



(10) 授权公告号 CN 109689689 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 06

(21) 申请号 201780054915.2

(22) 申请日 2017.07.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109689689 A

(43) 申请公布日 2019.04.26

(30) 优先权数据
62/365,712 2016.07.22 US
62/375,634 2016.08.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/043504 2017.07.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/018039 EN 2018.01.25

(73) 专利权人 丹娜法伯癌症研究所公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 韦恩·A·马拉斯科 朱铨

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240
专利代理师 沈敬亭

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2016054638 A1, 2016.04.07
US 2012189639 A1, 2012.07.26
W0 2013039954 A1, 2013.03.21
US 2015368349 A1, 2015.12.24
David A Schaer等. Anti-GITR antibodies - Potential clinical applications for tumor immunotherapy.《Curr Opin Investig Drugs》.2010,第11卷(第12期),1378-1386.

审查员 杨啸天

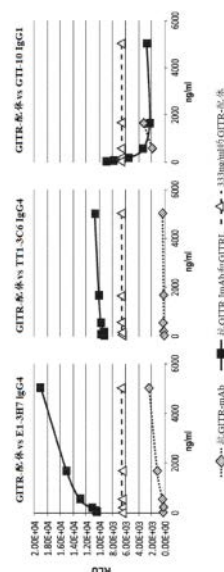
权利要求书2页 说明书33页 附图15页

(54) 发明名称

糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (GITR)
抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明包含结合GITR(也称为糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体)的人单克隆抗体。本发明的抗体与GITR的结合抑制其配体GITR-L的结合,并且可用于治疗癌症。



1. 一种结合人糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (GITR) 的分离的人源化单克隆抗体或其抗原结合片段, 其包含:

含SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的可变重链区和含SEQ ID NO: 16的氨基酸序列的可变轻链区。

2. 一种分离的人源化单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含:

氨基酸序列分别为SEQ ID NO. 71、72和73的可变重链互补决定区1、2和3 (VH-CDR); 及氨基酸序列分别为SEQ ID NO. 74、75和76的可变轻链互补决定区1、2和3 (VL-CDR),

其中所述抗体或抗体结合片段结合人糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (GITR)。

3. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为单价或二价。

4. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为单链抗体。

5. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体的结合亲和力在 10^{-5} M至 10^{-12} M的范围内。

6. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体具有IgG4重链恒定区。

7. 根据权利要求1所述的抗体, 其中整个Fc区在氨基酸位置234和235处含有突变。

8. 根据权利要求7所述的抗体, 其中所述突变为L234A和L235A。

9. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体为双特异性抗体, 其也结合肿瘤相关抗原、细胞因子或细胞表面受体。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其与治疗剂连接。

11. 根据权利要求10所述的抗体, 其中所述治疗剂为毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

12. 一种细胞, 其产生权利要求1-11中任一项所述的抗体。

13. 包含根据权利要求1-11中任一项所述的抗体的组合物在制备用于消耗受试者中的调节性T细胞的药剂中的用途, 其中所述消耗包括向对其有需要的受试者施用所述组合物。

14. 包含权利要求1-11中任一项所述的抗体的组合物在制备用于增强对抗原的免疫反应的药剂中的用途, 其中所述增强包括向对其有需要的受试者施用所述组合物。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述抗原为病毒抗原、细菌抗原或肿瘤相关抗原。

16. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述抗体的所述施用引起抗原特异性T细胞活性增加。

17. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述抗体的所述施用引起NK细胞毒性增加。

18. 根据权利要求14所述的用途, 其中是增强还包括向所述受试者施用IL-15。

19. 根据权利要求1-11中任一项所述的抗体在制备用于治疗或减轻与GITR异常表达相关的癌症症状的药剂中的用途, 所述治疗或减轻包括向对其有需要的受试者施用包含所述抗体的组合物。

20. 根据权利要求19所述的用途, 所述治疗或减轻还包括向所述受试者施用细胞因子或化学治疗剂。

21. 根据权利要求20所述的用途, 其中所述细胞因子为IL-15。

22. 一种核酸, 其包含SEQ ID NO: 13和15的核酸序列。

23. 一种核酸,其编码SEQ ID NO: 14和16的多肽。
24. 一种多肽,其包含SEQ ID NO: 14和16的氨基酸序列。
25. 一种载体,其包含权利要求22或23所述的核酸。
26. 一种细胞,其包含权利要求25所述的载体。

糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (GITR) 抗体及其使用方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案要求2016年7月22日提交的美国临时申请第62/365,712号和2016年8月16日提交的美国临时申请第62/375,634号的优先权和权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及抗糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (GITR) 抗体及其使用方法。

[0004] 政府利益

[0005] 本发明在[]授予的[]下受政府支持进行。政府拥有本发明的某些权利。

[0006] 序列表通过引用并入

[0007] 于[]创建的命名为[]且大小为[]千字节的文本文件内容据此通过引用整体并入。

背景技术

[0008] 免疫系统必须在消除致病实体(例如癌症)的有效反应同时保持对预防自身免疫性疾病的耐受性之间达到平衡。T细胞在维持免疫功能抑制和主动免疫排斥之间的平衡方面起关键作用。调节性T细胞(Treg)的特征在于表达CD25⁺、CD4⁺、FOXP3⁺和糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子相关受体(GITR)。Treg抑制病理性免疫反应,并最终通过调节免疫自身耐受性来维持免疫自稳。Treg的存在抑制了负责消除各种病理实体的活化效应T细胞的活性。

[0009] 人上皮恶性肿瘤与循环中和肿瘤本身存在的Treg的量增加有关。癌症患者中抑制性Treg的存在增加,导致包括效应细胞在内的常规T细胞的抑制,这进而导致IFN- γ 产生的下调。在体内癌症动物模型中减少Treg的存在或活性导致效应T细胞的量和活性增加,在这之后常常是肿瘤尺寸减小和/或其它癌症症状减轻。

[0010] T细胞活化导致Treg和效应T细胞中的GITR水平上调。使得Treg免疫抑制功能降低,并且效应T细胞活性增加的调节GITR活性的方式是一个正在进行密切研究的领域。GITR配体GITR-L在多种细胞中表达,包括树突细胞、巨噬细胞和B细胞。先前研究已证实在癌症模型中施用外源性GITR-L后或通过拮抗GITR的缓和方式增加的抗肿瘤免疫活性之间的关联。

[0011] 鉴于存在增加以及Treg在癌症中的作用,进一步关注通过GITR调节Treg的活性和存在对于进一步理解并最终治疗癌症是最重要的。因此,迫切需要能够特异性结合GITR和调节GITR与其配体GITR-L结合的试剂,作为促进效应T细胞活性并因此而促进抗肿瘤活性的手段。

发明内容

[0012] 在本发明的各个方面中提供了一种结合人抗糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体

(GITR)的分离的人源化单克隆抗体或其抗原结合片段。所述抗体具有：具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的可变轻链区；含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的可变轻链区；具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的可变重链区和具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的可变轻链区。

[0013] 在本发明的另一方面中提供了一种分离的人源化单克隆抗体或抗原结合片段，其具有：分别具有SEQ ID NO.53、54或55的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及含SEQ ID NO.56、57或58的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.59、60或61的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.62、63或64的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.65、66或67的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.68、69或70的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.71、72或73的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.74、75或76的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.77、78或79的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.80、81或82的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.83、84或85的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.86、87或88的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.89、90或91的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.92、93或94的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.95、96或97的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.98、99或100的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.101、102或103的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.104、105或106的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.107、108或109的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID NO.110、111或112的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR)；分别具有SEQ ID NO.113、114或115的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR)；及具有SEQ ID

NO.115、116或117的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR) ;和分别具有SEQ ID NO.101、118或119的氨基酸序列的可变重链互补决定区1、2或3 (VH-CDR) ;及具有SEQ ID NO.120、121或122的氨基酸序列的可变轻链互补决定区1、2或3 (VL-CDR) 。

[0014] 所述抗体为单价或二价。例如所述抗体为单链抗体。所述抗体的结合亲和力在 10^{-5} M至 10^{-12} M的范围内。在一些方面中,所述抗体具有IgG4重链恒定区。在其它方面中,所述抗体具有在氨基酸位置234和235处含有突变的Fc区。所述突变为例如L234A和L235A。

[0015] 在其它方面中,本发明包括含有本发明的人GITR抗体和也结合肿瘤相关抗原、细胞因子或细胞表面受体的抗体的双特异性抗体。

[0016] 任选地,本发明的抗体与治疗剂连接,例如毒素、放射性标记、siRNA、小分子或细胞因子。

[0017] 本发明还提供了产生根据本发明所述的抗体的细胞。

[0018] 在各个方面中本发明提供了通过向有需要的受试者施用包含根据本发明所述的抗体的组合物来消耗受试者中的调节性T细胞的方法。

[0019] 本发明的其它方法包括通过向有需要的受试者施用包含根据本发明所述的抗体的组合物来增强对抗原的免疫反应的方法。所述抗原为病毒抗原、细菌抗原或肿瘤相关抗原。

[0020] 在各个方面中,施用根据本发明所述的抗体引起抗原特异性T细胞活性增加和/或NK细胞毒性增加。

[0021] 在一些方面中本发明的方法还包括向受试者施用IL-15。

[0022] 再另一方面中,本发明包括通过向有需要的受试者施用包含根据本发明所述的抗体的组合物来治疗或减轻癌症症状的方法。所述癌症是其中GITR或其配体GITR-L过表达的癌症。任选地,进一步向受试者施用细胞因子例如IL-15或化学治疗剂。

[0023] 本发明还提供了具有SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51的核酸序列的核酸。

[0024] 再一方面中,本发明提供了编码SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52的多肽或具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52的氨基酸序列的多肽的核酸。还提供了含有根据本发明所述的核酸的载体。本发明还包括含有根据本发明所述的载体的细胞。

[0025] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的相同含义。虽然在本发明的实践中可以使用与本文所述那些相似或等效的方法和材料,但下面描述的是合适的方法和材料。所有出版物、专利申请、专利和本文提到的其它参考文献明确地通过引用整体并入,在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,本文所述的材料、方法和实例仅为说明性的而非旨在为限制性。

[0026] 本发明的其它特征和优点将从以下详述和权利要求中显而易见并为其所涵盖。

附图说明

[0027] 图1说明了用于鉴定抗GITR抗体的ELISA体外结合测定的设计和结果。将板涂覆各2ug/ml的A) hGITR-His;B) hGITR-mlgG2a;C) mGITR-His;或D) mlgG2a。模板下方示出了每个

对应孔的OD测量值。

[0028] 图2是一对图表,其显示了通过中尺度发现免疫测定法测定的四个不同浓度(1E10至1E13个粒子/mL)的指定抗GITR噬菌体抗体与两个不同浓度的hGITR-mIg的结合活性。

[0029] 图3是一对图表,其显示了使用中尺度发现免疫测定法测定的指定抗GITR噬菌体抗体与八个不同浓度的hGITR-mIg的结合活性。

[0030] 图4说明了使用抗GITR噬菌体抗体进行的流式细胞术结合测定的数据。将四个浓度的抗GITR噬菌体抗体(AB)连同表达稳定GITR的CHO细胞或对照CA9一起进行试验。

[0031] 图5是显示用单一浓度的来自单个集落培养上清液的噬菌体抗体的流式细胞术GITR结合数据的图表。橙色柱指示与表达GITR的CHO细胞的结合而蓝色柱指示与缺乏GITR表达的CHO细胞(CA9对照)的结合。

[0032] 图6说明来自单个集落的噬菌体上清液的ELISA GITR结合数据。示出了克隆模板、单个克隆物的OD450和每张板的涂覆模式。

[0033] 图7说明根据本发明的抗GITR抗体的流式细胞术和ELISA结果。

[0034] 图8是显示通过流式细胞术测定分析的呈全IgG1-Fc (LALA) 突变体形式表达的抗GITR抗体的GITR结合的图表。通过5-点2X连续稀释来测试结合GITR(+) CHO细胞系的抗GITR mAb,一式两份。

[0035] 图9是显示对结合细胞表面表达的GITR的抗GITR IgG1-Fc (LALA) 抗体的另一流式细胞术分析的图表。通过5-点2X连续稀释来测试结合GITR(+) CHO细胞系的抗GITR mAb,一式两份。

[0036] 图10证明了通过流式细胞术分析的,呈IgG 1-Fc (LALA) 形式(图A) 或呈IgG4形式(图B) 表达的抗GITR IgG1抗体的GITR结合能力。通过4-点2X连续稀释来测试结合GITR(+) CHO细胞系的抗GITR mAb,一式两份。

[0037] 图11说明47ng/mL的GITR配体与10-点2x连续稀释的抗GITR E1-3H7 IgG4、TT1-3C6 IgG4或商用GTI-10 IgG1抗体之间的结合竞争。

[0038] 图12说明通过Promega测定,在用GloResponse™ NF-κB-luc2P/GITR Jurkat细胞进行的体外测定中,抗GITR E1-3H7IgG4或TT1-3C6协同增加GITR配体诱导的荧光素酶表达。

具体实施方式

[0039] 本发明提供了针对糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体(也称为GITR) 有特异性的人源化单克隆抗体。通过使用经广泛验证的Mehta I/II人抗体-噬菌体展示文库针对人GITR淘选(panning) 来鉴定所述抗体。这些抗体代表一类新的针对GITR的人单克隆抗体。

[0040] 这些抗GITR人单克隆抗体在本文中称为“huGITR抗体”。

[0041] 有存档证据表明在上皮癌的情况下,调节性T细胞(Treg) 的量增加。还有证据表明GITR在由Treg维持的显性免疫自身耐受性中起关键作用。Treg上的GITR表达与癌症期间Treg增加之间的这种联系允许有机会靶向GITR活性作为促进效应T细胞功能增强的手段。具体地,这使得靶向GITR成为癌症治疗的潜在免疫治疗方法。

[0042] Treg表达CD28、CD4、FOXP3和GITR。效应T细胞活性的抑制主要通过FOXP3与活化T细胞核因子NF-AT的二聚化介导,其转而导致IFN-γ、IL-2和IL-4的抑制。已经证实通过与

其配体结合的方式而增加GITR连接会降低Treg对活化T细胞的抑制作用。另外,已经证实直接靶向GITR的抗体会降低Treg抑制功能。

[0043] 虽然GITR在Treg和效应T细胞中均表达,但GITR的表达量在前者中明显更高。因此,已将GITR认为是调节各种疾病(包括癌症)中Treg的抑制功能的良好候选靶标。小鼠模型已经表明刺激GITR导致Treg抑制活性降低。其它研究还表明,拮抗GITR活性导致Treg募集至恶性细胞减少。结合起来,这些数据表明GITR是癌症病理生理学中的关键受体。

[0044] 本发明提供了特异性结合GITR蛋白质的人单克隆抗体。本发明的抗体与GITR的结合中断了GITR配体结合GITR的能力。通过多种机制,huGITR抗体降低了Treg对效应细胞的抑制功能。施用huGITR抗体可导致Treg消耗、效应T细胞(Teff)增殖增加、抗原特异性T细胞活性增加和效应细胞因子产生增加。在一些情况下,huGITR抗体促进或增强抗原特异性免疫反应。

[0045] 因此,本发明的huGITR抗体可用于调节T细胞活性。具体而言,huGITR抗体可以抑制Treg活性并刺激Teff活性。另外,本发明的huGITR抗体增加NK细胞的细胞毒性并增加IFN γ 分泌。

[0046] huGITR抗体为单价或二价并且包含单链或双链。在功能上,huGITR抗体的结合亲和力和在 10^{-5}M 至 10^{-12}M 的范围内。例如,huGITR抗体的结合亲和力为 10^{-6}M 至 10^{-12}M , 10^{-7}M 至 10^{-12}M , 10^{-8}M 至 10^{-12}M , 10^{-9}M 至 10^{-12}M , 10^{-5}M 至 10^{-11}M , 10^{-6}M 至 10^{-11}M , 10^{-7}M 至 10^{-11}M , 10^{-8}M 至 10^{-11}M , 10^{-9}M 至 10^{-11}M , 10^{-10}M 至 10^{-11}M , 10^{-5}M 至 10^{-10}M , 10^{-6}M 至 10^{-10}M , 10^{-7}M 至 10^{-10}M , 10^{-8}M 至 10^{-10}M , 10^{-9}M 至 10^{-10}M , 10^{-5}M 至 10^{-9}M , 10^{-6}M 至 10^{-9}M , 10^{-7}M 至 10^{-9}M , 10^{-8}M 至 10^{-9}M , 10^{-5}M 至 10^{-8}M , 10^{-6}M 至 10^{-8}M , 10^{-7}M 至 10^{-8}M , 10^{-5}M 至 10^{-7}M , 10^{-6}M 至 10^{-7}M 或 10^{-5}M 至 10^{-6}M 。

[0047] 此外,本发明的抗体包含治疗剂,包括但不限于毒素、放射性标记、siRNA或细胞因子。

[0048] 鉴定了十三种独特单克隆huGITR抗体。这些包括mAb#E1-3B4、#E1-3E5(并且也称为#P2-2D12)、#E1-3E9、#E1-3H7(也称为#E5-3B2和#ET1-3B1)、#ET1-3D6、#ET1-3E12、#P1-2A11、#P4-2F1、#T1-3G7、#TT1-3C6(也称为#E1-3F6)、TT1-3C8、#TT1-3F5和#TT5-3E2。表1A-13B中示出了可变区核酸序列和氨基酸序列。表14中示出了与这些抗体的可变区相关的CDR的氨基酸序列。

[0049] 下面提供了单克隆人GITR抗体的核酸和氨基酸序列:

[0050]

