRad iCycler进行定量逆转录PCR反应,并2⁻($\Delta \Delta$ CT)方法用于计算基于GAPDH的标准化的mRNA相对表达水平。

[0219] 酶联免疫吸附试验(ELSA)

[0220] 使用5 μ g/ml抗原铺板并在4 $^{\circ}$ C下过夜,然后用PBST(含0.5%吐温-20)清洗,使用

5%BSA封闭后,加入细胞培养上清液,清洗,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体(HRP结合的IgG特异性抗体或者IgM特异性抗体(Jackson公司)以及HRP标记的IgM特异性抗体以1:2500稀释),最后使用TMB底物溶液进行检测。

[0221] 酶联免疫斑点法

[0222] 在4℃下用溶解在50mM碳酸氢钠缓冲液(pH9.6)中的抗原(5μg/mL)在96孔MAHAS4510硝酸纤维素板(Millipore公司)上铺板过夜。纤维素板在37℃下清洗后用含有10%胎牛的RPMI1640封闭2小时。将PBMC 3以 $\times 10^5$ 细胞/孔的密度接种于纤维素板上,在37℃下孵育24小时,然后用2000倍稀释的HRP标记的山羊抗人IgG抗体检测斑点形成细胞(Spot-forming cells,SFC),并在37°孵育2h,通过加入TtrueBLASE底物溶液(购自KPL,Gaithersburg,MD)。

[0223] 采用的统计方法对数据分布和方差特征进行了适当的假设。除另有说明外,采用双向方差分析(Two-way ANOVA)比较不同组的终点均值。Prism6(GraphPad)软件用来进行回归分析和作图。

[0224] 实施例2:IL2刺激PBMC增殖

[0225] PBMC包括产生抗体的B细胞、T细胞和树突状细胞群。这些细胞在体外的扩增可以形成生发中心样结构。结果如图1所示。在图中,“对照组”表示没有抗原或任何刺激剂的细胞;其它的所有条形柱代表用抗原TrkA以及不同的因子处理的细胞。要注意的是,IL2是促进细胞增殖的最有效的刺激剂。

[0226] 实施例3:ICOSL是诱导抗体产生的关键刺激剂

[0227] 在PBMC扩增过程中,ICOSL与抗原TrkA和其他刺激剂一起加入培养液中。我们发现,在培养10-14天后,包括ICOSL在内的刺激剂混合物,联合其他关键成分CD40L、IL2、IL21和CpG-ODN可增强B细胞内的人源抗体(IgM和IgG)合成/产生。ICOSL也是一种关键的刺激剂,它诱导的抗体水平最高。结果如图2A-2B所示,表明ICOSL和CD40L协同促进IgG的产生,远超过ICOSL或CD40L单独作用。

[0228] 实施例4:IL21促进IgM转化为IgG

[0229] 用ICOSL、CD40L、IL21和CpG-ODN混合培养14d后,IgG的产生量增加,但是仅用IL21刺激培养,而IgM的产生量略有下降。结果如图3A-3B所示。

[0230] 实施例5:ICOS的效应

[0231] 1. ICOS也是增加抗体产生的关键刺激剂

[0232] 为了进一步测试其他细胞因子或刺激剂对体外抗体产生的影响,在抗原OVA(2μg/ml)或TrkA(2μg/ml)存在下,将ICOS(55nM)添加到体外免疫系统中。分别用OVA/IL2/I121(IL2+I121=基础刺激剂)、OVA/IL2、OVA/I121、OVA//IL2/I121/ICOS、OVA/IL2/I121/CD40L、TrkA//IL2/I121/ICOS、TrkA/IL2/I121/CD40L和vehicle(对照溶液PBS)孵育PBMC(1.5×10^5 细胞/孔,96孔板)。抗原为OVA时,CD40L刺激的细胞与ICOS刺激的细胞相比,*p<0.05;抗原为TrkA时,CD40L刺激的细胞与ICOS刺激的细胞相比,***p<0.0001。

[0233] 图4A和4B中的结果表明,用ICOS进行体外刺激可增强抗OVA或TrkA抗体(IgM和IgG)的产生。值得注意的是,对于OVA或TrkA作为抗原,ICOS比CD40L更有效地刺激抗体IgG的产生(大约为1.5倍)。

[0234] 2. ICOS促进GC样表型(CD19⁺GL7⁺)B细胞的加速生成

[0235] FACS分选后,GC样B细胞被定义为CD3⁻、CD19⁺、GL7⁺、Fas⁺细胞。坐标轴内的数字代表不同类别的GC样B细胞。如图5A至5C所示,未经任何刺激剂培养的PBMC在第0天被分选,GC样B细胞的比例约为9.84% (图5A)。用OVA抗原 (2 μ g/ml) 免疫PBMC,并用CD40L加入IL2 (10ng/ml) 和IL21 (50ng/ml) (基础刺激剂,basic) 的混合液处理,于第14天分选,GC样B细胞的比例约为85.25% (图5B)。同样的,PBMC用ICOS加入基础刺激剂处理,GC样B细胞的比例约为90.42% (图5C)。

[0236] 实施例6: toll样受体激动剂的作用

[0237] 1. TLR激动剂是另一种诱导抗体产生的关键刺激剂。

[0238] 为了进一步测试其他细胞因子或分子对抗体产生的影响,在抗原OVA (2 μ g/ml) 存在下,将一种合成的TLR7/8激动剂 (50nM和500nM) 添加到体外免疫系统中。分别用OVA/IL2/I121、OVA/IL2、OVA/I121、OVA/I121、OVA/IL2/I121、OVA/IL2/I121、OVA/IL2/I121、OVA/IL2/I121/CD40L、OVA/IL2/I121/合成的TLR7/8激动剂 (50nM)、OVA/IL2/I121/合成的TLR7/8激动剂 (500nM) 和对照溶液培养PBMC (1.5 \times 10⁵细胞/孔,96孔板)。用合成的TLR7/8激动剂 (50nM) 刺激的细胞与用CD40L细胞刺激的细胞相比,*p<0.05。用合成的TLR7/8激动剂 (500nM) 刺激的细胞与用CD40L细胞刺激的细胞相比,****p<0.0001。

[0239] 图6A和6B中的结果表明,TLR7/8激动剂对刺激抗OVA抗体的产生更有效。注意,对于IgG抗体,TLR7/8激动剂在体外作用14天时比在体外7天和21天时更有效 (50nM和500nM的TLR激动剂分别比CD40L高约3.5倍和10.0倍) (图6A)。对于IgM抗体,TLR7激动剂在体外7、14、21天有效。在第7天和第21天,TLR7/8激动剂比CD40L更有效,因此,为了实现选择性地刺激IgG的目的,TLR7/8的最佳作用时间为7天。

[0240] 使用TLR9激动剂CpG ODN (2 μ g/ml) 也进行了类似的试验。图10显示,在第14天,CpG-ODN在刺激抗OVA抗体 (IgG和IgM) 的产生方面与CD40L相似。

[0241] 分别用OVA/IL2/IL21/CD40L、OVA//IL2/IL21/合成TLR激动剂 (50nM)、OVA/IL2/IL21/合成TLR7/8激动剂 (500nM) 和vehicle (对照溶液PBS) 培养来自不同志愿者 (志愿者1和志愿者2) 的PBMC (4 \times 10⁵细胞/孔,48孔板)。

[0242] 图7A和7B表示来自2个不同志愿者PBMC的数据,显示合成的TLR7/8激动剂在刺激抗体产生方面与相似 (志愿者1) 或比CD40L更有效 (志愿者2)。误差线是标准偏差。CD40L (2 μ g/ml) 刺激的细胞:*p<0.05。用合成的TLR7/8激动剂 (500nM) 刺激细胞:****p<0.0001。

[0243] 2. TLR7或TLR7/8激动剂可增强AID和BLIMP-1的表达水平

[0244] 已知AID通过诱导抗体基因的超突变 (hyper-mutation) 参与B细胞亲和力成熟。BLIMP-1的表达代表活性B细胞的增殖和分化。为探讨TLR激动剂对AID表达的影响,采用定量RT-PCR方法检测合成的TLR7/8激动剂 (500nM) 与CD40L (55nM) 处理后AICDA (编码AID的基因) mRNA水平的变化。PBMC是从两个不同的志愿者 (见图8,志愿者3和志愿者4) 采集的。分别用OVA/IL2/IL21/CD40L、OVA/IL2/IL21/合成的TLR7/8激动剂 (500nM)、OVA/IL2/IL21和vehicle (对照溶液PBS) 孵育PBMC (4 \times 10⁵细胞/孔,48孔板)。以OVA/IL2/IL21孵育后的PBMC中甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的表达为基准,以OVA/IL2/IL21孵育后的PBMC中AID和BLIMP-1的表达做为对照。误差线为标准偏差。对于志愿者4的PBMC,合成的TLR7/8激动剂刺激的细胞与用CD40L刺激的细胞相比,**p<0.01。对于志愿者3的PBMC,合成的TLR7/8激动剂刺激的细胞与用CD40L刺激的细胞相比,****p<0.0001。

