



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102741287 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201080017854. 0

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/153038 2009. 02. 17 US

W0 2007/062245 A2, 2007. 05. 31, 全文.

W0 2008/106116 A2, 2008. 09. 04, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 10. 17

审查员 朱宁

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/024377 2010. 02. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/096418 EN 2010. 08. 26

(73) 专利权人 UCB 制药公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 A·D·G·劳森 A·M·内斯比特

A·G·波普尔威尔 S·G·肖

D·什佩托尔 章毅

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书31页

序列表21页 附图9页

(54) 发明名称

对人 OX40 具有特异性的抗体分子

(57) 摘要

本发明涉及对人 OX40 的抗原决定簇具有特异性的抗体分子、所述抗体分子的治疗用途以及制备所述抗体分子的方法。

1. 一种包含重链和轻链的结合人 OX40 的拮抗性抗体,其中所述重链的可变域包含 CDR-H1 以 SEQ ID NO:1 给出的序列组成的 CDR、CDR-H2 以 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:20 给出的序列组成的 CDR 和 CDR-H3 以 SEQ ID NO:3 给出的序列组成的 CDR,以及其中所述轻链的可变域包含 CDR-L1 以 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:21 给出的序列组成的 CDR、CDR-L2 以 SEQ ID NO:5 给出的序列组成的 CDR 和 CDR-L3 以 SEQ ID NO:6 给出的序列组成的 CDR。

2. 权利要求 1 的拮抗性抗体,其中所述重链可变域由 SEQ ID NO: 9 给出的序列组成。

3. 权利要求 1 的拮抗性抗体,其中所述轻链可变域由 SEQ ID NO: 7 给出的序列组成。

4. 权利要求 1 的拮抗性抗体,其中所述抗体选自:具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段,其中所述片段是 Fab、修饰的 Fab'、Fab'、F(ab')₂、或 scFv 片段。

5. 一种结合人 OX40 的拮抗性抗体,具有由 SEQ ID NO: 9 所给出的序列组成的重链可变域和由 SEQ ID NO: 7 所给出的序列组成的轻链可变域。

6. 一种结合人 OX40 的拮抗性抗体,具有由 SEQ ID NO: 15 所给出的序列组成的重链和由 SEQ ID NO: 11 所给出的序列组成的轻链。

7. 权利要求 1 的拮抗性抗体,其具有与其连接的效应分子或报道分子。

8. 权利要求 7 的拮抗性抗体,其中所述效应分子包括一种或多种聚合物。

9. 权利要求 8 的拮抗性抗体,其中所述一种或多种聚合物为任选取代的直链或带支链的聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物或者带支链或不带支链的多糖。

10. 权利要求 9 的拮抗性抗体,其中所述一种或多种聚合物为甲氧基聚乙二醇或聚乙二醇。

11. 权利要求 10 的拮抗性抗体,其具有与重链 C 末端的半胱氨酸残基之一连接的赖氨酰-马来酰亚胺基团或赖氨酰双-马来酰亚胺基团,其中赖氨酰残基的各个氨基具有与其共价连接的分子量为 15000-40000 Da 的甲氧基聚乙二醇残基。

12. 一种对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其为修饰的 Fab 片段,具有由 SEQ ID NO:15 所给出的序列组成的重链和由 SEQ ID NO:11 所给出的序列组成的轻链,并且具有与重链第 226 位的半胱氨酸连接的赖氨酰-马来酰亚胺基团,其中赖氨酰残基的各个氨基具有与其共价连接的分子量为 15000-40000 Da 的甲氧基聚乙二醇残基。

13. 一种分离的 DNA 序列,所述序列编码权利要求 1-12 中任一项的抗体的一种或多种重链和 / 或轻链。

14. 一种克隆载体或表达载体,所述克隆载体或表达载体包含一个或多个权利要求 13 的 DNA 序列。

15. 权利要求 14 的载体,其中所述载体包含 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:18 给出的序列。

16. 权利要求 14 的载体,其中所述载体包含 SEQ ID NO:19 给出的序列。

17. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含一种或多种权利要求 14 或权利要求 15 或权利要求 16 的克隆载体或表达载体。

18. 一种用于制备权利要求 1-12 中任一项的抗体的方法,所述方法包括培养权利要求 17 的宿主细胞和分离所述抗体。

19. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1-12 中任一项的抗体,和一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

20. 权利要求 19 的药物组合物,所述组合物还包含其它活性成分。
21. 权利要求 1-12 中任一项的抗体或权利要求 19 或 20 的药物组合物在制备用于治疗或预防由 OX40 介导或与 OX40 的水平提高相关的病理性病症的药物中的用途。
22. 一种包含结合 OX40 的免疫球蛋白部分和两种域抗体的 OX40 结合抗体融合蛋白,其中所述结合 OX40 的免疫球蛋白部分由权利要求 1 的拮抗性抗体组成。
23. 权利要求 22 的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白部分为 Fab 或 Fab'。
24. 权利要求 22 或 23 的融合蛋白,其中所述两种域抗体为通过二硫键连接的可变重链 (VH) 和可变轻链 (VL) 配对。
25. 权利要求 24 的融合蛋白,其中所述 VH 和 VL 配对结合白蛋白。
26. 权利要求 21 的用途,其中所述病理性病症为感染。
27. 权利要求 21 的用途,其中所述病理性病症为移植物抗宿主病或移植排斥。
28. 权利要求 21 的用途,其中所述病理性病症为变态反应、COPD、哮喘、自身免疫性疾病或类风湿性关节炎。

对人 OX40 具有特异性的抗体分子

[0001] 本发明涉及对 OX40 的抗原决定簇具有特异性的抗体分子和包含所述抗体分子的组合物。本发明还涉及所述抗体分子、组合物的治疗用途以及制备所述抗体分子的方法。

[0002] OX40 (也被称作 CD134、TNFRSF4、ACT35 或 TXGP1L) 是 TNF 受体超家族的成员,该超家族包括 4-1BB、CD27、CD30 和 CD40。OX40 的胞外配体结合域由 3 个完全的半胱氨酸富集域 (CRD) 和第四个 C 端不完全 CRD 组成 (Bodmer 等,2002,Trends Biochem Sci,27,19-26)。

[0003] OX40 的配体为 OX40L 并且 3 个拷贝的 OX40 结合三聚体配体以形成 OX40-OX40L 复合体 (Compaan 和 Hymowitz,2006,Structure,14,1321-1330)。OX40 是膜结合受体;但也已检测到可溶的同种型 (Taylor 和 Schwarz,2001,J. Immunol. Methods,255,67-72)。可溶形式的功能意义目前未知。OX40 并不表达于静止性 T 细胞上,但与 T 细胞受体 (TCR) 连接后瞬时表达于活化 T 细胞上。OX40 的配体 OX40L,是 TNF 家族的成员并且表达于活化的抗原呈递细胞 (APC),包括 B 细胞、巨噬细胞、内皮细胞和树突细胞 (DC) 上。

[0004] OX40 是主要的共刺激受体,其中 CD28 与 OX40 的顺序衔接为最佳的 T 细胞增殖和存活所必需。OX40 在活化 T 细胞上的连接导致增强的细胞因子产生和 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞两者的增殖 (Gramaglia 等,2000,J. Immunol,165,3043-3050, Bansal-Pakala 等,2004,J. Immunol,172,4821-425) 并且可有利于正在进行的 Th1 应答和 Th2 应答两者 (Gramaglia 等,1998,J. Immunol.,161,6510-6517,Arestides 等,2002,Eur. J. Immunol. 32,2874-2880)。OX40 共刺激使 T 细胞的存活延长到超过免疫应答的初始效应期并通过抑制效应 T 细胞的死亡而增加记忆 T 细胞的数量。

[0005] 当免疫激活过度或不受控制时,可发生病理性变态反应、哮喘、炎症、自身免疫性疾病和其它相关疾病。因为 OX40 对增强免疫应答有作用,其可加重自身免疫性疾病和炎性疾病。

[0006] OX40/OX40L 的相互作用在疾病模型中的作用已在 OX40 敲除小鼠中被证实。在实验性变应性脑脊髓炎 (EAE),多发性硬化的模型中,在 OX40 敲除小鼠中观察到 CNS 内较不严重的疾病临床体征和减少的炎症浸润 (Carboni 等,2003,J. Neuroimmunology,145,1-11)。同时用卵清蛋白初免并攻击的 OX40 敲除小鼠表现出肺部炎症的减少 (嗜酸粒细胞增多方面减少 80-90%)、粘液产生减少和明显缓解的气道高反应性 (Jember 等,2001,J. Exp. Med.,193,387-392)。鼠 OX40 配体的单克隆抗体已在以下中显示出有益的效应:类风湿性关节炎的胶原诱导的关节炎模型 (Yoshioka 等,2000,Eur. J. Immunol.,30,2815-2823)、EAE (Nohara 等,2001,J. Immunol.,166,2108-2115)、非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠 (Pakala 等,2004,Eur. J. Immunol.,34,3039-3046)、T 细胞重建小鼠的结肠炎 (Malmstrom 等,2001,J. Immunol.,166,6972-6981,Totsuka 等,2003,Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,284,G595-G603) 和肺部炎症的模型 (Salek-Ardakani 等,2003,J. Exp. Med.,198,315-324,Hoshino 等,2003,Eur. J. Immunol,33,861-869)。人 OX40L 的抗体已在猕猴肺部炎症的模型中描述并且导致变应原攻击后的细支气管灌洗液中 IL-5、IL-13 和效应记忆 T 细胞的水平减少 (Seshasayee 等,2007,J. Clin. Invest,117,3868-3878)。

[0007] 已在几种自身免疫性疾病和炎性疾病中观察到 OX40 表达的增加。这包括

分离自类风湿性关节炎患者的滑液的 T 细胞上 OX40 表达的增加 (Brugnoni D 等, 1998, Br. J. Rheum., 37, 584-585; Yoshioka 等, 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823; Giacomelli R 等, 2001, Clin. Exp. Rheumatol., 19, 317-320)。类似地在患有溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的患者的胃肠组织中 (Souza 等, 1999, Gut, 45, 856-863; Stuber 等, 2000, Eur. J. Clin. Invest., 30, 594-599) 和多发性硬化患者的活动病灶 (Carboni 等, 2003, J. Neuroimmunology, 145, 1-11) 中已注意到 OX40 表达的增加。人气道平滑肌 (ASM) 上也可检测到 OX40L 并且哮喘患者 ASM 细胞显示出比健康供者更强的炎症应答, 提示哮喘中 OX40/OX40L 通路的作用 (Burgess 等, 2004, J. Allergy Clin Immunol., 113, 683-689; Burgess 等, 2005, J. Allergy Clin Immunol., 115, 302-308)。文献还已报道分离自系统性红斑狼疮 (SLE) 患者的外周血的 CD4+T 细胞表达的 OX40 水平升高, 这种升高与疾病活动度相关 (Patschan 等, 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242)。

[0008] 基于 OX40 在变态反应、哮喘以及自身免疫和炎症相关疾病中的作用, 一种治疗这些疾病的途径是通过使用抗 OX40L 抗体或拮抗性抗 OX40 抗体阻断 OX40-OX40L 信号转导。

[0009] 抗 OX40L 抗体已被描述于参见例如 W02006/029879。已描述许多激动性抗 OX40 抗体但已知非常少拮抗性抗 OX40 抗体。兔多克隆抗小鼠 OX40 抗体由 Stuber 等, 1996, J. Exp. Med, 183, 979-989 制备, 其阻断了 OX40 和 OX40L 之间的相互作用。结合人 OX40 的小鼠单克隆抗体 131 和 315 由 Imura 等, 1996, J. Exp. Med, 2185-2195 制得。

[0010] 完整的人拮抗性抗体已被描述于 W02007/062245, 最高亲和力的这些抗体对细胞表面表达的 OX40 (活化 T 细胞) 具有 11nM 的亲和力。

[0011] 人源化的拮抗性抗体已被描述于 W02008/106116 并且对 OX40 具有最佳亲和力的抗体具有 0.94nM 的亲和力。

[0012] 已描述了其它的抗 OX40 抗体, 包括鼠 L106 (美国专利第 6, 277, 962 号) 和鼠 ACT35, 市购自 eBioscience。

[0013] 因此本领域仍存在对适合治疗患者的改良抗 OX40 抗体的需要。

[0014] 我们现已鉴定了适合用于治疗或预防由 OX40 介导或与 OX40 的水平提高相关的病理性病症的高亲和力拮抗性抗 OX40 抗体。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 显示了与本公开内容的抗体相关的某些氨基酸或 DNA 序列

[0017] 图 2 显示了 A26 Fab'-PEG 形式的抗体的图示

[0018] 图 3 显示了 A26 Fab'-PEG 抗体对细胞表面的 OX40 的基于细胞的亲和力

[0019] 图 4 显示了 A26 Fab'-PEG 抗体对与活化 T 细胞结合的 OX40L 的抑制百分比

[0020] 图 5 显示了在人 MLR 中 A26 Fab'-PEG 抗体对 T 细胞增殖的抑制百分比

[0021] 图 6 显示了 A26 Fab'-PEG 对暴露于破伤风类毒素的 PBMC 的增殖的抑制情况

[0022] 图 7 显示了 A26 Fab'-PEG 对暴露于屋尘螨 (Dermatophagoides pteronyssinus) 的变应原提取物的 PBMC 的 IL-13 产生的抑制百分比

[0023] 图 8 显示了 A26 Fab'-PEG 对暴露于屋尘螨的变应原提取物的 PBMC 的细胞因子产生的抑制百分比

[0024] 图 9 显示了在 Hu-SCID 模型中 A26 Fab'-PEG 抑制 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的增殖。

[0025] 图 10 显示了在体内模型中 A26 Fab'-PEG 对关节炎评分 (根据曲线下面积) 的抑

制情况

[0026] 图 11 显示了在体内模型中关节炎的总组织学评分

[0027] 发明详述

[0028] 人源化抗体所源自的原始大鼠抗体在本文中称为 CA044_00026。

[0029] 通常呈 Fab 片段或其它片段形式的人源化 CA044_00026, 称为 A26。

[0030] 以图 2 所示形式的聚乙二醇化抗体“A26”, 在本文中称为 A26Fab’ PEG。

[0031] 抗体可变域的残基按照惯例依照由 Kabat 等发明的系统编号。该系统由 Kabat 等, 1987 提出, 载于 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (此后“Kabat 等 (见上文)”)。除非另外指出时, 否则将该编号系统用于本说明书。

[0032] Kabat 残基命名并不总是直接与氨基酸残基的线性编号对应。无论是框架还是互补决定区 (CDR), 实际的线性氨基酸序列可能比严格的 Kabat 编号包含更少或另外的氨基酸, 对应于缩短或插入基本可变域结构的结构组分。对于既定的抗体, 残基的正确 Kabat 编号可通过比对抗体序列与“标准”Kabat 编号序列的同源性残基来确定。

[0033] 重链可变域的 CDR 依照 Kabat 编号系统位于残基 31-35 (CDR-H1)、残基 50-65 (CDR-H2) 和残基 95-102 (CDR-H3)。然而, 依照 Chothia (Chothia, C. 和 Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), 等同于 CDR-H1 的环从残基 26 延伸至残基 32。因此除非另外指出, 否则本文采用的“CDR-H1”意指残基 26-35, 如联合 Kabat 编号系统和 Chothia 的拓扑环定义所述。

[0034] 轻链可变域的 CDR 依照 Kabat 编号系统位于残基 24-34 (CDR-L1)、残基 50-56 (CDR-L2) 和残基 89-97 (CDR-L3)。

[0035] 本文所用术语“拮抗性抗体”描述了以下抗体, 其能够抑制和 / 或中和 OX40 的生物信号转导活性, 例如通过阻断或大量减少 OX40 与 OX40 配体的结合, 从而抑制 OX40 的激活。

[0036] 本发明所用抗体可利用本领域已知的任何合适的方法得到。包括融合蛋白 (例如 OX40-Fc 融合蛋白) 或表达多肽的细胞 (重组或天然地) (例如活化 T 细胞) 在内的 OX40 多肽 / 蛋白, 可用于制备特异性识别 OX40 的抗体。所述 OX40 多肽可为“成熟的”多肽或其生物活性片段或衍生物。合适地所述 OX40 多肽为成熟的人多肽或其胞外域或片段。所述胞外域典型地包含 OX40 蛋白的氨基酸 29-214 (SWISS PROT 条目 P43489)。OX40 多肽可通过本领域熟知的方法从包含表达系统的遗传工程宿主细胞制备或者其可回收自天然的生物来源。在本申请中, 术语“多肽”包含肽、多肽和蛋白。除非另外指出, 否则这些可互换使用。所述 OX40 多肽在一些实例中可为较大蛋白 (例如融合蛋白例如与亲和标签融合的) 的一部分。可得到针对所述 OX40 多肽产生的抗体, 其中利用熟知和常规的方案通过向动物优选非人的动物给予多肽, 免疫接种动物是必需的, 参见例如 Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (编辑), 第 4 卷, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)。可免疫接种许多温血动物, 例如兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪。但通常小鼠、兔、猪和大鼠是最适合的。

[0037] 本发明所用抗体包括完整的抗体及其功能上有活性的片段或衍生物并且可为但不限于单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体或嵌合抗体。

[0038] 单克隆抗体可通过本领域已知的任何方法制备,例如杂交瘤技术 (Kohler 和 Milstein,1975, Nature,256 :495-497)、三源杂交瘤技术、人 B- 细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等,1983, Immunology Today,4 :72) 和 EBV- 杂交瘤技术 (Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 第 77-96 页, Alan R Liss, Inc., 1985)。

[0039] 本发明所用抗体还可利用单一淋巴细胞抗体方法,通过克隆和表达免疫球蛋白可变区 cDNA 来得到,所述可变区 cDNA 通过例如 Babcook, J. 等,1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15) :7843-78481 ;W092/02551 ;W02004/051268 和国际专利申请第 W02004/106377 号中所述的方法,由针对制备特定抗体选择的单一淋巴细胞得到。