表 1A. Ab #E1-3B4 可变区核酸序列
Ab #E1-3B4 的 V _H 链 VH (IGHV3-9*01 F) (SEQ ID NO:1)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTACAGCCTGGGGGGT CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCA TGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAAG TCTTAGTTGGAATACTGGTCGAGTAGCCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCCCTGTATCTGCAAATG AACAGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCTTCTATTACTGTGCAAAGGCTC CGCCCTTGGCTTAGTTGGCTGGTTCGACGCCTGGGGGCCAGGGCACCTGG TCACCGTCTCCTCAG
Ab#E1-3B4 的 V _L 链(IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:3)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGAC AGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGTCTCAGAACCTATTATGGAAGTT GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTCTACTTGTCTTCTATGGCAA GAGAGTCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGG AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCT GACTATTACTGTAACCTCCAGGACAGCAGTGGTGACTTATTATTCGGCGGA GGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

[0051]

表 1B. Ab #E1-3B4 可变区氨基酸序列
Ab #E1-3B4 的 V _H 链 VH (IGHV3-9*01) (SEQ ID NO:2)
QVQLVQSGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSSL SWNTGRVAYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRPEDTAFYYCAKGSALG LVGWFDAGWGQGLTVTVSS
Ab #E1-3B4 的 V _L 链(IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:4)
SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYGSWYQQKPGQAPLLVFGKESR PSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSQDSSGDLFLGGGTLTLVL

[0052]

表 2A. Ab #E1-3E5 可变区核酸序列
Ab #E1-3E5 的 V _H 链 VH (IGHV3-9*01) (SEQ ID NO:5)
caggtgcagctggtgcaatctgggggaggtctggtcagctcgggaagtcggtgagactctctgtgcagcctctggattcacattg gtgattatgccatgcactgggtccggcaagctccaggaaagggcctggagtgggtcgcaggcattactaggaatagtggtcgcata gcctatcgggactttgtgaagggccgattcatcatctccagagacaacccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaga gccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagcgaaatgactggggcttatgatattggggccaaggaccacggtcaccgtctcc tcag
Ab #E1-3E5 的 V _L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:7)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTC AGGATCACATGCCAAGGAGACGGCCTCAGATACTATTATGCAAGCTGGTACCAGC AGAAGCCAGGACAGGCCCTATACTTGTCTCTTTGGTAAAAACAACCGGCCCT CAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAATACAGCTTCCTTGAC CATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCGCGGGA CAGCAGTGGTAAACCATCGATTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTACCGTCCTAA

[0053]

表 2B. Ab #E1-3E5 可变区氨基酸序列	
Ab #E1-3E5 (也称为#P2-2D12)的 V _H 链 VH (IGHV3-9*01) (SEQ ID NO:6)	
QVQLVQSGGGLVQSGKSVRLSCAASGFTFGDYAMHWVRQAPGKGLEWVAGITRN SGRIAYADFKGRFIISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEMTGAYDIWGQG TTVTVSS	
Ab #E1-3E5(也称为#P2-2D12)的 V _L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:8)	
SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDGLRYYYASWYQQKPGQAPILVLFQKNNRPSGI PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHRFFGTGKVTVL	

[0054]

表 3A. Ab #E1-3E9 可变区核酸序列	
Ab #E1-3E9 的 V _H 链 VH (IGHV3-30-3*01) (SEQ ID NO:9)	
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTG CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAA GCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG TATATTACTGTGCGAAAGAGGATTACTATGATAGTAGTGGTTCGAACTACTGGGGCC AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG	
Ab #E1-3E9 的 V _L 链 VL (IGLV1-47*01) (SEQ ID NO:11)	
CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA CCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACC AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCACCTATAGGAATGATCAGCGGCC CTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG CCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTTCAGCTTGGGAT GACAGCCTGGGTGGCGAGGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCAACGTCCTAG	

[0055]

表 3B. Ab #E1-3E9 可变区氨基酸序列	
Ab #E1-3E9 的 V _H 链 VH (IGHV3-30-3*01) (SEQ ID NO:10)	
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKE DYYDSSGSNYWGQGLTVTVSS	
Ab #E1-3E9 的 V _L 链 VL (IGLV1-47*01) (SEQ ID NO:12)	
LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLTYRN DQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYFCSAWDDSLGGEVFGT GTKVNVL	

[0056]

表 4A. Ab #E1-3H7 可变区核酸序列	
Ab #E1-3H7 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:13)	

[0057]

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCCATGCCATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG
GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCGGTACGGCGGATGCTTTTGATATCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

Ab #E1-3H7 的 V_L 链 VL (IGLV1-44*01) (SEQ ID NO:15)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGGGACCCCCGACAGAGGGTC
ACCATCTCTTGTCTGGAGGCGTCCCCAACATCGGAAGTAATCCTGTAAACTGGT
ACCTCCACCGCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAATAGCAATCAGTG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTTTCTGGCTCCAGGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCAT
GGGATGACAGCCTGGATGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCC
TAG

[0058]

表 4B. Ab #E1-3H7 可变区氨基酸序列

Ab #E1-3H7 (也称为#E5-3B2 和#ET1-3B1)的 V_H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:14)

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIGTA
DAFDIWGQGTTTVTVSS

Ab #E1-3H7(也称为#E5-3B2 和#ET1-3B1)的 V_L 链 VL (IGLV1-44*01) (SEQ ID NO:16)

QSALTQPPSVSGTPGQRVTISCSGGVPNIGSNPVNWYLHRPGTAPKLLIYNSN
QWPSGVPDRFSGSRSGTSASLAISGLQSEDEADYCAAWDDSLDGLVFGGG
TKLTVL

[0059]

表 5A. #ET1-3D6 可变区核酸序列

#ET1-3D6 的 V_H 链 VH (IGHV1-46*01) (SEQ ID NO:17)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTACCAGCTACTATA
TGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAT
AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGC
AGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGC
TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCTAGAGAA
AAAAGCAGCAGCTGGTACGGGGGGGACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCC
AGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

#ET1-3D6 的 V_L 链 VL (IGLV2-11*01) (SEQ ID NO:19)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTC
AGTCACCATCTCCTGCACTGGAAGCAGCAGTGATGTTGGTGGTTATCATTA
TGTCTCCTGGTACCAACAATACCCAGGCAAAGTCCCCAAACTGATGATTTA
TGATGTCTCTAGGCGGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGTTCTCTGGCTCCAA
GTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACG
AGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTGTGGTCTTCG
GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAC

[0060]

表 5B. #ET1-3D6 可变区氨基酸序列
#ET1-3D6 的 V _H 链 VH (IGHV1-46*01) (SEQ ID NO:18)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREKSS SWYGGDNWFDPWGQGTLLTVSS
#ET1-3D6 的 V _L 链 VL (IGLV2-11*01) (SEQ ID NO:20)
QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGSSSDVGGYHYVSWYQQYPGKVPKLMY DVSRRPSGVSDRFSGSKSGSTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTVVFSGG TKLTVL

[0061]

表 6A. #ET1-3E12 可变区核酸序列
#ET1-3E12 的 V _H 链 VH (IGHV1-18*01) (SEQ ID NO:21)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGT GCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAAT GGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGAC ACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGTACACCCCTTAGATATAGCAGTGGCTGCCGAC GATTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
#ET1-3E12 的 V _L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:23)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCA GGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCACAACTTATGCAAGCTGGTACCAGCA GAAGCCAGGACAGGCCCTGTTCTTGTCTATCTATGGTAAAAACAAGCGGCCCTCA GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCATCTCAGGGAACACAGCTTCCTTGACCAT CACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCGGGACAGC AGTGGTAAGCATTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG

[0062]

表 6B. #ET1-3E12 可变区氨基酸序列
#ET1-3E12 的 V _H 链 VH (IGHV1-18*01) (SEQ ID NO:22)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDV HPLDIAVAADDYYYGMDVWGQGTLLTVSS
#ET1-3E12 的 V _L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:24)
SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSTLTNYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNK RPSGIPDRFSGSISGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGKHVYVFGTGTKV TVL

[0063]

表 7A. #P1-2A11 可变区核酸序列
#P1-2A11 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:25)

[0064]

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCA
TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC
TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATTG
GGGCCTAGTACAACCTGGAATCCGGCTATGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCCTCAG

#P1-2A11 的 V_L 链 VL (IGLV1-50*01) (SEQ ID NO:27)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGA
GGGTACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTAT
GATGTACACTGGTACCAACAGCTTCCAGGAAAAGCCCCAACTCCTCAT
CTATGATAATACCAATCGGCCCTCGGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTC
CAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGG
ATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGAAAGCCTGAATGGTCAG
GTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG

表 7B. #P1-2A11 可变区氨基酸序列

#P1-2A11 的 V_H 链 VH (IGHV3-23*04 F) (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDWG
LVQLESGYDYWGQGLTVTVSS

[0065]

#P1-2A11 的 V_L 链 VL (IGLV1-50*01) (SEQ ID NO:28)

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGKAPKLLIYD
NTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDESLNGQVFG
TGTKVTVL

表 8A. #P4-2F1 可变区核酸序列

#P4-2F1 的 V_H 链 VH (IGHV4-4*02) (SEQ ID NO:29)

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGA
CCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTGAC
TGGTGGAGTTGGGTCCGCCAGGTCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG
GGGAAATCTATCACAGTGGCAGTCCCAACTACAACCCGTCCCTCAGGGGT
CGAGTCACCATATCAGTAGACAAGTCGAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCT
GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGAA
AGAGTTGCTCCTACAGTAGACGGTGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCCTCAG

[0066]

P4-2F1 的 V_L 链 VL (IGKV1-39*01) (SEQ ID NO:31)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTACCACCTATTAAAA
TTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTG
CATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGAATCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGC
AACTTATTATTGTCAACAGGCCAGCAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGG
GACCAAGGTGGATCTCAAAC

[0067]

表 8B. #P4-2F1 可变区氨基酸序列
#P4-2F1 的 V _H 链 VH (IGHV4-4*02) (SEQ ID NO:30)
QVQLQQSGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSDWWSWVRQVPGKGLEWIGEI YHSGSPNYPNPSLRGRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARERVAPT VDGAFDVWGQGTMTVSS
#P4-2F1 的 V _L 链 VL (IGKV1-39*01 F) (SEQ ID NO:32)
DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQASSFPLTFGGGTKVDLK

[0068]

表 9A. #T1-3G7 可变区核酸序列
#T1-3G7 的 V _H 链 VH (IGHV5-51*01) (SEQ ID NO:33)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCCCGGGGAG TCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCGGGATACAGCTTTACCAACTACTGG ATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATTGGGA TCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCTTCCAAGGCC AGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCACCAGCACTGCCTACCTGCAGTGG AGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGGATAAA GAGTTACTATGATAGTAGTGGTTATTACCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCAG
#T1-3G7 的 V _L 链 VL (IGLV3-21*02) (SEQ ID NO:35)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGA CGGCCAGCATAACCTGTGGGGGAAACAACATTGGGAGTAAAAGTGTGCA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCTCTGGTCTGCTATGATG ATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCT GGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGG CCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGAAGAGGTATTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

[0069]

表 9B. #T1-3G7 可变区氨基酸序列
#T1-3G7 的 V _H 链 VH (IGHV5-51*01) (SEQ ID NO:34)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWIGIY PGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSTSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIKSYD SSGYLWGQGT LVTSS
#T1-3G7 的 V _L 链 VL (IGLV3-21*02) (SEQ ID NO:36)
QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSEEVFGGGTKLT VL

[0070]

表 10A. #TT1-3C6 (也称为#E1-3F6)可变区核酸序列
#TT1-3C6 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:37)

[0071]

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCA
TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC
TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGACGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAAGGG
GGTTCATGGACGTCTGGGGCAAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

#TT1-3C6 的 V_L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:39)

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGAC
AGTCACCATCACATGCCAAGGAGACATCCTCGAAGCCTATTATGCAAGTT
GGTACCAGCAGAGGCCAGGACAGGCCCCTGTCCTTGTCTATCTATGGCGAA
AACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGGTTCTCTGGCTCCAGGTCAG
GAAACACAGCCTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGC
TGACTATTATTGTAACCTCTCGGGACAGCAGTGGTAGCCATGTGGTATTTCG
CGGAGGGACCAAGATGACCGTCCTGG

[0072]

表 10B. #TT1-3C6(也称为#E1-3F6)可变区氨基酸序列

#TT1-3C6 的 V_H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:38)

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI
SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCARRGFM
DVWGKGTLVTVSS

#TT1-3C6 的 V_L 链 VL (IGLV3-19*01) (SEQ ID NO:40)

SSELTQDPAVSVALGQTVTITCQGDILEAYYASWYQQRPGQAPVLVIYGENN
RPSGIPDRFSGSRSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGSHVVFGGGTK
MTVL

[0073]

表 11A. #TT1-3C8 可变区核酸序列

#TT1-3C8 的 V_H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:41)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAACAGCTTTGCCA
TGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGG
TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGGC
ACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

#TT1-3C8 的 V_L 链 VL (IGKV2D-29*01) (SEQ ID NO:43)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCTGTCCGTCACCCCTGGGCA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG
GAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAA
CTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTT
AGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGG
AGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCTC
TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

[0074]

表 11B. #TT1-3C8 可变区氨基酸序列	
#TT1-3C8 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:42)	
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSFAMTWVRQAPGKGLEWVSGI	
SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHAF	
DIWGQGTTVTVSS	
#TT1-3C8 的 V _L 链 VL (IGKV2D-29*01) (SEQ ID NO:44)	
DIVMTQSPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLI	
YEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPLTFGG	
GTKVEIK	

[0075]

表 12A. #TT1-3F5 可变区核酸序列	
#TT1-3F5 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04)(SEQ ID NO:45)	
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT	
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCA	
TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC	
TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC	
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG	
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATA	
AAGGTGGGGGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC	
CTCAG	
#TT1-3F5 的 V _L 链 VL (IGLV6-57*01) (SEQ ID NO:47)	
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGAC	
GGTAACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATG	
TGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTTCCCCCACCCTGTGATCTAT	
GAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCAT	
CGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCCTCTCTGGACTGAAGACTG	
AGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATAGTACCTCTCATGTCT	
TCGGAACCTGGGACCCAGGTCACCGTCCTAG	

[0076]

表 12B. #TT1-3F5 可变区氨基酸序列	
#TT1-3F5 的 V _H 链 VH (IGHV3-23*04) (SEQ ID NO:46)	
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI	
SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKGG	
GFDPWGQGLTVTVSS	
#TT1-3F5 的 V _L 链 VL (IGLV6-57*01) (SEQ ID NO:48)	
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDN	
QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSTSHVFGTGTQ	
VTVL	

[0077]

表 13A. #TT5-3E2 可变区核酸序列	
#TT5-3E2 的 V _H 链 VH (IGHV5-51*01) (SEQ ID NO:49)	

[0078]

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGA
 GTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAACTACT
 GGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGGTGG
 GGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAA
 GGCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGC
 AGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAG
 ACCAGGGTATTACTATGGTTCTGGGGAGTTATTATAACGTTGACTACTGGG
 GCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAG

#TT5-3E2 的 V_L 链 VL (IGLV3-1*01) (SEQ ID NO:51)

CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAG
 ACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATGAATTGGGGGATAAATTTGCTTT
 CTGGTATCAACAAAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAA
 GATAGTAAGAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCATCTC
 TGGGAACACGGCCACCCTGACTATCAGCAGGGTCGAGGCCGGAGATGA
 GGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGATAGCAATGGTGGTCCCCCATTCG
 GGAGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

[0079]

表 13B. #TT5-3E2 可变区氨基酸序列

#TT5-3E2 的 V_H 链 VH (IGHV5-51*01) (SEQ ID NO:50)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWVGI
 IYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARPGY
 YYGSGSYYNVDYWGQGLTVTVSS

#TT5-3E2 的 V_L 链 VL (IGLV3-1*01) (SEQ ID NO:52)

QPGLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDKFAFWYQQKPGQSPVLVIYQDSK
 RPSGIPERFSGSISGNTATLTISRVEAGDEADYFCQVWDSNGGPPFGRGTKLT
 VL

[0080] 本文所述的huGITR抗体结合GITR。一方面,huGITR抗体对GITR具有高亲和力和高特异性。另一方面,huGITR抗体可以结合GITR受体并防止、抑制或阻断配体GITR-L与其受体GITR结合。

[0081] 表14. 重链和轻链的氨基酸序列

[0082]

抗体	可变区	CDR1	CDR2	CDR3
#E1-3B4	VH	GFT <u>F</u> DDYA (SEQ ID NO:53)	LSWNTG RV (SEQ ID NO:54)	AKGSALGLVGWFDA (SEQ ID NO:55)
#E1-3B4	VL	SLR <u>T</u> YY (SEQ ID NO:56)	G <u>K</u> E (SEQ ID NO:57)	NSQDSSGDLL (SEQ ID NO:58)
#E1-3E5 (和 #P2-2D12)	VH	GFT <u>E</u> G DY A (SEQ ID NO:59)	ITRNSGR I (SEQ ID NO:60)	ASEMTGAYDI (SEQ ID NO:61)

[0083]