[0245] 为了测试TLR7激动剂咪喹莫特对AICDA和BLIMP-1表达的影响,通过定量RT-PCR测定了在TLR7激动剂咪喹莫特(500nM)存在下体外免疫后AICDA和BLIMP-1的mRNA水平,并与CD40L进行比较(图9)。PBMC是从一个健康的志愿者中采集的,分别用OVA/IL2/IL21、OVA/IL2/IL21/CD40L(0.1nM)、OVA/IL2/IL21/CD40L(24nM)、OVA/IL2/IL21/imiquimod(0.1nM)、OVA/IL2/IL21/imiquimod(500nM)和vehicle(对照溶液PBS)孵育PBMC(1.5×10^5 细胞/孔,96孔板)。TLR7激动剂(500nM)刺激的细胞与CD40L(0.1nM)刺激的细胞比较,AICDA mRNA的表达差异有显著性,* $p < 0.05$;TLR7激动剂(500nM)刺激的细胞与CD40L(24nM)刺激的细胞的BLIMP-1mRNA比较差异更显著,**** $p < 0.0001$ 。

[0246] 图8和图9都显示,在刺激AICDA和BLIMP-1的表达方面,TLR7激动剂和合成的TLR7/8激动剂远远优于CD40L。图8和图9还表明,与CD40L相比,TLR7通过超突变诱导强化的抗体变异的能力更强,抗体的亲和力更高。因此,TLR7被认为是一种潜在的刺激剂,可促进针对免疫原性较低的抗原的抗体产生。

[0247] 3. 合成TLR7/8激动剂与TLR9拮抗剂E6446的协同作用。

[0248] 用0.02 μ M E6446、0.2 μ M E6446、10 μ M E6446、OVA+IL2+IL21和培养液对2例健康志愿者PBMC(3×10^5 细胞/孔,48孔板)预孵育1小时,然后用500nM的合成的TLR7/8激动剂刺激含E6446(E6446 0.02 μ M、E6446 0.2 μ M和E6446 10 μ M)和OVA+IL2+IL21的细胞培养板孔,同时用OVA+IL2+IL21和培养液分别添加到低刺激对照(基础刺激剂)和无刺激对照(vehicle),7天或14天后,取上清液进行试验。

[0249] E6446二盐酸盐(E6446-HCL)是一种合成的核酸感受TLRs拮抗剂。它对CpG2006(TLR9激动剂)抑制的IC50值在0.01-0.03 μ M之间(数据未显示)。但它需要2-8 μ M(100倍高的浓度)来抑制R848(TLR7/8激动剂)的作用(数据未显示)。

[0250] 外周血单核细胞(PBMC)的抗体反应是由一些刺激剂与含有10ng/ml IL2和50ng/ml IL21的刺激剂混合物的协同作用触发的(见图11A-11G)。

[0251] 图11A-11C显示,TLR7/8激动剂和低浓度的TLR9拮抗剂E6446(例如0.02 μ M和0.2 μ M)之间的协同作用仅在14天培养物产生IgG水平而不是IgM水平上观察到,但在7天的培养中没有观察到,这表明低浓度的E6446促进了TLR7/8激动剂对抗体IgG产生的影响。

[0252] 图11D-11F显示,合成的TLR7/8激动剂显著增强了抗原特异性IgG和IgM反应,但通过添加TLR7/8拮抗剂(10 μ M E6446盐酸盐)可以阻止反应。高浓度TLR9拮抗剂E6446(10 μ M)逆转了TLR7/8激动剂在7天和14天培养中对IgG和IgM的作用。

[0253] 图11G显示,经合成的TLR7/8拮抗剂处理的PBMC在体外表现出显著的CD21减少的现象,表明高浓度E6446抑制了CD21水平。相反,在体外阻断TLR9(分别为0.02 μ M和0.2 μ M E6446二盐酸盐)后,使用TLR7/8激动剂刺激PBMC可显著提高IgG反应和细胞活性,表明TLR7/8激动剂有利于树突状细胞的产生,高浓度TLR9拮抗剂E6446可部分逆转这一现象。

[0254] 4. IL2、IL21或联合刺激对IgG产生的进一步促进作用

[0255] 用4 μ g/ml OVA,10ng/ml IL2,50ng/ml IL21,24nM ICOS,55nM CD40L,500nM合成的TLR7/8激动剂或者它们的组合刺激剂孵育取自2名健康志愿者的PBMC(3×10^5 个细胞/孔,48孔板),7天或14天后,取上清液进行检测。IL2,IL21与ICOS、CD40L或合成的TLR7/8激动剂分别共同刺激,能够引起协同增强IgG产生的作用(图12I)。

[0256] 5. 刺激剂对IgG和IgM产生的剂量依赖效应

[0257] 来自2例健康志愿者的PBMC(3×10^5 细胞/孔,48孔板)分别使用4 μ g/ml OVA、10ng/ml IL2、50ng/ml IL21、ICOS(24nM、55nM、100nM)、CD40L(10nM、24nM、55nM)、合成的TLR7/8激动剂(0.1nM、50nM、500nM)及其组合孵育。7天或14天后,取上清液进行检测。图13A-13F显示ICOS、CD40L、TLR7/8激动剂调节IgG和IgM反应有剂量依赖效应。

[0258] 体外10ng/ml IL2和50ng/ml IL21联合刺激可增强抗原特异的IgG和IgM反应,尤其是分别和ICOS、CD40L或者合成的TLR7/8激动剂等刺激剂共同处理。此外,数据还表明,ICOS、CD40L和TLR7/8激动剂作为抗体产生的调节因子具有剂量依赖性。

[0259] 虽然本发明已经依据一些特定的实施方案(其中一些是优先实施方案)进行特别展示和描述,然而本领域研究人员仍能够很容易理解,在不脱离本发明在此公开的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行某些改变。