[0040] 筛选抗体可利用测量与人 OX40 的结合情况的测定和 / 或测量阻断 OX40 与其配体 OX40L 结合的能力的测定来进行。结合测定的实例是 ELISA, 具体而言,使用固定于板上的人 OX40 和人 Fc 的融合蛋白并应用缀合的二抗检测与所述融合蛋白结合的抗 OX40 抗体。阻断测定的实例是基于流式细胞术的测定,其测量 OX40 配体融合蛋白与人 CD4 细胞上的 OX40 结合的阻断情况。将荧光标记的二抗用于检测与细胞结合的 OX40 配体融合蛋白的量。该测定寻找由于上清中抗体阻断了配体融合蛋白与抗体的结合而减少的信号。阻断测定的另一个实例是以下测定 :其中通过测量氚标记的胸苷掺入,来测量由包被在板上的 OX40 配体融合蛋白介导的首次用于实验的人 T 细胞共刺激的阻断情况。

[0041] 人源化抗体 (其包括 CDR 移植抗体) 为具有一个或多个来自非人物种的互补决定区 (CDR) 和来自人免疫球蛋白分子的框架区的抗体分子 (参见例如 US 5,585,089 ; W091/09967)。应理解的是,唯一可能必需的是转移所述 CDR 的特异性决定残基而非整个 CDR (参见例如 Kashmiri 等,2005, Methods,36,25-34)。人源化抗体任选还可包含一个或多个来源于 CDR 所得自的非人物种的框架残基。

[0042] 嵌合抗体由来源于两种不同物种的成分组成,使得所述成分保留其所来源自的物种的特征。通常嵌合抗体包含一种物种 (例如小鼠、大鼠、兔或类似物种) 的可变区和来自另一种物种例如人的恒定区。

[0043] 本发明所用抗体还可使用本领域已知的多种噬菌体展示方法得到并且包括由以下文献公开的那些 :Brinkman 等 (在 J. Immunol. 中 Methods,1995,182 :41-50)、Ames 等 (J. Immunol. Methods,1995,184 :177-186)、Kettleborough 等 (Eur. J. Immunol. 1994,24 : 952-958)、Persic 等 (Gene,19971879-18)、Burton 等 (Advances in Immunology,1994,57 : 191-280) 以及 W0 90/02809 ;W0 91/10737 ;W0 92/01047 ;W0 92/18619 ;W0 93/11236 ;W0 95/15982 ;W0 95/20401 和 US 5,698,426 ;5,223,409 ;5,403,484 ;5,580,717 ;5,427,908 ; 5,750,753 ;5,821,047 ;5,571,698 ;5,427,908 ;5,516,637 ;5,780,225 ;5,658,727 ; 5,733,743 和 5,969,108。

[0044] 完全人抗体是其中重链和轻链两者的可变区和恒定区 (若存在时) 为全部人来源的或与人来源的序列基本相同,无需来自同一抗体的那些抗体。完全人抗体的实例可包括例如通过上述噬菌体展示方法制备的抗体,和由小鼠制备的抗体,其中鼠免疫球蛋白的可变区和任选恒定区基因已被其人对对应物代替,所述对应物例如以下专利的一般术语中所述 :EP0546073 B1、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US5,770,429、EP 0438474 和 EP0463151。

[0045] 在一个实施方案中,本发明提供了包含重链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗

体,其中所述重链的可变域包含以下 CDR 中的至少一个:具有 CDR-H1 以图 1(c)SEQ ID NO:1 给出的序列的 CDR、具有 CDR-H2 以图 1(c)SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:20 给出的序列的 CDR 和具有 CDR-H3 以图 1(c)SEQ ID NO:3 给出的序列的 CDR。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含重链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中所述重链的可变域的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 中的至少两个选自:CDR-H1 以 SEQ ID NO:1 给出的序列、CDR-H2 以 SEQ ID NO:2 给出的序列和 CDR-H3 以 SEQ ID NO:3 给出的序列。例如所述抗体可包含重链,其中 CDR-H1 具有 SEQ ID NO:1 给出的序列并且 CDR-H2 具有 SEQ ID NO:2 给出的序列。或者,所述抗体可包含重链,其中 CDR-H1 具有 SEQ ID NO:1 给出的序列并且 CDR-H3 具有 SEQ ID NO:3 给出的序列,或者所述抗体可包含重链,其中 CDR-H2 具有 SEQ ID NO:2 给出的序列并且 CDR-H3 具有 SEQ ID NO:3 给出的序列。为了避免疑惑,应理解的是包括所有的排列。

[0047] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含重链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中所述重链的可变域包含 CDR-H1 以 SEQ ID NO:1 给出的序列、CDR-H2 以 SEQ ID NO:2 给出的序列和 CDR-H3 以 SEQ ID NO:3 给出的序列。

[0048] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含重链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中所述重链的可变域包含 CDR-H1 以 SEQ ID NO:1 给出的序列、CDR-H2 以 SEQ ID NO:20 给出的序列和 CDR-H3 以 SEQ ID NO:3 给出的序列。

[0049] 在一个实施方案中,本发明提供了包含轻链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中所述轻链的可变域包含以下 CDR 中的至少一个:具有 CDR-L1 以图 1(c)SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:21 给出的序列的 CDR、具有 CDR-L2 以图 1(c)SEQ ID NO:5 给出的序列的 CDR 和具有 CDR-L3 以图 1(c)SEQ ID NO:6 给出的序列的 CDR。

[0050] 在另一个实施方案中,本发明提供包含轻链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中所述轻链的可变域的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 中的至少两个选自:CDR-L1 以 SEQ ID NO:4 给出的序列、CDR-L2 以 SEQ ID NO:5 给出的序列和 CDR-L3 以 SEQ ID NO:6 给出的序列。例如,所述抗体可包含轻链,其中 CDR-L1 具有 SEQ ID NO:4 给出的序列并且 CDR-L2 具有 SEQ ID NO:5 给出的序列。或者,所述抗体可包含轻链,其中 CDR-L1 具有 SEQ ID NO:4 给出的序列并且 CDR-L3 具有 SEQ ID NO:6 给出的序列,或者所述抗体可包含轻链,其中 CDR-L2 具有 SEQ ID NO:5 给出的序列并且 CDR-L3 具有 SEQ ID NO:6 给出的序列。为了避免疑惑,应理解的是包括所有的排列。

[0051] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含轻链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中可变域包含 CDR-L1 以 SEQ ID NO:4 给出的序列、CDR-L2 以 SEQ ID NO:5 给出的序列和 CDR-L3 以 SEQ ID NO:6 给出的序列。

[0052] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含轻链的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其中可变域包含 CDR-L1 以 SEQ ID NO:21 给出的序列、CDR-L2 以 SEQ ID NO:5 给出的序列和 CDR-L3 以 SEQ ID NO:6 给出的序列。

[0053] 本发明的抗体分子合适地分别包含互补的轻链或互补的重链。

[0054] 因此在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链和轻链,其中所述重链的可变域包含 CDR-H1 以 SEQ ID NO:1 给出的序列、CDR-H2 以 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:20 给出的序列和 CDR-H3 以 SEQ ID NO:3 给出的序列,并且其中所述轻链的可变域包含 CDR-L1 以

SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :21 给出的序列、CDR-L2 以 SEQ ID NO :5 给出的序列和 CDR-L3 以 SEQ ID NO :6 给出的序列。

[0055] 应理解的是可对本发明提供的 CDR 作出一个或多个氨基酸的取代、添加和 / 或缺失而不显著改变抗体结合 OX40 并中和 OX40 活性的能力。任何氨基酸的取代、添加和 / 或缺失的影响可易于通过本领域的技术人员检测,例如通过使用本文所述的方法,特别是实施例中所描述的方法,确定 OX40 的结合情况和 OX40/OX40L 相互作用的抑制情况。因此,本发明提供了包含一个或多个选自以下的 CDR 的对人 OX40 具有特异性的抗体:CDRH-1 (SEQ ID NO :1)、CDRH-2 (SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :20)、CDRH-3 (SEQ ID NO :3)、CDRL-1 (SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :21)、CDRL-2 (SEQ ID NO :5) 和 CDRL-3 (SEQ ID NO :6),其中一个或多个所述 CDR 中的一个或多个氨基酸已被另一种氨基酸、合适地如本文以下定义的相似氨基酸取代。在一个实施方案中,本发明提供了对人 OX40 具有特异性的抗体,其包含如图 1(c) 所示 CDRH-1 (SEQ ID NO :1)、CDRH-2 (SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :20)、CDRH-3 (SEQ ID NO :3)、CDRL-1 (SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :21)、CDRL-2 (SEQ ID NO :5) 和 CDRL-3 (SEQ ID NO :6),例如其中一个或多个所述 CDR 中的一个或多个氨基酸已被另一种氨基酸、例如如本文以下定义的相似氨基酸取代。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链,其中所述重链的可变域包含三个 CDR,其中 CDRH-1 的序列与 SEQ ID NO :1 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性,CDRH-2 的序列与 SEQ ID NO :2 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性和 / 或 CDRH-3 的序列与 SEQ ID NO :3 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性。在另一个实施方案中,本发明的抗体包含重链,其中所述重链的可变域包含三个 CDR,其中 CDRH-1 的序列与 SEQ ID NO :1 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性,CDRH-2 的序列与 SEQ ID NO :2 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性和 / 或 CDRH-3 的序列与 SEQ ID NO :3 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性。

[0057] 本文所用“同一性”,是指在比对序列中的任何特定位置,序列之间的氨基酸残基是相同的。本文所用“相似性”,是指在比对序列中的任何特定位置,序列之间的氨基酸残基具有相似的类型。例如,亮氨酸可被异亮氨酸或缬氨酸取代。其它可常彼此取代的氨基酸包括但不限于:

[0058] - 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 (具有芳族侧链的氨基酸);

[0059] - 赖氨酸、精氨酸和组氨酸 (具有碱性侧链的氨基酸);

[0060] - 天冬氨酸和谷氨酸 (具有酸性侧链的氨基酸);

[0061] - 天冬酰胺和谷氨酰胺 (具有酰胺侧链的氨基酸);和

[0062] - 半胱氨酸和甲硫氨酸 (具有含硫侧链的氨基酸)。可易于计算出同一性和相似性的程度 (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第 1 部分, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑., M Stockton Press, New York, 1991, 可获得

自 NCBI 的 BLAST™ 软件 (Altschul, S. F. 等, 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-410 ;Gish, W. & States, D. J. 1993, Nature Genet. 3 :266-272. Madden, T. L. 等, 1996, Meth. Enzymol. 266 : 131-141 ;Altschul, S. F. 等, 1997, Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 ;Zhang, J. & Madden, T. L. 1997, Genome Res. 7 :649-656)。

[0063] 在另一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链, 其中所述轻链的可变域包含三个 CDR, 其中 CDRL-1 的序列与 SEQ ID NO :4 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性, CDRL-2 的序列与 SEQ ID NO :5 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性和 / 或 CDRL-3 的序列与 SEQ ID NO :6 给出的序列具有至少 60% 的同一性或相似性。在另一个实施方案中, 本发明的抗体包含轻链, 其中所述轻链的可变域包含三个 CDR, 其中 CDRL-1 的序列与 SEQ ID NO :4 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性, CDRL-2 的序列与 SEQ ID NO :5 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性和 / 或 CDRL-3 的序列与 SEQ ID NO :6 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 的同一性或相似性。

[0064] 在一个实施方案中, 本文提供的抗体为单克隆抗体。

[0065] 在一个实施方案中, 本文提供的抗体为嵌合抗体。

[0066] 在一个实施方案中, 本发明提供的抗体为 CDR 移植抗体分子, 其包含一个或多个 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、20 和 / 或 21 (图 1(c)) 中提供的 CDR 或其变体。本文所用术语 ‘CDR 移植抗体分子’ 是指以下抗体分子, 其中重链和 / 或轻链包含一个或多个来自供体抗体 (例如鼠单克隆抗体) 的 CDR (若需要的话, 包括一个或多个修饰的 CDR), 其被移植至受体抗体 (例如人抗体) 的重链和 / 或轻链可变区框架。关于综述, 参见 Vaughan 等, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998。在一个实施方案中, 并非转移整个 CDR, 而是仅将来自本文上述任何一个 CDR 的一个或多个特异性决定残基转移至人抗体的框架 (参见例如 Kashmiri 等, 2005, Methods, 36, 25-34)。在一个实施方案中, 仅将来自本文上述一个或多个 CDR 的特异性决定残基转移至人抗体的框架。在另一个实施方案中, 仅将来自本文上述各个 CDR 的特异性决定残基转移至人抗体的框架中。

[0067] 当 CDR 或特异性决定残基被移植时, 可根据所述 CDR 所来源的供体抗体的种类 / 类型使用任何合适的受体可变区框架序列, 包括小鼠、灵长类和人的框架区。合适地, 本发明的 CDR 移植抗体具有包含人受体框架区和上述的一个或多个 CDR 或特异性决定残基的可变域。因此, 在一个实施方案中提供其中可变域包含人受体框架区和非人的供体 CDR 的中和 CDR 移植抗体。

[0068] 可用于本发明的人框架的实例是 KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY 和 POM (Kabat 等, 见上文)。例如, KOL 和 NEWM 可用于重链, REI 可用于轻链而 EU、LAY 和 POM 可用于重链和轻链两者。或者, 可使用人种系序列; 这些可来自 :<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

[0069] 在本发明的 CDR 移植抗体中, 受体重链和轻链并不一定需要来自同一抗体并且若需要的话, 可包含具有来源于不同链的框架区的复合链。

[0070] 本发明 CDR 移植抗体的重链的合适的框架区来源于人亚群 VH3 序列 1-33-07 以及 JH4。因此, 提供了包含至少一种非人供体 CDR 的中和 CDR 移植抗体, 其中重链框架区来源于人亚群 VH3 序列 1-33-07 以及 JH4。人 JH4 的序列如下 : (YFDY)WGQGLTVTVSS (Seq ID No : 22)。YFDY 基序是 CDR-H3 的一部分, 并非框架 4 的一部分 (Ravetch, J.V. 等, 1981, Cell, 27,

583-591)。

[0071] 本发明 CDR 移植抗体的轻链的合适的框架区来源于人种系亚群 VK1 序列 2-1 1-02 以及 JK4。因此,提供了包含至少一种非人供体 CDR 的中和 CDR 移植抗体,其中轻链框架区来源于人亚群序列 2-1 1-02 以及 JK4。JK1 的序列如下:(WT)FGQGTKVEIK(Seq ID No:23)。WT 基序是 CDR-L3 的一部分,并非框架 4 的一部分(Hieter, PA.,等,1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522)。

[0072] 此外,在本发明的 CDR 移植抗体中,框架区不需要与受体抗体具有完全相同的序列。例如,罕见残基可变成对该受体链类别或类型更频繁存在的残基。或者,受体框架区中所选的残基可被改变以使它们对应于供体抗体的相同位置上存在的残基(参见 Reichmann 等,1998, Nature, 332, 323-324)。这样的改变应保持最小必要性以恢复供体抗体的亲和力。选择受体框架区中可能需要被改变的残基的方案参见 WO 91/09967。

[0073] 合适地,在本发明的 CDR 移植抗体分子中,若受体重链具有人 VH3 序列 1-3 3-07 以及 JH4,则所述重链的受体框架区除包含一个或多个供体 CDR 外,还在第 37、73、78 或 94 位(依据 Kabat 等,见上文)中的至少一个上包含供体残基。因此,提供 CDR 移植抗体,其中至少在重链可变域的第 37、73、78 和 94 位的残基为供体残基。

[0074] 合适地,在本发明的 CDR 移植抗体分子中,若受体轻链具有人亚群 VK1 序列 2-1 1-02 以及 JK4,则所述轻链的受体框架区除包含一个或多个供体 CDR 外,还在第 64 或 71 位中的至少一个上包含供体残基。因此,提供 CDR 移植抗体,其中至少在轻链可变域的第 64 和 71 位的残基为供体残基。

[0075] 供体残基为来自供体抗体的残基,供体抗体即 CDR 最初来源的抗体。

[0076] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链,其中所述重链的可变域包含图 1(b) SEQ ID NO:9 给出的序列。

[0077] 应理解的是,可对本发明提供的抗体可变域作出一个或多个氨基酸的取代、添加和/或缺失而不显著改变抗体结合 OX40 并中和 OX40 活性的能力。任何的氨基酸的取代、添加和/或缺失的影响可易于由本领域的技术人员检测,例如通过使用本文所述的方法,特别是实施例中所述方法以确定 OX40 的结合和配体阻断情况。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含重链,其中所述重链的可变域包含与 SEQ ID NO:9 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链,其中所述重链的可变域包含与 SEQ ID NO:9 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0079] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链,其中所述轻链的可变域包含图 1(a) SEQ ID NO:7 给出的序列。

[0080] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链,其中所述轻链的可变域包含与 SEQ ID NO:7 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含轻链,其中所述轻链的可变域包含与 SEQ ID NO:7 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0081] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链和轻链,其中所述重链的可变域包含 SEQ ID NO:9 给出的序列,并且所述轻链的可变域包含 SEQ ID NO:7 给出的序列。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中,抗体包含重链和轻链,其中所述重链的可变域包

含与 SEQ ID NO:9 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列并且所述轻链的可变域包含与 SEQ ID NO:7 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。合适地,所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链的可变域包含与 SEQ ID NO:9 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列,并且其中所述轻链的可变域包含与 SEQ ID NO:7 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0083] 本发明的抗体分子可包括具有全长重链和轻链或其片段的完整抗体分子,并且可为但不限于:Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、单域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价抗体、三价抗体或四价抗体、双-scFv、双链抗体(diabody)、三链抗体、四链抗体及任何以上 kanti 的表位结合片段(参见例如 Holliger 和 Hudson,2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136;Adair 和 Lawson,2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法为本领域熟知(参见例如 Verma 等,1998, Journal of Immunological Methods,216,165-181)。本发明所用其它抗体片段包括国际专利申请 W02005/003169、W02005/003170 和 W02005/003171 中所述的 Fab 和 Fab' 片段。多价抗体可包含多特异性或者可为单特异性的(参见例如 W0 92/22853 和 W005/113605)。

