



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108137686 B

(45) 授权公告日 2022.06.17

(21) 申请号 201680039426.5

(22) 申请日 2016.05.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108137686 A

(43) 申请公布日 2018.06.08

(30) 优先权数据
62/158,515 2015.05.07 US
62/161,198 2015.05.13 US
62/262,373 2015.12.02 US
62/323,458 2016.04.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/031257 2016.05.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/179517 EN 2016.11.10

(73) 专利权人 阿吉纳斯公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 路德维格癌症研究所有限公司
纪念斯隆-凯特琳癌症中心

(72) 发明人 马克·范迪吉克
叶卡特琳娜·布雷奥斯-奈斯特龙
沃尔克·赛贝特 格尔德·里特
大卫·舍尔
丹尼尔·赫希霍恩-西默尔曼
塔哈·梅尔杰奥贝 唐浩
大卫·A·维斯基 杰里米·维特
尼古拉斯·S·威尔逊

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 樊英如 邱晓敏

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103946238 A, 2014.07.23
CN 104203981 A, 2014.12.10
CN 101918447 A, 2010.12.15
W0 2014148895 A1, 2014.09.25
W0 03106498 A2, 2003.12.24
CN 1844145 A, 2006.10.11

审查员 吴胜

权利要求书8页 说明书114页
序列表55页 附图52页

(54) 发明名称
抗OX40抗体及其使用方法

(57) 摘要
本披露提供了特异性结合人类OX40受体(OX40)的抗体以及包括此类抗体的组合物。在一个具体方面,这些抗体特异性结合人类OX40并且调节OX40活性,例如,增强、激活、或诱导OX40活性,或降低、灭活、或抑制OX40活性。本披露还提供了通过给予抗体来治疗障碍、如癌症的方法,该抗体特异性结合人类OX40并且调节OX40活性,例如,增强、激活、或诱导OX40活性。还提供了通过给予抗体来治疗自身免疫性或炎性疾病或障碍的方法,该抗体特异性结合人类OX40并且调节OX40活性,例如,降低、灭活、或抑制OX40活性。

CN 108137686 B

1. 一种特异性结合人类OX40的分离的抗体,该抗体包括:(a) 重链可变区,该重链可变区包括

由SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成的重链互补决定区1(CDR1),

由SEQ ID NO: 5的氨基酸序列组成的重链CDR2,以及

由SEQ ID NO: 6的氨基酸序列组成的重链CDR3;和

(b) 轻链可变区,该轻链可变区包括

由SEQ ID NO: 1的氨基酸序列组成的轻链CDR1,

由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成的轻链CDR2,

以及由SEQ ID NO: 3的氨基酸序列组成的轻链CDR3。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中该重链可变区包括SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中该抗体包括重链序列,该重链序列包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO: 60-63。

4. 如权利要求1所述的抗体,其中该轻链可变区包括SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的抗体,其中该抗体包括轻链序列,该轻链序列包括SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

6. 一种特异性结合人类OX40的分离的抗体,该抗体包括:

(a) 重链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO: 16的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,该轻链可变区包括SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的抗体,其中该抗体包括:

(a) 重链,该重链包括SEQ ID NO: 60的氨基酸序列;和

(b) 轻链,该轻链包括SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

8. 如权利要求6所述的抗体,其中该抗体包括:

(a) 重链,该重链包括SEQ ID NO: 61的氨基酸序列;和

(b) 轻链,该轻链包括SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

9. 如权利要求6所述的抗体,其中该抗体包括:

(a) 重链,该重链包括SEQ ID NO: 62或SEQ ID NO: 63的氨基酸序列;和

(b) 轻链,该轻链包括SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

10. 如权利要求1-2、4、或6中任一项所述的抗体,该抗体进一步包括重链恒定区和/或轻链恒定区。

11. 如权利要求10所述的抗体,其中该重链恒定区选自下组,该组由以下各项组成:人类免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。

12. 如权利要求11所述的抗体,其中该IgG₁是非岩藻糖基化的IgG₁。

13. 如权利要求11所述的抗体,其中该IgG₁的氨基酸序列包括N297A突变或选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

14. 如权利要求11所述的抗体,其中该IgG₁的氨基酸序列包括N297Q突变。

15. 如权利要求11所述的抗体,其中该IgG₄的氨基酸序列包括S228P突变。

16. 如权利要求11所述的抗体,其中该IgG₂的氨基酸序列包括C127S突变。

17. 如权利要求11所述的抗体,其中该重链恒定区包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO: 64-71。

18. 如权利要求10所述的抗体,其中该轻链恒定区选自人 κ 轻链和人 λ 轻链。
19. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体是人抗体。
20. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体是激动性的。
21. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体激活、增强或诱导人类OX40的活性。
22. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体诱导CD4⁺ T细胞增殖。
23. 如权利要求22所述的抗体,其中该CD4⁺ T细胞增殖是该抗体的浓度的基本上递增性的函数。
24. 如权利要求22所述的抗体,其中该CD4⁺ T细胞增殖显示S形剂量响应曲线。
25. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过抗-CD3-刺激的外周血单核细胞(PBMC)诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、或其组合的产生。
26. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过抗-CD3-刺激的PBMC诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生,其中TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生是该抗体的浓度的基本上递增性的函数。
27. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过抗-CD3-刺激的PBMC诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生,其中TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生显示S形剂量响应曲线。
28. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过SEA-刺激的外周血单核细胞(PBMC)诱导IL-2产生并且通过SEA-刺激的PBMC抑制IL-10产生。
29. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过SEA-刺激的PBMC诱导IL-2产生,其中IL-2产生是该抗体的浓度的基本上递增性的函数。
30. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过SEA-刺激的PBMC诱导IL-2产生,其中IL-2产生显示S形剂量响应曲线。
31. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过调节性T细胞来缓解效应T细胞的抑制。
32. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体通过效应T细胞和调节性T细胞的共培养来诱导IL-2产生并且通过效应T细胞和调节性T细胞的共培养来抑制IL-10产生。
33. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,该抗体进一步包括可检测标签。
34. 一种分离的核酸分子,该核酸分子编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的重链可变区或重链。
35. 一种分离的核酸分子,该核酸分子编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链。
36. 一种分离的核酸分子,该核酸分子编码:
 - (a) 如权利要求1-33中任一项所述的抗体的重链可变区或重链以及如权利要求1-33中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链; 或
 - (b) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区。
37. 如权利要求34所述的分离的核酸分子,其中该核酸分子编码重链可变区,该重链可变区包括SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

38. 如权利要求35所述的分离的核酸分子,其中该核酸分子编码轻链可变区,该轻链可变区包括SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

39. 一种分离的载体,该载体包括如权利要求34-38中任一项所述的核酸分子。

40. 一种宿主细胞,其包含:

(a) 核酸分子,其编码权利要求1-33任一项的抗体的重链可变区或重链,和编码权利要求1-33任一项的抗体的轻链可变区或轻链;

(b) 编码权利要求1-33中任一项的抗体的重链可变区或重链的第一核酸分子,以及编码权利要求1-33任一项的抗体的轻链可变区或轻链的第二核酸分子;

(c) 载体,其包含编码权利要求1-33中任一项的抗体的重链可变区或重链和权利要求1-33中任一项的抗体的轻链可变区或轻链的核酸分子;或者

(d) 包含编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的重链可变区或重链的核酸分子的第一载体,以及包含编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链的核酸分子的第二载体。

41. 一种产生结合人类OX40的抗体的方法,该方法包括培养宿主细胞,所述宿主细胞包含:

(a) 核酸分子,其编码权利要求1-33任一项的抗体的重链可变区或重链,和编码权利要求1-33任一项的抗体的轻链可变区或轻链;

(b) 编码权利要求1-33中任一项的抗体的重链可变区或重链的第一核酸分子,以及编码权利要求1-33任一项的抗体的轻链可变区或轻链的第二核酸分子;

(c) 载体,其包含编码权利要求1-33中任一项的抗体的重链可变区或重链和权利要求1-33中任一项的抗体的轻链可变区或轻链的核酸分子;或者

(d) 包含编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的重链可变区或重链的核酸分子的第一载体,以及包含编码如权利要求1-33中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链的核酸分子的第二载体。

42. 一种分离的抗体,该抗体特异性结合人类OX40并且由如权利要求35-38中任一项所述的分离的核酸分子或权利要求39的分离的载体编码。

43. 一种药物组合物,该药物组合物包括如权利要求1-5、6-33或42中任一项所述的抗体以及药学上可接受的赋形剂。

44. 一种药物组合物,该药物组合物包括如权利要求1-5、6-33或42中任一项所述的抗体、如权利要求34-38中任一项所述的核酸分子、如权利要求39所述的载体、或如权利要求40所述的宿主细胞;以及药学上可接受的赋形剂。

45. 如权利要求1-5、6-33或42中任一项所述的抗体、如权利要求34-38中任一项所述的核酸分子、如权利要求39所述的载体、如权利要求40所述的宿主细胞、或如权利要求43或44所述的药物组合物在制备用于增强受试者的T细胞扩增和T细胞效应子功能的制剂中的用途。

46. 如权利要求1-5、6-33或42中任一项所述的抗体、如权利要求34-38中任一项所述的核酸分子、如权利要求39所述的载体、如权利要求40所述的宿主细胞、或如权利要求43或44所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的药剂中的用途,其中所述癌症选自非小细胞肺癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、乳腺癌、卵巢癌和肾癌。

47. 如权利要求46所述的用途,该方法进一步包括向该受试者给予吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。

48. 如权利要求47所述的用途,其中该抑制剂选自下组,该组由以下各项组成:依帕卡朵丝坦、F001287、印朵目德、以及NLG919。

49. 如权利要求48所述的用途,其中该抑制剂是依帕卡朵丝坦。

50. 如权利要求48所述的用途,其中该抑制剂是F001287。

51. 如权利要求48所述的用途,其中该抑制剂是印朵目德。

52. 如权利要求48所述的用途,其中该抑制剂是NLG919。

53. 如权利要求46所述的用途,进一步包括向该受试者给疫苗。

54. 如权利要求53所述的用途,其中该疫苗包括热休克蛋白肽复合物(HSPPC),该复合物包括与抗原肽复合的热休克蛋白。

55. 如权利要求54所述的用途,其中该热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合,其中该HSPPC衍生自获得自受试者的肿瘤。

56. 如权利要求54所述的用途,其中该热休克蛋白是hsp70或hsc70蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合。

57. 一种试剂盒,该试剂盒包括权利要求1-5、6-33或42中任一项所述的抗体、如权利要求34-38中任一项所述的核酸分子、如权利要求39所述的载体、如权利要求40所述的宿主细胞、或如权利要求43或44所述的药物组合物,以及a)检测试剂、b)OX40抗原、c)标识,该标识反映批准用于人类给药使用或销售、或d)其组合。

58. 如权利要求10所述的抗体,其中该抗体包括人类免疫球蛋白IgG₁重链恒定区,并且其中该IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合,或包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

59. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中相对于该抗体与SEQ ID NO: 55的人类OX40序列之间的结合,该抗体与变体OX40之间的结合大幅变弱,并且其中该变体OX40包括SEQ ID NO: 55的序列,除了选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。

60. 如权利要求59的抗体,其中所述抗体包含人免疫球蛋白IgG1重链恒定区,并且其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含选自N297A、N297Q、D265A及其组合的突变或选自D265A、P329A及其组合的突变。

61. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中与对SEQ ID NO: 55的人类OX40序列的结合相比,该抗体展示出对以下蛋白质降低的结合或不结合:该蛋白质与SEQ ID NO: 55相同,除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。

62. 如权利要求61所述的抗体,其中所述抗体包含人免疫球蛋白IgG1重链恒定区,并且其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含选自N297A、N297Q、D265A及其组合的突变或选自D265A、P329A及其组合的突变。

63. 如权利要求1-9任一项所述的抗体,其中该抗体特异性结合人类OX40序列的表位,该表位包括SEQ ID NO: 55的选自下组的残基,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、

115、以及其组合。

64. 如权利要求63所述的抗体,其中所述抗体包含人免疫球蛋白IgG1重链恒定区,并且其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含选自N297A、N297Q、D265A及其组合的突变或选自D265A、P329A及其组合的突变。

65. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体特异性结合SEQ ID NO: 55的选自下组的至少一个残基,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。

66. 如权利要求65所述的抗体,其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含选自N297A、N297Q、D265A及其组合的突变或选自D265A、P329A及其组合的突变。

67. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中该抗体特异性结合SEQ ID NO: 55的残基58、60、62、80、88、93、99、以及115。

68. 如权利要求67所述的抗体,其中所述抗体包含人免疫球蛋白IgG1重链恒定区,并且其中所述IgG1重链恒定区的氨基酸序列包含选自N297A、N297Q、D265A及其组合的突变或选自D265A、P329A及其组合的突变。

69. 一种特异性结合人类OX40的分离的抗体,该抗体包括如权利要求1-2、4、6、19、或59-68中任一项所述的重链可变区序列和轻链可变区序列,其中该抗体选自下组,该组由以下各项组成:Fab、Fab'、F(ab')₂、以及scFv片段。

70. 一种特异性结合人类OX40的分离的抗体,该抗体包括一个重链和一个轻链,其中该重链和轻链分别包括如权利要求1-2、4、6、19、或59-68中任一项所述的重链可变区序列和轻链可变区序列。

71. 如权利要求70所述的抗体,该抗体进一步包括人类免疫球蛋白IgG₁重链恒定区,其中该IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合,或包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

72. 一种特异性结合人类OX40的分离的抗体,其中该抗体包括:

(a) 第一抗原结合域,该第一抗原结合域特异性结合人类OX40,包含

(i) 第一重链可变域(VH),该第一重链可变域包括VH互补决定区(CDR)1,该VH-CDR1由SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成;VH-CDR2,该VH-CDR2由SEQ ID NO: 5的氨基酸序列组成;以及VH-CDR3,该VH-CDR3由SEQ ID NO: 6的氨基酸序列组成,和

(ii) 第一轻链可变域(VL),该第一轻链可变域包括VL-CDR1,该VL-CDR1由SEQ ID NO: 1的氨基酸序列组成;VL-CDR2,该VL-CDR2由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成;以及VL-CDR3,该VL-CDR3由SEQ ID NO: 3的氨基酸序列组成;和

(b) 第二抗原结合域,该第二抗原结合域不特异性结合由人类免疫细胞表达的抗原。

73. 如权利要求72所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域与以下抗体一样特异性结合人类OX40的相同表位,该抗体包括VH和VL,该VH包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列,该VL包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

74. 如权利要求72所述的抗体,其中与对SEQ ID NO: 55的人类OX40序列的结合相比,该特异性结合人类OX40的抗原结合域展示出对以下蛋白质降低的结合或不结合:该蛋白质与SEQ ID NO: 55相同,除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。

75. 如权利要求72所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中该VH包括SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

76. 如权利要求72所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中该VL包括SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

77. 如权利要求72所述的抗体,其中该第二抗原结合域特异性结合非人类抗原。

78. 如权利要求72所述的抗体,其中该第二抗原结合域特异性结合病毒抗原。

79. 如权利要求78所述的抗体,其中该病毒抗原是HIV抗原。

80. 如权利要求72所述的抗体,其中该第二抗原结合域特异性结合鸡白蛋白或鸡卵溶菌酶。

81. 一种特异性结合OX40的分离的抗体,其中该抗体包括:

(a) 特异性结合人类OX40的抗原结合域,该抗原结合域包括第一重链和轻链,其中

(i) 所述第一重链包含第一重链可变域(VH),该第一重链可变域包括VH互补决定区(CDR)1,该VH-CDR1由SEQ ID NO: 4的氨基酸序列组成;VH-CDR2,该VH-CDR2由SEQ ID NO: 5的氨基酸序列组成;以及VH-CDR3,该VH-CDR3由SEQ ID NO: 6的氨基酸序列组成,和

(ii) 所述第一轻链包含第一轻链可变域(VL),该第一轻链可变域包括VL-CDR1,该VL-CDR1由SEQ ID NO: 1的氨基酸序列组成;VL-CDR2,该VL-CDR2由SEQ ID NO: 2的氨基酸序列组成;以及VL-CDR3,该VL-CDR3由SEQ ID NO: 3的氨基酸序列组成;以及

(b) 第二重链或其片段。

82. 如权利要求81所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域与以下抗体一样特异性结合人类OX40的相同表位,该抗体包括VH和VL,该VH包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列,该VL包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

83. 如权利要求81所述的抗体,其中与对SEQ ID NO: 55的人类OX40序列的结合相比,该特异性结合人类OX40的抗原结合域展示出对以下蛋白质降低的结合或不结合:该蛋白质与SEQ ID NO: 55相同,除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。

84. 如权利要求81所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中该VH包括SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

85. 如权利要求81所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中该VL包括SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

86. 如权利要求81所述的抗体,其中该第二重链的片段是Fc片段。

87. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH,该VH包含与SEQ ID NO: 16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的氨基酸序列。

88. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH,该VH包含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列。

89. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH,该VH包含衍生自人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列。

90. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VL,该VL包含与SEQ ID NO: 15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的

氨基酸序列。

91. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VL,该VL包含SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

92. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括轻链,该轻链包含SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

93. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括轻链,该轻链包含SEQ ID NO: 50的氨基酸序列。

94. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VL,该VL包含衍生自人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

95. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH序列和VL序列,该VH序列和VL序列分别在SEQ ID NO: 16和15中列出。

96. 如权利要求72-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域包括重链,该重链包含SEQ ID NO: 60的氨基酸序列。

97. 如权利要求72--81中任一项所述的抗体,其中该第一抗原结合域和该第二抗原结合域包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合,或包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

98. 如权利要求82-86中任一项所述的抗体,其中该特异性结合人类OX40的抗原结合域和该第二重链或其片段包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合,或包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

99. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,其中该抗体对人类OX40是拮抗性的。

100. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,其中该抗体灭活、降低或抑制人类OX40的活性。

101. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,其中该抗体抑制或减少人类OX40与人类OX40配体的结合。

102. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,其中该抗体抑制或减少人类OX40信号传导。

103. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,其中该抗体抑制或减少由人类OX40配体诱导的人类OX40信号传导。

104. 如权利要求58或72-86中任一项所述的抗体,该抗体进一步包括可检测标签。

105. 一种药物组合物,该药物组合物包括如权利要求58或69-104中任一项所述的抗体以及药学上可接受的赋形剂。

106. 如权利要求46所述的用途,该方法进一步包括向该受试者给予检查点靶向剂。

107. 如权利要求106所述的用途,其中该检查点靶向剂选自下组,该组由以下各项组成:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗CD137抗体、以及激动剂抗OX40抗体。

108. 一种试剂盒,该试剂盒包括如权利要求58或69-104中任一项所述的抗体、或如权利要求105所述的药物组合物,以及a) 检测试剂、b) OX40抗原、c) 标识,该标识反映批准用于

人类给药使用或销售、或d) 其组合。

抗OX40抗体及其使用方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请包括序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交且通过引用以其全文结合在此(2016年5月5日创建的所述ASCII副本被命名为3617_003PC04_ST25.txt且大小为120,927字节)。

1. 发明领域

[0003] 本披露涉及特异性结合人类OX40受体(“OX40”)的抗体、包括此类抗体的组合物、以及生产和使用特异性结合OX40的抗体的方法。

[0004] 2. 背景

[0005] 先天性和获得性免疫应答在控制人类肿瘤生长中的贡献是充分表征的(维塞利(Vesely)MD等人,(2011)免疫学年鉴(Annu Rev Immunol) 29:235-271)。其结果是,已出现了基于抗体的策略,其出于癌症治疗的目的旨在增强T细胞应答,如用激发型抗体靶向T细胞表达的刺激性受体、或用功能性拮抗剂靶向抑制性受体(梅尔曼(Mellman)I等人,(2011)自然(Nature) 480:480-489)。抗体介导的激动剂和拮抗剂方法已显示出临床前活性,并且最近显示出临床活性。调整T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、以及NK细胞功能的重要刺激性受体是OX40受体(又称为OX40、CD134、TNFRSF4、TXGP1L、ACT35、以及ACT-4)(Sugamura K等人,(2004)自然免疫学评论(Nat Rev Immunol) 4:420-431)。OX40是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的一个成员,并且经由OX40信号传导可以调整重要的免疫功能。

[0006] 展示加载有同源肽的MHC类别I或II分子的专职抗原呈递细胞(APC)进行T细胞受体(TCR)刺激后,可以通过抗原特异性T细胞上调OX40(Sugamura K等人,(2004)自然免疫学评论4:420-431)。当成熟后,APC(如树突细胞(DC))上调刺激性B7家族成员(例如,CD80和CD86),连同辅助共刺激分子(包括OX40配体(OX40L)),这有助于塑造T细胞免疫应答的动力学和大小,连同有效的记忆细胞分化。明显的是,其他细胞类型也可以表达组成性和/或诱导性水平的OX40L,如B细胞、血管内皮细胞、肥大细胞,并且在一些情况下是活化的T细胞(索鲁什(Soroosh)P等人,(2006)免疫学杂志(J Immunol) 176:5975-5987)。据信OX40:OX40L共结合驱动受体三聚体的更高有序聚簇和后续信号转导(康帕安(Compaan)DM等人,(2006)结构(Structure) 14:1321-1330)。

[0007] 已经在鼠科动物和人类肿瘤组织中观察到肿瘤微环境中通过T细胞的OX40表达(布雅德(Bulliard)Y等人,(2014)免疫细胞生物学(Immunol Cell Biol) 92:475-480以及皮康思(Piconese)S等人,(2014)肝脏病学(Hepatology) 60:1494-1507)。相对于常规T细胞群体,调节性T细胞(Treg)的瘤内群体高度表达OX40,这一特征归因于它们的增殖状态(维特(Waight)JD等人,(2015)免疫学杂志(J Immunol) 194:878-882以及布雅德(Bulliard)Y等人,(2014)免疫细胞生物学(Immunol Cell Biol) 92:475-480)。早期研究证明,OX40激发型抗体能够引起小鼠模型中的肿瘤排斥(温伯格(Weinberg)AD等人,(2000)免疫学杂志 164:2160-2169以及皮康思S等人,(2008)实验医学杂志(J Exp Med) 205:825-839)。还已经显示,使人类OX40信号传导激发的小鼠抗体增强癌症病人的免疫功能(柯蒂(Curti)BD等

人, (2013) 癌症研究 (Cancer Res) 73:7189-7198)。

[0008] OX40与OX40L相互作用还与炎症性以及自身免疫性疾病和障碍中的免疫应答有关, 这些疾病包括哮喘/特应性、脑脊髓炎、类风湿关节炎、结肠炎/炎性肠病、移植物抗宿主疾病(例如, 移植排斥)、非肥胖性糖尿病小鼠中的糖尿病、以及动脉硬化的小鼠模型(克罗夫特(Croft) M等人, (2009) 免疫学综述 (Immunol Rev) 229 (1):173-191, 以及其中引用的参考文献)。与疾病和障碍相关的症状减少已经报道于OX40-和OX40L-缺陷小鼠中、接受加载有细胞抑制剂的抗OX40脂质体的小鼠中、以及其中OX40与OX40L相互作用受抗OX40L封闭性抗体或融合到人类免疫球蛋白的Fc片段上的重组OX40阻断的小鼠中(克罗夫特M等人; 布特EPJ等人, (2005) 关节炎研究与治疗 (Arthritis Res Ther) 7:R604-615; 温伯格AD等人, (1999) 免疫学杂志162:1818-1826)。还显示出, 用封闭性抗OX40L抗体进行治疗能抑制猕猴哮喘模型中的Th2炎症(克罗夫特M等人; Seshasayee D等人, (2007) 临床研究杂志 (J Clin Invest) 117:3868-3878)。另外地, OX40L的多态性已与狼疮相关联(克罗夫特M等人)。

[0009] 鉴于人类OX40在调节免疫应答中的作用, 在此提供了特异性结合OX40的抗体以及这些抗体用以调节OX40活性的用途。

[0010] 3. 发明概述

[0011] 在一个方面, 在此提供了特异性结合OX40(例如, 人类OX40)的抗体。

[0012] 在一个实施例中, 特异性结合OX40的抗体包括: 包含在SEQ ID NO:16中的VH CDR1的重链可变区(VH) CDR1、包含在SEQ ID NO:16中的VH CDR2的VH CDR2、包含在SEQ ID NO:16中的VH CDR3的VH CDR3、包含在SEQ ID NO:15中的VL CDR1的轻链可变区(VL) CDR1、包含在SEQ ID NO:15中的VL CDR2的VL CDR2、以及包含在SEQ ID NO:15中的VL CDR3的VL CDR3, 其中根据CDR的卡巴特定义、乔西亚定义、卡巴特定义和乔西亚定义的组合、IMGT编号系统、AbM定义、或接触定义(contact definition)来限定各个CDR。

[0013] 在一个实施例中, 特异性结合OX40的抗体包括: (a) 包括重链互补决定区1(CDR1)的重链可变区, 该重链CDR1包括GSAMH (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列; 重链CDR2, 其包括RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列; 以及重链CDR3, 其包括GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列; 以及(b) 包括轻链CDR1的轻链可变区, 该轻链CDR1包括RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列; 轻链CDR2, 其包括LGSNRAS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列; 以及轻链CDR3, 其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。

[0014] 在一个实施例中, 特异性结合OX40的抗体包括: (a) 包括重链CDR1的重链可变区, 该重链CDR1包括GFTFSGSA (SEQ ID NO:47)的氨基酸序列; 重链CDR2, 其包括IRSKANSYAT (SEQ ID NO:48)的氨基酸序列; 以及重链CDR3, 其包括TSGIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49)的氨基酸序列; 以及(b) 包括轻链CDR1的轻链可变区, 该轻链CDR1包括QSLLHSNGYNY (SEQ ID NO:44)的氨基酸序列; 轻链CDR2, 其包括LGS (SEQ ID NO:45)的氨基酸序列; 以及轻链CDR3, 其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:46)的氨基酸序列。

[0015] 在一个实施例中, 该抗体包括具有人类或人类衍生的框架区的重链可变区。

[0016] 在一个实施例中, 该抗体包括重链可变框架区, 该重链可变框架区衍生自由人类基因编码的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列包括IGHV3-73*01 (SEQ ID NO:19)。

[0017] 在一个实施例中, 该抗体包括具有人类或人类衍生的框架区的轻链可变序列。

[0018] 在一个实施例中, 该抗体包括轻链可变框架区, 该轻链可变框架区衍生自由人类

基因编码的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列包括IGKV2-28*01 (SEQ ID NO:18)。

[0019] 在一个实施例中,该抗体包括重链可变区序列,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0020] 在一个实施例中,该抗体包括重链序列,其包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:21、23、51、以及52。在一个实施例中,该抗体包括重链序列,其包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:60-63。

[0021] 在一个实施例中,该抗体包括轻链可变区序列,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施例中,该抗体包括轻链序列,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0023] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中该重链可变区包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0024] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中该轻链可变区包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0025] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0026] 在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0027] 在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:61的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:51或52的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体包括:重链,其包括SEQ ID NO:62或63的氨基酸序列;以及轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0029] 在一个实施例中,该抗体包括重链和/或轻链恒定区。在一个实施例中,该重链恒定区选自下组,该组由以下各项组成:人类免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。在一个实施例中,该IgG₁是非岩藻糖基化的IgG₁。在一个实施例中,IgG₁的氨基酸序列包括N297A突变。在一个实施例中,IgG₁的氨基酸序列包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。在一个实施例中,IgG₁的氨基酸序列包括N297Q突变。在一个实施例中,IgG₄的氨基酸序列包括S228P突变。在一个实施例中,IgG₂的氨基酸序列包括C127S突变。在一个实施例中,该重链恒定区包括选自下组的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:32-37、53-54、以及64-71。在一个实施例中,该轻链恒定区选自下组,该组由以下各项组成:人类免疫球蛋白IgG κ 和IgG λ 。

[0030] 在一个实施例中,该抗体是人抗体。

[0031] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体与以下抗体结合人类OX40的相同表位,该抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT (SEQ

ID NO:3)的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体与以下抗体结合人类OX40的相同表位,该抗体包括:VH CDR1,其包括GFTFSGSA (SEQ ID NO:47)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括IRSKANSYAT (SEQ ID NO:48)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括TSGIYDSSGYDY (SEQ ID NO:49)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括QSLLSNGYNY (SEQ ID NO:44)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGS (SEQ ID NO:45)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:46)的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体与以下抗体结合人类OX40的相同表位,该抗体包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及轻链可变区,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0032] 在一个实施例中,该抗体是激动性的。在一个实施例中,该抗体激活、增强或诱导人类OX40的活性。在一个实施例中,该抗体诱导CD4⁺T细胞增殖。在一个实施例中,CD4⁺T细胞增殖是抗体浓度的基本上递增性的函数。在一个实施例中,CD4⁺T细胞增殖显示S形剂量响应曲线。在一个实施例中,该抗体通过抗-CD3-刺激的T细胞诱导IL-2、TNF α 、IFN γ 、IL-4、IL-10、IL-13、或其组合的产生。在一个实施例中,该抗体通过抗-CD3-刺激的外周血单核细胞(PBMC)诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、或其组合的产生。在一个实施例中,该抗体通过抗-CD3-刺激的PBMC诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生,其中TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生是抗体浓度的基本上递增性的函数。在一个实施例中,该抗体通过抗-CD3-刺激的PBMC诱导TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生,其中TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13的产生显示S形剂量响应曲线。在一个实施例中,该抗体通过SEA-刺激的T细胞诱导IL-2的产生并且通过SEA-刺激的T细胞抑制IL-10的产生。在一个实施例中,该抗体通过SEA-刺激的外周血单核细胞(PBMC)诱导IL-2的产生并且通过SEA-刺激的PBMC抑制IL-2的产生。在一个实施例中,该抗体通过SEA-刺激的PBMC诱导IL-2的产生,其中IL-2的产生是抗体浓度的基本上递增性的函数。在一个实施例中,该抗体通过SEA-刺激的PBMC诱导IL-2的产生,其中IL-2的产生显示S形剂量响应曲线。

[0033] 在一个实施例中,该抗体通过调节性T细胞缓解效应T细胞的抑制。

[0034] 在一个实施例中,该抗体通过效应T细胞和调节性T细胞的共培养诱导IL-2的产生并且通过效应T细胞和调节性T细胞的共培养抑制IL-10的产生。

[0035] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVK (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml)和例如

100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0036] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下比在0.032μg/ml的抗体的存在下的IL-2产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0037] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFNγ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2

10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0038] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体增加CD4⁺T细胞增殖,其中CD4⁺T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4⁺T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例

如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0039] 在一个实施例中,特异性结合OX40的抗体包括:VH CDR1,其包括GSAMH (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;VH CDR3,其包括GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;VL CDR1,其包括RSSQSLLSNGYNYLD (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL CDR2,其包括LGSNRAS (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL CDR3,其包括MQALQTPLT (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0040] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸

序列具有至少70%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0041] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司(Meso Scale Discovery)))所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下比在0.032μg/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0042] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml

和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时, IL-2的产生显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如, 20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如, 在孔中10⁵个细胞) 持续例如5天; 以及 (b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0043] 在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域, 其中该抗体, 与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如, 100ng/ml) 相组合地, 当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生, 如通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中在4 μ g/ml的抗体的存在下比在0.032 μ g/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生: (a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如, 20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如, 在孔中10⁵个细胞) 持续例如5天; 以及 (b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0044] 在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域, 其中该抗体, 与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如, 100ng/ml) 相组合地, 当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生, 如通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生: (a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如, 20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如, 在孔中10⁵个细胞) 持续例如5天; 以及 (b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域, 其中该抗体, 与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如, 100ng/ml) 相组合地, 当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生, 如通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时, IL-2的产生显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如, 20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及

97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中 10^5 个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0045] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下比在0.032μg/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中 10^5 个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0046] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中 10^5 个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中 10^5 个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0047] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的

VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下比在0.032μg/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0048] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0049] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下

比在0.032 μ g/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生：(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体（例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml）和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC（例如，在孔中10⁵个细胞）持续例如5天；以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））测量IL-2的滴度。

[0050] 在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A (SEA)（例如，100ng/ml）相组合地，当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生，如通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））所测量，其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生：(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体（例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml）和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC（例如，在孔中10⁵个细胞）持续例如5天；以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））测量IL-2的滴度。在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A (SEA)（例如，100ng/ml）相组合地，当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生，如通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））所测量，其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时，IL-2的产生显示S形剂量响应曲线，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体（例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml）和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC（例如，在孔中10⁵个细胞）持续例如5天；以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））测量IL-2的滴度。

[0051] 在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A (SEA)（例如，100ng/ml）相组合地，当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生，如通过例如电化学发光（例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒（细观发现公司））所测量，其中在4 μ g/ml的抗体的存在下比在0.032 μ g/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生：(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体（例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml）和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC（例如，在孔中10⁵个细胞）持续例如5天；以及(b) 收集澄清上清液并且通过

例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0052] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0053] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中在4μg/ml的抗体的存在下比在0.032μg/ml的抗体的存在下IL-2的产量更大。可以在例如包括以下步骤的测定中评估IL-2的产生:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0054] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域,其中该抗体当

与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0055] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的

存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7μg/ml和50μg/ml、1.6μg/ml和50μg/ml、3.1μg/ml和50μg/ml、或6.3μg/ml和50μg/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50μg/ml;或0.07、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50μg/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0056] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7μg/ml和50μg/ml、1.6μg/ml和50μg/ml、3.1μg/ml和50μg/ml、或6.3μg/ml和50μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50μg/ml;或0.07、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50μg/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8μg/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNFα、TNFβ、IFN γ、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类

灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中当抗OX40抗体浓度在例如 0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时, 一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在板结合的抗CD3抗体 (例如, 0.8 μ g/ml) 和不同浓度 (例如, 0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml; 或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml) 的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天; 以及 (b) 收集上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司) 或非人类灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 测量一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生。

[0057] 在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域, 其中该抗体当与板结合时, 与板结合的抗CD3抗体 (例如, 0.8 μ g/ml) 相组合地, 当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生, 如通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司) 或非人类灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在板结合的抗CD3抗体 (例如, 0.8 μ g/ml) 和不同浓度 (例如, 0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml; 或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml) 的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天; 以及 (b) 收集上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司) 或非人类灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 测量一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生。在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域, 其中该抗体当与板结合时, 与板结合的抗CD3抗体 (例如, 0.8 μ g/ml) 相组合地, 当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生, 如通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司) 或非人类灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 所测量, 其中当抗OX40抗体浓度在例如 0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时, 一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13) 的产生显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在板结合的抗CD3抗体 (例如, 0.8 μ g/ml) 和不同浓度 (例如, 0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml; 或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml) 的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天; 以及 (b) 收集上清液并且通过例如电化学发光 (例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司) 或非人类灵长动物 (NHP) V-Plex测定试剂盒 (细观发现公司)) 测量一种或多种细胞因子 (例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-

13)的产生。

[0058] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0059] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、

或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0060] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ

g/ml) 相组合地, 当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生, 如通过例如电化学发光(例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量, 其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时, 一种或多种细胞因子(例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在板结合的抗CD3抗体(例如, 0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如, 0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml; 或0.07、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天; 以及(b) 收集上清液并且通过例如电化学发光(例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如, TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0061] 在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域, 其中该抗体增加CD4+T细胞增殖, 其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37℃下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及(c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域, 其中该抗体增加CD4+T细胞增殖, 其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时, CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37℃下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及(c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0062] 在一个实施例中, 抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少70%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少70%一致性的VH结构域, 其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时, 该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37℃下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例

如,在孔中 10^5 个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0063] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中 10^5 个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中 10^5 个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0064] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少75%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少75%一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中 10^5 个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0065] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中 10^5 个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检

查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0066] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0067] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0068] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少85%一致性的

VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少85%一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0069] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0070] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0071] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml

之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37℃下用例如10μM羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3μg/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20μg/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2μg/ml和20μg/ml、或2μg/ml和20μg/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37℃下用例如10μM羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3μg/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20μg/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0072] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%一致性的VH结构域,其中当该抗体以20μg/ml的浓度相比于以2μg/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37℃下用例如10μM羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3μg/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20μg/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0073] 在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2μg/ml和20μg/ml、或2μg/ml和20μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37℃下用例如10μM羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3μg/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20μg/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在一个实施例中,抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2μg/ml和20μg/ml、或2μg/ml和20μg/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37℃下用例如10μM羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集

的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟；(b) 在充分洗涤之后，用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度（例如，0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml）的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞（例如，在孔中10⁵个细胞）；以及(c) 在例如第4天，用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0074] 在一个实施例中，抗体包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少98%一致性的VL结构域和与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少98%一致性的VH结构域，其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时，该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯（CFSE）对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟；(b) 在充分洗涤之后，用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度（例如，0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml）的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞（例如，在孔中10⁵个细胞）；以及(c) 在例如第4天，用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0075] 在一个实施例中，抗体包括人类免疫球蛋白IgG₁重链恒定区，其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：N297A、N297Q、D265A、以及其组合。在一个实施例中，抗体包括IgG₁重链恒定区，其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：D265A、P329A、以及其组合。

[0076] 在一个实施例中，特异性结合人类OX40的抗体是一种抗体，其中相对于该抗体与SEQ ID NO:55的人类OX40序列之间的结合，该抗体与变体OX40之间的结合大幅变弱，并且其中该变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列，除了选自下组的氨基酸突变以外，该组由以下各项组成：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。

[0077] 在一个实施例中，特异性结合人类OX40的抗体是一种抗体，其中相对于该抗体与SEQ ID NO:55的人类OX40序列之间的结合，该抗体与变体OX40之间的结合大幅变弱，并且其中该变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列，除了以下氨基酸突变以外：W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。

[0078] 在一个实施例中，特异性结合人类OX40的抗体是一种抗体，与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比，该抗体展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质（除了存在选自下组的氨基酸突变，该组由以下各项组成：N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合）降低的结合或不结合。

[0079] 在一个实施例中，抗体特异性结合人类OX40。特异性结合人类OX40的分离的抗体，其中与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比，该抗体展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质（除了存在氨基酸突变W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A）降低的结合或不结合。

[0080] 在一个实施例中，特异性结合人类OX40的抗体是特异性结合人类OX40序列的表位的抗体，该表位包括SEQ ID NO:55的选自下组的残基，该组由以下各项组成：60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。

[0081] 在一个实施例中，特异性结合人类OX40的抗体是特异性结合人类OX40序列的表位的抗体，该表位包括SEQ ID NO:55的残基58、60、62、80、88、93、99、以及115。

[0082] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗体是特异性结合SEQ ID NO:55的选自下组的至少一个残基的抗体,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。

[0083] 在一个实施例中,抗体包括重链可变区序列和轻链可变区序列,在此提供的抗体并且选自下组,该组由以下各项组成:Fab、Fab'、F(ab')₂、以及scFv片段。

[0084] 在一个实施例中,抗体包括人类免疫球蛋白IgG₁重链恒定区,并且其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合。在一个实施例中,抗体包括IgG₁重链恒定区,其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

[0085] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗体包括:(a)特异性结合人类OX40的第一抗原结合域;以及(b)不会特异性结合由人类免疫细胞表达的抗原的第二抗原结合域。

[0086] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:(a)包括VH互补决定区(CDR)1的第一重链可变域(VH),该VH CDR1包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH-CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;以及VH-CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;以及(b)包括VL-CDR1的第一轻链可变域(VL),该VL-CDR1包括RSSQSLLSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL-CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL-CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域与以下抗体一样地特异性结合人类OX40的相同表位,该抗体包括:VH,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以及VL,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一个实施例中,与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比,特异性结合人类OX40的抗原结合域展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质(除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合)降低的结合或不结合。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中VH包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中VL包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0087] 在一个实施例中,第二抗原结合域特异性结合非人类抗原。在一个实施例中,第二抗原结合域特异性结合病毒抗原。在一个实施例中,病毒抗原是HIV抗原。在一个实施例中,第二抗原结合域特异性结合鸡白蛋白或鸡卵溶菌酶。

[0088] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗体包括:(a)包括VH互补决定区(CDR)1的第一重链可变域(VH),该VH CDR1包括GSAMH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;VH-CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;以及VH-CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;以及(b)包括VL-CDR1的第一轻链可变域(VL),该VL-CDR1包括RSSQSLLSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;VL-CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;以及VL-CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域与以下抗体一样地特异性结合人类OX40的相同表位,该抗体包括:VH,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以及VL,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一个实施例中,与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比,特异性结合人类OX40的抗原结合域展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质(除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合)降低的结合或不结合。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中VH包括

SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括VH和VL,其中VL包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0089] 在一个实施例中,第二重链是Fc片段。

[0090] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VH,其包括与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VH,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VH,其包括衍生自人类IGHV3-73种系序列的氨基酸序列。

[0091] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VL,其包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VL-CDR3,其包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VL,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:轻链,其包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:VL,其包括衍生自人类IGKV2-28种系序列的氨基酸序列。

[0092] 在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括分别在SEQ ID NO:16和15中列出的VH和VL序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:重链,其包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域包括:重链,其包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0093] 在一个实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合。在一个实施例中,第一抗原结合域和第二抗原结合域包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域和第二重链或其片段包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、以及其组合。在一个实施例中,特异性结合人类OX40的抗原结合域和第二重链或其片段包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

[0094] 在一个实施例中,抗体与人类OX40拮抗。在一个实施例中,抗体灭活、降低或抑制人类OX40的活性。在一个实施例中,抗体抑制或减少人类OX40与人类OX40配体的结合。在一个实施例中,抗体抑制或减少人类OX40信号传导。在一个实施例中,抗体抑制或减少由人类OX40配体诱导的人类OX40信号传导。

[0095] 在一个实施例中,抗体包括可检测标签。

[0096] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体用作药物。

[0097] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体用作诊断剂。

[0098] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体用于体外检测样品中的OX40的用途。在一个实施例中,OX40是人类OX40。

[0099] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体用于体外激活、增强或诱导人类OX40活性的用途。在一个实施例中,抗体体外诱导CD4⁺T细胞增殖。

[0100] 在一个方面,在此提供了编码特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的分离的

核酸分子。在一个实施例中,核酸分子编码在此提供的抗OX40抗体的重链可变区或重链。在一个实施例中,核酸分子编码在此提供的抗OX40抗体的轻链可变区或轻链。在一个实施例中,核酸分子编码在此提供的抗OX40抗体的重链可变区或重链以及该抗体的轻链可变区或轻链。在一个实施例中,核酸分子编码重链可变区,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码轻链可变区,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。还在此提供了由此类核酸分子编码的分离的抗体。

[0101] 在一个方面,在此提供了包含此类核酸分子的载体。

[0102] 在一个方面,在此提供了包含此类核酸分子或此类载体的宿主细胞。在一个实施例中,宿主细胞选自下组,该组由以下各项组成:组织培养中的大肠杆菌、假单孢菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属、酵母菌、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、海拉(HeLa)、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10细胞、植物细胞、昆虫细胞及人类细胞。

[0103] 在一个方面,在此提供了产生特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的方法,该方法包括培养此类宿主细胞,从而核酸分子得以表达并且抗体得以产生。

[0104] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体、本发明的核酸分子、本发明的载体、和/或本发明的宿主细胞用作药物。

[0105] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体、本发明的核酸分子、本发明的载体、和/或本发明的宿主细胞用作诊断剂。

[0106] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体、本发明的核酸分子、本发明的载体、和/或本发明的宿主细胞用于体外检测样品中的OX40的用途。在一个实施例中,OX40是人类OX40。

[0107] 在一个实施例中,本发明涉及本发明的抗体用于体外激活、增强或诱导人类OX40活性的用途。在一个实施例中,抗体体外诱导CD4⁺T细胞增殖。

[0108] 在一个方面,在此提供了药物组合物,该药物组合物包括在此提供的特异性结合OX40的抗体、编码特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核酸分子、包含此种核酸分子的载体、或包含此种核酸分子或载体的宿主细胞。

[0109] 在一个方面,在此提供了药物组合物,该药物组合物包括在此提供的特异性结合OX40的抗体、编码特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核酸分子、包含此种核酸分子的载体、或包含此种核酸分子或载体的宿主细胞,用作药物。

[0110] 在一个方面,在此提供了药物组合物,该药物组合物包括在此提供的特异性结合OX40的抗体、编码特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核酸分子、包含此种核酸分子的载体、或包含此种核酸分子或载体的宿主细胞,用作诊断剂。

[0111] 在一个方面,在此提供了用于调节受试者的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。在一个实施例中,该方法用于增强或诱导受试者的免疫应答。在一个实施例中,调节免疫应答包括增强或诱导受试者的免疫应答。

[0112] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在调节免疫应答的方法中使用。

[0113] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物

用于在增强或诱导免疫应答的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0114] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在调节受试者的免疫应答的方法中使用。

[0115] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在增强或诱导受试者的免疫应答的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0116] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在调节受试者的免疫应答的方法中使用，该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。

[0117] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在增强或诱导受试者的免疫应答的方法中使用，该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0118] 在一个方面，在此提供了用于增强受试者的T细胞扩增以及T细胞效应子功能的方法，该方法包括向该受试者给予有效量的在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。

[0119] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在增强T细胞扩增以及T细胞效应子功能的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0120] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在增强受试者的T细胞扩增以及T细胞效应子功能的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0121] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在增强受试者的T细胞扩增以及T细胞效应子功能的方法中使用，该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0122] 在一个方面，在此提供了用于治疗受试者癌症的方法，该方法包括向该受试者给予有效量的在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。在一些实施例中，癌症选自下组，该组由以下各项组成：黑色素瘤、肾癌、以及前列腺癌。在一些实施例中，癌症选自下组，该组由以下各项组成：黑色素瘤、肾癌、前列腺癌、结肠癌、以及肺癌。在一些实施例中，肺癌是非小细胞肺癌 (NSCLC)。在一个实例中，该方法进一步包括向受试者给予检查点靶向剂。在一个实例中，检查点靶向剂选自下组，该组由以下各项组成：拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗CD137抗体、以及激动剂抗OX40抗体。

[0123] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗癌症的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0124] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者癌症的方法中使用。在一个实施例中，抗体是激动性的。

[0125] 在一个方面，本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者癌症的方法中使用，该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗

体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物。在一个实施例中,抗体是激动性的。

[0126] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)检查点靶向剂用作药物。在一个实施例中,抗体是激动性的。

[0127] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)检查点靶向剂,用于在治疗癌症的方法中使用。在一个实施例中,抗体是激动性的。

[0128] 在一个方面,本发明涉及药物组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)检查点靶向剂。

[0129] 如在此描述的抗体可以与IDO抑制剂组合使用以治疗癌症。在一个实施例中,该方法进一步包括向受试者给予吡哆胺-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。如在此描述的用于治疗癌症的IDO抑制剂以药物组合物的固体剂型(如片剂、丸剂或胶囊剂)存在,其中药物组合物包括IDO抑制剂以及药学上可接受的赋形剂。因此,如在此描述的抗体和如在此描述的IDO抑制剂可以作为分开的剂型分别、顺序或同时给予。在一个实施例中,胃肠外给予抗体,而口服给予IDO抑制剂。在具体实施例中,抑制剂选自下组,该组由以下各项组成:依帕卡朵丝坦(epacadostat)(因塞特公司(Incyte Corporation))、F001287(福克斯生物科学公司(Flexus Biosciences))、印朵目德(indoximod)(纽琳基因公司(NewLink Genetics))、以及NLG919(纽琳基因公司)。依帕卡朵丝坦(epacadostat)已描述于PCT公开号WO 2010/005958中,出于所有的目的将其通过引用以其全文结合在此。在一个实施例中,抑制剂是依帕卡朵丝坦(epacadostat)。在另一个实施例中,抑制剂是F001287。在另一个实施例中,抑制剂是印朵目德(indoximod)。在另一个实施例中,抑制剂是NLG919。

[0130] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)IDO抑制剂,用作药物。

[0131] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)IDO抑制剂,用于在治疗癌症的方法中使用。在一个方面,本发明涉及组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)IDO抑制剂。

[0132] 在此描述的抗体可以与疫苗组合使用。在一个具体实施例中,疫苗包括热休克蛋白肽复合物(HSPPC),其中HSPPC包括与一种或多种抗原肽(例如,肿瘤相关抗原肽)复合的热休克蛋白(例如,gp96蛋白、hsp70蛋白、或hsc70蛋白)。在一个实施例中,热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合。在一个实施例中,热休克蛋白是hsp70或hsc70蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合。在一个实施例中,热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合,其中HSPPC衍生自获得自受试者的肿瘤。在一个实施例中,热休克蛋白是hsp70或hsc70蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合,其中HSPPC衍生自获得自受试者的肿瘤。

[0133] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)疫苗,用作药物。在一个实施例中,抗体是激动性的。

[0134] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)疫苗,用于在治疗癌症的方法中使用。在一个实施例中,抗体是激动性的。

[0135] 在一个方面,本发明涉及组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物以及(b)疫苗。在一个实施例中,抗体是激动性

的。

[0136] 在一些实施例中,本披露提供了如在此描述的抗体在制造用于治疗癌症的药物中的用途。在某些实施例中,本披露提供了如在此描述的抗体用于在治疗癌症中使用。在某些实施例中,本披露提供了如在此描述的药物组合物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。在某些实施例中,本披露提供了如在此描述的药物组合物用于在治疗癌症中使用。

[0137] 在一个方面,在此提供了用于治疗受试者自身免疫或炎症性疾病或障碍的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。在一些实施例中,该疾病或障碍选自下组,该组由以下各项组成:移植排斥、血管炎、哮喘、类风湿关节炎、皮炎、炎性肠病、葡萄膜炎、以及狼疮。

[0138] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗自身免疫或炎症性疾病或障碍的方法中使用。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0139] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者自身免疫或炎症性疾病或障碍的方法中使用。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0140] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者自身免疫或炎症性疾病或障碍的方法中使用,该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0141] 在一个方面,在此提供了用于治疗受试者的传染性疾病的方法,该方法包括向该受试者给予有效量的在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、或药物组合物。

[0142] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗传染性疾病的方法中使用。在一个实施例中,抗体是激动性的。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0143] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者的传染性疾病的方法中使用。在一个实施例中,抗体是激动性的。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0144] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物用于在治疗受试者的传染性疾病的方法中使用,该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物。在一个实施例中,抗体是激动性的。在一个实施例中,抗体是拮抗性的。

[0145] 在此处提供的方法的一个实施例中,受试者是人。

[0146] 在一个方面,在此提供了用于检测样品中的OX40的方法,该方法包括将所述样品与在此提供的抗体接触。

[0147] 在一个方面,在此提供了用于体外检测样品中的OX40的方法,该方法包括将所述样品与在此提供的抗体接触。在一个实施例中,OX40是人类OX40。

[0148] 在一个方面,在此提供了用于体外检测样品中的OX40的方法,该方法包括将所述样品与在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物接触。在一个实施例中,OX40是人类OX40。

[0149] 在一个方面,在此提供了在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合

物,优选在此提供的抗体用于体外检测样品中的OX40的用途。

[0150] 在一个方面,在此提供了在此提供的抗体、核酸、载体、宿主细胞、和/或药物组合物、优选在此提供的抗体用于在检测受试者中的OX40中使用。在一个实施例中,受试者是人。

[0151] 在一个方面,在此提供了试剂盒,该试剂盒包括:在此提供的特异性结合OX40的抗体、编码特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核酸分子、包含此种核酸分子的载体、包含此种核酸分子或载体的宿主细胞、或包含此种抗体、核酸分子、载体、或宿主细胞的药物组合物,以及a)检测试剂、b) OX40抗原、c) 标识,该标识反映批准用于人类给药使用或销售、或d) 其组合。

[0152] 4.附图简要说明

[0153] 图1A、1B、1C、1D、以及1E:图1A是一对直方图,示出了抗OX40抗体pab1949和同种型对照与活化的人类CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的结合。图1B是一对直方图,示出了pab1949-1和同种型对照与未刺激和刺激的(使用抗CD3抗体)CD4⁺T细胞的结合。图1C是显示剂量滴定的pab1949-1或同种型对照与活化的人类CD4⁺T细胞的结合的图。图1D是一组直方图,测量了pab1949-1和同种型对照与人类未刺激的血源性免疫细胞群体的结合。图1E是pab1949和同种型对照与活化的食蟹猴(*cynomolgus monkey*) (食蟹猴(*Macaca fascicularis*))CD4⁺T细胞结合的直方图。

[0154] 图2A、2B、以及2C是次优CD3刺激测定以评估抗OX40抗体pab1949(图2A和2C)和pab2044(图2B)的刺激对富集的CD4⁺T细胞增殖作用的结果的图。抗体pab1949是人IgG₁抗体。抗体pab2044与pab1949具有相同的重链可变区和相同的轻链,但包括人类IgG₄恒定区。针对每种测试的抗体示出了细胞增殖(CFSE;x轴):图2A中IgG₁同种型对照、pab1949、以及抗CD28抗体作为阳性对照;以及图2B中IgG₄同种型对照、pab2044、以及抗CD28抗体。图2C是显示在次优抗CD3刺激下抗OX40抗体pab1949(0.002、0.02、0.2、2、以及20μg/ml)的滴定以及该抗体对富集的CD4⁺T细胞增殖的作用的线形图。

[0155] 图3A、3B、3C、3D、3E、以及3F是来自抗OX40抗体pab1949或pab1949-1与不同次优浓度的抗CD3抗体和IL-2相组合诱导的IFN γ 和TNF α 细胞因子产生的代表性分析结果。在图3A-3C中,对来自四个不同供体的PBMC进行测试:供体KM、供体TM、供体GS、以及供体SB。图3A和3B是显示来自供体SB(图3A)和供体GS(图3B)的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的细胞内细胞因子染色(IFN γ 和TNF α)的标绘图。对于抗OX40抗体pab1949或同种型对照标绘IFN γ +TNF α +多功能CD4⁺T细胞以及CD8⁺T细胞或TNF α +单功能CD4⁺T细胞以及CD8⁺T细胞的百分比(图3C)。图3C中显示的百分比代表在三种不同抗CD3抗体浓度下产生的最高应答。误差条代表标准偏差(n=2)。图3D、3E、以及3F是一组图,显示在类似的次优抗CD3刺激测定中,在衍生自供体GS的PBMC的细胞中由抗OX40抗体pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的TNF α +CD4⁺T细胞(图3D)、IFN γ +TNF α +多功能CD8⁺T细胞(图3E)、以及IFN γ +CD8⁺T细胞(图3F)的百分比。

[0156] 图4A、4B、以及4C是显示使用衍生自供体1、2、4、5、7、8、9、以及10的PBMC的细胞的次优抗CD3刺激测定结果的一组图。针对pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体的抗体浓度范围对IFN γ +,TNF α +,或IFN γ +TNF α +多功能CD4⁺或CD8⁺T细胞的百分比进行绘图。

[0157] 图5A是一组条形图,显示在次优抗CD3刺激测定中使用来自供体SB和供体GS的

PBMC, 抗OX40抗体pab1949或同种型对照对一系列细胞因子(IL-2、TNF α 、IL-10、IL-4、以及IL-13)分泌的作用。使用不同次优浓度的抗CD3抗体(克隆SP34)、IL2(20U/ml)、以及5 μ g/ml的抗OX40抗体或IgG₁同种型对照活化来自健康供体的PBMC, 并且在刺激后4天(SB#1A)或3天(SB#1B、SB#2、以及GS)测量细胞因子。图5A中的条形代表由在5 μ g/ml的抗OX40抗体浓度下测试的所有抗CD3浓度诱导的最高细胞因子分泌。误差条代表标准偏差(n=2)。图5B、5C、以及5D是一组图, 显示在次优浓度的抗CD3抗体存在下, 在衍生自供体GS的PBMC的细胞中由不同浓度的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体诱导的细胞因子(TNF α 、IL-10、或IL-13)的分泌量。

[0158] 图6A、6B、以及6C是一组图, 显示在次优抗CD3刺激测定中, 在衍生自供体1-10的PBMC的细胞中由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的GM-CSF的分泌量。ECL是指电化学发光。

[0159] 图7A、7B、以及7C类似于图6A、6B、以及6C, 显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的IL-2的分泌量。ECL是指电化学发光。

[0160] 图8A、8B、以及8C类似于图6A、6B、以及6C, 显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的TNF β 的分泌量。

[0161] 图9A和9B是条形图, 显示在以1:3的比例共培养的调节性T细胞(Treg)和效应T细胞(Teff)(Treg:Teff)中, 由可溶或交联的(使用抗Fc F(ab')₂) pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体诱导的IL-2(图9A)和IL-10(图9B)生产。