#E1-3E5 (和 P2-2D12)	VL	GLRYYY (SEQ ID NO: 62)	GKN (SEQ ID NO:63)	NSRDSSGNHRF (SEQ ID NO:64)
#E1-3E9	VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO:65)	ISYDGSN K (SEQ ID NO:66)	AKEDYYDSSGSNY (SEQ ID NO:67)
#E1-3E9	VL	SSNIGSNY (SEQ ID NO:68)	RND (SEQ ID NO:69)	SAWDDSLGGEV (SEQ ID NO:70)
#E1-3H7 (也称为 #E5-3B2 和 #ET1-3B1)	VH	GFTFSSHA (SEQ ID NO:71)	ISGSGGS T (SEQ ID NO:72)	AKIGTADAFDI (SEQ ID NO:73)
#E1-3H7 (也称为 #E5-3B2 和 #ET1-3B1)	VL	VPNIGSNP (SEQ ID NO:74)	NSN (SEQ ID NO:75)	AAWDDSLDGLV (SEQ ID NO:76)
#ET1-3D6	VH	GYTFTSYY (SEQ ID NO:77)	INPSGGS T (SEQ ID NO:78)	AREKSSSWYGGDNWFDP (SEQ ID NO:79)
#ET1-3D6	VL	SSDVGGY HY (SEQ ID NO:80)	DVS (SEQ ID NO:81)	SSYTSSSTVV (SEQ ID NO:82)
#ET1-3E12	VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO:83)	ISAYNG NT (SEQ ID NO:84)	ARDVHPLDIAVAADDYYYY GMDV (SEQ ID NO:85)
#ET1-3E12	VL	SLTTNY (SEQ ID NO:86)	GKN (SEQ ID NO:87)	NSRDSSGKHVY (SEQ ID NO:88)
#P1-2A11	VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO:65)	ISGSGGS T (SEQ ID NO:72)	AKDWGLVQLESGYDY (SEQ ID NO:89)
#P1-2A11	VL	SSNIGAGY D (SEQ ID NO:90)	DNT (SEQ ID NO:91)	AAWDESLNGQV (SEQ ID NO:92)
#P4-2F1	VH	GGSISSD W (SEQ ID NO:93)	IYHSGSP (SEQ ID NO:94)	ARERVAPTVDGAFDV (SEQ ID NO:95)
#P4-2F1	VL	QSITTY (SEQ ID NO:96)	AAS (SEQ ID NO:97)	QQASSFPLT (SEQ ID NO:98)

[0084]

#T1-3G7	VH	GYSFTNY W (SEQ ID NO:99)	IYPGDSD T (SEQ ID NO:100)	ARIKSYYDSSGYL (SEQ ID NO:101)
#T1-3G7	VL	NIGSKS (SEQ ID NO:102)	DDS (SEQ ID NO:103)	QVWDSSEEV (SEQ ID NO:104)
#TT1-3C6 (和 #E1-3F6)	VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO:65)	ISGSGGS T (SEQ ID NO:72)	ARRGFMDV (SEQ ID NO:105)
#TT1-3C6 (和 #E1-3F6)	VL	ILEAYY (SEQ ID NO:106)	GEN (SEQ ID NO:107)	NSRDSSGSHVV (SEQ ID NO:108)
#TT1-3C8	VH	GFTFNSFA (SEQ ID NO:109)	ISGSGGS T (SEQ ID NO:72)	AKGHAFDI (SEQ ID NO:110)
#TT1-3C8	VL	QSLHSDG KTY (SEQ ID NO:111)	EVS (SEQ ID NO:112)	MQSIQLPLT (SEQ ID NO:113)
#TT1-3F5	VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO:65)	ISGSGGS T (SEQ ID NO:72)	AKDKGGGFDP (SEQ ID NO:114)
#TT1-3F5	VL	SGSIASNY (SEQ ID NO:115)	EDN (SEQ ID NO:116)	QSYDSTSHV (SEQ ID NO:117)
#TT5-3E2	VH	GYSFTNY W (SEQ ID NO:101)	IYPGDSD T (SEQ ID NO:118)	ARPGYYYGSGSYYNVDY (SEQ ID NO:119)
#TT5-3E2	VL	ELGDKF (SEQ ID NO:120)	QDS (SEQ ID NO:121)	QVWDSNGGPP (SEQ ID NO:122)

[0085] 本发明的特征还有与本文所述的huGITR抗体的氨基酸或核苷酸序列具有指定百分比同一性或相似性的抗体。例如,在比较本文所述任一种huGITR抗体的指定区域或全长时,该抗体可具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。可通过本领域已知的方法进行序列比较和/或比对来测定与本发明核酸和蛋白质的序列同一性或相似性。例如,可利用序列比较算法(即BLAST或BLAST 2.0)、人工比对或目视检查来测定本发明核酸和蛋白质的序列同一性或相似性。

[0086] 关于氨基酸序列,本领域技术人员将易于认识到对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单独取代、缺失或添加,其改变、添加、缺失或取代所编码序列中的单个氨基酸或一小部分氨基酸,在本文中统称为“保守性修饰变体”。在一些实施方案中,改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表是本领域熟知的。本文公开

的huGITR抗体的此类保守性修饰变体与未修饰的GITR抗体相比可表现出与GITR的交叉反应性增强。

[0087] 抗体

[0088] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,免疫球蛋白分子即含有特异性结合抗原(与抗原进行免疫反应)的抗原结合位点的分子。用“特异性结合”或“与……进行免疫反应”意指抗体与预期抗原的一个或多个抗原决定簇反应而不与其它多肽反应。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb(结构域抗体)、单链、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 和 $F_{(ab')_2}$ 片段、scFv和 F_{ab} 表达文库。

[0089] 单链Fv(“scFv”)多肽分子是共价连接的 $V_H:V_L$ 杂二聚体,可以由包括通过肽编码接头连接的 V_H 和 V_L 编码基因的基因融合物表达。(参见Huston等人(1988)Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883)。已经描述了许多方法以辨别用于将来自抗体V区的天然聚集但经化学分离的多肽轻链和重链转化成scFv分子的化学结构,scFv分子将会折叠成与抗原结合位点的结构基本上类似的三维结构。参见,例如美国专利第5,091,513、5,132,405和4,946,778。

[0090] 已经并且可以产生非常大的天然人scFv文库以提供针对大量靶分子的大量重排抗体基因来源。可由患有感染性疾病的个体构建较小文库以便分离疾病特异性抗体(参见Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:9339-43(1992);Zebedee等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3175-79(1992))。

[0091] 一般而言,从人体获得的抗体分子与IgG、IgM、IgA、IgE和IgD任一类有关,其在分子中存在的重链性质方面彼此不同。某些类别也具有亚类,诸如IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄等。此外,在人类中,轻链可为 κ 链或 λ 链。术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链V区内三个高度发散性延伸段,称为“超变区”,插入称为“骨架区”或“FR”的更保守性侧翼延伸段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白的超变区之间和附近的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个超变区和重链的三个超变区在三维空间上相对于彼此布置形成抗原结合表面。抗原结合表面与所结合抗原的三维表面互补,并且重链和轻链的三个超变区称为“互补决定区”或“CDR”。表1A-表13B中示出了scFv抗体含CDR的VH和VL区。

[0092] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白、scFv或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团诸如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。例如,可针对多肽的N端或C端肽产生抗体。

[0093] 如本文所用,术语“免疫结合”和“免疫结合特性”是指在免疫球蛋白分子和免疫球蛋白对其有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以根据相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中 K_d 越小代表亲和力越强。可以使用本领域熟知的方法量化所选多肽的免疫结合特性。一种此类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力和同等影响两个方向的速率的几何参数。因此,“结合速率常数”($K_{\text{结合}}$)和“脱离速率常数”($K_{\text{脱离}}$)可通过计算浓度及实际缔合和解离速率来确定。(参见Nature 361:186-87(1993))。

$K_{\text{结合}}/K_{\text{脱离}}$ 之比使得能够消去与亲和力无关的所有参数,并且与解离常数 K_d 相等。(通常参见,Davies等人(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。通过放射性配体结合测定法或本领域技术人员已知的类似测定法测量,当平衡结合常数(K_d) $\leq 10\mu\text{M}$,优选 $\leq 10\text{nM}$,更优选 $\leq 10\text{nM}$ 且最优选 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM 时,称本发明的抗体特异性结合GITR表位。

[0094] 本发明的GITR蛋白或其衍生物、片段、类似物、同源物或直系同源物,可以在产生免疫特异性结合这些蛋白质组分的抗体中用作免疫原。与蛋白脂质体偶联的GITR蛋白或其衍生物、片段、类似物、同源物或直系同源物,可以在产生免疫特异性结合这些蛋白质组分的抗体中用作免疫原。

[0095] 本领域技术人员将认识到,无需过度实验就可能确定人单克隆抗体是否具有与本发明的人单克隆抗体相同的特异性,这是通过确定前者是否防止后者与GITR结合而进行的。如果测试的人单克隆抗体与本发明的人单克隆抗体竞争,正如本发明的人单克隆抗体的结合减少所示,则可能两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。

[0096] 确定人单克隆抗体是否具有本发明的人单克隆抗体的特异性的另一种方式是用通常与之反应的GITR蛋白预先温育本发明的人单克隆抗体,然后添加测试的人单克隆抗体以确定测试的人单克隆抗体在其结合GITR的能力方面是否受到抑制。如果测试的人单克隆抗体受到抑制,则极有可能其具有与本发明的人单克隆抗体相同或功能上等效的表位特异性。也可以利用GITR并且确定试验单克隆抗体是否能够中和GITR来进行本发明的人单克隆抗体的筛选。

[0097] 本领域已知的各种程序可用于产生针对本发明的蛋白质,或针对其衍生物、片段、类似物、同源物或直系同源物的多克隆或单克隆抗体。(参见例如,Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow E,and Lane D,1988,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,其通过引用并入本文)。

[0098] 抗体可通过熟知的技术纯化,例如使用蛋白质A或蛋白质G的亲色谱法,主要提供免疫血清的IgG成分。随后或可替代地,是所寻求的免疫球蛋白靶标的特异性抗原或其表位,可以固定在柱上以通过免疫亲和色谱法纯化免疫特异性抗体。例如D.Wilkinson讨论了免疫球蛋白的纯化(The Scientist,The Scientist,Inc.公开的,Philadelphia PA,第14卷第8期(2000年4月17日),第25-28页)。

[0099] 术语“单克隆抗体”或“MAb”或“单克隆抗体组合物”,如本文所用,是指仅含一个分子种类的由独特轻链基因产物和独特重链基因产物组成的抗体分子的抗体分子群体,具体而言,在该群体的所有分子中单克隆抗体的互补决定区(CDR)相同。MAb含有能够与抗原特定表位进行免疫反应,特征在于对其具有独特结合亲和力的抗原结合位点。

[0100] 可以使用杂交瘤法,诸如Kohler和Milstein,Nature,256:495(1975)所述的那些方法,制备单克隆抗体。在杂交瘤法中,通常用免疫剂使小鼠、仓鼠或其它适当的宿主动物免疫以引出产生或能够产生将会与免疫剂特异性结合的抗体的淋巴细胞。可替代地,淋巴细胞可体外免疫。

[0101] 免疫剂通常将包括蛋白质抗原、其片段或其融合蛋白。通常,如果需要人类来源的细胞则使用外周血淋巴细胞,或者如果需要非人哺乳动物来源则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇使淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,

(1986) 第59-103页)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在优选含有一种或多种抑制未融合、永生化细胞生长或存活的物质的合适培养基中培养。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),所述物质防止HGPRT缺陷型细胞生长。

[0102] 优选的永生化细胞系是有效融合,支持所选抗体生成细胞的稳定高水平抗体表达,并且对培养基诸如HAT培养基敏感的那些细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤系,例如可从加利福尼亚圣地亚哥的萨克研究所细胞分布中心和弗吉尼亚州马纳萨斯的美国模式培养物保藏所获得。人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也已经有描述,用于产生人单克隆抗体。(参见Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63页)。

[0103] 然后可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的存在。优选地,通过免疫沉淀法或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可以,例如通过Munson和Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定。而且,在单克隆抗体的治疗应用中,重要的是鉴定对靶抗原具有高度特异性和高结合亲和力的抗体。

[0104] 在鉴定所需杂交瘤细胞后,克隆物可通过限制稀释程序亚克隆并通过标准方法生长。(参见Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 第59-103页)。用于该目的合适培养基包括,例如杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)和RPMI-1640培养基。可替代地,杂交瘤细胞可在哺乳动物体内随腹水而生长。

[0105] 可通过常规免疫球蛋白纯化程序例如蛋白质A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法从培养基或腹水分离或纯化亚克隆物分泌的单克隆抗体。

[0106] 单克隆抗体也可通过重组DNA方法制备,例如美国专利第4,816,567号中描述的那些方法。编码本发明的单克隆抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠类抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离并测序。本发明的杂交瘤细胞用作此类DNA的优选来源。一经分离,就可将DNA置于表达载体内,然后转染到宿主细胞诸如猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。DNA也可以经修饰,例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠类序列(参见美国专利第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)),或通过将非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接。此类非免疫球蛋白多肽可以取代本发明抗体的恒定结构域,或者可以取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0107] 全人抗体是其中轻链和重链的整个序列,包括CDR,都是由人类基因产生的抗体分子。本文将此类抗体称为“人源化抗体”、“人抗体”或“全人抗体”。人单克隆抗体可使用以下技术制备:三源杂交瘤(trioma)技术;人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor等人, 1983 Immunol Today 4:72);和用于产生人单克隆抗体的EBV杂交瘤技术(参见Cole等人, 1985在:

MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY中,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)。人单克隆抗体可以使用并且可以通过使用人杂交瘤(参见Cote等人,1983.Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030)或通过体外用爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus)转化人B细胞(参见Cole等人,1985在:MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY中,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)产生。

[0108] 另外,人抗体也可以使用另外的技术产生,包括噬菌体展示文库。(参见Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991))。类似地,可通过将人免疫球蛋白基因座引入到其中内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的转基因动物,例如小鼠中来制备人抗体。激发后,观察到人抗体产生,其在各个方面,包括基因重排、组装和抗体库,与在人类中所看到的抗体非常相似。这种方法例如,在美国专利第5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016号中和在Marks等人,Bio/Technology 10,779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368 856-859(1994);Morrison,Nature 368,812-13(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14,845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14,826(1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13 65-93(1995)中有描述。

[0109] 另外可以使用经修饰以便响应于抗原激发而产生全人抗体而非动物内源性抗体的转基因非人动物产生人抗体。(参见PCT公开案W094/02602)。非人宿主中编码免疫球蛋白重链和轻链的内源基因已经丧失能力,并将编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性基因座插入宿主基因组中。例如,使用含必需人类DNA区段的酵母人工染色体,并入人类基因。然后通过使含有少于完整修饰补体的中间转基因动物杂交育种,作为后代获得提供所有所需修饰的动物。此类非人动物的优选实施方案是小鼠,并且如PCT公开案W0 96/33735和W0 96/34096中所公开的那样,称为XenomouseTM。这种动物产生分泌全人免疫球蛋白的B细胞。在用目标免疫原免疫后,可以直接从动物获得抗体,例如,多克隆抗体制剂,或可替代地源自该动物的永生B细胞,诸如产生单克隆抗体的杂交瘤。另外,编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因可以回收和表达以直接获得抗体,或者可以进一步修饰以获得抗体类似物,例如单链Fv(scFv)分子。

[0110] 在美国专利第5,939,598号中公开了产生缺乏内源性免疫球蛋白重链表达的非人宿主例如小鼠的方法的一个实例。它可以通过一种方法获得,该方法包括使J区段基因从胚胎干细胞中的至少一个内源重链基因座中缺失以防止基因座重排并防止形成重排的免疫球蛋白重链基因座的转录物,缺失受含有编码选择标记的基因的靶向载体影响;从胚胎干细胞产生转基因小鼠,其体细胞和生殖细胞含有编码选择标记的基因。

[0111] 在美国专利第5,916,771号中公开了一种产生目标抗体,诸如人抗体的方法。该方法包括将含有编码重链的核苷酸序列的表达载体引入培养的一个哺乳动物宿主细胞中,将含有编码轻链的核苷酸序列的表达载体引入另一个哺乳动物宿主细胞,并且使这两个细胞融合形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

[0112] 在该程序的进一步改进中,PCT公开案W0 99/53049中公开了鉴定免疫原上临床相关表位的方法和选择以高亲和力免疫特异性结合相关表位的抗体的相关方法。

[0113] 抗体可以由含有编码上述单链抗体的DNA区段的载体表达。

[0114] 这些可包括载体、脂质体、裸DNA、佐剂辅助的DNA、基因枪、导管等。载体包括化学

偶联物,诸如WO 93/64701中所述,其具有靶向部分(例如细胞表面受体的配体)和核酸结合部分(例如聚赖氨酸);病毒载体(例如DNA或RNA病毒载体);融合蛋白,诸如PCT/US 95/02140(WO 95/22618)中所述,其是含有靶部分的融合蛋白(例如,对靶细胞有特异性的抗体)和核酸结合部分(例如鱼精蛋白);质粒、噬菌体等。载体可以是染色体的、非染色体的或合成的。

[0115] 优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学偶联物。逆转录病毒载体包括莫洛尼鼠白血病病毒。优选DNA病毒载体。这些载体包括痘病毒载体,诸如正痘病毒(orthopox)或禽痘病毒(avipox)载体,疱疹病毒载体,诸如单纯疱疹病毒I型(HSV)载体(参见Geller, A.I.等人, J. Neurochem, 64:487(1995); Lim, F.等人, 在DNA Cloning: Mammalian Systems 中, D. Glover编辑 (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I.等人, Proc Natl. Acad. Sci: U.S.A. 90:7603(1993); Geller, A.I.等人, Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149(1990), 腺病毒载体(参见LeGal LaSalle等人, Science, 259:988(1993); Davidson等人, Nat. Genet 3:219(1993); Yang等人, J. Virol. 69:2004(1995) 和腺相关病毒载体(参见Kaplitt, M.G.等人, Nat. Genet. 8:148(1994))。