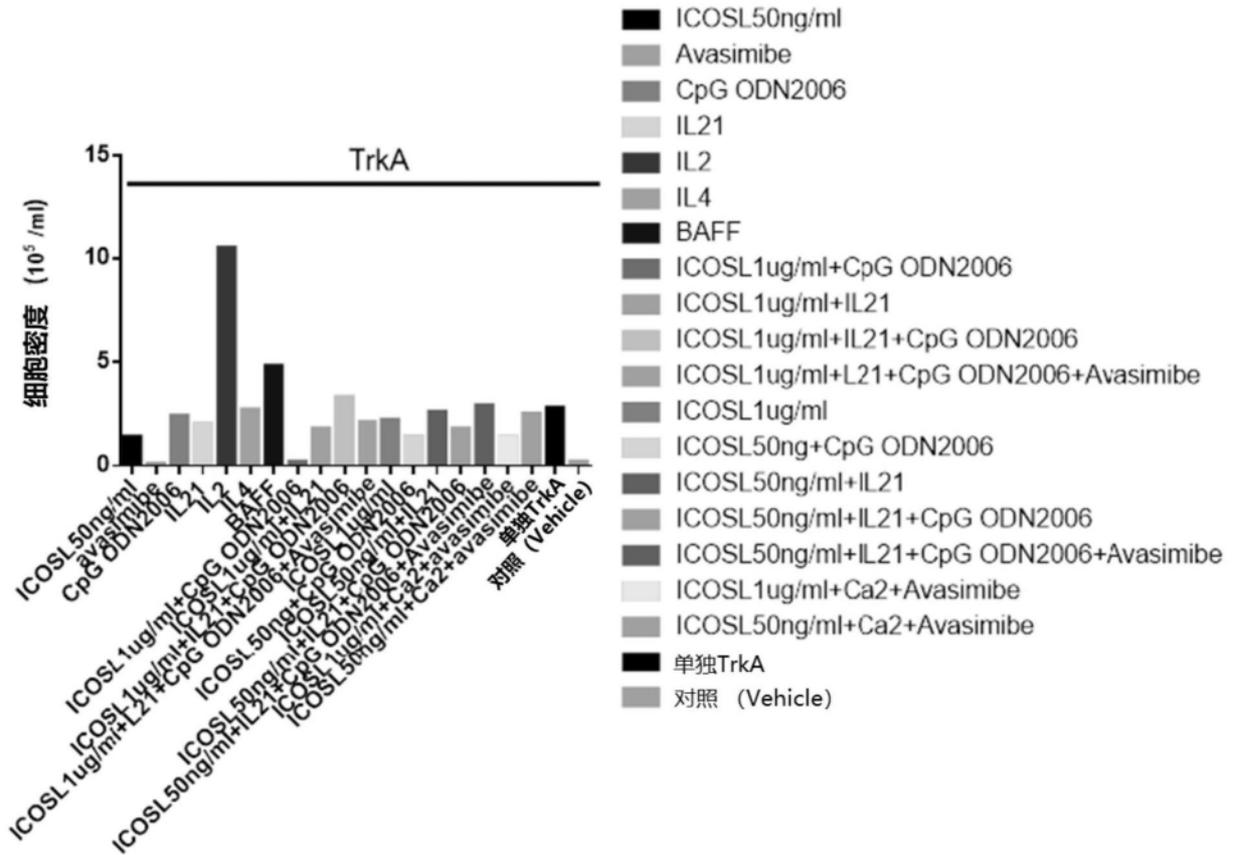


图1

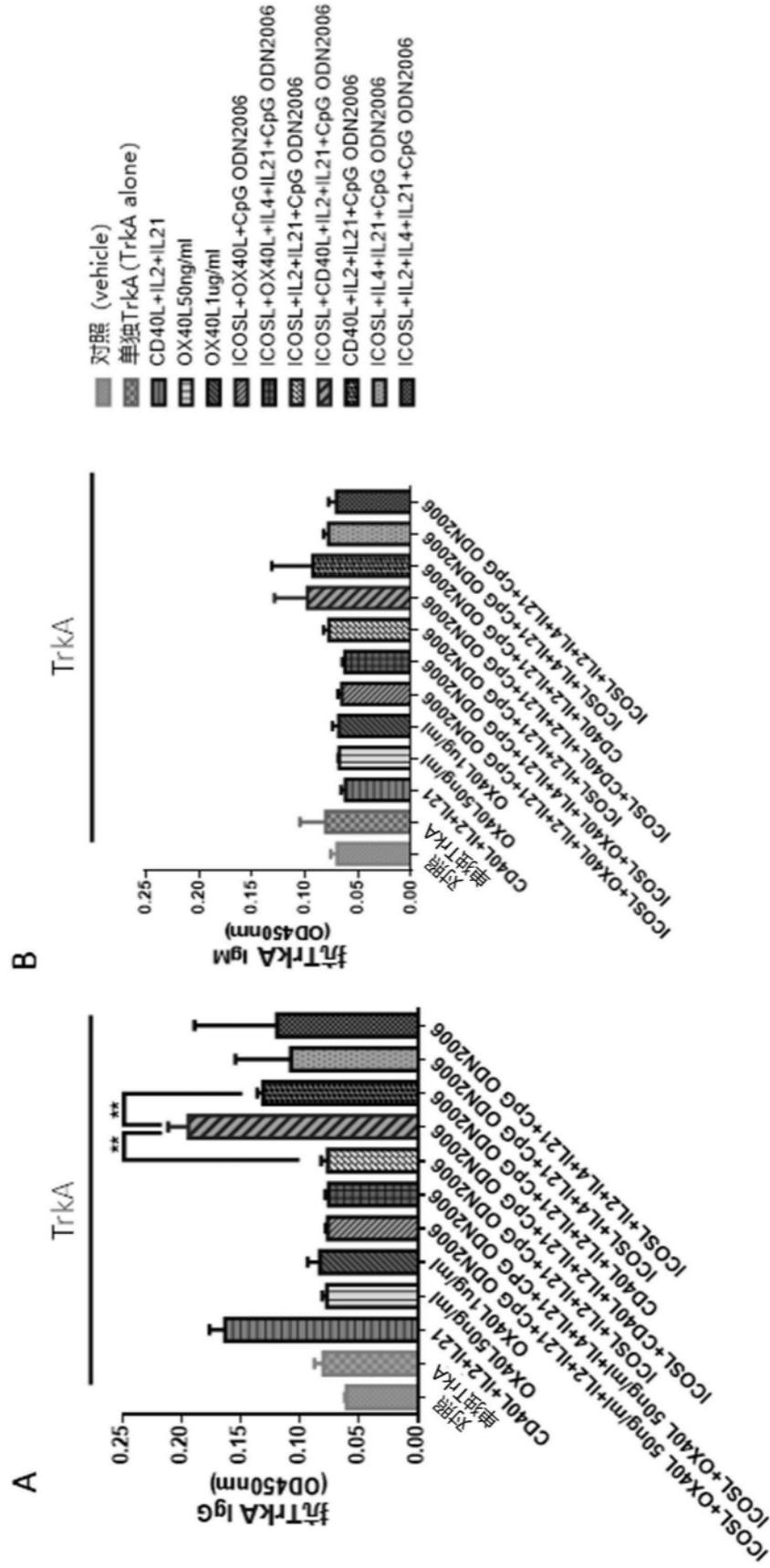


图2

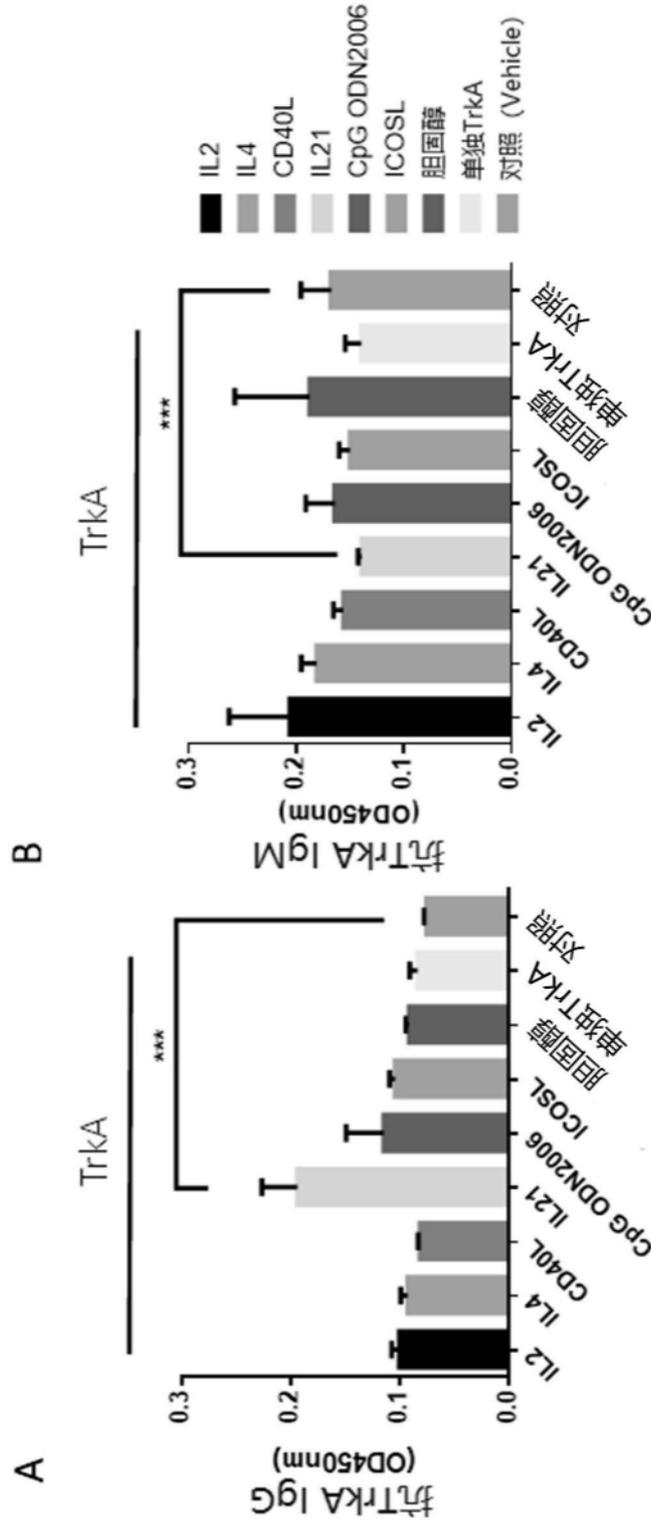


图3