[0162] 图10A、10B、10C、10D、10E、10F、以及10G是描绘在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时, 抗OX40抗体对初代人类PBMC的功能活性的图。在不存在或存在固定浓度(10 μ g/ml)或不同浓度的抗OX40抗体或同种型对照的情况下用SEA刺激人类PBMC并且评估IL-2或IL-10细胞因子分泌。所测试的抗OX40抗体包括pab1949、pab1949-1、pab2193-1、pab1949-1-N297A、以及参考抗体pab1784和pab2045。在10 μ g/ml的抗OX40抗体浓度下, 对于所测试的抗体对IL-2(图10A)和IL-10(图10B)的倍数变化进行绘图。图10C、10D、以及10E是显示在pab1949、pab1949-1、或参考抗体pab1784以及pab2045的不同浓度下, IL-2产生的倍数变化的剂量响应曲线。通过学生t检验相比于由星号指示的同种型对照试样来确定统计显著性。误差条代表来自3次重复的标准偏差。图10A中的*代表p<0.001。图10B中的*代表p<0.01。图10F是图, 显示由pab1949-1、pab2193-1、IgG₁同种型对照抗体、或IgG₂同种型对照抗体剂量滴定诱导的IL-2产生。图10G是图, 显示响应于pab1949-1、pab1949-1-N297A、或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定的IL-2产生。

[0163] 图11A和11B是来自测定的结果, 在该测定中使用OX40NF- κ B-荧光素酶报告子细胞系对可溶(可溶条件, 图11A)或交联(复合条件, 图11B)的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体进行测试。针对所测试的不同抗体浓度对相对光单位(RLU)进行绘图。

[0164] 图12A和12B是来自报告子测定的结果, 在该报告子测定中测试当抗OX40抗体结合至表达OX40的靶细胞时抗OX40抗体用于活化表达Fc γ RIIIA(图12A)或Fc γ RIIAH131变体(图12B)的报告子细胞的能力。在图12A中, 针对不同浓度的pab1949-1和pab2044-1对 Δ RLU值进行绘图。 Δ RLU代表抗OX40抗体的RLU减去同种型对照的RLU。在图12B中, 针对浓度递增的pab1949-1、pab1949-1-S267E/L328F、pab2193-1、IgG₁同种型对照抗体或IgG₂同种型对照抗体对RLU值进行绘图。

[0165] 图13A是条形图,显示来自通过抗CD3/抗CD28珠粒活化的健康供体的nTregs、CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞上的人类OX40的 Δ MFI(如通过流式细胞术所测量的)。 Δ MFI代表抗OX40抗体的MFI减去同种型对照的MFI。所使用的抗OX40抗体是PE-缀合的小鼠抗人类OX40抗体(生物传奇公司(Biolegend):ACT35;目录:350004;批号:B181090)。图13B是显示来自两个健康供体的活化的nTreg和效应T细胞上的人类OX40的 Δ MFI的条形图。将细胞用商业抗OX40抗体(BER-ACT35克隆)或同种型对照抗体进行染色并且使用流式细胞术进行分析。图13C是使用Fc γ 受体IIIA(Fc γ RIIIA)报告子细胞系检验抗OX40抗体pab1949的图。在37 $^{\circ}$ C下,在pab1949或同种型对照存在下,将过量表达Fc γ RIIIA(158V/V多态性)的Jurkat NFAT-荧光素酶报告子细胞与活化的初代nTreg和效应T细胞共培养持续20小时。在20小时之后,记录相对光单位(RLU),其代表Fc γ RIIIA结合。 Δ RLU代表抗OX40抗体的RLU减去同种型对照的RLU。误差条代表标准偏差(n=2)。所示出的数据代表使用来自三个供体的细胞的实验。图13D类似于图13C,显示了来自使用修饰的实验方案测试pab1949-1的研究的结果。

[0166] 图14A是一组直方图,示出了通过流式细胞术测量的OX40的表面表达。从健康人类供体(a-c,n=3)的血液或从非小细胞肺癌患者(NSCLC)(d-f,n=3)的肿瘤组织中收集试样。将细胞群体定义如下:Tconv(CD3⁺、CD4⁺、CD8a⁻、CD25低、以及FOXP3⁻)或Treg(CD3⁺、CD4⁺、CD8a⁻、CD25高、以及FOXP3⁺)。图14B是一对来自类似于图14A中所描绘的研究的直方图,测量了来自子宫内膜癌样品的CD8⁺或CD4⁺T细胞、或Treg细胞中的表面OX40表达。图14C是显示不同肿瘤类型中Treg细胞和Teff细胞上OX40表达的条形图。图14D是汇总在与肿瘤相关的CD4⁺Teff细胞和Treg细胞中OX40表达的表格。“-”代表阴性/没有表达,“+”代表弱表达,“++”代表中度表达,并且“+++”代表高度表达。

[0167] 图15A和15B是一组图,显示在衍生自食蟹猴PBMC的细胞中由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的GM-CSF的分泌量。注意,Cyno 2和Cyno 9是指来自独立实验中所测试的相同食蟹猴的PBMC。从不同食蟹猴供体中收集所有其他PBMC样品。

[0168] 图16A和16B类似于图15A和15B,显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的IL-17的分泌量。

[0169] 图17A和17B类似于图15A和15B,显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的TNF β 的分泌量。

[0170] 图18A和18B类似于图15A和15B,显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的IL-5的分泌量。

[0171] 图19A和19B类似于图15A和15B,显示了由pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体剂量滴定诱导的IL-10的分泌量。

[0172] 图20A和20B是一组图,显示来自检验在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时,抗OX40抗体pab1949-1对初代食蟹猴PBMC的功能活性的测定的结果。针对pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体的剂量滴定,对由来自两个食蟹猴供体的PBMC分泌的IL-2量进行绘图。

[0173] 图21是汇总单克隆抗OX40抗体pab1949-1和pab1928与表达人类OX40丙氨酸突变体的1624-5细胞的结合的表格。

[0174] 5. 详细说明

[0175] 在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且调节OX40活性的抗体(例如,单克隆抗体)。例如,在一个方面,在此提供了特异性结合OX40并且增强、诱导、或增加一种或

多种OX40活性的抗体。例如,在另一个方面,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且灭活、降低或抑制一种或多种OX40活性的抗体。在具体实施例中,抗体是分离的。

[0176] 还提供了编码此类抗体的分离的核酸(多核苷酸),如互补DNA(cDNA)。进一步提供了载体(例如,表达载体)及细胞(例如,宿主细胞),其包括编码此类抗体的核酸(多核苷酸)。还提供了制造此类抗体的方法。在其他方面,在此提供了用于诱导、增加或增强OX40活性并且治疗某些病症(如癌症)的方法及用途。进一步提供了用于灭活、减少、或抑制OX40(例如,人类OX40)活性并且治疗某些病症(如炎症或自身免疫性疾病及障碍)的方法及用途。还提供了相关组合物(例如,药物组合物)、试剂盒及检测方法。

[0177] 5.1 术语

[0178] 如在此所使用的,术语“约”和“大约”,当用于修饰数值或数值范围时,显示5%至10%高于及5%至10%低于该值或范围的偏差维持在所述值或范围旨在意指的范围内。

[0179] 如在此所使用的,如果在指定域范围内(例如,在给定实验中,或使用多次实验的平均值)B随着A增加而大幅增加,那么在A值的指定域范围内,B是A的“基本上递增性的函数”。该定义允许相对于与任何A的较低值对应的B值,与A的给定值对应的B值低1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、或20%。

[0180] 如在此所使用的,术语“抗体”是本领域用语并且在此可以互换地使用,并意指具有特异性结合抗原的抗原结合部位的分子。

[0181] 抗体可以包括,例如单克隆抗体、重组产生的抗体、人源抗体、人源化抗体、表面更新的抗体(resurfaced antibodies)、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、四聚体抗体,其包括两个重链及两个轻链分子、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、杂缀合(heteroconjugate)抗体、单域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fvs(scFv)、驼峰化(camelized)抗体、亲合体(affybody)、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫化物连接的Fvs(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗抗Id抗体)、双特异性抗体、以及多特异性抗体。在某些实施例中,在此描述的抗体是指多克隆抗体群。抗体可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何种类(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、或IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})的免疫球蛋白分子。在某些实施例中,在此描述的抗体是IgG抗体、或其种类(例如,人类IgG₁、IgG₂、或IgG₄)或亚类。在一个具体实施例中,抗体是人源化单克隆抗体。在另一个具体实施例中,抗体是人类单克隆抗体,例如其是免疫球蛋白。在某些实施例中,在此描述的抗体是IgG₁、IgG₂、或IgG₄抗体。

[0182] 如在此所使用的,术语“抗原结合域”、“抗原结合区”、“抗原结合部位”及类似术语是指抗体分子的部分,该部分包括赋予抗体分子针对抗原的特异性的氨基酸残基(例如,互补决定区(CDR))。抗原结合区可以衍生自任何动物物种,如啮齿类动物(例如,小鼠、大鼠或仓鼠)以及人类。

[0183] 如在此所使用的,术语“可变区”或“可变域”可互换使用并且在本领域中是常见的。可变区典型地是指抗体的部分,一般而言,轻链或重链的部分,典型地,成熟重链中氨基末端的约110至120个氨基酸或110至125个氨基酸以及成熟轻链中约90至115个氨基酸,其在抗体之间序列上广泛地不同并且针对其特定抗原用于特定抗体的结合及特异性。序列的可变性集中于那些被称为互补决定区(CDR)的区,而可变域中更高度保守的区被称为框架区(FR)。不希望受任何具体机制或理论束缚的情况下,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体

与抗原的相互作用及特异性。在某些实施例中,可变区是人类可变区。在某些实施例中,可变区包括啮齿类动物或鼠科动物CDR以及人类框架区(FR)。在具体实施例中,可变区是灵长类动物(例如,非人类灵长动物)可变区。在某些实施例中,可变区包括啮齿类动物或鼠科动物CDR以及灵长类动物(例如,非人类灵长动物)框架区(FR)。

[0184] 术语“VL”及“VL结构域”可互换使用,是指抗体的轻链可变区。

[0185] 术语“VH”及“VH结构域”可互换使用,是指抗体的重链可变区。

[0186] 术语“卡巴特编号”及类似术语是本领域公认的并且是指抗体的重链和轻链可变区或其抗原结合部分中编号氨基酸残基的系统。在某些方面中,可以根据卡巴特编号系统确定抗体的CDR(参见,例如,卡巴特(Kabat)EA&吴(Wu)TT(1971)纽约科学学术年报(Ann NY Acad Sci)190:382-391以及卡巴特(Kabat)EA等人,(1991)免疫学重要的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生和公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH出版号91-3242)。使用卡巴特编号系统,抗体重链分子中的CDR典型地存在于氨基酸位置31至35,其任选地可以包括一个或两个额外的氨基酸在35之后(在卡巴特编号方案中被称为35A及35B)(CDR1)、氨基酸位置50至65(CDR2)及氨基酸位置95至102(CDR3)。使用卡巴特编号系统,抗体轻链分子中的CDR典型地存在于氨基酸位置24至34(CDR1)、氨基酸位置50至56(CDR2)及氨基酸位置89至97(CDR3)。在一个具体实施例中,已根据卡巴特编号方案确定在此描述的抗体的CDR。

[0187] 如在此所使用的,术语“恒定区”或“恒定域”是可互换的并且在本领域中具有共同意义。恒定区是抗体部分,例如,轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合但可展现出各种效应子功能,如与Fc受体的相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区相对于免疫球蛋白可变域一般具有更为保守的氨基酸序列。

[0188] 如在此所使用的,当关于抗体使用时,术语“重链”,基于恒定域的氨基酸序列可意指任何不同类型,例如, α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ ,其分别产生抗体的IgA、IgD、IgE、IgG及IgM类型,包含IgG的亚类,例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、以及IgG₄。

[0189] 如在此所使用的,当关于抗体使用时,术语“轻链”,基于恒定域的氨基酸序列可意指任何不同类型,例如,kappa(κ)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。在具体实施例中,轻链是人类轻链。

[0190] “结合亲和力”总体上是指分子(例如,抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如,抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,如在此所使用的,“结合亲和力”是指内部结合亲和力,其反映出结合对(例如,抗体与抗原)的成员之间1:1相互作用。分子X针对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)来表示。可以本领域中已知的多种方式测量和/或表示亲和力,包括但不限于,平衡解离常数(K_D)以及平衡缔合常数(K_A)。从 $k_{\text{关}}/k_{\text{开}}$ 的商计算 K_D ,而从 $k_{\text{开}}/k_{\text{关}}$ 的商计算 K_A 。 $k_{\text{开}}$ 是指例如抗体对抗原的结合速率常数,而 $k_{\text{关}}$ 是指例如抗体对抗原的解离。可以通过本领域普通技术人员已知的技术,如BIAcore®或KinExA来确定 $k_{\text{开}}$ 及 $k_{\text{关}}$ 。

[0191] 如在此所使用的,“保守性氨基酸取代”是其中的氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基所替代的取代。具有侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸),不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)。

酸、色氨酸),非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸), β -支链的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在某些实施例中,在一个或多个CDR中或抗体的一个或多个框架区中的一个或多个氨基酸残基可以被具有类似侧链的氨基酸残基取代。

[0192] 如在此所使用的,“表位”是本领域中的术语并且是指抗体可特异性结合的抗原的局部区。表位可以是,例如,多肽的连续氨基酸(线性或连续表位)或者表位可以是,例如,来自一种或多种多肽的两个或多个非连续区聚集在一起(构象、非线性、间断或非连续表位)。在某些实施例中,抗体所结合的表位可以由例如NMR光谱术、X射线衍射结晶学研究、ELISA分析、偶合质谱法(例如,液相层析质谱法)的氢/氘交换、基于数组的寡肽扫描分析、和/或诱变基因作图(例如,定点诱变基因作图)确定。对于X射线晶体学,可使用任一种本领域中已知的方法完成结晶(例如,吉尔格(Giegé)R等人,(1994)晶体学报D辑:生物晶体学(Acta Crystallogr D Biol Crystallogr) 50(Pt 4):339-350;麦克弗森(McPherson)A(1990)欧洲生物化学杂志(Eur J Biochem) 189:1-23;钱(Chayen)NE(1997)结构(Structure) 5:1269-1274;麦克弗森A(1976)生物化学杂志(J Biol Chem) 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可使用为人熟知的X射线衍射技术进行研究并且可使用计算机软件(如X-PLOR(耶鲁大学(Yale University),1992,由分子模拟公司(Molecular Simulations,Inc.)精细化;参见,例如,酶学方法(Meth Enzymol) (1985)第114和115卷,编辑威科夫(Wyckoff)HW等人;U.S.2004/0014194)、以及BUSTER(布里科奈(Bricogne)G(1993)晶体学报D辑:生物晶体学 49(Pt 1):37-60;布里科奈G(1997)酶学方法276A:361-423,编辑卡特(Carter)CW;罗维西(Roversi)P等人,(2000)晶体学报D辑:生物晶体学 56(Pt 10):1316-1323)。诱变基因作图研究可使用本领域技术人员已知的任何方法来完成。参见,例如,钱贝(Champe)M等人,(1995)生物化学杂志270:1388-1394以及坎宁安(Cunningham)BC和威尔斯(Wells)JA(1989)科学244:1081-1085关于诱变技术的描述,包括丙氨酸分区诱变技术。在一个具体实施例中,使用丙氨酸扫描诱变研究确定抗体的表位。

[0193] 如在此所使用的,术语“免疫特异性结合”、“免疫特异性识别”、“特异性结合”以及“特异性识别”在抗体背景下是类似术语,并且是指结合抗原(例如,表位或免疫复合物)的分子,而此种结合是本领域技术人员所理解的。例如,特异性结合抗原的分子通常以较低亲和性可结合到其他肽或多肽上,其通过例如免疫测定、**BLIAcore**[®]、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,博伊西(Boise),爱达荷州(ID))或其他本领域中已知的分析来确定。在一个具体实施例中,免疫特异性结合一种抗原的分子以至少2对数、2.5对数、3对数、4对数或高于当分子非特异性结合另一种抗原时的 K_A 的 K_A 结合到该抗原。在具有抗OX40抗原结合域和不特异性结合由人类免疫细胞表达的抗原的第二抗原结合域的抗体背景下,术语“免疫特异性结合”、“免疫特异性识别”、“特异性结合”以及“特异性识别”是指针对多于一种抗原具有突出特异性的抗体(即,与第二抗原结合域相关的OX40和抗原)。

[0194] 在另一个具体实施例中,免疫特异性结合抗原的分子在类似结合条件下不与其他蛋白交叉反应。在另一个具体实施例中,免疫特异性结合抗原的分子不与其他非OX40蛋白交叉反应。在一个具体实施例中,在此提供了以比与另一种不相关抗原较高的亲和性结合OX40的抗体。在某些实施例中,在此提供了以20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%亲和性或比与另一种不相关抗原更高

的亲合性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体, 如通过例如放射免疫测定、表面等离子共振或动力学排除测定法所测量的。在一个具体实施例中, 在此描述的抗OX40抗体与不相关非OX40蛋白的结合程度小于该抗体与OX40蛋白结合的10%、15%或20%, 如通过例如放射免疫测定所测量的。

[0195] 在一个具体实施例中, 在此提供了以比与另一种OX40较高的亲合性结合人类OX40的抗体。在某些实施例中, 在此提供了以5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%亲合性或比与另一种OX40该高的亲合性结合人类OX40的抗体, 如通过例如放射免疫测定、表面等离子共振或动力学排除测定法所测量的。在一个具体实施例中, 在此描述的结合人类OX40的抗体将以小于该抗体与人类OX40蛋白结合的10%、15%或20%结合另一种OX40蛋白质, 如通过例如放射免疫测定、表面等离子共振或动力学排除测定法所测量的。

[0196] 如在此所使用的, 术语“OX40受体”或“OX40”或“OX40多肽”是指OX40包括但不限于, 天然OX40、OX40的亚型或OX40的种间OX40同系物。Ox40又称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (TNFRSF4)、ACT35、CD134、IMD16、以及TXGP1L。GenBank™登录号BC105070和BC105072提供了人类OX40核酸序列。Refseq号NP_003318.1提供了人类OX40的氨基酸序列。人类OX40的不成熟氨基酸序列提供为SEQ ID NO:17。人类OX40的成熟氨基酸序列提供为SEQ ID NO:55。人类OX40由Entrez Gene指定为GeneID:7293。RefSeq号XM_005545122.1和XP_005545179.1分别提供了预测的食蟹猴OX40核酸序列和氨基酸序列。还已经报道了人类OX40的可溶亚型(泰勒(Taylor)L等人, (2001) 免疫学方法杂志255:67-72)。如在此所使用的, 术语“人类OX40”是指包括SEQ ID NO:55的多肽序列的OX40。

[0197] 如在此所使用的, 术语“OX40配体”和“OX40L”是指肿瘤坏死因子配体超家族成员4 (TNFSF4)。OX40L另外被称为CD252、GP34、TXGP1、以及CD134L。GenBank™登录号D90224.1和AK297932.1提供了示例性的人类OX40L核酸序列。RefSeq号NP_003317.1和Swiss-Prot登录号P23510-1提供了针对亚型1的示例性人类OX40L氨基酸序列。RefSeq号NP_001284491.1和Swiss-Prot登录号P23510-2提供了针对亚型2的示例性人类OX40L氨基酸序列。人类OX40L由Entrez Gene指定为GeneID:7292。在一个具体实施例中, OX40L是SEQ ID NO:42的人类OX40L亚型1或SEQ ID NO:43的亚型2。

[0198] 如在此所使用的, 术语“宿主细胞”可以是任何类型的细胞(例如, 原代细胞、培养物中的细胞或来自细胞系的细胞)。在具体实施例中, 术语“宿主细胞”是指用核酸分子转染的细胞以及此种细胞的子代或潜在子代。此种细胞的子代可以不与用核酸分子转染的亲本细胞相同, 因为例如可能在后代中或核酸分子整合进宿主细胞基因组中时发生的突变或环境影响。

[0199] 如在此所使用的, 在给予受试者治疗的背景下, 术语“有效量”是指达到所希望的预防或治疗效果的治疗的量。有效量的实例提供于以下章节5.5.1.3中。

[0200] 如在此所使用的, 术语“受试者”与“患者”可互换地使用。受试者可以是动物。在一些实施例中, 受试者是哺乳动物, 诸如非灵长类(例如, 牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类(例如, 猴或人类), 最优选地是人类。在一些实施例中, 受试者是食蟹猴。在某些实施例中, 此类术语是指非人类动物(例如, 非人类动物, 诸如猪、马、牛、猫或狗)。在一些实施例中, 此类术语是指宠物或家畜。在具体实施例中, 此类术语是指人类。

[0201] 如在此所使用的,如果相对于测试抗体与第二抗原之间的结合,测试抗体与第一抗原之间的结合降低了至少30%、40%、50%、60%、70%或80%,那么相对于测试抗体与第二抗原之间的结合,测试抗体与第一抗原之间的结合“大幅变弱”,如例如在流式细胞术分析中所测量的。

[0202] 两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间“百分比一致性”的确定也可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的一个具体、非限制性的实例是卡尔林(Karlin)S和阿尔丘尔(Altschul)SF(1990)美国科学院院报87:2264-2268的算法,该算法在卡尔林S和阿尔丘尔SF(1993)美国科学院院报90:5873-5877中被修改。此种算法被结合到阿尔丘尔SF等人,(1990)分子生物学杂志215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可由NBLAST核苷酸程序参数设定为例如分数=100,字长=12,来进行以获得与在此描述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白检索可由XBLAST程序参数设定为例如分数50,字长=3,来进行以获得与在此描述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目标的有缺口的比对,可以利用如在阿尔丘尔SF等人,(1997)核酸研究25:3389-3402中所述的有缺口的BLAST。可替代地,可以将PSI-BLAST用于进行检测分子之间的距离关系的迭代检索(Id.)。当运用BLAST、有缺口的BLAST以及PSI-BLAST程序时,可以使用对应程序的(例如,XBLAST及NBLAST的)默认参数(参见,例如,在万维网(ncbi.nlm.nih.gov)上的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI))。用于序列比较的数学算法的另一个具体、非限制性的实例是梅耶斯(Myers)和米勒(Miller)的算法(1988,CABIOS 4:11-17)。此种算法被结合到ALIGN程序(第2.0版)中,该程序是GCG序列排比软件包的一部分。当运用ALIGN程序用于比较氨基酸序列,可使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分。

[0203] 可使用类似于上述那些技术的技术,在容许或不容许缺口的情况下确定两个序列之间的百分比一致性。在计算百分比一致性中,典型地仅计数确切的匹配。

[0204] 如在此所使用的,术语“不结合由人类免疫细胞表达的抗原的抗原结合域”意指该抗原结合域不结合由任何造血起源的人类细胞表达的抗原,该人类细胞在免疫应答中发挥作用。免疫细胞包括淋巴细胞(如B细胞和T细胞);自然杀伤细胞;以及骨髓细胞(如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、以及粒细胞)。例如,此种结合域不会结合OX40或TNF受体超家族的由人类细胞表达的任何其他成员。然而,该抗原结合域可以结合例如但不限于以下各项的抗原:在其他生物而并非人类中表达的抗原(即非人类抗原);不是由野生型人类细胞表达的抗原;或病毒抗原(包括但不限于,来自不感染人类细胞的病毒的抗原、或不存在于不受感染的人类免疫细胞中的病毒抗原)。

[0205] 5.2 抗体

[0206] 在一个具体方面,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体(例如,单克隆抗体(如嵌合、人源化、或人抗体))。

[0207] 在某些实施例中,在此描述的抗体结合人类CD4⁺T细胞和人类CD8⁺T细胞。在某些实施例中,在此描述的抗体结合人类CD4⁺细胞和食蟹猴CD4⁺T细胞。

[0208] 在一个具体实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链可变区(VL),该轻链可变区包括:

[0209] (a) 包括氨基酸序列RSSQSLHNSNGYNYLD(SEQ ID NO:1)、由其组成、或基本上由其

组成的VL CDR1,

[0210] (b) 包括氨基酸序列LGSNRAS (SEQ ID NO:2)、由其组成、或基本上由其组成的VL CDR2,以及

[0211] (c) 包括氨基酸序列MQALQTPLT (SEQ ID NO:3)、由其组成、或基本上由其组成的VL CDR3,如表1中所示。

[0212] 在一些实施例中,抗体包括在此描述的VL框架区。在具体实施例中,抗体包括表3中所列抗体的VL框架区(FR)。

[0213] 在另一个实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括重链可变区(VH),该重链可变区包括:

[0214] (a) 包括氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:4)、由其组成、或基本上由其组成的VH CDR1,

[0215] (b) 包括氨基酸序列RIRSKANSYATAYAA SVKG (SEQ ID NO:5)、由其组成、或基本上由其组成的VH CDR2,以及

[0216] (c) 包括氨基酸序列GIYDSSGYDY (SEQ ID NO:6)、由其组成、或基本上由其组成的VH CDR3,如表2中所示。

[0217] 在一些实施例中,抗体包括在此描述的VH框架。在具体实施例中,抗体包括表4中所列抗体的VH框架区。

[0218] 表1.VL CDR氨基酸序列¹

[0219] 抗体	VL CDR1 (SEQ ID NO:)	VL CDR2 (SEQ ID NO:)	VL CDR3 (SEQ ID NO:)
[0220] pab1949	RSSQSLLHSNGYNY LD (1)	LGSNRAS (2)	MQALQTPLT (3)

[0221] ¹表1中的VL CDR是根据卡巴特(Kabat)确定的。

[0222] 表2.VH CDR氨基酸序列²

[0223] 抗体	VH CDR1 (SEQ ID NO:)	VH CDR2 (SEQ ID NO:)	VH CDR3 (SEQ ID NO:)
pab1949	GSAMH (4)	RIRSKANSYATAYAA SVKG (5)	GIYDSSGYDY (6)

[0224] ²表2中的VH CDR是根据卡巴特(Kabat)确定的。

[0225] 表3.VL FR氨基酸序列³

[0226] 抗体	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
pab1949	DIVMTQSPLSLP VTPGEPASISC (7)	WYLQKPG QSPQLLIY (8)	GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEA EDVGVYYC (9)	FGGGTKVEI K (10)

[0227] ³表3中描述的VL框架区是针对CDR基于卡巴特编号系统的边界而确定的。换言之，VL CDR是通过卡巴特 (Kabat) 确定的，并且框架区是围绕呈FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、以及FR4形式的可变区中的CDR的氨基酸残基。

[0228] 表4.VH FR氨基酸序列⁴

[0229]	抗体	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
	pab1949	EVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAA SGFTFS (11)	WVRQASG KGLEWVG (12)	RFTISRDDSKNT AYLQMNSLKTE DTAVYYCTS (13)	WGQGTLV TVSS (14)

[0230] ⁴表4中描述的VH框架区是针对CDR基于卡巴特编号系统的边界而确定的。换言之，VH CDR是通过卡巴特 (Kabat) 确定的，并且框架区是围绕呈FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、以及FR4状态的可变区中的CDR的氨基酸残基。

[0231] 在具体实施例中，抗体包括表3中所列出的四个VL框架区 (FR) 以及表4中所列出的四个VH框架区 (FR)。

[0232] 在某些实施例中，在此提供了特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 并且包括pab1949或pab2044的轻链可变区 (VL) CDR和重链可变区 (VH) CDR的抗体，例如，如在表1和2中所列出的 (即SEQ ID NO:1-6)。在某些实施例中，在此提供了特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 并且包括pab1949或pab2044的轻链可变区 (VL) CDR和重链可变区 (VH) CDR的抗体，例如，如在表1和2中所列出的 (即SEQ ID NO:1-6)，并且VL框架区和VH框架区在表3和4中列出。

[0233] 在一个具体实施例中，在此描述的特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括轻链可变区 (VL)，该轻链可变区包括：如在表1中所列出的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3和在表3中所列出的VL框架区。

[0234] 在某些实施例中，抗体包括轻链可变框架区，该轻链可变框架区衍生自由人类基因编码的氨基酸序列，其中该氨基酸序列是IGKV2-28*01的氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)。

[0235] 在一个具体实施例中，在此描述的特异性结合OX40 (例如，人类OX40)

[0236] 的抗体包括重链可变区 (VH)，该重链可变区包括：如在表2中所列出的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3和在表4中所列出的VH框架区。

[0237] 在某些实施例中，抗体包括重链可变框架区，该重链可变框架区衍生自由人类基因编码的氨基酸序列，其中该氨基酸序列是IGHV3-73*01的氨基酸序列 (SEQ ID NO:19)。

[0238] 在一个具体实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括：VL结构域，其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一个具体实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成、或基本上由其组成的VL结构域。

[0239] 在某些实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括：VH结构域，其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成、或基本上由其组成的VH结构域。

[0240] 在某些实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括VH结构域和VL结构域，其中VH结构域和VL结构域分别包括SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施例中，特异性结合OX40 (例如，人类OX40) 的抗体包括VH结构域和VL结构域，其中VH

结构域和VL结构域分别由SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成、或基本上由其组成。

[0241] 在某些方面中,在此描述的抗体可单独地依其VL结构域或单独地依其VH结构域、或单独地依其3个VL CDR或单独地依其3个VH CDR进行描述。参见,例如,雷德(Rader)C等人,(1998)美国科学院院报95:8910-8915,将其通过引用以其全文结合在此,其描述了小鼠抗 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体的人源化,通过分别从人类轻链或重链文库中鉴别互补轻链或重链,从而得到具有与原始抗体亲和性一样高或高于其的亲和性的人源化抗体变体。还参见克拉克森(Clackson)T等人,(1991)自然352:624-628,将其通过引用以其全文结合在此,其描述了通过使用特定VL结构域(或VH结构域)并筛选用于互补可变域的文库而产生结合特定抗原的抗体的方法。筛选产生针对特定VH结构域的14个新配偶体以及针对特定VL结构域的13个新配偶体,这些配偶体是强结合剂,如通过ELISA所确定的。还参见金姆(Kim)SJ和洪(Hong)HJ,(2007)微生物学杂志(J Microbiol)45:572-577,将其通过引用以其全文结合在此,其描述了通过使用特定VH结构域并筛选用于互补VL结构域的文库(例如,人类VL文库)而产生结合特定抗原的抗体的方法;所选择的VL结构域进而可用于引导选择额外的互补(例如,人类)VH结构域。

[0242] 在某些方面中,抗体的CDR可根据乔西亚编号方案(Chothia numbering scheme)(其是指免疫球蛋白结构环的位置)来确定(参见,例如,乔西亚C和莱斯克(Lesk)Am,(1987),分子生物学杂志196:901-917;Al-Lazikani B等人,(1997)分子生物学杂志273:927-948;乔西亚C等人,(1992)分子生物学杂志227:799-817;拉蒙塔诺(Tramontano)A等人,(1990)分子生物学杂志215(1):175-82;以及美国专利号7,709,226)。典型地,当使用卡巴特编号规定(Kabat numbering convention)时,Chothia CDR-H1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDR-H2环存在于重链氨基酸52至56处,并且Chothia CDR-H3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDR-L1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDR-L2环存在于轻链氨基酸50至56处,并且Chothia CDR-L3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用卡巴特编号规定进行编号时,Chothia CDR-H1环的末端根据环的长度在H32及H34之间变化(这是因为卡巴特编号方案将插入置于H35A及H35B处;如果35A和35B均不存在,则环在32处终止;或仅35A存在,则环在33处终止;若35A和35B两者都存在,则环在34处终止)。

[0243] 在某些方面中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的VL的Chothia VL CDR的抗体。在某些方面中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的VH的Chothia VH CDR的抗体。在某些方面中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的VL的Chothia VL CDR并且包括pab1949或pab2044的VH的Chothia VH CDR的抗体。在某些实施例中,特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施例中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括Kabat CDR和Chothia CDR组合的抗体。

[0244] 在某些方面中,抗体的CDR可根据如描述于勒弗朗(Lefranc)M-P,(1999)免疫学家(The Immunologist)7:132-136以及勒弗朗M-P等人,(1999)核酸研究(Nucleic Acids Res)27:209-212中的IMGT编号系统来确定。根据IMGT编号方案,VH-CDR1在位置26至35处,

VH-CDR2在位置51至57处,VH-CDR3在位置93至102处,VL-CDR1在位置27至32处,VL-CDR2在位置50至52处,并且VL-CDR3在位置89至97处。在一个具体实施例中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的CDR的抗体,如通过IMGT编号系统(例如,如描述于上述勒弗朗M-P(1999)以及上述勒弗朗M-P等人,(1999)中)所确定的。

[0245] 在某些方面中,抗体的CDR可根据麦克卡伦(MacCallum)RM等人,(1996)分子生物学杂志262:732-745来确定。还参见,例如,马丁(Martin)A.在《抗体工程》(Antibody Engineering)中的“抗体可变域的蛋白质序列及结构分析(“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”)”,康特曼(Kontermann)和迪贝尔(Dübel),编辑,第31章,第422-439页,柏林斯普林格出版社(Springer-Verlag),柏林(Berlin)(2001)。在一个具体实施例中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的CDR的抗体,如通过麦克卡伦RM等人中的方法所确定的。

[0246] 在某些方面中,抗体的CDR可根据AbM编号方案来确定,该编号方案是指AbM高变区,这些高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的平衡(compromise),并且被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件(牛津大学分子小组公司(Oxford Molecular Group, Inc.))使用。在一个具体实施例中,在此提供了特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括pab1949或pab2044的CDR的抗体,如通过AbM编号方案所确定的。

[0247] 在一个具体实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),沿在此描述的抗体的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或多个CDR的位置可以变化一、二、三、四、五或六个氨基酸位置。例如,在一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),相对于在此描述的抗体(例如,pab1949或pab2044)的CDR位置,定义在此描述的抗体的CDR的位置可以通过将CDR的N端和/或C端边界移位一、二、三、四、五或六个氨基酸而变化。在另一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),沿在此描述的抗体的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或多个CDR的长度可以变化(例如,变短或变长)一、二、三、四、五或更多个氨基酸。

[0248] 在一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3可以比在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)短一、二、三、四、五或更多个氨基酸。在另一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3可以比在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)长一、二、三、四、五或更多个氨基酸。在另一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3的氨基端可以相比于在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)延长一、

二、三、四、五或更多个氨基酸。在另一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3的羧基末端可以相比于在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)延长一、二、三、四、五或更多个氨基酸。在另一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3的氨基端可以相比于在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)缩短一、二、三、四、五或更多个氨基酸。在一个实施例中,只要能维持免疫特异性结合至OX40(例如,人类OX40)(例如,基本上维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%),在此描述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、和/或VH CDR3的羧基末端可以相比于在此描述的一个或多个CDR(例如,SEQ ID NO:1-6)缩短一、二、三、四、五或更多个氨基酸。本领域中已知的任何方法都可以用于确认免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)是否得以维持,例如,在此提供的“实例”部分(第6章节)中所述的结合分析及条件。

[0249] 在具体方面,在此提供了包括抗体轻链和重链(例如,分别的轻链和重链)的抗体。关于轻链,在一个具体实施例中,在此描述的抗体轻链是 κ 轻链。在另一个具体实施例中,在此描述的抗体轻链是 λ 轻链。在又一个具体实施例中,在此描述的抗体轻链是人类 κ 轻链或人类 λ 轻链。在一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40多肽(例如,人类OX40)的抗体包括轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包括在SEQ ID NO:15中列出的序列,并且其中轻链的恒定区包括人类 κ 轻链恒定区的氨基酸序列。在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包括在SEQ ID NO:15中列出的序列,并且其中轻链的恒定区包括人类 λ 轻链恒定区的氨基酸序列。在一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链,其中VL结构域的氨基酸序列包括在SEQ ID NO:15中列出的序列,并且其中轻链的恒定区包括人类 κ 或 λ 轻链恒定区的氨基酸序列。人类恒定区序列的非限制性实例已经在本领域中有描述,例如,参见美国专利号5,693,780以及上述卡巴特EA等人,(1991)。

[0250] 在一个具体实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链,该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列。

[0251] 关于重链,在一个具体实施例中,在此描述的抗体重链可以是 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 重链。在另一个具体实施例中,所述抗体重链可以包括人类 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 重链。在一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括重链,其中VH结构域的氨基酸序列可以包括在SEQ ID NO:16中列出的序列,并且其中重链的恒定区包括人类 γ 重链恒定区的氨基酸序列。在一个具体实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括重链,其中VH结构域的氨基酸序列包括在SEQ ID NO:16中列出的序列,并且其中重链的恒定区包括在此描述或本领域已知的人类重链的氨基酸。人类恒定区序列的非限制性实例已经在本领域中有描述,例如,参见美国专利号5,693,780以及上述卡巴特EA等人,(1991)。

[0252] 在一个具体实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括重链,该重链包括在SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列。在一个具体实施例中,在此描述的

特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:60中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:61中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:51中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:62中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:52中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括重链, 该重链包括在SEQ ID NO:63中列出的氨基酸序列。

[0253] 在一个具体实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括包含任何在此描述的氨基酸序列的VL结构域和VH结构域, 并且其中恒定区包括IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY免疫球蛋白分子、或人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY免疫球蛋白分子恒定区的氨基酸序列。在另一个具体实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括包含任何在此描述的氨基酸序列的VL结构域和VH结构域, 并且其中恒定区包括IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY免疫球蛋白分子、任何种类 (例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂) 或任何亚类 (例如, IgG_{2a} 以及 IgG_{2b}) 免疫球蛋白分子恒定区的氨基酸序列。在一个具体实施例中, 恒定区包括人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY免疫球蛋白分子、任何种类 (例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂) 或任何亚类 (例如, IgG_{2a} 以及 IgG_{2b}) 免疫球蛋白分子恒定区的氨基酸序列。

[0254] 在另一个具体实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括包含任何在此描述的氨基酸序列的VL结构域和VH结构域, 并且其中恒定区包括人类IgG₁ (例如, 同种异型G1m3、G1m17,1或G1m17,1,2)、人类IgG₂、或人类IgG₄恒定区的氨基酸序列。在一个具体实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括包含任何在此描述的氨基酸序列的VL结构域和VH结构域, 并且其中恒定区包括人类IgG₁ (同种异型G1m3) 恒定区的氨基酸序列。人类恒定区的非限制性实例在本领域中有描述, 例如, 参见上述卡巴特 (Kabat) EA等人, (1991)。

[0255] 在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括: 轻链, 该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列, 以及重链, 该重链包括在SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括: 轻链, 该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列, 以及重链, 该重链包括在SEQ ID NO:60中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括: 轻链, 该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列, 以及重链, 该重链包括在SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括: 轻链, 该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列, 以及重链, 该重链包括在SEQ ID NO:61中列出的氨基酸序列。在另一个实施例中, 在此描述的特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括: 轻链, 该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列, 以及重链, 该重链包括在SEQ ID NO:51或52中列出的氨基酸序

列。在另一个实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:轻链,该轻链包括在SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列,以及重链,该重链包括在SEQ ID NO:62或63中列出的氨基酸序列。

[0256] 在某些实施例中,将一、二或更多个突变(例如,氨基酸取代)导入在此描述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人类IgG₁的残基231至340)和/或CH3结构域(人类IgG₁的残基341-447)和/或铰链区,其具有根据卡巴特编号系统的编号(例如,卡巴特(Kabat)中的EU指数(EU index)),以改变抗体的一种或多种功能特性(如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性)。

[0257] 在某些实施例中,将一、二或更多个突变(例如,氨基酸取代)导入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,这样使得铰链区中的半胱氨酸残基数目发生变化(例如,增加或减少),如在例如美国专利号5,677,425中所描述的。可以将CH1结构域的铰链区中的半胱氨酸残基数目改变,以例如协助轻链和重链的组装、或以改变(例如,增加或减少)该抗体的稳定性。

[0258] 在一些实施例中,将一、二或更多个突变(例如,氨基酸取代)导入在此描述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人类IgG₁的残基231至340)和/或CH3结构域(人类IgG₁的残基341-447)和/或铰链区,其具有根据卡巴特编号系统的编号(例如,卡巴特(Kabat)中的EU指数(EU index)),以增加或减少抗体对效应细胞表面上Fc受体(例如,活化的Fc受体)的亲合性。降低或增加抗体对Fc受体的亲和性的抗体的Fc区中的突变以及用于将此类突变导入到Fc受体或其片段中的技术是本领域技术人员已知的。抗体的Fc受体中发生可以改变抗体对Fc受体的亲和性的突变的实例描述于例如,史密斯(Smith) P等人,(2012)美国科学院院报109:6181-6186、美国专利号6,737,056、以及国际公开号W0 02/060919;W0 98/23289;以及W0 97/34631中,将其通过引用结合在此。

[0259] 在一个具体实施例中,将一、二或更多个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)导入到IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中,以改变(例如,减少或增加)体内抗体的半衰期。关于将改变(例如,减少或增加)体内抗体半衰期的突变的实例,参见,例如,国际公开号W0 02/060919;W0 98/23289;以及W0 97/34631;以及美国专利号5,869,046、6,121,022、6,277,375以及6,165,745。在一些实施例中,将一、二或更多个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)导入到IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中,以减少体内抗体的半衰期。在其他实施例中,将一、二或更多个氨基酸突变(即取代、插入或缺失)导入到IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中,以增加体内抗体的半衰期。在一个具体实施例中,抗体可以在第二恒定(CH2)结构域(人类IgG₁的残基231至340)和/或第三恒定(CH3)结构域(人类IgG₁的残基341-447)中具有一个或多个氨基酸突变(例如,取代),其具有根据卡巴特(Kabat)中EU指数(EU index)的编号(上述卡巴特EA等人,(1991))。在一个具体实施例中,在此描述的抗体的IgG₁的恒定区包括在位置252甲硫氨酸(M)取代为酪氨酸(Y)、在位置254丝氨酸(S)取代为苏氨酸(T)、以及在位置256苏氨酸(T)取代为谷氨酸(E),根据卡巴特(Kabat)中的EU指数(EU index)进行编号。参见美国专利号7,658,921,将其通过引用结合在此。此种类型的突变体IgG(称为“YTE突变体”)相较于相同抗体的野生型形式已显示展现增加四倍的半衰期(参见达尔阿夸(Dall'Acqua) WF等人,(2006)生物化学杂志281:23514-24)。在某些实施例中,抗体包括IgG恒定域,该恒定域包括在位置251至257、285至290、308至314、385至389及428至436处氨基

酸残基的一、二、三或更多个氨基酸取代,根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号。

[0260] 在另外的实施例中,将一、二或更多个氨基酸取代导入到IgG恒定域Fc区中,以改变抗体的一种或多种效应子功能。例如,可以将一个或多个选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320以及322(根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号)的氨基酸用不同氨基酸进行替代,这样使得该抗体具有针对效应物配体的改变的亲和性,但是保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和性被改变的效应物配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这个途径进一步详细地描述于美国专利号5,624,821和5,648,260中。在一些实施例中,恒定区结构域的缺失或失活(经由点突变或其他方式)可降低循环抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。关于使恒定域缺失或失活并且从而提高肿瘤定位的突变的描述,参见,例如,美国专利号5,585,097以及8,591,886。在某些实施例中,可以将一个或多个氨基酸取代导入到在此描述的抗体的Fc区中,以去除Fc区上可降低Fc受体结合的潜在糖基化位点(参见,例如,希尔兹 (Shields) RL等人, (2001) 生物化学杂志276:6591-604)。在不同的实施例中,在此描述的抗体的恒定区中可发生以下突变中的一个或多个:N297A取代;N297Q取代;L235A取代以及L237A取代;L234A取代以及L235A取代;E233P取代;L234V取代;L235A取代;C236缺失;P238A取代;D265A取代;A327Q取代;或P329A取代,根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号。在某些实施例中,在此描述的抗体的恒定区中可发生选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

[0261] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体包括带有N297Q或N297A氨基酸取代的IgG₁的恒定域。在一个实施例中,在此描述的抗体包括带有选自下组的突变的IgG₁的恒定域,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。

[0262] 在某些实施例中,可以将在此描述的抗体的恒定区中的一个或多个选自氨基酸残基329、331以及322的氨基酸(根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号)用不同氨基酸进行替代,这样使得该抗体具有改变的C1q结合和/或减少的或废除的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这个途径进一步详细地描述于美国专利号6,194,551中(伊杜索奇 (Idusogie) 等人)。在一些实施例中,可以将在此描述的抗体的CH2结构域的N端区中的氨基酸位置231至238内的一个或多个氨基酸残基进行改变,以由此改变该抗体固定补体的能力。这个途径进一步描述于国际公开号W0 94/29351中。在某些实施例中,通过使在以下位置处的一个或多个氨基酸发生突变(例如,引入氨基酸取代),对在此描述的抗体的Fc区进行修饰以提高该抗体对抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 进行介导的能力,和/或以提高该抗体针对一种Fc γ 受体的亲和性:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438、或439,根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号。这个途径进一步描述于国际公开号W0 00/42072中。

[0263] 在某些实施例中,在此描述的抗体包括带有在位置267、328、或其组合处的突变(例如,取代)(根据卡巴特 (Kabat) 中的EU指数 (EU index) 进行编号)的IgG₁的恒定域。在某些实施例中,在此描述的抗体包括带有选自下组的突变(例如,取代)的IgG₁的恒定域,该组

由以下各项组成：S267E、L328F、以及其组合。在某些实施例中，在此描述的抗体包括带有S267E/L328F突变（例如，取代）的IgG₁的恒定域。在某些实施例中，在此描述包括带有S267E/L328F突变（例如，取代）的IgG₁的恒定域的抗体针对Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、或Fc γ RIIA以及Fc γ RIIB具有增加的结合亲和力。

[0264] 在某些实施例中，在此描述的抗体包括IgG₄抗体的恒定域，并且在重链氨基酸残基228处的丝氨酸（根据卡巴特（Kabat）中的EU指数（EU index）进行编号）取代为脯氨酸。

[0265] 在某些实施例中，在此描述的抗体包括IgG₂抗体的恒定域，并且在重链氨基酸残基127处的半胱氨酸（根据卡巴特（Kabat）进行编号）取代为丝氨酸。

[0266] 已经报道，具有低岩藻糖含量的抗体针对Fc受体（例如，Fc γ RIIIA）具有增加的亲和性。因此，在某些实施例中，在此描述的抗体具有低岩藻糖含量或无岩藻糖含量。可以使用本领域技术人员已知的技术来生产此类抗体。例如，可以在岩藻糖化缺陷型或缺少岩藻糖基化作用能力的细胞中表达抗体。在一个具体实例中，可以将具有敲除α1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系用以产生具有低岩藻糖含量的抗体。**Potelligent[®]**系统（龙沙公司）是此种系统的实例，可以将其用于产生具有低岩藻糖含量的抗体。可替代地，具有低岩藻糖含量或无岩藻糖含量的抗体可由例如下述生产：(i) 在避免或降低岩藻糖基化作用的条件下培养细胞；(ii) 翻译后移去岩藻糖（例如，用岩藻糖苷酶）；(iii) 翻译后加入所希望的糖（例如，在重组表达非糖基化的糖蛋白之后）；或(iv) 纯化糖蛋白，以选择未经岩藻糖基化的抗体。对于用于生产具有无岩藻糖含量或低岩藻糖含量的抗体的方法，参见，例如，朗莫尔（Longmore）GD和沙克特（Schachter）H（1982）碳水化合物研究（Carbohydr Res）100：365-92以及今井西谷（Imai-Nishiya）H等人，（2007）BMC生物技术（BMC Biotechnol.）7：84。

[0267] 工程化的糖型可用于多种目的，包括但不限于，增强或降低效应子功能。用于在此描述的抗体中生成工程化的糖型的方法包括但不限于，披露于例如乌马纳（Umaña）P等人，（1999）自然生物技术（Nat Biotechnol）17：176-180；戴维斯（Davies）J等人，（2001）生物技术与生物工程（Biotechnol Bioeng）74：288-294；希尔兹（Shields）RL等人，（2002）生物化学杂志277：26733-26740；新川（Shinkawa）T等人，（2003）生物化学杂志278：3466-3473；丹羽（Niwa）R等人，（2004）临床癌症研究（Clin Cancer Res）11：6248-6255；普雷斯塔（Presta）LG等人，（2002）生物化学学会会刊（Biochem Soc Trans）30：487-490；坎达（Kanda）Y等人，（2007）糖生物学（Glycobiology）17：104-118；美国专利号6,602,684；6,946,292；以及7,214,775；美国专利公开号US 2007/0248600；2007/0178551；2008/0060092；以及2006/0253928；国际公开号WO 00/61739；WO 01/292246；WO 02/311140；以及WO 02/30954；Potillegent[™]技术（BioWa公司，普林斯顿（Princeton），新泽西州（N.J.））；以及**GlycoMAb[®]**糖基化工程技术（Glycart生物技术AG，苏黎世，瑞士）中的那些方法。还参见，例如，费拉拉（Ferrara）C等人，（2006）生物技术与生物工程93：851-861；国际公开号WO 07/039818；WO 12/130831；WO 99/054342；WO 03/011878；以及WO 04/065540。

[0268] 在某些实施例中，用于工程化在此描述的抗体的Fc结构域的技术是Xencor（Monrovia, CA）的**Xmab[®]**技术。参见，例如，美国专利号8,367,805；8,039,592；8,124,731；8,188,231；美国专利公开号2006/0235208；国际公开号WO 05/077981；WO 11/097527；以及理查德兹（Richards）JO等人，（2008）分子癌症治疗学（Mol Cancer Ther）7：2517-2527。

[0269] 在某些实施例中,在此描述的抗体的恒定区中在与人类IgG1重链中位置L234、L235、以及D265对应的位置处的氨基酸残基(根据编号的EU指数(EU index)进行编号)分别不是L、L、以及D。这个途径详细地描述于国际公开号W0 14/108483中。在一个具体实施例中,与人类IgG1重链中位置L234、L235、以及D265对应的氨基酸分别是F、E、以及A;或A、A、以及A。

[0270] 在某些实施例中,可以将任何在此描述的恒定区突变或修饰引入到在此描述的具有两个重链恒定区的抗体的一个或两个重链恒定区中。

[0271] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:1-3中列出的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3氨基酸序列(例如,列于表1中的那些);(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:4-6中列出的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3氨基酸序列(例如,列于表2中的那些);(iii)该轻链进一步包括轻链恒定域,该轻链恒定域包括人类κ轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括重链恒定域,该重链恒定域包括人类IgG₁(任选地IgG₁(同种异型G1m3))重链恒定域的氨基酸序列。

[0272] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸;(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列;(iii)该轻链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类κ轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类IgG₁(任选地IgG₁(同种异型G1m3))重链恒定域的氨基酸序列。

[0273] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:1-3中列出的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3氨基酸序列(例如,列于表1中的那些);(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:4-6中列出的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3氨基酸序列(例如,列于表2中的那些);(iii)该轻链进一步包括轻链恒定域,该轻链恒定域包括人类κ轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括重链恒定域,该重链恒定域包括人类IgG₄重链恒定域的氨基酸序列。

[0274] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;(iii)该轻链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类κ轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类IgG₄重链恒定域的氨基酸序列。

[0275] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:1-3中列出的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3氨基酸序列(例如,列于表1中的那些);(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括在SEQ ID NO:4-6中列出的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3氨基酸序列(例如,列于表2中的那些);(iii)该轻链进一步包括轻链恒定域,该轻链恒定域包括人类κ轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括重链恒定域,该重链恒定域包括人类IgG₂重链恒定域的氨基酸序列。

[0276] 在另一个具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括轻链和重链,其中(i)该轻链包括VL结构域,该结构域包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列;(ii)该重链包括VH结构域,该结构域包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;(iii)该轻链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类 κ 轻链恒定域的氨基酸序列;以及(iv)该重链进一步包括恒定域,该恒定域包括人类IgG₂重链恒定域的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列并且重链包括SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列并且重链包括SEQ ID NO:62的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列并且重链包括SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列并且重链包括SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0277] 在另一个具体实施例中,在此提供的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(a)包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链,其在氨基酸位置297处具有N取代为A或Q的氨基酸取代;以及(b)包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在另一个具体实施例中,在此提供的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(a)包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链,其在氨基酸位置297处具有N取代为A或Q的氨基酸取代;以及(b)包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0278] 在另一个具体实施例中,在此提供的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(a)包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链,其具有选自下组的氨基酸取代,该组由以下各项组成:在氨基酸位置267处S取代为E、在氨基酸位置328处L取代为F、以及在氨基酸位置267处S取代为E和在氨基酸位置328处L取代为F二者;以及(b)包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在另一个具体实施例中,在此提供的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(a)包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链,其具有选自下组的氨基酸取代,该组由以下各项组成:在氨基酸位置267处S取代为E、在氨基酸位置328处L取代为F、以及在氨基酸位置267处S取代为E和在氨基酸位置328处L取代为F二者;以及(b)包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0279] 在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体展示出抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)活性。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体引发自然杀伤细胞介导的细胞消耗。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体用于治疗被自然杀伤细胞浸润的的肿瘤。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体展示出抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体引发巨噬细胞介导的细胞消耗。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体用于治疗被巨噬细胞浸润的的肿瘤。在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体选择性地耗尽瘤内的调节性T细胞。

[0280] 在具体实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括框架区(例如,VL结构域和/或VH结构域的框架区),该框架区是人类框架区或衍生自人类框架区。人类框架区的非限制性实例在本领域中有描述,例如,参见上述卡巴特(Kabat)EA等人,(1991)。在某些实施例中,在此描述的抗体包括框架区(例如,VL结构域和/或VH结构域的框架区),该框架区是灵长类(例如,非人类灵长类)框架区或衍生自灵长类(例如,非人类

灵长类) 框架区。

[0281] 例如,将来自抗原特异性非人抗体(典型地为啮齿类动物来源(例如,小鼠或大鼠))的CDR移植到同源人类或非人类灵长动物受体框架中。在一个实施例中,非人类灵长动物受体框架来自旧世界猿(Old World ape)。在一个具体实施例中,旧世界猿(Old World ape)受体框架来自黑猩猩(*Pan troglodytes*)、倭黑猩猩(*Pan paniscus*)或大猩猩(*Gorilla gorilla*)。在一个具体实施例中,非人类灵长动物受体框架来自黑猩猩(*Pan troglodytes*)。在一个具体实施例中,非人类灵长动物受体框架是旧世界猿受体框架。在一个具体实施例中,旧世界猿受体框架来自猕猴属。在某一个实施例中,非人类灵长动物受体框架衍生自食蟹猴(*Macaca cynomolgus*)。非人类灵长动物框架序列描述于美国专利申请公开号US 2005/0208625中。

[0282] 在某些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括一个、两个或更多个VL框架区(FR),该框架区具有针对上述表3所列抗体在此描述的氨基酸序列。在一些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括一个、两个或更多个VH框架区(FR),该框架区具有针对上述表4所列抗体在此描述的氨基酸序列。在具体实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:一个、两个或更多个VL框架区,该框架区具有针对上述表3所列抗体在此描述的氨基酸序列,以及一个、两个或更多个VH框架区,该框架区具有针对上述表4所列抗体在此描述的氨基酸序列。

[0283] 在一些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:VL结构域的一个、二个、三个或四个框架区,该结构域具有pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO: 7-10)的氨基酸序列,其带有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸突变(例如,氨基酸取代(如保守性氨基酸取代))和/或VH结构域的框架区,该结构域具有pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:11-14)的氨基酸序列。在某些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:VH结构域的一个、二个、三个或四个框架区,该结构域具有pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:11-14)的氨基酸序列,其带有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个氨基酸突变(例如,氨基酸取代(如保守性氨基酸取代))和/或VL结构域的框架区,该结构域具有pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:7-10)的氨基酸序列。

[0284] 在某些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与上述表3中在此描述的VL框架区具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL框架区(FR)。在某些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与上述表4中在此描述的VH框架区具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH框架区(FR)。在一些实施例中,在此描述的特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:与上述表4中在此描述的VH框架区具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH框架区(FR),以及与上述表3中在此描述的VL框架区具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL框架区(FR)。

[0285] 两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间百分比一致性的确定也可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的一个具体、非限制性的实例是卡尔林(Karlin)S和阿尔丘尔(Altschul)SF(1990)美国科学院院报87:2264-2268的算法,该算法