[0116] 痘病毒载体将基因引入细胞质中。禽痘病毒载体仅导致核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体优选用于将核酸导入神经细胞内。腺病毒载体导致比腺相关病毒(约4个月)更短的表达(约2个月),其又比HSV载体更短。选择的特定载体将取决于靶细胞和所治疗的病状。引入可以通过标准技术进行,例如感染、转染、转导或转化。基因转移模式的实例包括例如裸DNA、CaPO₄沉淀、DEAE葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂质转染、细胞显微注射和病毒载体。

[0117] 载体可用于靶向基本上任何预期靶细胞。例如,立体定位注射可用于将载体(例如腺病毒、HSV)导向预期位置。另外,可以使用微泵输注系统(诸如SynchroMed输注系统)通过脑室内(icv)输注来递送颗粒。已经证明基于总体流动的方法,称为对流,在将大分子递送到大脑延伸区域方面是有效的,并且可以用于将载体递送至靶细胞。(参见Bobo等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080(1994); Morrison等人, Am. J. Physiol. 266:292-305(1994))。可以使用的其它方法包括导管、静脉、肠胃外、腹膜内和皮下注射,及口服或其它已知施用途径。

[0118] 这些载体可用于表达大量可以多种方式使用的抗体。例如,检测样品中GITR的存在。抗体也可用于尝试结合并破坏GITR活性。

[0119] 有技术可以适用于产生对本发明的抗原蛋白有特异性的单链抗体(参见例如美国专利第4,946,778号)。另外,有方法可以适用于构建F_{ab}表达文库(参见例如Huse等人, 1989Science 246:1275-1281),以允许快速有效地鉴定对蛋白质或其衍生物、片段、类似物或同源物具有所需特异性的单克隆F_{ab}片段。含有蛋白质抗原独特型的抗体片段可以通过本领域已知的技术产生,包括但不限于:(i)通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的F_{(ab')₂}片段;(ii)通过还原F_{(ab')₂}片段的二硫键产生的F_{ab}片段;(iii)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而产生的F_{ab}片段及(iv)F_v片段。

[0120] 异源偶联抗体也在本发明的范围内。异源偶联抗体由两个共价连接的抗体组成。例如,已提出此类抗体将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(参见美国专利第4,676,980号),并用于治疗HIV感染(参见WO 91/00360;WO 92/200373;EP 03089)。考虑到可以在体外使用

合成蛋白质化学中的已知方法,包括涉及交联剂的那些方法,制备抗体。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚胺,以及例如美国专利第4,676,980号中公开的那些。

[0121] 可能需要在效应功能方面修饰本发明的抗体,以便增强,例如抗体治疗癌症的有效性。例如,可向Fc区引入半胱氨酸残基,从而允许在该区域内形成链间二硫键。这样产生的同型二聚体抗体可具有提高的内化能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。(参见Caron等人,J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, J. Immunol, 148:2918-2922 (1992))。可替代地,抗体可工程化,具有双Fc区并且由此可具有增强的补体裂解和ADCC能力。(参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989))。

[0122] 在某些实施方案中,本发明的抗体包含Fc变体,其包含改变抗体的抗原非依赖性效应功能,尤其是抗体的循环半衰期的氨基酸取代。此类抗体与缺乏这些取代的抗体相比表现出与FcRn的结合增加或减少,因此分别在血清中的半衰期增加或减少。预计对FcRn的亲合力提高的Fc变体具有更长的血清半衰期,并且此类分子可应用于治疗期望施用的抗体的半衰期较长的哺乳动物,例如以治疗慢性疾病或病症。相反,预计FcRn结合亲合力降低的Fc变体具有更短的半衰期,并且此类分子也可用于,例如施用给其中缩短循环时间可能有利的哺乳动物,例如用于体内诊断成像或用于起始抗体长期存在于循环中时具有毒副作用的情形。FcRn结合亲合力降低的Fc变体也不大可能穿过胎盘,因此也可用于治疗孕妇的疾病或病症。另外,可能期望FcRn结合亲合力降低的其它应用包括其中期望定位到脑部、肾脏和/或肝脏的那些应用。在一个示例性实施方案中,本发明的改变的抗体表现出从脉管系统穿过肾小球上皮细胞的转运减少。在另一个实施方案中,本发明的改变的抗体表现出穿过血脑膜屏障(BBB)从脑部进入血管间隙的转运减少。在一个实施方案中,FcRn结合改变的抗体包含在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。FcRn结合环由氨基酸残基280-299组成(根据EU编号)。在通过引用并入本文的国际PCT公开案第W005/047327号中公开了改变FcRn结合活性的示例性氨基酸取代。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或其片段包含具有一个或多个以下取代的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。

[0123] 在一些实施方案中,将突变引入mAb的恒定区,使得mAb的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性改变。例如,突变是CH2结构域中的LALA突变。一方面,bsAb在异二聚体mAb的一个scFv单元上含有突变,这降低了ADCC活性。另一方面,mAb在异二聚体mAb的两条链上均含有突变,这完全消除了ADCC活性。例如,引入mAb一个或两个scFv单元的突变是CH2结构域中的LALA突变。可以优化这些具有可变ADCC活性的mAb,使得mAb对表达mAb识别的一种抗原的细胞表现出最大的选择性杀伤作用,然而对mAb识别的第二种抗原表现出最小的杀伤作用。

[0124] 在其它实施方案中,用于本文所述的诊断和治疗方法的抗体具有恒定区,例如IgG₁或IgG4重链恒定区,将其改变以减少或消除糖基化。例如,本发明的抗体还可以包含含有改变抗体糖基化的氨基酸取代的Fc变体。例如,所述Fc变体可具有减少的糖基化(例如,N-或O-连接的糖基化)。在示例性实施方案中,Fc变体包含通常在氨基酸位置297(EU编号)处发现的N-连接聚糖减少的糖基化。在另一个实施方案中,抗体在糖基化基序附近或内部

具有氨基酸取代,例如,含有氨基酸序列NXT或NXS的N-连接糖基化基序。在一个具体实施方案中,抗体包含在氨基酸位置228或299处具有氨基酸取代的Fc变体(EU编号)。在更具体的实施方案中,抗体包含IgG1或IgG4恒定区,其包含S228P和T299A突变(EU编号)。

[0125] 在通过引用并入本文的国际PCT公开案第W005/018572号中公开了赋予减少或改变的糖基化的示例性氨基酸取代。在优选的实施方案中,修饰本发明的抗体或其片段以消除糖基化。此类抗体或其片段可称为“去糖基化”抗体或其片段(例如“去糖基化”抗体)。虽然不受理论束缚,但据信“去糖基化”抗体或其片段可在体内具有改善的安全性和稳定性特征。示例性去糖基化抗体或其片段包含IgG4抗体的去糖基化Fc区,其缺乏Fc效应功能,从而消除Fc介导的对表达GITR的正常重要器官的毒性的可能性。在其它实施方案中,本发明的抗体或其片段包含改变的聚糖。例如,抗体可以在Fc区的Asn297处的N-聚糖上具有数目减少的岩藻糖残基,即,去岩藻糖基化。在另一个实施方案中,抗体可以在Fc区的Asn297处的N-聚糖上具有数目改变的唾液酸残基。iii) 共价连接

[0126] 本发明还涉及免疫偶联物,其包含与细胞毒性剂诸如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素偶联的抗体(即放射性偶联物)。

[0127] 可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(nomycine)和单端孢菌素(tricothecenes)。有多种放射性核素可用于生成放射性偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0128] 抗体和细胞毒剂的偶联物使用多种双功能蛋白偶联剂来制备,诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如Vitetta等人,Science 238;1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0129] 本领域的普通技术人员将认识到各种各样的可能部分均可与所得抗体或本发明的其它分子偶联。(参见,例如“Conjugate Vaccines”,Contributions to Microbiology and Immunology,J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr(编辑),Carger Press,New York,(1989),其全部内容通过引用并入本文)。

[0130] 偶联可以通过将会使两个分子结合的任何化学反应来完成,只要抗体和其它部分保持其各自的活性即可。这种连接可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和结合、插入、配位结合和络合。然而,优选的结合是共价结合。共价结合可以通过现有侧链直接缩合或通过并入外部桥连分子来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白质分子(诸如本发明的抗体)偶联到其它分子上。例如,代表性偶联剂可包括有机化合物,诸如硫酯、碳二亚胺、琥珀

酰胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、二氮杂苯和六亚甲基二胺。该列表并非旨在穷举本领域已知的各类偶联剂,而是更常见的偶联剂的示例。(参见Killen和Lindstrom, *Jour. Immun.* 133: 1335-2549 (1984); Jansen等人, *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); 及Vitetta等人, *Science* 238:1098 (1987))。优选的接头在文献中有描述。(参见,例如, Ramakrishnan, S.等人 *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), 其描述了MBS (M-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯的用途)。还参见美国专利第5,030,719号,描述了通过寡肽接头与抗体偶联的卤代乙酰肼衍生物的用途。特别优选的接头包括: (i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基) 碳二亚胺盐酸盐; (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)-甲苯 (Pierce Chem.Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (琥珀酰亚胺-6[3-(2-吡啶基二硫代) 丙酰氨基]己酸酯 (Pierce Chem.Co., Cat.#21651G); (iv) 磺基-LC-SPDP (磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰氨基]己酸酯 (Pierce Chem.Co. Cat.#2165-G); 和 (v) 与EDC偶联的磺基-NHS (N-羧基磺基-琥珀酰亚胺: Pierce Chem.Co., Cat.#24510)。

[0131] 上述沉降物含有具有不同属性的组分,因此产生具有不同生理化学性质的偶联物。例如,烷基羧酸盐的磺基-NHS酯比芳族羧酸盐的磺基-NHS酯更稳定。含有NHS-酯的接头比磺基-NHS酯类溶解性差。此外,接头SMPT含有空间位阻的二硫键,并且可以形成稳定性增加的偶联物。二硫键通常不如其它连键稳定,因为二硫键在体外被切割,产生较少可用的偶联物。尤其是磺基-NHS可以增强碳二亚胺偶联剂的稳定性。当连同磺基-NHS使用时,碳二亚胺偶联剂(例如EDC)形成比单独的碳二亚胺偶联反应更耐水解的酯。

[0132] 本文公开的抗体也可以配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,例如Epstein等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); 及美国专利第4,485,045和4,544,545号中描述的。美国专利第5,013,556号公开了具有增强的循环时间的脂质体。

[0133] 特别有用的脂质体可以通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。通过具有限定孔径的过滤器挤出脂质体,以得到具有所需直径的脂质体。如Martin等人, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) 中所述,可以通过二硫化物交换反应使本发明抗体的Fab'片段与脂质体偶联。

[0134] GITR抗体的用途

[0135] 可以施用本发明的特异性结合GITR蛋白的抗体或其片段用于治疗GITR相关疾病或病症。“GITR相关疾病或病症”包括疾病状态和/或与疾病状态相关的症状,其中发现GITR水平升高和/或涉及GITR的细胞信号传导途径激活。示例性GITR相关疾病或病症包括但不限于癌症和炎性疾病。

[0136] 许多癌症过表达GITR并且GITR的上调与高风险预后因素相关。GITR或其配体GITR-L在肿瘤细胞中的过表达也可以表明肿瘤细胞逃避抗肿瘤免疫的机制。此类癌症包括实体瘤和血液肿瘤。使用本发明的抗体抑制或消耗Treg并刺激Teff。另外,本发明的抗体增加NK细胞的毒性并增加IFN γ 的产生。

[0137] 本发明的抗体,包括双特异性、多克隆、单克隆、人源化和全人抗体,可用作治疗剂。此类试剂通常用于治疗或预防受试者中的癌症,增加疫苗效率或增强天然免疫反应。将抗体制剂,优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体制剂,施用于受试者并且通常将会由于其与靶标结合而具有作用。施用抗体可以消除或抑制或干扰GITR蛋白的活性。

[0138] 可以呈药物组合物的形式施用本发明的特异性结合GITR蛋白的抗体或其片段用于治疗癌症。制备包含抗体的治疗组合物的原理和考虑因素以及组分选择的指导提供于例如Remington:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等编辑)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.,1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;及Peptide And Protein Drug Delivery(Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York。

[0139] 本发明抗体的治疗有效量通常涉及实现治疗目标所需的量。如上所述,这可能是抗体与其靶抗原之间的结合相互作用,在某些情况下,会干扰靶标功能。需要施用的量还将取决于抗体对其特异性抗原的结合亲和力,并且还将取决于施用的抗体从其施用的其它受试者的游离体积中消耗的速率。作为非限制性实例,本发明抗体或抗体片段的治疗有效给药量的常见范围可为约0.1mg/kg体重至约50mg/kg体重。常见给药频率可以是例如每天两次至每周一次。

[0140] 在使用抗体片段的情况下,优选特异性结合靶蛋白结合结构域的最小抑制片段。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计保持结合靶蛋白序列的能力的肽分子。此类肽可以化学合成和/或通过重组DNA技术产生。(参见,例如,Marasco等人,Proc,Natl.Acad.Sci USA,90:7889-7893(1993))。制剂还可含有一种以上的活性化合物,这是所治疗的具体适应症所必需的,优选那些具有互补活性且彼此不产生不利影响的活性化合物。可替代地或另外,组合物可包含增强其功能的试剂,例如细胞毒性剂细胞因子(例如IL-15),化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子适于以对预期目的有效的量呈组合存在。

[0141] 活性成分也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊,分别例如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,胶体药物递送系统中(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。

[0142] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0143] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成型制品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0144] 根据本发明的抗体可以用作检测样品中GITR(或蛋白质或其蛋白质片段)的存在的试剂。优选地,抗体含有可检测标记。抗体可为多克隆的,或更优选地,为单克隆的。可以使用完整的抗体或其片段(例如 F_{ab} 、scFv或 $F_{(ab)2}$)。关于探针或抗体,术语“标记”旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即物理连接)到探针或抗体对探针或抗体进行直接标记,以及通过与经直接标记的另一种试剂的反应性而对探针或抗体进行间接标记。间接标记的实例包括使用经荧光标记的二抗检测一抗和用生物素对DNA探针进行末端标记,使其可以用经荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。因此,在术语“生物样品”的使用中包

括血液和血液的成分或组分,包括血清、血浆或淋巴。即,本发明的方法可用于在体外和体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,用于检测分析物mRNA的体外技术包括Northern杂交和原位杂交。用于检测分析蛋白的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括Southern杂交。进行免疫测定的程序例如在“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology”,第42卷,J.R.Crowther(编辑)Human Press,Totowa,NJ,1995;“Immunoassay”,E.Diamandis和T.Christopoulos,Academic Press,Inc.,San Diego,CA,1996;及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985中有描述。此外,用于检测分析物蛋白的体内技术包括向受试者中引入经标记的抗分析物蛋白抗体。例如,可以用放射性标志物标记抗体,所述放射性标志物在受试者中的存在和位置可以通过标准成像技术检测。

[0145] 针对GITR蛋白(或其片段)的抗体可以用于本领域已知的与GITR蛋白定位和/或定量有关的方法中(例如,用于测量适当生理样品中GITR蛋白的水平,用于诊断方法中,用于蛋白质成像等)。在给定实施方案中,使用对GITR蛋白质有特异性的抗体或其含有抗体来源的抗原结合结构域的衍生物、片段、类似物或同源物,作为药理活性化合物(以下称为“治疗剂”)。

[0146] 对本发明的GITR蛋白有特异性的抗体可用于通过标准技术分离GITR多肽,例如免疫亲和、色谱法或免疫沉淀。针对GITR蛋白(或其片段)的抗体可以在诊断上用于监测组织中的蛋白质水平,作为临床试验程序的一部分,例如,以确定给定治疗方案的功效。通过将抗体与可检测物质偶联(即物理沉降)可以促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质和放射性物质。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪亚胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺(luminol);生物发光物质的实例包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白(aequorin),合适的放射性物质的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0147] 药物组合物

[0148] 本发明的抗体或试剂(在本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物可以掺入适于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含抗体或试剂和药学上可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。合适的载体在最新版本Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述,这是该领域的标准参考文献,其通过引用并入本文。此类载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性媒介物如不挥发性油。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,则考虑在组合物中使用它们。补充活性化合物也可以掺入组合物中。

[0149] 将本发明的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(即局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶

液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂诸如乙二胺四乙酸 (EDTA)；缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及调节渗透压的试剂，诸如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱调节pH，诸如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0150] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(可溶于水的情况)或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的并且应该是流动的，达到容易注射的程度。必须在制造和储存条件下是稳定的，并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。例如，通过使用诸如卵磷脂的涂层，通过在分散的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，可以实现对微生物作用的预防。在许多情况下，优选在组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)、氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0151] 无菌注射液可以通过将所需量的活性化合物根据需与上面列举的一种成分或组合一起掺入适当的溶剂中，然后过滤灭菌来制备。通常，通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液，所述媒介物含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下，制备方法是真空干燥和冷冻干燥，由其先前无菌过滤的溶液得到活性成分加上任何其它所需成分的粉末。

[0152] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压制成片剂。为了口服治疗施用的目的，可以将活性化合物与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。口服组合物也可以使用流体载体制备用作漱口水，其中流体载体中的化合物经口服施用，漱口并吐出或吞咽。可以包括药学相容性粘合剂和/或佐剂物质作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有下列任何成分或类似性质的化合物：粘合剂诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂诸如淀粉或乳糖；崩解剂如海藻酸、Primogel或玉米淀粉；润滑剂诸如硬脂酸镁或Sterotes；助流剂诸如胶体二氧化硅；甜味剂诸如蔗糖或糖精；或调味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂。