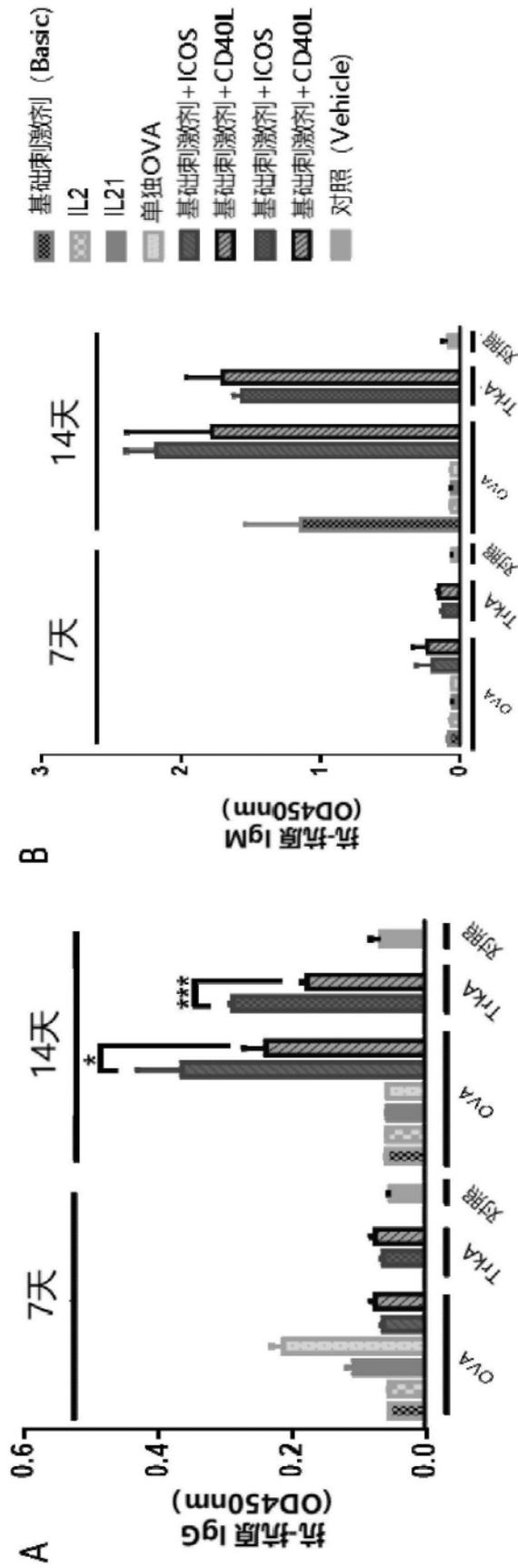


图4

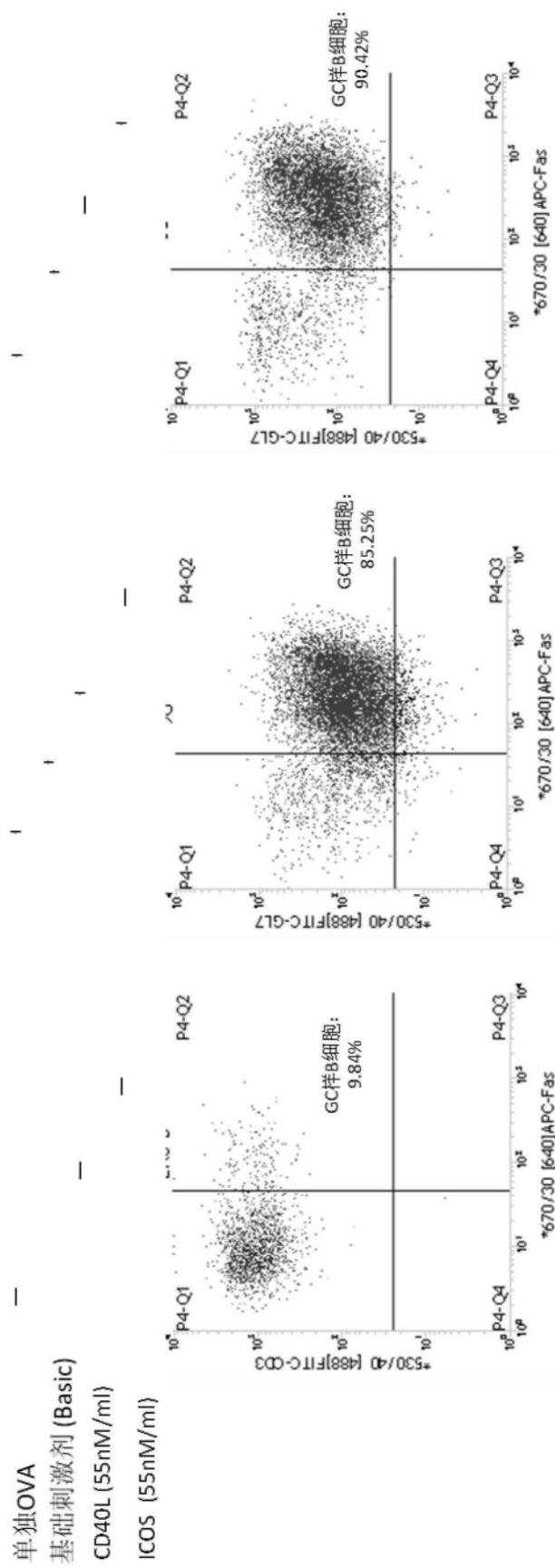


图5

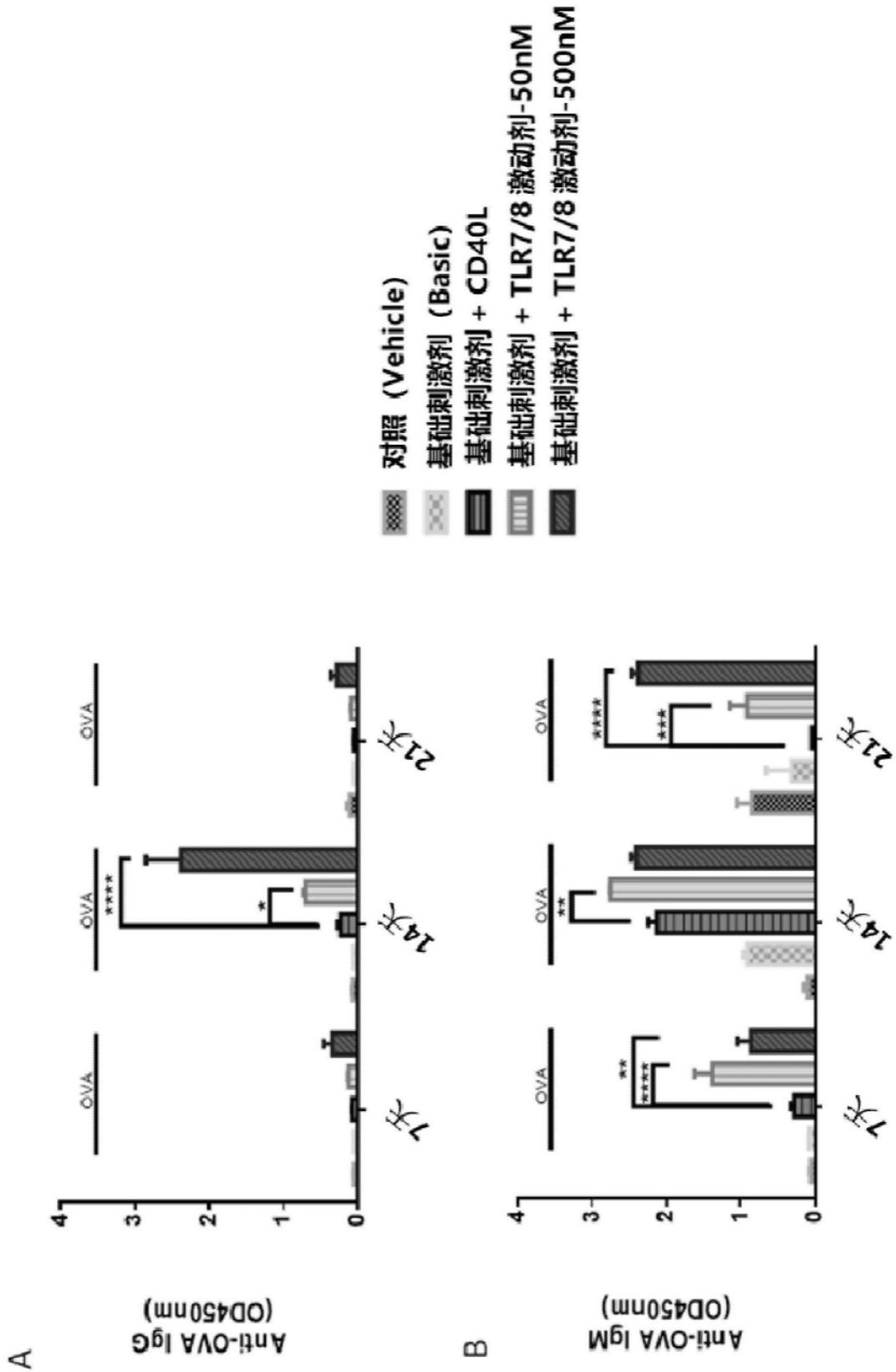


图6