在卡尔林S和阿尔丘尔SF (1993) 美国科学院院报90:5873-5877中被修改。此种算法被结合到阿尔丘尔SF等人, (1990) 分子生物学杂志215:403的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸检索可由NBLAST核苷酸程序参数设定为例如分数=100, 字长=12, 来进行以获得与在此描述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白检索可由XBLAST程序参数设定为例如分数50, 字长=3, 来进行以获得与在此描述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目标的有缺口的比对, 可以利用如在阿尔丘尔SF等人, (1997) 核酸研究25:3389-3402中所述的有缺口的BLAST。可替代地, 可以将PSI BLAST用于进行检测分子之间的距离关系的迭代检索(Id.)。当运用BLAST、有缺口的BLAST以及PSI Blast程序时, 可以使用对应程序的(例如, XBLAST及NBLAST的) 默认参数(参见, 例如, 在万维网(ncbi.nlm.nih.gov) 上的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI))。用于序列比较的数学算法的另一个具体、非限制性的实例是梅耶斯(Myers) 和米勒(Miller) 的算法(1988, CABIOS 4:11-17)。此种算法被结合到ALIGN程序(第2.0版) 中, 该程序是GCG序列排比软件包的一部分。当运用ALIGN程序用于比较氨基酸序列, 可使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分。

[0286] 可使用类似于上述那些技术的技术, 在容许或不容许缺口的情况下确定两个序列之间的百分比一致性。在计算百分比一致性中, 典型地仅计数确切的匹配。

[0287] 在某些实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如, SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域, 其中该抗体包括与pab1949或pab2044的VL CDR相同的VL CDR。

[0288] 在某些实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如, SEQ ID NO:16) 的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域, 其中该抗体包括与pab1949或pab2044的VH CDR相同的VH CDR。

[0289] 在某些实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括:
(i) 与pab1949或pab2044 (例如, SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域; 以及
(ii) 与pab1949或pab2044 (例如, SEQ ID NO:16) 的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域, 其中该抗体包括与pab1949或pab2044的VL CDR和VH CDR相同的VL CDR和VH CDR。

[0290] 在某些实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如, SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域, 其中该抗体, 与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如, 100ng/ml) 相组合地, 当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生, 如通过例如电化学发光(例如, 人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)) 所测量, 其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml、0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。在某些实施例中, 在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的抗体

包括与pab1949或pab2044 (例如,SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中10⁵个细胞) 持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0291] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如,SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量,其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如,SEQ ID NO:15) 的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体 (例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC (例如,在孔中10⁵个细胞) 持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 测量IL-2的滴度。

[0292] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如,SEQ ID NO:16) 的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光 (例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒 (细观发现公司)) 所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗体包括与pab1949或pab2044 (例如,SEQ ID NO:16) 的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、

至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0293] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a) 在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml) 和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b) 收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0294] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(i) 与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii) 与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml) 相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类

OX40)的抗体包括：(i)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域；以及(ii)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A(SEA)相组合地，诱导例如PBMC中IL-2的产生，其中IL-2的产生是在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如，在孔中10⁵个细胞)持续例如5天；以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0295] 在某些实施例中，在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括：(i)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域；以及(ii)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如，100ng/ml)相组合地，当在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生，如通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量，其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时，IL-2的产生显示S形剂量响应曲线。在某些实施例中，在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括：(i)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域；以及(ii)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域，其中该抗体，与葡萄球菌肠毒素A(SEA)相组合地，诱导例如PBMC中IL-2的产生，其中当抗OX40抗体在例如0.032 μ g/ml和20 μ g/ml、0.16 μ g/ml和20 μ g/ml、0.8 μ g/ml和20 μ g/ml、4 μ g/ml和20 μ g/ml、0.032 μ g/ml和4 μ g/ml、0.16 μ g/ml和4 μ g/ml、或0.8 μ g/ml和4 μ g/ml之间时，IL-2的产生显示S形剂量响应曲线，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如，20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256 μ g/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如，在孔中10⁵个细胞)持续例如5天；以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。

[0296] 在某些实施例中，在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域，其中该抗体当与板结合时，与板结合的抗CD3抗体(例如，0.8 μ g/ml)相组合地，当在例如37 $^{\circ}$ C以

及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37℃以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0297] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37℃以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、

0.3、1、3、6、12、25、和50 $\mu\text{g/ml}$ ；或0.0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 $\mu\text{g/ml}$)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 以及5% CO_2 下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在某些实施例中，在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域，其中该抗体当与板结合时，与板结合的抗CD3抗体(例如，0.8 $\mu\text{g/ml}$)相组合地，当在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 以及5% CO_2 下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生，如通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量，其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、3.1 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、或6.3 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 之间时，一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a)在板结合的抗CD3抗体(例如，0.8 $\mu\text{g/ml}$)和不同浓度(例如，0.0.3、1、3、6、12、25、和50 $\mu\text{g/ml}$ ；或0.0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 $\mu\text{g/ml}$)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 以及5% CO_2 下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0298] 在某些实施例中，在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括：(i)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域；以及(ii)与pab1949或pab2044(例如，SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域，其中该抗体当与板结合时，与板结合的抗CD3抗体(例如，0.8 $\mu\text{g/ml}$)相组合地，当在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 以及5% CO_2 下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生，如通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量，其中一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生是在例如0.7 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、1.6 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、3.1 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 、或6.3 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 之间的抗体浓度的基本上递增性的函数，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a)在板结合的抗CD3抗体(例如，0.8 $\mu\text{g/ml}$)和不同浓度(例如，0.0.3、1、3、6、12、25、和50 $\mu\text{g/ml}$ ；或0.0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 $\mu\text{g/ml}$)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 以及5% CO_2 下培养这些PBMC持续例如4天；以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如，人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如， $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。在某些实施例

中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(i)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体当与板结合时,与板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)相组合地,当在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下刺激持续例如4天后诱导例如PBMC或T细胞中一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.7 μ g/ml和50 μ g/ml、1.6 μ g/ml和50 μ g/ml、3.1 μ g/ml和50 μ g/ml、或6.3 μ g/ml和50 μ g/ml之间时,一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在板结合的抗CD3抗体(例如,0.8 μ g/ml)和不同浓度(例如,0、0.3、1、3、6、12、25、和50 μ g/ml;或0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)的板结合的本发明抗体的存在下、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下培养这些PBMC持续例如4天;以及(b)收集上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)或非人类灵长动物(NHP) V-Plex测定试剂盒(细观发现公司))测量一种或多种细胞因子(例如,TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、或IL-13)的产生。

[0299] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体增加CD4⁺T细胞增殖,其中CD4⁺T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4⁺T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4⁺细胞的百分比来检查CD4⁺T细胞增殖。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4⁺T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4⁺T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4⁺细胞的百分比来检查CD4⁺T细胞增殖。

[0300] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0301] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0302] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的

抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0303] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(i)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(i)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中当该抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时,该抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0304] 在某些实施例中,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:(i)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:15)的VL结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VL结构域;以及(ii)与pab1949或pab2044(例如,SEQ ID NO:16)的VH结构域的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%序列一致性的VH结构域,其中该抗体增加CD4+T细胞增殖,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml、或2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时,CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟;(b)在充分洗涤之后,用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度(例如,0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml)的例如在此描述的

板结合的抗体、在例如37℃以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞(例如,在孔中10⁵个细胞);以及(c)在例如第4天,用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0305] 在另一个方面,在此提供了与在此描述的抗体(例如,pab1949或pab2044)结合OX40的相同或重叠表位(例如,人类OX40的表位)的抗体。在某些实施例中,抗体的表位可以由例如NMR光谱术、X射线衍射结晶学研究、ELISA分析、耦合质谱法(例如,液相层析质谱法)的氢/氘交换、基于数组的寡肽扫描分析、和/或诱变基因作图(例如,定点诱变基因作图)确定。对于X射线晶体学,可使用任一种本领域中已知的方法完成结晶(例如,吉尔格(Giegé)R等人,(1994)晶体学报D辑:生物晶体学(*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*) 50(Pt 4):339-350;麦克弗森(McPherson)A(1990)欧洲生物化学杂志(*Eur J Biochem*) 189:1-23;钱(Chayen)NE(1997)结构(*Structure*) 5:1269-1274;麦克弗森A(1976)生物化学杂志(*J Biol Chem*) 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可使用为人熟知的X射线衍射技术进行研究并且可使用计算机软件(如X-PLOR(耶鲁大学(Yale University),1992,由分子模拟公司(Molecular Simulations,Inc.)精细化;参见,例如,酶学方法(*Meth Enzymol*) (1985)第114和115卷,编辑威科夫(Wyckoff)HW等人;美国专利申请号2004/0014194)、以及BUSTER(布里科奈(Bricogne)G(1993)晶体学报D辑:生物晶体学49(Pt 1):37-60;布里科奈G(1997)酶学方法276A:361-423,编辑卡特(Carter)CW;罗维西(Roversi)P等人,(2000)晶体学报D辑:生物晶体学56(Pt 10):1316-1323)。诱变基因作图研究可使用本领域技术人员已知的任何方法来完成。参见,例如,上述钱贝(Champe)M等人,(1995)及上述坎宁安(Cunningham)BC和威尔斯(Wells)JA(1989)关于诱变技术的描述,包括丙氨酸分区诱变技术。在一个具体实施例中,使用丙氨酸扫描诱变研究确定抗体的表位。此外,识别并且结合OX40(例如,人类OX40)的相同或重叠表位的抗体可使用常规技术(如免疫测定)进行鉴定,例如,通过显示一种抗体阻断另一种抗体结合靶抗原的能力(即竞争性结合分析)。还可以使用竞争结合鉴定法以确定两种抗体是否对表位具有类似结合特异性。可以在分析中确定竞争性结合,其中在测试下的免疫球蛋白抑制参考抗体特异性结合共同抗原(如OX40)。已知许多类型的竞争性结合分析,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶联免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见斯塔里(Stahli)C等人,(1983)酶学方法(*Methods Enzymol*) 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见柯克兰(Kirkland)TN等人,(1986)免疫学杂志137:3614-9);固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见哈洛E和拉内D,(1988)抗体:实验室手册,冷泉港实验室出版社);使用I-125标签的固相直接标记RIA(参见莫雷尔(Morel)GA等人,(1988)分子免疫学(*Mol Immunol*) 25(1):7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(张(Cheung)RC等人,(1990)病毒学(*Virology*) 176:546-52);以及直接标记RIA(莫尔登豪尔(Moldenhauer)G等人,(1990)斯堪的纳维亚免疫学杂志(*Scand J Immunol*) 32:77-82)。典型地,此种分析涉及使用结合至带有未标记的测试免疫球蛋白以及标记的参考免疫球蛋白中的任一种的固体表面或细胞的纯化抗原(例如,OX40(如人类OX40))。可以在测试免疫球蛋白的存在下,通过确定结合至固体表面或细胞的标签量而测量竞争性抑制。通常,测试免疫球蛋白以过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,它将会抑制参考抗体特异性结合共同抗原至少50%-55%、55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%或更多。可使用标记抗原或标记抗体以许多不同形式配置竞争结合鉴定法。在此种分

析的常用版本中,将抗原固定在96孔板上。然后,使用放射性或酶标签测量未标记抗体阻断标记抗体结合抗原的能力。关于进一步的细节,参见,例如,瓦格纳(Wagener) C等人,(1983) 免疫学杂志130:2308-2315;瓦格纳C等人,(1984) 免疫学方法杂志68:269-274;黑木(Kuroki) M等人,(1990) 癌症研究50:4872-4879;黑木M等人,(1992) 免疫学研究(Immunol Invest) 21:523-538;黑木M等人,(1992) 杂交瘤(Hybridoma) 11:391-407以及抗体:实验室手册,编辑上述哈洛E和拉内D编辑,第386-389页。

[0306] 在一个实施例中,使用表面等离子共振(**BIAcore®**),例如通过‘串联方式(in tandem approach)’(如艾迪赫(Abdiche) YN等人,(2009) 分析生物化学(Analytical Biochem) 386:172-180所述)进行竞争分析,由此将OX40抗原固定在芯片表面上(例如,CM5传感器芯片),并且然后使抗OX40抗体在芯片上跑过。为了确定一种抗体是否与在此描述的抗OX40抗体竞争,首先使抗OX40抗体在芯片表面跑过以达到饱和,并且然后添加潜在的竞争抗体。相对于非竞争对照,然后可以确定并且量化竞争抗体的结合。

[0307] 在某些方面中,可将竞争结合分析用于确定抗体是否例如以剂量依赖性方式被另一种抗体竞争性阻断,例如,当两种抗体在竞争结合分析(如竞争ELISA分析)中识别相同或空间重叠表位时,抗体与参考抗体结合基本上相同的表位或重叠表位,可使用标记抗原或标记抗体以许多不同形式配置该分析。在一个具体实施例中,在竞争结合分析中抗体可与在此描述的抗体(例如,抗体pab1949或pab2044)、或其嵌合或Fab抗体、或包括在此描述的抗体(例如,pab1949或pab2044)的VH CDR及VL CDR的抗体进行测试。

[0308] 在另一个方面,在此提供了与在此描述的抗体(例如,pab1949或pab2044)竞争(例如,以剂量依赖性方式)结合OX40(例如,人类OX40)的抗体,如使用本领域技术人员已知或在此描述的分析(例如,ELISA竞争性分析或表面等离子共振)所确定的。在另一个方面,在此提供了竞争性抑制(例如,以剂量依赖性方式)在此描述的抗体(例如,pab1949或pab2044)结合OX40(例如,人类OX40)的抗体,如使用本领域技术人员已知或在此描述的分析(例如,ELISA竞争性分析、或悬浮阵列或表面等离子共振分析)所确定的。在具体实施例中,此类竞争性阻断抗体活化、诱导或增强一种或多种OX40活性。在具体方面,在此提供了与包括在此描述的氨基酸序列的抗体(例如,抗体pab1949或pab2044的VL和/或VH氨基酸序列)竞争(例如,以剂量依赖性方式)特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体,如使用本领域技术人员已知或在此描述的分析(例如,ELISA竞争性分析、或悬浮阵列或表面等离子共振分析)所确定的。

[0309] 在某些实施例中,在此提供了与在此描述的抗体竞争结合OX40(例如,人类OX40)的程度跟在此描述的抗体自体竞争结合OX40(例如,人类OX40)的程度相同的抗体。在一些实施例中,在此提供了与在此描述的抗体竞争结合OX40(例如,人类OX40)的第一抗体,其中该第一抗体在分析中竞争结合,该分析包括以下步骤:(a)用以未标记形式的第一抗体在容器中孵育OX40转染细胞;以及(b)添加以标记形式的在此描述的抗体至容器中并且在容器中孵育细胞;以及(c)检测结合细胞的以标记形式的在此描述的抗体。在某些实施例中,在此提供了与在此描述的抗体竞争结合OX40(例如,人类OX40)的第一抗体,其中竞争呈现为第一抗体与OX40的结合降低超过了80%(例如,85%、90%、95%或98%、或在80%至85%、80%至90%、85%至90%、或85%至95%之间)。

[0310] 在具体方面,在此提供了与包括具有在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的VL结

构域和具有在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的VH结构域的抗体竞争(例如,以剂量依赖性方式)特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体。

[0311] 在具体方面,在此提供了与包括(i)包括具有列于表1中VL CDR的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3的VL结构域;以及(ii)包括具有列于表2中CDR的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3的VH结构域的抗体竞争(例如,以剂量依赖性方式)特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体。

[0312] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体是被包括具有在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的VL结构域和具有在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列的VH结构域的抗体竞争性阻断(例如,以剂量依赖性方式)特异性结合OX40(例如,人类OX40)的一种抗体。

[0313] 在另一个具体实施例中,在此描述的抗体是被包括(i)包括具有列于表1中CDR的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3的VL结构域;以及(ii)包括具有列于表2中CDR的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3的VH结构域的抗体竞争性阻断(例如,以剂量依赖性方式)的一种抗体。

[0314] 在具体方面,在此提供了与pab1949或pab2044的抗体免疫特异性结合相同表位的抗体,以特异性结合OX40(例如,人类OX40)。本领域技术人员已知或在此描述的分析(例如,X射线晶体学、偶合质谱法(例如,液相层析质谱法)的氢/氘交换、丙氨酸扫描、ELISA分析等)可用于确定两种抗体是否结合至相同表位。

[0315] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体免疫特异性结合被pab1949或pab2044结合的相同表位或与该表位重叠的表位。

[0316] 在另一个具体实施例中,在此描述的抗体与包括(i)包括具有列于表1中CDR的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2、以及VL CDR3的VL结构域;以及(ii)包括具有列于表2中CDR的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2、以及VH CDR3的VH结构域的抗体免疫特异性结合相同表位。

[0317] 在一个具体方面,相对于该抗体与SEQ ID NO:55的人类OX40序列之间的结合,在此描述的抗体与变体OX40之间的结合大幅变弱,并且其中该变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列,除了一个选自下组的氨基酸突变(例如,取代),该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合。在一些实施例中,变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列,除了任何一个选自下组的突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。在一些实施例中,变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列,除了任何二、三、四、五、六或七个选自下组的突变,该组由以下各项组成:W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。在一些实施例中,变体OX40包括SEQ ID NO:55的序列,除了氨基酸突变W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。

[0318] 在一个具体方面,在此描述的抗体特异性结合人类OX40序列的表位,该表位包括SEQ ID NO:55的选自下组的残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。在一些实施例中,该表位包括选自下组的任何一个残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,该表位包括选自下组的任何二、三、四、五、六或七个残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的58、60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,该表位包括SEQ ID NO:55的残基58、60、62、80、88、93、99、以

及115、基本上由其组成、或由其组成。

[0319] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体特异性结合SEQ ID NO:55的表位,该表位包括选自下组的残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。在一些实施例中,该表位包括选自下组的任何一个残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,该表位包括选自下组的任何二、三、四、五、六或七个残基、基本上由其组成、或由其组成,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的58、60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,该表位包括SEQ ID NO:55的残基58、60、62、80、88、93、99、以及115、基本上由其组成、或由其组成。

[0320] 在一个具体方面,在此描述的抗体特异性结合SEQ ID NO:55的选自下组的至少一个残基,该组由以下各项组成:60、62、80、88、93、99、115、以及其组合。在一些实施例中,在此描述的抗体特异性结合选自下组的任何一个残基、或任何二、三、四、五、六或七个残基,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,在此描述的抗体特异性结合选自下组的任何二、三、四、五、六或七个残基,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:55的58、60、62、80、88、93、99、以及115。在一些实施例中,在此描述的抗体特异性结合SEQ ID NO:55的残基58、60、62、80、88、93、99、以及115。

[0321] 在一个具体方面,与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比,在此描述的抗体展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质(除了存在一个选自下组的氨基酸突变(例如,取代),该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合)降低的结合或不结合。在一些实施例中,该蛋白与SEQ ID NO:55相同,除了存在包括选自下组的任何一个突变、或任何二、三、四、五、六或七个突变的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。在一些实施例中,该蛋白与SEQ ID NO:55相同,除了存在包括选自下组的任何二、三、四、五、六或七个突变的氨基酸突变,该组由以下各项组成:W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A。在一些实施例中,该蛋白与SEQ ID NO:55相同,除了存在包括突变W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、以及P115A的氨基酸取代。

[0322] 在某些实施例中,在此描述的抗体的表位被用作免疫原以生产抗体。对于用于生产抗体的方法,参见,例如,以下章节5.3。

[0323] 在具体方面,在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体起到激动剂的作用。

[0324] 在某些实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体将OX40(例如,人类OX40)活性增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述和/或本领域技术人员已知的方法所测定的。在某些实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体将OX40(例如,人类OX40)活性增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

85%、90%、95%、98%或99%，如通过在此描述和/或本领域技术人员已知的方法所测定的。OX40（例如，人类OX40）活性的非限制性实例可以包括OX40（例如，人类OX40）信号传导、细胞增殖、细胞存活、以及细胞因子产生（例如，IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13）。在某些实施例中，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体诱导、增强、或增加OX40（例如，人类OX40）活性。在具体实施例中，如以下实例中所述测定OX40活性的增加。

[0325] 在某些方面中，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体诱导、增强、或增加表达OX40并且响应于OX40信号传导的细胞的细胞增殖（例如，响应于OX40刺激和OX40信号传导而增殖的细胞（如T细胞））。细胞增殖测定如本领域中所述（例如，³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法，如在实例2中所述），并且可以由本领域普通技术人员容易地实施。在具体实施例中，相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂（例如植物凝集素（PHA）和/或佛波醇乙酯（PMA）、或TCR复合物刺激抗体（如抗CD3抗体以及抗CD28抗体））刺激的T细胞，用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂（例如植物凝集素（PHA）和/或佛波醇乙酯（PMA）、或TCR复合物刺激抗体（如抗CD3抗体以及抗CD28抗体））刺激的T细胞（例如，CD4⁺或CD8⁺效应T细胞）在免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体的存在下，具有增加的细胞增殖。

[0326] 在具体实施例中，相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体（例如，不会免疫特异性结合OX40的抗体）的情况下的OX40（例如，人类OX40）活性刺激，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体将细胞增殖（例如，T细胞（如CD4和CD8效应T细胞））增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍，如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法（例如，³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法，如以下实例2中所述）所测定的。在具体实施例中，相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体（例如，不会免疫特异性结合OX40的抗体）的情况下的OX40（例如，人类OX40）活性，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体将细胞增殖（例如，T细胞（如CD4和CD8效应T细胞））增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%，如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法（例如，³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法，如以下实例2中所述）所测定的。在具体实施例中，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体增加CD4+T细胞增殖，其中CD4+T细胞增殖是在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯（CFSE）对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟；(b) 在充分洗涤之后，用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度（例如，0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml）的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞（例如，在孔中10⁵个细胞）；以及(c) 在例如第4天，用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在具体实施例中，免疫特异性结合OX40（例如，人类OX40）的在此描述的抗体增加CD4+T细胞增殖，其中CD4+T细胞增殖是在例如2 μ g/ml和20 μ g/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数，如在例如包括以下步骤的测定中评估：(a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧

光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度 (例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml) 的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞 (例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及 (c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在具体实施例中, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体增加CD4+T细胞增殖, 其中当抗OX40抗体浓度在例如0.2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时, CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度 (例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml) 的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞 (例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及 (c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在具体实施例中, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体增加CD4+T细胞增殖, 其中当抗OX40抗体浓度在例如2 μ g/ml和20 μ g/ml之间时, CD4+T细胞增殖显示S形剂量响应曲线, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度 (例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml) 的例如在此描述的板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞 (例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及 (c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。在具体实施例中, 当抗体以20 μ g/ml的浓度相比于以2 μ g/ml的浓度存在时, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体导致CD4+T细胞增殖的更大增加, 如在例如包括以下步骤的测定中评估: (a) 在例如37 $^{\circ}$ C下用例如10 μ M羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 对例如富集的CD4+T细胞进行标记持续例如7分钟; (b) 在充分洗涤之后, 用例如3 μ g/ml的例如板结合的抗CD3抗体和不同浓度 (例如, 0.002、0.02、0.2、2、和20 μ g/ml) 的例如在此描述的其板结合的抗体、在例如37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂的情况下刺激这些细胞 (例如, 在孔中10⁵个细胞); 以及 (c) 在例如第4天, 用例如抗CD4抗体进行细胞染色并且借助流式细胞术通过例如测量CFSE低CD4+细胞的百分比来检查CD4+T细胞增殖。

[0327] 在一些实施例中, 相对于仅用促T细胞分裂原刺激的T细胞, 用促T细胞分裂原 (例如, 抗CD3抗体或佛波酯) 刺激的T细胞 (例如, CD4⁺或CD8⁺效应T细胞) 在免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体的存在下, 具有增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的细胞增殖, 如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法 (例如, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法, 如以下实例2中所述) 所测定的。在一些实施例中, 相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞, 用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞 (例

如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的存在下,具有增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞增殖,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法,如以下实例2中所述)所测定的。在一个具体实施例中,如以下实例2中所述对细胞增殖进行测定。在具体实施例中,5μg/ml在此描述的OX40抗体将用3μg/ml抗CD3抗体处理的人类CD4T细胞的增殖增加了至少20%。在具体实施例中,5μg/ml在此描述的OX40抗体将用3μg/ml抗CD3抗体处理的人类CD4T细胞的增殖增加了至少30%。在具体实施例中,5μg/ml在此描述的OX40抗体将用3μg/ml抗CD3抗体处理的人类CD4T细胞的增殖增加了至少40%。在具体实施例中,5μg/ml在此描述的OX40抗体将用3μg/ml抗CD3抗体处理的人类CD4T细胞的增殖增加了至少50%。

[0328] 在某些方面中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体增加细胞(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))的存活。在一个具体实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的存在下,具有增加的存活。细胞存活测定如本领域中所述(例如,台盼蓝排除测定法)并且可以由本领域普通技术人员容易地实施。

[0329] 在具体实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体将细胞存活(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法),在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下所测定的。在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体将细胞存活(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法)所测定的。

[0330] 在一些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞,用促T细胞分裂原(例如,抗CD3抗体或佛波酯)刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的存在下,具有增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的细胞存活,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法)所测定的。在一些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合

OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体的存在下, 具有增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞存活, 如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法 (例如, 台盼蓝排除测定法) 所测定的。

[0331] 在某些实施例中, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体防止效应T细胞 (例如, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 效应T细胞) 遭受激活诱导的细胞死亡。

[0332] 在具体实施例中, 相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体 (例如, 不会免疫特异性结合OX40的抗体) 的情况下、在有或无OX40 (例如, 人类OX40) 刺激存在下的细胞因子产生, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体将细胞因子产生 (例如, IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13) 诱导、增强、或增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%, 如通过在此描述 (参见以下实例, 如实例2) 或本领域技术人员已知的方法所测定的。在具体实施例中, 相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体 (例如, 不会免疫特异性结合OX40的抗体) 的情况下、在有或无OX40 (例如, 人类OX40) 刺激存在下的细胞因子产生, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体将细胞因子产生 (例如, IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13) 诱导或增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍, 如通过在此描述 (参见以下实例, 如实例2) 或本领域技术人员已知的方法所测定的。

[0333] 在某些实施例中, 相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞, 用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞 (例如, $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 效应T细胞) 在免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体的存在下, 具有增加了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞因子产生 (例如, IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13), 如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法 (例如, ELISA测定或如以下实例中所述) 所测定的。在一些实施例中, 相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞, 用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂 (例如植物凝集素 (PHA) 和/或佛波醇乙酯 (PMA)、或TCR复合物刺激抗体 (如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)) 刺激的T细胞 (例如, $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 效应T细胞) 在免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体的存在下, 具有增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的细胞因子产生 (例如, IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13), 如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法 (例如, ELISA测定或如以下实例中所述) 所测定的。

[0334] 在具体实施例中, 相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体 (例如, 不会免疫特异性结合OX40的抗体) 的情况下的IL-2产生, 免疫特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此

描述的抗体将响应于葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激的IL-2产生增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述(参见以下实例,如实例2)或本领域技术人员已知的方法所测定的。

[0335] 在某些实施例中,相对于仅用SEA刺激的T细胞,用葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激进行刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的存在下,具有增加了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的IL-2产生,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,ELISA测定或如以下实例中所述)所测定的。

[0336] 在具体实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。在某些实施例中,由抗体与SEA相结合诱导的IL-2产生是在例如0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数。在另一个实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2的产生是在例如0.032μg/ml和20μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在某些实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A (SEA) 相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中IL-2的产生是在例如0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间的抗体浓度的基本上递增性的函数,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在具体实施例中,当抗体以20μg/ml的浓度相比于以0.032μg/ml的浓度存在时,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体响应于葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml)导致更多的IL-2产生。在一个具体实施例中,当抗体以20μg/ml的浓度相比于以0.16μg/ml的浓度存在时,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体响应于葡萄球菌肠毒素A (SEA) (例如,100ng/ml)导致更多的IL-2产生。

[0337] 在具体实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)相组合地,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后诱导例如PBMC中IL-2的产生,如通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))所测量,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml之间时,IL-2的产生显示S形剂量响应曲线。在某些实施例中,当抗OX40抗体浓度在例如0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,由抗体与SEA相组合诱导的IL-2产生显示S形剂量响应曲线。在另一个实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.032μg/ml和20μg/ml之间时,IL-2产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在某些实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体,与葡萄球菌肠毒素A(SEA)相组合地,诱导例如PBMC中IL-2的产生,其中当抗OX40抗体浓度在例如0.16μg/ml和20μg/ml、0.8μg/ml和20μg/ml、4μg/ml和20μg/ml、0.032μg/ml和4μg/ml、0.16μg/ml和4μg/ml、或0.8μg/ml和4μg/ml之间时,IL-2产生显示S形剂量响应曲线,如在例如包括以下步骤的测定中评估:(a)在不存在或存在不同浓度的该抗体(例如,20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、和0.000256μg/ml)和例如100ng/ml的SEA下、在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下培养这些PBMC(例如,在孔中10⁵个细胞)持续例如5天;以及(b)收集澄清上清液并且通过例如电化学发光(例如,人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司))测量IL-2的滴度。在具体实施例中,当抗体以20μg/ml的浓度相比于以0.032μg/ml的浓度存在时,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)导致更多的IL-2产生。在一个具体实施例中,当抗体以20μg/ml的浓度相比于以0.16μg/ml的浓度存在时,当在例如37℃、5%CO₂、以及97%湿度下刺激持续例如5天后,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)(例如,100ng/ml)导致更多的IL-2产生。

[0338] 在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的IL-10产生,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体将响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的IL-10产生降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%,如通过在此描述(参见以下实例,如实例2)或本领域技术人员已知的方法所测定的。

[0339] 在某些实施例中,相对于仅用SEA刺激的T细胞,用葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激进行刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的存在下,具有降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%的IL-10产生,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,ELISA测定或如下实例中所述)所测定的。

[0340] 在具体实施例中,当结合至活化的调节性T细胞时、免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体结合至选自由CD16、CD32A及CD64所组成的组的活化Fc γ 受体的程度大于(例如,1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍)当结合至活化的效应T细胞时、抗体结合至选自由CD16、CD32A及CD64所组成的组的活化Fc γ 受体的程度,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,Fc γ 受体IIIA(CD16)报告测定或如以下实例中所述)所测定的。在具体实施例中,活化Fc γ 受体在选自下组的细胞上表达,该组由以下各项组成:髓源性效应细胞以及淋巴细胞源性效应细胞。在一个具体实施例中,活化Fc γ 受体是CD16。

[0341] 在具体实施例中,当结合至活化的调节性T细胞时、免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体引起选自由CD16、CD32A及CD64所组成的组的活化Fc γ 受体的活化更强于当结合至活化的效应T细胞时、抗体引起选自由CD16、CD32A及CD64所组成的组的活化Fc γ 受体的活化。在具体实施例中,当免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体结合至活化的调节性T细胞时、活化Fc γ 受体的活化更强于当免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体结合至活化的效应T细胞时、活化Fc γ 受体的活化至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,Fc γ 受体IIIA(CD16)报告测定或如以下实例中所述)所测定的。在具体实施例中,活化Fc γ 受体在选自下组的细胞上表达,该组由以下各项组成:髓源性效应细胞以及淋巴细胞源性效应细胞。在一个具体实施例中,活化Fc γ 受体是CD16。

[0342] 在一个具体方面,在此提供了免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的拮抗剂抗体。

[0343] OX40信号传导的活化取决于受体聚簇,以形成更高有序的受体复合物,该受体复合物有效募集顶上衔接蛋白以驱动细胞内信号转导。不拘于理论,抗OX40激动剂抗体可经由双价抗体臂(即,两个各自结合OX40抗原的抗体臂)和/或经由共接合到辅助骨髓或淋巴样细胞上的Fc-Fc受体(FcR)来介导受体聚簇。因此,一种用于开发抗OX40拮抗剂抗体的途径是选择与OX40配体(OX40L)竞争结合OX40的抗体,减弱或消除抗体的Fc区与Fc受体的结合,和/或采用单价抗体形式。单价抗体形式可以包括结构上单价的抗体,例如但不限于,仅包括一个抗原结合域(例如,仅一个Fab臂)的抗OX40抗体、或仅包括一个结合OX40(例如,人类OX40)的与重链配对或与重链的片段配对(例如,Fc片段)的抗原结合域的抗体。单价抗体形式还可以包括功能上单价的抗体,例如,仅包括一个结合OX40(例如,人类OX40)的与不结合由人类免疫细胞表达的抗原的第二抗原结合域配对的抗原结合域的抗体(即,该抗体包括两个抗原结合域,但只有一个抗原结合域结合OX40)。

[0344] 以上讨论的IgG恒定域Fc区的突变的实例可降低Fc受体结合或可去除潜在糖基化位点。在某些实施例中,如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的重链恒定区包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、以及其组合。在某些实施例中,突变是N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中,突变是C127S。在某些实施例中,突变是S228P。在一个实施例中,如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的重链恒定区包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:

D265A、P329A、以及其组合。在某些实施例中，重链恒定区选自下组，该组由以下各项组成：免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。在某些实施例中，免疫球蛋白是人类免疫球蛋白。包含突变(例如，取代)的人类免疫球蛋白在此也被称为人类免疫球蛋白。在一个具体方面，如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括免疫球蛋白IgG₁重链恒定区，其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：N297A、N297Q、D265A、或其组合。在一个方面，如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括免疫球蛋白IgG₁重链恒定区，其中IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：D265A、P329A、以及其组合。在一个具体方面，如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括免疫球蛋白IgG₂重链恒定区，其中IgG₂重链恒定区的氨基酸序列包括C127S突变。在一个具体方面，如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括免疫球蛋白IgG₄重链恒定区，其中IgG₄重链恒定区的氨基酸序列包括S228P突变。在某些实施例中，抗体是拮抗性的。

[0345] 在一个具体方面，如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体选自下组，该组由以下各项组成：Fab、Fab'、F(ab')₂、以及scFv片段，其中Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段包括如在此描述的抗OX40抗原结合域或抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列。可以通过本领域的普通技术人员已知的任何技术(包括但不限于，以下章节5.3中所讨论的那些)生产Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段。在某些实施例中，Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段进一步包括延长抗体在体内半衰期的部分。该部分也被称为“半衰期延长部分”。可以使用任何本领域的普通技术人员已知用于延长Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段在体内半衰期的部分。例如，半衰期延长部分可以包括Fc区、聚合物、白蛋白、或白蛋白结合蛋白或化合物。聚合物可以包括天然或合成的、可任选取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基、聚氧化烯基、聚糖、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、甲氧基聚乙二醇、乳糖、直链淀粉、右旋糖酐、糖原、或其衍生物。取代基可以包括一个或多个羟基、甲基、或甲氧基。在某些实施例中，可以通过添加一个或多个用于附接半衰期延长部分的C端氨基酸来修饰Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段。在某些实施例中，半衰期延长部分是聚乙二醇或人血清清蛋白。在某些实施例中，Fab、Fab'、F(ab')₂、或scFv片段融合到Fc区上。在某些实施例中，抗体是拮抗性的。

[0346] 在一个具体方面，免疫特异性结合OX40(例如，人类OX40)的抗体包括一个重链和一个轻链(即该抗体不包括任何其他重链或轻链，并且包括单个重链-轻链对、基本上由其组成、或由其组成)，其中重链和轻链分别包括如在此描述的抗OX40抗原结合域或抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列。在某些实施例中，重链包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、以及其组合。在某些实施例中，突变是N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中，突变是C127S。在某些实施例中，突变是S228P。在某些实施例中，重链包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：D265A、P329A、以及其组合。在某些实施例中，重链选自下组，该组由以下各项组成：免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。在某些实施例中，免疫球蛋白是人类免疫球蛋白。在某些实施例中，重链是IgG₁重链，其包括选自下组的突变，该组由以下各项组成：N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中，重链是IgG₂重链，其包括C127S突变。在某些实施例中，重链是IgG₄重链，其包括S228P突变。在某些实施例中，重链是IgG₁重链，其包括选自下组的突变，该组由

以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。在某些实施例中,抗体是拮抗性的。

[0347] 在一个具体方面,如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:第一抗原结合域,其结合OX40,如在此描述的;以及第二抗原结合域,其不会特异性结合由人类免疫细胞表达的抗原(即第二抗原结合域不会结合OX40或任何其他由人类免疫细胞表达的抗原),如在此描述的。在某些实施例中,第一和第二抗原结合域包括互补CH3结构域。例如,互补CH3结构域允许异源二聚体化优先发生在第一抗原结合域的重链和第二抗原结合域的重链之间,而不是各自抗原结合域的同源二聚体化。可以使用本领域的普通技术人员已知的任何技术(包括但不限于,如在里奇韦(Ridgway) JBB等人,(1996)蛋白质工程(Protein Eng) 9(7):617-621以及麦钱特(Merchant) M等人中描述的突出入洞(knob-into-hole)技术)来生产互补CH3结构域。例如,突出物入洞(knob-into-hole)技术将第一CH3结构域中的小氨基酸用较大氨基酸(即“突出”)替代并且将第二CH3结构域中的大氨基酸用较小氨基酸(即“洞”)替代。然后可以基于突出物和洞的相互作用,使包括CH3结构域的多肽二聚化。在某些实施例中,抗原结合域中的一个包括第一IgG₁CH3结构域,其包括选自下组的取代,该组由以下各项组成:T366Y以及T366W,并且另一个抗原结合域包括第二IgG₁CH3结构域,其包括选自下组的取代,该组由以下各项组成:Y407T、T366S、L368A、以及Y407V。在某些实施例中,第二抗原结合域所结合的抗原不是由人类免疫细胞天然表达的。在某些实施例中,免疫细胞选自下组,该组由以下各项组成:T细胞(CD4+T细胞或CD8+T细胞)、B细胞、自然杀伤细胞、树突细胞、巨噬细胞、以及嗜酸性粒细胞。在某些实施例中,特异性结合OX40的抗原结合域包括第一VH和第一VL,并且第二抗原结合域包括第二VH和第二VL。在某些实施例中,特异性结合OX40的抗原结合域包括第一重链和第一轻链,并且第二抗原结合域包括第二重链和第二轻链。在某些实施例中,抗体用于给予至样本或受试者,其中第二抗原结合域是非反应性的(即第二抗原结合域所结合的抗原不存在于样本或受试者中)。在某些实施例中,第二抗原结合域不会特异性结合表达OX40的细胞上的抗原(例如,第二抗原结合域不会结合由表达OX40的细胞天然表达的抗原)。在某些实施例中,抗体在样本或受试者中起到单价抗体(即抗OX40单价抗体)的作用,其中抗体的第一抗原结合域结合OX40,而第二抗原结合域在样本或受试者中是非反应性的(例如,由于在样本或受试者中不存在第二抗原结合域所结合的抗原)。在某些实施例中,第二抗原结合域特异性结合非人类抗原(即在其他生物而非人类中表达的抗原)。在某些实施例中,第二抗原结合域特异性结合病毒抗原。在某些实施例中,病毒抗原来自不感染人类的病毒(即非人类病毒)。在某些实施例中,病毒抗原不存在于人类免疫细胞中(例如,人类免疫细胞不受与病毒抗原相关的病毒感染)。在某些实施例中,病毒抗原是HIV抗原。在某些实施例中,第二抗原结合域特异性结合鸡白蛋白或鸡卵溶菌酶。在某些实施例中,第二抗原结合域特异性结合不是由(即不存在于)野生型细胞(例如,野生型人类细胞)表达的抗原。在某些实施例中,第二抗原结合域特异性结合不是由(即不存在于)正常细胞(例如,野生型细胞(例如,野生型人类细胞))表达的肿瘤相关抗原。在某些实施例中,肿瘤相关抗原不是由(即不存在于)人类细胞表达的。在某些实施例中,第二抗原结合域的重链恒定区包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、以及其组合。在某些实施例中,突变是N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中,突变是C127S。在某些实施例中,突变是S228P。在某些实施例中,第二抗原结合域的重链恒定区包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、

以及其组合。在某些实施例中,第一和第二抗原结合域的重链恒定区选自下组,该组由以下各项组成:免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。在某些实施例中,免疫球蛋白是人类免疫球蛋白。在某些实施例中,第一和第二抗原结合域的重链恒定区是同种型的。在某些实施例中,第一抗原结合域包括第一IgG₁重链恒定区并且第二抗原结合域包括第二IgG₁重链恒定区,其中第一和第二重链恒定区包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中,第一抗原结合域包括第一IgG₁重链恒定区并且第二抗原结合域包括第二IgG₁重链恒定区,其中第一和第二重链恒定区包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、或其组合。在某些实施例中,第一抗原结合域包括第一IgG₂重链恒定区并且第二抗原结合域包括第二IgG₂重链恒定区,其中第一和第二重链恒定区包括C127S突变。在某些实施例中,第一抗原结合域包括第一IgG₄重链恒定区并且第二抗原结合域包括第二IgG₄重链恒定区,其中第一和第二重链恒定区包括S228P突变。在某些实施例中,抗体是拮抗性的。

[0348] 在一个具体方面,如在此描述的免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体包括:特异性结合OX40的第一抗原结合域,其包括第一重链和第一轻链;以及第二重链或其片段。在某些实施例中,第一和第二重链、或第二重链的片段包括互补CH3结构域。例如,互补CH3结构域允许异源二聚体化优先发生在重链之间,而不是各自重链的同源二聚体化。在某些实施例中,重链中的一个包括第一IgG₁CH3结构域,其包括选自下组的取代,该组由以下各项组成:T366Y以及T366W,并且另一个重链包括第二IgG₁CH3结构域,其包括选自下组的取代,该组由以下各项组成:Y407T、T366S、L368A、Y407V。在一些实施例中,第二重链的片段是Fc片段。在某些实施例中,第二重链或其片段来自特异性结合非人类抗原(即在其他生物而非人类中表达的抗原)的抗原结合域。在某些实施例中,第二重链或其片段来自特异性结合病毒抗原的抗原结合域。在某些实施例中,病毒抗原不存在于人类免疫细胞中(例如,人类免疫细胞不受与病毒抗原相关的病毒感染)。在某些实施例中,病毒抗原是HIV抗原。在某些实施例中,第二重链或其片段来自特异性结合鸡白蛋白或鸡卵溶菌酶的抗原结合域。在某些实施例中,第二重链或其片段来自特异性结合不是由(即不存在于)野生型细胞(例如,野生型人类细胞)表达的抗原的抗原结合域。在某些实施例中,第二重链或其片段来自特异性结合不是由(即不存在于)正常细胞(例如,野生型细胞(例如,野生型人类细胞))表达的肿瘤相关抗原的抗原结合域。在某些实施例中,肿瘤相关抗原不是由(即不存在于)人类细胞表达的。在某些实施例中,第二重链或其片段包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、以及其组合。在某些实施例中,突变是N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中,突变是C127S。在某些实施例中,突变是S228P。在某些实施例中,第二重链或其片段包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、以及其组合。在某些实施例中,第一和第二重链恒定区选自下组,该组由以下各项组成:免疫球蛋白IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、以及IgA₂。在某些实施例中,免疫球蛋白是人类免疫球蛋白。在某些实施例中,第一和第二重链恒定区是同种型的。在某些实施例中,第一和第二重链恒定区是IgG₁恒定区,并且包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A、或其组合。在某些实施例中,第一和第二重链恒定区是IgG₁恒定区,并且包括选自下组的相同的突变,该组由以下各项组成:D265A、P329A、或其组合。在某些实施例中,第一和第二重链恒定区是IgG₂重链恒定区,并且包括C127S突变。在某些实施例中,第一和

第二重链恒定区是IgG₄重链恒定区,并且包括S228P突变。在某些实施例中,抗体是拮抗性的。

[0349] 在上述针对包括特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域以及第二抗原结合域或第二重链或其片段的抗体的方面中,抗原结合域可以包括在此描述的抗OX40序列中或任一种。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:(a) 包括VH互补决定区(CDR) 1的第一重链可变域(VH),该VH CDR1包括GSAMH(SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列;VH CDR2,其包括RIRSKANSYATAYAASVKG(SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列;以及VH-CDR3,其包括GIYDSSGYDY(SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列;以及(b) 包括VL-CDR1的第一轻链可变域(VL),其包括RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列;VL-CDR2,其包括LGSNRAS(SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列;以及VL-CDR3,其包括MQALQTPLT(SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域与以下抗体特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的相同表位,该抗体包括:VH,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以及VL,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施例中,与结合SEQ ID NO:55的人类OX40序列相比,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域展示出与SEQ ID NO:55相同的蛋白质(除了存在选自下组的氨基酸突变,该组由以下各项组成:N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、以及其组合)降低的结合或不结合。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括VH和VL,其中VH包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括VH和VL,其中VL包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施例中,结合OX40的抗原结合域包括:VH,其包括与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:VH,其包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施例中,结合OX40的抗原结合域包括:VH,其包括衍生自人类IGHV3-73种系序列(例如,IGHV3-73*01(例如,具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列))的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:VL,其包括与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、或99%一致的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:VL-CDR3,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:3。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:VL,其包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:轻链,其包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:轻链,其包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:VL,其包括衍生自人类IGKV2-28种系序列(例如,IGKV2-28*01(例如,具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列))的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括分别在SEQ ID NO:16和15中列出的VH和VL序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:重链,其包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括:重链,其包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:N297A、N297Q、D265A突变、或其组合。在某些实施例中,特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的抗原结合域包括选自下组的突变,该组由以下各项组成:

D265A、P329A以及其组合。

[0350] 在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体与OX40(例如,人类OX40)拮抗。在某些实施例中,抗体灭活、降低或抑制OX40(例如,人类OX40)的活性。在某些实施例中,抗体抑制或减少OX40(例如,人类OX40)与OX40配体(例如,人类OX40配体)的结合。在某些实施例中,抗体抑制或减少OX40(例如,人类OX40)信号传导。在某些实施例中,抗体抑制或减少由OX40配体(例如,人类OX40配体)诱导的OX40(例如,人类OX40)活性(例如,OX40信号传导)。在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体抑制或减少T细胞增殖。在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体抑制或减少T细胞增殖。在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体抑制或减少细胞因子的产生(例如,通过刺激的T细胞抑制或减少IL-2、TNF α 、IFN γ 、IL-4、IL-10、IL-13、或其组合的产生)。在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体通过SEA刺激的T细胞抑制或减少IL-2的产生。在某些实施例中,在此描述的拮抗性抗体阻断OX40与OX40L的相互作用(例如,阻断OX40L与OX40彼此的结合(例如,阻断人类OX40配体与人类OX40的结合))。

[0351] 在某些实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将OX40(例如,人类OX40)活性降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述和/或本领域技术人员已知的方法所测定的。在某些实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将OX40(例如,人类OX40)活性降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过在此描述和/或本领域技术人员已知的方法所测定的。OX40(例如,人类OX40)活性的非限制性实例可以包括OX40(例如,人类OX40)信号传导、细胞增殖、细胞存活、以及细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13)。在某些实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体抑制、减少、或灭活OX40(例如,人类OX40)活性。在具体实施例中,如以下实例中所述测定OX40活性。

[0352] 在某些方面中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体抑制、减少、或灭活表达OX40并且响应于OX40信号传导的细胞的细胞增殖(例如,响应于OX40刺激和OX40信号传导而增殖的细胞(如T细胞))。细胞增殖测定如本领域中所述(例如,³H-胸腺嘧啶核苷掺入法、BrdU掺入法或CFSE法,如在以下实例中所述),并且可以由本领域普通技术人员容易地实施。在具体实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低的细胞增殖。

[0353] 在某些方面中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体降低细胞(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))的存活。在一个具体实施例中,相对于仅用

促T细胞分裂原刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低的存活。细胞存活测定如本领域中所述(例如,台盼蓝排除测定法)并且可以由本领域普通技术人员容易地实施。

[0354] 在具体实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将细胞存活(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法),在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下所测定的。在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的OX40(例如,人类OX40)活性,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将细胞存活(例如,T细胞(如CD4和CD8效应T细胞))降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法)所测定的。

[0355] 在一些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞,用促T细胞分裂原(例如,抗CD3抗体或佛波酯)刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的细胞存活,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法)所测定的。在一些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞存活,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,台盼蓝排除测定法)所测定的。

[0356] 在某些实施例中,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体无法防止效应T细胞(例如,CD4⁺和CD8⁺效应T细胞)遭受激活诱导的细胞死亡。

[0357] 在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下、在有或无OX40(例如,人类OX40)刺激存在下的细胞因子产生,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13)抑制、减少、或灭活了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过在此描述(参见以下实例)或本领域技术人员已知的方法所测定的。在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特

异性结合OX40的抗体)的情况下、在有或无OX40(例如,人类OX40)刺激存在下的细胞因子产生,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13)抑制或减少了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述(参见以下实例,如实例2)或本领域技术人员已知的方法所测定的。

[0358] 在某些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13),如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,ELISA测定或如以下实例中所述)所测定的。在一些实施例中,相对于仅用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞,用促T细胞分裂原或T细胞受体复合物刺激剂(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA)、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体))刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13),如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,ELISA测定或如以下实例中所述)所测定的。

[0359] 在具体实施例中,相对于在不存在任何抗体或存在不相关抗体(例如,不会免疫特异性结合OX40的抗体)的情况下的IL-2产生,免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体将响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的IL-2产生降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过在此描述(参见以下实例,如实例2)或本领域技术人员已知的方法所测定的。

[0360] 在某些实施例中,相对于仅用SEA刺激的T细胞,用葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激进行刺激的T细胞(例如,CD4⁺或CD8⁺T细胞)在免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的拮抗性抗体的存在下,具有降低了至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的IL-2产生,如通过在此描述或本领域技术人员已知的方法(例如,ELISA测定或如以下实例中所述)所测定的。

[0361] 可以将抗OX40抗体融合或缀合(例如,共价地或非共价地连接)到可检测标签或物质上。可检测标签或物质的实例包括酶标签(如,葡萄糖氧化酶);放射性同位素(如碘(¹²⁵I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹²¹In)及锝(⁹⁹Tc));发光标签(如鲁米诺);以及荧光标

签(如荧光素及罗丹明及生物素)。可以将此类标记抗体用于检测OX40(例如,人类OX40)蛋白。参见,例如,以下章节5.5.2。

[0362] 5.3 抗体产生

[0363] 免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体可通过本领域已知的任何合成抗体的方法产生,例如,通过化学合成或通过重组表达技术。在此描述的方法采用,除非另有指明,分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成及修饰、核酸杂交及技术领域中相关领域的常规技术。这些技术描述于,例如,在此引用的参考文献中并且在文献中已有充分解释。参见例如,马尼亚蒂斯(Maniatis) T等人,(1982) 分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press);萨姆布鲁克(Sambrook) J等人,(1989),分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港实验室出版社;萨姆布鲁克J等人,(2001),分子克隆:实验室手册,冷泉港实验室出版社,冷泉港,NY;奥苏贝尔FM等人,当代分子生物学实验手册,约翰&威利父子公司(1987以及每年更新);当代免疫学实验手册(Current Protocols in Immunology),约翰&威利父子公司(1987以及每年更新)盖特(Gait)(编辑)(1984)寡核苷酸合成:实用方法(Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach),IRL出版社;埃克斯坦(Eckstein)(编辑)(1991)寡核苷酸及类似物:实用方法(Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach),IRL出版社;比伦(Birren) B等人,(编辑)(1999)基因组分析:实验室手册(Genome Analysis:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社。

[0364] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体是通过任何涉及创造的手段(例如,经由DNA序列的合成、基因工程)而制备、表达、创造或分离的抗体(例如,重组抗体)。在某些实施例中,此类抗体包括并非天然存在于动物或哺乳动物(例如,人类)体内的抗体种系谱中的序列(例如,DNA序列或氨基酸序列)。

[0365] 在某一方面中,在此提供了制造免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的方法,该方法包括培养在此描述的细胞或宿主细胞。在某一方面中,在此提供了制造免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的方法,该方法包括使用在此描述的细胞或宿主细胞(例如,细胞或宿主细胞,其包括编码在此描述的抗体的多核苷酸)表达(例如,重组表达)该抗体。在一个具体实施例中,细胞是分离的细胞。在一个具体实施例中,已经将外源多核苷酸引入至细胞中。在一个具体实施例中,该方法进一步包括纯化从细胞或宿主细胞中获得的抗体的步骤。

[0366] 用于产生多克隆抗体的方法在本领域是已知的(参见,例如精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology),(2002)第5次编辑,奥苏贝尔FM等人,编辑,约翰&威利父子公司,纽约中的第11章)。

[0367] 可使用本领域中已知的各种技术来制备单克隆抗体,包括使用杂交瘤、重组体及噬菌体展示技术或其组合。例如,可使用杂交瘤技术产生单克隆抗体,包括本领域中已知以及所教导的技术,例如,在哈洛(Harlow) E和拉内(Lane) D,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社,第2版,1988);哈姆林(Hammerling) GJ等人,在单克隆抗体及T细胞杂交瘤(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas) 563 681(爱思唯尔(Elsevier), N.Y., 1981)中。如在此所使用的,术语“单克隆抗体”不限于由杂交瘤技术产生的抗体。例如,可由外源表达在此描述的抗体的宿主细胞重组产生单克隆抗体。

[0368] 在具体实施例中,如在此所使用的“单克隆抗体”是由单个细胞(例如,生产重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)所产生的抗体,其中通过例如ELISA或本领域已知或在此提供的实施例中的其他抗原-结合或竞争性结合分析,来确定抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在具体实施例中,单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施例中,单克隆抗体是单价抗体或多价(例如,双价)抗体。在某些实施例中,单克隆抗体可以是Fab片段或F(ab')₂片段。可例如,通过如科勒(Kohler)G和米尔斯坦(Milstein)C(1975)自然(Nature) 256:495中所描述的杂交瘤方法制造或可例如使用例如如在此描述的技术从噬菌体文库分离在此描述的单克隆抗体。其他用于制备克隆细胞系以及由其表达的单克隆抗体的方法是本领域中所熟知的(参见,例如,上述精编分子生物学实验指南,(2002)第5次编辑,奥苏贝尔FM等人中的第11章)。

[0369] 使用杂交瘤技术用于产生以及筛选特异性抗体的方法在本领域中是常规的并且是众所周知的。例如,在杂交瘤方法中,小鼠或其他适当的宿主动物(如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴)经过免疫以引发产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质(例如,OX40(例如,人类OX40))的抗体的淋巴细胞。可替代地,体外可使淋巴细胞免疫。然后,使用适当的熔剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(戈丁(Goding) JW(编辑),单克隆抗体:原理与实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice),第59-103页(学术出版社(Academic Press),1986))。此外,可使用RIMMS(多位点重复免疫)技术免疫动物(基尔帕特里克(Kilpatrick)KE等人,(1997)杂交瘤(Hybridoma) 16:381-9,通过引用以其全文结合)。

[0370] 在一些实施例中,可以用抗原(例如,OX40(例如,人类OX40))免疫小鼠(或其他动物,(如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)),并且一旦检测到免疫应答,例如,在小鼠血清中检测到特异性针对抗原的抗体,收集小鼠脾脏并且分离脾细胞。然后,通过熟知的技术将脾细胞融合至任何适当的骨髓瘤细胞,例如来自细胞系SP20(可以获得自美国种质保存中心(ATCC®)(马纳萨斯(Manassas),VA))的细胞,以形成杂交瘤。通过有限的稀释选择并克隆杂交瘤。在某些实施例中,收集经免疫小鼠的淋巴结并且与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0371] 因而,将所制备的杂交瘤细胞接种并生长在适当的培养基中,其优选包含一或多种能够抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如,若亲代骨髓瘤细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨蝶呤及胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0372] 具体实施例采用有效融合、支持通过所选的生产抗体的细胞稳定高-水平产生抗体,并且对培养基(如HAT培养基)敏感的骨髓瘤细胞。在这些之中,骨髓瘤细胞系是鼠科骨髓瘤株系,如NS0细胞系或衍生自MOPC-21及MPC-11小鼠肿瘤细胞系,其可以获得自美国加利福尼亚州(CA)圣地亚哥(San Diego)索尔克研究所细胞分布中心(Salk Institute Cell Distribution Center),以及SP-2或X63-Ag8.653细胞,其可以获得自美国马里兰州(MD)罗克维尔市(Rockville)美国种质保存中心。还描述了人类骨髓瘤及小鼠-人类杂合骨髓瘤细胞系用于产生人类单克隆抗体(科兹波尔(Kozbor)D(1984)免疫学杂志133:3001-5;布罗迪(Brodeur)等人,单克隆抗体生产及应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),第51-63页(马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker,Inc.),纽约,1987))。