[0084] 在一个实施方案中,将本公开内容的抗体提供为结合 OX40 的抗体融合蛋白,其包含免疫球蛋白部分(例如 Fab 或 Fab' 片段,以及直接或间接与其连接的一种或两种单域抗体(dAb)),例如如 W02009/040562 中所述。

[0085] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含两种域抗体,例如作为可变重链(VH)与可变轻链(VL)配对,任选通过二硫键连接。

[0086] 在一个实施方案中,所述融合蛋白的 Fab 元件或 Fab' 元件与一个或多个单域抗体具有相同或相似的特异性。在一个实施方案中,所述 Fab 或 Fab' 与一个或多个单域抗体具有不同的特异性,这就是说所述融合蛋白是多价的。在一个实施方案中,本发明的多价融合蛋白具有白蛋白结合位点,例如其中的 VH/VL 对提供白蛋白结合位点。

[0087] 本发明的抗体分子的恒定区结构域,若存在的话,可根据抗体分子预期的功能和特别地可能需要的效应子功能来选择。例如,所述恒定区结构域可为人 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 结构域。具体而言,可使用人 IgG 恒定区域,当抗体分子旨在用于治疗用途并需要抗体的效应子功能时特别可使用 IgG1 和 IgG3 同种型。或者当抗体分子旨在用于治疗目的并且不需要抗体的效应子功能,例如用于单纯阻断 OX40 活性时,可使用 IgG2 和 IgG4 同种型。应理解的是,还可使用这些恒定区结构域的序列变体。例如可使用 IgG4 分子,其中第 241 位的丝氨酸已变为脯氨酸,如 Angal 等,Molecular Immunology,1993,30(1),105-108 中所述。本领域的技术人员还应理解的是,抗体可经历许多翻译后修饰。这些修饰的类型和程度往往视用于表达抗体的宿主细胞系和培养条件而定。这样的修饰可包括在以下方面的改变:糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺的脱酰胺。常见的修饰是由于羧肽酶的作用而丢失羧基末端碱性残基(例如赖氨酸或精氨酸)(如 Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134,1995 所述)。因此,图 1(f),SEQ ID NO:15 中给出的抗体重链的 C 端赖氨酸可不存在。

[0088] 在一个实施方案中,抗体重链包含 CH1 域并且抗体轻链包含 CL 域, κ 或 λ 。

[0089] 在一个实施方案中,由本发明提供的抗体为其中重链恒定区包含修饰的绞链区的对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体。因此,本发明提供了抗体,其中重链包含图 1(f),SEQ

ID NO :15 给出的序列或由该序列组成。

[0090] 应理解的是可,对本发明提供的抗体可变域和 / 或恒定域作出一个或多个氨基酸的取代、添加和 / 或缺失而不显著改变抗体结合 OX40 并中和 OX40 活性的能力。任何氨基酸取代、添加和 / 或缺失的影响可易于由本领域的技术人员检测,例如通过使用本文所述的方法,特别是实施例中所述方法以确定 OX40 结合情况和 OX40/OX40L 相互作用的阻断情况。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,抗体包含重链,其中所述重链包含与 SEQID NO :15 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。合适地,所述抗体包含重链,其中所述重链包含与 SEQ ID NO :15 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0092] 在一个实施方案中,本发明的抗体分子包含含有图 1(d), SEQ ID NO :11 给出的序列的轻链。

[0093] 在本发明的一个实施方案中,抗体包含轻链,其中所述轻链包含与 SEQID NO :11 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。例如,所述抗体包含轻链,其中所述轻链包含与 SEQ ID NO :11 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0094] 在一个实施方案中,本发明提供了一种抗体,其中重链包含 SEQ ID NO :15 给出的序列或由该序列组成,并且轻链包含 SEQ ID NO :11 给出的序列或由该序列组成。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含与 SEQ ID NO :15 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列,并且所述轻链包含与 SEQ ID NO :11 给出的序列具有至少 60% 同一性或相似性的序列。一般而言,所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含与 SEQ ID NO :15 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列,并且其中所述轻链包含与 SEQ ID NO :11 给出的序列具有至少 70%、80%、90%、95% 或 98% 同一性或相似性的序列。

[0096] 生物分子例如抗体或片段,包含酸性和 / 或碱性官能团,从而给予分子净正电荷或负电荷。总体“观察到的”电荷的量视实体的绝对氨基酸序列、3D 结构中带电基团的局部环境和分子的环境条件而定。等电点 (pI) 是特定分子或其溶剂可接近表面不携带净电荷时的 pH。在一个实施方案中,本公开内容的抗体或片段具有至少 7 的等电点 (pI)。在一个实施方案中,所述抗体或片段具有至少 8,例如 8.5、8.6、8.7、8.8 或 9 的等电点 (pI)。

[0097] 本发明的 OX40 抗体和片段已被改造成具有合适的等电点。这可导致抗体和 / 或片段具有更强大的性质,特别是合适的溶解度和 / 或稳定性质和 / 或改善的纯化特征。

[0098] 因此在一个方面,本发明提供了人源化 OX40 抗体,其改造成具有与最初鉴定的抗体 CA044_00026 不同的等电点。所述抗体可例如通过置换氨基酸残基来改造,例如用一种或多种碱性氨基酸残基置换酸性氨基酸残基。或者,可引入碱性氨基酸残基或可移除酸性氨基酸残基。或者,若分子具有不能接受的高 pI 值,可根据需要引入酸性残基以降低 pI。改造的抗体或片段的目标 pI 理想地可为例如 8 以上,例如 8.5 或 9。重要的是,当操作 pI 时,必须注意保持抗体或片段的所需活性。因此在一个实施方案中,改造的抗体或片段具有与“未修饰的”抗体或片段相同或基本相同的活性。

[0099] 可使用程序例如 *ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html 和

http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html 以预测抗体或片段的等电点。

[0100] 本发明还提供了被本发明提供的抗体结合的人 OX40 的特定区或表位,具体而言,所述抗体为包含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和 / 或轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体。

[0101] 人 OX40 多肽的特定区或表位可通过本领域已知的任何合适的表位作图法联合由本发明提供的任何一种抗体来鉴定。这类方法的实例包括针对与本发明抗体的结合筛选来源于 OX40 的不同长度的肽,其中可特异地结合抗体的最小片段包含被该抗体识别的表位的序列。所述 OX40 肽可合成制备或通过 OX40 多肽的蛋白水解消化制备。结合抗体的肽可通过例如质谱分析鉴定。在另一个实例中,核磁共振光谱或 X-射线晶体学可用于鉴定被本发明的抗体结合的表位。一旦鉴定,即可根据需要将结合本发明抗体的表位片段用作免疫原以得到结合相同原位的另外的拮抗性抗体。

[0102] 交叉阻断本发明抗体(具体而言,包含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体)结合的抗体,可类似地用于拮抗 OX40 的活性。因此,本发明还提供了对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其交叉阻断上述任何一种抗体与人 OX40 的结合和 / 或被被这些抗体中的任何一种交叉阻断结合 OX40。在一个实施方案中,这样的抗体结合与本文上述的抗体相同的表位。在另一个实施方案中,交叉阻断的中和抗体结合与被本文上述抗体结合的表位接界和 / 或重叠的表位。在另一个实施方案中,本发明的该方面中交叉阻断的中和抗体并不结合与本发明的抗体相同的表位或与所述表位的接界和 / 或重叠的表位。

[0103] 交叉阻断抗体可利用本领域的任何合适的方法鉴定,例如通过使用竞争 ELISA 测定或 BIAcore 测定,其中交叉阻断抗体与人 OX40 的结合阻止本发明抗体的结合,反之亦然。

[0104] 在一个实施方案中,提供对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体,其交叉阻断其重链包含序列 gH2(SEQ ID NO :9) 并且其轻链包含序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体与人 OX40 的结合。在一个实施方案中,由本发明提供的交叉阻断抗体抑制含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体的结合达大于 80%,例如达大于 85%,例如达大于 90%,特别地达大于 95%。

[0105] 备选地或另外地,本发明该方面的拮抗性抗体可被包含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体交叉阻断结合人 OX40。因此还提供对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体分子,其被包含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体交叉阻断结合人 OX40。在一个实施方案中,由本发明该方面提供的拮抗性抗体与人 OX40 的结合,被包含重链序列 gH2(SEQ ID NO :9) 和轻链序列 gL8(SEQ ID NO :7) 的抗体抑制达大于 80%,例如达大于 85%,例如达大于 90%,特别地达大于 95%。

[0106] 在一个实施方案中,由本发明提供的交叉阻断抗体是完全人的。在一个实施方案中,由本发明提供的交叉阻断抗体是人源化的。在一个实施方案中,由本发明提供的交叉阻断抗体对人 OX40 具有 100pM 或更好的亲和力。在一个实施方案中,由本发明提供的交叉阻断抗体对人 OX40 具有 50pM 或更好的亲和力。

[0107] 在一个实施方案中,所述交叉阻断抗体具有至少 7 的等电点,例如至少 8,例如 8.5、8.6、8.7、8.8、8.9 或 9.0。

[0108] 本发明的抗体分子合适地具有高的结合亲和力,具体而言皮摩尔级的。亲和力可

使用本领域已知的任何合适方法包括如本文的实施例中所述的 BIAcore, 利用分离的天然或重组 OX40 或合适的融合蛋白 / 多肽来测量。在一个实例中, 亲和力利用本文实施例中所述的重组人 OX40 的胞外域来测量。在一个实例中, 使用的重组人 OX40 胞外域是二聚体, 例如 Fc 融合二聚体。合适地, 本发明的抗体分子对分离的人 OX40 具有约 200pM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 本发明的抗体分子具有约 100pM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 本发明的抗体分子具有约 50pM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 本发明的抗体分子具有约 40pM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 本发明的抗体分子具有约 30pM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 本发明的抗体分子为完全人的或人源化的并且具有约 100pM 或更好的结合亲和力。

[0109] 本发明的抗体分子合适地对活化 T 细胞的表面上表达的人 OX40 具有高结合亲和力, 例如纳摩尔级或皮摩尔级的亲和力。亲和力可利用本领域已知的任何合适方法 (包括本文实施例中所述的的方法) 利用活化的 CD4⁺OX40⁺ 人 T 细胞来测量。具体而言, 本发明的抗体分子对细胞表面表达的人 OX40 具有约 2nM 或更好的结合亲和力。在一个实例中, 本发明的抗体分子对细胞表面表达的人 OX40 具有约 1.5nM 或更好的结合亲和力。在另一个实例中, 本发明的抗体分子对细胞表面表达的人 OX40 具有约 1.2nM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中, 提供对人细胞表面表达的 OX40 具有约 2nM 或更好的结合亲和力的完全人或人源化抗体分子。

[0110] 应理解的是, 由本发明提供的抗体的亲和力可利用本领域已知的任何合适的方法改变。因此, 本发明还涉及本发明的抗体分子的变体, 其对 OX40 具有提高的亲和力。这样的变体可通过许多亲和力成熟方案得到, 包括 CDR 突变 (Yang 等, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、链改组 (Marks 等, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、大肠杆菌增变菌株的使用 (Low 等, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996)、DNA 改组 (DNA shuffling) (Patten 等, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示 (Thompson 等, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) 和有性 PCR (Cramer 等, Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等 (见上文) 讨论了亲和力成熟的这些方法。

[0111] 在一个实施方案中, 本发明的抗体分子阻断 OX40 和 OX40L 之间的相互作用。适用于确定抗体阻断该相互作用的能力的许多测定描述于本文的实施例中。在一个实施方案中, 本发明提供对人 OX40 具有特异性的中和抗体, 其能够在低于 5nM 的浓度下抑制人 OX40L (以终浓度为 2 μ g/ml 检测) 与活化人 CD4+OX40+T 细胞结合达 50%。在一个实施方案中, 用于所述测定的人 OX40L 为天然人 OX40。在一个实施方案中, 用于所述测定的人 OX40 为重组人 OX40。在一个实施方案中, 所述中和抗体为人源化或完全人抗体。

[0112] 若需要的话, 本发明所用抗体可与一个或多个效应分子缀合。应认识到的是, 所述效应分子可包括单个效应分子或者两个或更多个如此连接的这类分子以形成可与本发明的抗体连接的单个部分。当需要得到与效应分子连接的抗体片段时, 这可通过标准的化学或重组 DNA 方法制备, 其中所述抗体片段直接或经由偶联剂与效应分子连接。用于将这样的效应分子缀合至抗体的技术为本领域所熟知 (参见 Hellstrom 等, Controlled Drug Delivery, 第 2 版, Robinson 等编辑., 1987, 第 623-53 页; Thorpe 等, 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 和 Dubowchik 等, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123)。具体的化学方法包括例如描述于 WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476 和

W003031581 中的那些。或者,当效应分子为蛋白或多肽时,连接可利用重组 DNA 方法实现,例如如 WO 86/01533 和 EP0392745 中所述。

[0113] 本文所用术语效应分子包括例如抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白例如酶、其它的抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段例如 DNA、RNA 及其片段、放射性核素、特别是放射性碘、放射性同位素、螯合金属、纳米粒子和报道基团例如荧光化合物或可通过 NMR 或 ESR 光谱检测的化合物。

[0114] 效应分子的实例可包括细胞毒素或细胞毒素剂,包括对细胞有害的(例如杀死细胞)的任何物质。实例包括考布他汀(combrestatin)、海兔毒素、埃博霉素、星形孢菌素、美登木素生物碱、海绵抑制素、根瘤菌素(rhizoxin)、软海绵素(halichondrins)、杆孢菌素(roridin)、哈密特林(hemiasterlin)、紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素(colchicin)、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素(puromycin)及其类似物或同系物。

[0115] 效应分子还包括但不限于:抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(decarbazine))、烷化剂(例如氮芥、塞替派(thioepa)苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素 C 和顺二氯二氨合铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如柔红霉素(原先的道诺霉素)和多柔比星),抗生素(例如更生霉素(原先的放线菌素)、博来霉素、光神霉素、安曲霉素(AMC)、刺孢霉素或 duocarmycins)以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0116] 其它的效应分子可包括螯合的放射性核素,例如 ^{111}In 和 ^{90}Y 、 Lu^{177} 、铋 213 、镅 252 、铱 192 和钨 188 /铈 188 ;或药物例如但不限于:烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶 I 抑制剂、紫杉烷和苏拉明。其它的效应分子包括蛋白、肽和酶。目标酶包括但不限于:蛋白水解酶、水解酶、裂解酶、异构酶、转移酶。目标蛋白、目标多肽和目标肽包括但不限于:免疫球蛋白、毒素例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素,蛋白例如胰岛素、肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原激活物、血栓生成剂或抗血管生成剂,例如制管张素(angiostatin)或内皮抑制素,或者,生物反应修饰剂例如淋巴因子、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、神经生长因子(NGF)或其它的生长因子和免疫球蛋白。

[0117] 其它的效应分子可包括可用于例如诊断的可检测物质。可检测物质的实例包括:各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性核素、正电子发射金属(用于正电子成像术)和非放射性顺磁金属离子。通常参见美国专利第 4,741,900 号关于可与抗体缀合用作诊断剂的金属离子。合适的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基包括链霉亲和素、亲和素和生物素;合适的荧光物质包括伞形花内酯、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白;合适的发光物质包括鲁米诺;合适的生物发光物质包括萤光素酶、萤光素和水母素;合适的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 ^{99}Tc 。

[0118] 在另一个实例中,效应分子可增加抗体的体内半衰期,和/或减少抗体的免疫原性和/或提高抗体跨过上皮屏障递送进入免疫系统。这类型的合适效应分子的实例包括:聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,例如 W005/117984 中所述的那些。

[0119] 当效应分子为聚合物时,其可通常为合成或天然存在的聚合物,例如任选取代的直链或带支链的聚亚烷基 (polyalkylene)、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物或者带支链或不带支链的多糖,例如同多糖或杂多糖。

[0120] 可存在于上述合成聚合物的上特定的任选取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基。

[0121] 合成聚合物的特定实例包括任选取代的直链或带支链的聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚(乙稀醇)或其衍生物,特别是任选取代的聚(乙二醇)例如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0122] 具体的天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。

[0123] 本文所用“衍生物”意指包括反应衍生物,例如硫醇选择性反应基团,例如马来酰亚胺等。所述反应基团可直接与聚合物连接或经由接头区段与聚合物连接。应理解的是,这样的基团的残基在一些实例中作为在抗体片段和聚合物之间的连接基团形成产物的一部分。

[0124] 聚合物的大小可根据需要变化,但通常平均分子量范围在 500Da-50000Da,例如 5000Da-40000Da,例如 20000-40000Da。具体而言,所述聚合物大小可根据产物的预期用途来选择,例如定位于某些组织例如肿瘤的能力或延长循环中的半衰期的能力(关于综述,参见 Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545)。因此,例如,当产物旨在离开循环和穿透组织,例如用于肿瘤的治疗,可能有利的是使用小分子量的聚合物,例如分子量在 5000Da 左右的聚合物。对于其中产物保留在循环中的应用而言,可能有利的是利用较高分子量的聚合物,例如具有分子量范围在 20000Da-40000Da 的聚合物。

[0125] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚(乙二醇)或特别的甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物,并且特别是其中分子量范围在约 15000Da-约 40000Da。

[0126] 在一个实例中,本发明所用抗体连接了聚(乙二醇)(PEG)部分。在一个具体的实例中,所述抗体为抗体片段,并且 PEG 部分可经由位于抗体片段上的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任何游离的氨基、亚胺基、巯基、羟基或羧基)连接。这样的氨基酸可天然存在于抗体片段中或可利用重组 DNA 方法改造至片段中(参见例如 US 5, 219, 996 ;US 5, 667, 425 ;W098/25971)。在一个实例中,本发明的抗体分子是修饰的 Fab 片段,其中修饰是在其重链的 C 末端添加一个或多个氨基酸以允许效应分子的连接。合适地,另外的氨基酸形成修饰的绞链区,其包含可与效应分子连接的一个或多个半胱氨酸残基。可利用多个位点连接两个以上的 PEG 分子。