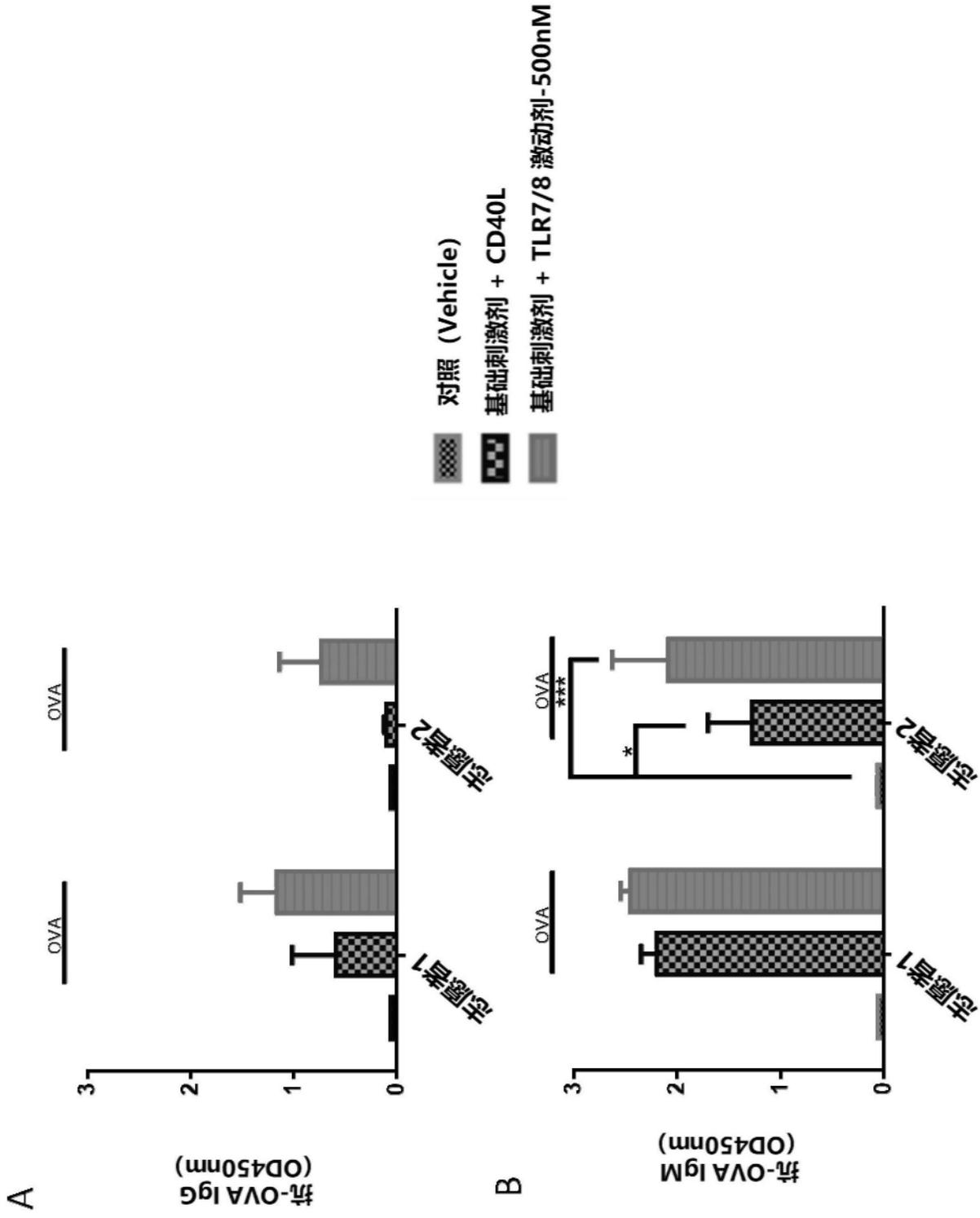


图7

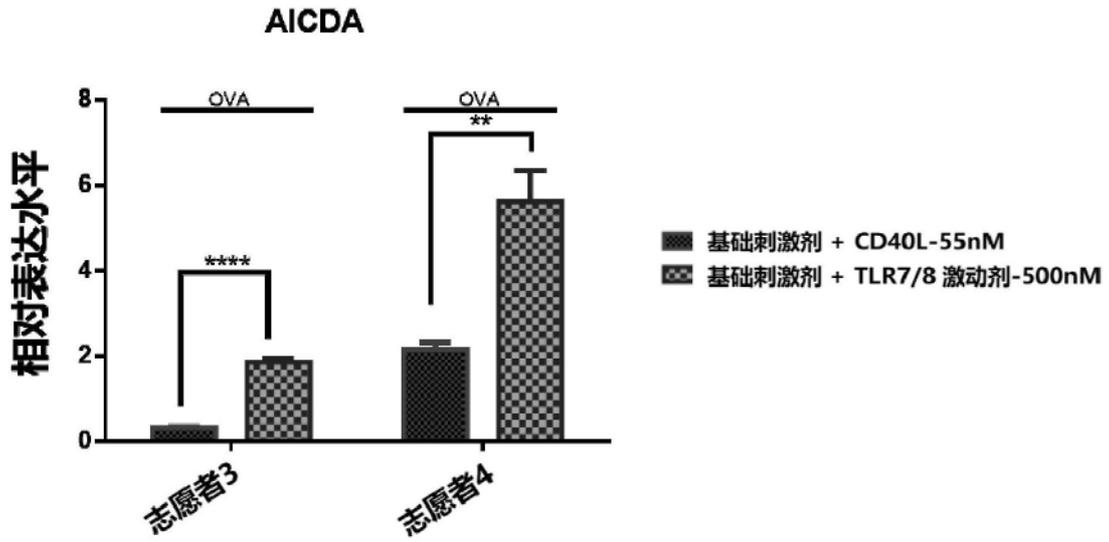


图8

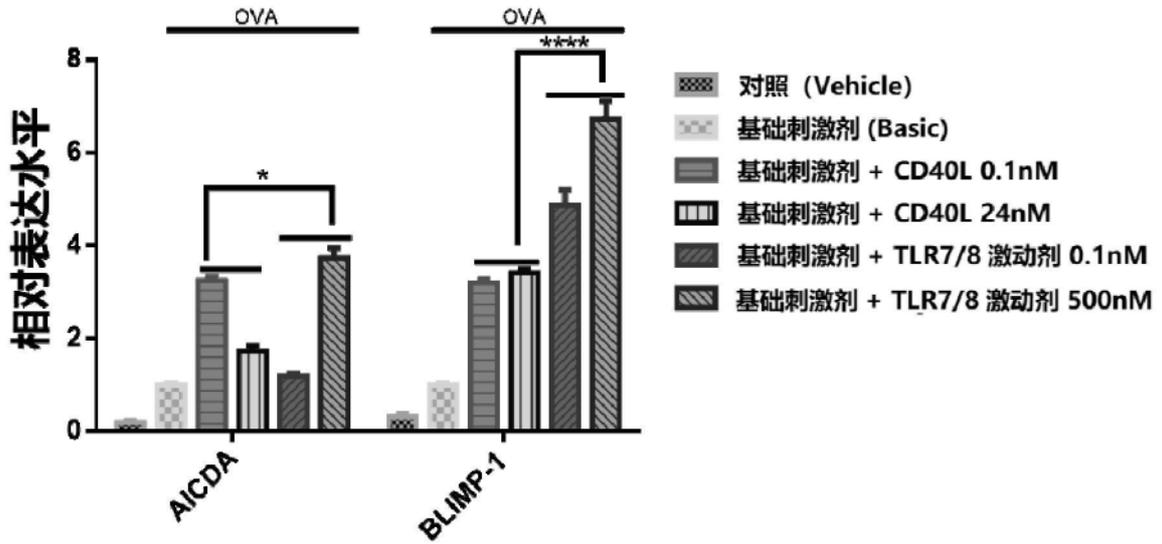


图9