[0373] 为了产生针对OX40 (例如, 人类OX40) 的单克隆抗体, 对杂交瘤细胞生长于其中的培养基进行分析。通过本领域中已知的方法确定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性, 例如, 免疫沉淀法或通过体外结合鉴定法, 如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0374] 在鉴定出产生具有所希望特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后, 可通过有限稀释流程将克隆进行亚克隆并且通过标准方法 (上述戈丁JW (编辑), 单克隆抗体: 原理与实践) 使其生长。为此目的, 适当的培养基包括, 例如, D-MEM或RPMI 1640培养基。此外, 杂交瘤细胞可作为动物中的腹水瘤在体内生长。

[0375] 通过常规免疫球蛋白纯化程序 (例如, 蛋白质A-交联琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱法) 适当地将由亚克隆所分泌的单克隆抗体从培养基、腹水液或血清中分离。

[0376] 可以通过本领域的普通技术人员已知的任何技术产生在此描述的抗体。例如, 可使用酶 (如木瓜酵素 (以产生Fab片段)) 或胃蛋白酶 (以产生F(ab')₂片段) 通过免疫球蛋白分子的蛋白酶剪切产生在此描述的Fab及F(ab')₂片段。Fab片段对应于四聚体抗体分子的两个相同臂中的一个并且包含与重链的VH及CH1结构域配对的完整轻链。F(ab')₂片段包含四聚体抗体分子的两个通过铰链区的二硫键连接的抗原结合臂。

[0377] 另外, 还可以使用各种本领域已知的噬菌体展示方法来产生在此描述的抗体。在噬菌体展示方法中, 蛋白被展示于噬菌体颗粒的表面上, 这些噬菌体颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。具体地说, 将编码VH和VL结构域的DNA序列从动物cDNA文库 (例如, 人类或鼠类的受影响组织cDNA文库) 中进行扩增。通过PCR将编码这些VH和VL结构域的DNA与scFv连接物重组在一起, 并且克隆至噬粒载体中。将该载体以电穿孔转至大肠杆菌中, 并且用辅助噬菌体对该大肠杆菌进行感染。在这些方法中所使用的噬菌体典型地是包括fd和M13的丝状噬菌体, 并且这些VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。表达与特定抗原结合的抗体的噬菌体可以用抗原 (例如, 使用标记抗原或被结合或捕获至固体表面或珠的抗原) 来进行选择或鉴定。可以被用来制备在此描述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括在以下项中所披露的那些: 布尔克曼 (Brinkman) 等人, (1995) 免疫学方法杂志 (J Immunol Methods) 182:41-50; 艾姆斯 (Ames) RS等人, (1995) 免疫学方法杂志 184:177-186; 凯特尔伯勒 (Kettleborough) CA等人, (1994) 欧洲免疫学杂志 (Eur J Immunol) 24:952-958; 佩西克 (Persic) L等人, (1997) 基因 (Gene) 187:9-18; 伯顿 (Burton) DR和巴巴斯 (Barbas) CF (1994), 免疫学进展 (Advan Immunol) 57:191-280; PCT申请号PCT/GB 91/001134; 国际公开号W0 90/02809、W0 91/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、W0 93/11236、W0 95/15982、W0 95/20401、以及W0 97/13844; 以及美国专利号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、以及5,969,108。

[0378] 如在以上参考文献中所说明的, 在噬菌体选择之后, 可以对来自该噬菌体的这些抗体编码区进行分离, 并且用来产生抗体 (包括人类抗体), 并且在任何所希望的宿主 (包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母以及细菌 (例如, 如以下描述的)) 中进行表达。还可以采用用以重组产生抗体 (如Fab、Fab' 及F(ab')₂片段) 的技术, 使用本领域已知的方法, 如以下项中所披露的那些: PCT公开号W0 92/22324; 马利纳克斯 (Mullinax) RL等人, (1992)

生物技术 (BioTechniques) 12 (6) :864-9;沙怀 (Sawai) H等人, (1995) 美国生殖免疫学杂志 (Am J Reprod Immunol) 34:26-34;以及贝特尔 (Better) M等人, (1988) 科学 (Science) 240:1041-1043。

[0379] 在一个方面,为了产生抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制位点以及保护限制位点的旁侧序列的PCR引物可用于扩增来自模版(例如,scFv克隆)的VH或VL序列。利用本领域的技术人员已知的克隆技术,可以将经PCR扩增的VH结构域克隆进表达VH恒定区的载体中,并且可以将经PCR扩增的VL结构域克隆进表达VL恒定区(例如人类 κ 或 λ 恒定区)的载体中。还可以将VH和VL结构域克隆进表达必需恒定区的一种载体。然后使用本领域技术人员已知的技术,将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中,以产生表达抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0380] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分衍生自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可包含融合至人抗体恒定区的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。用于生产嵌合抗体的方法在本领域中是已知的。参见,例如,莫里森 (Morrison) SL (1985) 科学229:1202-7;维(Oi) VT和莫里森SL (1986) 生物技术4:214-221;吉利斯 (Gillies) SD等人, (1989) 免疫学方法杂志125:191-202;以及美国专利号5,807,715、4,816,567、4,816,397、以及6,331,415。

[0381] 人源化抗体能够结合预定的抗原并且包括框架区,其具有实质上人类免疫球蛋白的氨基酸序列,而CDR具有实质上非人类免疫球蛋白(例如,鼠科免疫球蛋白)的氨基酸序列。在具体实施例中,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白通常是人类免疫球蛋白。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3及CH4区。人源化抗体可以选自任何类型的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA及IgE及任何同型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃及IgG₄。可以使用本领域中已知的各种技术来产生人源化抗体,包括但不限于,CDR-移植(欧洲专利号EP 239400;国际公开号W0 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101、以及5,585,089),贴面(veneering)或重铺(resurfacing)(欧洲专利号EP 592106以及EP 519596;帕德兰 (Padlan) EA (1991) 分子免疫学 (Mol Immunol) 28 (4/5) :489-498;斯登尼克 (Studnicka) GM等人, (1994) 蛋白质工程 (Prot Engineering) 7 (6) :805-814;以及罗格斯克 (Roguska) MA等人, (1994) 美国科学院院报91:969-973),链改组(chain shuffling)(美国专利号5,565,332),以及以下项中所披露的技术:例如,美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公开号W0 93/17105;谭 (Tan) P等人, (2002) 免疫学杂志169:1119-25;卡尔达斯 (Caldas) C等人, (2000) 蛋白质工程13 (5) :353-60;摩里亚 (Morea) V等人, (2000) 方法 (Methods) 20 (3) :267-79;巴卡 (Baca) M等人, (1997) 生物化学杂志 (J Biol Chem) 272 (16) :10678-84;罗格斯克 (Roguska) MA等人, (1996) 蛋白质工程9 (10) :895-904;科托 (Couto) JR等人, (1995) 癌症研究55 (增刊23) :5973s-5977s;科托 (Couto) JR等人, (1995) 癌症研究55 (8) :1717-22;桑德胡 (Sandhu) JS (1994) 基因150 (2) :409-10以及佩德森 (Pedersen) JT等人, (1994) 分子生物学杂志 (J Mol Biol) 235 (3) :959-73。还参见美国申请公开号US 2005/0042664 A1 (2005年2月24日),该申请通过引用以其全部内容结合在此。

[0382] 可以通过本领域熟知的方法产生单域抗体(例如,缺少轻链的抗体)。参见里希曼 (Riechmann) L和缪德曼斯 (Muyldermans) S (1999) 免疫学杂志231:25-38;纳托尔 (Nuttall) SD等人, (2000) 当代药学生物技术 (Curr Pharm Biotechnol) 1 (3) :253-263;缪德曼斯S, (2001) 生物技术杂志 (J Biotechnol) 74 (4) :277-302;美国专利号6,005,079;以及国际公

开号W0 94/04678、W0 94/25591以及W0 01/44301。

[0383] 另外,免疫特异性结合OX40抗原的抗体可以进而被用于产生“模拟”抗原的抗独特型抗体,这是使用本领域的普通技术人员所熟知的技术。(参见,例如,格林斯潘 (Greenspan) NS和博纳 (Bona) CA (1989) FASEB杂志7 (5):437-444;以及尼辛诺夫 (Nissinoff) A (1991) 免疫学杂志147 (8):2429-2438)。

[0384] 在具体实施例中,与在此描述的抗OX40抗体一样结合OX40 (例如,人类OX40) 的相同表位的在此描述的抗体是人抗体。在具体实施例中,竞争性阻断 (例如,以剂量依赖性方式) 在此描述的抗体中的任一种 (例如,pab1949或pab2044) 与OX40 (例如,人类OX40) 结合的在此描述的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的任何方法产生人抗体。例如,可使用不能表达功能性内源免疫球蛋白,但可以表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠。具体地说,人类重链及轻链免疫球蛋白基因复合物可随机或通过同源重组导入小鼠胚胎干细胞中。可替代地,除了人类重链及轻链基因之外,人类可变区、恒定区及多变区还可被导入小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链及轻链免疫球蛋白基因可分别或在通过同源重组导入人类免疫球蛋白基因座的同时变得无功能。具体地说, J_H 区的纯合性缺失阻止内源性抗体产生。将经修饰的胚胎干细胞扩展并且显微注射进胚泡中,以产生嵌合小鼠。然后,饲养嵌合小鼠,以产生表达人抗体的纯合子代。用所选抗原以正常的方式使转基因小鼠免疫 (例如全部或部分抗原 (例如,OX40))。可以使用常规杂交瘤技术从经免疫的转基因小鼠中获得针对抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所携带的人类免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后经历类别转换及体细胞突变。因此,使用此种技术,可能产生治疗有用的IgG、IgA、IgM及IgE抗体。对于用于产生人抗体的此项技术的综述,参见伦贝格 (Lonberg) N和胡萨尔 (Huszar) D (1995) 免疫学国际评论 (Int Rev Immunol) 13:65-93。对于用于产生人抗体及人类单克隆抗体的此项技术及用于生产此类抗体的程序的详细讨论,参见例如,国际公开号W0 98/24893、W0 96/34096以及W0 96/33735;以及美国专利号5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318以及5,939,598。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM (安根尼克斯 (Abgenix) 公司;美国专利号6,075,181以及6,150,184)、HuAb-MouseTM (梅达雷克斯公司 (Mederex, Inc.) /Gen Pharm;美国专利号5,545,806以及5,569,825)、Trans Chromo MouseTM (Kirin) 以及KM MouseTM (梅达雷克斯公司 (Medarex) /Kirin)。

[0385] 特异性结合OX40 (例如,人类OX40) 的人抗体可以通过多种本领域已知的方法制造,包括上述噬菌体展示方法,使用衍生自人类免疫球蛋白序列的抗体文库。还参见美国专利号4,444,887、4,716,111、以及5,885,793;以及国际公开号W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735、以及W0 91/10741。

[0386] 在一些实施例中,可使用小鼠-人类杂交瘤产生人抗体。例如,用EB病毒 (EBV) 转化的人类外周血淋巴细胞可与小鼠骨髓瘤细胞融,以产生分泌人类单克隆抗体的小鼠-人类杂交瘤,并且可以筛选这些小鼠-人类杂交瘤,以确定分泌免疫特异性结合靶抗原 (例如,OX40 (例如,人类OX40)) 的人类单克隆抗体的杂交瘤。此类方法是已知的并且在本领域中有描述,参见,例如,新本 (Shinmoto) H等人, (2004) 细胞工程学 (Cytotechnology) 46:19-23;那加那瓦 (Naganawa) Y等人, (2005) 人类抗体 (Human Antibodies) 14:27-31。

[0387] 5.3.1 多核苷酸

[0388] 在某些方面中,在此提供了多核苷酸,其包括编码免疫特异性结合OX40 (例如,人

类OX40)抗原的在此描述的抗体或其片段(例如,可变轻链区和/或可变重链区)的核苷酸序列,以及载体,例如包括此类多核苷酸的载体,用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌以及哺乳动物细胞)中重组表达。在此提供了多核苷酸,其包括编码任一种在此提供的抗体的核苷酸序列,连同载体,其包括此类多核苷酸序列,例如在宿主细胞(例如,哺乳动物细胞)中有效表达它们的表达载体。

[0389] 如在此所使用的,“分离的”多核苷酸或核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源(例如,在小鼠或人类)的其他核酸分子中分离出来的。另外,“分离的”核酸分子(如cDNA分子)可基本上不含其他细胞材料或当通过重组技术产生时,不含培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学制剂。例如,语言“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特别是少于约10%)的其他材料(例如,细胞材料、培养基、其他核酸分子、化学前体和/或其他化学制剂)的多核苷酸或核酸分子的制剂。在一个具体实施例中,将编码在此描述的抗体的一个或多个核酸分子分离或纯化。

[0390] 在特定方面中,在此提供了多核苷酸,其包括编码免疫特异性结合OX40多肽(例如,人类OX40)且包括如在此描述的氨基酸序列的抗体的核苷酸序列,连同抗体,其与结合OX40多肽(例如,以剂量依赖性方式)的此类抗体竞争、或与此类抗体结合相同的表位。

[0391] 在某些方面中,在此提供了多核苷酸,其包括编码在此描述的抗体轻链或重链的核苷酸序列。多核苷酸可以包括编码轻链(包括在此描述的抗体的VL FR以及CDR(参见例如表1和3))的核苷酸序列。多核苷酸可以包括编码重链(包括在此描述的抗体的VH FR以及CDR(参见例如表2和4))的核苷酸序列。在具体实施例中,在此描述的多核苷酸编码VL结构域,其包括在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列。在具体实施例中,在此描述的多核苷酸编码VH结构域,其包括在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列。

[0392] 在具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括编码包括三个VL链CDR(例如,包含在此描述的任一种抗体的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3(例如,参见表1))的抗OX40抗体的核苷酸序列。在具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括三个VH链CDR(例如,包含在此描述的任一种抗体的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3(例如,参见表2))。在具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括编码抗OX40抗体的核苷酸序列,该抗体包括三个VH链CDR(例如,包含在此描述的任一种抗体的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3(例如,参见表1))以及三个VH链CDR(例如,包含在此描述的任一种抗体的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3(例如,参见表2))。

[0393] 在具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括编码抗OX40抗体或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括VL结构域,例如包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,包括在此描述的氨基酸序列(例如参见表1和3,例如在表中按名称鉴定的具体抗体的VL CDR及VLFR)。在具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括编码抗OX40抗体或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括VH结构域,例如包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,包括在此描述的氨基酸序列(例如参见表2和4,例如在表中按名称鉴定的具体抗体的VH CDR及VHFR)。

[0394] 在某些实施例中,在此描述的多核苷酸包括编码在此提供的抗体的核苷酸序列,该抗体包括轻链可变区,其包括在此描述的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:15),其中该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在某一个实施例中,在此描述的多核苷酸包括编码在此提供的抗体pab1949或pab2044或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括轻链可变

区,该轻链可变区包括在此描述的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:15)。

[0395] 在某些实施例中,在此描述的多核苷酸包括编码在此提供的抗体的核苷酸序列,该抗体包括重链可变区,该重链可变区包括在此描述的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:16),其中该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在某一个实施例中,在此描述的多核苷酸包括编码在此提供的抗体pab1949或pab2044或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括重链可变区,该重链可变区包括在此描述的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:16)。

[0396] 在某些方面中,多核苷酸包括编码在此描述的抗体或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括VL结构域,该VL结构域包括一个或多个具有在此描述的氨基酸序列(例如,参见表3)的VL FR,其中该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在某些方面中,多核苷酸包括编码在此描述的抗体或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括VH结构域,该VH结构域包括一个或多个具有在此描述的氨基酸序列(例如,参见表4)的VH FR,其中该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。

[0397] 在具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码在此描述的抗体或其片段的核苷酸序列,该抗体或其片段包括:是人类框架区的框架区(例如,VL结构域和VH结构域的框架区),其中该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在某些实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码描述于上述章节5.2中的抗体或其片段(例如,CDR或可变域)的核苷酸序列。

[0398] 在具体方面,在此提供了多核苷酸,其包括编码包括轻链和重链(例如,分别的轻链和重链)的抗体的核苷酸序列。关于轻链,在一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码 κ 轻链的核苷酸序列。在另一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码 λ 轻链的核苷酸序列。在又一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码包括人类 κ 轻链或人类 λ 轻链的在此描述的抗体的核苷酸序列。在一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核苷酸序列,其中该抗体包括轻链,并且其中VL结构域的氨基酸序列可包括在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列,并且其中轻链的恒定区包括人类 κ 轻链恒定区的氨基酸序列。在另一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码抗体的核苷酸序列,该抗体免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)并且包括轻链,其中VL结构域的氨基酸序列可包括在SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列,并且其中轻链的恒定区包括人类 λ 轻链恒定区的氨基酸序列。例如,人恒定区序列可以是描述于美国专利号5,693,780中的那些。

[0399] 在一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码在此描述的、免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核苷酸序列,其中该抗体包括重链,其中VH结构域的氨基酸序列可包括在SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列,并且其中重链的恒定区包括人类 γ 重链恒定区的氨基酸序列。

[0400] 在某一个实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码在此描述的、免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体(例如,pa91949或pab2044,如针对VH结构域,SEQ ID NO:16,或针对VL结构域,SEQ ID NO:15)的VH结构域和/或VL结构域的一个或多个核苷酸序列。

[0401] 在又一个具体实施例中,在此提供的多核苷酸包括编码在此描述的、免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的抗体的核苷酸序列,其中该抗体包括包含任何在此描述的氨基酸序列的VL结构域和VH结构域,并且其中恒定区包括人类IgG₁(例如,同种异型1、17或3)、人类IgG₂或人类IgG₄恒定区的氨基酸序列。

[0402] 在一个具体实施例中,在此提供了多核苷酸,其包括编码抗OX40抗体或其结构域(如在此所指定,参见例如表1-4,例如抗体pab1949或pab2044)的核苷酸序列。

[0403] 在此还提供了编码例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列取代以及消除mRNA不稳定性组件而优化的抗OX40抗体或其片段的多核苷酸。通过引入密码子改变和/或消除mRNA中抑制区而产生编码抗OX40抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH结构域、或VL结构域)以重组表达优化的核酸的方法因而可以通过采用描述于例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;以及6,794,498中的优化方法进行。例如,RNA中潜在的剪接位点和不稳定性组件(例如,A/T或A/U丰富的组件)可无需改变由核酸序列编码的氨基酸而发生突变,以增加RNA重组表达的稳定性。这些改变利用遗传密码的简并,例如对于相同的氨基酸使用替代密码子。在一些实施例中,可以令人希望的是改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如与原氨基酸具有类似化学结构及特性和/或功能的类似氨基酸。

[0404] 在某些实施例中,编码在此描述的抗OX40抗体或其片段(例如,VL结构域或VH结构域)的优化多核苷酸序列可与编码在此描述的抗OX40抗体或其片段(例如,VL结构域或VH结构域)的未优化多核苷酸序列的反义(例如互补)多核苷酸杂交。在具体实施例中,编码在此描述的抗OX40抗体或片段的优化核苷酸序列在高严格度条件下与编码在此描述的抗OX40抗体或其片段的未优化多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在一个具体实施例中,编码在此描述的抗OX40抗体或其片段的优化核苷酸序列在高严格度、中等、或较低严格度杂交条件下与编码在此描述的抗OX40抗体或其片段的未优化核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已描述于,参见例如美国专利申请公开号US 2005/0048549(例如,第72-73段)中,将其通过引用结合在此。

[0405] 可通过本领域中已知的任何方法获得多核苷酸,并且确定多核苷酸的核苷酸序列。可以使用本领域熟知的方法确定编码在此描述的抗体(例如,描述于表14中的抗体)以及这些抗体的修饰形式的核苷酸序列,即以此方式组装已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子,以产生编码抗体的核酸。编码抗体的此类多核苷酸可以组装自化学合成的寡核苷酸组合(例如,如描述于库特梅尔(Kutmeier)G等人,(1994),生物技术(BioTechniques)17:242-246中),简言之,其涉及包含编码抗体、将那些寡核苷酸的退火与连接、然后通过PCR扩增所连接的寡核苷酸的序列部分的重叠寡核苷酸合成。

[0406] 可替代地,可以使用本领域熟知的方法(例如,PCR及其他分子克隆方法)从适当来源(例如,杂交瘤)的核酸中产生编码在此描述的抗体或其片段的多核苷酸。例如,使用可与已知序列的3'及5'端杂交的合成引物的PCR扩增可使用获得自生产感兴趣的抗体的杂交瘤细胞的基因组DNA进行。可使用此类PCR扩增方法以获得包括编码抗体轻链和/或重链的序列的核酸。可使用此类PCR扩增方法以获得包括编码抗体可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。可以将扩增的核酸克隆进载体中,以在宿主细胞中表达以及进一步克隆,例如,以产生嵌合及人源化抗体。

[0407] 如果包含编码特定抗体或其片段的核酸的克隆无法获得,但已知抗体分子或其片段的序列,则编码免疫球蛋白或其片段的核酸可以化学合成或获得自适当来源(例如,抗体cDNA文库或产生自下述的cDNA文库,或从下述分离的核酸(优选poly A+RNA):表达抗体的任何组织或细胞,如经选择表达在此描述的抗体的杂交瘤细胞),通过PCR扩增,使用可与序列的3'及5'端杂交的合成引物,或通过克隆,使用特异性针对特定基因序列的寡核苷酸探

针,以从cDNA文库中鉴定例如编码抗体的cDNA克隆。然后,可以使用本领域熟知的任何方法,将通过PCR产生的扩增核酸克隆进可复制的克隆载体中。

[0408] 使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗OX40抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)可以容易地分离和测序编码在此描述的抗OX40抗体的DNA。杂交瘤细胞可充当此类DNA的来源。一旦发生分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将载体转染至不另外产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如来自CHO GS System™(龙沙公司(Lonza))的CHO细胞)或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中获得合成抗OX40抗体。

[0409] 为了产生抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制位点以及保护限制位点的旁侧序列的PCR引物可用于扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域的技术人员已知的克隆技术,可以将经PCR扩增的VH结构域克隆进表达重链恒定区(例如人类 γ 4恒定区)的载体中,并且可以将经PCR扩增的VL结构域克隆进表达轻链恒定区(例如人类 κ 或 λ 恒定区)的载体中。在某些实施例中,用于表达VH或VL结构域的载体包括EF-1 α 启动子、分泌讯号、可变域的克隆位点、恒定域以及选择标记如新霉素。还可以将VH和VL结构域克隆进表达必需恒定区的一种载体。然后使用本领域技术人员已知的技术,将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中,以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0410] 还可以例如,通过以鼠序列取代人类重链和轻链恒定域的编码序列,或通过非免疫球蛋白多肽全部或部分的编码序列共价结合至免疫球蛋白编码序列来修饰DNA。

[0411] 还提供了在高严格度、中等、或较低严格度杂交条件下与编码在此描述的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在具体实施例中,在此描述的多核苷酸在高严格度、中等、或较低严格度杂交条件下杂交至编码在此提供的VH结构域(例如,SEQ ID NO:16)和/或VL结构域(例如,SEQ ID NO:15)的多核苷酸。

[0412] 杂交条件已描述于本领域中并且是本领域技术人员已知的。例如,在严格条件下的杂交可涉及以下:与在约45℃下在6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中的滤膜结合的DNA杂交,接着在0.2xSSC/0.1%SDS中在约50℃-65℃下进行一次或多次洗涤;在高严格条件下的杂交可涉及以下:与在约45℃下在6xSSC中的滤膜结合的核酸杂交,接着在0.1xSSC/0.2%SDS中在约68℃下进行一次或多次洗涤。在其他严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知的并且已被描述于,参见例如,奥苏贝尔(Ausubel)FM等人编辑,(1989)当代分子生物学实验手册(Current Protocols in Molecular Biology),第I卷,格林出版协会公司(Green Publishing Associates,Inc.)以及约翰&威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.),纽约(New York),第6.3.1-6.3.6和2.10.3页中。

[0413] 5.3.2 细胞及载体

[0414] 在某些方面中,在此提供了表达(例如,重组地)特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的细胞(例如,宿主细胞)以及相关多核苷酸和表达载体。在此提供了载体(例如,表达载体),该载体包括多核苷酸,该多核苷酸包括编码抗OX40抗体或片段的核苷酸序列,以在宿主细胞中、优选在哺乳动物细胞中重组表达。在此还提供了宿主细胞,其包括此类载体以重组地表达在此描述的抗OX40抗体(例如,人类或人源化抗体)。在一个具体方面,在此提供了用于产生在此描述的抗体的方法,该方法包括在宿主细胞中表达此类抗体。

[0415] 特异性结合OX40 (例如, 人类OX40) 的在此描述的抗体或其片段 (例如, 在此描述的抗体重链或轻链或单链抗体) 的重组表达涉及构建表达载体, 其包含编码该抗体或片段的多核苷酸。一旦已经获得编码在此描述的抗体或其片段 (例如, 重链或轻链可变域) 的多核苷酸, 可使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术产生用于生产抗体分子的载体。因此, 在此描述了通过表达包含抗体或抗体片段 (例如, 轻链或重链) 编码核苷酸序列的多核苷酸用于制备蛋白质的方法。可以使用本领域的技术人员熟知的方法来构建含有抗体或抗体片段 (例如, 轻链或重链) 编码序列以及适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括, 例如, 体外重组DNA技术、合成技术及体内遗传重组。还提供了可复制载体, 其包括编码在此描述的抗体分子、抗体重链或轻链、抗体或其片段重链或轻链可变域或重链或轻链CDR的核苷酸序列, 可操作地连接至启动子。此类载体可以例如包括编码抗体分子恒定区的核苷酸序列 (参见例如, 国际公开号W0 86/05807以及W0 89/01036; 以及美国专利号5, 122, 464), 并且可以将抗体的可变域克隆进此类载体中, 以表达整个重链、整个轻链或整个重链及轻链二者。

[0416] 可以通过常规技术将表达载体转移到细胞 (例如, 宿主细胞) 中, 并且然后可以通过常规技术培养所得细胞, 以产生在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 或其片段。因此, 在此提供了宿主细胞, 其包含编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 或其片段的 (例如, 其重链或轻链、或其片段) 的多核苷酸, 可操作地连接至启动子, 以在宿主细胞中表达此类序列。在某些实施例中, 为了表达双链抗体, 可以将单独编码重链和轻链两者的载体在宿主细胞中共表达, 以表达整个免疫球蛋白分子, 详细说明如下。在某些实施例中, 宿主细胞包含载体, 该载体包括编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 重链及轻链两者、或其片段的多核苷酸。在具体实施例中, 宿主细胞包含两种不同的载体, 第一载体包括编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸, 以及第二载体包括编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 轻链或轻链可变区、或其片段的多核苷酸。在其他实施例中, 第一宿主细胞包括第一载体, 该第一载体包括编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸, 并且第二宿主细胞包括第二载体, 该第二载体包括编码在此描述的抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 轻链或轻链可变区的多核苷酸。在具体实施例中, 由第一细胞表达的重链/重链可变区联合第二细胞的轻链/轻链可变区, 以形成在此描述的抗OX40抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体)。在某些实施例中, 在此提供了宿主细胞群体, 其包括此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞。

[0417] 在一个具体实施例中, 在此提供了载体群体, 其包含第一载体和第二载体, 该第一载体包括编码在此描述的抗OX40抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 轻链/轻链可变区的多核苷酸, 并且该第二载体包括编码在此描述的抗OX40抗体 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) 重链/重链可变区的多核苷酸。

[0418] 可利用多种宿主-表达载体系统来表达在此描述的抗体分子 (例如, 包括pab1949或pab2044的CDR的抗体) (参见例如, 美国专利号5, 807, 715)。这类宿主表达系统代表可借以产生并随后纯化感兴趣的编码序列的媒介物, 而且还代表在用适当核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达在此描述的抗体分子的细胞。这些系统包括但不限于微生物, 如用

含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌和枯草杆菌);用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母(*Saccharomyces*)、毕赤酵母(*Pichia*));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻如莱茵衣藻);或具有含有源自哺乳动物细胞的基因组(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子、痘苗病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、海拉、以及NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20以及BMT10细胞)。在一个具体实施例中,用于表达在此描述的抗体(例如,包括抗体pab1949或pab2044中任一个的CDR的抗体)的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS SystemTM(龙沙公司)的CHO细胞。在一个具体实施例中,用于表达在此描述的抗体的细胞是人类细胞,例如,人类细胞系。在一个具体实施例中,哺乳动物表达载体是pOptiVECTM或pcDNA3.3。在一个具体实施例中,将细菌细胞(如大肠杆菌)或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于表达重组抗体分子,特别是用于表达整个重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)联合载体(如来自人巨细胞病毒的主要中期早期基因启动子组件)是针对抗体的有效表达系统(福尔京(Foecking)MK和霍夫施泰特尔(Hofstetter)H(1986)基因(Gene) 45:101-105;以及科克特(Cockett)MI等人,(1990)生物技术(Biotechnology) 8:662-667)。在某些实施例中,在此描述的抗体是由CHO细胞或NS0细胞产生的。在一个具体实施例中,编码免疫特异性结合OX40(例如,人类OX40)的在此描述的抗体的核苷酸序列的表达受组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调控。

[0419] 在细菌系统中,取决于所表达的抗体分子的预定用途,可以有利地选择许多表达载体。例如,当要产生大量这种抗体,用于生成抗体分子的药物组合物时,可能希望指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。这类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(鲁塞尔(Ruether)U和米勒-希尔(Mueller-Hill)B,(1983)EMBO J 2:1791-1794),其中抗体编码序列可以单独地与lac Z编码区同框连接至载体中,这样使得产生一种融合蛋白;pIN载体(井上(Inouye)S和井上M(1985)核酸研究(Nuc Acids Res) 13:3101-3109;凡赫克(Van Heeke)G和舒斯特(Schuster)SM(1989)生物化学杂志(J Biol Chem) 24:5503-5509);等。例如,pGEX载体也可以用于表达作为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白的外源多肽。一般来说,这类融合蛋白是可溶的并且能够通过吸附且结合至基质谷胱甘肽-琼脂糖珠粒,随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱来容易地从溶解的细胞中纯化。这些pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点,这样使得可以从GST部分释放克隆的靶基因产物。

[0420] 在一种昆虫系统中,例如,可以将加洲苜蓿夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*,AcNPV)用作表达外源基因的一种载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。可以将抗体编码序列单独地克隆至病毒的非必需区域(例如,多角体蛋白基因)中且置于一种AcNPV启动子(例如,多角体蛋白启动子)的控制下。

[0421] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为

表达载体的情况中,可以将感兴趣的抗体编码序列连接到腺病毒转录/翻译调控复合物上,例如晚期启动子以及三联前导序列。然后,可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。在病毒基因组非必需区域(例如,区域E1或E3)进行插入会得到能存活并且能够在被感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如参见洛根(Logan) J和申克(Shenk) T (1984) 美国科学院院报(PNAS) 81:3655-3659)。特定起始信号也被要求用于插入的抗体编码序列的有效翻译。这些信号包括ATG起始密码子和邻近序列。另外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同期以便确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以具有多种来源,天然的和合成的。可以通过包括适当的转录增强子组件、转录终止子等来增强表达的效率(参见例如,比特(Bitter) G等人,(1987) 酶学方法(Methods Enzymol) 153:516-544)。

[0422] 此外,可以选择一种宿主细胞株,该宿主细胞株调节插入的序列的表达,或以所希望的特定方式修饰和加工基因产物。蛋白质产物的这类修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)对于蛋白质的功能来说可能是重要的。不同宿主细胞对于蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保对所表达的异种蛋白进行正确的修饰和加工。为此,可以使用处理细胞机器以适当处理基因产物的初级转录物、糖基化及磷酸化的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、海拉、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不会内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠科骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10以及HsS78BsT细胞。在某些实施例中,在此描述的抗OX40抗体(例如,包括pab1949或pab2044的CDR的抗体)在哺乳动物细胞(如CHO细胞)中产生。

[0423] 在一个具体实施例中,在此描述的抗体具有低岩藻糖含量或无岩藻糖含量。可以使用本领域技术人员已知的技术来生产此类抗体。例如,可以在岩藻糖化缺陷型或缺少岩藻糖化能力的细胞中表达抗体。在一个具体实例中,可以将具有敲除 α 1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系用以产生具有低岩藻糖含量的抗体。**Potelligent[®]**系统(龙沙公司)是此种系统的实例,可以将其用于产生具有低岩藻糖含量的抗体。

[0424] 为了长期、高产率生产重组蛋白,可以产生稳定表达细胞。例如,可工程化稳定表达在此描述的抗OX40抗体(例如,包括pab1949或pab2044的CDR的抗体)的细胞系。在具体实施例中,在此提供的细胞稳定表达与形成在此描述的抗体(例如,包括pab1949或pab2044的CDR的抗体)有关的轻链/轻链可变域及重链/重链可变域。

[0425] 在某些方面中,并非使用含有病毒复制起点的表达载体,可以用由适当表达控制组件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的DNA及选择标记转化宿主细胞。在引入外源DNA/多核苷酸之后,可允许工程化细胞在富集培养基中生长1至2天,并且然后转换到选择性培养基中。重组质粒中的选择标记赋予对选择的抗性,并且允许细胞稳定地将质粒整合到其染色体中并生长以形成病灶,进而其可以进行克隆并扩展成细胞系。此方法可有利地用于工程化表达在此描述的抗OX40抗体或其片段的细胞系。这类工程化的细胞系特别适用于筛选和评估与该抗体分子直接或间接相互作用的组合物。

[0426] 可使用许多选择系统,包括但不限于,单纯疱疹病毒的胸苷激酶(威戈勒(Wigler) M等人,(1977) 细胞(Cell) 11(1):223-232)、次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(斯吉巴尔斯科

(Szybalska) EH和斯吉巴斯基 (Szybalski) W (1962) 美国科学院院报 (PNAS) 48 (12) :2026-2034) 以及腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (罗伊 (Lowy) I等人, (1980) 细胞22 (3) :817-823) 基因可分别用在tk-、hgprt-或aprt-细胞中。另外,可以将抗代谢药抗性作为选择以下基因的依据:dhfr,其赋予针对甲氨蝶呤的抗性 (威戈勒 (Wigler) M等人, (1980) 美国科学院院报 (PNAS) 77 (6) :3567-3570;奥海尔 (O' Hare) K等人, (1981) 美国科学院院报78:1527-1531); gpt,其赋予针对霉酚酸的抗性 (穆丽干 (Mulligan) RC和伯格 (Berg) P (1981) 美国科学院院报78 (4) :2072-2076); neo,其赋予针对氨基糖甙G-418的抗性 (吴 (Wu) GY和吴 (Wu) CH (1991) 生物疗法 (Biotherapy) 3:87-95;托尔斯托西弗 (Tolstoshev) P (1993) 药理学与毒物学年鉴 (Ann Rev Pharmacol Toxicol) 32:573-596;穆丽干RC (1993) 科学 (Science) 260:926-932;以及摩根 (Morgan) RA和安德森 (Anderson) WF (1993) 生物化学年评 (Ann Rev Biochem) 62:191-217;纳贝尔 (Nabel) GJ和费尔格纳 (Felgner) PL (1993) 生物技术趋势 (Trends Biotechnol) 11 (5) :211-215); 以及hygro,其赋予针对潮霉素的抗性 (圣德尔 (Santerre) RF等人, (1984) 基因 (Gene) 30 (1-3) :147-156)。可以将本领域公知的重组DNA技术的方法常规地应用于选择所希望的重组克隆,并且此类方法描述于,例如,奥苏贝尔 (Ausubel) FM等人 (编辑),当代分子生物学实验手册 (Current Protocols in Molecular Biology),约翰&威利父子公司 (John Wiley&Sons), NY (1993); 克里格勒 (Kriegler) M,基因转移和表达:实验室手册 (Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual), 斯托克顿出版社 (Stockton Press), NY (1990); 以及第12和13章中,Dracopoli NC等人 (编辑),当代人类遗传学实验手册 (Current Protocols in Human Genetics), 约翰&威利父子公司, NY (1994); Colbère-Garapin F等人, (1981) 分子生物学杂志 (J Mol Biol) 150:1-14中,将其通过引用以其全文结合在此。

[0427] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增来增加 (关于综述,参见贝宾顿 (Bebbington) CR和汉切尔 (Hentschel) CCG,使用基于基因扩增的载体来在DNA克隆中在哺乳动物细胞中表达克隆的基因 (The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning), 第3卷 (学术出版社 (Academic Press), 纽约,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,存在于宿主细胞培养物中的抑制剂的水平增加将使标记物基因的拷贝数目增加。由于所扩增的区域与抗体基因相关联,因此该抗体的产生也将增加 (克劳斯 (Crouse) GF等人, (1983), 分子细胞生物学杂志 (Mol Cell Biol) 3:257-66)。

[0428] 宿主细胞可被在此描述的两个或更多个表达载体 (第一载体编码重链衍生的多肽并且第二载体编码轻链衍生的多肽) 进行共转染。这两种载体可包含相同的选择标记,这使得重链和轻链多肽能相等表达。宿主细胞可以被不同量的两种或更多种表达载体进行共转染。例如,宿主细胞可以被下列任一比例的第一表达载体和第二表达载体进行转染:1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45或1:50。

[0429] 可替代地,可使用单个载体,该载体编码并且能够表达重链和轻链多肽两者。在此类情况中,轻链应置于重链之前,以避免过量的毒性游离重链 (普劳德富特 (Proudfoot) NJ (1986) 自然 (Nature) 322:562-565;以及科勒 (**Köhler**) G (1980) 美国科学院院报 (PNAS) 77:2197-2199)。重链和轻链编码序列可包括cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子或多

顺反子。多顺反子核酸构建体可编码2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,或者在2至5、5至10或10至20个范围内的基因/核苷酸序列。例如,双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包括启动子、第一基因(例如,在此描述的抗体重链)及第二基因及(例如,在此描述的抗体轻链)。在此种表达载体中,两种基因的转录可以由启动子来驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以由帽依赖性扫描机制来驱动,并且来自第二基因的mRNA的翻译可以由帽独立性机制(例如,通过IRES)来驱动。

[0430] 一旦在此描述的抗体分子已经通过重组表达产生,就可以通过本领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化该抗体分子,例如,通过色谱法(例如,离子交换、亲和法(特别是通过特异性抗原对蛋白质A的亲合性)和尺寸分级柱色谱法)、离心、差别溶解度、或者通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。另外,在此描述的抗体可融合到在此描述或其他本领域已知的异源多肽序列中以促进纯化。

[0431] 在具体实施例中,将在此描述的抗体分离或纯化。通常,分离的抗体是基本上不含其他具有与分离的抗体不同抗原特异性的抗体。例如,在一个具体实施例中,在此描述的抗体的制剂基本上不含细胞材料和/或化学前体。语言“基本上不含细胞材料”包括抗体的制剂,其中抗体是从细胞的细胞成分中分离出来的,抗体从细胞中分离或重组产生。因此,基本上不含细胞材料的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(按干重计)的异源蛋白质(在此也称为“污染蛋白质”)和/或抗体变体(例如,抗体的不同翻译后修饰形式)的抗体制剂。当重组地产生抗体或片段时,它也通常基本上不含培养基,即培养基表示蛋白制剂的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%的体积。当通过化学合成产生抗体或片段时,它通常基本上不含化学前体或其他化学制剂,即,从参与合成蛋白质的化学前体或其他化学制剂中分离出来。因此,此类抗体或片段的制剂具有少于约30%、20%、10%或5%(按干重计)的、除感兴趣的抗体或片段之外的化学前体或成分。在一个具体实施例中,将在此描述的抗体分离或纯化。

[0432] 5.4 药物组合物

[0433] 在此提供了组合物,其包括在此描述的具有所希望纯度的抗体在生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(1990)马克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚州)中。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下是对接受者无毒性的。

[0434] 在此描述的药物组合物可用于增强、诱导或激活OX40活性并且治疗病症(如癌症或传染性疾病)。可以根据在此描述的方法治疗的癌症的实例包括但不限于:B细胞淋巴瘤(例如,B细胞慢性淋巴细胞白血病、B细胞非霍奇金淋巴瘤、皮肤B细胞淋巴瘤、弥漫性大型B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、胚细胞瘤、脑转移瘤、乳癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、癌(例如,腺癌(例如,胃与食管交界处的腺癌))、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃与食管交界处的癌、胃肠道癌、成胶质细胞瘤(例如,多形性成胶质细胞瘤(例如,新诊断出的或复发的))、神经胶质瘤、头颈癌(例如,头颈部鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤、肾脏癌(例如,肾细胞癌及维耳姆斯氏瘤(Wilms' tumor))、喉癌、白血病(例如,慢性髓细胞性白血病、多毛细胞白血病)、肝癌(liver cancer)(例如,肝癌(hepatic carcinoma)及肝肿瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌及小细胞肺癌)、淋巴母细胞淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞

淋巴瘤、转移性脑肿瘤、转移性癌症、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、成神经细胞瘤、眼黑色素瘤、口咽癌症、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌(例如,胰管腺癌)、前列腺癌(例如,激素抵抗性(例如,去势难治性)、转移性、转移性激素难治性(例如,去势难治性、非雄激素依赖性))、肾细胞癌(例如,转移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如,横纹肌肉瘤)、皮肤癌(例如,黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤))、软组织肉瘤、实体瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、移行性细胞癌症(尿路上皮细胞癌症)、葡萄膜黑色素瘤(例如,转移性)、疣状癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)。在一个实施例中,可以根据在此描述的方法治疗的癌症的实例包括但不限于:晚期、复发性、或转移性实体瘤、淋巴瘤(例如,弥散性大B细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤)、乳癌、前列腺癌、头颈癌、结肠直肠癌、结肠癌、黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、子宫内膜癌、肾细胞癌、肾透明细胞癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌或肺腺癌)、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、胃癌、子宫癌、嗜铬细胞瘤、转移性皮肤鳞状细胞癌(例如,在移植患者中)、梅克尔细胞癌、皮肤T淋巴细胞瘤、神经内分泌肿瘤、骨源肿瘤(例如,骨肉瘤)、血管外皮细胞瘤、与遗传综合征有关的肿瘤(NF1或VHL)、脊索瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、生殖细胞瘤、小肠肿瘤、阑尾癌、以及病毒相关的肿瘤(例如,卡波西氏肉瘤)。在一个实施例中,在此描述的药物组合物用作药物或诊断剂。在一个实施例中,包括在此描述的激动性抗体的药物组合物用于在治疗癌症的方法中使用。

[0435] 包括在此描述的拮抗性抗体的在此描述的药物组合物可用于减少、抑制、或灭活OX40活性并且治疗病症(如炎性或自身免疫性疾病或障碍或传染性疾病)。在一个实施例中,包括在此描述的拮抗性抗体的药物组合物用于在治疗炎性或自身免疫性疾病或障碍或传染性疾病的方法中使用。

[0436] 包括在此描述的拮抗性抗体的在此描述的药物组合物可用于减少、灭活、或抑制OX40活性并且治疗选自下组的病症,该组由以下各项组成:感染(病毒性、细菌性、真菌性以及寄生虫)、与感染有关的内毒素休克、关节炎、类风湿关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔炎、阿尔茨海默病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、佩罗尼病、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、中风、I型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜炎、葡萄膜炎、自身免疫性眼色素层炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎性疾病(如多发性硬化症、狼疮(如系统性红斑性狼疮))以及格-巴综合征、皮炎、特异性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、格雷夫斯氏病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、美尼尔氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬变、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿病、胰炎、创伤(手术)、移植抗宿主疾病、移植排斥、心脏病(即心血管疾病)(包括缺血性疾病(如心肌梗塞连同动脉硬化))、血管内血凝固、骨吸收、骨质疏松症、骨关节炎、齿根骨膜炎、胃酸过少(hypochlorhydria)、视神经脊髓炎、乳糜泻、结缔组织病(例如,狼疮)、感染后炎性疾病(例如,格林-巴利综合征)、以及副肿瘤综合征。

[0437] 这些用于体内给药的组合物可以是无菌的。这可以通过经由例如无菌过滤膜进行过滤容易地实现。

[0438] 5.5 用途及方法

[0439] 5.5.1 治疗性用途及方法

[0440] 在一个方面,在此呈现了用于调节受试者的一种或多种免疫功能或应答的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予在此描述的抗OX40抗体或其组合物。在一个具体方

面,在此呈现了用于激活、增强或诱导受试者的一种或多种免疫功能或应答的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在一个具体实施例中,在此呈现了用于预防和/或治疗其中期望激活或增强一种或多种免疫功能或应答的疾病的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予在此描述的抗OX40抗体或其组合物。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗传染性疾病的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗癌症的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。癌症可以选自下组,该组由以下各项组成:黑色素瘤、肾癌、以及前列腺癌。癌症可以选自下组,该组由以下各项组成:黑色素瘤、肾癌、前列腺癌、结肠癌、以及肺癌。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗黑色素瘤的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗肾癌的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗前列腺癌的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某些实施例中,在此呈现了用于治疗结肠癌的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某些实施例中,在此呈现了用于治疗肺癌的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在某些实施例中,在此呈现了用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40抗体或其组合物。在一个实例中,该方法进一步包括向受试者给予检查点靶向剂。在一个实例中,检查点靶向剂选自下组,该组由以下各项组成:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗CD137抗体、以及激动剂抗OX40抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是拮抗剂抗PD-1抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是拮抗剂抗PD-L1抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是激动剂抗GITR抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是激动剂抗CD137抗体。

[0441] 在某些实施例中,将抗PD-1抗体用于此处所披露的方法中。在某些实施例中,抗PD-1抗体是尼沃鲁单抗(Nivolumab),又称为BMS-936558或MDX1106,由Bristol-Myers Squibb所开发。在某些实施例中,抗PD-1抗体是潘布罗利珠单抗(Pembrolizumab),又称为拉立珠单抗(Lambrolizumab)或MK-3475,由默克公司(Merck&Co)所开发。在某些实施例中,抗PD-1抗体是皮立珠单抗(Pidilizumab),又称为CT-011,由CureTech所开发。在某些实施例中,抗PD-1抗体是MEDI0680,又称为AMP-514,由医学免疫公司(Medimmune)所开发。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由诺华制药公司(Novartis Pharmaceuticals)所开发的PDR001。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由再生元制药(Regeneron Pharmaceuticals)所开发的REGN2810。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由辉瑞公司(Pfizer)所开发的PF-06801591。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由贝基公司(BeiGene)所开发的BGB-A317。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由安阿泰生物公司(AnaptysBio)和特瑟若公司(Tesaro)所开发的TSR-042。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由恒瑞公司(Hengrui)所开发的SHR-1210。

[0442] 可用于此处所披露的治疗方法的抗PD-1抗体的其他非限制性实例披露于以下专利和专利申请,出于所有的目的将通过引用将它们这些文件通过引用以全文结合在此:美国专利号6,808,710;美国专利号7,332,582;美国专利号7,488,802;美国专利号8,008,449;美国专利号8,114,845;美国专利号8,168,757;美国专利号8,354,509;美国专利号8,

686,119;美国专利号8,735,553;美国专利号8,747,847;美国专利号8,779,105;美国专利号8,927,697;美国专利号8,993,731;美国专利号9,102,727;美国专利号9,205,148;美国公开号US 2013/0202623 A1;美国公开号US 2013/0291136 A1;美国公开号US 2014/0044738 A1;美国公开号US 2014/0356363 A1;美国公开号US 2016/0075783 A1;以及PCT公开号WO 2013/033091 A1;PCT公开号WO 2015/036394 A1;PCT公开号WO 2014/179664 A2;PCT公开号WO 2014/209804 A1;PCT公开号WO 2014/206107 A1;PCT公开号WO 2015/058573 A1;PCT公开号WO 2015/085847 A1;PCT公开号WO 2015/200119 A1;PCT公开号WO 2016/015685 A1;以及PCT公开号WO 2016/020856 A1。

[0443] 在某些实施例中,将抗PD-L1抗体用于此处所披露的方法中。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由遗传技术公司 (Genentech) 所开发的atezolizumab。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由阿斯利康制药有限公司 (AstraZeneca)、塞尔基因公司 (Celgene) 以及医学免疫公司所开发的durvalumab。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是avelumab,又称为MSB0010718C,由默克雪兰诺公司 (Merck Serono) 以及辉瑞公司所开发。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由百时美施贵宝 (Bristol-Myers Squibb) 公司所开发的MDX-1105。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由阿帕里免疫公司 (Amplimmune) 和GSK公司所开发的AMP-224。

[0444] 可用于此处所披露的治疗方法的抗PD-L1抗体的非限制性实例披露于以下专利和专利申请,出于所有的目的通过引用将它们这些文件通过引用以全文结合在此:美国专利号7,943,743;美国专利号8,168,179;美国专利号8,217,149;美国专利号8,552,154;美国专利号8,779,108;美国专利号8,981,063;美国专利号9,175,082;美国公开号US 2010/0203056 A1;美国公开号US 2003/0232323 A1;美国公开号US 2013/0323249 A1;美国公开号US 2014/0341917 A1;美国公开号US 2014/0044738 A1;美国公开号US 2015/0203580 A1;美国公开号US 2015/0225483 A1;美国公开号US 2015/0346208 A1;美国公开号US 2015/0355184 A1;以及PCT公开号WO 2014/100079 A1;PCT公开号WO 2014/022758 A1;PCT公开号WO 2014/055897 A2;PCT公开号WO 2015/061668 A1;PCT公开号WO 2015/109124 A1;PCT公开号WO 2015/195163 A1;PCT公开号WO 2016/000619 A1;以及PCT公开号WO 2016/030350 A1。

[0445] 在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗选自下组的癌症的方法,该组由以下各项组成:B细胞淋巴瘤(例如,B细胞慢性淋巴细胞白血病、B细胞非霍奇金淋巴瘤、皮肤B细胞淋巴瘤、弥漫性大型B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、胚细胞瘤、脑转移瘤、乳癌、伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)、癌(例如,腺癌(例如,胃与食管交界处的腺癌))、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃与食管交界处的癌、胃肠道癌、成胶质细胞瘤(例如,多形性成胶质细胞瘤(例如,新诊断出的或复发的))、神经胶质瘤、头颈癌(例如,头颈部鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤、肾脏癌(例如,肾细胞癌及维耳姆斯氏瘤 (Wilms' tumor))、喉癌、白血病(例如,慢性髓细胞性白血病、多毛细胞白血病)、肝癌 (liver cancer) (例如,肝癌 (hepatic carcinoma) 及肝肿瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌及小细胞肺癌)、淋巴母细胞淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、转移性脑肿瘤、转移性癌症、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、成神经细胞瘤、眼黑色素瘤、口咽癌症、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌(例如,胰管腺癌)、前列腺癌(例如,激素抵抗性(例如,去势难治性)、转移性、转移性激素难治性(例如,去势难治性、非雄激素依赖

性))、肾细胞癌(例如,转移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如,横纹肌肉瘤)、皮肤癌(例如,黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤))、软组织肉瘤、实体瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、移行性细胞癌(尿路上皮细胞癌)、葡萄膜黑色素瘤(例如,转移性)、疣状癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗选自下组的癌症的方法,该组由以下各项组成:晚期、复发性、或转移性实体瘤、淋巴瘤(例如,弥散性大B细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤)、乳癌、前列腺癌、头颈癌、结肠直肠癌、结肠癌、黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤)、子宫内膜癌、肾细胞癌、肾透明细胞癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌或肺腺癌)、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、胃癌、子宫癌、嗜铬细胞瘤、转移性皮肤鳞状细胞癌(例如,在移植患者中)、梅克尔细胞癌、皮肤T淋巴瘤、神经内分泌肿瘤、骨源肿瘤(例如,骨肉瘤)、血管外皮细胞瘤、与遗传综合征有关的肿瘤(NF1或VHL)、脊索瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、生殖细胞瘤、小肠肿瘤、阑尾癌、以及病毒相关的肿瘤(例如,卡波西氏肉瘤)。

[0446] 在另一个实施例中,将抗OX40抗体给予诊断为患有癌症的患者,以增加患者的一种或多种免疫细胞群体(例如,T细胞效应细胞(如 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T细胞)的增殖和/或效应子功能。

[0447] 在一个具体实施例中,相对于未给予在此描述的抗OX40抗体的受试者的免疫功能,在此描述的抗OX40抗体将受试者的一种或多种免疫功能或应答激活或增强或诱导了至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%或至少10%或在10%至25%、25%至50%、50%至75%、或75%至95%之间的范围内,使用本领域中熟知的测定(例如,ELISPOT、ELISA)和细胞增殖测定。在一个具体实施例中,免疫功能是细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13产生)。在另一个实施例中,免疫功能是T细胞增殖/扩增,可以通过例如流式细胞术进行测定,以检测表达T细胞标记(例如,CD3、CD4或CD8)的细胞数量。在另一个实施例中,免疫功能是抗体生成,可以通过例如ELISA进行测定。在一些实施例中,免疫功能是效应子功能,可以通过例如细胞毒性分析或其他本领域中熟知的分析进行测定。在另一个实施例中,免疫功能是Th1应答。在另一个实施例中,免疫功能是Th2应答。在另一个实施例中,免疫功能是记忆应答。

[0448] 在具体实施例中,可以通过抗OX40抗体增强或诱导的免疫功能的非限制性实例是:效应淋巴细胞的增殖/扩增(例如,效应T淋巴细胞数量的增加)、以及抑制效应淋巴细胞(例如,效应T淋巴细胞)的细胞凋亡。在具体实施例中,通过在此描述的抗OX40抗体增强或诱导的免疫功能是: $CD4^+$ T细胞(例如,Th1及Th2辅助T细胞)、 $CD8^+$ T细胞(例如,细胞毒T淋巴细胞、 α/β T细胞、以及 γ/δ T细胞)、B细胞(例如,浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤-驻留T细胞、 $CD122^+$ T细胞、自然杀伤(NK)细胞)、巨噬细胞、单核细胞、树状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或多形核化的白细胞的增殖/数目的扩增或活化。在一个实施例中,在此描述的抗OX40抗体激活或增强淋巴细胞前体的增殖/扩增或数量。在一些实施例中,相对于阴性对照(例如,未用在此描述的抗OX40抗体处理、培养或接触的对应细胞的数量),在此描述的抗OX40抗体将 $CD4^+$ T细胞(例如,Th1及Th2辅助T细胞)、 $CD8^+$ T细胞(例如,细胞毒T淋巴细胞、 α/β T细胞、以及 γ/δ T细胞)、B细胞(例如,浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤-驻留T细胞(tumor-resident T cell)、 $CD122^+$ T细胞、自然杀伤(NK)细胞)、巨噬细

胞、单核细胞、树状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或多形核化的白细胞的数量增加大约至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或在10%至25%、25%至50%、50%至75%、或75%至95%之间的范围内。

[0449] 在一些实施例中,将在此描述的抗OX40抗体与靶向一种或多种免疫调节酶(如IDO(吡啶胺-2,3-双加氧酶)以及TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)的化合物组合向受试者给予。在具体实施例中,此类化合物选自下组,该组由以下各项组成:依帕卡朵丝坦(epacadostat)(因塞特公司(Incyte Corp))、F001287(福克斯生物科学公司(Flexus Biosciences))、印朵目德(indoximod)(纽琳基因公司(NewLink Genetics))、以及NLG919(纽琳基因公司)。在一个实施例中,化合物是依帕卡朵丝坦(epacadostat)。在另一个实施例中,化合物是F001287。在另一个实施例中,化合物是印朵目德(indoximod)。在另一个实施例中,化合物是NLG919。

[0450] 在一些实施例中,将在此描述的抗OX40抗体与疫苗组合向受试者给予。

[0451] 在一些实施例中,将在此描述的抗OX40抗体与抗CD137抗体、利妥昔单抗、环磷酰胺、化疗或放射治疗组合向受试者给予。

[0452] 在一些实施例中,将在此描述的抗OX40抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗组合向受试者给予。在一个具体实施例中,将抗OX40抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗组合向受试者给予。热休克蛋白(HSP)是普遍存在于所有物种中的高度保守蛋白质家族。作为热休克或其他形式应激(包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖剥夺)的结果,它们的表达可经有力地诱导成更高水平。根据分子量分类为五个家族:HSP-110、-90、-70、-60和-28。HSP经由抗原递呈细胞(APC)(如巨噬细胞和树突细胞(DC))的交叉呈递途径递送免疫原性肽,从而导致T细胞活化。HSP起到形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合物的肿瘤相关抗原肽的蛋白伴侣载体的作用。一旦从死肿瘤细胞中释放,HSP-抗原复合物被抗原呈递细胞(APC)吸收,其中抗原被加工成结合MHC类别I和类别II分子的肽,从而导致抗肿瘤CD8⁺及CD4⁺T细胞的活化。由衍生自肿瘤制剂的HSP复合物引发的免疫性特异性针对由每个受试者癌症表达的独特抗原肽抗体库。