[0153] 对于吸入施用，化合物以气溶胶喷雾的形式从加压容器或分配器或喷雾器中递送，加压容器或分配器含有合适的推进剂，例如气体诸如二氧化碳。

[0154] 全身性施用也可以通过经粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用，在制剂中使用适于要渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的，并且包括例如对于透粘膜施用而言，去污剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于透皮施用，将活性化合物配制成本领域公知的软膏、油膏、凝胶或乳膏。

[0155] 该化合物也可以制备成栓剂形式(例如，用常规栓剂基质诸如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠形式用于直肠递送。

[0156] 在一个实施方案中，活性化合物与载体一起制备，所述载体将保护化合物免于从体内快速消除，诸如控释制剂，包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的、生

物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙二醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。材料也可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc.商购获得。脂质体悬浮液(包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利第4,522,811号中所述。

[0157] 为了便于施用和剂量均匀以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物是特别有利的。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有预定量的活性化合物,经计算可与所需药物载体一起产生预期治疗效果。本发明剂量单位形式的规格由活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果,以及将此类活性化合物化用于治疗的技术中固有的局限性决定并直接依赖于上述因素。

[0158] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0159] 诊断测定

[0160] huGITR抗体可以在诊断上用于例如监测免疫细胞病症(例如CLL)的发展或进展,作为临床试验程序的一部分,以例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。

[0161] 在一些方面,出于诊断目的,本发明的huGITR抗体与可检测部分连接,提供了一种在患有癌症或慢性感染的受试者中检测T细胞衰竭的途径。

[0162] 可检测部分可以直接与抗体或片段偶联,或通过使用例如荧光二抗间接偶联。直接偶联可以通过例如荧光团与抗体或抗体片段的标准化学偶联,或通过基因工程来完成。可以构建嵌合体或融合蛋白,其含有与荧光或生物发光蛋白偶联的抗体或抗体片段。例如,Casadei等人描述了制备能够在哺乳动物细胞中表达水母发光蛋白和抗体基因的融合蛋白的载体构建体的方法。

[0163] 如本文所用,关于探针或抗体,术语“标记”旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即物理连接)到探针或抗体对探针或抗体进行直接标记,以及通过与经直接标记的另一种试剂的反应性而对探针或抗体进行间接标记。间接标记的实例包括使用经荧光标记的二抗检测一抗和用生物素对DNA探针进行末端标记,使其可以用经荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体(诸如活检组织),以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。即,本发明的检测方法可用于在体外和体内检测生物样品中的表达GITR的细胞。例如,用于检测GITR的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀和免疫荧光。此外,用于检测GITR的体内技术包括向受试者中引入经标记的抗GITR抗体。例如,可以用放射性标志物标记抗体,所述放射性标志物在受试者中的存在和位置可以通过标准成像技术检测。在“靶向”偶联物,即含有靶向部分-设计用于将偶联物定位在受试者或动物体内的一个或多个特定位点处的分子或特征的偶联物的情况下,“定位”是指基本上已经达到受试者体内结合、“定位”与未结合、“游离”实体之间的平衡时的状态。达到此类平衡的速率取决于施用途径。例如,通过静脉内注射施用以定位于血栓的偶联物可在注射的数分钟内实现在血栓的定位或积聚。另一方面,口服施用以定位肠内感染的偶联物可能需要数小时才能实现定位。可替代地,定位可以简单地指在实体施用之后的选定时间段实体在受试者或动物体内的位置。作为另一个实例,当部分在施用后分布时实现定位。

[0164] 在所有上述情况中,本领域技术人员可以对实现定位的时间进行合理估计。此外,

可以通过根据本发明的方法诸如用光检测器装置,对可检测部分(例如,发光偶联物)进行成像来跟踪根据时间变化的定位状态。所用“光检测器装置”应具有足够高的灵敏度,以便能够在合理的时间内对来自哺乳动物体内的微弱光进行成像,并使用来自此类装置的信号构建图像。

[0165] 在可以使用非常明亮的发光部分和/或检测定位于正在成像的受试者或动物表面附近的发光融合蛋白的情况下,可以使用一副“夜视”护目镜或标准的高灵敏度摄像机,例如硅强化管(SIT)相机(例如,来自Hamamatsu Photonic Systems,Bridgewater,N.J.)。然而,更典型地,需要更灵敏的光检测方法。

[0166] 在极低的光照水平下,每单位面积的光子通量变得如此低,以至于正在成像的场景不再显得连续。相反,它由单个光子表示,这些光子在时间和空间上彼此不同。在监视器上观察,此类图像显示为闪烁的光点,每个点代表一个检测到的光子。随着时间推移在数字图像处理器中累积这些检测到的光子,可以获取和构造图像。与传统相机相比,其中为每个图像点处的信号分配一个强度值,在光子计数成像中,信号幅度没有意义。目的是简单地检测信号(光子)的存在并计算随时间变化信号相对于其位置的发生数。

[0167] 下面描述的至少两种类型的光检测器装置可以检测单个光子并产生可以通过图像处理器分析的信号。降噪光检测装置通过降低光子检测器中的背景噪声来实现灵敏度,而不是放大光子信号。主要通过冷却检测器阵列来降低噪声。该装置包括电荷耦合装置(CCD)相机,被称为“背照式”冷却CCD相机。在更敏感的仪器中,冷却是通过使用例如液氮实现的,这使得CCD阵列的温度接近-120℃。“背照式”是指超薄背板,其减小了待检测光子跟踪路径长度,从而提高了量子效率。特别灵敏的背照式低温CCD相机是“TECH 512”,可从Photometries,Ltd.(Tucson,Ariz.)获得的200系列相机。

[0168] “光子放大装置”在光子击中检测屏之前放大光子。这一类包括带增强器,诸如微通道增强器的CCD相机。微通道增强器通常含有垂直于相机检测屏并与相机检测屏共同延伸的金属通道阵列。微通道阵列置于待成像的样品、受试者或动物与相机之间。进入阵列通道的大多数光子在离开之前接触通道的一侧。施加在阵列上的电压导致每次光子碰撞释放许多电子。来自此类碰撞的电子以“霰弹(shotgun)”模式离开其原点通道,并通过相机检测到。

[0169] 通过将增强微通道阵列串联放置可以实现更高的灵敏度,使得在第一阶段产生的电子转而在第二阶段产生电子的放大信号。然而,实现灵敏度增加,以空间分辨率为代价,分辨率随着每个额外放大阶段而降低。示例性的基于微通道增强器的单光子检测装置是可从Hamamatsu获得的C2400系列。

[0170] 图像处理器处理由光检测器装置产生的信号,该光检测器装置对光子进行计数以便构建图像,该图像可以例如在监视器上显示或在视频打印机上打印。此类图像处理器通常作为包括上述灵敏光子计数相机的系统的一部分出售,因此可从相同的来源获得。通常将图像处理器连接到个人计算机,例如IBM兼容的PC或Apple Macintosh(Apple Computer,Cupertino,Calif),其可以作为购买的成像系统的一部分包括在内或不包括在内。一旦图像以数字文件的形式存在,就可以通过各种图像处理程序(诸如“ADOBE PHOTOSHOP”,Adobe Systems,Adobe Systems,Mt.View,Calif.)对其进行操纵和打印。

[0171] 在一个实施方案中,生物样品含有来自试验受试者的蛋白质分子。一种优选的生

物样品是通过常规方法从受试者分离的外周血白细胞样品。

[0172] 本发明还涵盖用于检测生物样品中GITR或GITR表达细胞的存在的试剂盒。例如，试剂盒可包含：能够检测生物样品中的癌症或肿瘤细胞的经标记化合物或试剂（例如，抗GITR scFv或单克隆抗体）；用于测定样品中GITR量的工具；和用于比较样品与标准品中的GITR量的工具。在一些实施方案中，该标准品是非癌细胞或其细胞提取物。可以将化合物或试剂包装在合适的容器中。该试剂盒还可包括使用该试剂盒检测样品中的癌症的说明书。

[0173] 双特异性抗体

[0174] 双特异性抗体 (bsAb) 是包含两个可变结构域或scFv单元的抗体，使得所得抗体识别两种不同的抗原。本发明提供识别GITR和第二抗原的双特异性抗体。示例性的第二抗原包括肿瘤相关抗原、细胞因子和细胞表面受体。在一些实施方案中，第二抗原可以是CAIX（碳酸酐酶IX或G250）、IL-10或CCR4。在一些实施方案中，第二抗原可以是细胞表面受体，其中细胞表面受体是PD-1、PDL1、CCR4、IL21R、BTLA、HVEM或TIM3。本发明的双特异性抗体包含本文公开的huGITR抗体的重链和轻链组合或scFv。

[0175] 双特异性抗体的构建

[0176] 可以使用本领域已知的方法构建本发明的双特异性抗体。在一些实施方案中，双特异性抗体是单个多肽，其中两个scFv片段通过足够长度的长接头多肽连接，以允许两个scFv单元之间的分子内缔合形成抗体。在其它实施方案中，双特异性抗体是一个以上通过共价键或非共价键连接的多肽。

[0177] 在另一个实施方案中，使用“旋钮入孔 (knob into hole)”方法构建双特异性抗体 (Ridgway等人, Protein Eng 7:617-621 (1996))。在这种方法中，两个不同可变结构域的Ig重链被还原以选择性地破坏重链配对，同时保留重链-轻链配对。混合识别两种不同抗原的两种重链-轻链异二聚体以促进通过CH3结构域的工程化“旋钮入孔”介导的异连接 (heteroligation) 配对。

[0178] 在另一个实施方案中，可以通过交换来自两种或更多种不同抗体的重链-轻链二聚体来构建双特异性抗体以产生杂合抗体，其中第一重链-轻链二聚体识别GITR而第二重链-轻链二聚体识别第二抗原。重链-轻链二聚体的机制类似于人IgG4的形成，其也起双特异性分子的作用。IgG重链的二聚化受分子内力驱动，诸如配对每条重链的CH3结构域和二硫桥。已显示CH3结构域 (R409) 中存在特定的氨基酸会促进二聚体交换和IgG4分子的构建。重链配对也通过抗体铰链区中的重链间二硫键进一步稳定。具体地，在IgG4中，铰链区在氨基酸226-230处含有氨基酸序列Cys-Pro-Ser-Cys (与含有序列Cys-Pro-Pro-Cys的稳定IgG1铰链区相比)。已将位置229处这种丝氨酸的序列差异与IgG4在铰链区形成新型链内二硫键的趋势联系起来 (Van der Neut Kolfshoten, M. 等人, 2007, Science 317:1554-1557 和Labrijn, A.F. 等人, 2011, Journal of immunol 187:3238-3246)。

[0179] 因此，通过在CH3结构域中引入R409残基和在识别GITR或第二抗原的抗体的铰链区中引入Cys-Pro-Ser-Cys序列，可以产生本发明的双特异性抗体，使得重链-轻链二聚体交换以产生具有一个识别GITR的重链-轻链二聚体和识别第二抗原的第二重链-轻链二聚体的抗体分子，其中第二抗原是本文公开的任何抗原。如本文所公开的，还可以改变已知的IgG4分子，使得重链和轻链识别GITR或第二抗原。由于IgG4分子的固有特征，使用该方法构建本发明的双特异性抗体可能是有益的，其中Fc区与其它IgG亚型的不同之处在于它与免

疫反应的效应系统,例如由某些白细胞表达的补体和Fc受体相互作用不良。这种特定性质使得这些基于IgG4的双特异性抗体对治疗应用具有吸引力,其中需要抗体结合靶标并在功能上改变与靶标相关的信号传导途径,但不触发效应子活性。

[0180] 在一些实施方案中,将突变引入bsAb的恒定区,使得bsAb的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性改变。例如,突变是CH2结构域中的LALA突变。一方面,bsAb在异二聚体bsAb的一个scFv单元上含有突变,这降低了ADCC活性。另一方面,bsAb在异二聚体bsAb的两条链上均含有突变,这完全消除了ADCC活性。例如,引入bsAb一个或两个scFv单元的突变是CH2结构域中的LALA突变。可以优化这些具有可变ADCC活性的bsAb,使得bsAb对表达bsAb识别的一种抗原的细胞表现出最大的选择性杀伤作用,然而对bsAb识别的第二种抗原表现出最小的杀伤作用。

[0181] 本文公开的双特异性抗体可用于治疗疾病或医学病状,例如癌症。本发明的双特异性抗体尤其可用于与Treg增加相关的疾病或医学病状。

[0182] 治疗方法

[0183] 本发明提供了治疗处于(或易患)癌症或其它细胞增殖相关疾病或病症风险的受试者的预防和治疗的方法。此类疾病或病症包括但不限于例如与GITR异常表达相关的那些疾病或病症。例如,所述方法用于治疗、预防或缓解癌症症状。可替代地,该方法用于治疗、预防或缓解GITR在T细胞反应中起负调节作用的癌症症状。可替代地,该方法用于治疗、预防或缓解实体瘤的症状,诸如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、皮肤癌、肝癌、胰腺癌或胃癌。另外,本发明的方法用于治疗血液学癌症,诸如白血病和淋巴瘤。可替代地,该方法用于治疗、预防或缓解已经转移的癌症的症状。

[0184] 因此,一方面,本发明提供了通过向受试者施用本发明的单克隆抗体、scFv抗体或双特异性抗体来预防、治疗或缓解受试者中的癌症或细胞增殖性疾病或病症的症状的方法。例如,可以按治疗有效量施用huGITR抗体。

[0185] 处于癌症或细胞增殖相关疾病或病症风险的受试者包括有癌症家族史的患者或暴露于已知或疑似致癌剂的受试者。预防剂的施用可以在癌症表现之前进行,从而预防疾病,或者可替代地延迟其进展。

[0186] 另一方面,通过使细胞与本发明的GITR抗体接触来抑制肿瘤细胞生长,降低Treg活性,增加Teff活性或增加NK细胞的细胞毒性。细胞是表达GITR的任何细胞。例如,细胞为T细胞或NK细胞。

[0187] 本发明还包括增加或增强对抗原的免疫反应的方法。通过向受试者施用本发明的单克隆抗体或scFv抗体来增加或增强免疫反应。例如通过增大抗原特异性T效应子功能来增大免疫反应。抗原是病毒(例如HIV)、细菌、寄生虫或肿瘤抗原。免疫反应是天然免疫反应。天然免疫反应意指作为感染结果的免疫反应。感染为慢性感染。增加或增强对抗原的免疫反应可通过本领域已知的许多方法测量。例如,可以通过测量以下任何一项来测量免疫反应:T细胞活性、T细胞增殖、T细胞活化、效应细胞因子的产生和T细胞转录谱。

[0188] 可替代地,免疫反应是由疫苗接种诱导的反应。因此,另一方面,本发明提供了通过向受试者施用本发明的单克隆抗体或scFv抗体和疫苗来增加疫苗效率的方法。抗体和疫苗依次或同时施用。疫苗是肿瘤疫苗、细菌疫苗或病毒疫苗。

[0189] 组合方法

[0190] 本发明提供了通过施用结合GITR蛋白的相同表位或可替代地结合GITR蛋白的两个不同表位的两种不同抗体来治疗患者的癌症。可替代地,通过施用结合GITR的第一抗体和结合除GITR以外的蛋白质的第二抗体来治疗癌症。例如,除GITR以外的其它蛋白质可包括但不限于PD-1、PD-L1、CAIX、CCR4和IL-10。例如,除GITR以外的其它蛋白质是肿瘤相关抗原。

[0191] 在一些实施方案中,本发明提供了huGITR抗体单独或与附加抗体一起施用,所述附加抗体识别除GITR以外的另一种蛋白质,细胞能够实现或增大免疫反应。例如,这些细胞可以是外周血单核细胞(PBMC),或在PBMC中发现的任何细胞类型,例如细胞毒性T细胞、巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0192] 另外,本发明提供了结合GITR蛋白的抗体和抗肿瘤剂或其它治疗剂的施用,所述抗肿瘤剂诸如小分子、生长因子、细胞因子,其它治疗剂包括生物分子诸如肽、肽模拟物、类肽、多核苷酸、脂质衍生介体、小生物胺、激素、神经肽和蛋白酶。小分子包括但不限于无机分子和有机小分子。合适的生长因子或细胞因子包括IL-2、GM-CSF、IL-12和TNF- α 。小分子文库是本领域已知的。(参见Lam, Anticancer Drug Des., 12:145, 1997)。

[0193] 在以下实施例中将进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0194] 实施例

[0195] 实施例1:抗GITR抗体的分离这里的鉴定是描述的十三种抗GITR单克隆抗体的分离。用Mehta I/II噬菌体展示文库,以不同的抗原浓度和洗涤条件进行三轮hGITR-mIg淘选。以不同的抗原浓度和洗涤条件进行两轮mGITR-his淘选。然后进行ELISA测定,用来自第二轮的2 μ g/ml的hGITR-mIgG2a或mGITR-His筛选来自第二轮和第三轮的单克隆物。对ELISA阳性克隆物进行测序并用第二ELISA测定确认,包括如图1中所述的阴性对照。鉴定了43种独特克隆物。

[0196] 使用MSD(中尺度发现系统)在两种不同浓度的hGITR-mIgG2a抗原和四种不同浓度的PEG纯化的抗GITR噬菌体-AB中进一步测试克隆与hGITR的结合(图2)。进行第二个实验,测试8种浓度的hGITR-mIg和恒定数量的PEG纯化的抗GITR噬菌体-AB(图3)。