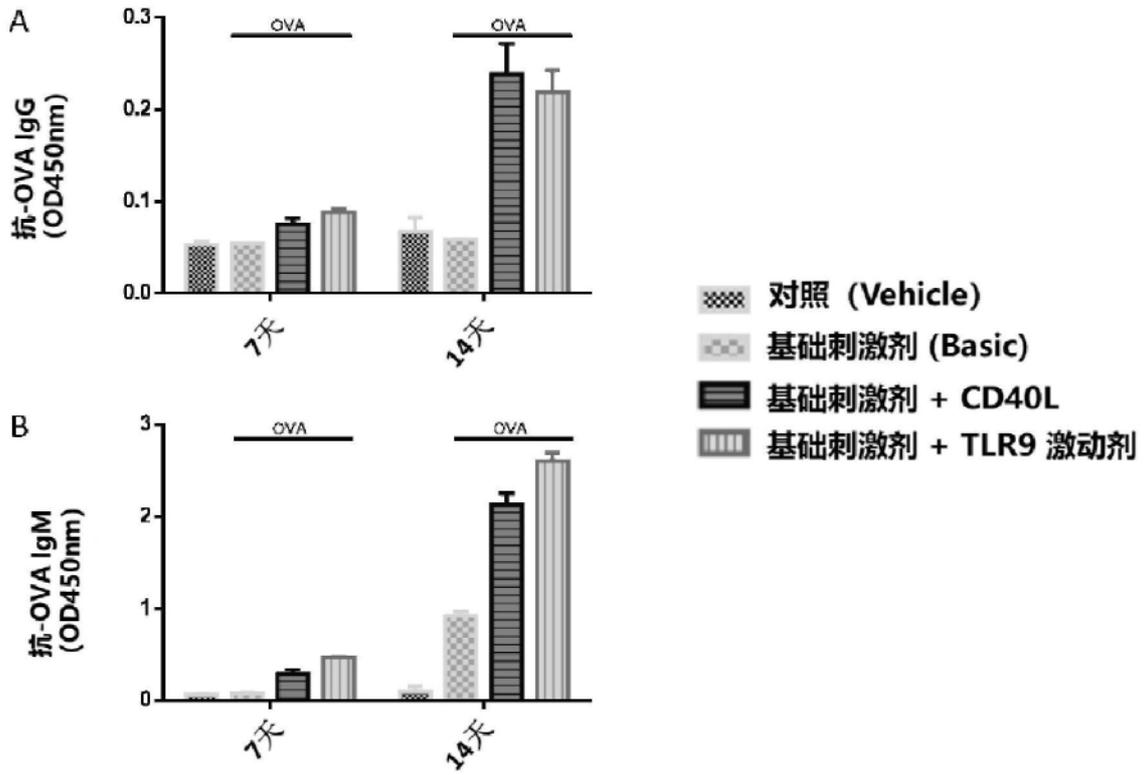


图10

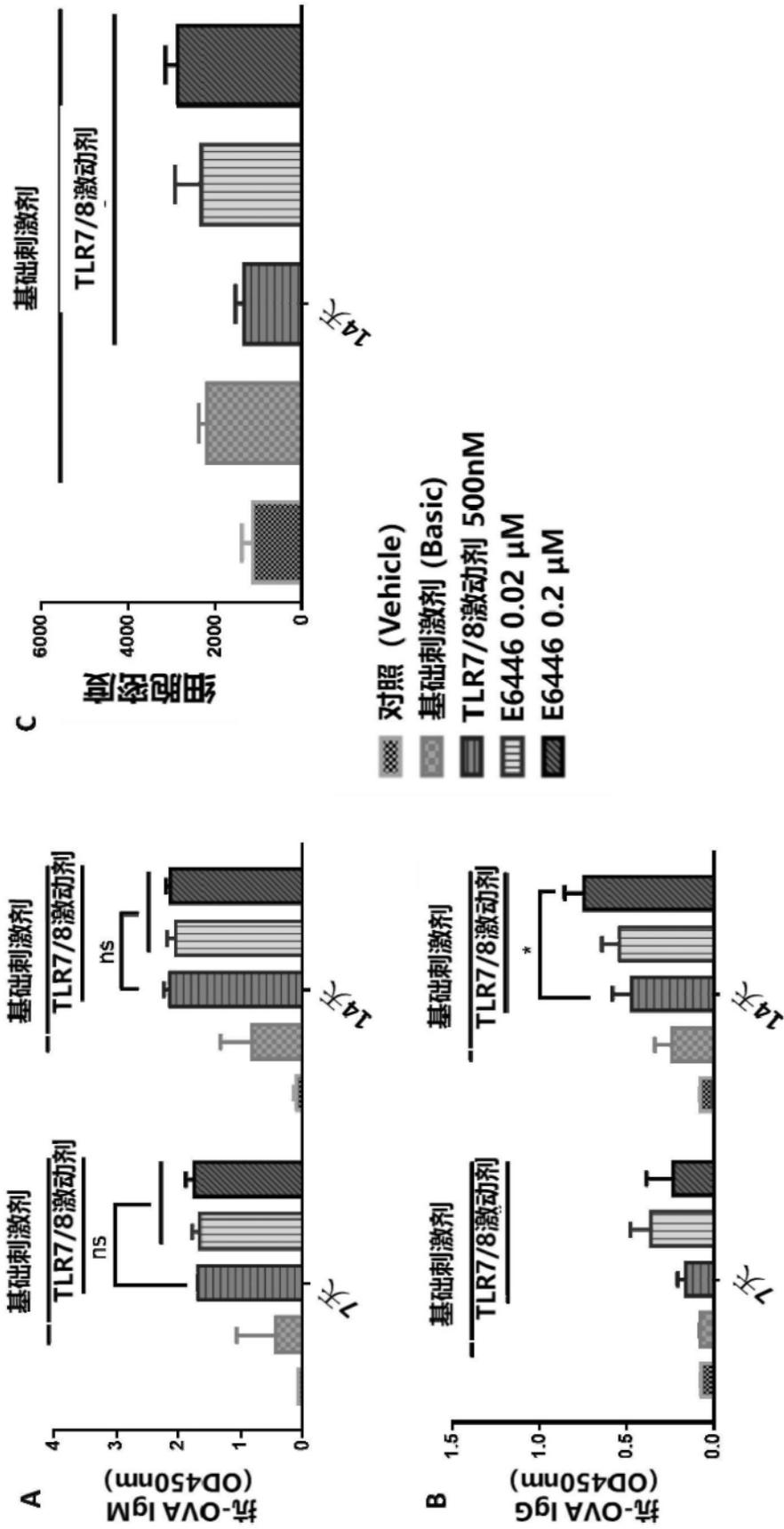


图11A-11C

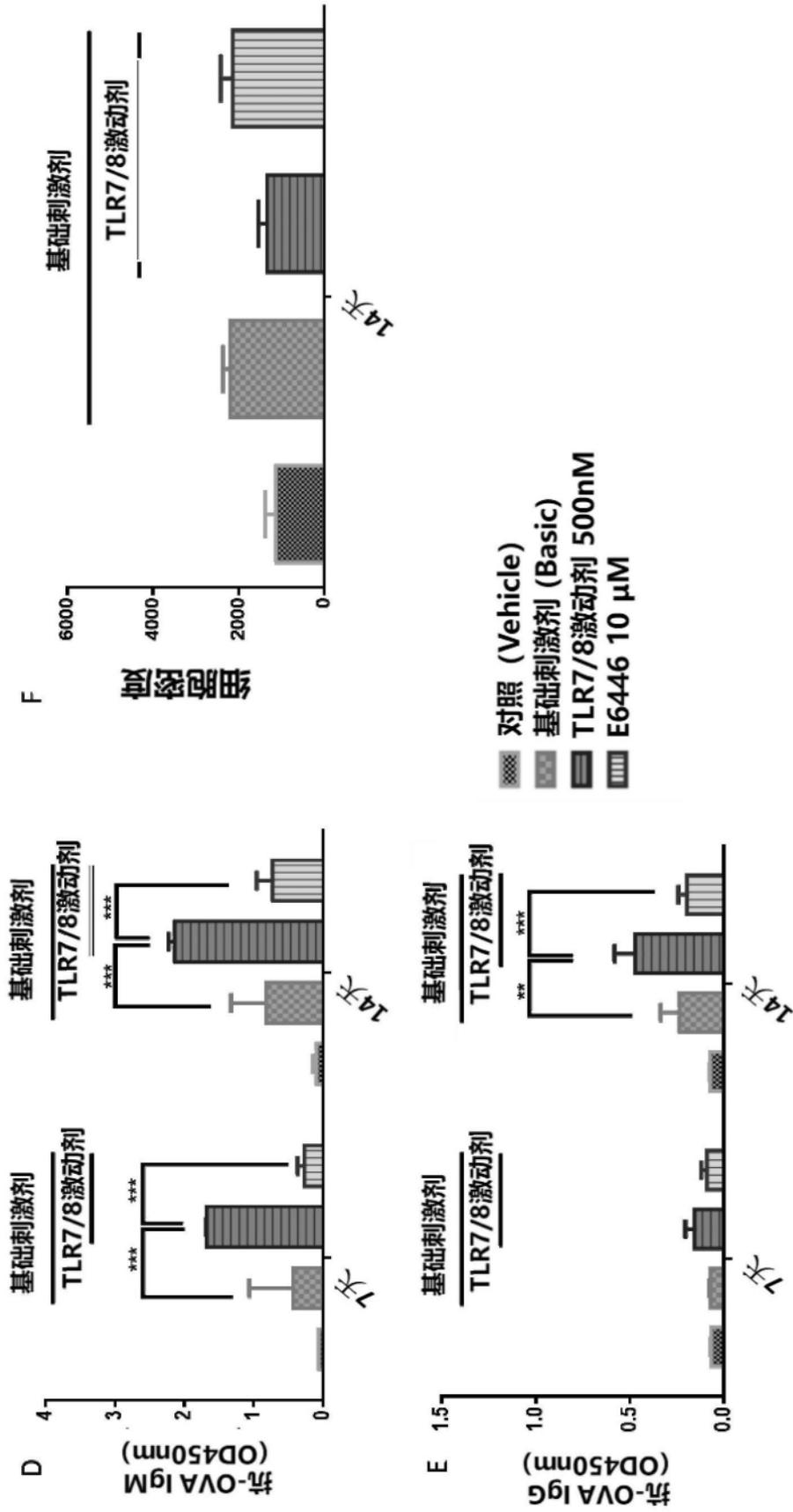


图11D-11E