[0453] 热休克蛋白肽复合物(HSPPC)是蛋白肽复合物,其由与抗原肽非共价复合的热休克蛋白组成。HSPPC引发先天性和获得性免疫应答两者。在一个具体实施例中,一种或多种抗原肽显示出针对正在治疗的癌症的抗原性。经由膜受体(主要是CD91)或通过结合Toll样受体,HSPPC可有效地被APC抓住。HSPPC内化导致具有趋化因子和细胞因子产生的APC的功能成熟,从而引起自然杀伤细胞(NK)、单核细胞和Th1及Th-2介导的免疫应答的活化。在一些实施例中,用于此处所披露的方法中的HSPPC包括一种或多种热休克蛋白,其来自与抗原肽复合的应激蛋白的hsp60、hsp70或hsp90家族。在一些实施例中,HSPPC包括hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白或其两种或更多种的组合。

[0454] 在一个具体实施例中,将抗OX40抗体与热休克蛋白肽复合物(HSPPC)(例如,热休克蛋白肽复合物-96(HSPPC-96))组合向受试者给予以治疗癌症。HSPPC-96包括与抗原肽复合的96kDa热休克蛋白(Hsp),gp96。HSPPC-96从受试者的肿瘤中制造的癌症免疫疗法并且包含癌症的抗原“指纹”。在一些实施例中,该指纹包含仅存在于特定受试者的特异性癌症细胞中的独特抗原,并且注射疫苗旨在刺激受试者的免疫系统,以识别并且攻击任何具有

特异性癌症指纹的细胞。

[0455] 在一些实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)从受试者的肿瘤组织中产生。在一个具体实施例中,从正在治疗的癌症类型的肿瘤或其转移中产生HSPPC(例如,HSPPC-96)。在另一个具体实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)对于正在治疗的受试者是自体的。在一些实施例中,肿瘤组织是非坏死肿瘤组织。在一些实施例中,使用至少1克(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、或至少10克)的非坏死肿瘤组织以产生疫苗方案。在一些实施例中,在手术切除后,在用于疫苗制备之前将非坏死肿瘤组织冷冻。在一些实施例中,通过纯化技术将HSPPC(例如,HSPPC-96)从肿瘤组织中分离、过滤并制备成可注射疫苗。在一些实施例中,给予受试者6-12个剂量的HSPPC(例如,HSPPC-96)。在此类实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)剂量可以按最初每周4个剂量,然后双周2-8个另外的剂量给予。

[0456] 可根据在此描述的方法使用的HSPPC的其他实例披露于以下专利和专利申请,出于所有的目的通过引用将它们这些文件通过引用以全文结合在此:美国专利号6,391,306、6,383,492、6,403,095、6,410,026、6,436,404、6,447,780、6,447,781以及6,610,659。

[0457] 在一些实施例中,本发明涉及本发明的抗体或药物组合物用作药物。在一些方面,本发明涉及本发明的抗体或药物组合物用于在治疗癌症的方法中使用。在一些方面,本发明涉及本发明的抗体或药物组合物用于在治疗受试者癌症的方法中使用,该方法包括向该受试者给予有效量的本发明的抗体或药物组合物。在一些方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)检查点靶向剂,用作药物。在一些方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)检查点靶向剂,用于在用于治疗癌症的方法中使用。在一些方面,本发明涉及组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)检查点靶向剂。在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)IDO抑制剂,用作药物。在一些方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)IDO抑制剂,用于在治疗癌症的方法中使用。在一些方面,本发明涉及组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)IDO抑制剂。在一些方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)疫苗,用作药物。在一些方面,本发明涉及(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)疫苗,用于在治疗癌症的方法中使用。在一些方面,本发明涉及组合物、试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)疫苗。在抗体或药物组合物用于在治疗癌症的方法中使用的一个优选实施例中,抗体是激动性的。

[0458] 在一个方面,如在此呈现的用于调节受试者的一种或多种免疫功能或应答的方法是用于灭活、减少或抑制受试者的一种或多种免疫功能或应答的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予抗OX40拮抗性抗体或其组合物。在一个具体实施例中,在此呈现了用于预防和/或治疗其中期望灭活、降低或抑制一种或多种免疫功能或应答的疾病的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予在此描述的抗OX40拮抗性抗体或其组合物。在某一个实施例中,在此呈现了用于治疗自身免疫或炎性疾病或障碍的方法,该方法包括向对其有需要的受试者给予有效量的抗OX40拮抗性抗体或其组合物。在某些实施例中,受试者是人。在某些实施例中,疾病或障碍选自下组,该组由以下各项组成:感染(病毒性、细菌性、真菌性以及寄生虫)、与感染有关的内毒素休克、关节炎、类风湿关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔炎、阿尔茨海默病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、佩罗尼病、乳糜泻、胆

囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、中风、I型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜炎、葡萄膜炎、自身免疫性眼色素层炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎症性疾病(如多发性硬化症、狼疮(如系统性红斑性狼疮))以及格-巴综合征、皮炎、特异性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、格雷夫斯氏病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、美尼尔氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬变、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿病、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主疾病、移植排斥、心脏病(即心血管疾病)(包括缺血性疾病(如心肌梗塞连同动脉硬化))、血管内血凝固、骨吸收、骨质疏松症、骨关节炎、齿根骨膜炎、胃酸过少(hypochlorhydria)、视神经脊髓炎、乳糜泻、结缔组织病(例如,狼疮)、感染后炎症性疾病(例如,格林-巴利综合征)、以及副肿瘤综合征。在某些实施例中,该疾病或障碍选自下组,该组由以下各项组成:移植排斥、血管炎、哮喘、类风湿关节炎、皮炎、炎症肠病、葡萄膜炎、以及狼疮。在某些实施例中,此处的方法中的任一项(例如,用于治疗传染性疾病的方法、或用于治疗自身免疫或炎症性疾病或障碍的方法)包括向受试者给予如在此描述的抗体以及检查点靶向剂。在某些实施例中,检查点靶向剂是抗体(例如,抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CEACAM1抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、或抗OX40抗体)。在某些实施例中,检查点靶向剂是拮抗剂或激动剂抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是抗PD-1抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是抗GITR抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂是抗CD137抗体。

[0459] 在另一个实施例中,将抗OX40拮抗性抗体给予诊断为患有自身免疫或炎症性疾病或障碍的患者,以降低患者的一种或多种免疫细胞群体(例如,T细胞效应细胞(如CD4⁺及CD8⁺T细胞)的增殖和/或效应子功能。

[0460] 在一个具体实施例中,相对于未给予在此描述的抗OX40拮抗性抗体的受试者的免疫功能,在此描述的抗OX40拮抗性抗体将受试者的一种或多种免疫功能或应答灭活或降低或抑制至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%或至少10%或在10%至25%、25%至50%、50%至75%、或75%至95%之间的范围内,使用本领域中熟知的测定(例如,ELISPOT、ELISA)和细胞增殖测定。在一个具体实施例中,免疫功能是细胞因子产生(例如,IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、和/或IL-13产生)。在另一个实施例中,免疫功能是T细胞增殖/扩增,可以通过例如流式细胞术进行测定,以检测表达T细胞标记(例如,CD3、CD4或CD8)的细胞数量。在另一个实施例中,免疫功能是抗体生成,可以通过例如ELISA进行测定。在一些实施例中,免疫功能是效应子功能,可以通过例如细胞毒性分析或其他本领域中熟知的分析进行测定。在另一个实施例中,免疫功能是Th1应答。在另一个实施例中,免疫功能是Th2应答。在另一个实施例中,免疫功能是记忆应答。

[0461] 在具体实施例中,可以通过抗OX40拮抗性抗体降低或抑制的免疫功能的非限制性实例是:效应淋巴细胞的增殖/扩增(例如,效应T淋巴细胞数量的减少)、以及刺激效应淋巴细胞(例如,效应T淋巴细胞)的细胞凋亡。在具体实施例中,通过在此描述的抗OX40拮抗性抗体降低或抑制的免疫功能是:CD4⁺T细胞(例如,Th1及Th2辅助T细胞)、CD8⁺T细胞(例如,细胞毒T淋巴细胞、 α/β T细胞、以及 γ/δ T细胞)、B细胞(例如,浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤-驻留T细胞(tumor-resident T cell)、CD122⁺T细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、树状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或多形核化

(polymorphonucleated) 的白细胞的增殖/数目的扩增或活化。在一个实施例中,在此描述的抗OX40拮抗性抗体灭活或降低或抑制淋巴细胞前体的增殖/扩增或数量。在一些实施例中,相对于阴性对照(例如,未用在此描述的抗OX40拮抗性抗体处理、培养或接触的对应细胞的数量),在此描述的抗OX40拮抗性抗体将CD4⁺T细胞(例如,Th1及Th2辅助T细胞)、CD8⁺T细胞(例如,细胞毒T淋巴细胞、 α/β T细胞、以及 γ/δ T细胞)、B细胞(例如,浆细胞)、记忆T细胞、记忆B细胞、肿瘤-驻留T细胞、CD122⁺T细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、树状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或多形核化的白细胞的数量减少大约至少99%、至少98%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%、或在10%至25%、25%至50%、50%至75%、或75%至95%之间的范围内。

[0462] 在一些方面,本发明涉及本发明的抗体或药物组合物用于在治疗自身免疫或炎性疾病或障碍的方法中使用。在一个方面,本发明涉及本发明的抗体或药物组合物用于在治疗传染性疾病的方法中使用。在抗体或药物组合物用于在治疗自身免疫或炎性疾病或障碍、或传染性疾病的方法中使用的一个优选实施例中,抗体是拮抗性的。

[0463] 5.5.1.1 给药途径及剂量

[0464] 在此描述的抗体或组合物可以通过多种途径递送至受试者,如胃肠外、皮下、静脉内、皮内、经皮、鼻内、瘤内、以及给药至肿瘤引流淋巴结。在一个实施例中,抗体或组合物通过静脉内或瘤内途径进行给药。

[0465] 将有效治疗和/或预防病症的抗体或组合物的量将取决于疾病的性质并且可以通过标准临床技术确定。

[0466] 组合物中所采用的精确剂量也将取决于给药途径、以及疾病的严重程度,并且应根据从业者的判断及各个受试者的情况而决定。例如,有效剂量还可以依给药方式、目标部位、患者的生理状态(包括年龄、体重及健康)、患者是否为人类或动物、给予的其他药物或治疗是否为预防性或治疗性的而异。通常,患者是人类,但也可治疗包括转基因哺乳动物的非人哺乳动物。可以将治疗剂量优化滴定以优化安全性及疗效。

[0467] 在某些实施例中,采用体外测定以帮助鉴别最佳剂量范围。可以从衍生自体外或动物模型测试系统的剂量响应曲线外推有效剂量。

[0468] 通常,由于对外来多肽的免疫应答,人抗体比来自其他物种的抗体在人体内具有更长的半衰期。因此,通常可能的是较低剂量的人抗体及较低频率的给药。

[0469] 5.5.2 检测及诊断用途

[0470] 在此描述的抗OX40抗体(参见例如章节5.2)可用于分析生物试样中的OX40蛋白水平,使用本领域的技术人员已知的典型免疫组织学方法,包括免疫测定,如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀反应或蛋白质印迹法。合适的抗体测定标签是本领域中已知的并且包括酶标签(如,葡萄糖氧化酶);放射性同位素(如碘(¹²⁵I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹²¹In)及钨(⁹⁹Tc));发光标签(如鲁米诺);以及荧光标签(如荧光素及罗丹明及生物素)。此类标签可用于标记在此描述的抗体。可替代地,可以对识别在此描述的抗OX40抗体的第二抗体进行标记并且与抗OX40抗体组合使用以检测OX40蛋白水平。

[0471] 测定OX40蛋白表达水平旨在包括在第一生物试样中直接(例如,通过确定或估计

绝对蛋白水平)或相对(例如,通过与第二生物试样中疾病相关的蛋白水平比较)定性或定量测量或估计OX40蛋白的水平。可测量或估计并且将第一生物试样中的OX40多肽表达水平与标准OX40蛋白水平进行比较,标准取自从不患有疾病的个体中获得的第二生物试样或由不患有疾病的个体的种群的平均水平确定。正如本领域将理解的,一旦已知“标准”OX40多肽水平,其可重复用作为比较的标准品。

[0472] 如在此所使用的,术语“生物试样”是指获得自受试者、细胞系、组织或其他可能表达OX40的细胞来源的任何生物试样。用于从动物(例如,人类)中获得活体组织切片及体液的方法是本领域中所熟知的。生物试样包括外周血单核细胞。

[0473] 在此描述的抗OX40抗体可用于预后、诊断、监测及筛查应用,包括熟练技术人员所熟知并且标准并且基于本说明书的体外和体内应用。用于体外评估和评价免疫系统状态和/或免疫应答的预后、诊断、监测及筛查测定和试剂盒可用于预测、诊断及监测来评估患者样品,包括已知患有或怀疑患有免疫系统-功能异常或关于预期或所希望的免疫系统应答、抗原应答或疫苗应答者的那些样品。免疫系统状态和/或免疫应答的评估和评价还可用于测定患者对于药物临床试验或对于给予特定化学治疗剂或抗体(包括其组合)相对于不同药剂或抗体的适合性。此种类型的预后及诊断及监测评估已处于实践中,利用对抗乳癌中HER2蛋白的抗体(HerceptTest™,达科公司(Dako)),其中该测定使用Herceptin®也用于评价抗体疗法的患者。体内应用包括定向细胞治疗以及免疫系统调节及免疫应答放射性成像。

[0474] 在一个实施例中,抗OX40抗体可用于活检样品的免疫组织化学中。

[0475] 在另一个实施例中,抗OX40抗体可用于检测OX40的水平或在其膜表面上包含OX40的细胞水平,然后将这些水平与某些疾病症状相关联。在此描述的抗OX40抗体可以携带可检测或功能性标签。当使用荧光标签时,本领域中已知目前可获得的显微镜检查法和荧光激活细胞分选器分析(FACS)或两种方法程序的组合可用于鉴别以及量化特异性结合成员。在此描述的抗OX40抗体可以携带荧光标签。示例性的荧光标签包括,例如,反应性及偶联探针(例如,氨基香豆素(Aminocoumarin)、荧光素(Fluorescein)及德克萨斯红(Texas red)、亚历克萨荧光染料(Alexa Fluor dye)、Cy染料及DyLight染料)。抗OX40抗体可以携带放射性标记物,如同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac以及¹⁸⁶Re。当使用放射性标记物时,本领域中已知目前可获得的计数程序可用于鉴别以及量化抗OX40抗体特异性结合OX40(例如,人类OX40)。在标签是酶的情况下,检测可以通过本领域中已知目前所采用的比色、分光亮度、荧光分光亮度、电流滴定或气体定量技术中的任一种来完成。这可以通过将样品或对照样品与抗OX40抗体在考虑到抗体与OX40之间的复合物的形成的条件下进行接触来实现。对该抗体和OX40之间形成的任何复合物进行检测并在该样品和该对照中进行比较。鉴于在此描述的抗体针对OX40的特异性结合,其抗体可用于特异性检测细胞表面的OX40表达。在此描述的抗体还可以经由免疫亲和纯化用于纯化OX40。

[0476] 此处还包括了测定系统,其可以测试试剂盒的形式进行制备,用于定量分析例如OX40或OX40/OX40L复合物的存在程度。系统或测试试剂盒可包括标记组分(例如,标记抗体)以及一种或多种另外的免疫化学试剂。参见例如以下章节5.6对试剂盒的详细描述。

[0477] 在一些方面,在此提供了用于体外检测样品中的OX40的方法,该方法包括将所述

样品与抗体接触。在一些方面,在此提供了在此提供的抗体用于体外检测样品中的OX40的用途。在一个方面,在此提供了在此提供的抗体或药物组合物用于在检测受试者中的OX40中使用。在一个方面,在此提供了在此提供的抗体或药物组合物用作诊断剂。在一个优选实施例中,抗体包括可检测标签。在一个优选实施例中,OX40是人类OX40。在一个优选实施例中,受试者是人。

[0478] 5.6 试剂盒

[0479] 在此提供了试剂盒,其包括一种或多种在此描述的抗体或其缀合物。在一个具体实施例中,在此提供了药物包或试剂盒,其包括填充有在此描述的药物组合物的一种或多种成分(如在此提供的一种或多种抗体)的一个或多个容器。在一些实施例中,试剂盒包含在此描述的药物组合物以及任何预防剂或治疗剂(如在此描述的那些)。在某些实施例中,试剂盒可包含促T细胞分裂原(例如植物凝集素(PHA)和/或佛波醇乙酯(PMA))、或TCR复合物刺激抗体(如抗CD3抗体以及抗CD28抗体)。任选地与此类容器相关联的可以是处于管理药物或生物制品生产、使用或销售的政府机构所规定的形式的标识,该标识反映生产、使用或销售机构批准用于人施用。

[0480] 在此还提供了可用于上述方法中的试剂盒。在一个实施例中,试剂盒在一个或多个容器中包括在此描述的抗体,优选纯化抗体。在一个具体实施例中,在此描述的试剂盒包含基本上分离的OX40抗原(例如,人类OX40),该抗原可以用作对照物。在另一个具体实施例中,在此描述的试剂盒进一步包括不与OX40抗原反应的对照抗体。在另一个具体实施例中,在此描述的试剂盒包含一个或多个用于检测抗体与OX40抗原结合的组件(例如,抗体可缀合至可检测底物(如荧光化合物、酶底物、放射性化合物或发光化合物),或识别第一抗体的第二抗体可缀合至可检测底物)。在具体实施例中,在此提供的试剂盒可包括重组产生或化学合成的OX40抗原。试剂盒中所提供的OX40抗原还可以附接到固体支持体上。在一个更具体的实施例中,上述试剂盒的检测装置包括OX40抗原所附接的固体支持体。此种试剂盒还可包括未附接的、报告子标记的抗人类抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在该实施例中,可以通过所述报告子标记的抗体的结合来检测抗体与OX40抗原的结合。另外,提供了试剂盒或多部分试剂盒,其包括(a)本发明的抗体或药物组合物以及(b)检查点靶向剂、IDO抑制剂和/或疫苗。

[0481] 以说明的方式而不是以限制的方式提供以下实例。

[0482] 6. 实例

[0483] 以说明的方式而不是以限制的方式提供此章节(即章节6)中的实例。

[0484] 6.1 实例1:产生对抗人类OX40的新颖抗体

[0485] 此实例描述了结合人类OX40的抗体的产生及表征。具体地说,此实例描述了特异性结合人类OX40以及对T细胞呈现共刺激性影响的人类抗体的产生。

[0486] 6.1.1 文库产生

[0487] 在此描述了Retrocyte DisplayTM文库的产生。对于文库插入片段的产生,通过苯酚/氯仿从源自于两个脐带血样的FACS分选的CD19阳性人类B淋巴细胞中萃取总RNA。使用来自富酶泰斯公司(Fermentas)(目录号K1621和K1622)的RevertAid第一链cDNA合成试剂盒,将每个脐带血样(1μg)的总RNA用于第一链cDNA合成。通过PCR从cDNA中扩增抗体可变区,并克隆进逆转录病毒表达载体(pCMA)中。随后将这些构建体用于转导前B细胞,以使用

Retrocyte DisplayTM技术在表面上表达抗体。逆转录病毒表达载体包含5' 和3' LTR、包括膜锚着点部分 (IGHG1) 的免疫球蛋白恒定区 (IGHG1或IGKC) 以及CD4表面标志基因。

[0488] 使用V_κ家族特异性正向引物和反向引物的混合物,通过半巢式PCR扩增轻链可变区 (VL)。正向引物引入HindIII克隆位点,并且反向引物引入Eco47III克隆位点。

[0489] 使用VH家族特异性正向引物和反向引物的混合物,通过PCR扩增重链可变区 (VH)。正向引物引入HindIII克隆位点,并且反向引物引入Eco47III克隆位点。

[0490] 将扩增的VH和V_κ区域在37℃下消化过夜。消化之后,获得大小为400-450bp的条带并进行凝胶纯化(马歇雷-纳高公司 (Macherey&Nagel), NucleoSpin凝胶和PCR净化 (Gel and PCR clean-up))。

[0491] 对于克隆重链可变区,将构建体3181 (pCMA-InsX Cg (iso3) loxP2-I-tr_huCD4-loxP) 用HindIII/Eco47III在37℃下消化持续4小时,并且将大小为8362bp的条带凝胶纯化。对于克隆κ轻链可变区,将构建体3204 (pCMA-InsX Ck-I-CD4) 用HindIII/Eco47III在37℃下消化持续4小时,并且将大小为7465bp的条带凝胶纯化。

[0492] 使用载体与插入片段1:3的比率,将消化并且纯化的抗体可变区在框内连接至合适的表达载体中。将每个VH和V_κ家族分别连接至逆转录病毒表达载体中并且通过沉淀将其浓缩10倍。还将沉淀的VH和V_κ连接反应分别转化至大肠杆菌DH10B细胞中用于文库产生。每个VH和V_κ家族的各自连接、沉淀和转化允许文库反映功能胚系基因的自然分布,由此确保相比于具有数目较少功能胚系基因的家族,具有大量功能胚系基因的VH或V_κ家族在最终文库中具有高度代表性。在转化之后,收获大肠杆菌细胞并且将其合并至最终文库中。通过诊断性限制酶切消化以及分析测序数据来控制每个文库的质量。从序列分析的数据中计算文库多样性。

[0493] 6.1.2 回收来自预选的前B细胞克隆的重链及轻链

[0494] 将如以上所描述产生的文库材料用于鉴别对OX40具有高结合亲和力的抗体。将B细胞克隆裂解,并且使用本领域标准的PCR方法,从稳定地整合到基因组DNA中的插入的逆转录病毒载体中扩增重链及轻链可变区。随后将扩增的重链及轻链可变区克隆进包含人类重链及轻链恒定区的哺乳动物表达载体中。随后将DNA质粒制剂用于转染CHO细胞,并且使用悬浮阵列技术测试所表达的抗体。在Microsynth (巴尔加赫 (Balgach), 瑞士) 上对抗体重链及轻链进行测序。

[0495] 6.1.3 抗OX40抗体的生物物理表征

[0496] 选择指定为pab1949的抗体,并且在如下所述的多个测定中对其进行表征。抗OX40抗体pab1949包括重链和轻链,该重链包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列并且该轻链包括SEQ ID NO:50的氨基酸序列的。抗体pab1949是在轻链恒定域中包含T109S取代(即,相对于野生型轻链恒定域,在位置109处苏氨酸取代为丝氨酸)的人类IgG₁抗体(根据卡巴特 (Kabat) 进行编号),这有助于将框内可变区克隆进恒定区中。该突变是不影响抗体结合或功能的保守修饰。还产生了在位置109处包含苏氨酸的野生型对应物(命名为pab1949-1) (根据卡巴特 (Kabat) 进行编号)。抗体pab1949-1是包括SEQ ID NO:60的重链和SEQ ID NO:20的轻链的人类IgG₁抗体。

[0497] 6.1.3.1 通过生物膜层干涉法的亲和性测定

[0498] 通过生物膜层干涉法 (BLI) 确定pab1949-1的亲和性。简言之,使用1xPBS稀释重组

体人类OX40抗原 (OX40-Fc, R&D) 以获得1,000 μ l的0.2 μ M并且将其添加至96孔板。将pab1949-1在1xPBS中稀释至浓度50nM。使用1xPBS从50nM溶液中制备pab1949-1的六点连续稀释物,以获得在50nM至0.78nM范围内的抗体稀释物,并且将对应抗体连续稀释物添加至96孔板的每个孔。根据制造商的说明,使用Octet®的16信道模式,在25℃下将传感物用人类OX40抗原涂覆持续5min,阈值为1.0nm。对于阻断,将0.5mg/ml的非特异性IgG₁抗体孵育10分钟。将包含pab1949-1的连续抗体稀释物的板置于Octet®仪器上。根据制造商的说明进行测定。分别记录pab1949-1与OX40抗原的结合和解离3分钟和10分钟。使用Octet®数据分析软件对数据进行分析,并且结果示于表5中。

[0499] 表5.pab1949-1的亲合性测定

[0500]	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (nM)
	1.09×10^6	1.26×10^{-4}	0.11

[0501] 6.1.3.2 结合至活化的人类或食蟹猴T细胞的抗体

[0502] 通过流式细胞术针对抗OX40抗体pab1949和pab1949-1与人类或食蟹猴OX40的结合特性进行分析。

[0503] 使用基于磁性的分离 (Miltenyi Biotec),将经由菲柯尔 (ficoll) 梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门 (Research Blood Components), LLC) 中分离的人类PBMC富集用于未改变的CD4⁺和CD8⁺T细胞。然后,在推荐的培养条件下,将T淋巴细胞的富集群体用具有500 U rIL-2 (R&D系统公司)的CD3-CD28膨胀珠粒 (Miltenyi Biotec) 进行活化3天,并且之后为50 U rIL-2。所推荐的培养条件定义如下:在37℃和5%CO₂下,将细胞培养在RPMI-1640培养基中,补充有10%胎牛血清、10 mM HEPES以及1X Pen/Strep-谷氨酰胺。在活化之后,在4℃下,将细胞与包含CD3 (BV711, OKT3)、CD4 (BV605, OKT4)、CD8a (BV650, RPA-T8) 的缀合抗体以及在FACS缓冲剂(具有2%FBS的PBS)中稀释的预先缀合的抗OX40抗体或同种型对照(均为Afluor488, 10 μ g/ml)的表面抗体混合物孵育持续30分钟。留出另外的样品用于单染补偿控制(CD45-BV650、CD45-Afluor488、CD45-BV605、以及CD45-BV711)。然后,将细胞用FACS缓冲剂洗涤两次并且使用LSRFortessa流式细胞仪 (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行分析。使用FACS DIVA与WEHI Weasel软件的组合分析流式细胞术图。抗OX40抗体pab1949结合至活化的人类CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞 (图1A)。

[0504] 针对结合活化的T细胞,对一系列浓度的pab1949-1进行测试,以表征剂量应答关系。简言之,将人类外周血单核细胞 (PBMC) 解冻并用PBS进行洗涤。用磁珠 (Miltenyi Biotec) 进行T细胞的阴性分离,并且将纯化的T细胞重悬于RPMI+10%FBS中并在37℃和5%CO₂下用抗-CD3/抗-CD28珠粒刺激持续72小时。将细胞洗涤并用Fc封闭液 (Trustain, 生物传奇公司 (Biolegend)) 在室温下封闭15分钟。将细胞再次洗涤,并在4℃下在黑暗中用pab1949-1的连续稀释 (10至0.00003 μ g/ml) 进行染色45分钟。将细胞洗涤,并且然后用包括抗CD3异硫氰酸荧光素 (FITC) (克隆SP34) 和抗CD4亮紫 (Brilliant Violet) (BV) 510 (克隆OKT4) 的谱系标志物抗体与第二抗体一起进行染色,以检测pab1949-1 (抗 κ IgG PE)。将细胞洗涤,用1.6%多聚甲醛进行固定,并且使用Becton Dickinson Fortessa流式细胞仪进行采集。pab1949-1限制仅结合至刺激的T细胞,而不结合未刺激的T细胞 (图1B)。pab1949-1与活化的人类CD4⁺T细胞的结合是剂量依赖性的 (图1C)。

[0505] 然后,针对pab1949-1的结合,对多个静止期免疫细胞亚型进行测试。将人类PBMC

解冻并用PBS进行洗涤。为了给死细胞染色,添加红外线(IR)生存染料(viability dye)并且在室温下避光孵育15分钟。将细胞洗涤,并且用胺染料红外线(生命技术公司(Life Technologies))在室温下染色15分钟。将细胞洗涤并在室温下进行Fc封闭(Trustain FcX, 生物传奇公司(Biolegend))10分钟。在洗涤之后,在4℃下,将细胞用1μg/ml的pab1949-1或IgG₁同种型对照避光孵育30分钟。将细胞洗涤,并且用二级试剂(抗-Fc F(ab')₂ PE, 杰克逊免疫研究实验室(Jackson Immune Research Laboratories))进行染色、随后进行谱系标志物抗体染色,该染色包括抗-CD3藻红蛋白菁7(PECy7, 克隆SP34.2)、抗-CD8BV510(克隆SK1)、抗-CD4多甲藻素-叶绿素-蛋白复合物(PerCP) Cy5(克隆Ly200)、以及抗-CD14FITC(克隆TUK4)。将细胞洗涤,用1.6%多聚甲醛进行固定,并且使用Becton Dickinson Fortessa流式细胞仪进行采集。如图1D所示,抗OX40抗体pab1949-1没有显示出与CD14⁺细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD20⁺B细胞、或CD3⁺-CD20⁺细胞可检出的结合。

[0506] 为了测试物种交叉反应性,使用活化的食蟹猴(*Macaca fascicularis*) PBMC进行细胞结合测定。简言之,在37℃下,在5% CO₂ 增湿的房室中,将能生存的食蟹猴PBMC (Worldwide Primates Inc.) 与刀豆凝集素-a(西格玛-奥德里奇(Sigma Aldrich), 5μg/ml) 和重组体IL-2 (Miltenyi, 20U/ml) 在补充有10%热灭活的FBS的RPMI培养基中进行活化持续3天。在活化之后,将细胞与人Fc受体阻断剂(生物传奇公司(Biolegend))在室温下孵育持续15分钟,以减少非特异性结合。将抗OX40抗体pab1949或人类IgG₁同种型对照(10μg/ml)添加至样品中并在4℃下孵育持续30分钟。在用FACS缓冲剂洗涤一次之后,将包含APC-缀合的抗-人类κ抗体连同特异性针对CD4 (BV605, OKT4) 和CD8a (PE, RPA-T8) 的抗体(均为2.5μg/ml)的抗体混合物稀释于FACS缓冲剂(PBS, 2mM EDTA, 0.5% BSA以及pH 7.2)中,将其添加至各个样品中并在4℃下孵育持续30分钟。在染色之前,留出另外的样品用于单染补偿控制(犬活性(cyno-reactive): CD4-BV605、CD4-PE、以及CD4-APC)。将样品在FACS缓冲剂中洗涤两次并且使用LSRFortessa流式细胞仪(BD生物科技公司(BD Biosciences))进行分析。如图1E所示, pab1949结合至活化的食蟹猴CD4⁺T细胞。

[0507] 6.1.3.3 OX40抗体选择性测定

[0508] 使用悬浮阵列技术作为多重测定,相对于TNFR超家族的其他成员来评价pab1949-1对于OX40的选择性。使用标准NHS-酯化学,将多个TNFR家族成员化学连接至Luminex[®]微球上。将pab1949-1的纯化材料在测定缓冲液(罗氏(Roche) 11112589001)中稀释至10ng/ml、100ng/ml以及1000ng/ml。简言之,将每份25μl的稀释物在黑暗中(20℃, 650rpm)与在5μl测定缓冲液中的1500Luminex[®]微球在96半孔滤板(密理博(Millipore), MABVN1250)中孵育1小时。将Luminex[®]微球(路明克斯公司(Luminex Corp), LC10001-01、LC10005-01、LC10010-01、LC10014-01、LC10015-01、LC10018-01、LC10022-01、LC10026-01、LC10052-01、LC10053-01以及LC10055-01)与重组体人类LTBR-Fc (Acros Biosystems, LTR-H5251)、抗-人类IgG (F(ab)₂-特异性, JIR, 105-006-097)、重组体人类OX40-Fc (R&D系统公司(R&D systems), 3388-OX)、重组体人类GITR-Fc (R&D, 689-GR)、重组体人类DR6-Fc (SinoBiological, 10175-H02H)、重组体人类DR3-Fc (R&D, 943-D3)、重组体人类GITR-His (SinoBiological, 13643-H08H)、重组体人类TWEAK R-Fc (SinoBiological, 10431-H01H)、重组体人类OX40-His (SinoBiological, 10481-H08H)、重组体人类4-1BB-His (SinoBiological, 10041-H08H)或重组体人类BAFFR-Fc (R&D, 1162-BR)经由与COOH珠粒表

面偶联的胺进行偶联。使用按1:3稀释系列(0.08-540ng/ml)的一式两份的25 μ l的人类IgG1标准品(西格玛公司(Sigma), I5154)来生成标准曲线。使用60 μ l标记有R-PE的山羊抗人类IgG F(ab)₂(2.5 μ g/ml; JIR 109-116-098, AbDSerotec Rapid RPE抗体缀合试剂盒, LNK022RPE)以及再一小时的孵育时间(20 $^{\circ}$ C, 650rpm)进行检测。使用Luminex[®]200系统(密理博(Millipore))对板进行分析。在48 μ l样本体积中,每孔计数总数为100个珠粒。将PE MFI值用于确定与上述重组蛋白的特异性或非特异性结合。

[0509] 抗体pab1949-1显示出与人类OX40的特异性结合,并且在检测浓度下没有观察到与其他TNFR家族成员的显著结合(数据未显示)。

[0510] 6.2 实例2:抗OX40抗体的菜单征

[0511] 此实例证明了,通过上述方法产生的抗OX40抗体pab1949和pab1949-1起到OX40的激动剂的作用的能力。对抗体pab1949和pab1949-1进行检测以确定它们共刺激初代人类CD4⁺或CD8⁺T细胞的能力。此外,将作为人类IgG₁抗体的pab1949和pab1949-1分别转化为人类IgG₄抗体pab2044和pab2044-1。抗体pab2044与pab1949具有相同的重链可变区和相同的轻链,但包括人类IgG₄恒定区。抗体pab2044包括SEQ ID NO:61的重链序列和SEQ ID NO:50的轻链序列。类似于pab1949, pab2044在轻链恒定区中包含T109S单个氨基酸取代、不影响抗体结合或功能的保守修饰,以促进克隆。野生型对应物, pab2044-1, 在位置109处包含苏氨酸(根据卡巴特(Kabat)进行编号), 并且包括SEQ ID NO:61的重链序列和SEQ ID NO:20的轻链序列。类似地, 同样将pab1949和pab1949-1分别转化为人类IgG₂抗体pab2193和pab2193-1。抗体pab2193包括SEQ ID NO:62的重链序列和SEQ ID NO:50的轻链序列。抗体pab2193-1包括SEQ ID NO:62的重链序列和SEQ ID NO:20的轻链序列。在一些测定中, 对pab1949、pab1949-1、pab2044、pab2044-1、pab2193、或pab2193-1的功能活性进行了检验。

[0512] 在一些测定中, 将本发明的抗OX40抗体的激动活性与参考抗体pab1784和pab2045的激动活性进行比较。抗体pab1784是基于美国专利号7,960,515(通过引用结合在此)中提供的抗体11D4的可变区而产生的。pab1784的重链包括11D4(SEQ ID NO:26)的重链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:65的人类IgG₁恒定区。pab1784的轻链包括11D4(SEQ ID NO:24)的轻链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:25的恒定区。

[0513] 抗体pab2045是基于国际公开号W0 13/038191(通过引用结合在此)中提供的抗体20E5的可变区而产生的。pab2045的重链包括20E5(SEQ ID NO:30)的重链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:65的人类IgG₁恒定区。pab2045的轻链包括20E5(SEQ ID NO:28)的轻链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:41的恒定区。

[0514] 6.2.1 抗OX40抗体对抗CD3刺激的CD4⁺T细胞增殖的作用

[0515] 为了检验pab1949对T细胞增殖的作用, 使用基于磁性的分离(Stemcell Technologies), 针对未改变的CD4⁺T细胞将经由菲柯尔(ficoid)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的人类PBMC富集。通过监测分裂的细胞中羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)染料的稀释来确定细胞增殖(柯(Quah)BJ等人, (2007)自然方案(Nat Protoc), 2(9):2049-56)。在37 $^{\circ}$ C下, 将富集的CD4⁺T细胞用10 μ M CellTrace[™] CFSE(生命技术公司(Life Technologies))标记7分钟。在充分洗涤之后, 将细胞悬浮于补充有10%热灭活的FBS的RPMI1640培养基中, 按1 \times 10⁶个细胞/ml。将总数为100 μ l (1 \times 10⁵个细胞)接种到用抗CD3抗体(3 μ g/ml, BD生物科技公司(BD

Biosciences))与5 μ g/ml的pab1949、5 μ g/ml的IgG1同种型对照、或2 μ g/ml的抗CD28抗体(BD 生物科技公司(BD Biosciences))预包衣的平底96孔板的每个孔中,并且在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下进行培养。在第5天,在4 $^{\circ}$ C下,将细胞用0.5 μ l/孔的标记有PerCP-Cy5.5的抗CD4抗体的在FACS缓冲剂(2%FBS在PBS中)中染色30分钟,并且通过LSRFortessa(BD生物科技公司(BD Biosciences))上的流式细胞术来确定CFSE低CD4+细胞的百分比。使用FlowJo对流式细胞术数据进行分析。

[0516] 使用与如以上所描述的其中将标记有CFSE的CD4+T细胞接种到用抗CD3抗体(3 μ g/ml, BD生物科技公司(BD Biosciences))与5 μ g/ml的pab2044、5 μ g/ml的IgG₄同种型对照(pab2031)、或2 μ g/ml的抗CD28抗体(BD生物科技公司(BD Biosciences))预包衣的96孔板中类似的测定,对pab2044的活性进行评估。在第5天,通过流式细胞术来检验CFSE低CD4+细胞的百分比。

[0517] 图2A和2B是来自用抗OX40抗体共同刺激诱导的CD4+T细胞增殖的代表性流式细胞术分析的直方图,显示了细胞数目(Y轴)和由标记有CFSE的CD4+T细胞发射的荧光水平(X轴)。通过增加的细胞百分比伴随由CFSE发射的荧光水平下降,显示出增强的CD4+T细胞增殖。该直方图中指示了CFSE低CD4+细胞的百分比。当添加至用次优浓度的抗CD3抗体活化的细胞中时,pab1949(图2A)和pab2044(图2B),当与板结合时,均诱导CD4+T细胞增殖。

[0518] 然后,对pab1949在诱导T细胞增殖中的剂量响应进行测量。使用基于磁性的分离(Stemcell Technologies),针对未改变的CD4+T细胞将经由菲柯尔(ficoll)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的PBMC富集。然后,在37 $^{\circ}$ C下,将CD4+T细胞的富集群体用10 μ M CellTrace™ CFSE(生命技术公司(Life Technologies))标记持续7min。在充分洗涤之后,将细胞悬浮于补充有10%热灭活的FBS的RPMI1640培养基中,按1 \times 10⁶/ml。将100 μ l(1 \times 10⁵)的细胞接种到用抗CD3抗体(3 μ g/ml, BD生物科技公司(BD Biosciences))与不同浓度的pab1949或IgG₁同种型对照预包衣的平底96孔板的每个孔中,并且在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下进行培养。在第4天,在4 $^{\circ}$ C下,将细胞用0.5 μ l/孔的标记有APC的抗CD4抗体在FACS缓冲剂(2%FBS在PBS中)中染色30分钟,并且通过LSRFortessa(BD生物科技公司(BD Biosciences))上的流式细胞术来确定CFSE低CD4+细胞的百分比。

[0519] 如图2C所示,抗OX40抗体pab1949能够在药理学上相关的抗体浓度下维持高水平的T细胞增殖。CD4+T细胞增殖是在0.2 μ g/ml与20 μ g/ml之间的pab1949浓度的基本上递增性的函数(图2C)。

[0520] 6.2.2 抗OX40抗体对抗CD3刺激的人类PBMC细胞因子产生的作用

[0521] 作为抗OX40抗体pab1949和pab1949-1的激动活性的进一步证据,对在次优抗CD3刺激下的细胞因子产生进行测量。

[0522] 对于细胞内细胞因子染色实验,将经由菲柯尔(ficoll)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的人类PBMC贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。将细胞重悬于细胞培养基(IL-2的RPMI+10%FBS+20U/mL)中并且将其添加至96孔培养平板中,该培养平板包含不同次优浓度的与板结合的抗CD3抗体,以及5 μ g/ml的抗OX40抗体pab1949或同种型对照IgG₁抗体。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下,将样品孵育3天。在活化之后,为了限制细胞内的蛋白质转运,根据制造商的说明,将细胞用布雷菲德菌素A(BD生

物科技公司 (BD Biosciences)) 进行处理,并且在37℃和5%CO₂下,将样品孵育6小时。在孵育之后,针对死细胞,将细胞用生存胺染料(viability amine dye) (生命技术公司 (Life Technologies)) 染色。在用FACS缓冲剂 (PBS, 2%FBS, pH 7.2) 洗涤之后,将稀释于冷FACS缓冲剂中的包含特异性针对CD3 (APC Cy7, SP34.2)、CD4 (PercP Cy5.5, L200)、以及CD8a (PE Cy7, SK1) 的抗体的抗体混合物添加至各个样品中并在4℃下孵育持续10分钟。将细胞固定,并且根据制造商的说明,将其用Cytofix-Cytoperm (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行透性化用于细胞内染色。将PBMC用特异性针对IFN γ (Alexa647, B27) 和TNF α (PE, Mab11) 的抗体进行染色,并且在室温下孵育10分钟。在染色之前,使用单染补偿控制,将结合小鼠IgG抗体 κ 轻链的珠粒用于给细胞染色的抗体进行染色。使用1xPerm-洗涤缓冲液 (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 洗涤样品并且使用FACS Canto流式细胞仪 (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行分析。使用Flojo软件分析流式细胞术图。

[0523] 对来自四个不同供体的PBMC进行测试:供体KM、供体TM、供体GS、以及供体SB。对于所有供体, pab1949证明了对人类T细胞的共刺激活性,包括IFN γ +TNF α +多功能CD4+T细胞以及CD8+T细胞以及TNF α +单功能CD4+T细胞以及CD8+T细胞 (图3A、3B、以及3C)。在来自供体GS的PBMC中, pab1949也能够增加IFN γ +单功能T细胞的百分比 (图3B)。

[0524] 然后,在与上述使用衍生自供体GS的PBMC的细胞的测定类似的次优抗CD3刺激测定中,对抗OX40抗体pab1949-1的剂量滴定进行测试。简言之,在37℃和5%CO₂下,将PBMC和与板结合的抗CD3抗体 (0.8 μ g/ml) 以及与板结合的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体 (0、0.3、1、3、6、12、25、或50 μ g/ml) 孵育4天。在活化之后,为了限制细胞内的蛋白质转运,根据制造商的说明,将细胞用布雷菲德菌素A (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行处理,并且在37℃和5%CO₂下,将样品孵育6小时。在孵育之后,将细胞用FITC生存胺染料 (viability amine dye) (生命技术公司 (Life Technologies)) 染色以区别活细胞和死细胞。在用冷缓冲剂 (1xPBS+2%FBS, pH 7.2) 洗涤之后,将包含抗CD3 (APC Cy7, SP34.2)、抗CD4 (PercP Cy5.5, L200)、以及抗CD8a (PE Cy7, SK1) 的抗体混合物添加至各个样品中并在4℃下孵育持续10分钟。将细胞固定,并且根据制造商的说明,将其用Cytofix-Cytoperm (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行透性化用于细胞内染色。将PBMC用抗IFN γ (Alexa647, B27) 和抗TNF α (PE, Mab11) 抗体进行染色,并且在室温下孵育10分钟。使用1xPerm-洗涤缓冲液 (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 洗涤样品并且使用FACSanto流式细胞仪 (BD生物科技公司 (BD Biosciences)) 进行采集。使用Flojo软件分析流式细胞术图。如图3D-3F所示,抗OX40抗体pab1949-1证明了共刺激活性并且以剂量依赖性方式增加了TNF α +CD4+T细胞、IFN γ +TNF α +多功能CD8+T细胞、以及IFN γ +CD8+T细胞的百分比。

[0525] 使用衍生自上述次优抗CD3刺激测定中额外供体的PBMC的细胞进一步测试 pab1949-1剂量范围的共刺激活性。在0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml下测试抗OX40抗体pab1949-1和IgG₁同种型对照抗体。抗OX40抗体pab1949-1始终增加来自多个供体的PBMC中的IFN γ +和/或TNF α +T细胞的百分比 (图4A-4C)。

[0526] 值得注意的是,对于来自很多供体的PBMC,由抗OX40抗体pab1949-1诱导的IFN γ +和/或TNF α +T细胞百分比是抗体浓度在所测试的大范围抗体浓度内的基本上递增性的函数 (图3D-3F和4A-4C)。

[0527] 为了进一步检验抗OX40抗体pab1949的激动活性,对所分泌的细胞因子的数量进

行了测量。将经由菲柯尔(ficoll)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的人类PBMC贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。将细胞重悬于细胞培养基(IL-2的RPMI+10%FBS+20U/mL)中并且将其添加至96孔培养平板中,该培养平板包含不同次优浓度的与板结合的抗CD3抗体,以及5 μ g/ml的抗OX40抗体pab1949或同种型对照IgG₁抗体。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育样品,并且在4天(SB#1A)或3天(SB#1B、SB#2、以及GS)后收集细胞培养物上清液。根据制造商的说明,使用V-PLEX ProinflammatoryPanel1(人类)试剂盒(细观发现公司)对样品进行测试,用于生产IL-2、TNF α 、IL-10、IL-4、以及IL-13。

[0528] 如图5A中所描绘,抗OX40抗体pab1949共刺激来自两个不同供体(供体SB和供体GS)的人类PBMC中的细胞因子产生。在两个分别的试验中对来自供体SB的PBMC的细胞因子产生进行了测试:SB#1A和SB#1B显示来自第一个实验的结果,其中分别在刺激4天和3天之后测量细胞因子;以及SB#2显示来自第二个实验的结果,其中在刺激3天之后测量细胞因子。

[0529] 然后,使用衍生自与上述测定类似的次优抗CD3刺激测定中的供体GS的PBMC的细胞,对由pab1949-1的剂量滴定诱导的细胞因子分泌进行检验。简言之,在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下,将PBMC和与板结合的抗CD3抗体(0.8 μ g/ml)以及与板结合的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体(0、0.3、1、3、6、12、25、或50 μ g/ml)孵育4天。在活化之后,收集细胞培养物上清液,使用人类TH1/TH2 10-Plex组织培养试剂盒(细观发现公司)用于检测细胞因子。

[0530] 如图5B-5D所示,抗OX40抗体pab1949-1以剂量依赖性方式刺激TNF α 、IL-10、以及IL-13产生。

[0531] 使用衍生自另外供体的PBMC的细胞来进一步证实pab1949-1在诱导细胞因子分泌中的共刺激活性。简言之,在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下,将PBMC和与板结合的抗CD3抗体(0.8 μ g/ml)以及与板结合的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体(0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50 μ g/ml)孵育4天。在活化之后,使用非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司)测量分泌至上清液中的细胞因子量。

[0532] 对于所测试的所有供体,pab1949-1剂量依赖性地增加了GM-CSF(图6A-6C)、IL-2(图7A-7C)、以及TNF β (图8A-8C)的分泌。

[0533] 对于来自很多供体的PBMC,由抗OX40抗体pab1949-1诱导的细胞因子(GM-CSF、IL-2、TNF α 、TNF β 、IL-10、以及IL-13)分泌是抗体浓度在大范围抗体浓度内的基本上递增性的函数(图5B-5D、6A-6C、7A-7C、和8A-8C)。

[0534] 6.2.3 抗OX40抗体在效应T细胞:调节性T细胞共培养测定中的作用

[0535] 然后,检验抗OX40抗体pab1949-1在效应T细胞(Teff):调节性T细胞(Treg)共培养测定中的活性。简言之,将经由菲柯尔(ficoll)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的人类PBMC贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。通过磁珠分离(分别为CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}调节性T细胞分离试剂盒II和Pant T细胞试剂盒,Miltenyi Biotec)来分离调节性T细胞和效应T细胞。然后,通过用抗-CD3/抗-CD28/抗-CD2珠粒(Miltenyi Biotec)按1:2(T细胞:珠粒)的比例在细胞培养基(RPMI+10%FBS)中孵育使调节性T细胞活化2天。在活化之后,在抗-CD3/抗-CD28/抗-CD2珠粒、可溶或交联的(使用抗-Fc F(ab')₂,杰克逊免疫研究(Jackson ImmunoResearch))pab1949-1或IgG₁同

种型对照 (10 μ g/ml) 的存在下, 将调节性T细胞和效应T细胞按1:3 (Treg:Teff) 的比例添加至96孔培养平板中。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下, 将样品孵育4天。在活化之后, 收集上清液, 并且使用AlphaLISA[®] (铂金埃尔默公司 (Perkin Elmer)) 测量IL-10或IL-2。

[0536] 在该体外Teff:Treg共培养测定中, 抗OX40抗体pab1949-1通过Treg细胞缓解了Teff细胞群体的抑制, 如通过与同种型处理的细胞相比来自pab1949-1处理的细胞中增强的IL-2产生 (图9A) 和降低的IL-10产生 (图9B) 所证明。

[0537] 6.2.4 在葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激时, 抗OX40抗体对人类PBMC的作用

[0538] 在葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激之后, 进一步评估了抗OX40抗体pab1949和pab1949-1对初代人类PBMC的功能活性。将在补充有青霉素、链霉素以及10%FBS (Hyclone) 的RPMI1640中的深冷保存的PBMC (10⁵个细胞/孔) 添加至96孔NUNCLON delta平面板 (NUNC[™]) 上。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂以及97%湿度下, 在不存在或存在固定浓度 (10 μ g/ml在图10A和10B中) 或不同浓度 (20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、以及0.00128 μ g/ml在图10C和10D中; 50、10、2、0.4、0.08、0.016、以及0.0032 μ g/ml在图10E中) 的抗OX40抗体或同种型对照以及100ng/ml的SEA (Toxin Technologies) 的情况下, 培养细胞5天。收集澄清上清液并且在-80 $^{\circ}$ C下储存直至分析。对于IL-2和IL-10, 使用电化学发光 (细观发现公司) 生成细胞因子的效价。

[0539] 抗OX40抗体pab1949在该初代人类PBMC测定中显示出激动活性, 包括IL-2产生 (图10A) 和抑制IL-10产生 (图10B)。通过在10 μ g/ml下的pab1949增强IL-2产生优于利用参考抗OX40抗体pab1784和pab2045所观察到的 (图10A)。图10C、10D、以及10E是来自三个独立试验的显示在用不同浓度的pab1949、pab1949-1、或参考抗体pab1784以及pab2045共同刺激之后, IL-2倍数变化的剂量响应曲线。抗体pab1949和pab1949-1展现出与参考抗体不同的剂量响应关系并且能够在药理学上相关的抗体浓度下诱导高水平的IL-2产生。由pab1949或pab1949-1诱导的IL-2产生是抗体浓度在大范围抗体浓度内的基本上递增性的函数 (例如, 在0.032与20 μ g/ml之间, 如图10C和10D所示, 或在0.0032与50 μ g/ml之间, 如图10E所示)。

[0540] 然后, 在上述初代人类PBMC测定中比较IgG₁抗体pab1949-1和IgG₂抗体pab2193-1的功能活性。简言之, 将深冷保存的人类PBMC (血液研究部门 (Research Blood Components)) 按10⁵个细胞/孔置于在96孔NUNCLON delta平面板中补充有Normocin[™] (英杰公司 (Invivogen), #ant-nr) 和10%热灭活的FBS (Gibco, 英杰公司 (Invitrogen Corporation)) 的RPMI1640培养基中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂以及97%湿度下, 将细胞与增加浓度 (50、10、2、0.4、0.08、0.016、以及0.0032 μ g/ml) 的pab1949-1、pab2193-1、IgG₁同种型对照抗体、或IgG₂同种型对照抗体、以及100ng/ml SEA超抗原 (拓新科技公司 (Toxin Technologies)) 孵育5天。收集澄清上清液并且在-80 $^{\circ}$ C下储存直至分析。通过ELISA测量IL-2的浓度。

[0541] 如图10F所示, IgG₁抗体pab1949-1和IgG₂抗体pab2193-1均诱导人类PBMC中的IL-2产生。类似于pab1949-1, pab2193-1也展现出剂量响应关系, 其中IL-2产生是抗体浓度的基本上递增性的函数。

[0542] 另外, 通过将IgG₁抗体pab1949-1与未糖基化的变体pab1949-1-N297A进行比较, 检验Fc γ R相互作用在抗OX40抗体pab1949-1的功能活性中的作用。pab1949-1-N297A与pab1949-1共享重链可变区和轻链序列, 但在重链恒定区中包括N297A取代 (根据EU编号系

统进行编号)。

[0543] 将经由菲柯尔(ficoll)梯度从健康供体血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components), LLC)中分离的人类PBMC贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。将细胞重悬于细胞培养基(RPMI+10%热灭活的FBS)中并且在37℃以及5%CO₂下,用100ng/ml SEA (Toxin Technologies)以及pab1949-1、pab1949-1-N297A、或IgG₁同种型对照抗体(0-50μg/ml)的剂量滴定进行孵育持续5天。收集上清液,并且然后使用AlphaLISA®(铂金埃尔默公司(Perkin Elmer))测试IL-2。

[0544] 如图10G所示,在SEA刺激时,pab1949-1和pab1949-1-N297A均以剂量依赖性方式诱导人类PBMC中的IL-2产生。存在于天冬酰胺297(N297)处的单个n-联糖基化位点的关键糖基化在pab1949-1-N297A变异体抗体上缺失,由此导致其Fc片段与FcγR结合的缺失。相比于野生型对应物,该变异体抗体展现出降低的激动活性。

[0545] 6.2.5 激动性抗OX40抗体对OX40NF-κB-荧光素酶报告子细胞系的作用

[0546] 使用人类OX40NF-κB-荧光素酶报告子细胞系测量抗OX40抗体pab1949-1介导T细胞中信号转导的能力。将使用Jurkat细胞系生成的报告子细胞重悬于测定培养基(RPMI+10%FBS+青霉素/链霉素/谷氨酸酯+1μg/ml嘌呤霉素)中,并且用不同浓度的可溶性pab1949-1(0-6μg/ml)或IgG₁同种型对照抗体在存在(复合条件)或不存在(可溶条件)抗Fc试剂的情况下进行孵育。在37℃和5%CO₂下,将板孵育2小时。在孵育之后,在室温下将板平衡,并且然后添加等体积的室温Nano-Glo试剂(普洛麦格公司(Promega))。使用EnVision多标记读取器2100读取发光。

[0547] 仅交联的pab1949-1诱导OX40NF-κB-荧光素酶报告子细胞系的活化显着(图11B)。可溶性pab1949-1诱导报告子细胞系的活化最低,并且IgG₁同种型对照抗体没有诱导可检测水平的荧光素酶表达(图11A和11B)。

[0548] 6.2.6 激动性抗OX40抗体对Fcγ受体IIIA报告子细胞系的作用

[0549] 在本实例中,使用表达Fcγ受体IIIA的报告子细胞系与表达人类OX40的靶细胞对IgG₁抗体pab1949-1和IgG₄抗体pab2044-1经由活化Fcγ受体共接合OX40和信号传导的能力进行评价。将过量表达FcγRIIIA(158V/V多态性)的Jurkat NFAT-荧光素酶报告子细胞(普洛麦格公司(Promega))用作效应细胞。抗体/抗原复合物,其中抗原位于靶细胞的表面,与效应细胞上的FcγRIIIA的结合向启动子/报告子构建体发信号并且导致荧光素酶基因表达。

[0550] 将OX40-过量表达细胞(PHA-活化的Hut102细胞)与FcγRIIIA报告子细胞在可溶性pab1949-1、pab2044-1、IgG₁同种型对照、或IgG₂同种型对照(0-10μg/ml)的剂量滴定存在下共培养。根据制造商的说明,对报告子细胞的活化进行评估,并且记录相对光单位(RLU)。ΔRLU计算如下:抗OX40抗体的RLU减去同种型对照的RLU。如图12A所示,当结合至OX40-表达细胞时,仅IgG₁抗体pab1949-1活化FcγRIIIA报告子细胞。

[0551] 6.2.7 激动性抗OX40抗体对Fcγ受体IIA报告子细胞系的作用

[0552] 然后,使用表达FcγRIIA(普洛麦格公司(Promega))的报告子细胞系与靶细胞(表达人类OX40的Jurkat细胞)对IgG₁抗体pab1949-1和pab1949-1-S267E/L328F连同IgG₂抗体pab2193-1经由FcγRIIA共接合OX40和信号传导的能力进行评价。pab1949-1-S267E/L328F与pab1949-1共享重链和轻链序列,但在重链恒定区中包括S267E和L328F取代(根据EU编号