[0197] 实施例2:来自HGTR和MGTR淘选的ELISA阳性和FACS阳性克隆物的表征。

[0198] 在使用hGITR-mIg淘选进行初始ELISA和FACS筛选后,总共鉴定了29种独特克隆物。在ELISA分析后,鉴定出这些克隆物中有10种与抗hGITR结合但不与hGITR-His结合。这些克隆物中有19种与hGITR-mIg和His两者结合,这些中有4种具有较弱的结合效率。15种克隆物在FACS分析中为阳性,其中3种具有比其它克隆物更弱的结合。在两轮mGITR-His淘选后,总共还有六种ELISA独特阳性克隆物。这些克隆物中有四种仅与抗mGITR-His结合,两种与mGITR-His和hGITR-his两者结合。针对mGITR选择一种scFV,但它与hGITR-mIg和-His强烈反应。

[0199] 实施例3:抗GITR抗体的表征

[0200] 使用四种不同浓度的抗GITR噬菌体-AB测试抗GITR的结合。另外,测试表达GITR或CA9的稳定CHO细胞的抗GITR抗体结合。使用FACS分析测定GITR结合的FITC阳性CHO细胞的百分比显示在图4中。用来自单个集落的噬菌体上清液以单一浓度进行第三次FACS GITR结合测定(图5)。该分析揭示抗GITR抗体结合表达GITR的CHO细胞而非表达CA9的CHO细胞。选

择对GITR结合呈阳性的那些用于使用单一浓度的来自单集落的噬菌体上清液进行进一步ELISA分析(图6)。图7中列出了流式细胞术和ELISA均为阳性的所选抗GITR抗体的最终列表。

[0201] 实施例4: IGG1-FC (LALA) 突变体形式和IGG4形式的抗GITR MAB的构建和表达

[0202] 将我们新发现的抗GITR噬菌体scFv抗体的VH和VL片段经PCR克隆到哺乳动物表达载体TCAE中,以IgG1Fc (LALA) 突变体形式或IgG4形式表达,两种形式均具有降低的或最小的ADCC活性。在293F细胞体外转染后,收获细胞上清液并通过人IgG定量测定法定量IgG浓度。然后使用流式细胞术将上清液用于测试这些IgG mAb与GITR (+) CHO细胞的GITR结合活性。图8-10中提供的结果证明,大多数抗GITR抗体在转化为IgG形式后保持其GITR结合活性。

[0203] 实施例5: GITR配体与抗GITR抗体之间的结合竞争

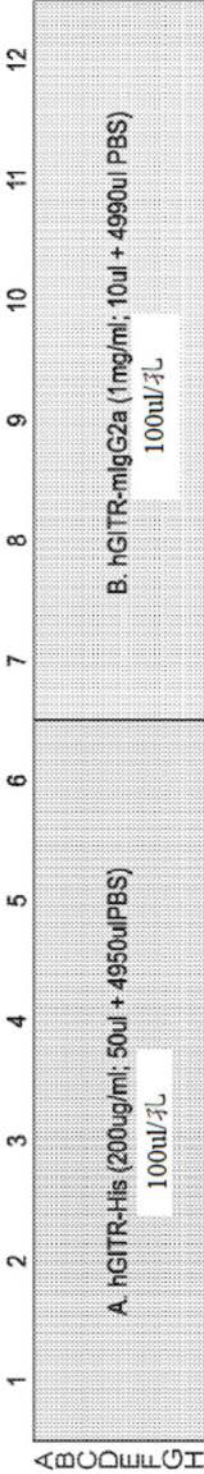
[0204] 为了进一步表征我们新发现的抗GITR抗体,分别通过流式细胞术在增加量的纯化抗GITR E1-3H7 IgG4或TT1-3C6 IgG4与恒定浓度的GITR配体之间进行竞争性结合测定。图11显示GITR配体的结合(通过Alexa 488标记的抗HA标签检测)随着增加抗GITR抗体的量(通过PE标记的小鼠抗人抗体检测)而减少,虽然程度较轻,但这是与商用GTI10抗体共有的特征。当NF- κ B-luc2P/GITR Jurkat报告细胞与浓度增加的抗GITR E1-3H7 IgG4或TT1-3C6 IgG4抗体以及恒定浓度的GITR配体一起温育时,荧光素酶活性增加到远高于当细胞与配体或单独的抗GITR抗体一起温育时的水平,这不是与商用GTI10抗体共有的特征(图12)。这些结果表明抗GITR E1-3H7 IgG4或TT1-3C6可以通过协同增加Promega的GloResponse™ NF- κ B-luc2P/GITR Jurkat细胞中GITR配体诱导的荧光素酶表达。

[0205] 其它实施方案

[0206] 虽然本发明已经结合其详述进行了描述了,但是前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1-3A1	ET1-3B1	P3-2B8	P4-2F8	TT1-3C6	TT5-3E2	E1-3A1	ET1-3B1	P3-2B8	P4-2F8	TT1-3C6	TT5-3E2
B	E1-3B4	ET1-3D6	P3-2E11	T1-3D1	TT1-3C8	TT5-3E5	E1-3B4	ET1-3D6	P3-2E11	T1-3D1	TT1-3C8	TT5-3E5
C	E1-3E5	ET1-3E12	P3-2H7	T1-3G7	TT1-3D6	TT5-3E7	E1-3E5	ET1-3E12	P3-2H7	T1-3G7	TT1-3D6	TT5-3E7
D	E1-3E9	ET1-3F2	P4-2A6	T5-3A1	TT1-3E8	TT5-3G3	E1-3E9	ET1-3F2	P4-2A6	T5-3A1	TT1-3E8	TT5-3G3
E	E1-3F6	P1-2A11	P4-2B7	T5-3A7	TT1-3F5	TT5-3H7	E1-3F6	P1-2A11	P4-2B7	T5-3A7	TT1-3F5	TT5-3H7
F	E1-3H7	P2-2B5	P4-2C8	T5-3B12	TT1-3F6	2XYT	E1-3H7	P2-2B5	P4-2C8	T5-3B12	TT1-3F6	2XYT
G	E5-3B2	P2-2D12	P4-2F1	T5-3D4	TT1-3F9	2XYT	E5-3B2	P2-2D12	P4-2F1	T5-3D4	TT1-3F9	2XYT
H	2 X YT	P2-2E10	P4-2F2	T5-3H11	2 X YT	2 X YT	2 X YT	P2-2E10	P4-2F2	T5-3H11	2 X YT	2 X YT

平板1: 涂覆模式



平板2: 涂覆模式

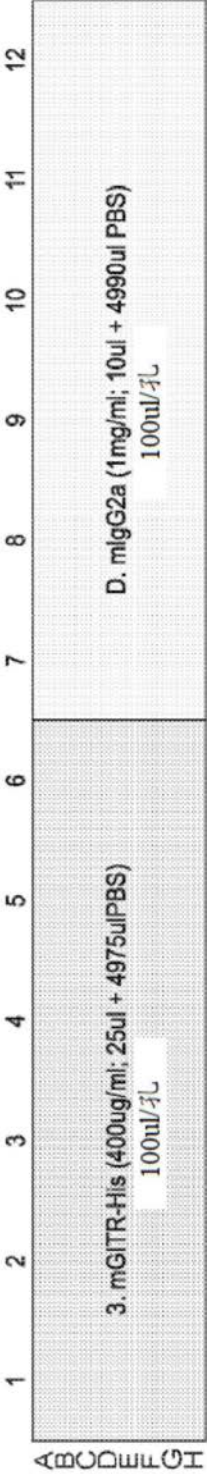


图1

平板1	hGITR-His	hGITR-His	hGITR-His	hGITR-His	hGITR-His	hGITR-His	hGITR-mIgG	hGITR-mIgG	hGITR-mIgG	hGITR-mIgG	hGITR-mIgG	hGITR-mIgG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.052	1.828	0.616	0.048	1.996	0.254	1.895	1.936	0.062	0.054	2.156	0.973
B	1.087	1.097	0.051	0.209	1.405	0.046	2.171	1.974	0.044	1.533	1.845	1.534
C	0.763	0.091	0.047	0.412	1.983	0.045	1.992	1.789	0.053	2.086	2.146	2.157
D	0.821	0.052	1.982	0.047	0.054	0.048	1.949	1.908	0.046	0.052	2.481	1.563
E	1.855	2.085	0.488	0.047	1.131	0.049	2.197	2.473	0.492	0.045	1.452	1.478
F	1.957	1.261	0.054	0.217	0.048	0.094	2.165	1.698	0.046	1.763	1.253	0.043
G	1.950	0.671	0.067	0.049	0.046	0.044	2.071	2.014	0.047	0.045	0.425	0.044
H	0.057	0.374	1.407	0.060	0.054	0.045	0.056	0.462	1.282	1.264	0.054	0.053

平板2	mGITR-His	mGITR-His	mGITR-His	mGITR-His	mGITR-His	mGITR-His	mIgG2a	mIgG2a	mIgG2a	mIgG2a	mIgG2a	mIgG2a
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.071	0.053	1.450	0.423	0.052	0.047	0.066	0.058	0.116	0.048	0.106	0.072
B	0.050	0.047	0.044	0.046	0.043	0.042	0.044	0.608	0.056	0.069	0.061	1.861
C	0.069	0.047	1.854	0.044	0.046	0.044	0.048	0.077	0.188	0.050	0.041	0.054
D	0.048	0.058	2.175	0.041	0.045	0.047	0.078	0.046	0.053	0.043	0.048	0.455
E	0.063	0.049	0.366	0.042	0.045	0.044	0.140	0.064	0.601	0.088	0.067	0.050
F	0.055	0.050	1.985	0.049	0.047	0.043	0.044	0.124	0.049	0.046	0.519	0.054
G	0.057	0.055	0.938	0.061	0.043	0.045	0.047	0.045	0.217	0.064	0.046	0.051
H	0.051	0.112	0.160	0.054	0.051	0.053	0.047	1.083	0.395	0.433	0.049	0.050