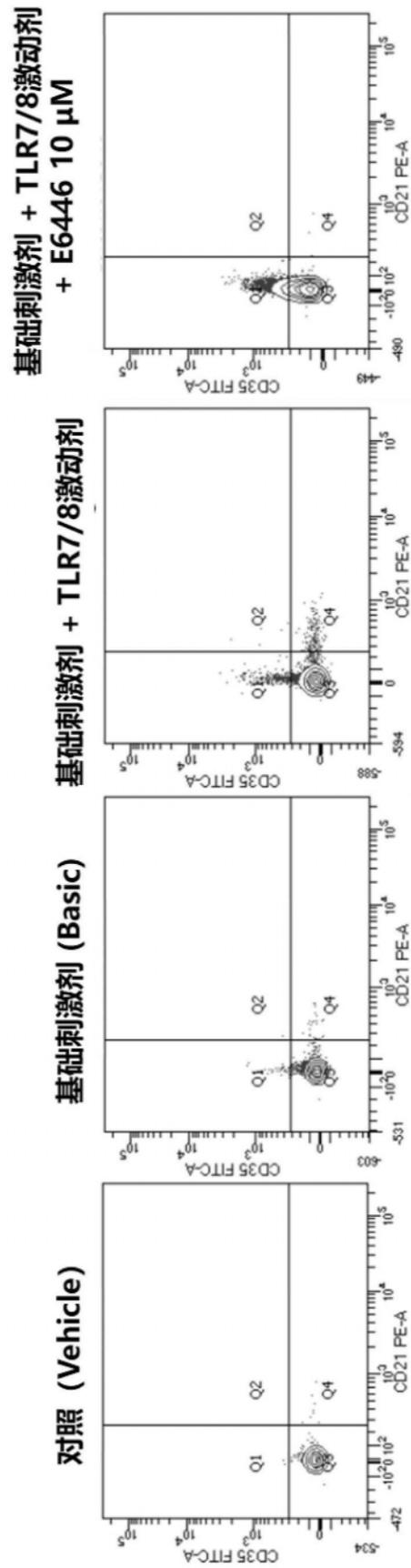


图11G

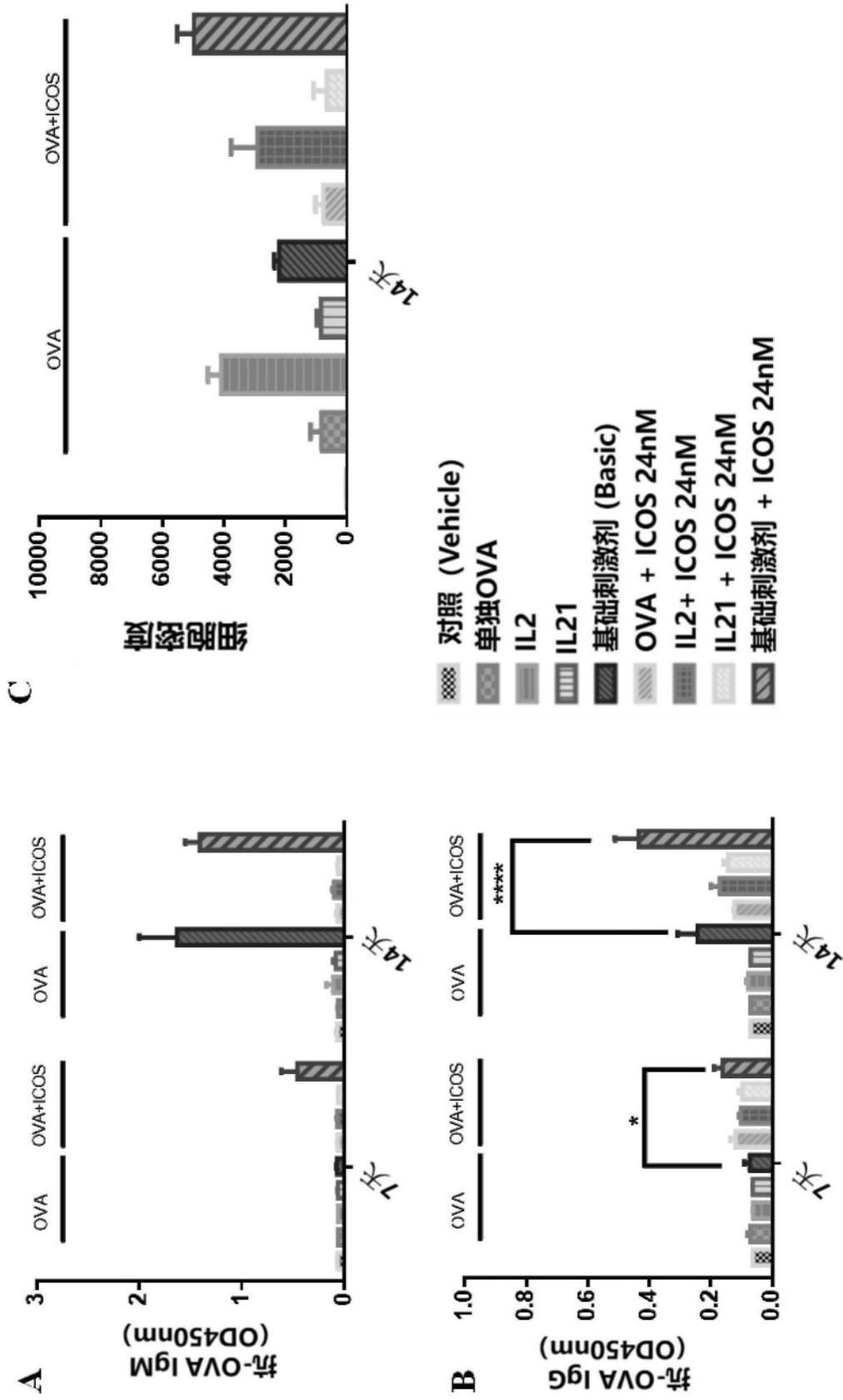


图12A-12C

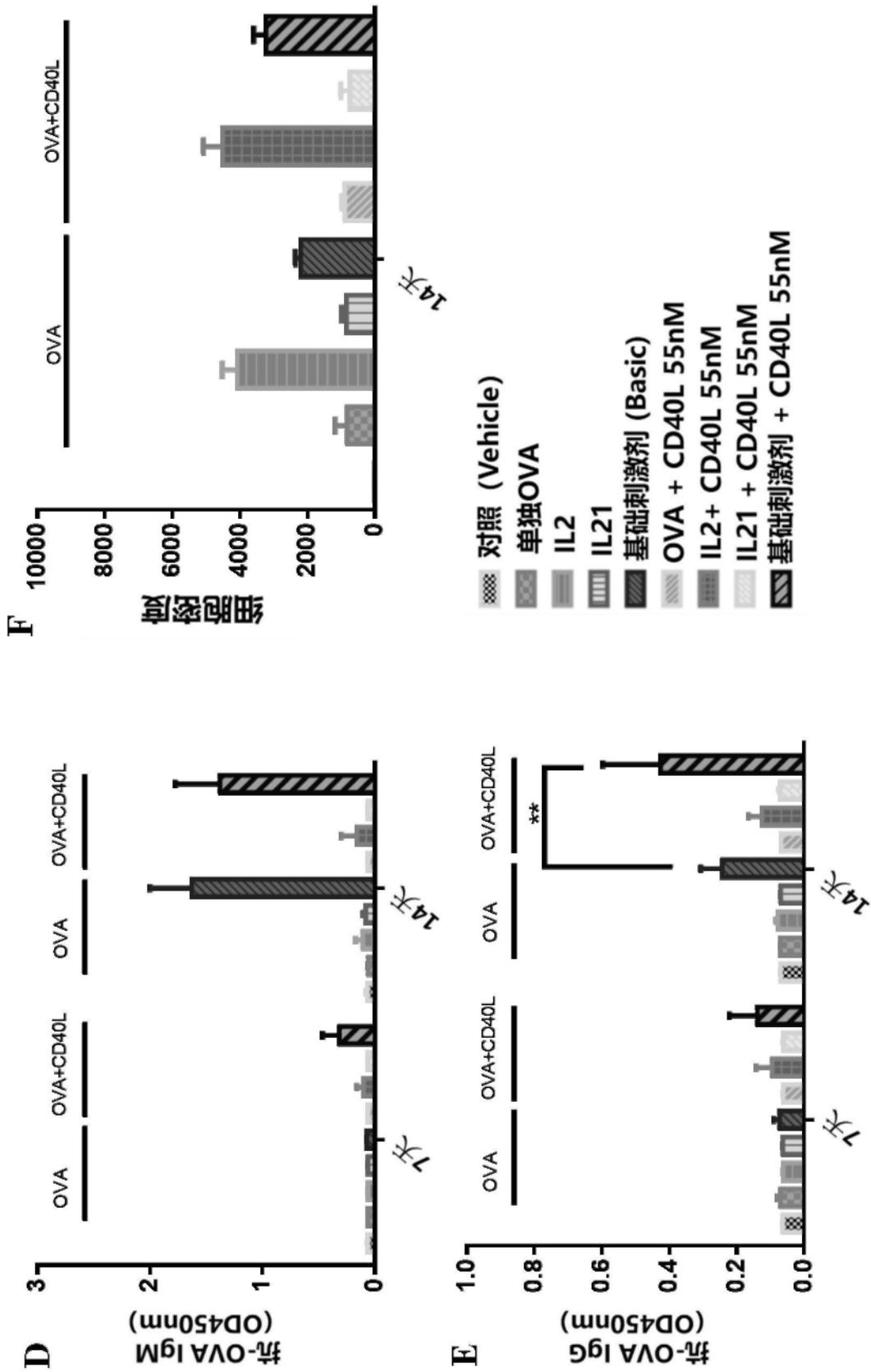


图12D-12F