系统进行编号)。

[0553] 将表达具有高亲和性131H/H多态性的Fc γ RIIA和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT应答组件的Jurkat细胞用作效应细胞。简言之,将25 μ l的靶细胞(6×10^6 个细胞/ml)与25 μ l的连续稀释的抗体在96孔白测定板的二重孔中混合。所测试的抗体是pab1949-1、pab1949-1-S267E/L328F、pab2193-1、IgG₁同种型对照抗体以及IgG₂同种型对照抗体。然后,将25 μ l的效应细胞(6×10^6 个细胞/ml)添加至每个孔中,从而得到1:1的效应物:靶比值。在37℃和5%CO₂下,将板孵育20小时。在该孵育之后,将Bio-Glo萤光素酶测定试剂(普洛麦格公司(Promega))在室温下解冻,并且将75 μ l添加至每个孔中。在5-10分钟内,使用EnVision多标记微孔板检测仪(铂金埃尔默公司(PerkinElmer))测量发光。将本底发光从各个样品读数中减去,并且记录调节的相对光单位(RLU)。

[0554] 如图12B所示,当结合至表达OX40的细胞时,IgG₂抗体pab2193-1显示出最强的Fc γ RIIA^{H131}活化,随后是pab1949-1-S267E/L328F以及pab1949-1。

[0555] 6.2.8 抗OX40抗体与调节性T细胞或效应T细胞的相互作用

[0556] 在本实例中,对通过活化的自然调节性T细胞(nTreg)和效应T细胞(Teff)表达人类OX40进行了检验。使用基于磁性的分离,针对未改变的CD3+T细胞(Teff)或CD4+CD25+CD45RA+T细胞(nTregs)将从健康供体中分离出的PBMC富集。将T淋巴细胞用抗-CD3/CD28偶联的珠粒与500U rIL-2活化4天,并且与50U rIL-2再活化4天。在活化8天之后,收获T细胞,并且在4℃下,用死细胞/活细胞可固定的Near-IR死细胞染色在PBS中进行染色20分钟。将包含针对CD4(BV605,OKT4)、CD8a(BV650,RPA-T8)、CD127(BV421,A01905)、CD25(APC,M-A251)、以及OX-40(PE,ACT35)的、稀释于缓冲剂(具有2%FBS的PBS)中的缀合抗体的表面抗体混合物添加至各个样品中并在4℃下孵育持续30分钟。然后,将细胞用缓冲剂洗涤并固定并且用胞内抗体混合物进行染色,该胞内抗体混合物包含稀释于缓冲剂中的针对CD3(BV711,OKT3)以及Foxp3(AF488,PCH101)的缀合抗体。对于OX40,使用小鼠抗人类IgG1-PE同种型对照,将来自各个T细胞群体的一个样品也用荧光负一型(fluorescence minus one)(FMO)对照进行染色。通过流式细胞术对样品进行分析。根据制造商的说明,同时运作PE-缀合的Quantibrite珠粒并且用于量化OX40受体密度。

[0557] 如图13A所示,人类OX40在活化的nTreg细胞上的表面表达高于其在活化的CD4+或CD8+效应T细胞上的表面表达。

[0558] 在类似的研究中,将来自两个供体的活化的nTreg以及Teff用商业抗OX40抗体(BER-ACT35克隆)或同种型对照抗体进行染色并且通过流式细胞术进行分析。A平均荧光强度(Δ MFI)代表抗OX40抗体的MFI减去同种型对照的MFI。结果示于图13B中。

[0559] 然后,使用上述表达Fc γ 受体IIIA(Fc γ RIIIA)的报告子细胞系与如上生成的活化的效应T细胞(Teff)或nTreg细胞,对抗OX40抗体pab1949经由活化Fc γ 受体共接合OX40和信号传导的能力进行评价。将抗OX40抗体pab1949或IgG₁同种型对照用起始浓度为10 μ g/ml的3倍稀释物进行连续稀释。在二重孔中,将25 μ l的各个抗体稀释物添加至Teff或nTreg细胞中。将过量表达Fc γ RIIIA(158V/V多态性)的Jurkat NFAT-荧光素酶报告子细胞按1:1的效应物-靶比值添加。将板孵育20小时,并且然后使用Bio-Glo萤光素酶测定试剂(普洛麦格公司(Promega))进行分析。将本底发光(空白外孔)从各个样品读数中减去,并且记录调节的相对光单位(RLU)。 Δ RLU示于图13C中,其代表抗OX40抗体的RLU减去同种型对

照的RLU。

[0560] 使用轻度修饰的实验方案,重复图13C中所描绘的研究。简言之,将来自健康志愿者的血沉棕黄层(血液研究部门(Research Blood Components))用于分离初代调节性T细胞和效应T细胞。通过磁珠分离将两个T细胞亚群纯化(分别为 $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$ 调节性T细胞分离试剂盒II和Pant T细胞试剂盒,Miltenyi Biotec),并且然后通过将细胞与抗-CD3/抗-CD28/抗-CD2珠粒(Miltenyi Biotec)以1:4的比例(T细胞:珠粒)在细胞培养基(RPMI+10%FBS)中孵育进行活化7天。将活化的Treg细胞或Teff细胞与上述表达Fc γ RIIIA的Jurkat NFAT-荧光素酶报告子细胞(普洛麦格公司(Promega))在可溶性pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体(0-10 μ g/ml)的剂量滴定存在下共培养。根据制造商的说明,对报告子细胞的活化进行评估,并且 Δ RLU示于图13D中。

[0561] 与活化的nTreg和活化的CD4⁺或CD8⁺效应T细胞之间的差异表面OX40表达一致(图13A和13B),抗OX40抗体pab1949(图13C)和pab1949-1(图13D)优选标记的活化的nTreg细胞,由此诱导在报告子细胞系中的Fc γ RIIIA依赖性信号转导。

[0562] 为了评价OX40过量表达是否是位于肿瘤微环境之内的调节性T细胞的特征,比较在分离自健康人类供体血液(图14A,a-c,n=3)或分离自非小细胞肺癌(NSCLC)患者肿瘤组织(图14A,d-f,n=3)的T细胞上的OX40表达。为了消除抗体与免疫群体的本底结合,在添加细胞表面和胞内抗体之前,将所有细胞用纯化的CD16/32抗体孵育(10 μ g/ml,在室温下20分钟)。在FcR-封闭之后,将所有样品用APC-缀合的抗OX40抗体(克隆Ber-ACT35)或同种型对照以及细胞表面抗体谱系混合物(CD3-FITC、CD25-PECy7、CD4-BV650以及CD8a-PE)在冰上孵育45分钟(每个1 μ g/ml),用FACS缓冲剂(PBS、EDTA以及0.5%BSA)洗涤三次,随后固定/透化并且用太平洋蓝缀合的FOXP3(在冰上固定/透化以及孵育各自45分钟,1 μ g/ml)孵育。然后,使用LSRFortessa流式细胞仪(BD生物科技公司(BD Biosciences))分析染色的样品。将图14A中的细胞群体定义如下:Tconv(CD3⁺、CD4⁺、CD8a⁻、CD25低、FOXP3⁻)或Treg(CD3⁺、CD4⁺、CD8a⁻、CD25高、FOXP3⁺)。

[0563] 如图14A所示,OX40表面表达在分离自NSCLC患者肿瘤组织的调节性T细胞上最高,而在来自健康供体的Treg或常规T细胞上有很低或没有可检测水平。

[0564] 对于其他肿瘤类型,进行类似的分析。简言之,将冷冻、解离的肿瘤样品(Conversant)或PBMC在AutoMACS水洗溶液(洗涤缓冲液,Miltenyi Biotec)中解冻,并且在细胞表面染色之前,将细胞进行Fc-封闭(Trustain FcX,生物传奇公司(Biolegend))。将细胞用洗涤缓冲液进行洗涤并且在下4 $^{\circ}$ C用谱系标志物抗体进行染色45分钟,这些谱系标志物抗体包括抗-CD3(克隆SP34)、抗-CD4(克隆OKT4)、抗-CD8(克隆SK1)、抗-CD25(克隆MA-251)、以及抗-OX40(克隆BER-ACT35)。根据制造商的说明,洗涤细胞并且用叉头框P3(FOXP3)/转录因子染色缓冲液组(eBioscience)进行透性化。在透化之后,将细胞用抗-FOXP3 eFluor450(克隆PCH101,eBioscience)进行染色。使用BD生物科技公司(BD Biosciences)Fortessa流式细胞仪采集染色的样品,并且使用Flojo软件分析数据。

[0565] 来自多种肿瘤类型(包括卵巢癌、结肠癌(CRC)、子宫内膜癌、肾细胞癌(RCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)以及乳癌)的样品证明了在与肿瘤相关的调节性T细胞中的OX40表达高于在与肿瘤相关的效应T细胞中的表达(图14B、14C、以及14D)。

[0566] 6.2.9 抗OX40抗体对抗CD3刺激的食蟹猴PBMC细胞因子产生的作用

[0567] 然后,使用次优抗CD3刺激测定,对抗OX40抗体pab1949-1对食蟹猴PBMC的激动活性进行检验。简言之,将冷冻的食蟹猴PBMC(全球灵长动物公司(World Wide Primates))贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。将细胞重悬于细胞培养基(IL-2的RPMI+10%FBS+20U/ml)中,并且在37℃和5%CO₂下,将其和与板结合的抗CD3抗体(0.8μg/ml)以及与板结合的pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体(0、0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50μg/ml)孵育4天。收集细胞培养物上清液,并且使用非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司)对所分泌的细胞因子进行检验。

[0568] 抗OX40抗体pab1949-1剂量依赖性地增强了GM-CSF(图15A和15B)、IL-17(图16A和16B)、TNFβ(图17A和17B)、IL-5(图18A和18B)、以及IL-10(图19A和19B)在多个食蟹猴的PBMC中的产生。

[0569] 6.2.10 在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时,抗OX40抗体对食蟹猴PBMC的作用

[0570] 在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激之后,进一步分析了pab1949-1共刺激食蟹猴PBMC的能力。将冷冻的食蟹猴PBMC(全球灵长动物公司(World Wide Primates))贮藏于液氮中,并在实验当天解冻。将细胞重悬于细胞培养基(RPMI+10%热灭活的FBS)中并且在37℃以及5%CO₂下,用SEA抗原(100ng/ml)连同pab1949-1或IgG₁同种型对照抗体(0、0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25、或50μg/ml)的剂量滴定进行孵育持续5天。在活化之后,收集细胞培养物上清液,并且使用非人类灵长动物(NHP)V-Plex测定试剂盒(细观发现公司)对所分泌的细胞因子进行检验。

[0571] 如图20A和20B所示,抗OX40抗体pab1949-1增加了来自两个供体的食蟹猴PBMC中的IL-2产生。

[0572] 6.3 实例3:抗OX40抗体的表位作图

[0573] 在本实例中,通过丙氨酸扫描对pab1949和参考抗OX40抗体pab1928的表位进行了分析。抗体pab1928是基于美国专利公开号US 2013/0280275(通过引用结合在此)中提供的抗体Hu106-122的可变区而产生的。pab1928的重链包括Hu106-122(SEQ ID NO:56)的重链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:65的人类IgG1恒定区。pab1928的轻链包括Hu106-122(SEQ ID NO:57)的轻链可变区的氨基酸序列和SEQ ID NO:25的恒定区。因此,重链包括SEQ ID NO:72的氨基酸序列并且轻链包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0574] 6.3.1 表位作图-丙氨酸扫描

[0575] 通过丙氨酸扫描,对pab1949-1和参考抗体pab1928的结合特性进行测定。简言之,将来自安捷伦技术公司(Agilent Technologies)(G5901A)的快速变化HT蛋白质工程系统(QuikChange HT Protein Engineering System)用于生成在胞外域中具有丙氨酸取代的人类OX40突变体。使用标准转染技术,随后如以上所描述的转导,使人类OX40突变体在1624-5细胞的表面表达。

[0576] 对表达正确折叠的人类OX40突变体的细胞,如通过在流式细胞术中结合多克隆抗OX40抗体所证明,进行进一步选择表达人类OX40突变体、不结合单克隆抗OX40抗体pab1949-1或pab1928的亚群。通过制备型、高速FACS(FACSAriaII, BD生物科技公司(BD Biosciences))将展现出特异性抗体结合的细胞从非结合细胞群体中分离。在组织培养中再次扩张抗体反应性或非反应性细胞池,由于逆转录病毒转导细胞的稳定表达表型,重复抗体定向的细胞分选和组织培养扩增的循环,直到获得明显可检测的抗OX40抗体

(pab1949-1或pab1928)非反应性细胞群体的点处。使抗OX40抗体非反应性细胞群体经历最终的单细胞分选步骤。在若干天的细胞扩增之后,使用流式细胞术,针对结合多克隆抗OX40抗体以及不结合单克隆抗体pab1949-1或pab1928,再次测试单细胞分选的细胞。简言之,将表达个体人类OX40丙氨酸突变体的1624-5细胞与单克隆抗OX40抗体pab1949-1或pab1928进行孵育。对于每种抗体,测试了两种抗体浓度(pab1949-1:2 μ g/ml和0.5 μ g/ml;pab1928:1.1 μ g/ml和0.4 μ g/ml)。将与APC缀合的多克隆抗OX40抗体(AF3388,R&D系统公司(R&D systems))以1:2000进行稀释。添加FC受体封闭(1:200;BD目录号553142),并且在4℃下,将样品孵育20分钟。在洗涤之后,对于检测如果有必要(PE-缀合的;BD目录号109-116-097),则在4℃下,将细胞用第二抗IgG抗体孵育20min。然后,洗涤细胞,并且使用流式细胞仪(BD 生物科技公司(BD Biosciences))进行采集。

[0577] 为了将表型(多克隆抗OX40抗体+、单克隆抗OX40抗体-)与基因型联系起来,对单细胞分选的人类OX40突变体进行测序。图21是显示仍然结合多克隆抗OX40抗体但不结合单克隆抗OX40抗体pab1949-1或pab1928的人类OX40丙氨酸突变体的表。所有残基是根据人类OX40的成熟氨基酸序列(SEQ ID NO:55)进行编号的。基于流式细胞术分析,“+”表示结合,而“-”表示缺少结合。

[0578] * * *

[0579] 本发明不被在此说明的具体实施例限于一定的范围。确实,从以上说明和附图,除了所描述的内容以外,本发明的不同修改对于本领域的普通技术人员而言也都将变得很清楚。这类改变旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0580] 出于所有的目的,本文所引用的全部参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)通过引用以其全文结合在此,并且这达到如同每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)具体地或单独地指明出于所有目的通过引用以其全文而结合的相同的程度。

[0581] 其他实施例在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 阿吉纳斯公司
 纪念斯隆-凯特琳癌症中心
 路德维格癌症研究所有限公司

<120> 抗OX40抗体及其使用方法

<130> 3617.003PC04/EKS/CLD

<150> 62/323,458
 <151> 2016-04-15

<150> 62/262,373
 <151> 2015-12-02

<150> 62/161,198
 <151> 2015-05-13

<150> 62/158,515
 <151> 2015-05-07

<160> 72

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 1

[0001] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 2

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 3

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 4

Gly Ser Ala Met His
1 5

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10

[0002]

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 7

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 9

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

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

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

[0003] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser
20 25 30

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 15

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

[0004]

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 16
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 17
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 17
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45
 [0005] Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80
 Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95
 Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 18
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 18

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

[0006]

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 19
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg
 100

<210> 20
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

[0007]

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

	180	185	190
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 195 200 205		
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215		
	<210> 21 <211> 451 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成肽		
	<400> 21		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser 20 25 30		
	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
	Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala 50 55 60		
[0008]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80		
	Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95		
	Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser 115 120 125		
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala 130 135 140		
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val 145 150 155 160		
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala 165 170 175		
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val 180 185 190		
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His 195 200 205		
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys 210 215 220		

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 [0009] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 22
 <400> 22
 000
 <210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 [0010] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

[0011]

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

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 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 25
<211> 107

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Arg Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

[0012]

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<400> 27
000

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

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

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

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

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

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65					70					75					80

[0013]	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp
					85						90				95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100						105		

<210> 29

<400> 29
000

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 30

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

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<400> 31
000

<210> 32

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (97)..(97)

<223> 可以是赖氨酸或精氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (239)..(239)

<223> 可以是天冬氨酸或谷氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (241)..(241)

<223> 可以是亮氨酸或甲硫氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (314)..(314)

<223> 可以是甘氨酸或丙氨酸

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

[0014]

[0015]

Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu
 225 230 235 240
 Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Xaa Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 33
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 33
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 [0016] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 34
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

[0017]

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 35

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

[0018]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

[0019]

<210> 36
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

[0020]

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Ser Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 37
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 37

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

[0021] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 38
 <211> 107

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (46)..(46)
<223> 可以是缬氨酸或丙氨酸

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (84)..(84)
<223> 可以是亮氨酸或缬氨酸

<400> 38

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Xaa Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

[0022]

Lys His Lys Xaa Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 39

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Val Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 40

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

[0023]

Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42
<211> 183
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

[0024]

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 43
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Met Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu

	20	25	30
	Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp 35 40 45		
	Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn 50 55 60		
	Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys 65 70 75 80		
	Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys 85 90 95		
	Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp 100 105 110		
	Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly 115 120 125		
	Glu Phe Cys Val Leu 130		
[0025]	<210> 44 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成肽		
	<400> 44		
	Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr 1 5 10		
	<210> 45 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成肽		
	<400> 45		
	Leu Gly Ser 1		
	<210> 46 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成肽		
	<400> 46		
	Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr 1 5		
	<210> 47 <211> 8 <212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Ala
1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 48

Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 49

Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10

[0026]

<210> 50

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 50

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 51
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 51
 [0027]
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	180	185	190
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys	210	215	220
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val	225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser	290	295	300
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	325	330	335
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	340	345	350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser	385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435	440	445
<210> 52			

[0028]

<211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 52

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

[0029] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 [0030] Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 53
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 53
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

	85	90	95
	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val	Glu Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro
	100	105	110
	Pro Val Ala Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp
	115	120	125
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	Asp
	130	135	140
	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	Gly
	145	150	155
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	Asn
	165	170	175
	Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Val His Gln Asp	Trp
	180	185	190
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly	Leu Pro
	195	200	205
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg	Glu
	210	215	220
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	Asn
	225	230	235
[0031]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile
	245	250	255
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr	
	260	265	270
	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys
	275	280	285
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	Cys
	290	295	300
	Ser Val Met His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu
	305	310	315
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325		
	<210> 54		
	<211> 326		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成肽		
	<400> 54		
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg	
	1	5	10
			15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 [0032] Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 55
<211> 249
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

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

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95

[0033] Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly
180 185 190

Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala
195 200 205

Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys
210 215 220

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala
225 230 235 240

Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
245

<210> 56
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 56

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

[0034]

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 57

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 58

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0035]

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 [0036] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 59
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 59
 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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0037]

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser 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
 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> 60
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 60
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

	Tyr	Cys	Thr	Ser	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			115					120					125				
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
			130				135						140				
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	145					150					155					160	
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165						170					175		
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180						185					190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195						200					205				
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		210					215					220					
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
	225					230					235					240	
[0038]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245						250					255		
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275						280					285				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				325						330					335		
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340						345					350			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
			370				375					380					
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 61
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 61

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0039]

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

[0040]

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 <210> 62
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 62
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 [0041] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 <210> 63
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 63
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

[0042]

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 [0043] Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 64
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (97)..(97)
<223> X是 K 或 R

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (239)..(239)
<223> X是 D 或 E

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (241)..(241)
<223> X是 L 或 M

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (314)..(314)
<223> X是 G 或 A

<400> 64

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0044]

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

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

	165	170	175
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190		
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205		
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220		
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu 225 230 235 240		
	Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Xaa Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
[0045]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 325		
	<210> 65 <211> 329 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成肽		
	<400> 65		
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 1 5 10 15		
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30		
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45		
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80		
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		

	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			115				120						125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135					140					
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145				150					155						160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165						170					175		
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190			
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200						205				
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225					230					235					240	
[0046]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245						250					255		
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275						280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
		290				295						300					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310					315					320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								
					325												
	<210>	66															
	<211>	329															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	合成肽															
	<400>	66															
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	

	20	25	30
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45		
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80		
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		
	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110		
	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125		
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140		
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160		
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175		
[0047]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190		
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205		
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220		
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225 230 235 240		
	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

325

<210> 67
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0048] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 68
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

[0049]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

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

180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
195	200	205
Ser Ser Ser Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser	
275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly	Asn Val Phe Ser	
290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser	
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
325		

[0050]

<210> 69
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
1	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	
65	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
85	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
100	110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

[0051] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 70
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

	35	40	45
	Gly Val His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser	Ser Gly Leu Tyr Ser
	50	55	60
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	Asn Phe Gly Thr Gln Thr	
	65	70	75 80
	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val Asp Lys	
		85	90 95
	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
		100	105 110
	Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
		115	120 125
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
		130	135 140
	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
		145	150 155 160
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
		165	170 175
	Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
		180	185 190
[0052]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
		195	200 205
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
		210	215 220
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
		225	230 235 240
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
		245	250 255
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
		260	265 270
	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
		275	280 285
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
		290	295 300
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
		305	310 315 320
	Ser Leu Ser Pro Gly		
		325	
<210>	71		

<211> 325
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

[0053] Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly
 325
 <210> 72
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <400> 72
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

[0054]

	195	200	205
	His Lys Pro Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys Arg Val	Glu Pro Lys Ser
	210	215	220
	Cys Asp Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu
	225	230	235 240
	Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu
	245	250	255
	Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser
	260	265	270
	His Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu
	275	280	285
	Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn Ser Thr
	290	295	300
	Tyr Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu Asn
	305	310	315 320
[0055]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Ala	Leu Pro Ala Pro
	325	330	335
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro Gln
	340	345	350
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln Val
	355	360	365
	Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala Val
	370	375	380
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro
	385	390	395 400
	Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Lys Leu Thr
	405	410	415
	Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser Val
	420	425	430
	Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu
	435	440	445
	Ser Pro Gly		
	450		

