



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116789832 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202310929184.9

司

(22) 申请日 2018.06.22

(72) 发明人 奥勒·奥尔森 夏冬

戴维·耶利曼

布莱恩·科瓦切维奇

比尔·布雷迪 布莱尔·伦肖

高泽人 朱义

(30) 优先权数据

62/524,554 2017.06.25 US

62/524,557 2017.06.25 US

62/524,558 2017.06.25 US

62/545,603 2017.08.15 US

62/551,035 2017.08.28 US

62/551,032 2017.08.28 US

62/551,065 2017.08.28 US

(74) 专利代理机构 北京京万通知识产权代理有

限公司 11440

专利代理师 许天易 徐小琴

(62) 分案原申请数据

201880038385.7 2018.06.22

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 西雅图免疫公司

地址 美国华盛顿州雷德蒙德市东北95街

15318号

申请人 成都百利多特生物药业有限责任公

权利要求书2页 说明书12页

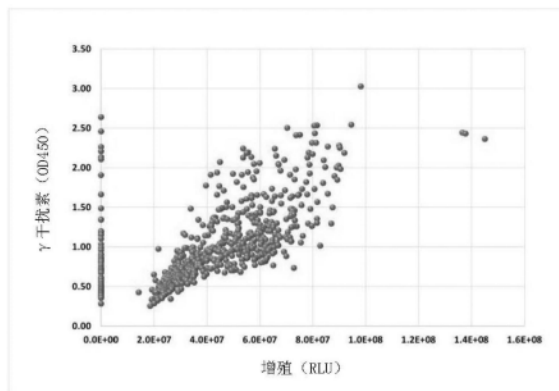
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

抗4-1BB抗体及其制备和使用方法

(57) 摘要

本申请提供了抗4-1BB单克隆抗体、其抗原结合部分、其治疗组合物和/或编码其的核酸,以及它们在治疗癌症和其他T细胞功能障碍中上调T细胞功能以增强细胞介导的免疫应答的用途。



1. 一种特异性结合人或食蟹猴4-1BB的分离的单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段,其包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:256、SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:264、SEQ ID NO:268或SEQ ID NO:272具有至少90%同一性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的分离的mAb或抗原结合片段,其对人或食蟹猴4-1BB具有Kd不大于70nM的结合亲和力。

3. 权利要求1或2的单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段,其包含可变重链氨基酸序列和可变轻链氨基酸序列,其中所述可变重链氨基酸序列包含如下互补决定区序列:SYHMQ、TISSGGNVYYASSARGG和DSGYSDPM,所述可变轻链氨基酸序列包含如下互补决定区序列:QASQNIRTYLS、AAANLAS和QSTYLGTDYVGGGA。

4. 根据权利要求3所述的分离的mAb或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:244所示的人源化轻链可变轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:248所示的人源化重链可变重链氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:244具有同一性不小于98%的轻链可变轻链氨基酸序列和与SEQ ID NO:248具有同一性不小于98%的重链可变重链氨基酸序列。

5. 根据权利要求3所述的分离的mAb或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:108所示的嵌合轻链可变轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:112所示的嵌合重链可变重链氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:108具有同一性不小于98%的轻链可变轻链氨基酸序列和与SEQ ID NO:112具有同一性不小于98%的重链可变重链氨基酸序列。

6. 根据权利要求4所述的分离的mAb或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:243所示的人源化轻链全长氨基酸序列和SEQ ID NO:247所示的人源化重链全长氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:243具有同一性不小于98%的轻链全长氨基酸序列和与SEQ ID NO:247具有同一性不小于98%的重链全长氨基酸序列。

7. 根据权利要求5所述的分离的mAb或抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:107所示的嵌合轻链全长氨基酸序列和SEQ ID NO:111所示的嵌合重链全长氨基酸序列,或包含与SEQ ID NO:107具有同一性不小于98%的轻链全长氨基酸序列和与SEQ ID NO:111具有同一性不小于98%的重链全长氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段,其中所述分离的mAb是人源化抗体、嵌合抗体或重组抗体。

9. 根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段,其中所述分离的mAb是IgG。

10. 根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fv、Fab、F(ab')₂、或scFV片段。

11. 根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段,其中所述分离的mAb是双特异性抗体、三特异性抗体或多特异性抗体。

12. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求1所述的分离的mAb或抗原结合片段。

13. 一种包含权利要求12所述的分离的核酸的表达载体,其中所述载体可在细胞中表达。

14. 一种包含权利要求12所述的核酸的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞。

15. 一种产生抗体的方法,包括培养根据权利要求14所述的宿主细胞以产生抗体。

16. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其还包含放射性同位素、放射性核素、毒素、治疗剂、化疗剂或其组合。

18. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1所述的分离的mAb或其抗原结合片段,其中所述癌症包括表达4-1BB的细胞。

19. 根据权利要求18所述的方法,还包括共同施用有效量的治疗剂。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述受试者是人。

抗4-1BB抗体及其制备和使用方法

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请号:2018800383857;发明名称:抗4-1BB抗体及其制备和使用方法)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年8月28日提交的美国临时专利申请No.62551065、2017年8月28日提交的美国临时专利申请No.62551032、2017年6月25日提交的美国临时专利申请No.62524554、2017年6月25日提交的美国临时专利申请No.62524557、2017年6月25日提交的美国临时专利申请No.62524558、2017年8月15日提交的美国临时专利申请No.62545603、2017年8月28日提交的美国临时专利申请62551032和2017年8月28日提交的美国临时专利申请No.62551035,其全部公开内容通过引用明确地并入本文。

技术领域

[0004] 本公开一般涉及抗体技术领域,更具体地涉及抗4-1BB抗体的制备和使用,以及所述抗体在癌症治疗和疗法中的应用。

背景技术

[0005] 癌症是全世界的主要健康问题。仅在美国,据估计,2016年就诊断出了1,685,210例新癌症病例,并有595,690例死亡(<http://www.cancer.gov>)。因此,任何可降低癌症严重性或死亡率的药剂都是理想的。

[0006] 在免疫系统中,通过由抗原呈递细胞(APC)呈递的外源抗原肽通过T细胞受体(TCR)递送的初级信号,可以活化静息T细胞以应答抗原。除了该初级信号之外,还存在进一步影响T细胞应答的次级正、负共刺激信号。完整的T细胞激活需要次级阳性信号(Lafferty等人,Ausl.J.Exp.Biol.Med.Sci.5327-42(1975))。负的次级信号可导致T细胞抑制和耐受。

[0007] 4-1BB是具有活化T细胞能力的共刺激免疫检查点分子。4-1BB,也称为CD137,肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF9),由淋巴细胞活化(ILA)诱导,是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。据报道CD137的交联增强T细胞增殖、IL-2分泌、存活和细胞溶解活性。此外,它可以增强免疫活性以消除小鼠中的肿瘤。

[0008] 辉瑞公司的Utomilumab(PF-05082566)靶向4-1BB,与默克公司的Keytruda结合使用时,可在一项小型临床试验中刺激对癌症的更强免疫系统攻击(<https://www.reuters.com/article/us-health-cancer-pfizer-immunotherapy-idUSKCN0Y92W2>)。PF-05082566正在进行七项临床试验。(www.clinicaltrials.gov)。

发明内容

[0009] 本公开尤其提供了抗4-1BB单克隆抗体、其抗原结合部分、其治疗组合物和/或编码其的核酸,以及它们在治疗癌症和其他T细胞功能障碍病症中上调T细胞的功能以增强细胞介导的免疫应答的用途。

[0010] 在一个实施方案中,提供了特异性结合人或食蟹猴4-1BB的分离的单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段。在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:256、SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:264、SEQ ID NO:268或SEQ ID NO:272具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0011] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段对4-1BB的结合亲和力Kd不大于30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM或100nM。

[0012] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段表现出一种或多种功能特性,例如但不限于与人或食蟹猴4-1BB的高亲和力结合、抑制人或食蟹猴4-1BB活性、诱导细胞凋亡、调节EGFR信号途径、上调EMT基因、增强T细胞活化、刺激抗体应答、逆转免疫抑制细胞的抑制功能或其组合。在一个实施方案中,免疫抑制细胞包括调节细胞。在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段通过包括T细胞增殖、IFN- γ 和/或IL-2分泌或其组合的机制或途径增强T细胞活化。

[0013] 在一些实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括人构架区。在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括人源化抗体、嵌合抗体或重组抗体。

[0014] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段是IgG。在一个实施方案中,抗原结合片段可包括Fv、Fab、F(ab')₂、scFV或scFV₂片段。在一个实施方案中,分离的mAb可以是双特异性抗体、三特异性抗体或多特异性抗体。

[0015] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括IgG1重链。在一个实施方案中,IgG1重链包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:255、SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:271具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0016] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括 κ 轻链。在一个实施方案中,