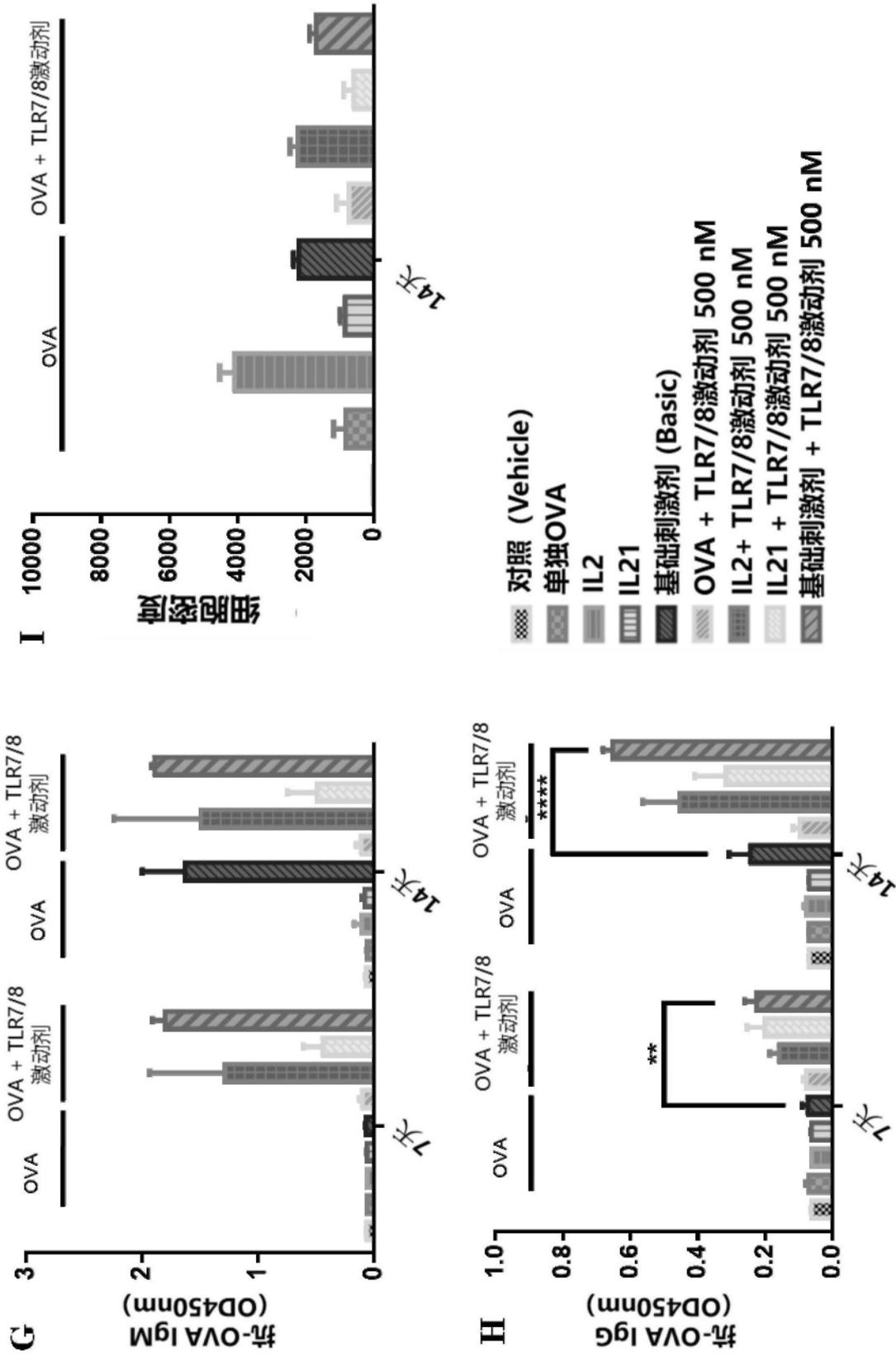


图12G-12I

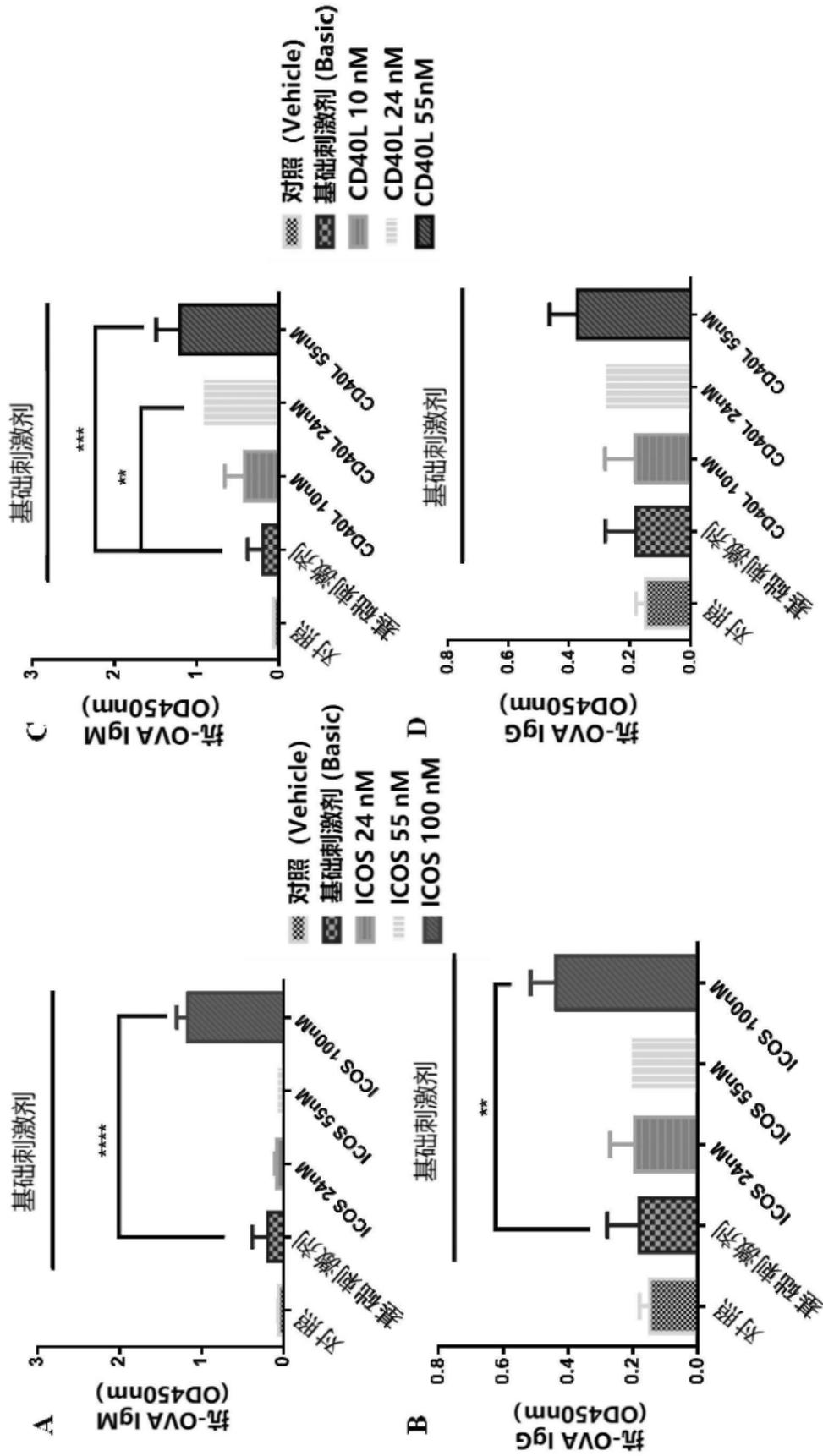


图13A-13D

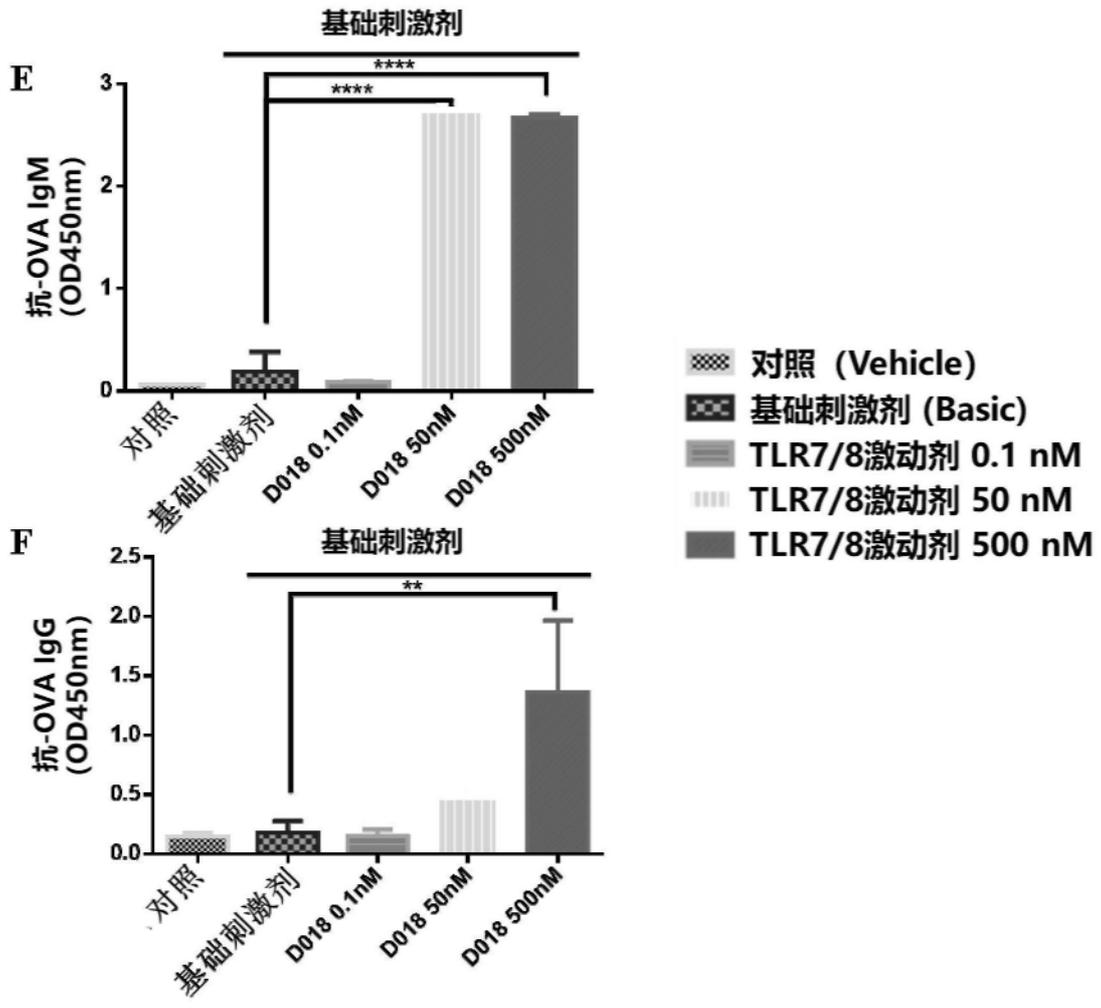


图13E-13F