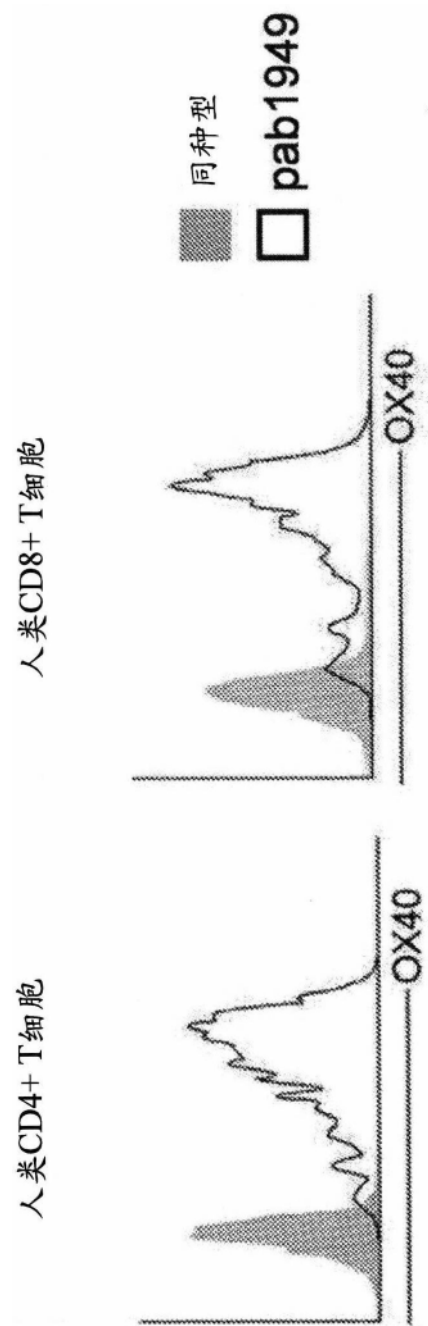


图1A

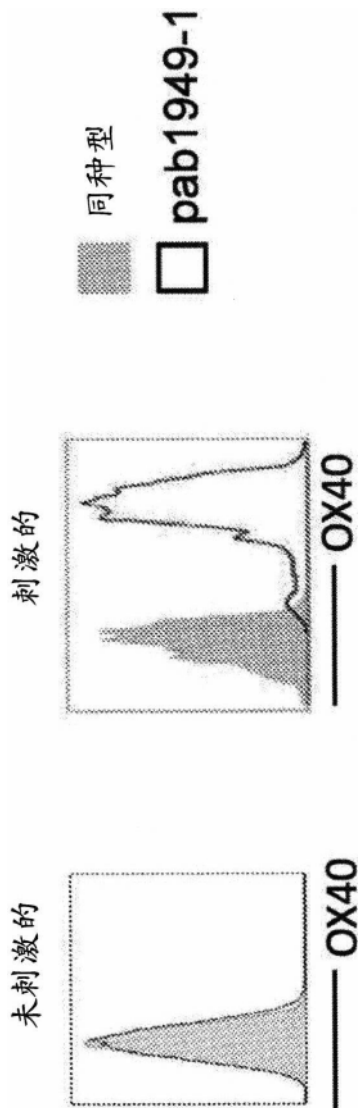


图1B

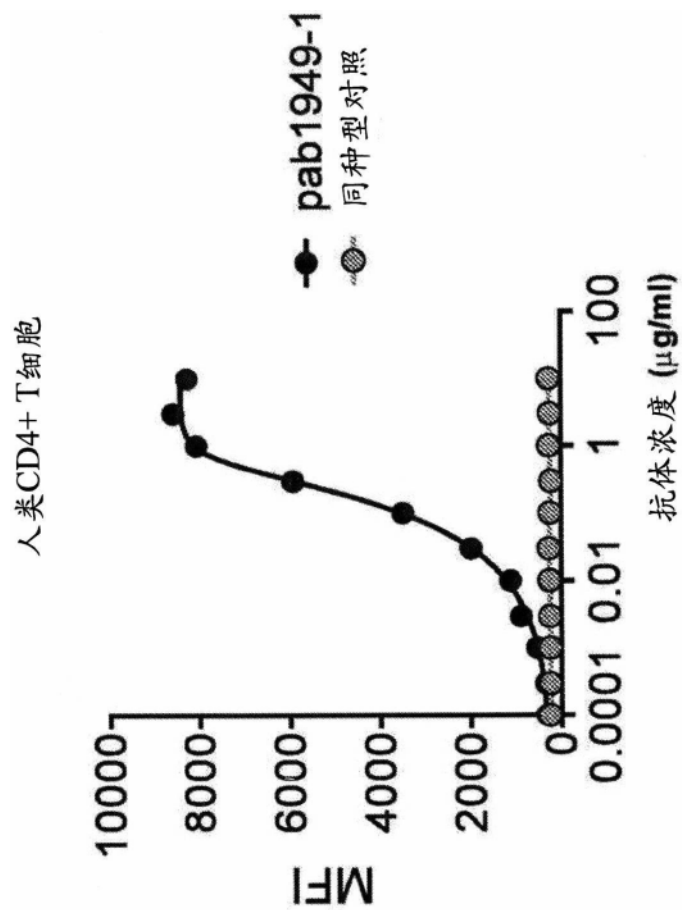


图1C

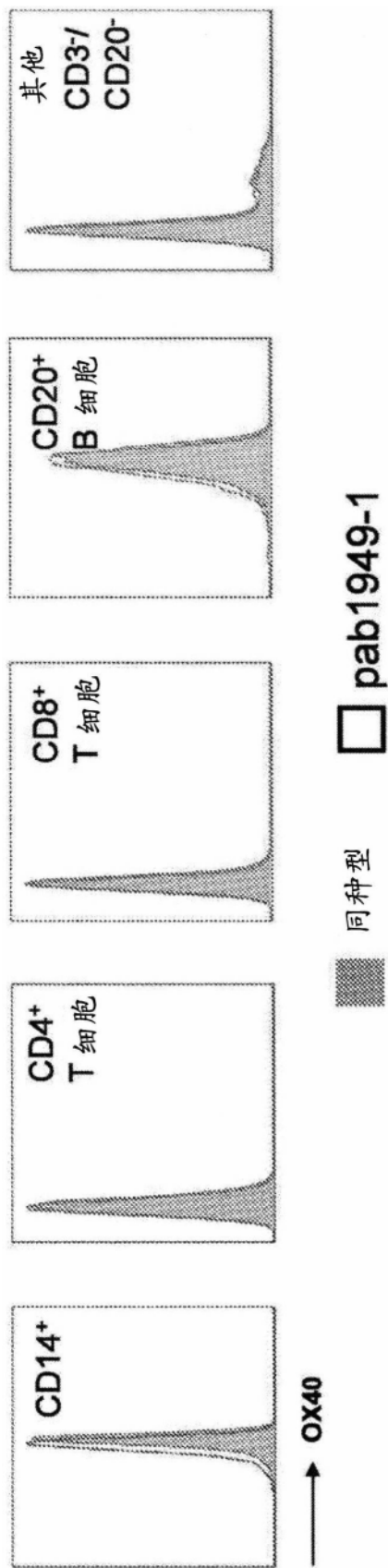


图1D

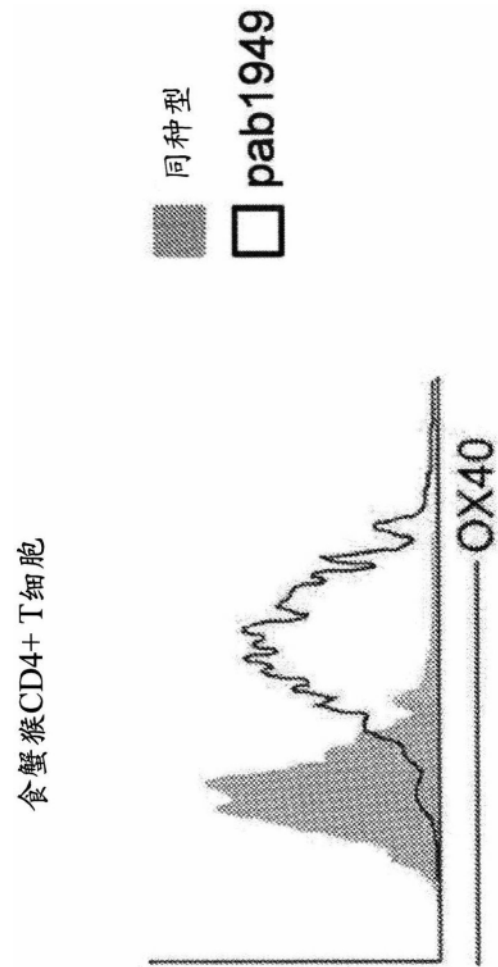


图1E

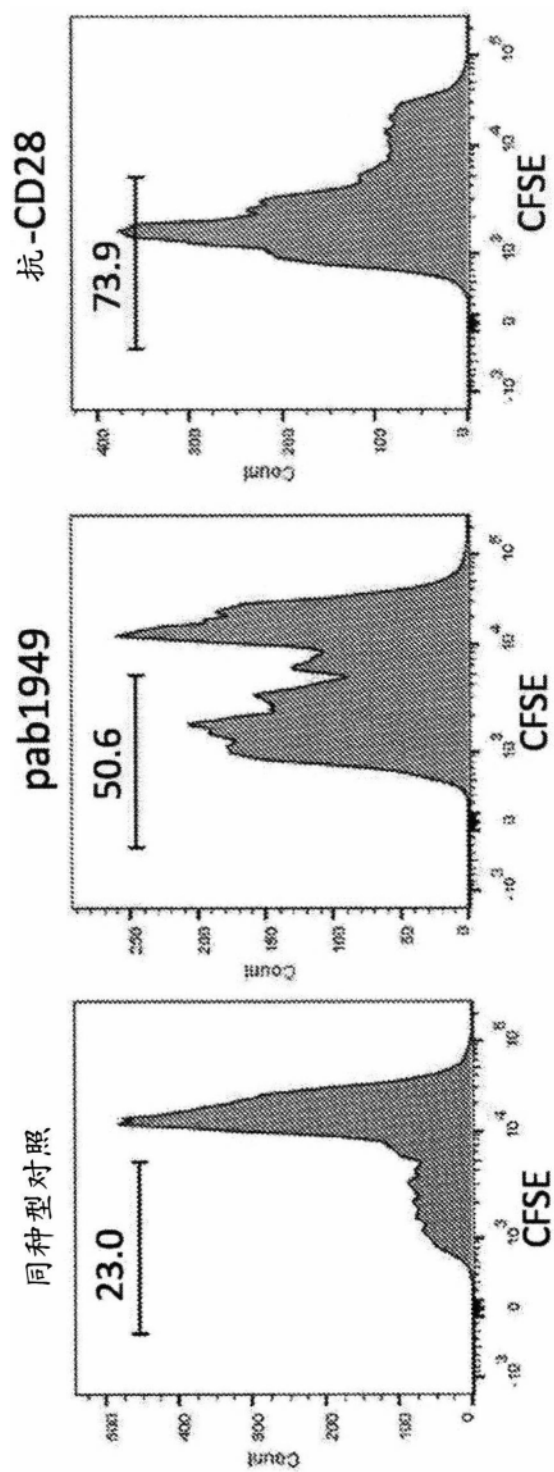


图2A

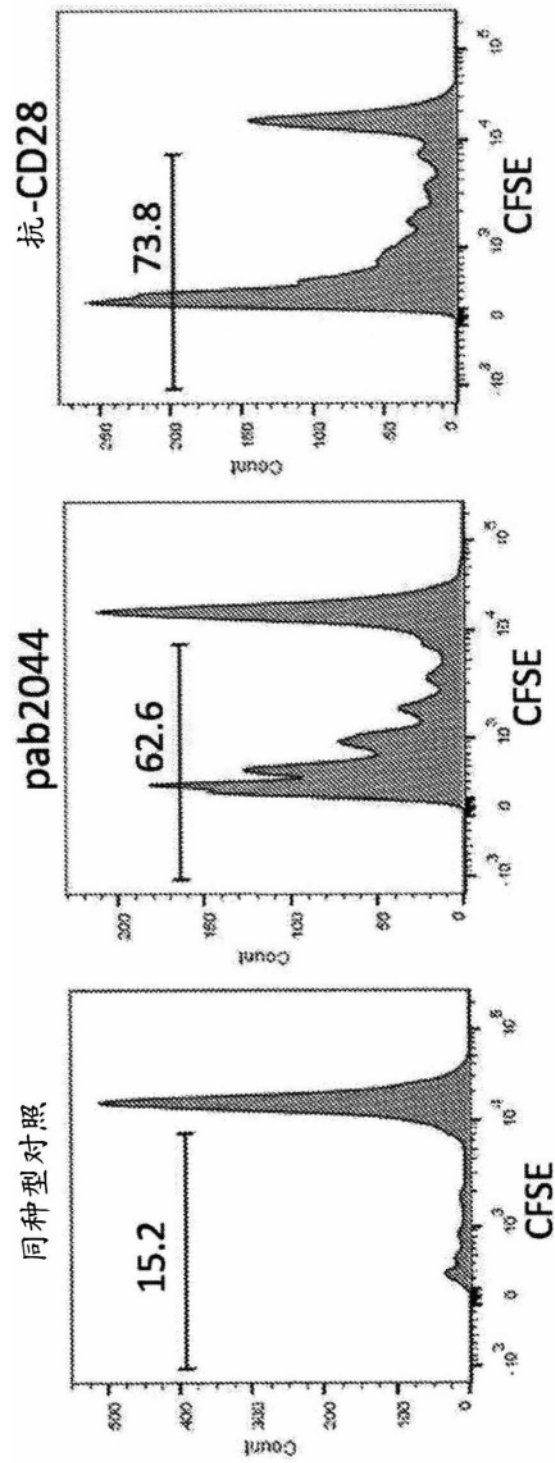


图2B

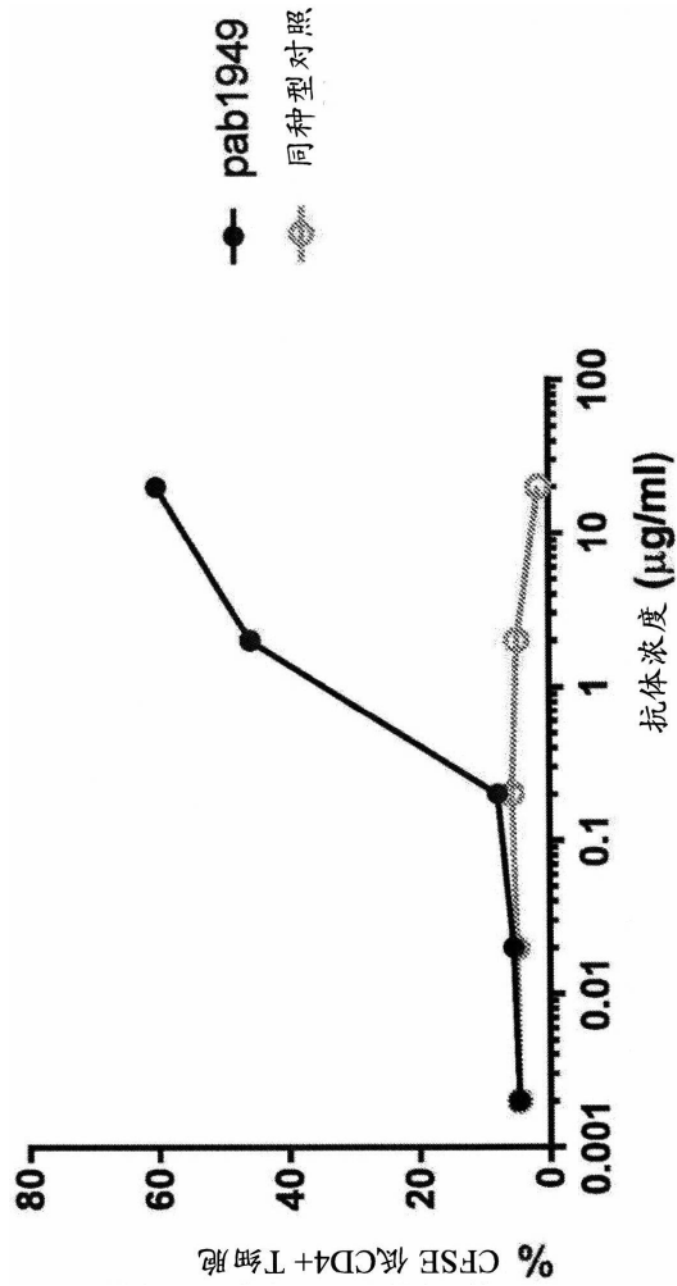


图2C

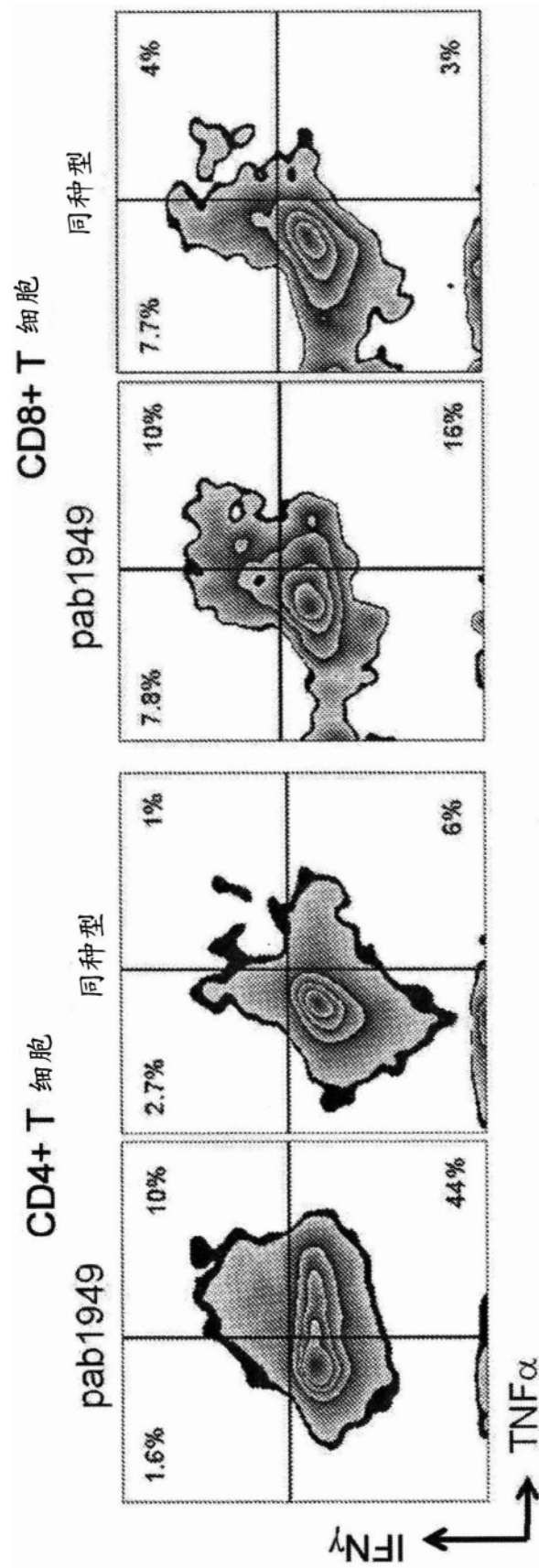


图3A

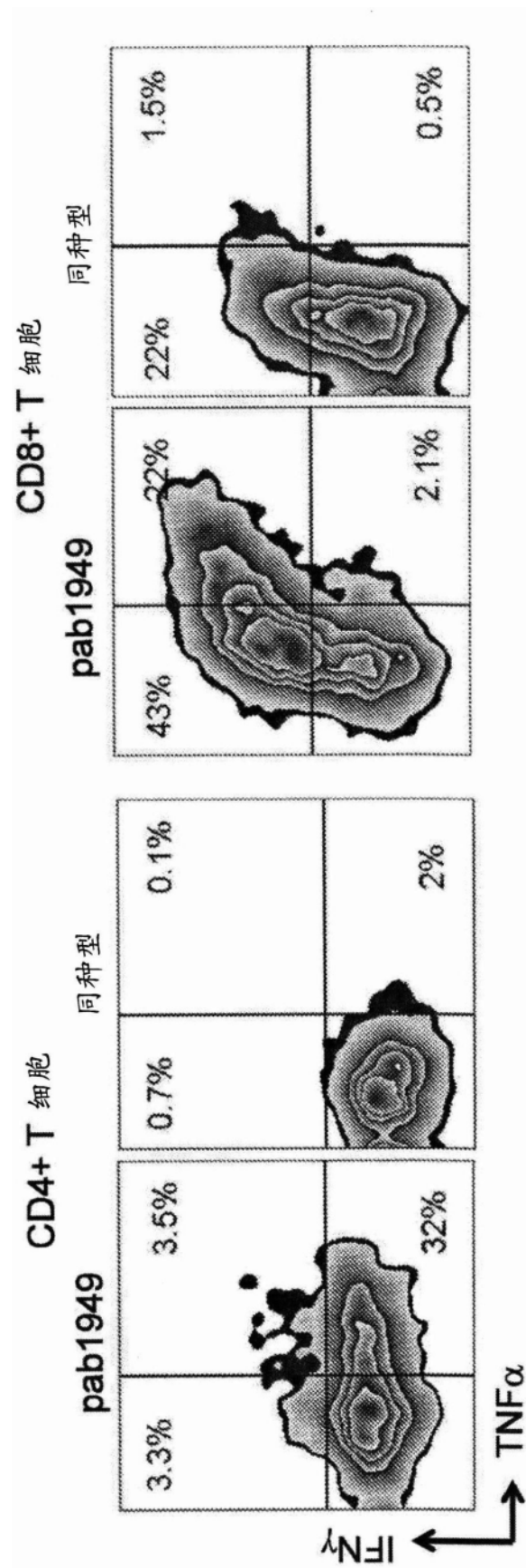


图3B

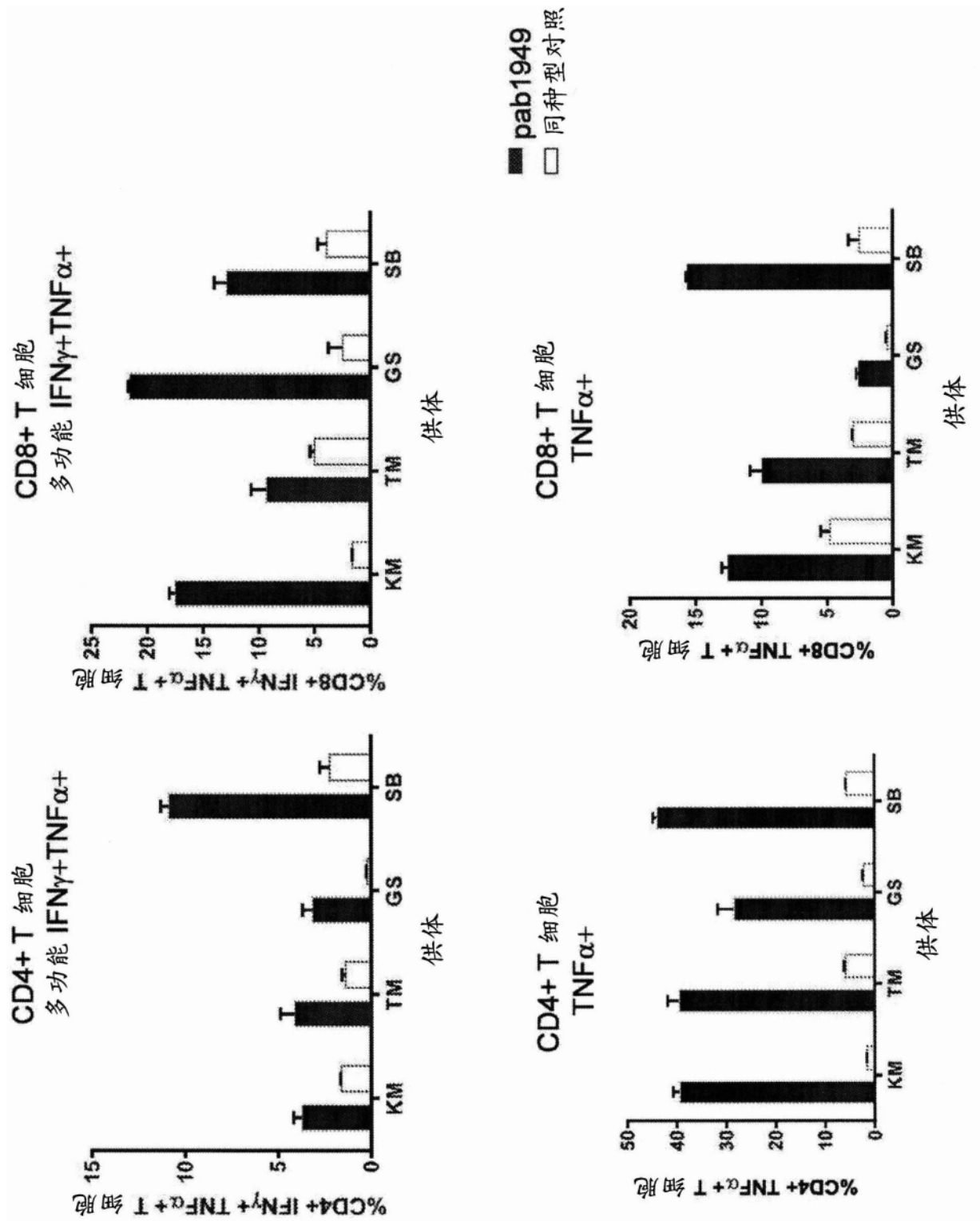


图3C

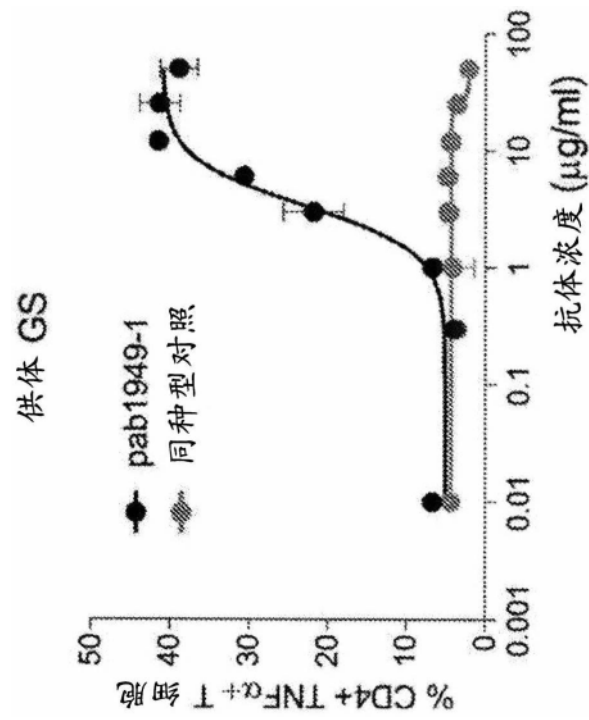


图3D

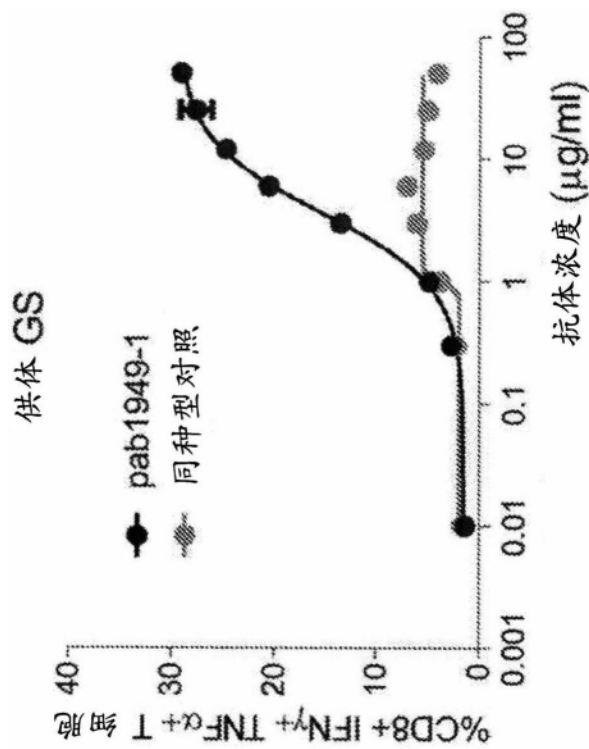


图3E

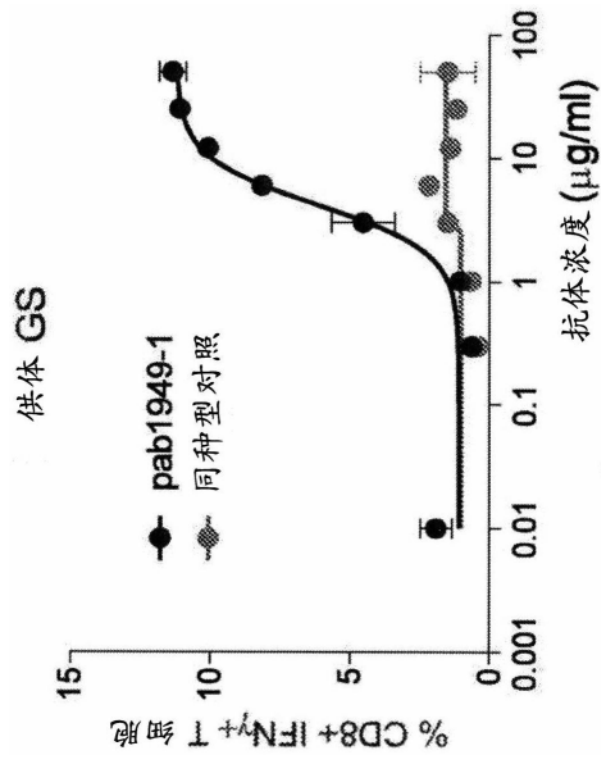


图3F

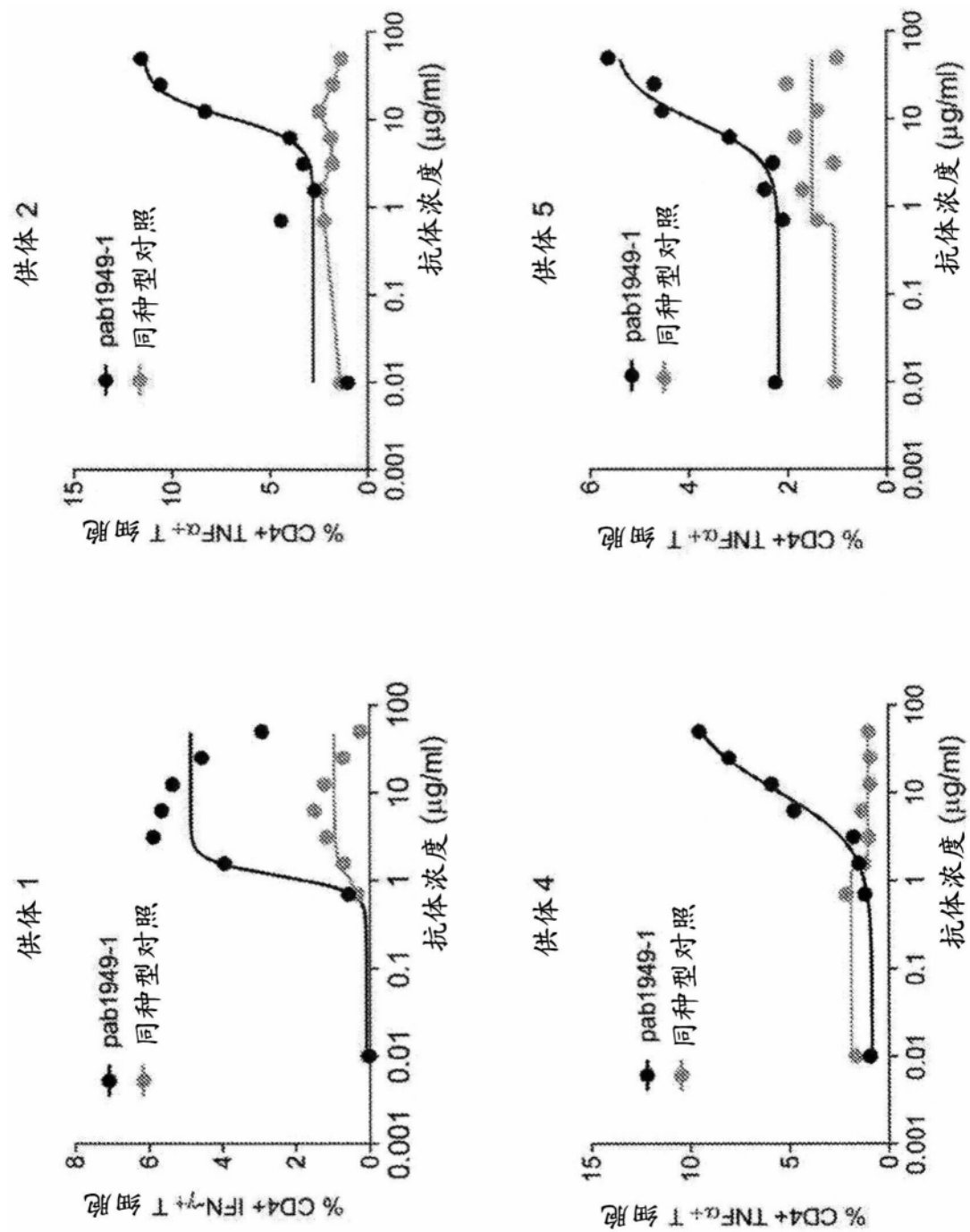


图4A

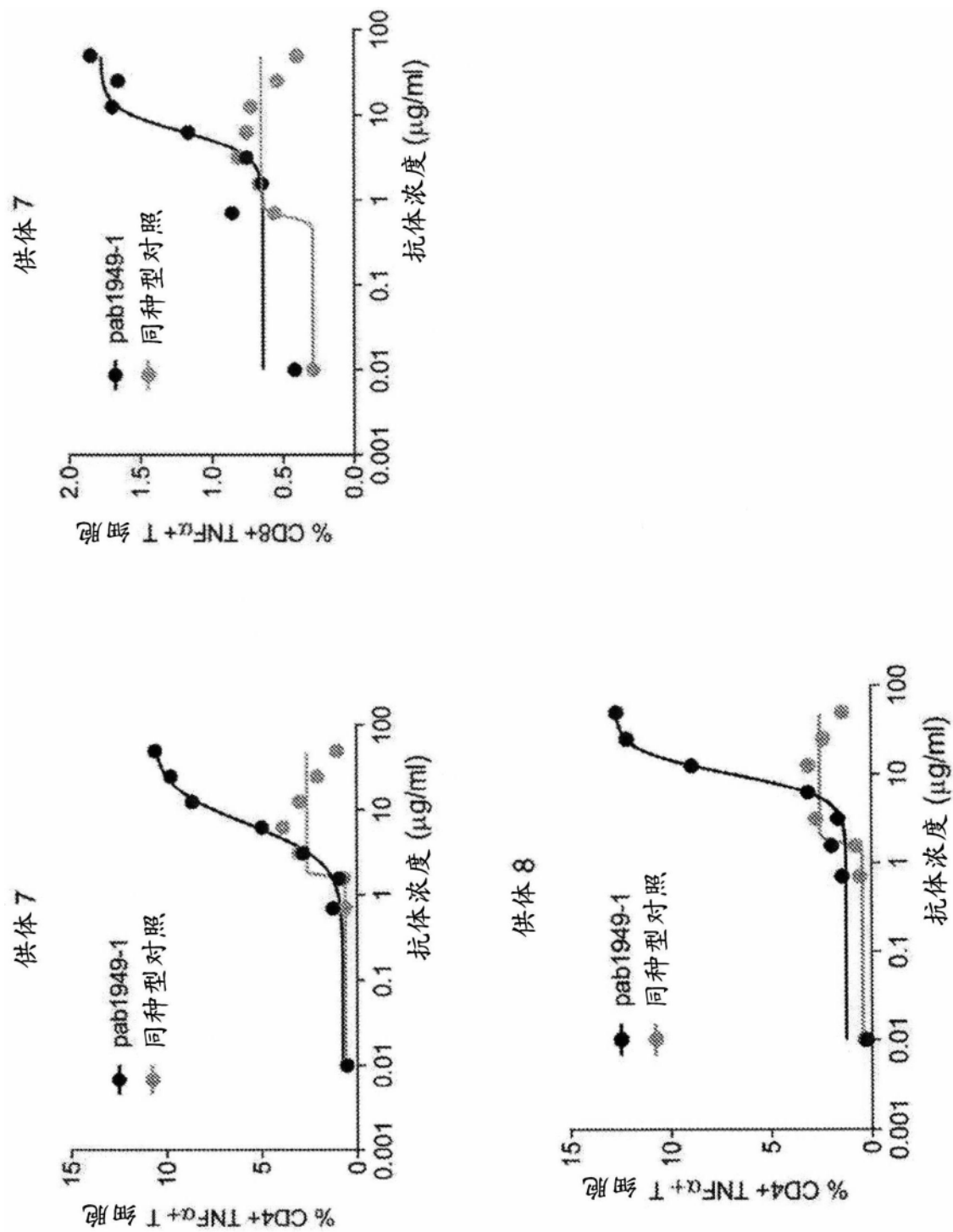


图4B

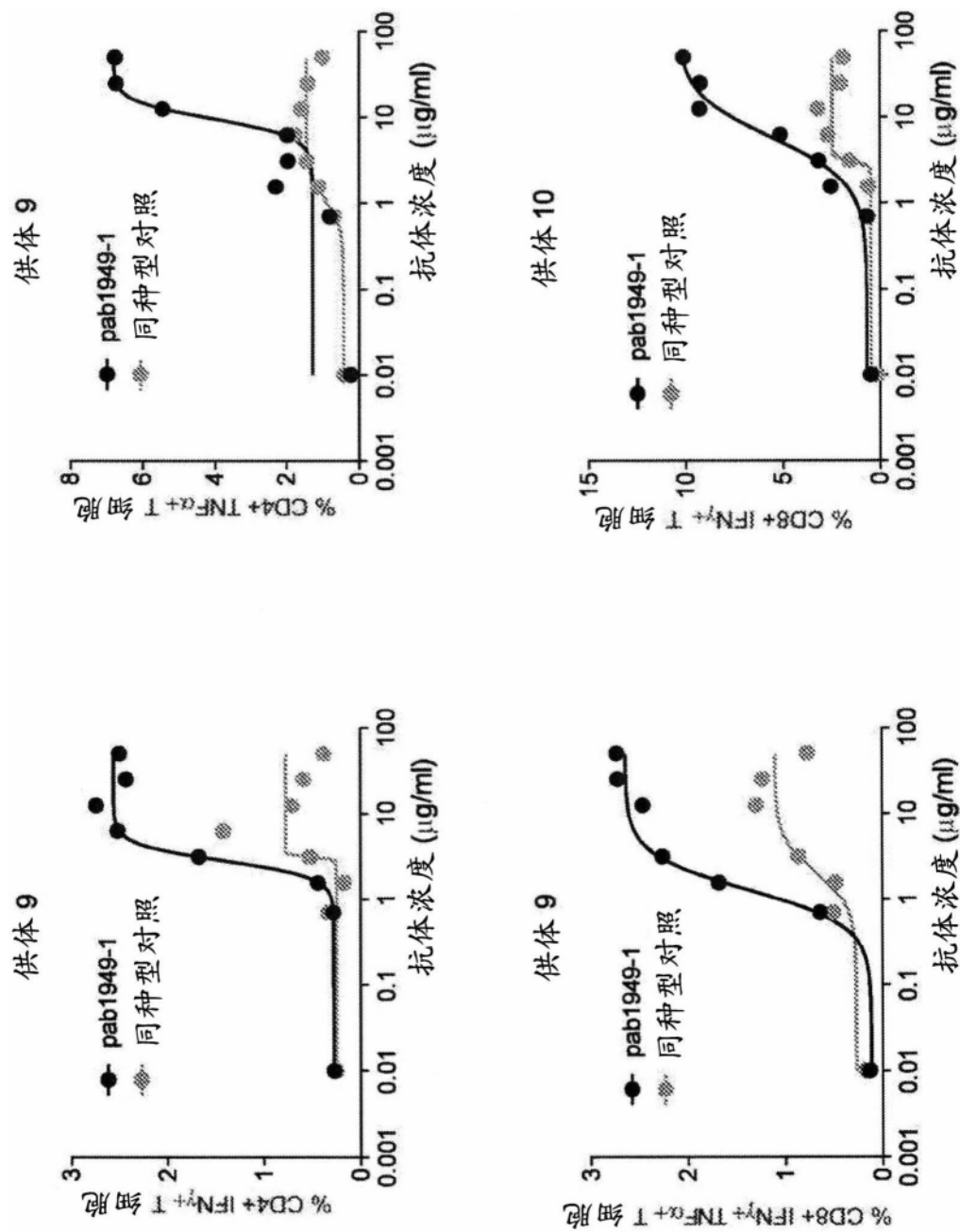


图4C

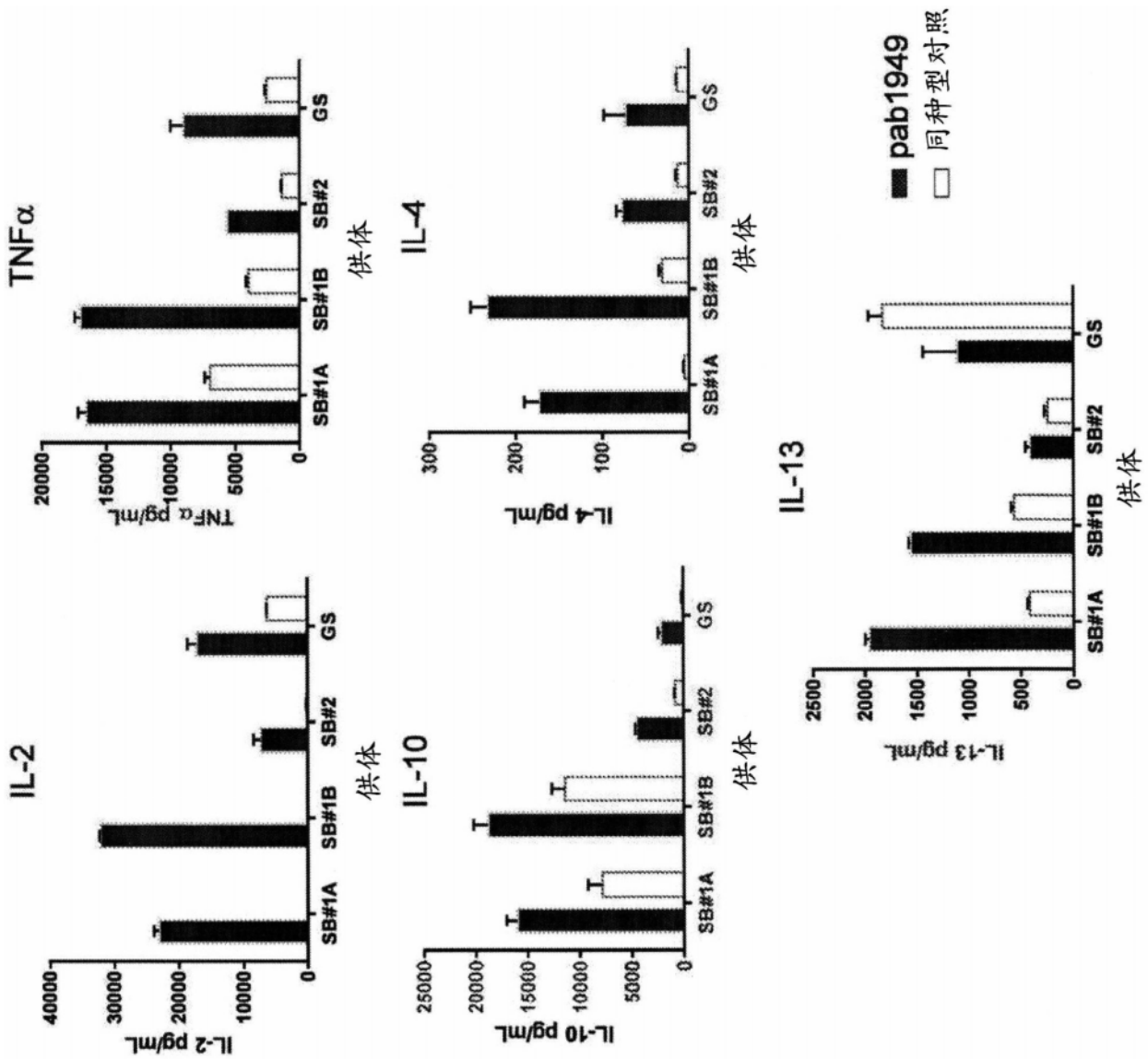


图5A

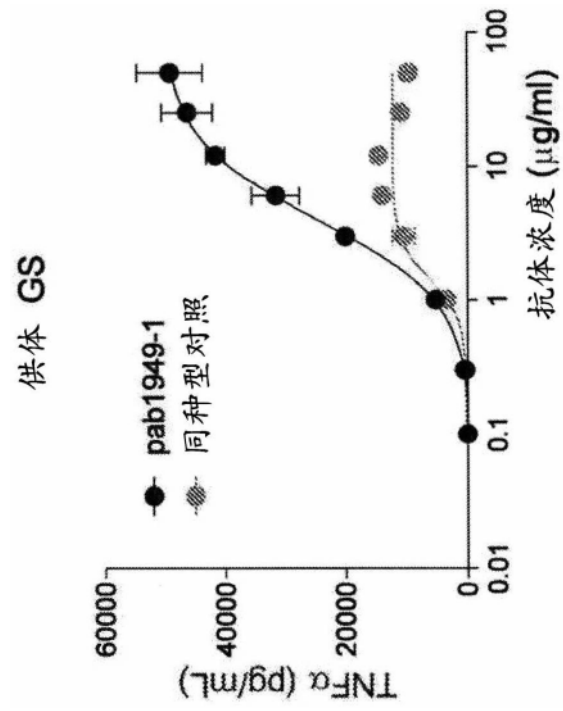


图5B

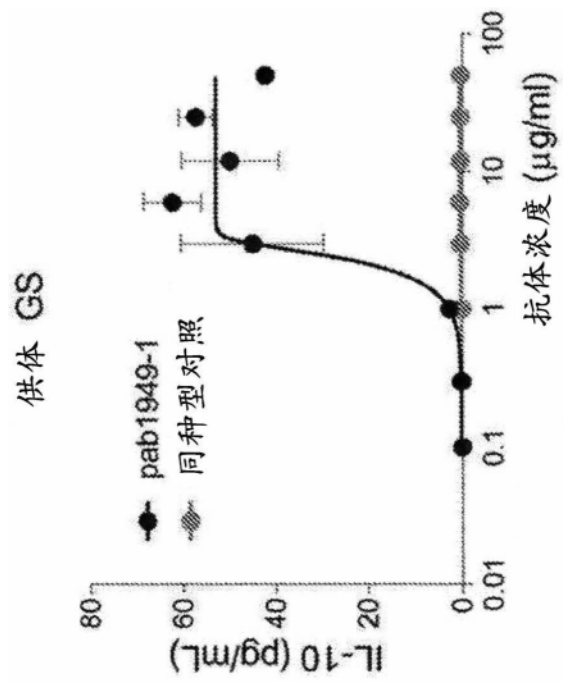


图5C

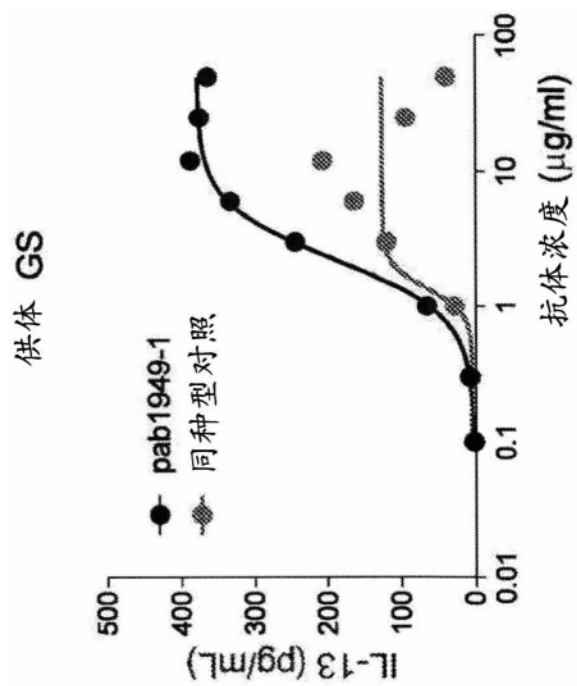


图5D

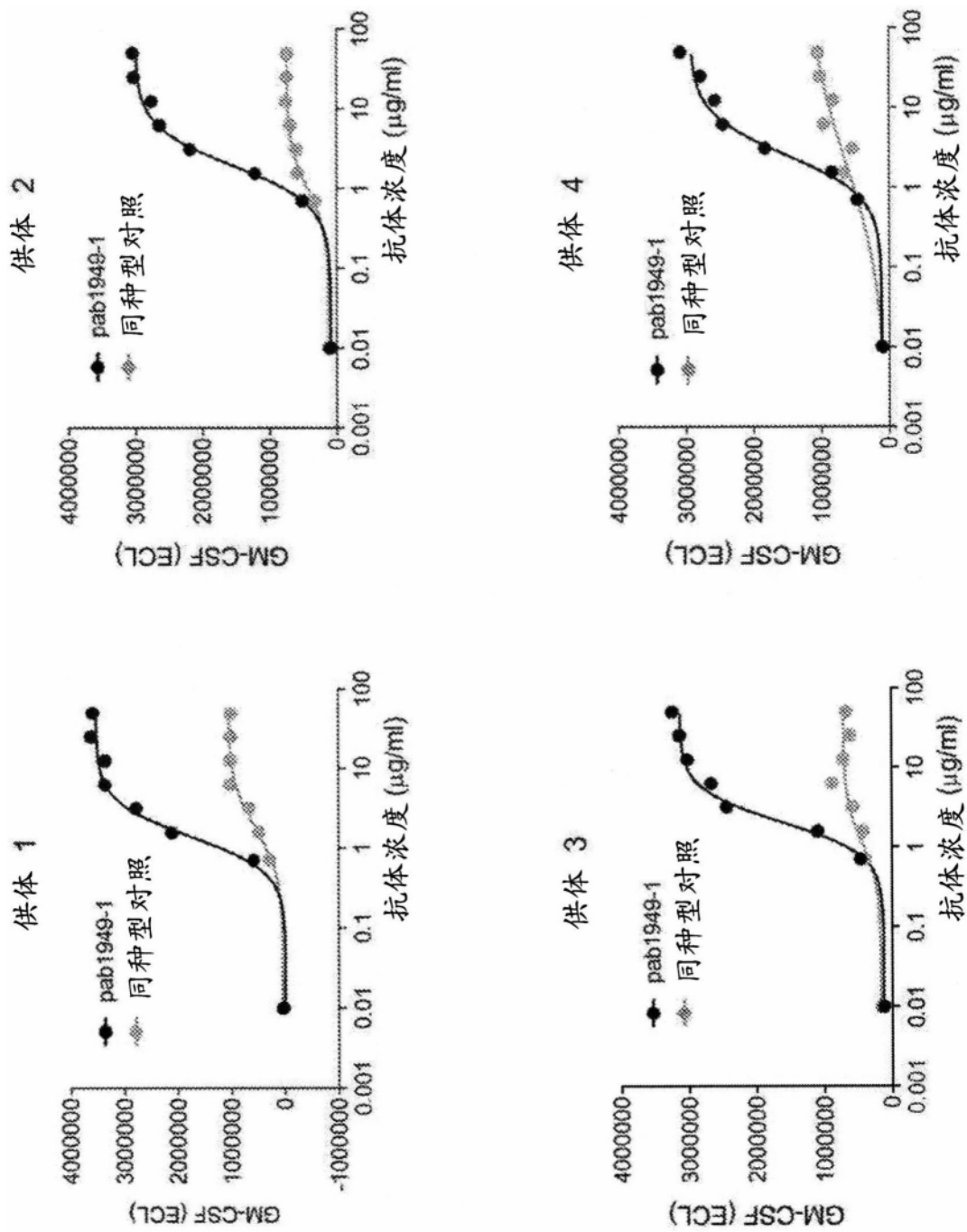


图6A

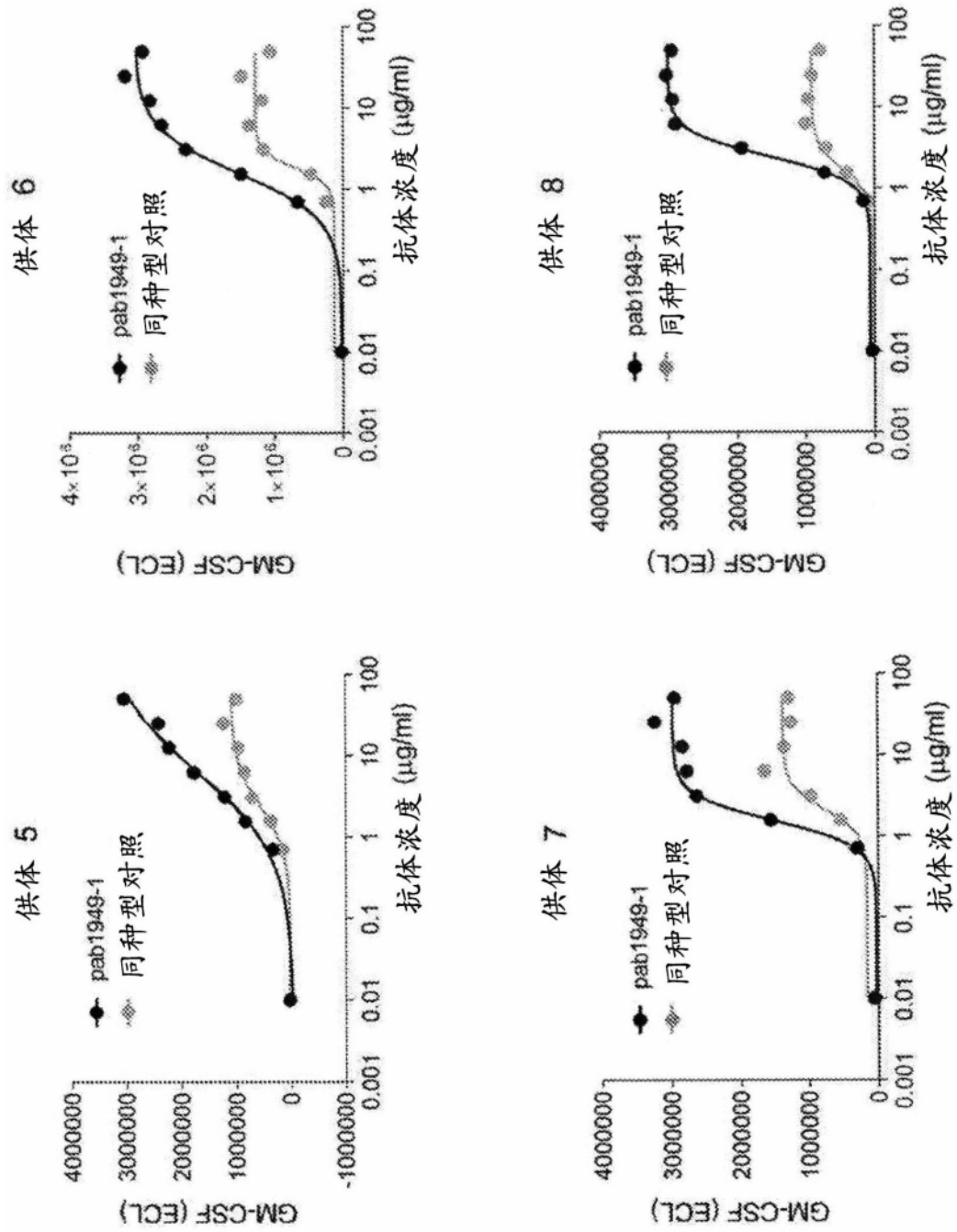


图6B

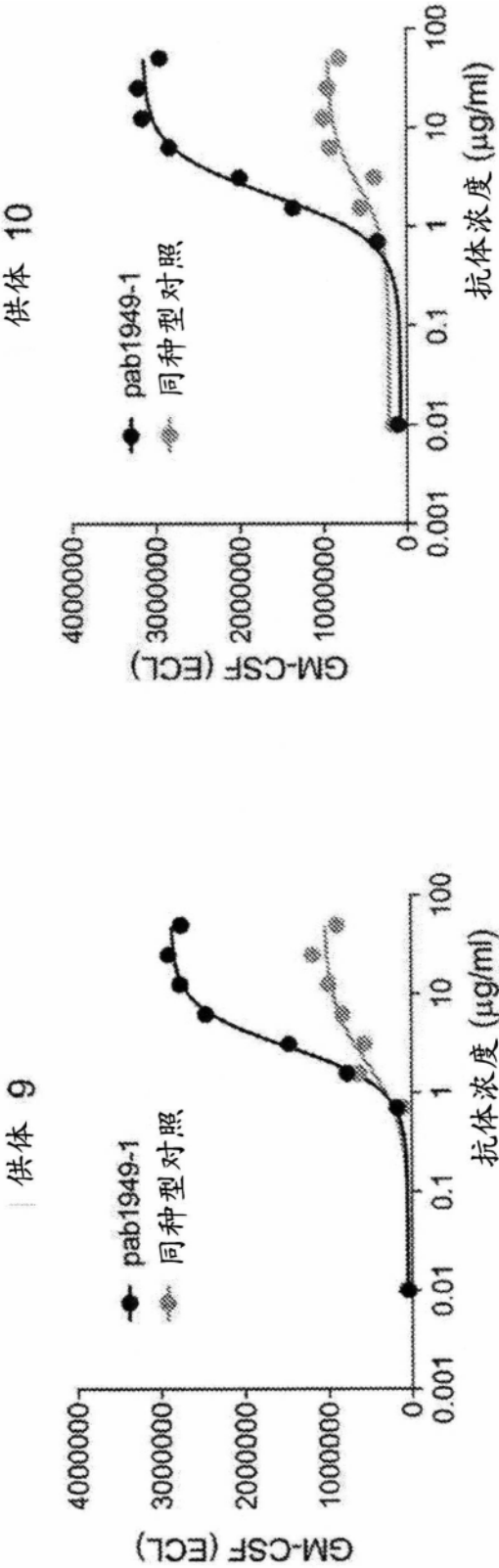


图6C

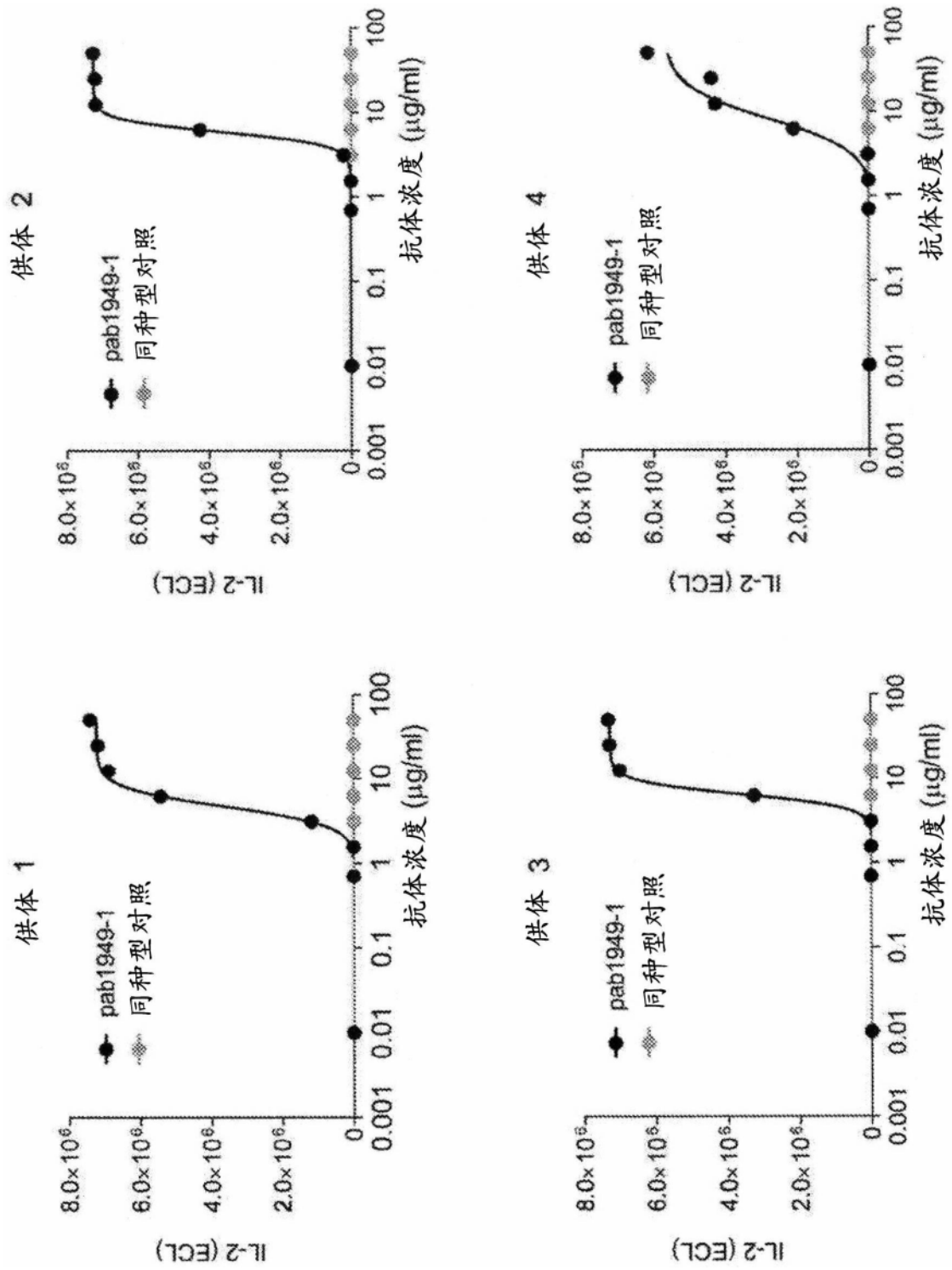


图7A

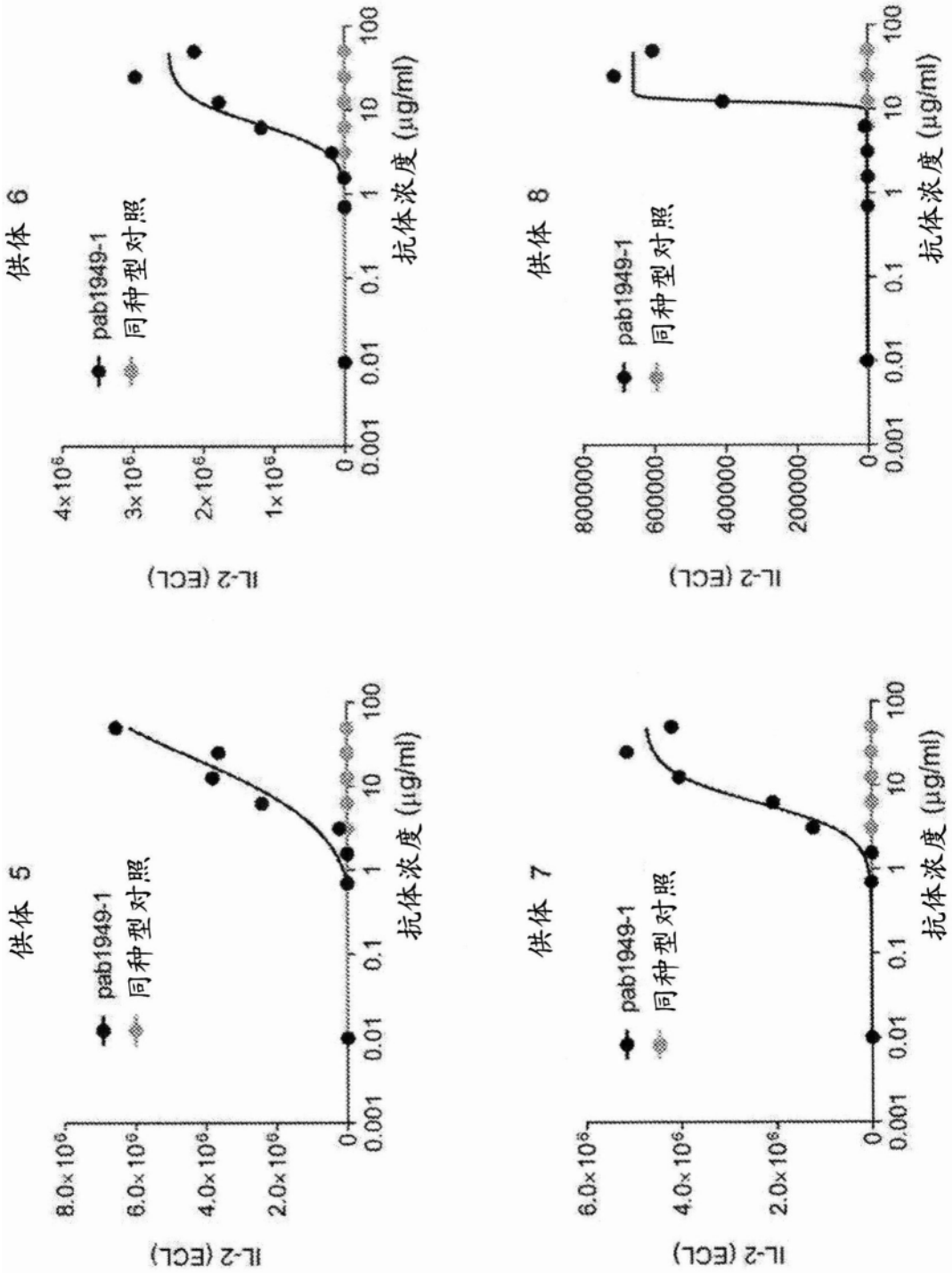


图7B

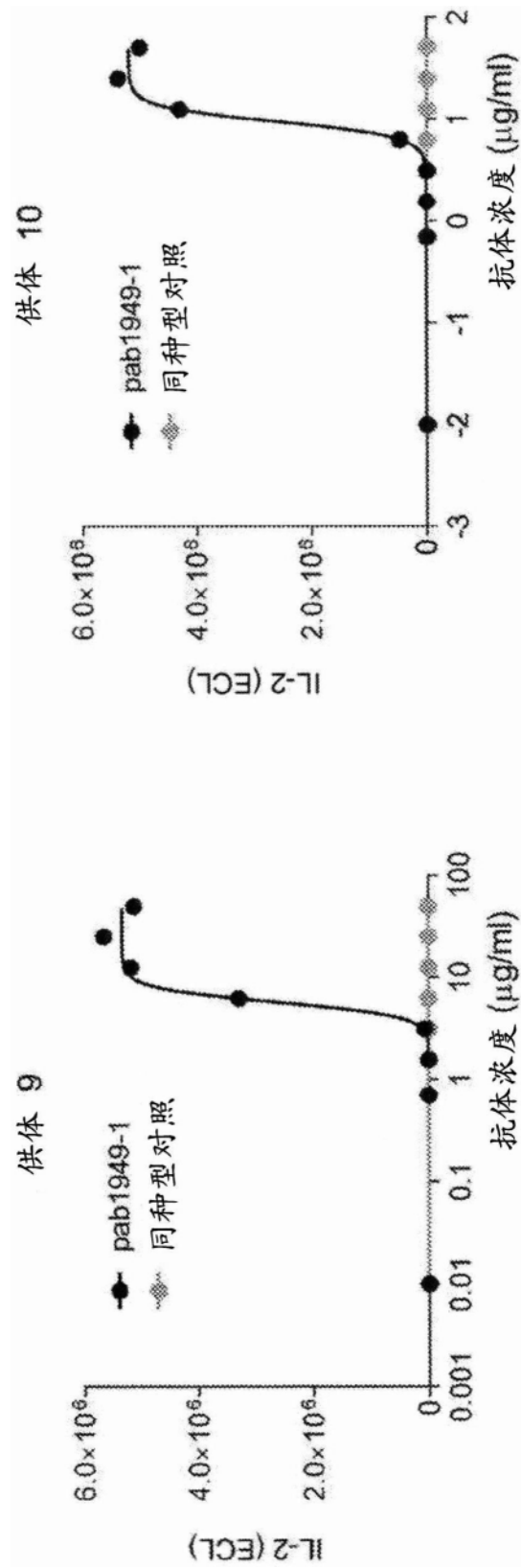


图7C

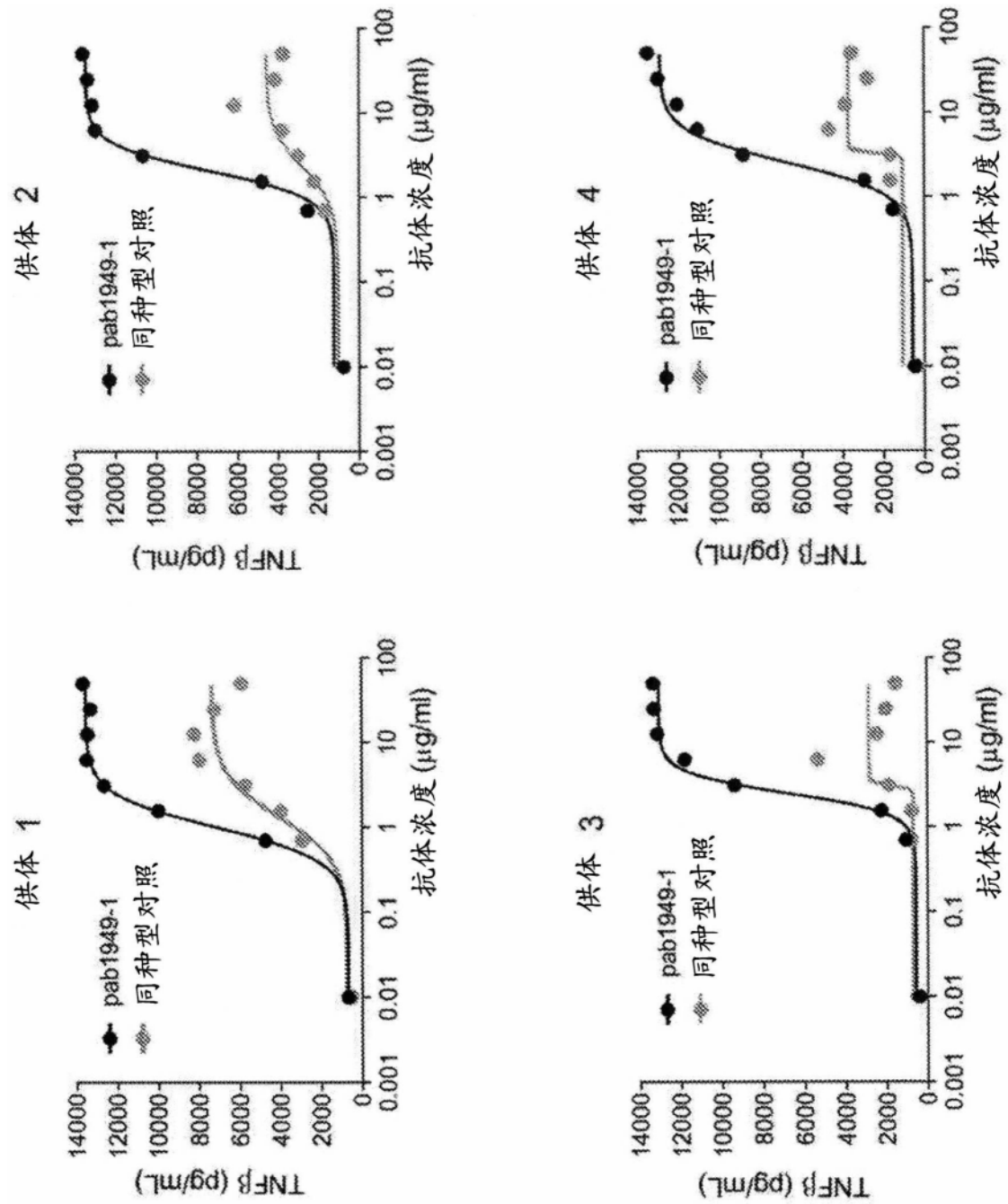


图8A

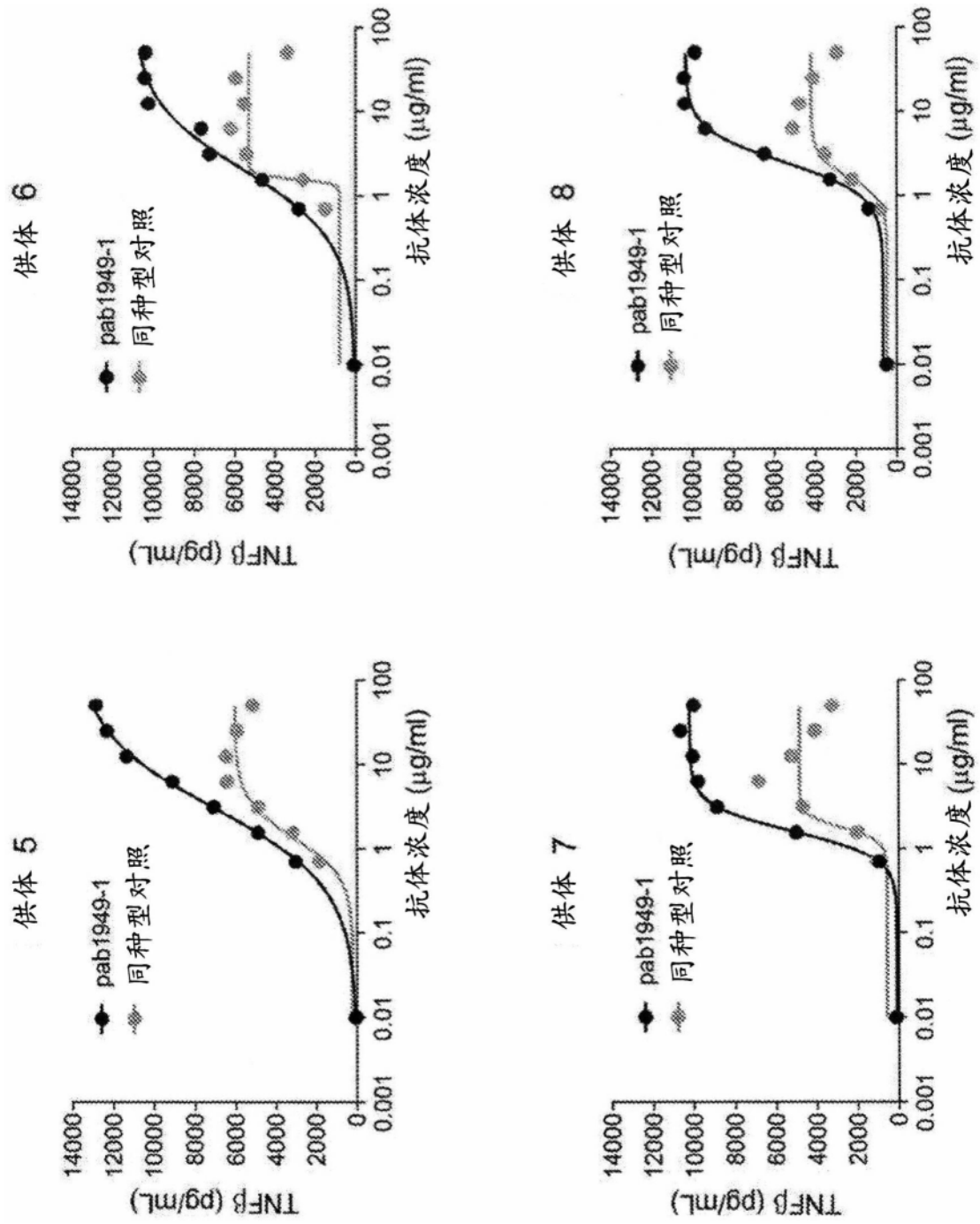


图8B

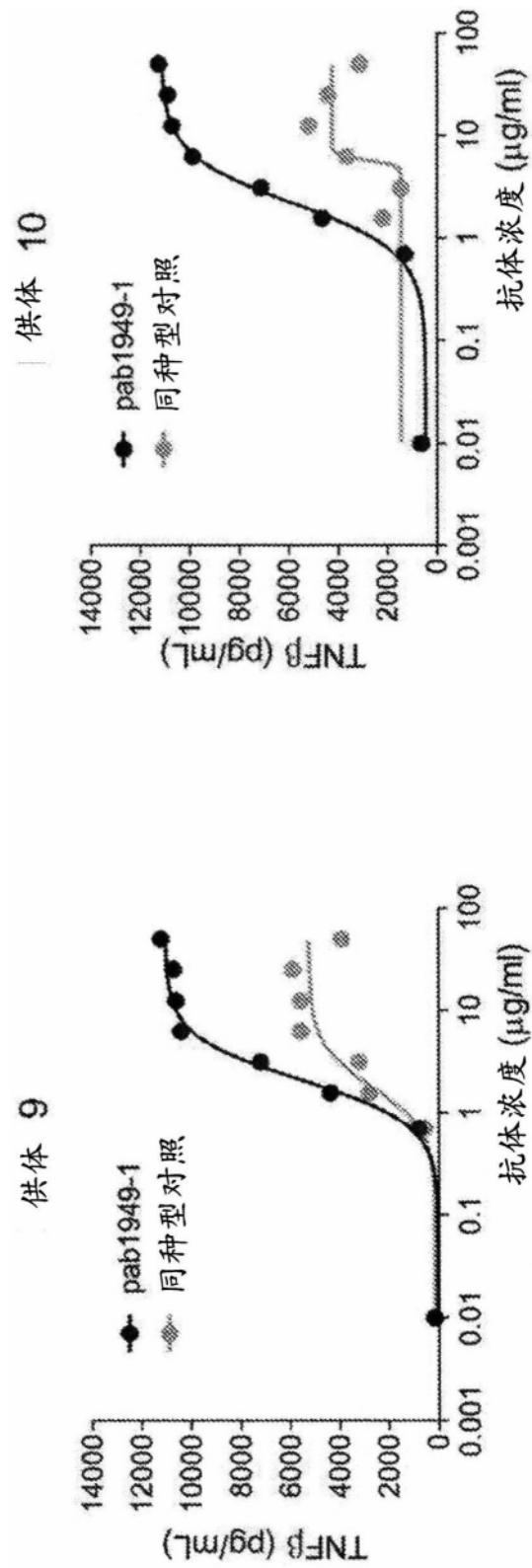


图8C

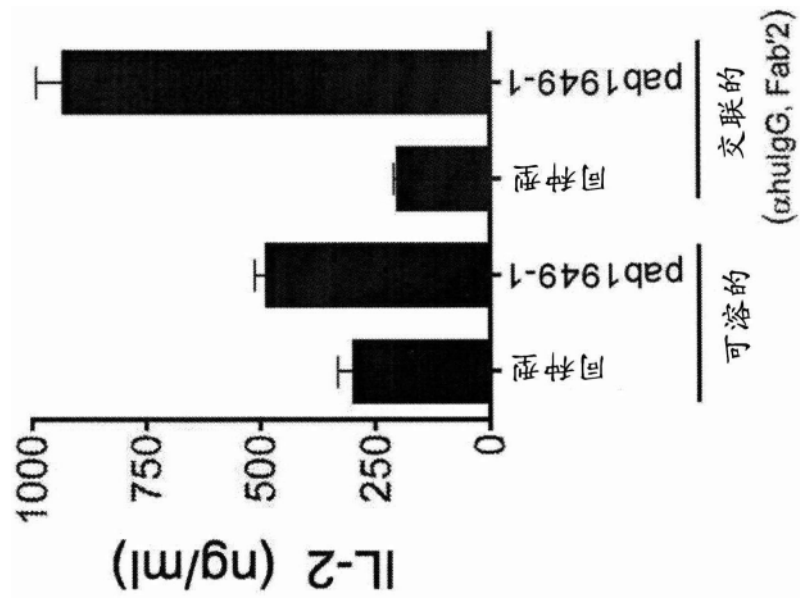


图9A

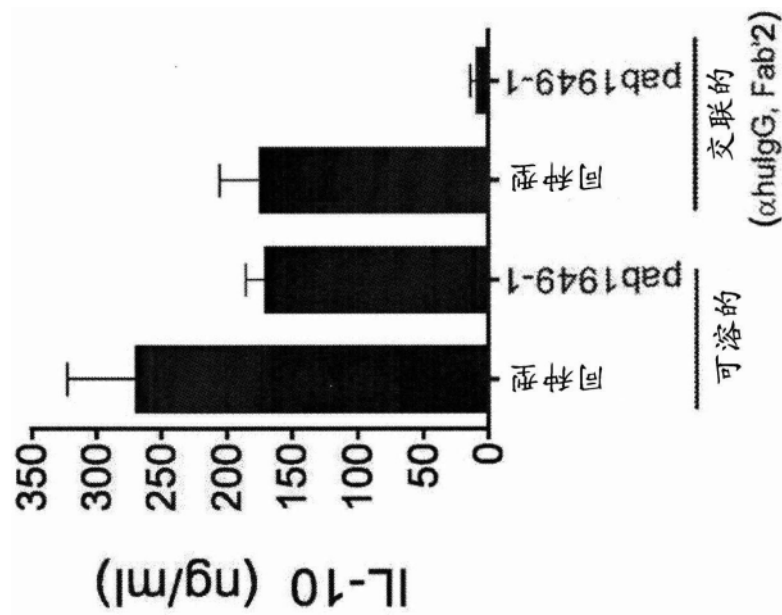


图9B

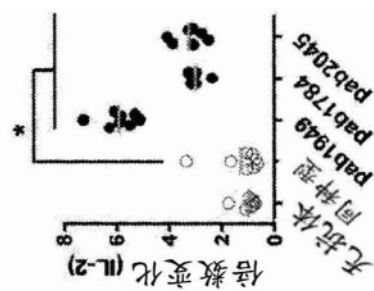