[0127] 合适地,PEG 分子经由位于抗体片段上的至少一个半胱氨酸残基的硫醇基共价连接。连接至修饰的抗体片段的各个聚合物分子可共价连接至位于该片段上的半胱氨酸残基的硫原子上。共价键通常为二硫键,或者特别地,硫-碳键。当硫醇基用作连接点时,可使用合适的活化的效应分子,例如硫醇选择性衍生物例如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。活化的聚合物可用作如上所述的聚合物-修饰抗体片段制备中的原料。所述活化的聚合物可为含硫醇反应基的任何聚合物,所述硫醇反应基为例如 α -卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺、酰

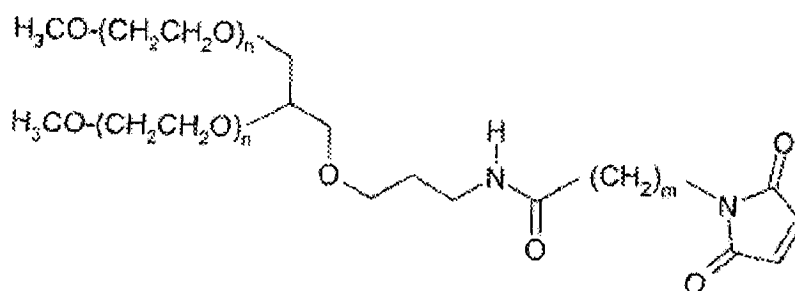
亚胺例如马来酰亚胺、乙烯基砜或二硫化物。这样的原料可市购得到（例如购自 Nektar, 原来的 Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA）或可利用传统的化学方法制备自市售的原料。具体的 PEG 分子包括 20K 甲氧基-PEG-胺（可购自 Nektar, 原来的 Shearwater; Rapp Polymere 和 SunBio）和 M-PEG-SPA（可购自 Nektar, 原来的 Shearwater）。

[0128] 在一个实施方案中, 抗体为修饰的 Fab 片段或 diFab, 其为聚乙二醇化的, 即具有与其共价连接的 PEG (聚(乙二醇)), 例如依据 EP 0948544 或 EP 1090037 中公开的方法 [还参见 "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (编辑), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris 和 S. Zalipsky (编辑), American Chemical Society, Washington DC 和 "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam 和 A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]。在一个实例中, PEG 连接绞链区的半胱氨酸。在一个实例中, PEG 修饰的 Fab 片段具有与修饰的绞链区中的单个硫醇基共价连接的马来酰亚胺基团。赖氨酸残基可共价连接至马来酰亚胺基团并且赖氨酸残基上的各个胺基可连接分子量为约 20,000Da 的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此连接在 Fab 片段上的 PEG 的总分子量可为约 40,000Da。

[0129] 在一个实施方案中, 本发明提供了对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体分子, 其为修饰的 Fab 片段, 该片段具有包含 SEQ ID NO:9 给出的序列的重链和包含 SEQ ID NO:7 给出的序列的轻链, 并且在其重链的 C 末端具有包含与效应分子连接的至少一个半胱氨酸残基的修饰绞链区。合适地, 所述效应分子为 PEG 并且利用 W098/25971 和 W02004072116 或 W02007/003898 中所述方法连接。合适地, 所述效应分子以这样的方式连接, 所述方式使得赖氨酸-马来酰亚胺基团连接重链的 C 末端的半胱氨酸残基, 并且赖氨酸残基的各个胺基具有与其共价连接的分子量为约 20,000Da 的甲氧基聚(乙二醇)残基。因此连接抗体的 PEG 的总分子量为约 40,000Da。具体的 PEG 分子包括 N, N'-双(甲氧基聚(乙二醇)MW 20,000)修饰赖氨酸的 2-[3-(N-马来酰亚胺)丙酰胺基]乙基酰胺, 也被称为 PEG2MAL40K (可购自 Nektar, 原来的 Shearwater)。

[0130] PEG 接头的备选来源包括 NOF, 其提供 GL2-400MA2 (其中 m 在以下结构中为 5) 和 GL2-400MA (其中 m 为 2) 并且 n 为约 450:

[0131]

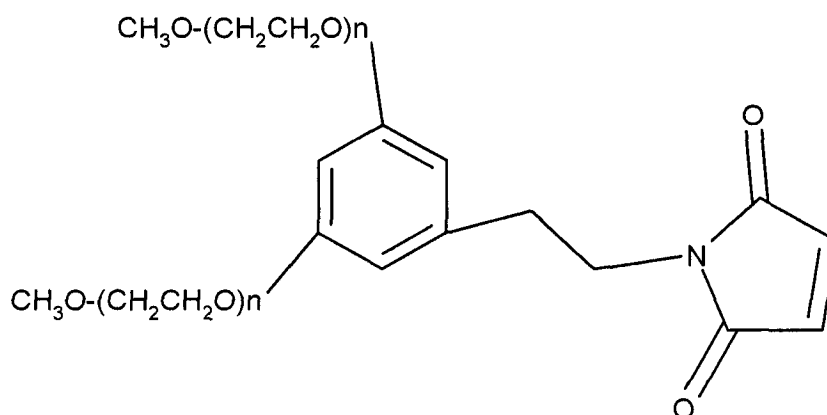


M 为 2 或 5

[0132] 换言之, 各个 PEG 为约 20,000Da。

[0133] 以下类型的另外备选的 PEG 效应分子可购自 Dr Reddy、NOF 和 Jenkem:

[0134]



[0135] 在一个实施方案中,提供聚乙二醇化的(例如用本文所述的 PEG)抗体,聚乙二醇经由链的第 226 或约 226 位氨基酸例如重链的第 226 位氨基酸(通过顺序编号)的半胱氨酸氨基酸残基连接。

[0136] 在一个实施方案中,本发明提供了对人 OX40 具有特异性的拮抗性抗体分子,其为修饰的 Fab 片段,该片段具有包含 SEQ ID NO:15 给出的序列或由该序列组成的重链和包含 SEQ ID NO:11 给出的序列或由该序列组成的轻链,并且具有与所述重链的 226 位(根据 SEQ ID NO:15 的线性编号)上的半胱氨酸连接的效应分子。合适地,所述效应分子为 PEG 并且利用 W098/25971 和 W02004072116 或 W02007/003898 中所述方法连接,并且赖氨酸-马来酰亚胺基团连接在重链(SEQ ID NO:15)的第 226 位的半胱氨酸残基上,并且赖氨酸残基的各个氨基具有与其共价连接的分子量为约 20,000Da 的甲氧基聚(乙二醇)残基。因此与抗体连接的 PEG 的总分子量为约 40,000Da。具体的 PEG 分子包括 N,N'-双(甲氧基聚(乙二醇)MW 20,000)修饰赖氨酸的 2-[3-(N-马来酰亚胺)丙酰胺基]乙基酰胺,也被称为 PEG2MAL40K(可购自 Nektar,原来的 Shearwater)。合适地,本发明的抗体分子是如图 2 所示的聚乙二醇化的修饰 Fab' 片段。所述聚乙二醇化分子在本文被称作 A26Fab' PEG。

[0137] 在另一个实例中,效应分子可利用申请 W02005/003169、W02005/003170 和 W02005/003171 中所述方法与抗体片段连接。

[0138] 本发明还提供了编码本发明抗体分子的一条或多条重链和/或轻链的分离的 DNA 序列。合适地,所述 DNA 序列编码本发明抗体分子的重链或轻链。本发明的 DNA 序列可包括例如通过化学方法制备的合成 DNA、cDNA、基因组 DNA 或其任何组合。编码本发明的抗体分子的 DNA 序列可通过本领域技术人员熟知的方法得到。例如,编码一部分或完全的抗体重链和轻链的 DNA 序列可根据需要自确定的 DNA 序列或基于相应的氨基酸序列合成。

[0139] 编码受体框架序列的 DNA 对于本领域的技术人员而言为广泛可得的并且可易于基于其已知的氨基酸序列合成。

[0140] 分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明的抗体分子的 DNA 序列。所需的 DNA 序列可完全或部分利用寡核苷酸合成技术合成。适当时可利用定向诱变和聚合酶链式反应(PCR)技术。

[0141] 合适的序列的实例提供于:图 1(h)SEQ ID NO:8;图 1(i)SEQ ID NO:10;图 1(j)SEQ ID NO:13;图 1(k)SEQ ID NO:14;图 1(l)SEQ ID NO:17 和图 1(m)SEQ ID NO:18。SEQ ID NO 18 中的核苷酸 1-63 和 SEQ ID NO:14 中的核苷酸 1-63 编码信号肽序列 OmpA,将其

切割得到本发明的拮抗性抗体分子（信号肽分别对应于图 1(g)SEQ ID NO:16 的氨基酸残基 1-21 和图 1(e)SEQ ID NO:12 的氨基酸残基 1-21）。本发明还提供编码包含 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18 的本发明抗体重链的分离的 DNA 序列。本发明还提供编码包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:14 的本发明抗体轻链的分离的 DNA 序列。

[0142] 本发明还涉及包含本发明的一个或多个 DNA 序列的克隆载体或表达载体。因此，提供了包含编码本发明抗体的一个或多个 DNA 序列的克隆载体或表达载体。合适地，所述克隆载体或表达载体包含两个 DNA 序列，分别编码本发明的抗体分子的轻链和重链。合适地，本发明的载体包含 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:18 给出的序列。SEQ ID NO 18 中的核苷酸 1-63 和 SEQ ID NO 14 中的核苷酸 1-63 编码 OmpA 的信号肽序列（分别为 SEQ ID NO:16 的残基 1-21 和 SEQ ID NO:12 的残基 1-21），其最适合被切割以得到本发明的中和抗体分子。在一个实例中，所述载体包含重链和轻链之间的基因间序列，例如 IGS2（参见 W003/048208）。因此，在一个实施方案中，本发明的载体包含图 1(n) (SEQ ID NO:19) 给出的序列。

[0143] 可构建载体的一般方法、转染方法和培养方法为本领域的技术人员熟知。在该方面，参考“Current Protocols in Molecular Biology”，1999，F. M. Ausubel（编辑），Wiley Interscience, New York 和由 Cold Spring Harbor 出版的 Maniatis Manual。

[0144] 还提供包含含有编码本发明抗体的一个或多个 DNA 序列的一个或多个克隆载体或表达载体的宿主细胞。任何合适的宿主细胞 / 载体系统可用于表达编码本发明的抗体分子的 DNA 序列。可使用细菌例如大肠杆菌和其它微生物系统，或还可使用真核例如哺乳动物宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0145] 本发明还提供用于制备本发明的抗体分子的方法，所述方法包括将含有本发明载体的宿主细胞在适于导致编码本发明抗体分子的 DNA 表达蛋白的条件下培养，和分离所述抗体分子。

[0146] 所述抗体分子可仅包含重链多肽或轻链多肽，在这种情况下仅重链或轻链多肽的编码序列需要用于转染宿主细胞。对于制备包含重链和轻链两者的产物，细胞系可用两种载体转染，这两种载体即编码轻链多肽的第一载体和编码重链多肽的第二载体。或者，可使用单一载体，所述载体包含编码轻链多肽和重链多肽的序列。

[0147] 本公开内容的抗体和片段以良好水平自宿主细胞中表达。因此，抗体和 / 或片段的性质被优化并有助于商业加工。

[0148] 由于本发明的抗体可用于治疗和 / 或预防病理性病况，所以本发明还提供包含本发明抗体分子以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的药物组合物或诊断组合物。因此，提供本发明的抗体在制备药物中的用途。所述组合物通常作为通常包含药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的辅药。

[0149] 本发明还提供用于制备药物组合物或诊断组合物的方法，所述方法包括将本发明的抗体分子加入一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体并混合。

[0150] 所述抗体分子可为药物组合物或诊断组合物中唯一的活性成分或者可伴随其它的活性成分，包括其它的抗体成分例如抗 TNF、抗 IL-1 β 、抗 T 细胞、抗 IFN γ 或抗 LPS 的抗体，或非抗体成分例如黄嘌呤。其它合适的活性成分包括能够诱导耐受性的抗体，例如抗

CD3 抗体或抗 CD4 抗体。

[0151] 在另一个实施方案中,本公开内容的抗体、片段或组合物与另外的药用活性剂联用,所述药用活性剂为例如皮质类固醇(例如丙酸氟替卡松(fluticasone propionate))和/或 β -2-激动剂(例如沙丁胺醇、沙美特罗或福莫特罗)或细胞生长和增殖的抑制剂(例如雷帕霉素、环磷酰胺(cyclophosphamide)、甲氨蝶呤)或备选的 CD28 和/或 CD40 抑制剂。在一个实施方案中,所述抑制剂是小分子。在另一个实施方案中,所述抑制剂是对靶标特异的抗体。

[0152] 药物组合物合适地包含治疗有效量的本发明的抗体。本文所用术语“治疗有效量”是指对治疗、缓解或预防目标疾病或病况所需的治疗剂的量或对表现出可检测的治疗效果或预防效果所需的治疗剂的量。对于任何抗体,治疗有效量可首先在细胞培养测定或在动物模型中,通常在啮齿类动物、兔、狗、猪或灵长类中估计。动物模型还可用于确定给药的合适浓度范围和途径。于是,这样的信息可用于确定可用于人中的给药剂量和途径。

[0153] 人受试者的精确治疗有效量视疾病状况的严重性、受试者的一般健康状况、受试者的年龄、体重和性别、饮食、给药时间和给药频率、一种或多种药物组合、反应灵敏度和对治疗的耐受/应答而定。该量可通过常规的实验确定并且在临床医生的判断范围内。通常,治疗有效量在 0.01mg/kg-50mg/kg,例如 0.1mg/kg-20mg/kg。药物组合物通常可以以每剂含预定量的本发明活性剂的单位剂量形式呈现。

[0154] 组合物可单独给予患者或者可与其它物质、药物或激素联合(例如同时、贯序或分别)给予。

[0155] 本发明的抗体分子给予的剂量取决于待治疗病况的性质、存在的炎症的程度以及抗体分子是否被预防地使用或用于治疗已存在的病况。

[0156] 剂量的频率视抗体分子的半衰期和其作用的持续时间而定。若抗体分子具有短的半衰期(例如 2-10 小时),则其可能需要每天给予一个或多个剂量。或者,若抗体分子具有长的半衰期(例如 2-15 天),则其可能仅需每天给予一次剂量、每周一次或甚至每 1-2 个月一次。

[0157] 药学上可接受的载体本身不应诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体并且不应有毒。合适的载体应为大的、代谢缓慢的大分子,例如蛋白、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物和失活的病毒颗粒。

[0158] 可使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐,或者有机酸盐,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐。

[0159] 治疗组合物中的药学上可接受载体还可包含液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。另外,辅助物质例如润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲物质,可存在于这样的组合物中。这些载体使药物组合物能够配制为片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊、液体制剂、凝胶剂、糖浆、浆液和混悬剂,用于被患者消化。

[0160] 用于给药的合适形式包括适于胃肠外给药的形式,例如通过注射或输注,例如通过弹丸注射或持续输注。当产品用于注射或输注时,其可采取在含油或含水的载体中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式,并且其可含有配制剂(formulatory agent),例如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,所述抗体分子可呈干燥的形式,用于使用前用合适的无菌液体重构。

[0161] 一旦配制,本发明的组合物即可直接给予受试者。待治疗的受试者可为动物。然而,在一个或多个实施方案中,组合物适合给予人受试者。

[0162] 合适地,在本公开内容的制剂中,最终制剂的 pH 不同于抗体或片段的等电点的值,例如若制剂的 pH 是 7,则 pI 为 8-9 或更高可为合适的。尽管不希望受理论所约束,但据认为这可最终提供具有提高的稳定性的终制剂,例如抗体或片段保持在溶液中。

[0163] 在一个实施方案中,pH 范围在 4.0-7.0 的药物制剂,包含:1-200mg/mL 的本公开内容抗体、1-100mM 的缓冲液、0.001-1% 的表面活性剂、a) 10-500mM 的稳定剂,b) 10-500mM 的稳定剂和 5-500mM 的张度剂,或者 c) 5-500mM 的张度剂。

[0164] 例如,pH 约为 6 的制剂可包含 1-50mg/mL 的抗体、20mM L-组氨酸(histadine) HCl、240mM 海藻糖和 0.02% 聚山梨酯 20。或者 pH 约为 5.5 的制剂可包含 1-50mg/mL 抗体、20mM 柠檬酸盐缓冲液、240mM 海藻糖、20mM 精氨酸和 0.02% 聚山梨酯 20。

[0165] 本发明的药物组合物可通过许多途径给药,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、经皮(例如参见 W098/20734)、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、阴道内或直肠途径。皮下注射器也可用于给予本发明的药物组合物。典型地,所述治疗组合物可制备为注射液,即作为液体溶液剂或混悬剂。也可制备在注射前适于溶于或悬浮于液体载体中的固体形式。

[0166] 组合物的直接递送通常通过皮下注射、腹膜内注射、静脉内注射或肌内注射或者递送至组织的间质间隙来实现。组合物还可给予至病灶内。剂量治疗可为单剂量方案或多剂量方案。

[0167] 应理解的是,组合物中的活性成分为抗体分子。因此,其易于在胃肠道中降解。因此,若组合物待通过利用胃肠道的途径给予,则组合物需要含有以下物质,其保护抗体免受降解,但一旦其被胃肠道吸收就释放抗体。

[0168] 药学上可接收的载体的详细论述参见 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, N. J. 1991)。

[0169] 在一个实施方案中,制剂作为用于包括吸入在内的局部给药的制剂提供。

[0170] 合适的可吸入制剂包括可吸入散剂、含气体推进剂的计量气雾剂或不含气体推进剂的可吸入溶液剂。含活性物质的本公开内容的可吸入散剂可仅由上述活性物质或上述活性物质和生理学上可接受的赋形剂的混合物组成。