图1续

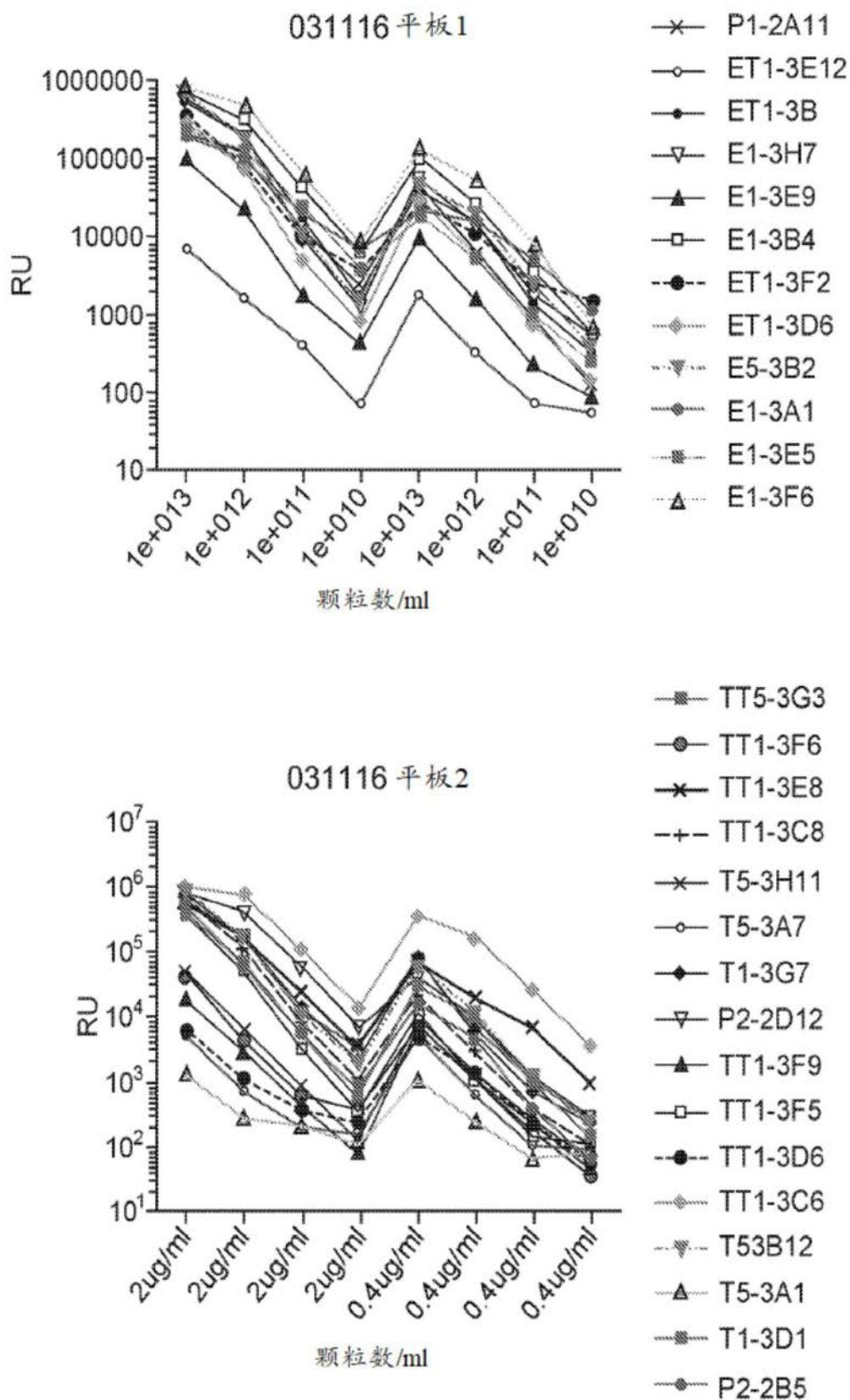


图2

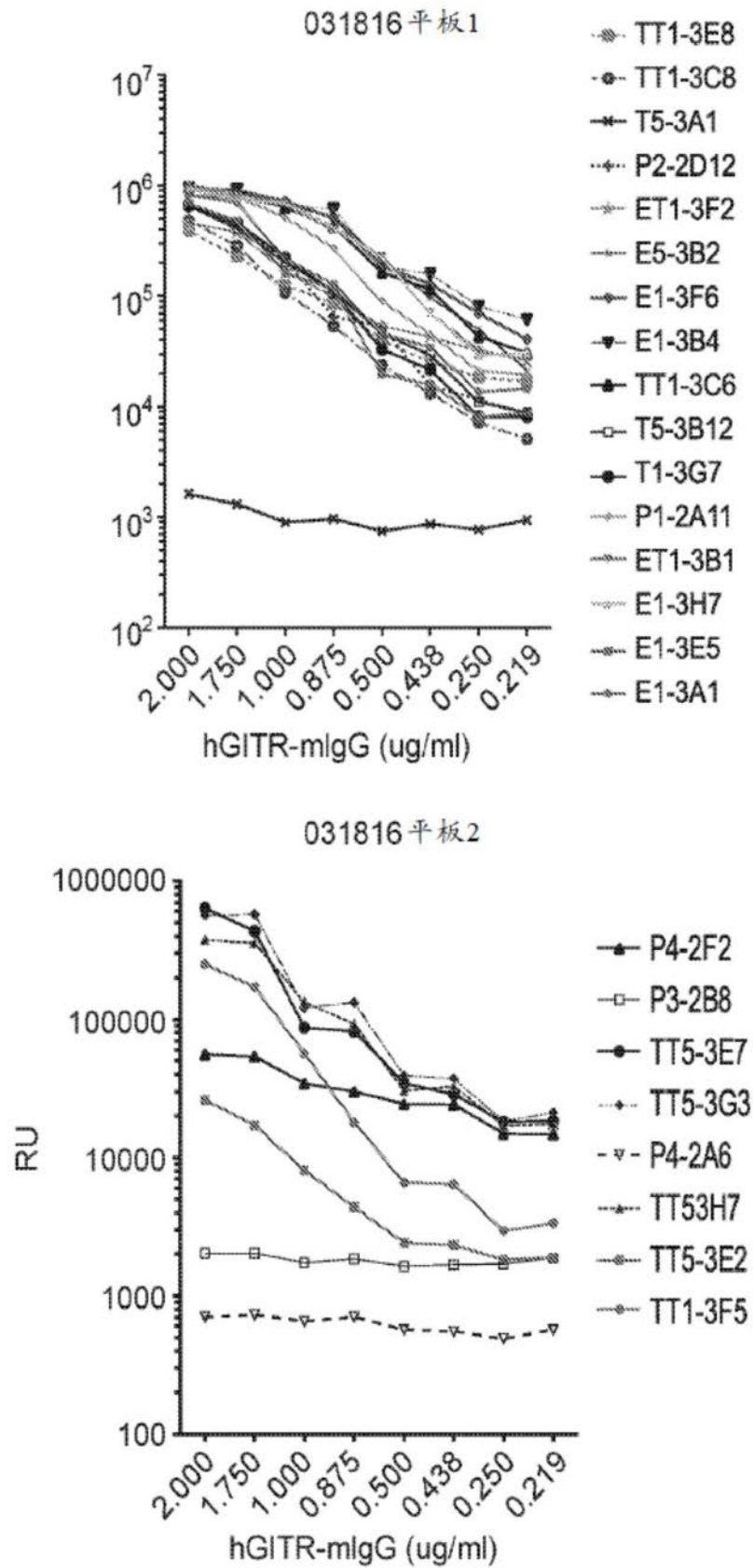


图3

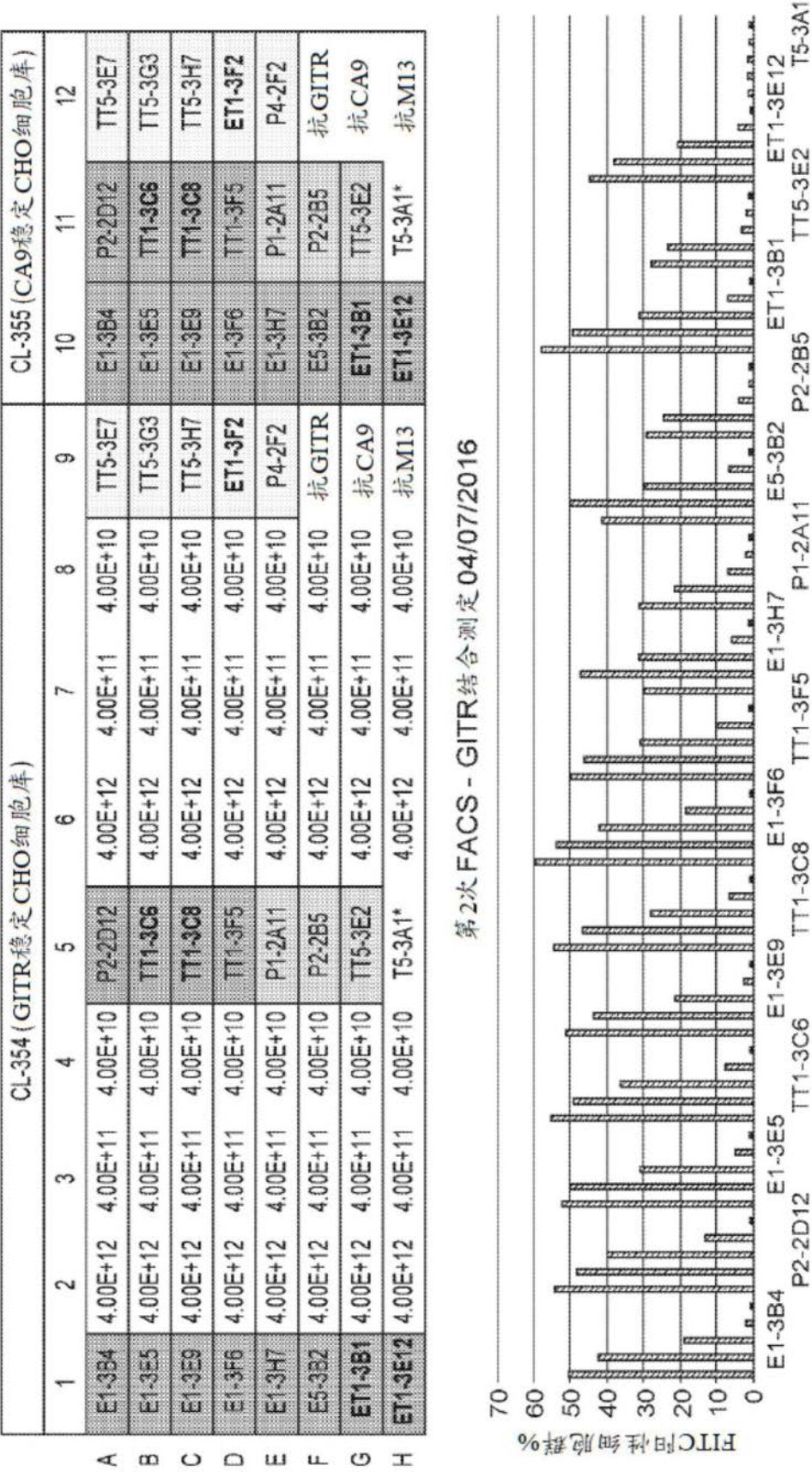
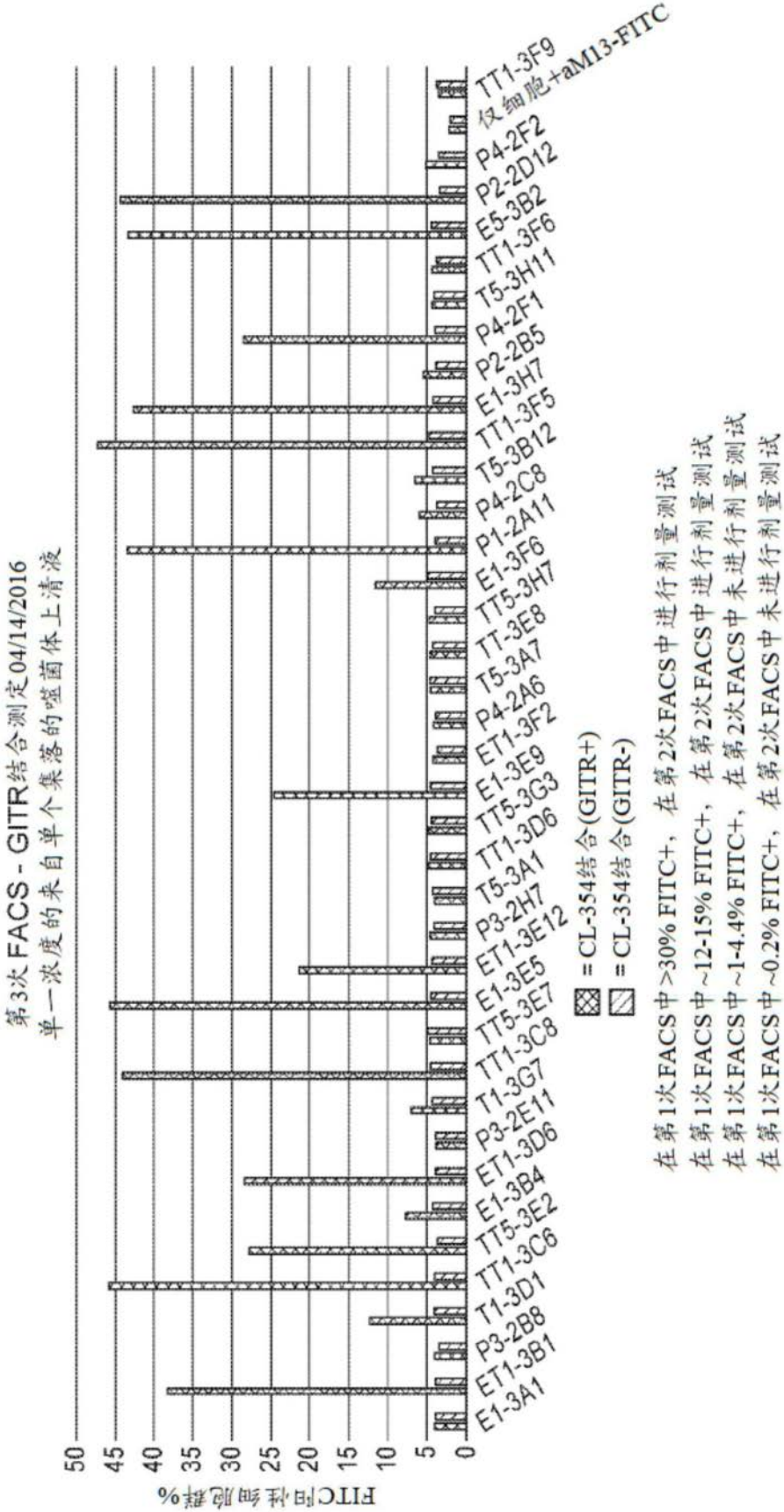


图4



在第1次FACS中>30% FITC+, 在第2次FACS中进行剂量测试
在第1次FACS中~12-15% FITC+, 在第2次FACS中进行剂量测试
在第1次FACS中~1-4.4% FITC+, 在第2次FACS中未进行剂量测试
在第1次FACS中~0.2% FITC+, 在第2次FACS中未进行剂量测试

图5

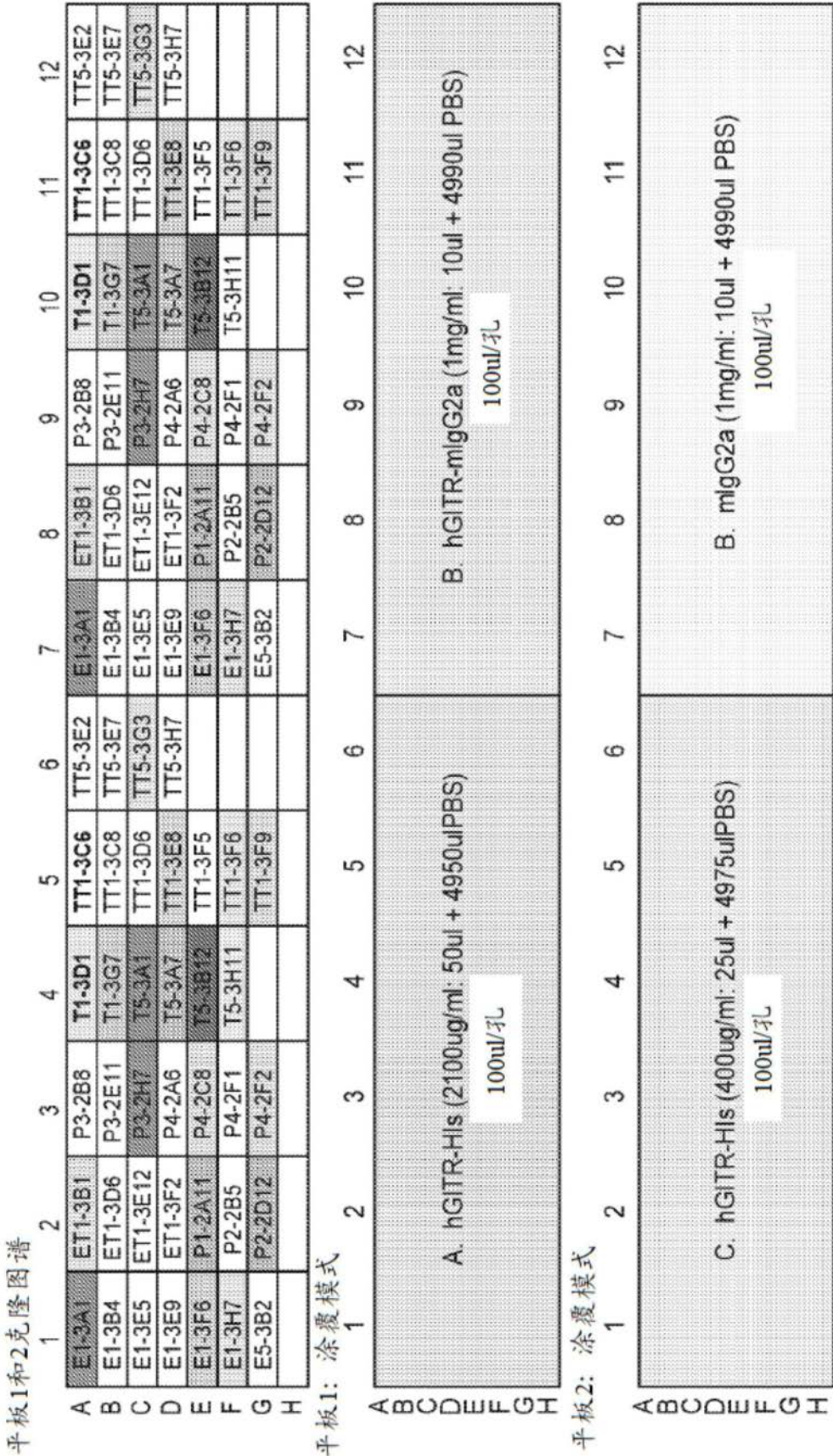


图6

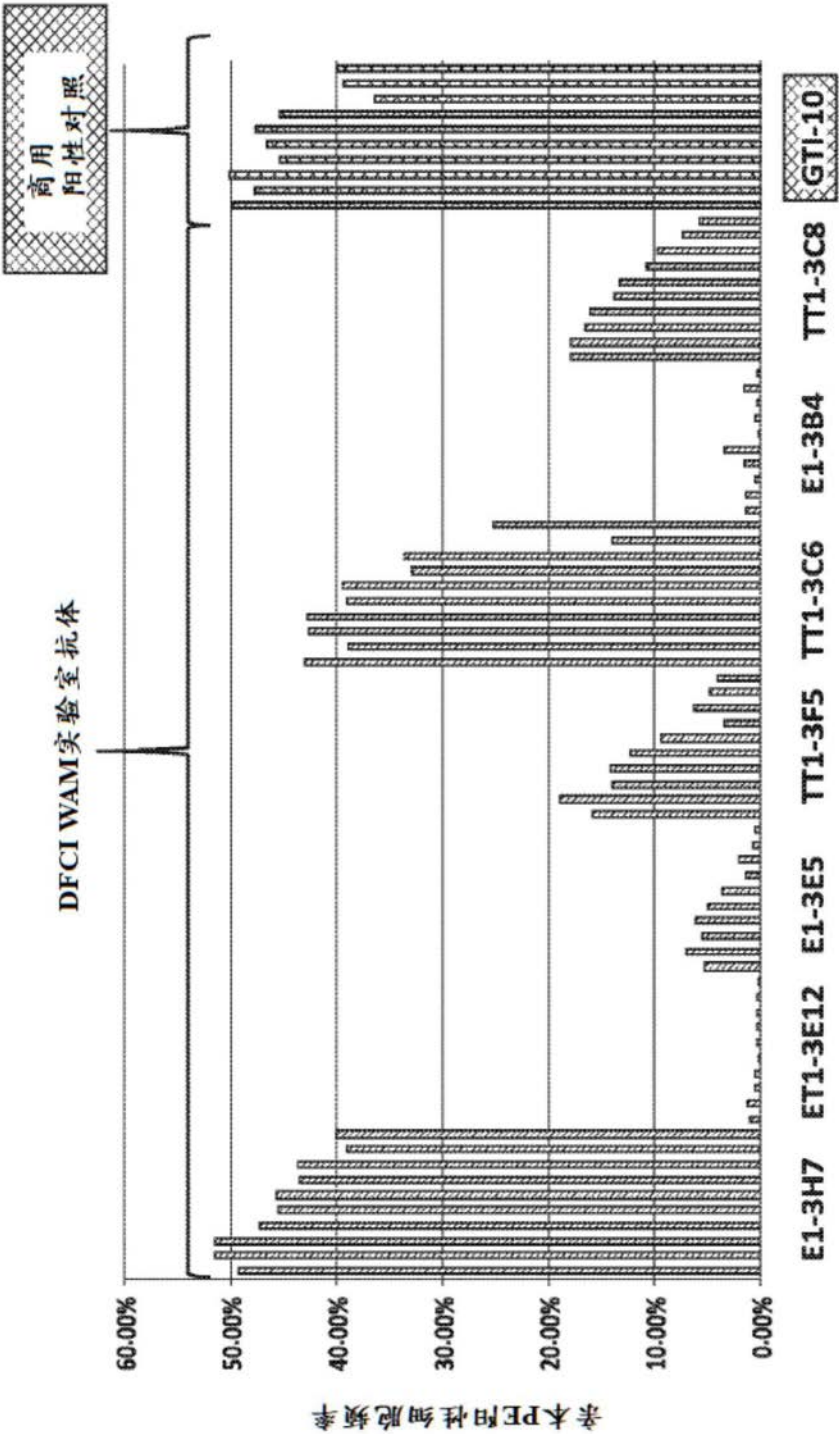
平板1		OD450											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.058	1.593	0.175	0.148	1.440	0.217	1.361	1.340	0.056	0.779		1.297	1.025
B	0.554	0.834	0.306	0.131	0.726	0.076	1.556	1.341	0.105	1.205		1.228	1.328
C	0.612	0.073	0.058	0.065	0.063	0.063	1.813	0.709	0.058	0.057		0.078	1.029
D	0.476	0.078	0.426	0.056	0.071	0.056	1.419	0.706	0.066	0.073		0.908	1.665
E	1.714	1.286	0.130	0.186	1.839	0.053	1.952	1.663	0.958	1.085		1.980	0.051
F	1.143	0.071	1.266	0.063	0.048	0.058	1.585	0.060	1.474	0.792		0.857	0.084
G	1.261	0.504	0.088	0.086	0.705	0.083	1.624	1.709	0.484	0.055		0.792	0.073
H	0.048	0.057	0.053	0.063	0.048	0.082	0.082	0.101	0.050	0.060		0.048	0.053

平板2		OD450											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.067	0.233	0.834	0.054	0.052	0.049	1.304	0.316	0.818	0.065	0.679	0.085	
B	0.055	0.047	0.563	0.044	0.044	0.043	0.056	0.125	0.051	0.049	0.306	1.712	
C	0.049	0.048	1.511	0.044	0.043	0.044	0.050	0.066	0.110	0.055	0.305	0.947	
D	0.047	0.049	0.921	0.045	0.044	0.046	0.162	0.745	0.096	0.718	1.044	1.864	
E	0.054	0.052	0.049	0.044	0.046	0.044	0.927	0.520	0.046	0.052	1.127	0.055	
F	0.048	0.282	0.053	0.044	0.043	0.045	0.399	0.057	0.050	0.604	0.718	0.056	
G	0.059	0.048	0.046	0.044	0.087	0.046	0.410	0.051	0.347	0.050	0.249	0.055	
H	0.096	0.060	0.055	0.051	0.047	0.044	0.049	0.051	0.052	0.049	0.056	0.063	

图6(续)

	4/20/16 ELISA	4/14/16 FACS	先前剂量 反应FACS
E1-3B4	++++	+	是
E1-3E5	++++	++++	是
E1-3E9	+++	++	是
E1-3F6	++++/++	+	是
E1-3H7	++++/+	++++	是
E5-3B2	++++/+	++++	是
ET1-3B1	+++/+	+++	是
ET1-3D6	+++	++	
ET1-3E12	++	++	是
P1-2A11	++++/++	++++	是
P2-2D12	++++	++++	是
P4-2F1	+++	++	
T1-3G7	+++	+	
TT1-3C6	+++ / ++	++++	是
TT1-3C8	+++ / +	++++	是
TT1-3F5	++++ / +++	++++	是
TT5-3E2	+++	++	是