图10A

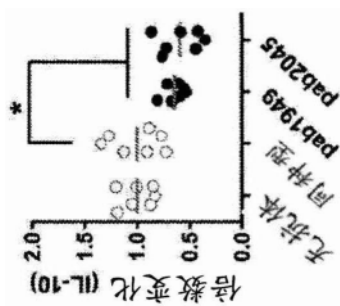


图10B

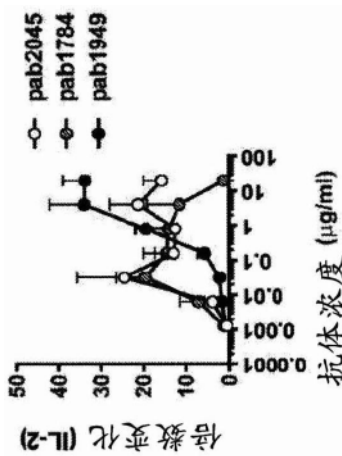


图10C

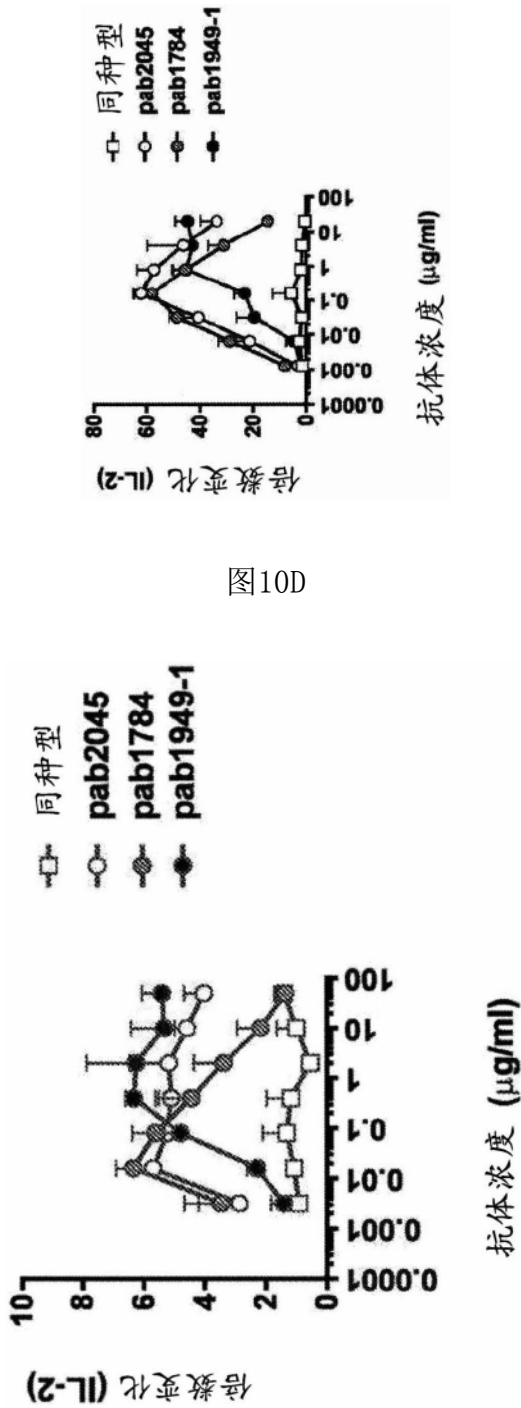


图10D

图10E

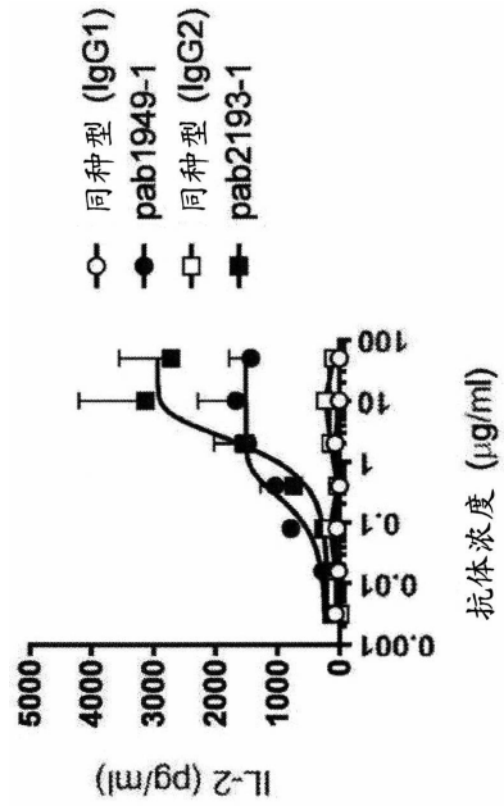


图10F

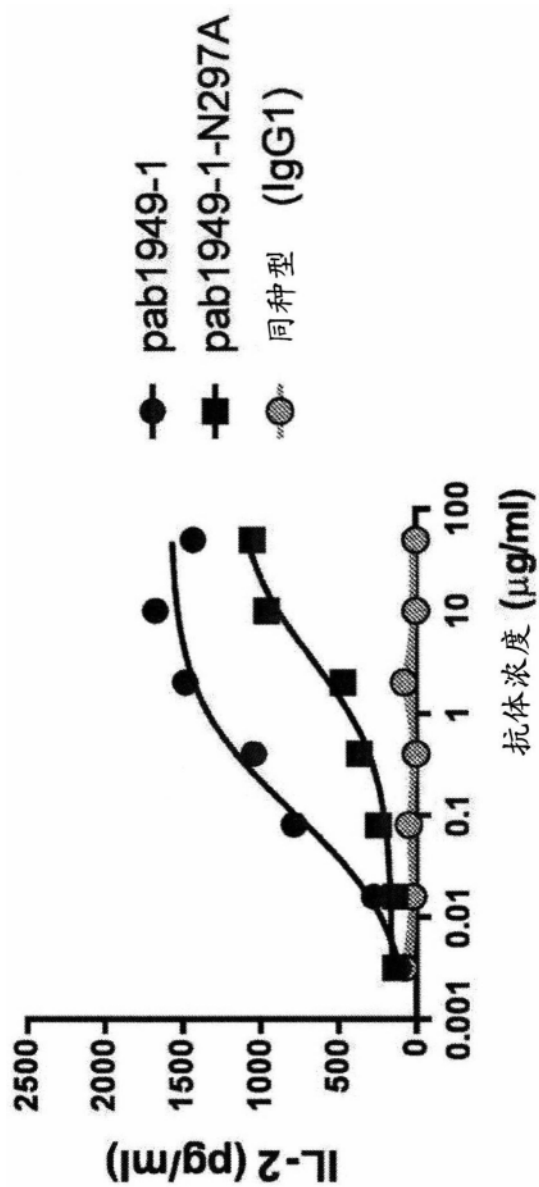


图10G

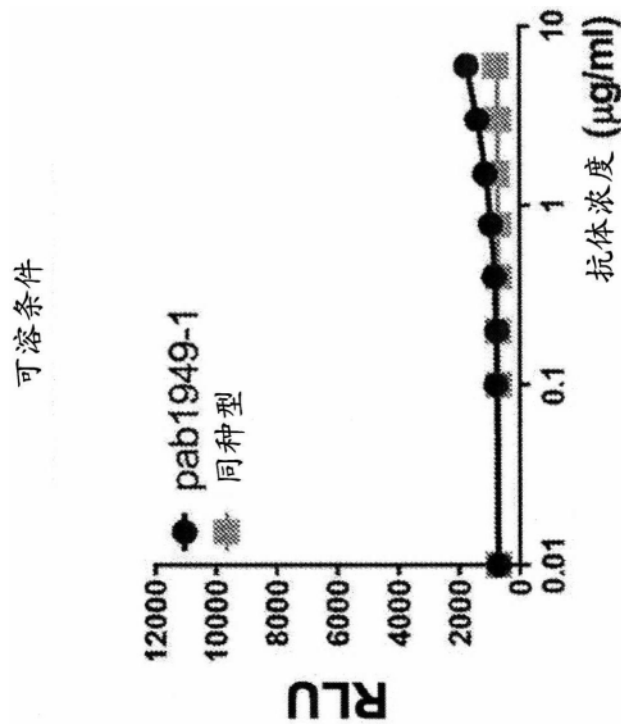


图11A

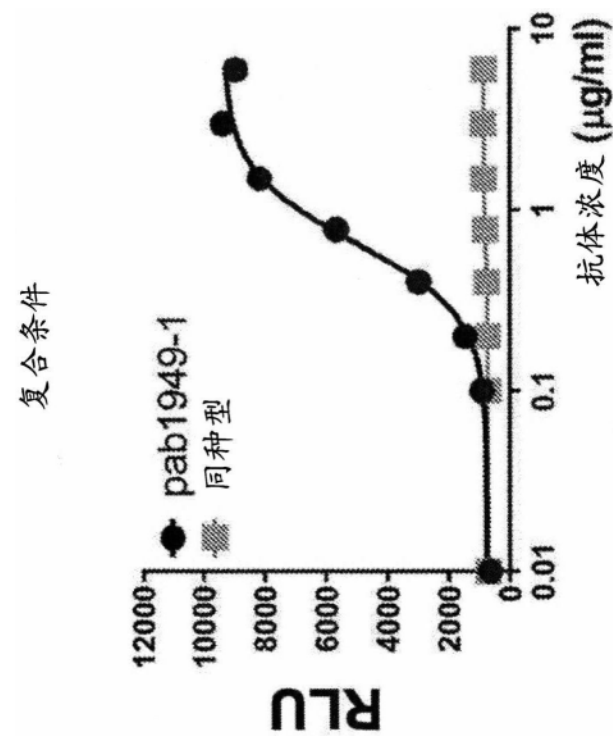


图11B

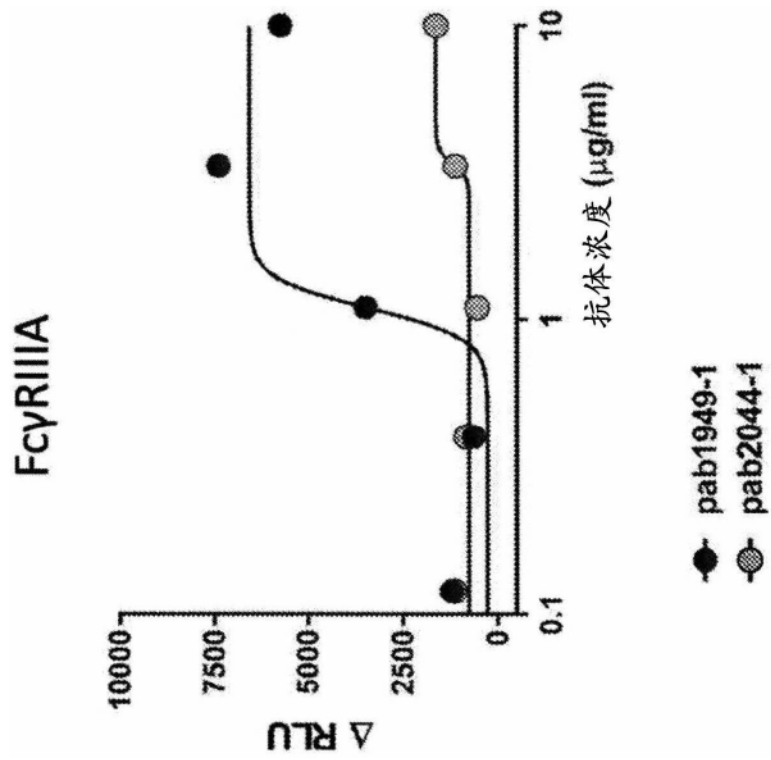


图12A

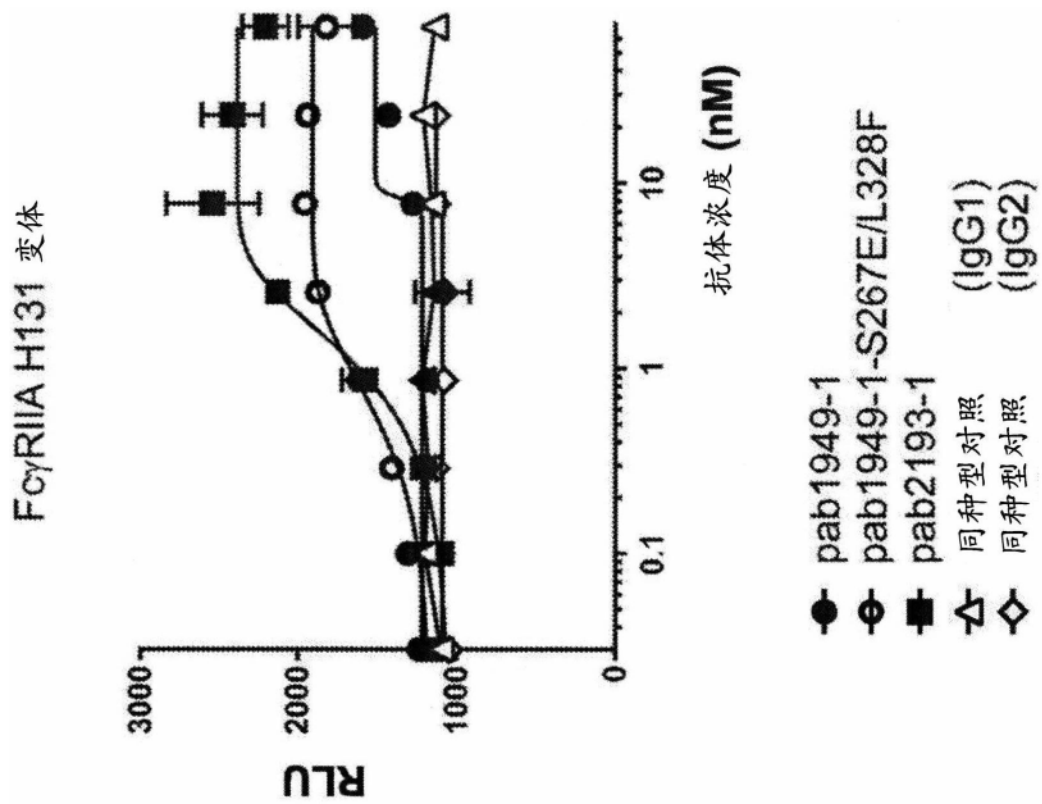


图12B

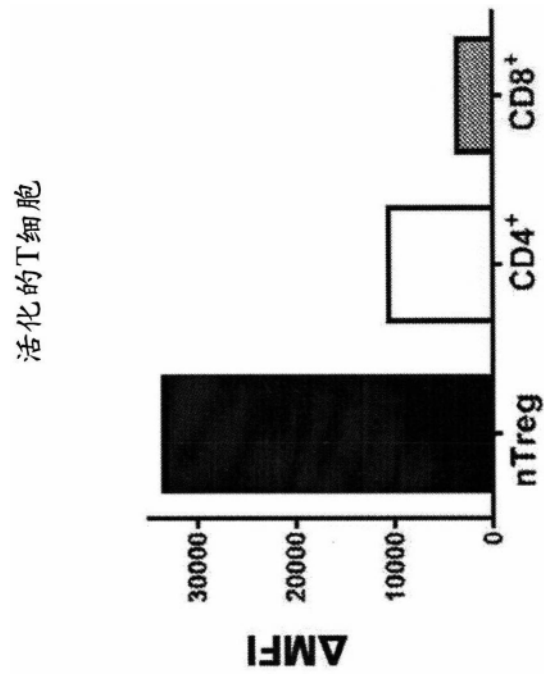


图13A

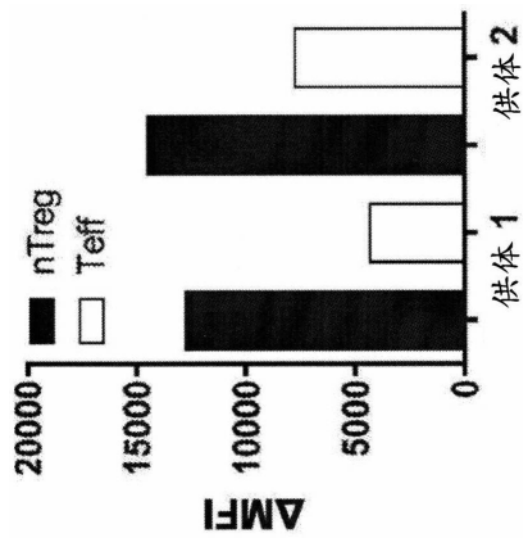


图13B

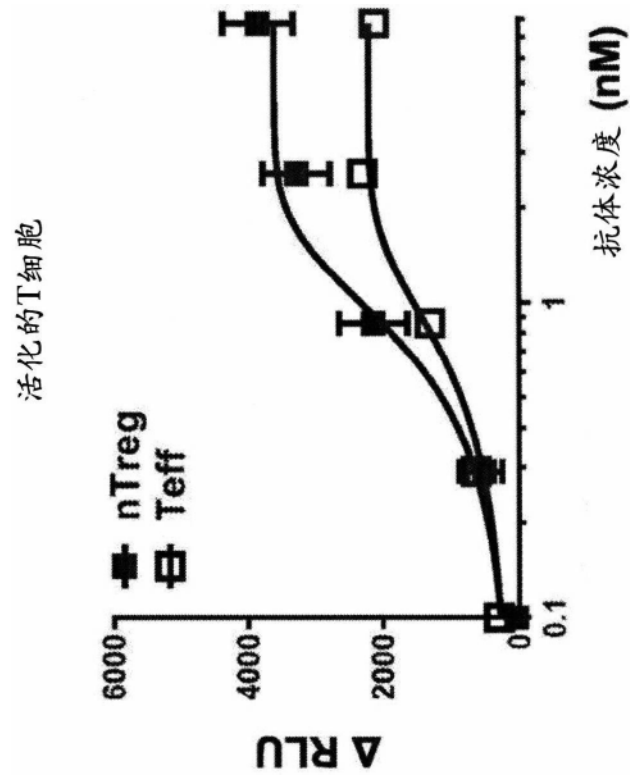


图13C

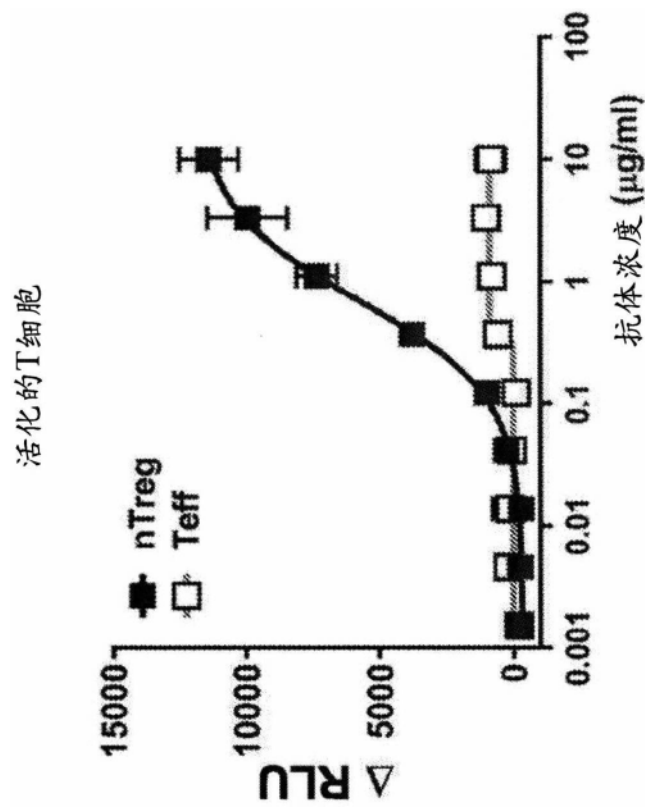


图13D

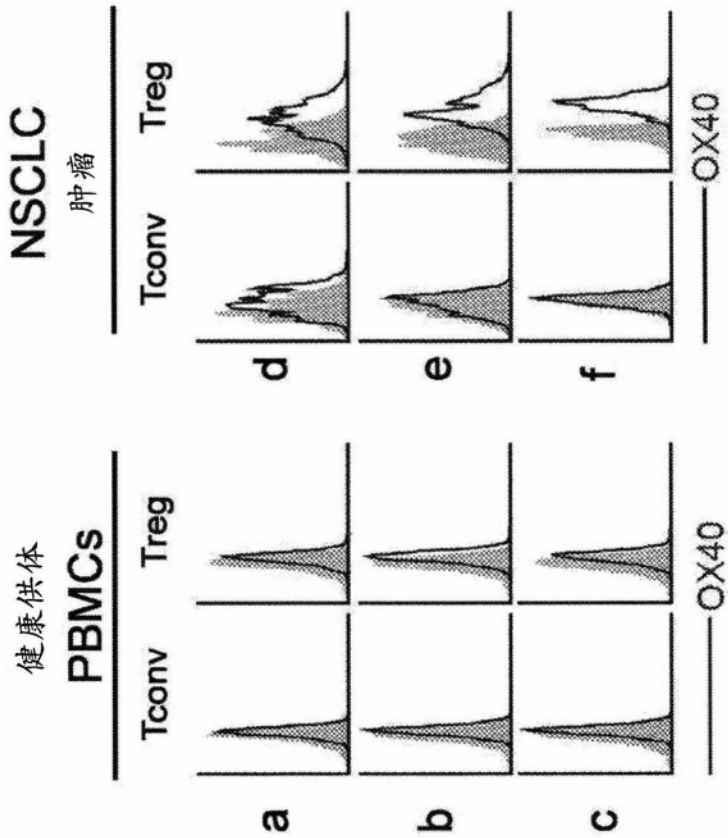


图14A

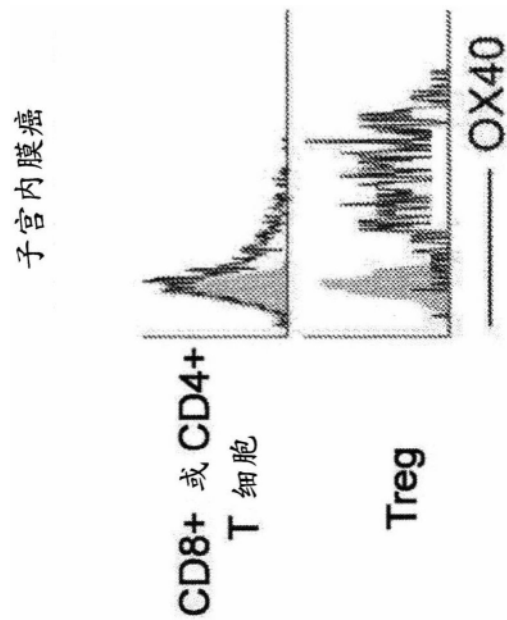


图14B

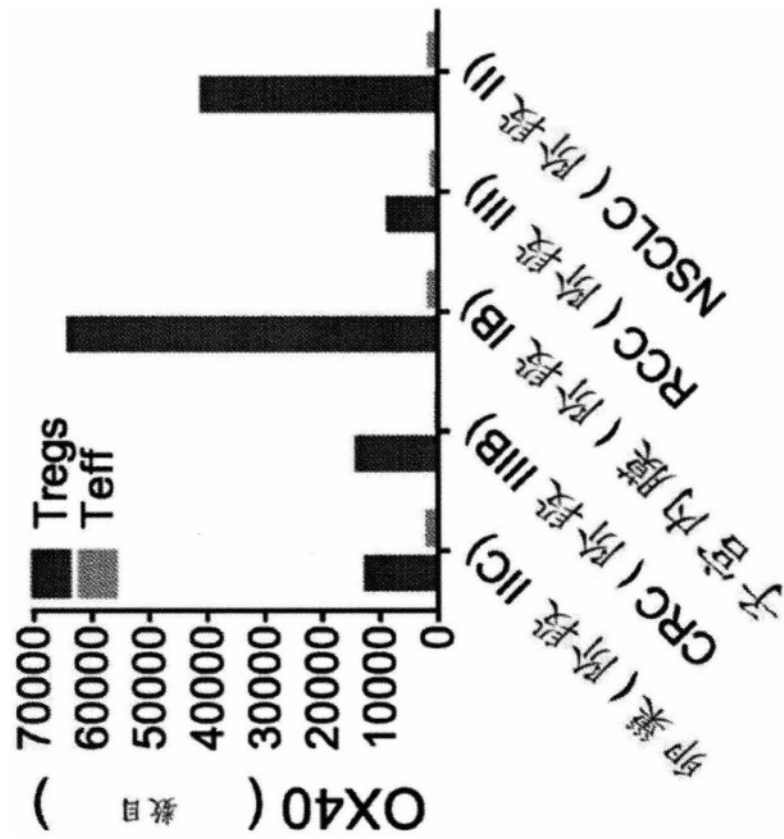


图14C

指示	样本 (n)	CD4 ⁺ 细胞	调节性T细胞
NSCLC	4	+/-	+++
子宫内膜	2	+/-	+++
结肠直肠	2	-	+
乳腺	2	-	+
卵巢	1	-	++
肾	1	-	+

图14D

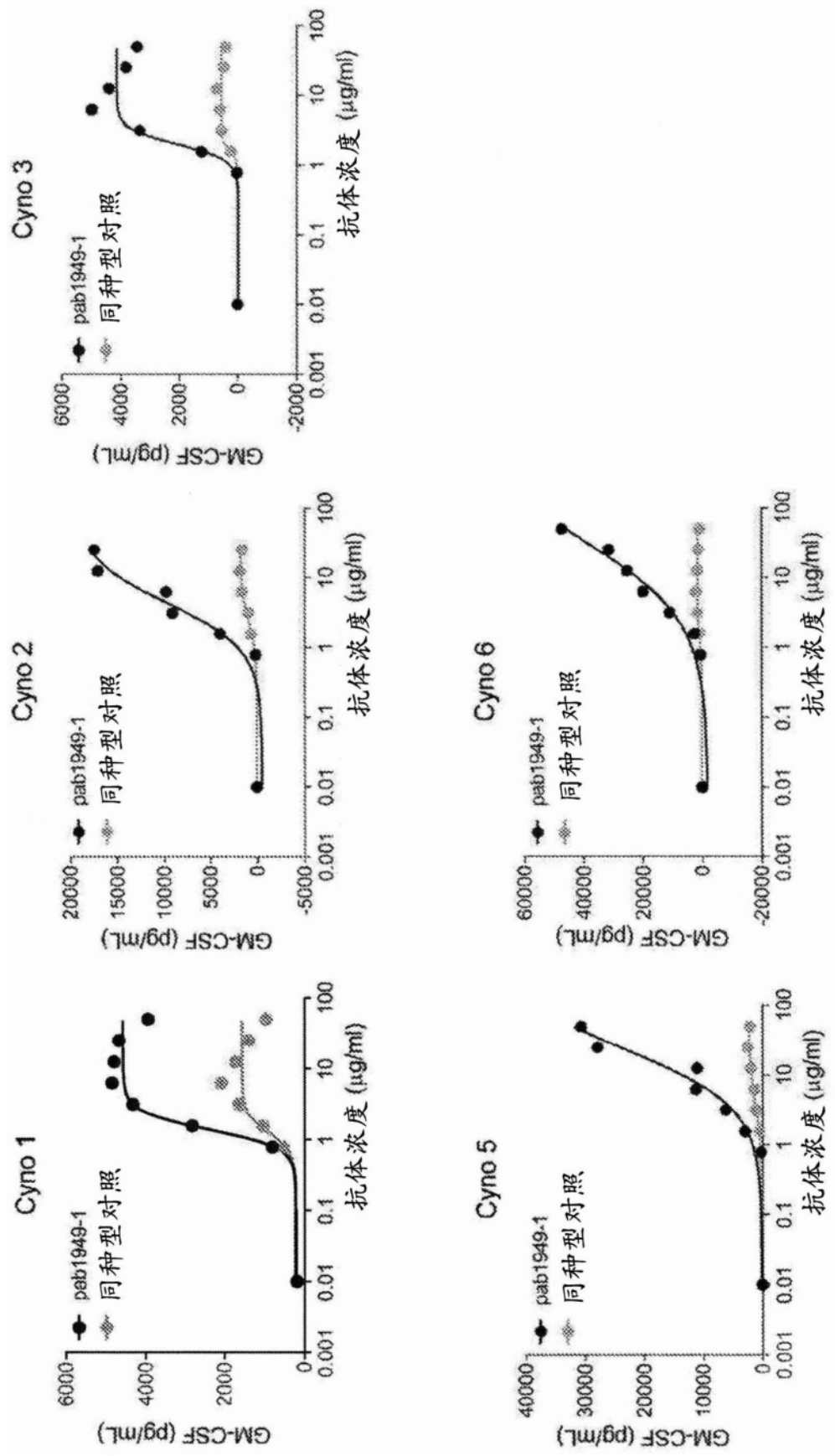


图15A

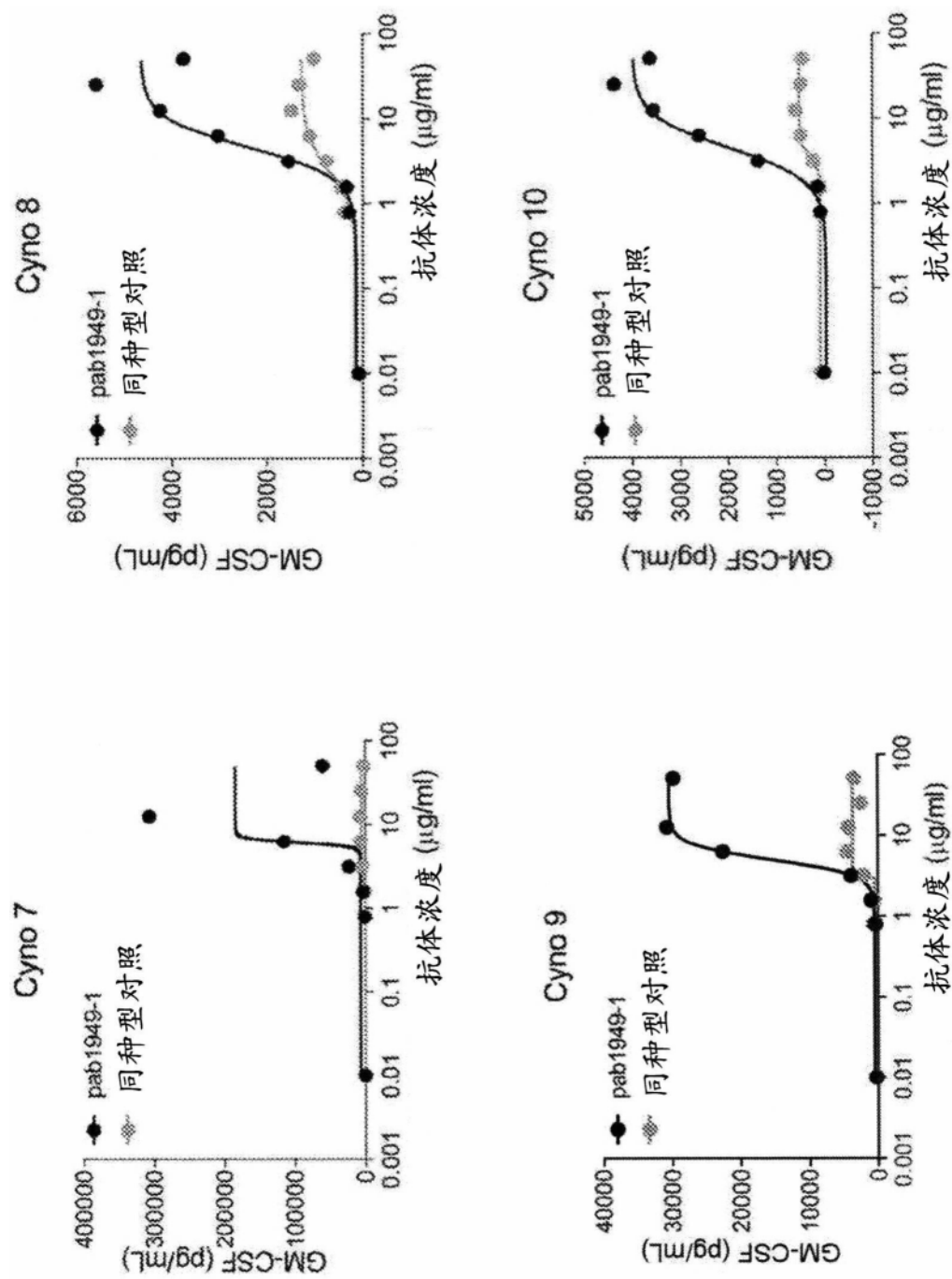


图15B

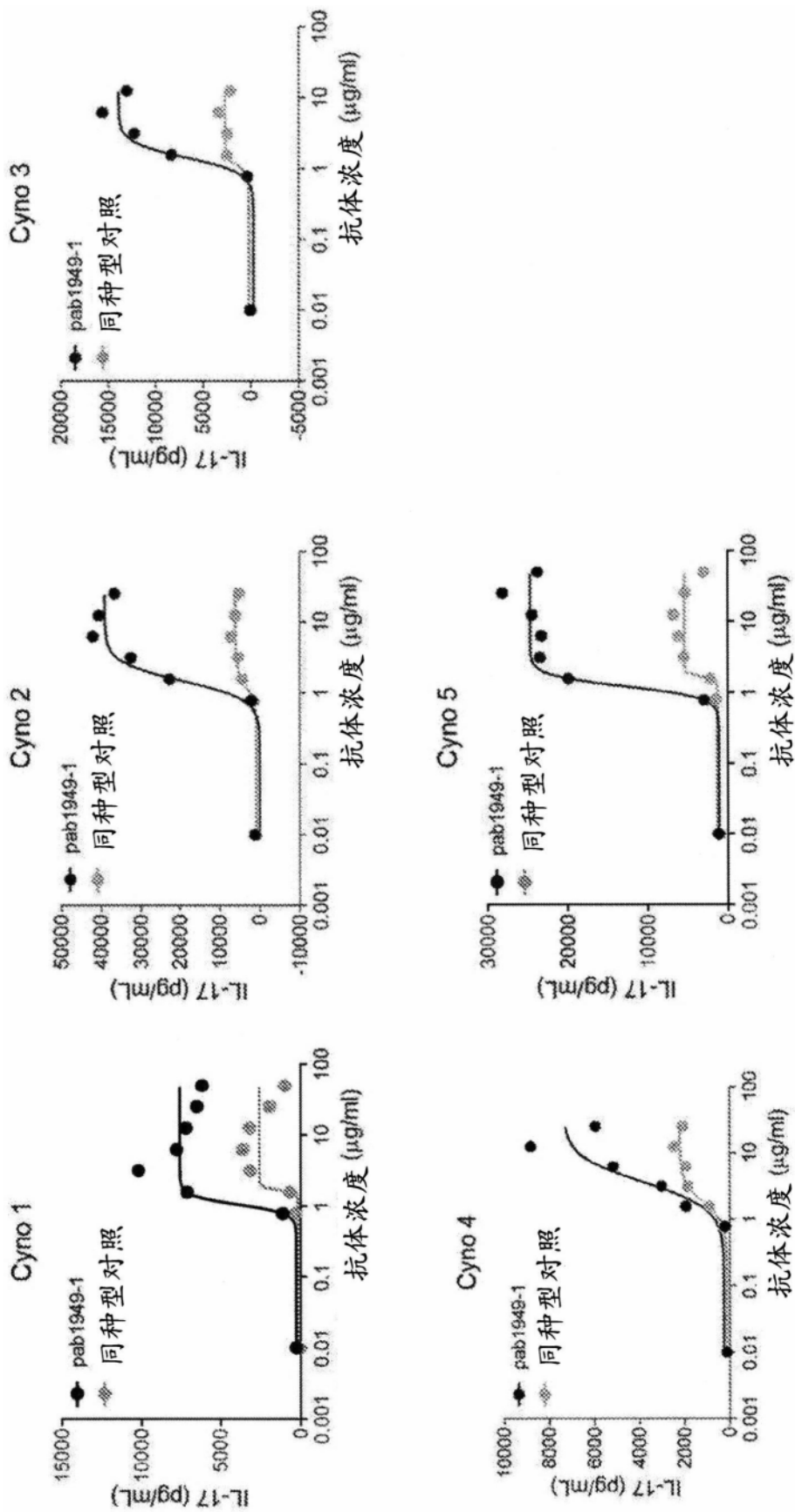


图16A

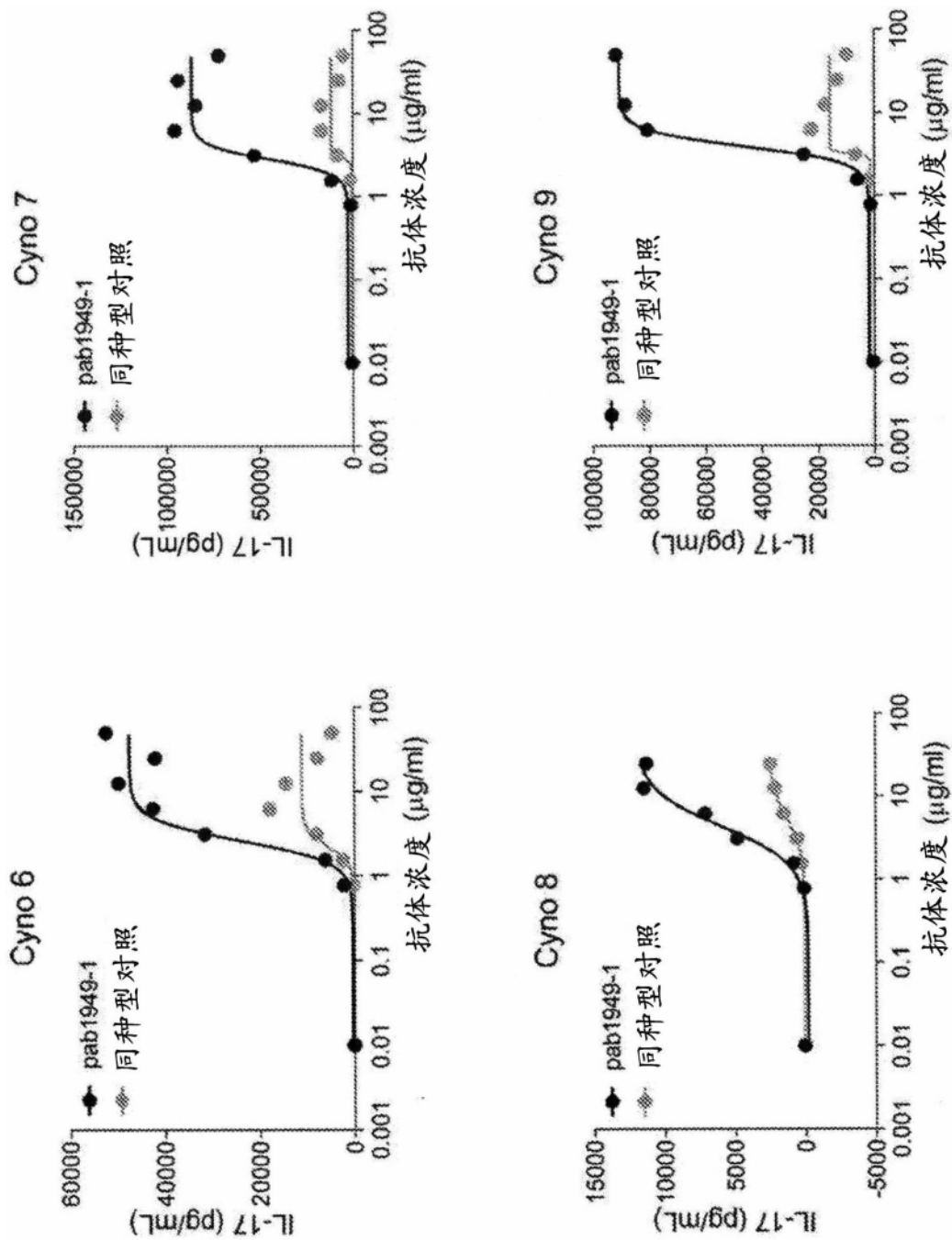


图16B

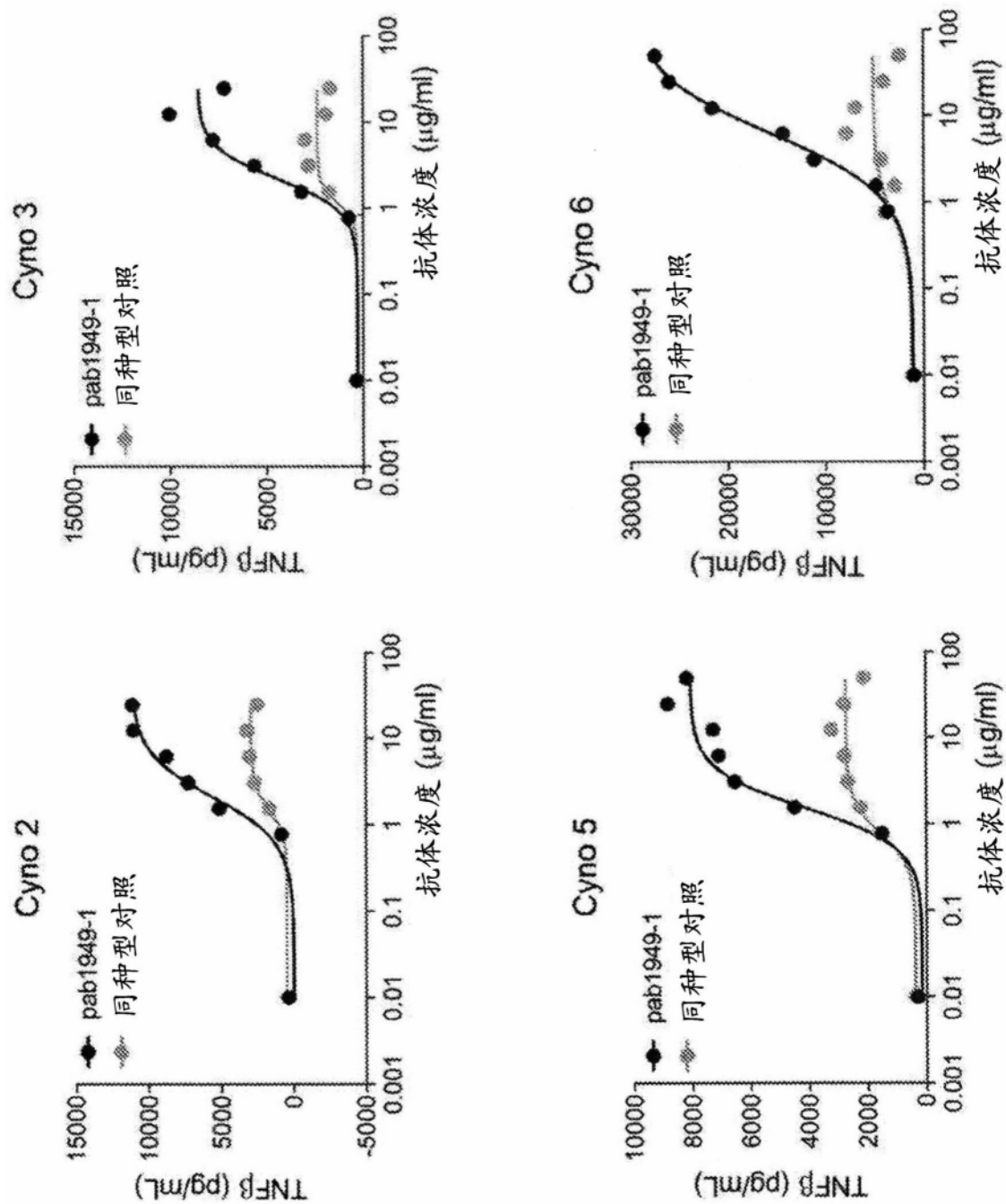


图17A

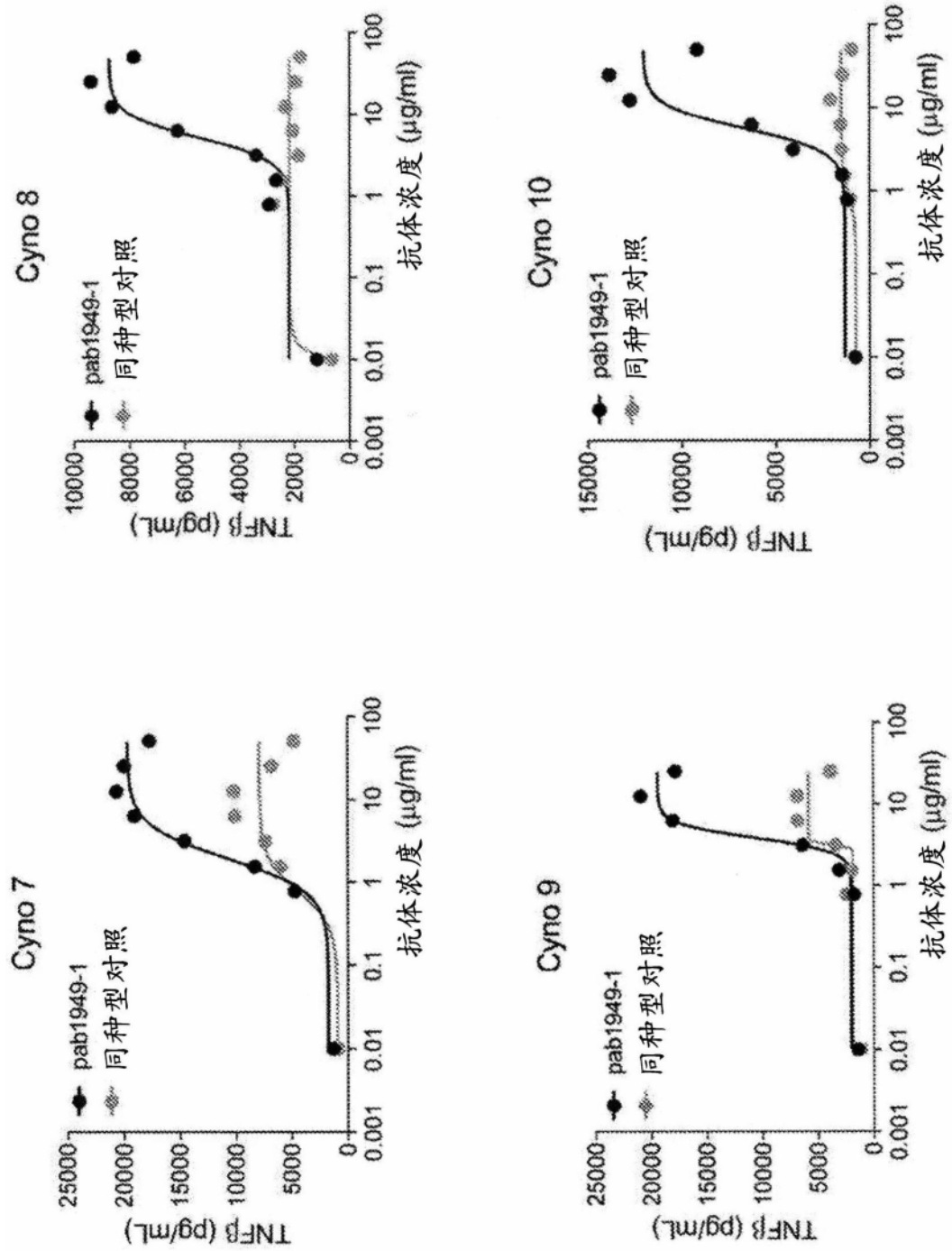


图17B

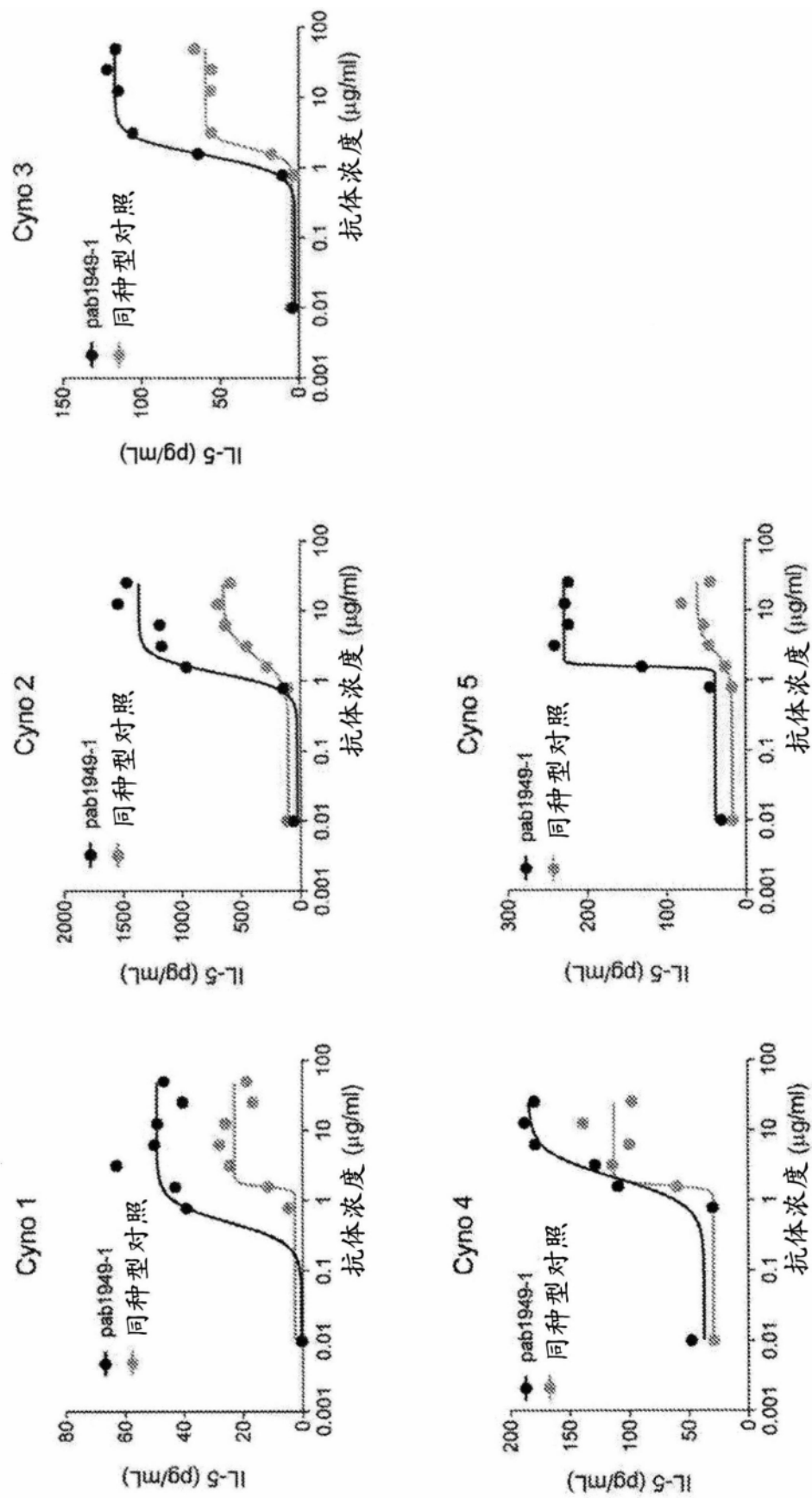


图18A

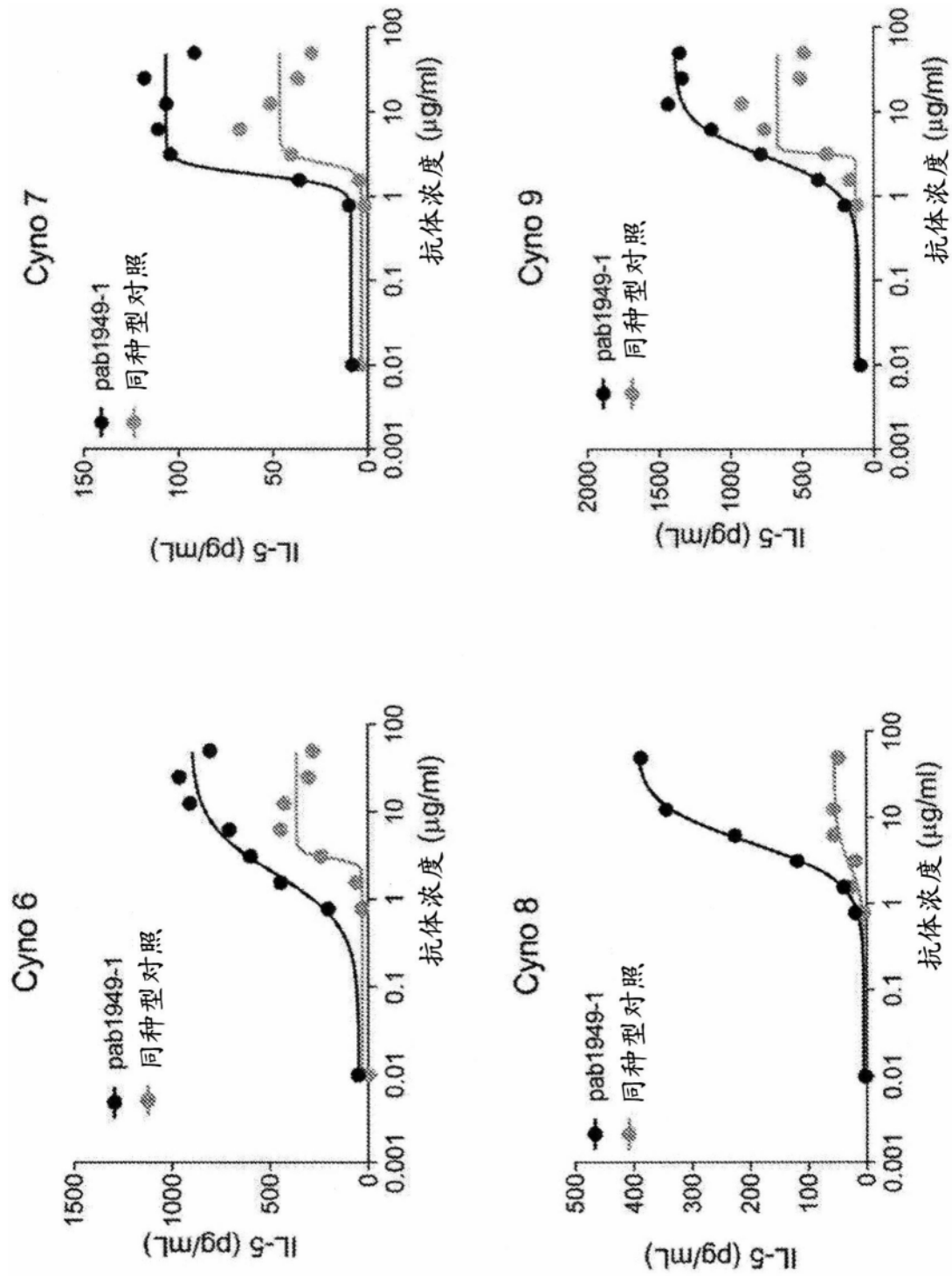


图18B

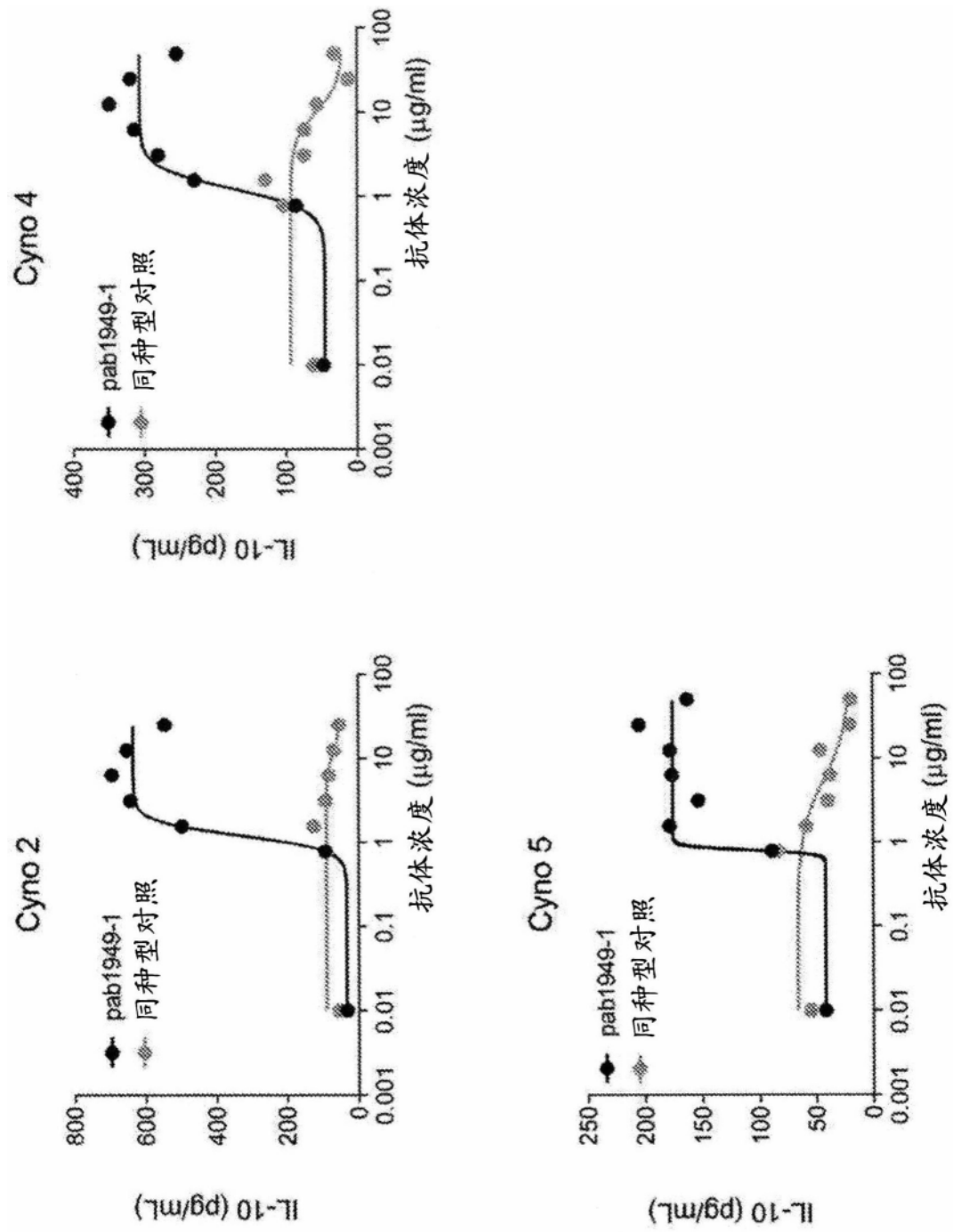


图19A

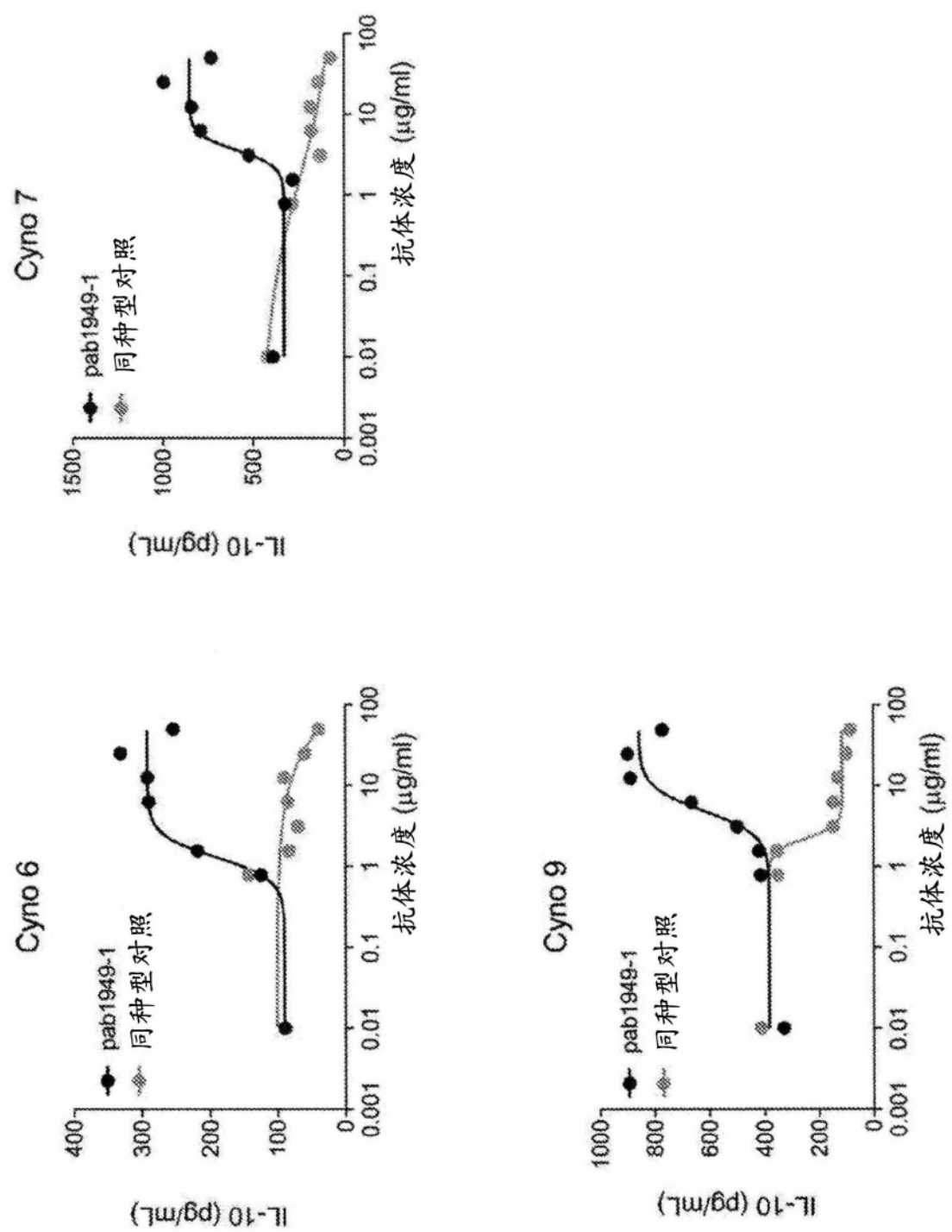


图19B

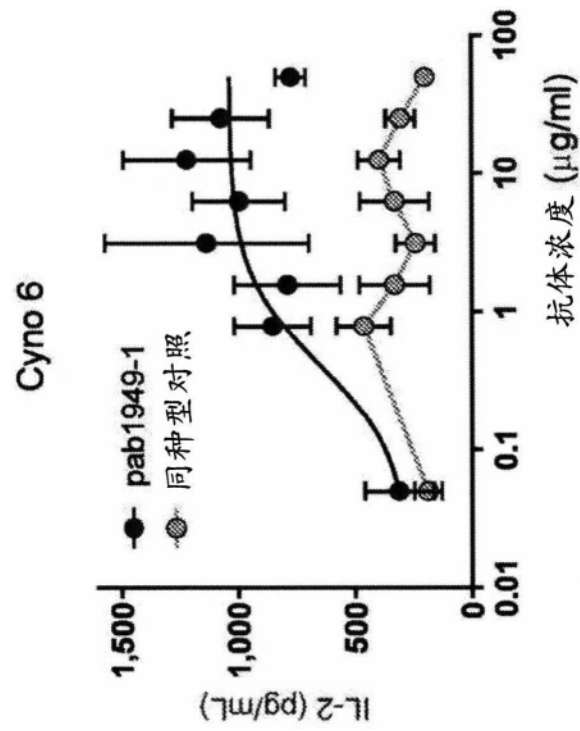


图20A

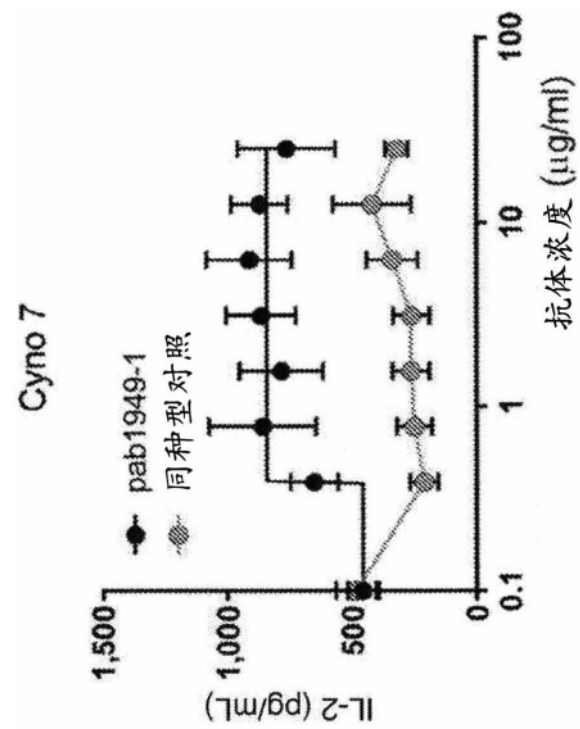


图20B

	pab1949-1	pab1928
W58A	-	-
N60A	-	+
R62A	-	+
R80A	-	+
L88A	-	+
P93A	-	+
P99A	-	+
P115A	-	+

图21