[0171] 这些可吸入散剂可包含单糖(例如葡萄糖或阿拉伯糖)、二糖(例如乳糖、蔗糖、麦芽糖)、寡聚糖和多糖(例如葡聚糖)、多元醇(例如山梨醇、甘露醇、木糖醇)、盐(例如氯化钠、碳酸钙)或这些彼此的混合物。适合使用单糖或二糖,使用乳糖或葡萄糖尤其但非唯一地,以其水合物的形式。

[0172] 用于肺中沉积的颗粒要求粒度小于 10 微米,例如 1-9 微米,例如 0.1-5 μm ,特别地 1-5 μm 。活性成分(例如抗体或片段)的粒度是首要重要的。

[0173] 可用于制备可吸入气雾剂的气体推进剂为本领域已知。合适的气体推进剂选自:烃,例如正丙烷、正丁烷或异丁烷,和卤代烃例如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷、环丙烷或环丁烷的氯化物和/或氟化衍生物。上述气体推进剂可单独使用或以其混合物使用。

[0174] 具体而言,合适的气体推进剂为选自以下的卤代烷烃衍生物: TG 11、TG 12、TG 134a 和 TG227。在上述卤代烃中, TG134a(1,1,1,2-四氟乙烷)和 TG227(1,1,1,2,3,3,3-七

氟丙烷)及其混合物是特别合适的。

[0175] 所述含气体推进剂的可吸入气雾剂还可含有其它成分,例如助溶剂、稳定剂、表面活性剂(表面活性物质)、抗氧化剂、润滑剂和用于调节 pH 的工具。所有这些成分为本领域已知。

[0176] 本发明的含气体推进剂的可吸入气雾剂可包含多至 5% 重量的活性物质。本发明的气雾剂包例如 0.002-5% 重量、0.01-3% 重量、0.015-2% 重量、0.1-2% 重量、0.5-2% 重量或 0.5-1% 重量的活性成分。

[0177] 或者肺局部给药还可通过液体溶液剂或混悬剂制剂给予,例如应用诸如喷雾器例如压缩器连接的喷雾器(例如与 Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va. 生产的 Pari Master(R) 压缩器连接的 Pari LC-Jet Plus(R) 喷雾器)等设备。

[0178] 本发明的抗体可分散于溶剂中例如以溶液剂或混悬剂的形式递送。其可悬浮于合适的生理溶液例如盐水或其它的药理学上可接受的溶剂或缓冲溶液。本领域已知的缓冲溶液每 1mL 水可包含 0.05mg-0.15mg 乙二胺四乙酸二钠、8.0mg-9.0mg NaCl、0.15mg-0.25mg 聚山梨酯、0.25mg-0.30mg 无水柠檬酸和 0.45mg-0.55mg 柠檬酸钠,使 pH 达到约 4.0-5.0。混悬剂可采用例如冻干抗体。

[0179] 治疗性混悬剂或溶液制剂还可含有一种或多种赋形剂。赋形剂为本领域熟知,包括缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、蛋白(例如血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨醇和甘油。溶液剂或混悬剂可包裹在脂质体或生物可降解微球内。制剂一般用无菌生产工艺以基本无菌的形式提供。

[0180] 这可包括如下制备和灭菌:通过用本领域普通技术人员熟悉的方法,过滤用于制剂(无菌的缓冲溶剂溶液中抗体的无菌混悬剂)的缓冲溶剂/缓冲溶液,并将该制剂分配至无菌容器中。

[0181] 可提供本公开内容的可雾化制剂,例如作为包装于箔包封中的单剂量单位(例如密封的塑料容器或塑料管)。各个小管在诸如 2mL 溶剂/溶液缓冲液等体积中包含单位剂量。

[0182] 本文公开的抗体可适用于经由雾化递送。

[0183] 还考虑的是,本发明的抗体可通过使用基因治疗给予。为了实现此目的,将在合适的 DNA 组分的控制下编码抗体分子的重链和轻链的 DNA 序列引入患者中,使得抗体链从 DNA 序列中表达出来并在原位装配。

[0184] 本发明还提供用于控制炎症性疾病(例如急性或慢性炎症性疾病)的抗体分子(或包含所述抗体分子的组合物)。合适地,抗体分子(或包含所述抗体分子的组合物)可用于减少炎症过程或预防炎症过程。在一个实施方案中,提供体内减少活化 T 细胞、特别是涉及不合适的炎症免疫应答的那些活化 T 细胞,例如募集到这类应答的附近/部位。

[0185] 如本文所用的活化 T 细胞的减少可为与治疗前或未治疗相比减少 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或更多百分比。有利地,用本发明的抗体、片段或组合物治疗可允许活化 T 细胞的水平降低,而不降低患者 T 细胞的一般水平(未活化 T 细胞)。这可导致较少的副作用,以及可能预防患者的 T 细胞贫化。

[0186] 本发明还提供了本发明的抗体分子用于治疗或预防由 OX40 介导或与 OX40 的水平

提高相关的病理性病症。所述病理性病症可例如选自：感染（病毒的、细菌的、真菌的和寄生虫的）、感染相关的内毒素休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎症性疾病、阿尔茨海默氏病、炎性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼病（Peyronie's Disease）、腹部疾病、胆囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、外科粘连、中风、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、免疫介导的中枢及外周神经系统的炎性病症例如多发性硬化、狼疮（例如系统性红斑狼疮）和格-巴综合症、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维化肺泡炎、格雷夫斯病（Grave's disease）、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、梅尼埃病（Meniere's disease）、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮症、韦格纳肉芽肿病（Wegener's granulomatosis）、其它的自身免疫性疾病、胰腺炎、外伤（手术）、移植物抗宿主病、移植排斥、心脏病包括缺血性疾病例如心肌梗死以及动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松症、骨关节炎、牙周炎和胃酸过少（hypochlorhydria）。

[0187] 在一个实施方案中，将本发明的抗体应用于治疗变态反应（allergy）、COPD、自身免疫性疾病或类风湿性关节炎。

[0188] 本发明还提供了本发明的抗体分子用于治疗或预防疼痛，特别是与炎症相关的疼痛。

[0189] 本发明还提供了本发明的抗体分子、片段或组合物在制备用于治疗或预防由 OX40 介导或与 OX40 的水平提高相关的病理性病症的药物中的用途，具体而言所述病理性病症为类风湿性关节炎、COPD。

[0190] 本发明还提供了本发明的抗体分子、片段或组合物在制备用于治疗或预防一种或多种本文所述的医学适应症的药物中的用途。

[0191] 本发明的抗体分子、片段或组合物可用于任何其中需要减少 OX40 在人或动物身体中的作用的治疗中。OX40 可在身体中循环或可以不需要的高水平集中位于身体的特定部位例如炎症部位。

[0192] 在一个实施方案中，将本发明的抗体分子或包含本发明抗体分子的组合物用于控制炎症性疾病，例如如本文所述的炎症性疾病。

[0193] 本发明还提供了治疗遭受由 OX40 介导的病症或处于由 OX40 介导的病症的风险的人或动物受试者的方法，所述方法包括给予所述受试者有效量的本发明抗体分子，或包含所述抗体分子的组合物。

[0194] 在一个实施方案中，提供纯化抗体（特别是本发明的抗体或片段）的方法，所述方法包括以下步骤：

[0195] 以非结合模式进行阴离子交换色谱法，使得杂质保留在柱上并将抗体洗脱。

[0196] 用于所述方法的合适的离子交换树脂包括 Q. FF 树脂（由 GE-Healthcare 提供）。所述步骤可例如在约 8 的 pH 下进行。

[0197] 所述方法还可包括最初的捕获步骤，其采用阳离子交换色谱，在约 4-5 例如 4.5 的 pH 下进行。所述阳离子交换色谱可例如采用诸如 CaptoS 树脂或 SP sepharose FF（由 GE-Healthcare 提供）等树脂。接着抗体或片段可利用离子盐溶液例如氯化钠（例如以 200mM 的浓度）从树脂上洗脱。

[0198] 因此，若合适的话，所述一个或多个色谱步骤可包括一个或多个洗涤步骤。

[0199] 纯化方法还可包括一个或多个过滤步骤，例如渗滤步骤。

[0200] 认为 pI 高于 8 (例如 8.5、8.6、8.7、8.8 或 9.0) 的抗体或片段有助于纯化以提供“不含”或“基本不含”杂质 (例如内毒素、DNA 和宿主细胞蛋白) 的抗体或片段。

[0201] 因此, 在一个实施方案中, 提供纯化的 OX40 抗体或片段, 例如人源化抗体或片段, 特别是本发明的抗体或片段, 以基本纯化的形式, 特别是不含或基本不含内毒素和 / 或宿主细胞蛋白或 DNA。

[0202] 上文所用的纯化形式意指至少 90 % 的纯度, 例如 91、92、93、94、95、96、97、98、99 % w/w 或更纯。

[0203] 基本不含内毒素一般意指每 mg 抗体产物的内毒素含量为 1EU 或更少, 例如每 mg 产物 0.5 或 0.1EU。

[0204] 基本不含宿主细胞蛋白或 DNA 一般意指每 mg 抗体产物的宿主细胞蛋白和 / 或 DNA 含量为 400 μ g 或更少, 例如 100 μ g/mg 或更少, 特别是若合适的话 20 μ g/mg。

[0205] 本发明的抗体分子还可用于诊断, 例如涉及 OX40 的疾病状态的体内诊断和成像。

[0206] 在本说明书的内容中包含意指包括。

[0207] 当技术上合适时, 本发明的实施方案可组合。

[0208] 实施方案在本文中描述为包含某些特征 / 要素。本公开内容还延伸至分开由或基本由所述特征 / 要素组成的实施方案。

[0209] 本发明在以下的实施例中通过仅仅阐述的方式进一步描述, 所述实施例是指附图, 其中:

实施例

[0210] 图 1 详述:

[0211] a) 抗体 A26 的轻链 V 区 (SEQ ID NO :7)

[0212] b) 抗体 A26 的重链 V 区 (SEQ ID NO :9)

[0213] c) 抗体 A26 的 CDRH1 (SEQ ID NO :1)、CDRH2 (SEQ ID NO :2)、CDRH3 (SEQ ID NO :3)、CDRL1 (SEQ ID NO :4)、CDRL2 (SEQ ID NO :5)、CDRL3 (SEQ ID NO :6), 抗体 CA044_00026 的 CDRH2 (SEQ ID NO :20) 和 CDRL1 (SEQ ID NO :21)。

[0214] d) 抗体 A26 的轻链 (SEQ ID NO :11)

[0215] e) 包含信号序列 (带下划线的) 的抗体 A26 的轻链 (SEQ ID NO :12)

[0216] f) 抗体 A26 的重链 (SEQ ID NO :15)

[0217] g) 包含信号序列 (带下划线的) 的抗体 A26 的重链 (SEQ ID NO :16)

[0218] h) 编码抗体 A26 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO :8)

[0219] i) 编码抗体 A26 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO :10)

[0220] j) 编码抗体 A26 的轻链的 DNA (SEQ ID NO :13)

[0221] k) 编码包含信号序列的抗体 A26 的轻链的 DNA (SEQ ID NO :14)

[0222] l) 编码抗体 A26 的重链的 DNA (SEQ ID NO :17)

[0223] m) 编码包含信号序列的抗体 A26 的重链的 DNA (SEQ ID NO :18)

[0224] n) 编码包含信号序列和基因间序列 IGS2 的抗体 A26 的重链和轻链的 DNA (SEQ ID NO :19)

[0225] DNA 操作及一般方法

[0226] 将大肠杆菌菌株 INV α F' (Invitrogen) 用于转化和常规的培养生长。DNA 的限制性内切酶和修饰酶获自 Roche Diagnostics Ltd. 和 New England Biolabs。质粒的制备利用 Maxi Plasmid 纯化试剂盒 (QIAGEN, 目录号 12165) 进行。DNA 测序反应利用 ABI Prism Big Dye 终止子测序试剂盒 (目录号 4304149) 进行并在 ABI 3100 自动序列分析仪 (Applied Biosystems) 上运行。数据使用程序 AutoAssembler (Applied Biosystems) 分析。寡核苷酸购自 Invitrogen。编码最初 V 区序列的基因由 Entelechon GmbH 设计和通过自动合成方法构建, 并通过寡核苷酸定向诱变修饰以得到移植的译本。Fab' 的浓度用 Fab' 组装 ELISA 确定。

[0227] 实施例 1: 中和抗 OX40 抗体 A26 的产生和人源化

[0228] 将雌性 Sprague Dawley 大鼠用人 OX40 和 mFC 的重组融合蛋白免疫接种。结合人 OX40 的抗体 CA044_00026 利用 W092/02551 中所述方法分离。分离抗体 CA044_00026 的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 的基因并在克隆后经由逆转录 PCR 测序。

[0229] 利用人 V- 区受体框架并通过改变框架区中供体残基的数目设计一系列人源化的 VL 区和 VH 区。设计两种移植的 VH 区 (gH1 和 2) 和 8 种移植的 VL 区 (gL1-8) 并通过寡核苷酸装配和 PCR 诱变建立基因。

[0230] 利用已亚克隆至大肠杆菌表达载体 pTTOD 的编码人源化可变域的基因, 针对各种移植物构建抗体 Fab' 片段, 所述载体含有编码人 C γ 1 重链 CH1 域 (G1m17 同种异型) 和人 C κ 轻链恒定域 (K1m3 同种异型) 的 DNA (如之前 W003/048208 中所述)。截短并修饰绞链区 (包括序列由 Cys-Pro-Pro-Cys 变成 Cys-Ala-Ala) 以得到可用于 PEG 部分的位点特异性连接的带单个半胱氨酸残基的绞链区 (参见实施例 2)。

[0231] 编码 OmpA 信号肽的序列与编码重链和轻链的基因的 5' 端连接。在表达时, 信号序列将各个多肽的转运定向于细菌周质。在通过细胞膜的易位后, 信号序列被切掉, 留下成熟的 Fab' 重链和轻链。

[0232] 将包含各移植物的 pTTOD 载体转化至宿主菌株大肠杆菌 K12 W3110 中, 并利用标准方法通过高细胞密度培养在大肠杆菌中制备抗体 Fab' 片段。利用标准方法运用阳离子交换和随后的阴离子交换色谱纯化抗体 (Humphreys 等, 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320)。

[0233] 将制备的各种 Fab' 片段在下文所述的结合和阻断中检测, 并将每一种根据其在 大肠杆菌中的表达情况、其相对于母体抗体的效价以及其对纯化和下游加工的适合情况进行评价。这导致被命名为 A26 的移植物 gL8gH2 的选择。该移植物的 V 区序列在图 1(a) 和图 1(b) 中示出, 即 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9 分别针对轻链 (gL2) 和重链 (gH2)。

[0234] 重链受体框架是人种系序列 VH3 1-3 3-07, 其带有来自人 JH- 区种系 JH4 的该部分的框架 4。轻链受体框架是人种系序列 VK1 2-1 1-02, 其带有来自人 JH- 区种系 JK4 的该部分的框架 4。SEQ ID NO:9 的重链中第 37、73、78 和 94 位 (Kabat 编号) 的氨基酸是供体残基 (来自母体抗体), 其被发现对保留完全的效价所必需。CDRH2 内的残基 64 从供体的谷氨酸转变为受体的赖氨酸 (E64K) 以得到具有更高 pI、更有利于离子交换纯化的分子。SEQ ID NO:7 的轻链中第 64 和 71 位 (Kabat 编号) 的氨基酸为供体残基, 其被发现对保留完全的效价所必需。CDR-L1 内的残基 27 和 28 从供体的谷氨酸和天冬氨酸转变为受体的谷氨酰胺 (E27Q) 和丝氨酸 (D28S) 以得到具有更高 pI、更有利于离子交换纯化的分子。

[0235] 该抗体的 CDR 在图 1(c) 中显示为未修饰的原始 CDRH2(SEQ ID NO:20) 和 CDRL1(SEQ ID NO:21)。全长的轻链和重链分别在图 1(d) 和 (f) 中示出。

[0236] gL8 和 gH2 基因在 DNA 水平上重新设计,使其含有针对在大肠杆菌中表达而优化的可变区和恒定区两者的密码子,并表达于如上所述的 pTTOD(Fab') 载体中。编码轻链和重链的 DNA 序列分别在图 1(k)SEQ ID NO:14 和图 1(m)SEQ ID NO:18 示出。

[0237] 该 Fab' (含恒定区) 的蛋白序列提供于 SEQ ID NO:11 和 12 (不含 OmpA 信号肽和含 OmpA 信号肽的轻链) 和 SEQ ID NO:15 和 16 (不含 OmpA 信号肽和含 OmpA 信号肽的重链)。pTTOD(A26 IGS2) 双顺反子表达载体包含图 1(n) 中提供的序列 (即 SEQ ID NO:19)。该序列包含在轻链基因和重链基因之间的基因内序列 IGS2 (参见 W003/048208) 以及轻链基因和重链基因两者起始处的 OmpA 前导序列。

[0238] 实施例 2 :A26Fab' -PEG 的制备

[0239] 如实施例 1 中所述在大肠杆菌中制备并纯化的 Fab' 片段 A26 依据 W02007/003898 中所述方法聚乙二醇化。

[0240] 将 PEG 连接在重链 (SEQ ID NO:15) 的第 226 位 (线性编号) 的绞链半胱氨酸上,使得赖氨酰-马来酰亚胺基团连接在重链 (SEQ ID NO:15) 的第 226 位的半胱氨酸残基上,并且赖氨酰残基的各个氨基具有与其共价连接的分子量约为 20,000Da 的甲氧基聚 (乙二醇) 残基。因此与抗体连接的 PEG 的总分子量约为 40,000Da,如图 2 所示。