图7



通过5-点2X连续稀释来测试结合GTR(+) CHO细胞系的抗GTR mAb, 一式两份。每种mAb起始浓度为1.5ug/ml, 除ET1-3F5以1ug/ml开始和TT1-3C6以0.75ug/ml开始外。注意, 每种最高浓度的mAb显示不与GTR(-)对照细胞结合(数据未示出)。

图8

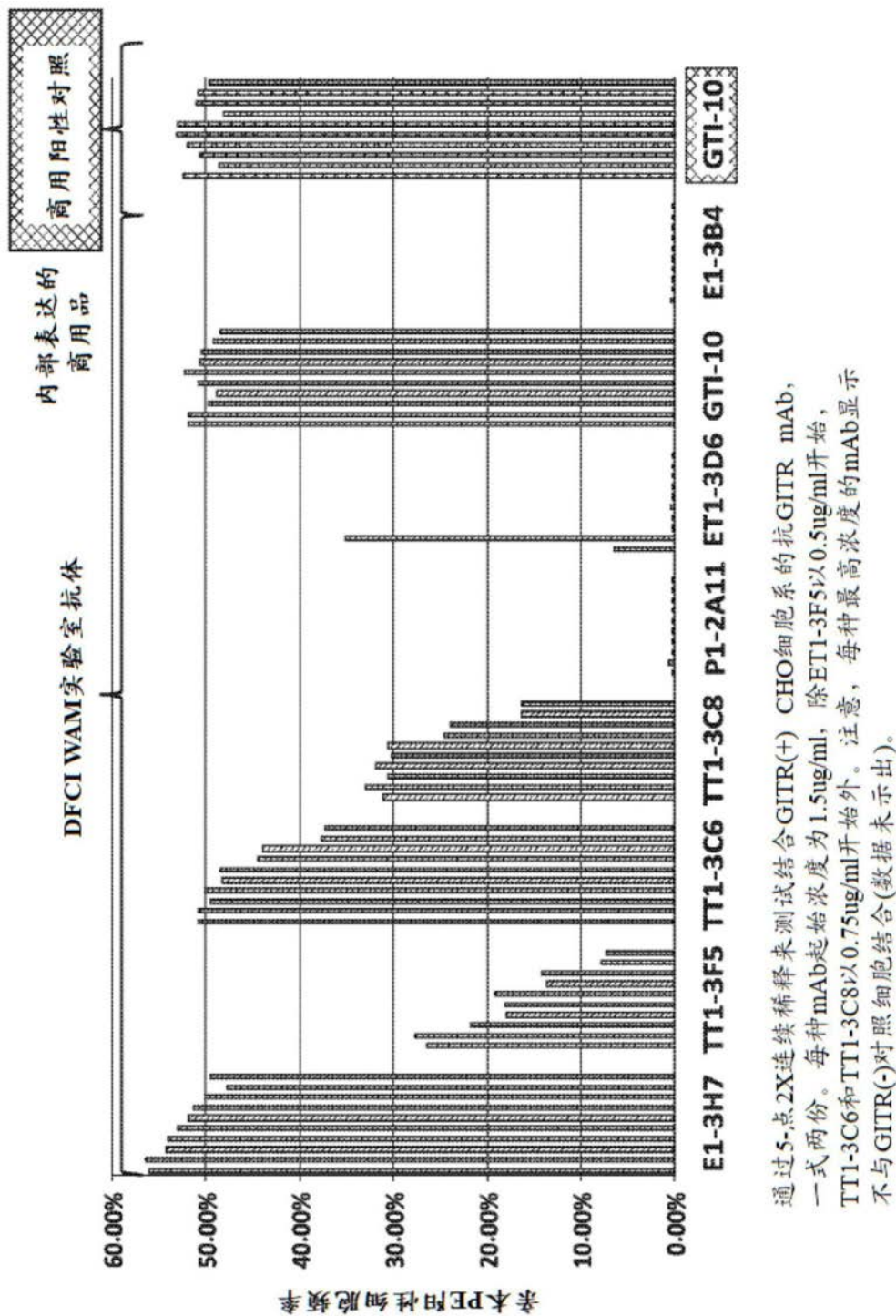


图9

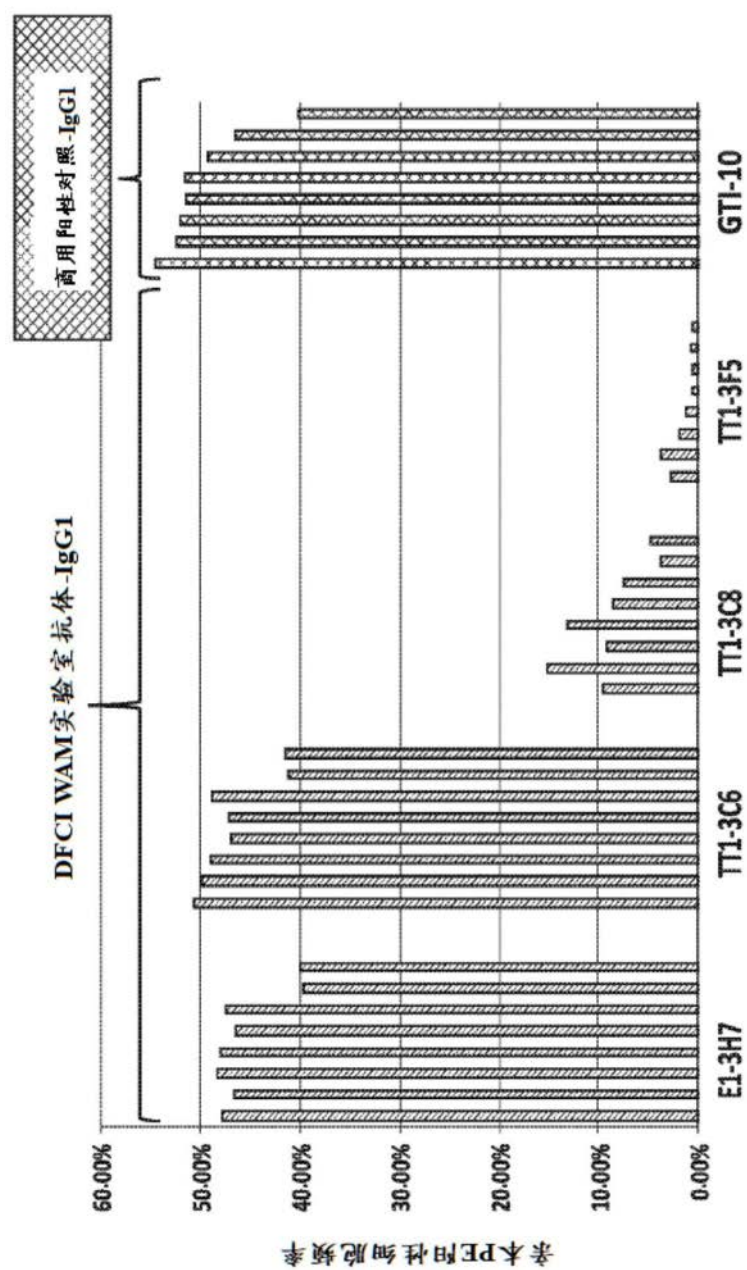
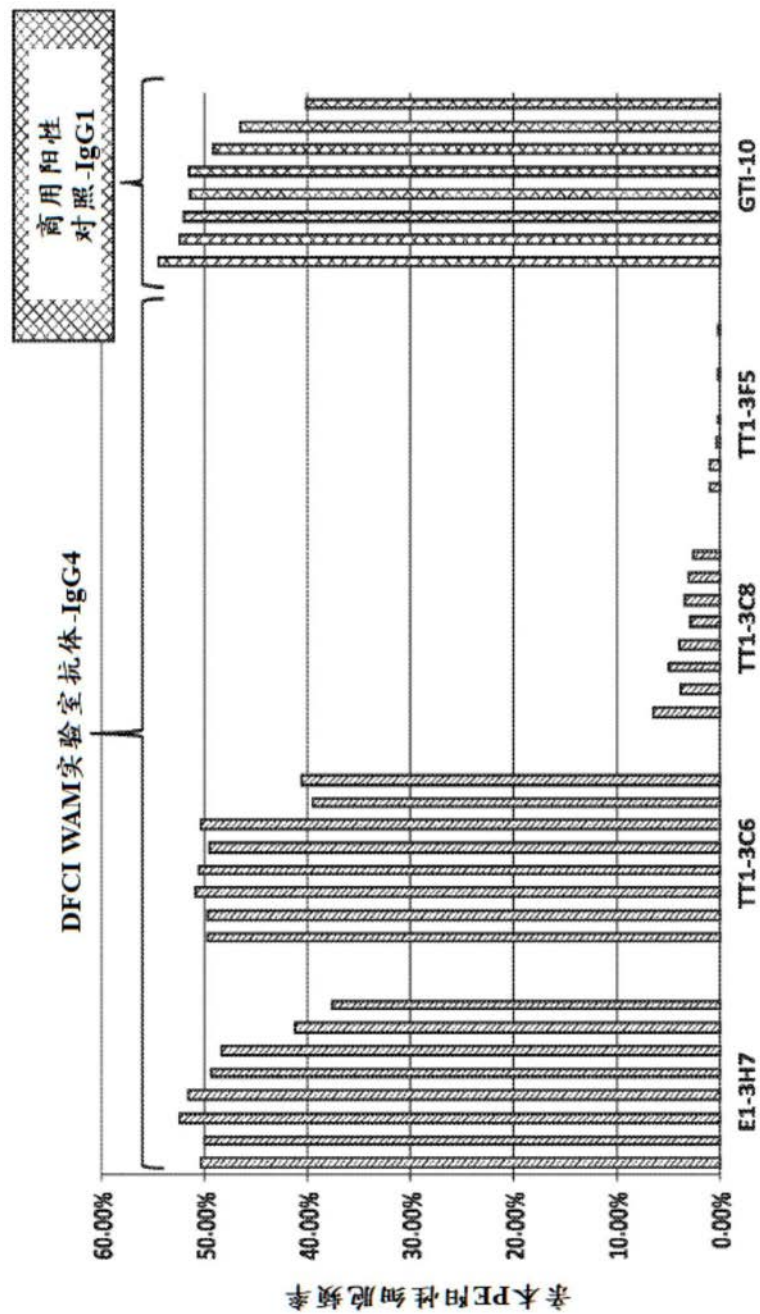


图10A

通过4-点2X连续稀释来测试结合GITR(+) CHO细胞系的抗GITR mAb, 一式两份。
图A中IgG1-FC(LALA)最终浓度为: 0.4ug/ml -> 0.2ug/ml -> 0.1ug/ml -> 0.05ug/ml
除了ET1-3F5以0.25ug/ml稀释液开始, 而E1-3H7和GTI-10以0.7ug/ml开始外。
图B中IgG4最终浓度为: 0.5ug/ml -> 0.2ug/ml -> 0.1ug/ml -> 0.05ug/ml, 除了ET1-3F5以0.2ug/ml
稀释液开始, GTI-10 IgG1以0.7ug/ml开始外。
注意, 每种最高浓度的mAb显示不与GITR(-)对照细胞结合(数据未示出)。



通过4-点2X连续稀释来测试结合GITR(+) CHO细胞系的抗GITR mAb, 一式两份。
图A中IgG1-FC(LALA)最终浓度为: 0.4ug/ml -> 0.2ug/ml -> 0.1ug/ml -> 0.05ug/ml
除了ET1-3F5以0.25ug/ml稀释液开始, 而E1-3H7和GTI-10以0.7ug/ml开始外。
图B中IgG4最终浓度为: 0.5ug/ml -> 0.2ug/ml -> 0.1ug/ml -> 0.05ug/ml,
除了ET1-3F5以0.2ug/ml稀释液开始, GTI-10 IgG1以0.7ug/ml开始外。
注意, 每种最高浓度的mAb显示不与GITR(-)对照细胞结合(数据未示出)。

图10B

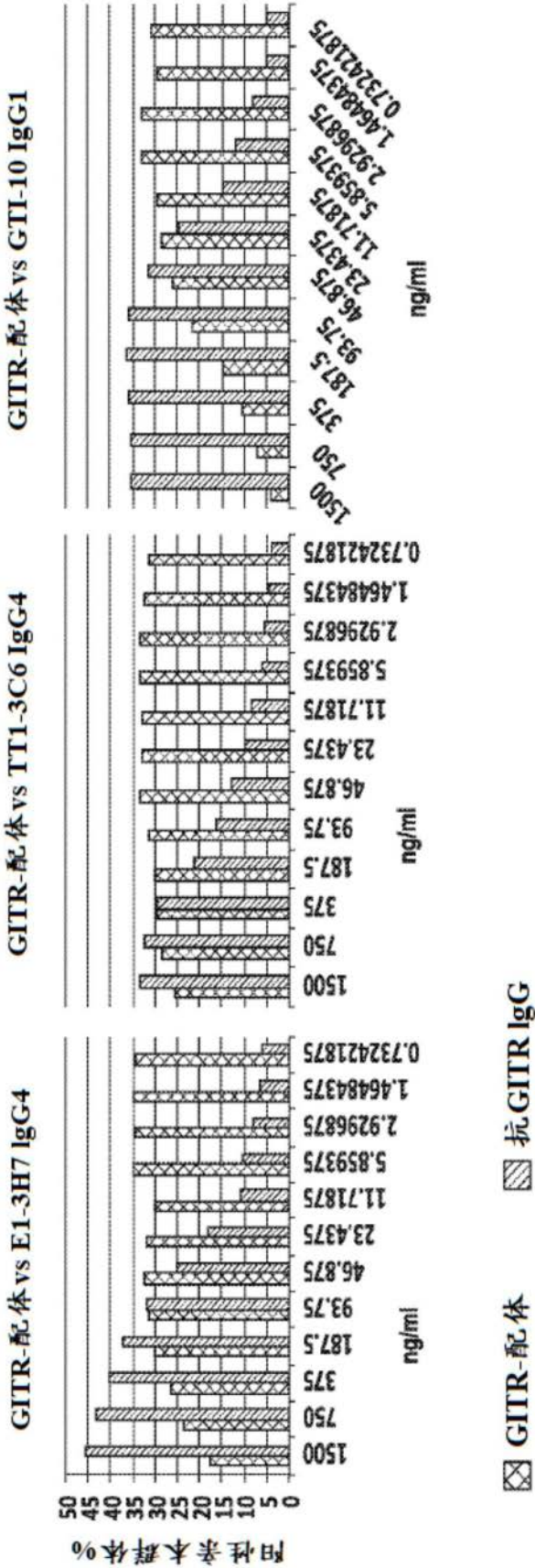


图11

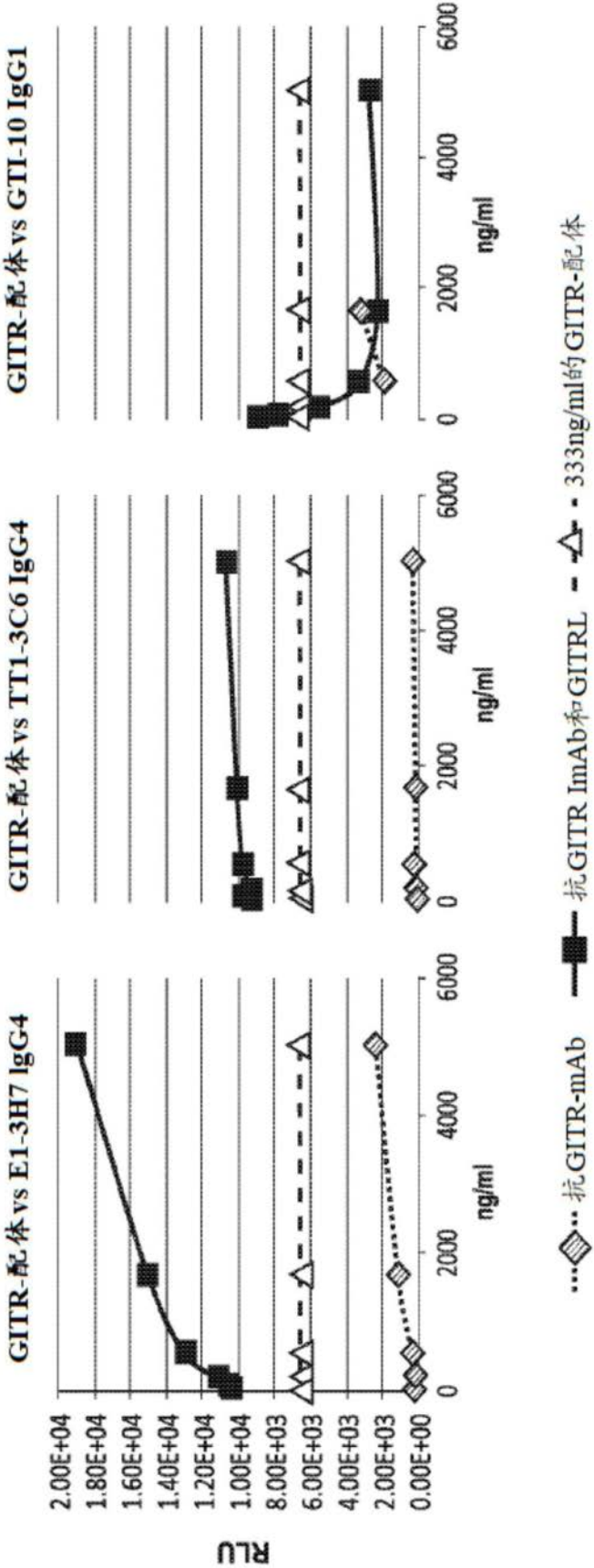


图12