[0241] 实施例 3 :A26 和 A26Fab' -PEG 对 OX40 亲和力的评价

[0242] BIAcore 技术实时监测生物分子之间的结合情况并且不需要标记。相互作用物之一,命名为配体,是直接固定于已固定的表面或捕获于已固定的表面,而另一个,命名为分析物,在捕获表面上的溶液中流动。传感器检测的是,随着分析物结合配体形成表面上的复合体导致的传感器表面上质量的变化。这与结合过程相对应。当分析物被缓冲液代替时,监测的是分析物从配体上解离的情况。在亲和力 BIAcore 测定中,配体是被检测的抗体而分析物为人 OX40。

[0243] 仪器:Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Sweden。

[0244] 传感器芯片:CM5 (研究级) 目录号:BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Sweden。芯片储存于 4℃。

[0245] 胺偶联试剂盒:目录号:BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Sweden

[0246] 乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)。用蒸馏水制备为 75mg/mL 并按 200 μL 等分储存于 -70℃。

[0247] N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)。用蒸馏水制备为 11.5mg/mL 并按 200 μL 等分储存于 -70℃。

[0248] 1M 乙醇胺盐酸盐 -NaOH pH 8.5。按 200 μL 等分储存于 -70℃。

[0249] 缓冲液:运行缓冲液:HBS-EP (为 0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%表面活性剂 P20)。目录号:BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Sweden。缓冲液储存于 4℃。

[0250] 固定化缓冲液:醋酸盐 5.0 (为 10mM 醋酸钠 pH 5.0)。目录号:BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Sweden。缓冲液储存于 4℃。

[0251] 配体捕获:Affinipure F(ab')₂ 片段山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 片段特异性的。Jackson

ImmunoResearch Inc(Pennsylvania,USA) 目录号:109-006-097。试剂储存于 4℃。

[0252] **配体**:抗体 A26 和 A26Fab' PEG,储存于 4℃。

[0253] **分析物**:与小鼠 IgG2a Fc(232aa) 融合的人 OX40 胞外 (185aa) 域。(0.5mg/ml, Ancell No 513-020 批号 142805),储存于 4℃。

[0254] **再生溶液**:通过用蒸馏水从 11.6M 的储液 (BDH, Poole, England. 目录号: 101254H) 稀释制得的 40mM HCl。

[0255] 5mM NaOH,通过用蒸馏水从 50mM 的储液稀释制得。目录号:BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Sweden。

[0256] **测定方法**:测定形式是通过固定化的抗人 F(ab')₂ 捕获抗体,然后在捕获表面上滴定人胞外域 OX40。操作的实例在以下给出:

[0257] BIA(生物分子相互作用分析 (Bimolecular Interaction Analysis)) 使用 BiAcCore 3000(BiAcCore AB) 进行。将 Affinipure F(ab')₂ 片段山羊抗人 IgG,F(ab')₂ 片段特异性的 (Jackson ImmunoResearch),经由胺偶联化学以约 4000 个反应单位 (RU) 的捕获水平固定于 CM5 传感器芯片上。HBS-EP 缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4、0.15M NaCl, 3mM EDTA、0.005% 表面活性剂 P20、BiAcCore AB) 用作流速为 10 μl/ 分的运行缓冲液。上样 10 μl 的 0.5 μg/mL 的 Fab' 或 50 μg/mL 的 Fab'-PEG 用于通过固定的抗人 IgG-F(ab')₂ 捕获。人 OX40 以不同浓度 (25nM-0.78nM) 以 30 μL/ 分的流速滴定经过捕获的抗体。通过以 10 μL/ 分的流速上样 10 μl 的 40mM HCl、接着上样 5 μL 的 5mM NaOH 来再生表面。

[0258] 本底扣除的结合曲线依照标准操作利用 BIAevaluation 软件 (3.2 版本) 分析。动力学参数根据拟合算法确定。

[0259] 对 A26 确定的亲和力值在 19-45.4pM 的范围内,而 A26Fab'-PEG 在 13.7-50.3pM 的范围内。

[0260] 下表显示了未聚乙二醇化的人源化 Fab 片段 A26 (fab*) 和 A26Fab'-PEG Fab 片段 (Fab-PEG**) 结合人 OX40 的重复数据:

[0261] 表 1

[0262]	样品	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
	Fab*	4.86 ± 1.6 E+05	1.29 ± 0.07 E-05	2.96E-11	29.6
	Fab-PEG**	4.76 ± 2.1 E+05	1.30 ± 0.46 E-05	3.13E-11	31.3

[0263] *5 次测定的平均值,**4 次测定的平均值

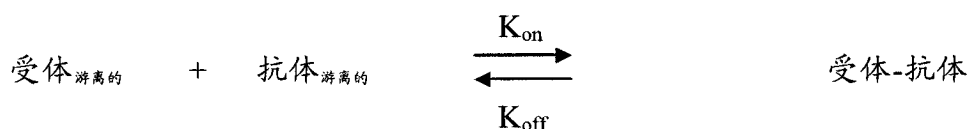
[0264] 实施例 3a :A26Fab'-PEG 的基于细胞的亲和力和配体阻断的能力

[0265] 基于细胞的亲和力

[0266] 为了确定 A26Fab'-PEG 对细胞表面表达的抗原的亲和力,使用活化的 CD4⁺OX40⁺T 细胞和 FITC 标记的抗体进行饱和结合实验。将在一定配体浓度范围之内平衡时抗体与受体的特异性结合,用于确定 K_D,假定在结合曲线的任何点上仅非常小部分的抗体与受体结合。

[0267] 平衡结合利用以下等式描述:

[0268]



[0269] 抗体与受体的结合速率 = $k_{\text{on}} \times [\text{受体}_{\text{游离的}}] \times [\text{抗体}_{\text{游离的}}]$

[0270] 受体-抗体复合体的解离速率 = $k_{\text{off}} \times [\text{受体-抗体}]$

[0271] 平衡时, 结合速率与解离速率相等并且等式可导出, 其描述结合等温线; 在半对数图上结合是 S 形的。 K_D 由 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 定义并且可根据结合曲线计算为出现半数最大结合时的浓度。

[0272] FITC 标记的 A26Fab'-PEG 与活化的人 CD4⁺OX40⁺T 细胞的结合通过流式细胞术跨越 4-log 浓度范围来测量。A26Fab'-PEG 的代表性结合曲线在图 3 中示出。从 3 名不同的供体的活化细胞上得到的 K_D 值为 1.193nM、1.071nM 和 1.055nM。

[0273] A26Fab'-PEG 的基于细胞的 K_D (平均 1.106nM) 明显弱于通过 BIAcore 测量的与重组 OX40 的结合 (31.3pM)。这可能是由于多种因素。A26Fab'-PEG 可对以二聚体 Fc 融合蛋白表达的重组 OX40 具有更高的亲和力, 该重组 OX40 与天然的细胞表面表达的 OX40 具有不同的三级结构和四级结构, 预测天然的细胞表面表达的 OX40 结合为细胞膜中的非共价三聚体 (Chan 等, 2000)。此外, 亲和力可因重组的 OX40 相比于天然的 OX40 的差异糖基化而改变。细胞膜的 3- 维环境例如膜卷曲和共定位蛋白也可提供空间位阻, 限制了 OX40 对 A26Fab'-PEG 的可接近性。因此, 基于细胞的亲和力很可能表示体内真实药物亲和力的更接近衡量。

[0274] 方法: A26Fab'-PEG 与人活化的 CD4⁺OX40⁺T 细胞的结合。将 PBMC 通过在 Ficoll 梯度上的分离而分离并用 1 μ g/mL PHA-L 在 37°C, 5% CO₂, 100% 湿度下活化 3 天。将 CD4⁺T 细胞通过利用磁珠 (人的 CD4⁺T 细胞分离试剂盒 II; Miltenyi Biotec) 阴选来分离。将约 1.2x 10⁵ 个细胞在抗体存在的情况下 (终浓度范围 10 μ g/mL-0.0006 μ g/mL (111nM-0.0068nM)) 在冰上孵育 2 小时。将细胞洗涤, 然后用 FACScalibur (Becton Dickinson) 通过流式细胞术分析。得到两条滴定曲线, 一条用 A26Fab'-PEG 而第二条用 gA33 Fab'-PEG 作为非特异性结合对照。将线性回归分析用于减去非特异性结合, 由此得到的特异性结合曲线通过非线性回归 (Graphpad Prism®) 分析以确定 K_D 。

[0275] 实施例 3b: 配体阻断能力

[0276] A26Fab'-PEG 阻断细胞表面表达的 OX40 和重组 OX40L 之间相互作用的能力利用基于流式细胞术的配体阻断测定来测量。简而言之, 活化的人 CD4⁺OX40⁺T 细胞用 A26Fab'-PEG 的滴定溶液预温育。随后将重组 OX40L 加入细胞并使其在 A26 Fab'-PEG 存在的情况下结合。然后结合的 OX40L 的比例通过流式细胞术利用标记的第二试剂检测。图 4 显示了代表性抑制曲线并证明了 A26Fab'-PEG 能够完全阻断 OX40L 结合。抑制重组 OX40L 结合的平均 IC₅₀ 为 4.1nM (n = 2 名供体)。

[0277] 方法: OX40L 与人活化的 CD4⁺OX40⁺T 细胞的结合被 A26Fab'-PEG 的抑制。将 PBMC 通过在 Ficoll 梯度上的分离而分离并用 1 μ g/mL PHA-L 在 37°C, 5% CO₂, 100% 湿度下活化 3 天。将 2.5x 10⁵ 个细胞在抗体存在的情况下 (终浓度范围 20 μ g/mL-0.0003 μ g/mL (229nM-0.0035nM)) 在冰上孵育 10 分钟。加入终浓度为 2 μ g/mL 的 OX40L (生物素化的 CD252muCD8, Ance11) 并在冰上再温育 30 分钟。洗涤细胞, 通过与 PE 标记的链霉亲和素

(Jackson Immunoresearch) 温育, 然后使用 FACScalibur (Becton Dickinson) 通过流式细胞术分析来检测 OX40L 结合。将 gA33Fab'-PEG 用作非特异性对照。抑制曲线通过非线性回归 (Graphpad Prism®) 分析以确定 IC₅₀。所示数据来自两名代表性供体之一。

[0278] 实施例 4 : 人功能性测定中 A26Fab'-PEG 的效价

[0279] 为了评价在细胞相互作用中 A26Fab'-PEG 阻断内源性 OX40-OX40L 结合的效价, 在一定范围的抗原驱动的人 T 细胞应答内测试 A26Fab'-PEG。

[0280] 实施例 4a : 混合淋巴细胞反应

[0281] 最初开发于 1964 年 (Bach 等, 1964, Science 143, 813-814) 的同种异体混合淋巴细胞反应 (MLR), 是利用两名不相关供体的全外周血单核细胞 (PBMC) 的同种异体反应性 T 细胞活化和增殖的体外模型 (O' Flaherty 等, 2000, Immunology, 100, 289-299)。供体 T 细胞经由识别不相关供体刺激者 PBMC 上的同种异体主要组织相容性复合体 (MHC) 抗原而活化, 导致细胞增殖和细胞因子产生 (Lukacs 等, 1993, Am J Pathology, 143, 1179-1188)。T 淋巴细胞的同种异体反应已显示通过同种异体的 MHC 抗原和结合的肽两者驱动 (Sherman 等, 1993, Annu. Rev. Immunol, 11, 385-402), 提示 MLR 反应可针对刺激者同种异体 MHC 抗原和结合的肽两者。MLR 反应的强度与应答者-刺激者对之间的 MHC 错配的程度相关 (Forrester 等, 2004, Corneal Transplantation : An Immunological Guide to the Clinical Problem, Imperial College Press, 66-67)。MLR 反应导致反应供体细胞增殖以及 T_H1 (IL-2、IFN- γ 和 TNF- α) 和 T_H2 (IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13) T 细胞衍生细胞因子的产生。MLR 中精确的细胞因子谱被认为对应答者-刺激者配对是特异性的 (Jordan 等, 2002, J. Immunol. Methods, 260, 1-14)。MLR 测定已广泛用于研究中, 以研究 T 细胞活化通路和筛选免疫抑制药物, 以及在临床情况下用于评价获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 患者的免疫功能并预测移植受体可能的供体器官排斥 (Bromelow 等, 2001, J. Immunol. Methods, 247, 1-8)。

[0282] A26Fab'-PEG 对体内人同种异体反应性 T 细胞活化和增殖的作用, 利用大致上如 O' Flaherty 等, 2000 所述的 MLR 测定研究。两名不相关供体的 PBMC 在存在和不存在 A26Fab'-PEG 的情况下共培养并通过 ³H- 胸苷掺入测量细胞增殖。如图 5 所示, A26Fab'-PEG 以剂量依赖的方式抑制 T 细胞增殖, 其中 IC₅₀ 值为 2.149nM (0.1877 μ g/mL), 最大抑制率为 57%。将人 MLR 的上清液在 Meso Scale Discovery (MSD) 人细胞因子测定中分析以调查 A26Fab'-PEG 对细胞因子的产生的作用。A26Fab'-PEG 在 MLR 中部分抑制 IFN- γ (55% 的抑制)、IL-13 (50% 的抑制) 和 IL-5 (80% 的抑制) 的产生 (数据未显示)。

[0283] 方法 : A26Fab'-PEG 对人同种异体单向全 PBMC MLR 增殖反应的抑制。将两名不相关供体的人 PBMC 从全血中分离。将来自一名供体的细胞通过 γ - 辐射灭活以得到刺激者群体。余下供体的细胞形成应答者群体。刺激者群体和应答者群体以 1 : 1 的比例 (1x10⁵ 个细胞 / 供体) 混合并在 A26Fab'-PEG (1ng-100 μ g/mL) 存在下培养 6 天。将 A33 Fab'-PEG (内部试剂) 作为对照试剂使用。细胞增殖在第 6 天通过 ³H- 胸苷掺入 (0.5 μ Ci/ 孔) 测量。将数据表示为相对于在不存在生物试剂的情况下应答者和刺激者反应的抑制百分比, 并且为 10 名不同供体配对 (的联合数据平均值 $\pm$ SEM)。利用 Graphpad Prism® 软件计算 IC₅₀ 值。结果在图 5 中示出。

[0284] 实施例 4b : 破伤风类毒素反应

[0285] 破伤风类毒素 (TT) 在已接种的个体中引起强 T 细胞特异性免疫应答。在体外,对 TT 攻击的抗原特异性记忆反应可通过监测 PBMC 的增殖及其细胞因子的产生 (T_H1 和 T_H2) 来检测 (Bishop 等,2005)。A26Fab'-PEG 以剂量依赖的方式抑制增殖和 IL-5、IL-13, IFN- γ 和 TNF- α 的产生 (数据未显示),其中增殖的最大抑制率达 38%。对 2 名供体计算的增殖抑制的 IC_{50} 值,为 0.58nM(0.051 μ g/mL) 和 1.11nM(0.097 μ g/mL)。图 6 显示了 1 名供体的 A26Fab'-PEG 增殖抑制曲线。

[0286] 方法:A26Fab'-PEG 抑制暴露于破伤风类毒素的 PBMC 的增殖。将 PBMC 通过在 Ficoll 梯度上的分离而分离,并在存在 A26Fab'-PEG (浓度范围 5 μ g/mL-0.001 μ g/mL) 的情况下在 96 孔圆底板中以终体积 200 μ L/孔暴露于 1 μ g/mL 破伤风类毒素 (Calbiochem)。在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 ,100%湿度下温育 5 天后,将细胞增殖通过将 3H 胸苷 (0.5 μ Ci/孔) 掺入活跃的分裂细胞中来测量。将单名代表性供体的结果示出。利用 Graphpad Prism[®] 软件计算 IC_{50} 值。

[0287] 实施例 4c:房尘螨反应

[0288] 可通过吸入性抗原例如房尘螨触 (包括来自屋尘螨属的种) 发几种急性哮喘 (Tillie-Leblond 等,2005,Allergy,60,(1),23-29)。在特应性而非非特应性患者中,这样的变应原引起外周血细胞的增殖反应和 T_H2 极化细胞因子的产生 (Ling 等,2004, Lancet, 363,608-615)。建立体外测定以确定 OX40 阻断对应答于抗原攻击的 T_H2 细胞因子 IL-13 的产生的作用。自具有变应原特异性 IgE (RAST) 评分 3-5 (等级 0-6) 的特应性群体采集 PBMC,并在 A26Fab'-PEG 或对照抗体存在的情况下用屋尘螨抗原刺激。A26Fab'-PEG 抑制 IL-13 的产生,最大抑制率为 60%, IC_{50} 值为 1.23nM (图 7)。此外,在该测定中 A26 Fab'-PEG 还有效地抑制了细胞因子 IL-4、IL-5 和 TNF- α 的产生,同时提高了调节性细胞因子 IL-10 的水平 (图 8)。

[0289] 方法图 7:A26Fab'-PEG 抑制暴露于屋尘螨变应原提取物的 PBMC 产生 IL-13。PBMC 从过敏性志愿者中通过 Ficoll 梯度分离而分离。将纯化的 PBMC 在测试抗体 (浓度范围在 10 μ g/mL-0.0005 μ g/mL) 存在的情况下在 96 孔圆底板中以终体积 200 μ L/孔暴露于 25 μ g/mL 屋尘螨变应原提取物 (Greer)。在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 ,100%湿度下温育 6 天后,收集上清液并通过 ELISA (Biosource) 检测 IL-13 的含量。图表表示三名供体的合并数据 (平均值 $\pm$ SEM)。使用 Graphpad Prism[®] 软件计算 IC_{50} 值。

[0290] 方法图 8:A26Fab'-PEG 调节暴露于屋尘螨变应原提取物的 PBMC 的细胞因子的产生。从过敏性志愿者中通过 Ficoll 梯度分离而分离 PBMC。在 10 μ g/mL A26Fab'-PEG (114nM) 或对照 (TN3Fab'-PEG) 存在的情况下将纯化的 PBMC 在 96 孔圆底板中以终体积 200 μ L/孔暴露于 25 μ g/mL 的屋尘螨变应原提取物 (Greer) 中。在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 ,100%湿度下温育 6 天后,收集上清液并利用复斑测定 (MSD) 检测细胞因子的含量。图表表示了三名供体的合并数据 (平均值 $\pm$ SEM)。

[0291] 总结

[0292] 人功能性测定中 A26Fab'-PEG 的 IC_{50} 值总结于表 2 中。所有三个测定中,A26Fab'-PEG 的效价相似并且与基于细胞的亲和力测量的 1.106nM 很好地相关。在这些测定中,细胞增殖和 / 或多种炎性细胞因子的产生被显著抑制,证实 A26Fab'-PEG 强烈抑制 T 细胞活化。破伤风类毒素试验和房尘螨测定均检测了记忆 T 细胞的记忆反应,表明

A26Fab'-PEG 能够抑制对多种抗原的已建立 T 细胞应答。

[0293] 表 2 人功能性体外测定中 A26Fab'-PEG 的平均 IC₅₀ 值

[0294]	功能性测定	平均 IC ₅₀ (nM)	平均 IC ₅₀ (μg/ml)
	混合淋巴细胞反应 -增殖的抑制(n = 10)	2.149	0.1877
	破伤类风毒素 -增殖的抑制(n = 2)	0.845	0.0733
	房尘螨 - IL-13 产生的抑制(n = 3)	1.23	0.1067

[0295] 对房尘螨抗原的特应性记忆 T_H2 应答提供针对过敏性哮喘的相关体外测定,并且数据提示 A26Fab'-PEG 在该适应症中可为有效的治疗。之前 OX40 共刺激已与肺部炎症相关,其中提示在变应原特异性的幼稚 CD4⁺ T 细胞分化成炎症 T_H2 细胞以及记忆 T_H2 细胞的记忆反应中该共刺激具有重要作用 (Wang & Liu, 2007, J. Clin. Invest, 117(12), 3655-3657)。在过敏性炎症期间,由受压的上皮细胞产生的固有细胞因子胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 驱动人树突细胞的成熟并且诱导 OX40L 的表达。OX40L 对促进具有增强的 TNF-α 产生而无 IL-10 产生的炎症表型的 CD4⁺ T 细胞的 T_H2 极化有作用 (Ito 等, 2005, J. Exp. Med, 202(9), 1213-1223)。在 HDM 应答中, A26Fab'-PEG 有效抑制经典的 T_H2 细胞因子 IL-13、IL-5、IL-4 和 TNF-α。此外,在四名过敏性供体中的两位中, A26Fab'-PEG 提高 IL-10 的产生。因此, A26Fab'-PEG 可能不仅具有抑制变态反应的能力而且具有调节其转向调节性表型的能力。

[0296] 实施例 5:

[0297] A26Fab'-PEG 在 Hu-SCID 模型中抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖

[0298] Hu-SCID 模型涉及用人 PBMC 复原 SCID 小鼠,人 PBMC 随后引发针对宿主小鼠的强烈的异种反应。该反应通过小鼠中人 T 细胞的增殖追踪。利用实验确定的关于 A26Fab'-PEG 的 PK 的数据,设计导致 A26Fab'-PEG 的稳态血浆浓度在 8、23 和 34 μg/ml 的给药方案。图 9 中的数据证实 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞显著被稳态血浆水平保持在 8、23 和 34 μg/ml 的 A26Fab'-PEG 所抑制。

[0299] 方法: A26Fab'-PEG 在 Hu-SCID 模型中抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖

[0300] 小鼠在第 -2 天按 0.825、2.475 或 8.25mg/kg 的皮下负荷剂量给药,随后每天在皮下分别给予 0.25、0.75 或 2.5mg/kg 的维持剂量。将小鼠在第 -1 天通过给予 TMβ1 去除 NK 细胞,然后在第 0 天转移 8×10⁶ 个人 PBMC 至腹腔内。随后实验在第 14 天终止并将血液、腹膜灌洗液和脾脏匀浆针对 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞进行分析。第 14 天通过颈脱位法处死小鼠并通过心脏穿刺取血。随后人 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的数目通过 FACS 分析确定。数据 (n = 10) 表示为平均值 ± SEM。在给予 A26Fab'-PEG 后血液中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的减少情况在图 9 中示出。

[0301] 实施例 6: A26Fab'-PEG 与非人灵长类 OX40 的交叉反应性

[0302] 为了证明 A26Fab'-PEG 在非人灵长类 (NHP) 疾病模型和临床前毒理学中的用途,在人细胞和 NHP 细胞中对比其相对的亲和力和功能性效价。

[0303] NHP 细胞上基于细胞的亲和力

[0304] 食蟹猴 (*Cynomolgus monkey*) 或猕猴的 CD4⁺T 细胞从外周血中分离并活化以表达高水平的 OX40。A26Fab'-PEG 的亲和力通过如图 3 所示的平衡结合曲线的非线性回归分析测量。A26Fab'-PEG 在亲和力方面显示出对于食蟹猴或猕猴的 CD4⁺T 细胞与人相比有少于 2- 倍的下降,提示其是高度交叉反应性的 (表 3)。

[0305] 表 3 A26Fab'-PEG 对人和 NHP 细胞的基于细胞亲和力的对比

[0306]

A26 Fab'-PEG	K _b (nM)
人 (n = 3)	1.106
食蟹猴 (n = 3)	1.859
猕猴 (n = 1)	1.202

[0307] 将 NHP PBMC 用 Lympholyte (VH Bio) 梯度分离,在 37℃,5% CO₂,100% 湿度下用 1 μg/mL PHA-L 活化 3,然后并利用磁珠 (非人灵长类的 CD4⁺T 细胞分离试剂盒 II; MiltenyiBiotec) 通过阴选来分离 CD4⁺ T 细胞。如实施例 3a (图 3) 所述检测亲和力。

[0308] 实施例 7 :食蟹猴 CIA 模型中的效价研究

[0309] 研究原理和研究设计

[0310] 食蟹猴胶原蛋白诱导的关节炎是用于在人实验之前对潜在抗关节炎药物进行概况分析的标准模型。在我们的实验中,该模型反应了针对 TNF α 和 IL-6 的治疗。这些数据与利用等同的抗人疗法的临床 RA 研究一致。

[0311] 食蟹猴中关节炎的诱导需要用胶原蛋白 II 的两个免疫接种步骤,中间分隔 3 周的时间。关节炎症状 (一个或多个关节的肿胀和触痛) 可在第二次免疫接种后的任何时间显示,并每周使用关节炎评分评价。实验总共进行 11 周。OX40 是共刺激分子,因而对功能的干扰预期对模型的免疫接种期有影响。评价用 A26 Fab'-PEG 的三种给药方案。一组仅在第一次免疫接种前一天接受 A26Fab'-PEG (100mg/kg) 一次。第二组仅在第二次免疫接种前一天接受 A26Fab'-PEG (100mg/kg) 一次,而第三组在第一次和第二次免疫接种前的一天接受 A26Fab'-PEG (100mg/kg)。动物的对照组接受醋酸盐缓冲液溶媒。溶媒处理组中的疾病发作通过在急性期蛋白 C 反应蛋白 (CRP) 和触珠蛋白 (临床上在 RA 试验中测量的生物标记) 的血清提高来表征。关节完整性通过 X 射线和通过组织学检查来评价。

[0312] 结果和结论

[0313] 在第一次免疫接种前一天用 A26Fab'-PEG 处理的动物中,关节炎严重性一般低于溶媒处理组的动物。关节炎评分的这些差别在第 49、63 和 76 天是统计学上显著的。图 10 显示按照临床评分的曲线下面积表示的个体动物的数据的整体总结。关节的骨质侵蚀的 X 射线评价也降低 (表 4),组织病理学的改变 (图 11) 亦是如此。CRP 和触珠蛋白的浓度趋向于低于对照组。在第一次免疫接种前的一天和第二次免疫接种前的一天用 A26Fab'-PEG 给药的动物组得到类似的结果。然而,在仅第二次免疫接种前一天接受 A26Fab'-PEG 的动物中没有观察到令人信服的抗关节炎作用。这些数据显示抗 OX40 治疗在食蟹猴 CIA 中的抗关节炎作用并且证实 OX40 对引发致病性免疫应答的重要性。

[0314] 图 10 :食蟹猴 CIA 中 A26 Fab'-PEG 对关节炎评分的抑制。数据显示对在第一次

和第二次免疫接种前接受醋酸盐缓冲液的对照动物 (Ac Ac)、在第一次免疫接种前接受的动物 (A26 Ac)、在第二次免疫接种前接受 A26 Fab'-PEG 的动物 (Ac A26) 以及在第一次和第二次免疫接种前接受 A26 Fab'-PEG 的动物 (A26 A26) 的临床评分数据的个体动物曲线下面积 (AUC)。条是中值。

[0315] 表 4 A26 Fab'-PEG 治疗对骨质侵蚀的 X 射线评分的影响

[0316]

组	天		
	0	35	76
Ac Ac	0	3.9 ± 1.7	24.8 ± 5.9
A26 Ac	0	0.3 ± 0.3	$7.6 \pm 3.9^*$
Ac A26	0	9.4 ± 4.5	17.9 ± 5.9
A26 A26	0	0.9 ± 0.7	$5.3 \pm 4.8^{**}$

[0317] Ac Ac 动物接受醋酸盐缓冲液溶媒, A26 Ac 动物在第一次免疫接种前接受 A26Fab'-PEG, Ac A26 动物在第二次免疫接种前接受 A26 Fab'-PEG, 而 A26 A26 动物在第一次和第二次免疫接种前接受 A26 Fab'-PEG。平均值 $\pm$ s. e. m., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Wilcoxin 检验。

[0318] 方法图 11 :A26Fab'-PEG 对食蟹猴 CIA 中总组织学评分的减少。数据显示研究终止时个体动物的总组织学评分 (软骨和骨的掺入性退化、纤维化、肉芽组织和增生)。Ac Ac 动物接受醋酸盐缓冲液溶媒, A26 Ac 动物在第一次免疫接种前接受 A26 Fab'-PEG, Ac A26 动物在第二次免疫接种前接受 A26Fab'-PEG, 而 A26 A26 动物在第一次和第二次免疫接种前接受 A26Fab'-PEG。条是中值。

[0319] 显然应理解的是, 本发明已通过仅仅实施例的方式描述, 并不以任何方式意指限制, 并且细节的修改可在随附权利要求范围内作出。本发明各个实施方案的优选特征针对各个其它实施方案已作必要的修正。本说明书中引用的所有的出版物 (包括但不限于专利和专利申请) 通过引用结合于本文中, 如同个体出版物各自具体且单独地指出通过在本文中如同充分陈述地引用结合。

[0001]

CPCH1162258P

序 列 表

<110> UCB Pharma S.A.
LAWSON, Alastair
NESBITT, Andrew
POPPLEWELL, Andrew
SHAW, Stevan
SHPEKTOR, Diana
ZHANG, Yi

<120> 对人 OX40 具有特异性的抗体分子

<130> G0088-W001

<150> US61/153038
<151> 2009-02-17

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

[0002]

<220>

<223> CDRH2

<400> 2

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> CDRH3

<400> 3

Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> CDRL1

<400> 4

Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala

1 5 10

[0003]

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> CDRL2

<400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体 A26 的轻链可变区

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0004]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码抗体 A26 的轻链可变区的 DNA

<400> 8

gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tegtgtgact
60

attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg ctgtgtatca gcagaaacgg
120

ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttcogtct

[0005]

180

cgttttctctg cgtctgggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg

240

gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccaactgac gtttggtggt

300

ggtaccaaag

ttgagatcaa

acgt

324

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 A26 的重链可变区

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr

65

70

75

80

[0006]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 编码抗体 A26 的重链可变区的 DNA

<400> 10
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
60

tcttgtgcag caageggttt cacgttcacc aactacggtg tccaactggat tcgtcaggca
120

ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac
180

cgtgactctg tcaaaggteg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac
240

ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt
300

gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c
351

[0007]

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 抗体 A26 的轻链

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

[0008]

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 包含信号序列的抗体 A26 的轻链

<400> 12

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

[0009]

Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Thr	Gln
35				40				45							
Ser	Ile	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala
50				55				60							
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro
65		70				75				80					
Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile
85				90				95							
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
100				105				110							
Tyr	Asp	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
115				120				125							
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
130				135				140							
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
145				150				155				160			
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
165				170				175							
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
180				185				190							

[0010]

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 13
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 编码抗体 A26 的轻链的 DNA

<400> 13
gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact
60

attacctgtc gtgcaacca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg
120

ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacaactc tgcataccgg tgttccgtct
180

cgtttctctg cgtctgggtc tggtaaggac tctactctga ccatctcttc tctgcagcgg
240

gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccaactgac gtttggtggt
300

ggtaacaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg
360

tctgaacgaac agctcaaata tggtaactgt tctgtcggtt gctctctgaa caacttctat

[0011]

420

ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag

480

gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact

540

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gccaagttac ccatcagggt

600

ctgtcttctc cggttaccaa aagctttaat agaggggagt gttaa

645

<210> 14

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码包含信号序列的抗体 A26 的轻链的 DNA

<400> 14

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggetg gtttcgctac cgtagcgcaa

60

gctgatatcc agatgacceca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcggtg

120

actattacct gtctgtcaac ccagagcacc tacaacgctc tggettggtg tcagcagaaa

180

ccgggtaaaag cgccaaaact cctgatctac aacgccaaca ctctgcatac cgggtgtccg

240

tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtaag gactctactc tgaccatctc ctctctgcag

300

ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attacccact gaogtttgg

360

[0012]

ggtggtacca aagttgagat caaacgtaag gttgcagctc catcgttett catctttcca
420

ccgtctgacg aacagctcaa atctggtact gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc
480

tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct
540

caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg
600

actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag
660

ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaa
708

<210> 15

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 A26 的重链

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0013]

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205

[0014]

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Ala Ala
225

<210> 16
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 包含信号序列的抗体 A26 的重链

<400> 16

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala
85 90 95

[0015]

Lys Asn Ser Pro Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp			
115	120	125	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
130	135	140	
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
145	150	155	160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
165	170	175	
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
180	185	190	
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
195	200	205	
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
210	215	220	
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
225	230	235	240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala			
245			

[0016]

<210> 17
<211> 687
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 编码抗体 A26 的重链的 DNA

<400> 17
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc
60
tcttgtgcag caagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca
120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggctc gacgtactac
180
cgtgactctg tcaaaggteg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac
240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactgggtgt
300
gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc
360
aaaggtcoga gcgttttccc actggctccg agctctaaat ccacctctgg tggtaaggct
420
gcactgggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct
480
ggtgcaactga cctctgggtt tcacaccttt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac
540
tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc
600
aacgtcaacc acaaaccgtc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatectgt
660

[0017]

gacaaaaccc atacctgcgc tgcgtaa
687

<210> 18
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 编码包含信号序列抗体 A26 的重链的 DNA

<400> 18
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa
60
gtcgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtec agcctggagg ggcctgcgt
120
ctctcttgtg cagcaagcgg ttacacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag
180
gcaccaggta aaggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac
240
taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctctgtg atgacgcgaa aaactctccg
300
tacctgcaga tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgtactgggt
360
ggtgaaggta tcttcgacta ctggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagecgttct
420
accaaaggtc cgagcgtttt cccactggct ccgagctcta aatccacctc tgggtggtacg
480
gtgcactgg gttgcctggg gaaagactac ttccagaaac cagttaccgt gtcttggaac
540

[0018]

tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc tttccagcag ttctgcagtc ttctggtctg
600

tactccctgt ctagegtggg taccgttcgg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc
660

tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacg aaagtggaca aaaaagtcga gccgaaatcc
720

tgtgacaaaa cccatacctg cgtgcgttaa
750

<210> 19

<211> 1459

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 编码包含基因间序列 IGS2 的抗体 A26 的重链和轻链的 DNA

<400> 19

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgtac cgtagegcaa
60

gtgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctcgg ccagcgtagg cgtcgtgtg
120

actattacct gtcgtgcaac ccagagcacc tacaacgtc ttgcttggtc tcagcagaaa
180

ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttcg
240

tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtaag gactctactc tgaccatctc ctctctgcag
300

ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attaccact gacgttttgt
360

ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catcgtctt catctttcca

[0019]

420

ccgtctgacg aacagctcaa atctgggtact gcttctgtcg ttgctctct gaacaacttc

480

tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct

540

caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccttg

600

actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag

660

ggctctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtgttaaaa tgaagaagac

720

tgctatagea attgcagtgg cgctagctgg ttctgccacc gtggcgcaag ctgaggttca

780

gctggctcag tctggaggcg ggcttgtcca gcctggaggg agcctgcgtc tctcttgtgc

840

agcaagcggg ttcaagtcca ccaactacgg tatccactgg attcgtcagg caccaggtaa

900

aggtctggaa tgggtagcct ctatctctcc gtctggtggt ctgacgtact accgtgactc

960

tgtcaaaggt cgtttcacca tctctcgtga tgacgegaaa aactctccgt acctgcagat

1020

gaactctctg cgtgcagaag ataccgcagt gtactactgc gctactggtg gtgaaggtat

1080

cttcgaactac tggggtcagg gtaccctggg aactgtctcg agcgtttcta ccaaaggtec

1140

gagcgttttc ccactggctc cgagctctaa atccacctct ggtggtaagg ctgcactggg

1200

[0020]

ttgcctgggtg aaagactact tcccagaacc agttaccgtg tcttggaact ctgggtgcact
1260

gacctctgggt gttcacacct ttccagcagc tctgcagtct tctgggtctgt actccctgtc
1320

tagcgtgggtt accgttccgt cttcttctct ggggtactcag acctacatct gcaacgtcaa
1380

ccacaaaccg tccaacacga aagtggacaa aaaagtcgag ccgaaatcct gtgacaaaaa
1440

ccataacctgc gctgcgtaa
1459

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> CDRH2

<400> 20

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> CDRL1

[0021]

<400> 21

Arg Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 JH4

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> JK1 序列

<400> 23

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

(a) 抗体 A26 的轻链可变区(SEQ ID NO:7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) 抗体 A26 的重链可变区(SEQ ID NO:9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS

(c)

CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2: SISPSGGLTYYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
SISPSGGLTYYRDSVEG (SEQ ID NO:20)
CDRH3: GGEGIFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
RATEDIYNALA (SEQ ID NO:21)
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) 抗体 A26 的轻链(SEQ ID NO:11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) 含信号序列的抗体 A26 的轻链(SEQ ID NO:12)

MKKTAAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPG
KAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 1

(f) 抗体 A26 的重链(SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(g) 含信号序列的抗体 A26 的重链(SEQ ID NO:16)

MKKTAIATAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAP
GKGLEWVASISPSGGLTYIRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGI
FDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCA
A

(h)编码抗体 A26 的轻链可变区的 DNA (SEQ ID NO:8)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTG
TCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAAC
TCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGT
ACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTA
CTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGT

图 1 续

(i) 编码抗体 A26 的重链可变区的 DNA (SEQ ID NO:10)

GAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTACGGCACCAG
GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAC
TCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT
GAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT
TCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGC

(j) 编码抗体 A26 的轻链的 DNA (SEQ ID NO:13)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTAT
TACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTA
AAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTC
TCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTT
CGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAG
TTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAG
CTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAA
AGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAAC
AGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAA
AAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

(k) 编码含信号序列的抗体 A26 的轻链的 DNA (SEQ ID NO:14)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC
TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA
TTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGT
AAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTT
CTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT
TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAA
GTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACA
GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGA
AAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAA
CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCA
AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

图 1 续

(l) 编码抗体 A26 的重链的 DNA (SEQ ID NO:17)

GAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAG
GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAC
TCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT
GAACTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT
TCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGC
GTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCT
GGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCTG
GTGTTACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTT
ACCGTTCGGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTC
CAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTG
CGTAA

(m) 编码含信号序列的抗体 A26 的重链的 DNA (SEQ ID NO:18)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGC
TGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCT
CTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCA
GGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGA
CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGA
TGAACCTCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATC
TTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAG
CGTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCC
TGGTGAAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACCTCTGGTGCCTGACCTCT
GGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGT
TACCGTTCGGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGT
CCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCT
GCGTAA

图 1 续

(n) 编码含基因间序列 IGS2 的抗体 A26 的重链和轻链的 DNA (SEQ ID NO:19)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC
TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA
TTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGT
AAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTT
CTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT
TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAA
GTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACA
GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGA
AAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAA
CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCA
AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAAAATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCT
AGCTGGTTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTG
TCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTAC
GGTATCCACTGGATTTCGTACAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCC
GTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAAGGTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATG
ACGCGAAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTAC
TACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGT
CTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCT
CTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCAGAACCAGTTACCGTG
TCTTGAACTCTGGTGCAGTACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTC
TGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCT
ACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGGACAAAAAAGTCGAGCCGAAA
TCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

图 1 续

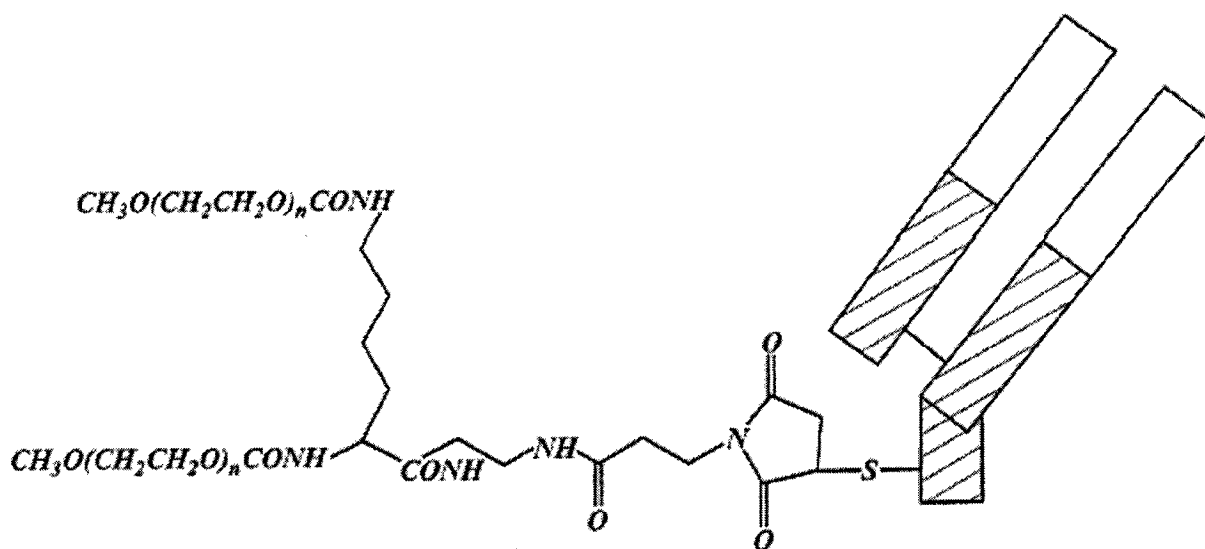


图 2

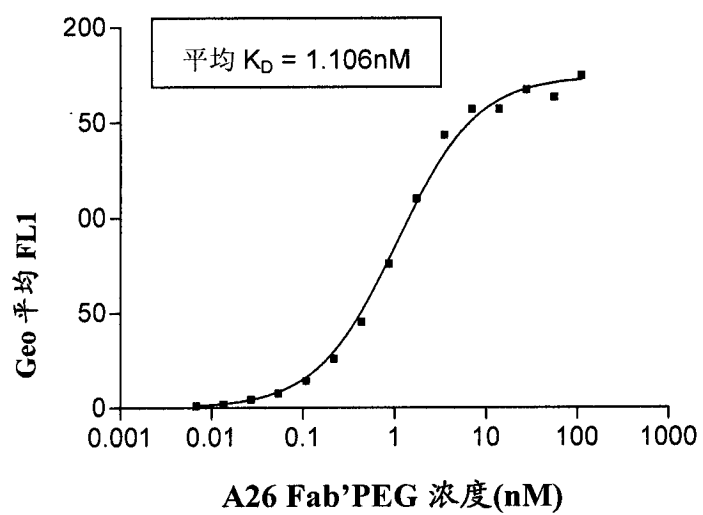


图 3

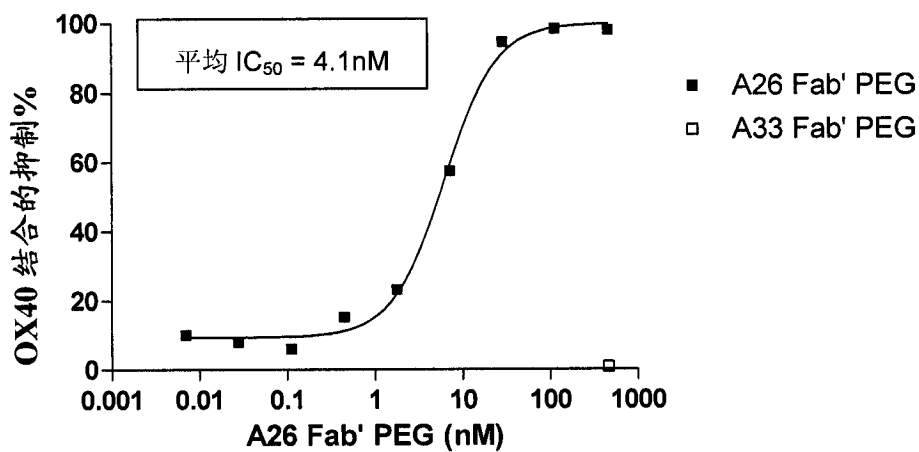


图 4

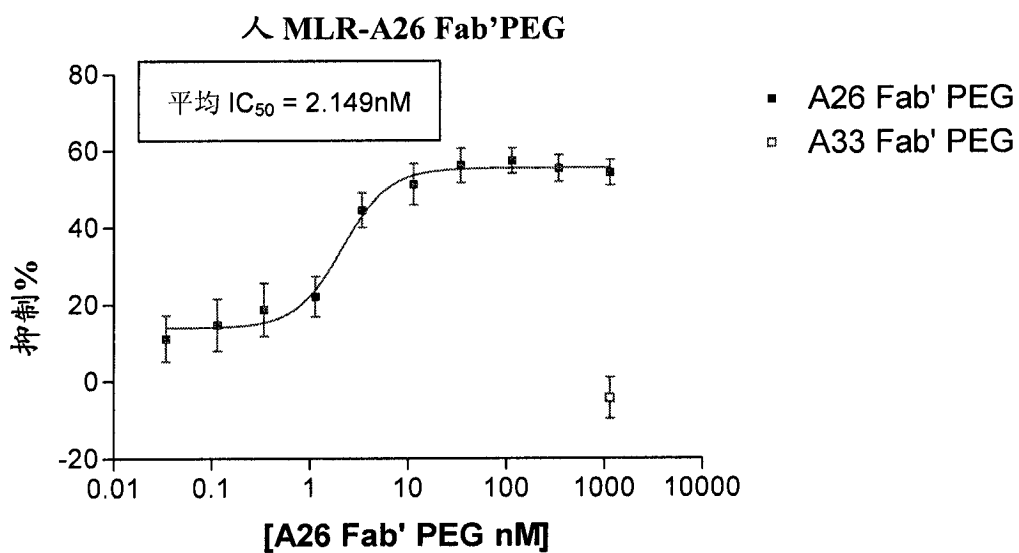


图 5

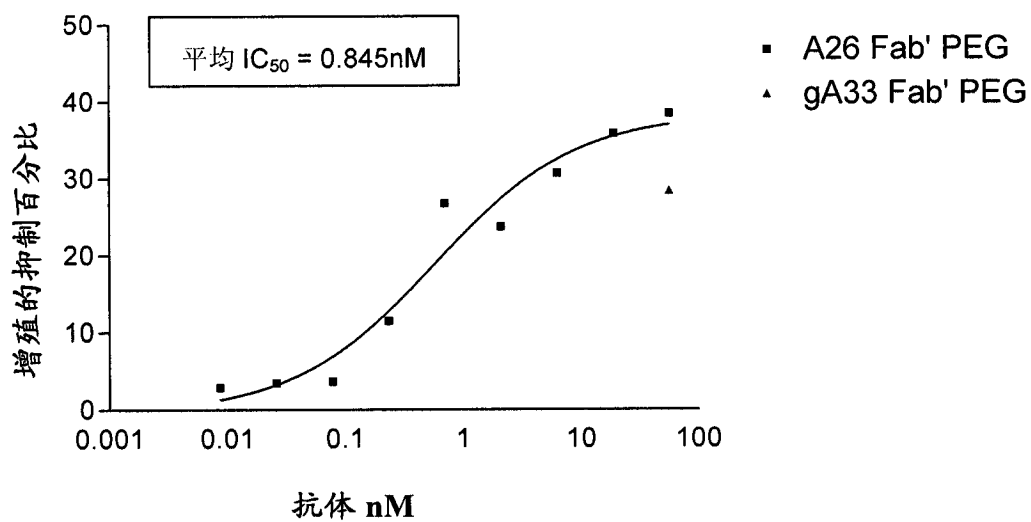


图 6

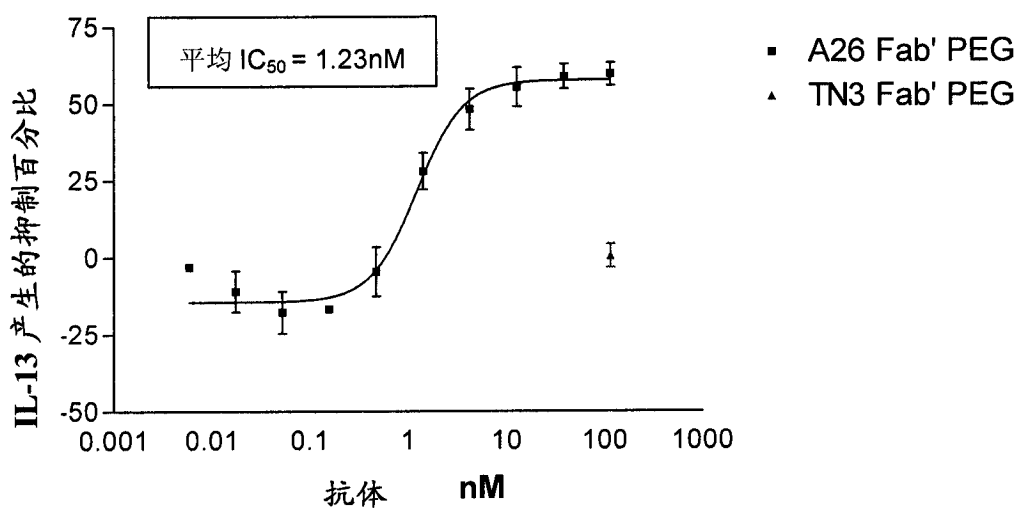


图 7

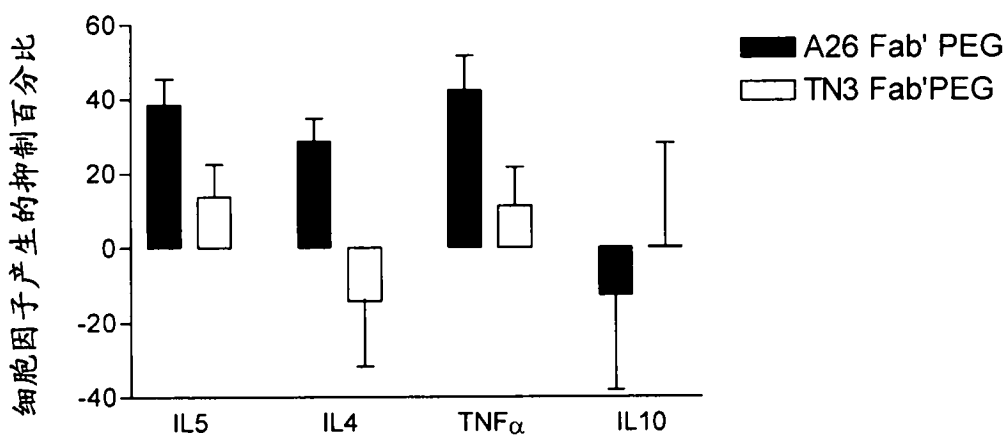


图 8

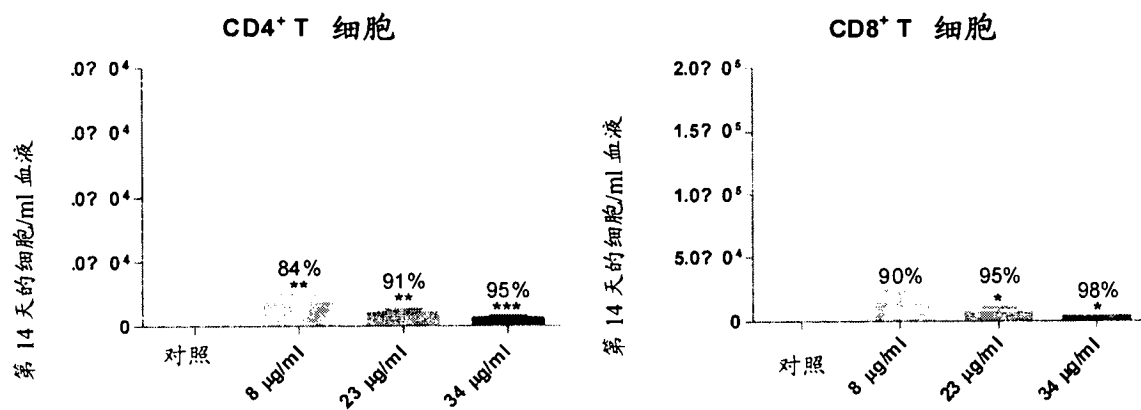


图 9

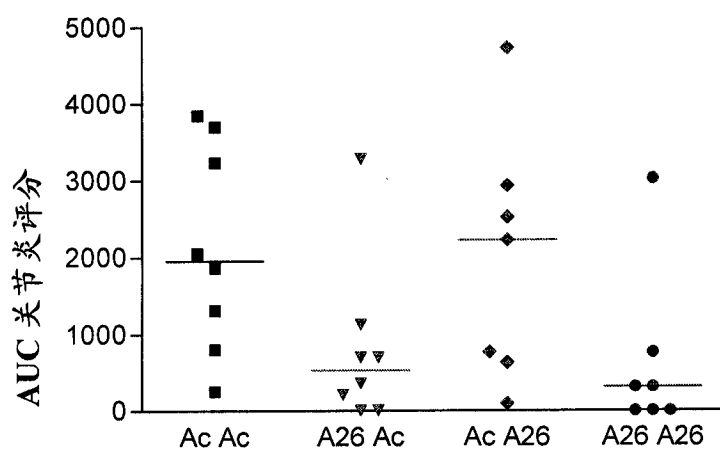


图 10

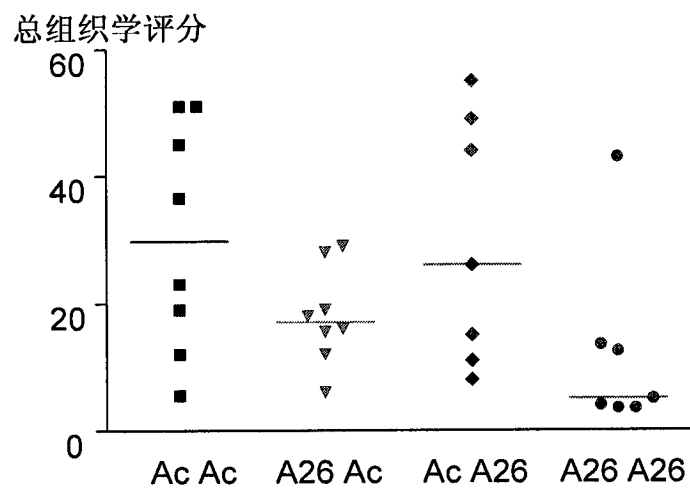


图 11