κ轻链包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:163、SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:179、SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:195、SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:211、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:1SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:243、SEQ IID NO:257或SEQ ID NO:263具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0017] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括可变轻链。可变轻链包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:260或SEQ ID NO:268具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0018] 在一个实施方案中,分离的mAb或抗原结合片段可包括可变重链。在一个实施方案中,可变重链包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:256、SEQ IID NO:264或SEQ ID NO:272具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0019] 本申请还提供了编码本文公开的分离的mAb或抗原结合片段的至少一部分的分离的核酸。在一个实施方案中,核酸编码IgG1重链,该IgG1重链包含与SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:167、SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:255、SEQ ID NO:263或SEQ ID NO:271具有同源性百分比的氨基酸序列。在一个实施方案中,核酸编码κ轻链,该κ轻链包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:139、SEQ ID NO:147、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:163、SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:179、SEQ ID NO:187、SEQ ID

NO:195、SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:211、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:1SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:257或SEQ ID NO:263具有同源性百分比的氨基酸序列。在一个实施方案中,核酸编码可变轻链,该可变轻链包含与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:140、SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:260或SEQ ID NO:268具有同源性百分比的氨基酸序列。在一个实施方案中,核酸编码可变重链,该可变重链包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:176、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:256、SEQ ID NO:264或SEQ ID NO:272具有同源性百分比的氨基酸序列。该同源性百分比不小于70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0020] 在一个实施方案中,提供了包含至少一种下述分离的核酸的表达载体。在一个实施方案中,载体可在细胞中表达。

[0021] 在一个实施方案中,提供了包含至少一种下述核酸的宿主细胞。在一个实施方案中,提供了包含下述表达载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。

[0022] 本申请还提供了产生本文公开的分离的mAb或抗原结合片段的方法。在一个实施方案中,该方法使用上述宿主细胞。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:提供含有可在宿主细胞中表达的载体的宿主细胞,其中所述表达载体包含至少一种下述核酸;以及培养上述宿主细胞以通过表达上述核酸产生抗体。

[0023] 本申请还提供了免疫缀合物,其包含通过接头与具有本文公开的序列的分离的mAb或抗原结合片段连接的药物单元或显像剂。接头可以是可切割的或不可切割的。在一个实施方案中,接头是化学接头。在一个实施方案中,接头包含共价键如酯键、醚键、胺键、酰胺键、二硫键、酰亚胺键、矾键、磷酸键(phosphate bond)、磷酸酯键(phosphorus ester bond)、肽键、腙键或其组合。在一个实施方案中,接头包含疏水性聚(乙二醇)接头。在一个实施方案中,接头包含肽键。

[0024] 在一个实施方案中,免疫缀合物中的药物单元包括化疗剂、生长抑制剂、卡利奇霉素类药物单元、抗有丝分裂剂、毒素、放射性同位素、治疗剂或其组合。在一个实施方案中,治疗剂包括抗体、酶或其组合。在一个实施方案中,药物单元包括卡利奇霉素、奥佐米星(ozogamicin)、单甲基溴瑞他汀E、美坦新(emtansine)、其衍生物或组合。

[0025] 在一个实施方案中,药物单元选自细胞毒性剂、免疫调节剂、显像剂或其组合。在一个实施方案中,细胞毒性剂选自生长抑制剂或化疗剂,该化疗剂来自微管蛋白结合剂、DNA嵌入剂、DNA烷化剂、酶抑制剂、免疫调节剂、抗代谢剂、放射性同位素或其组合。在一个

实施方案中,细胞毒性剂选自卡利奇霉素、奥佐米星、单甲基澳瑞他汀E、美坦新(emtansine)、其衍生物或组合。在一个实施方案中,免疫调节剂激活或抑制免疫细胞、T细胞、NK细胞、B细胞、巨噬细胞或树突细胞。

[0026] 在一个实施方案中,显像剂可以是放射性核素、荧光剂、量子点或其组合。

[0027] 本申请还提供了药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包括本文公开的分离的mAb或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在一个实施方案中,药物组合物包含免疫缀合物和药学上可接受的载体。

[0028] 在另一方面,本申请提供了治疗癌症的方法。在一个实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的具有本文公开的序列的分离的mAb或抗原结合片段。在一个实施方案中,该方法包括将有效量的单克隆抗体、其抗原结合片段和本文公开的免疫缀合物直接注射到肿瘤部位。

[0029] 在本公开的一些实施方案中,癌症具有表达4-1BB的细胞。可使用所公开的mAb或其抗原结合片段治疗的癌症的实例包括但不限于乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、食管癌、鼻咽癌、肛门癌、直肠癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌或脑癌。

[0030] 在一个实施方案中,该方法还包括共同施用有效量的治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂可以是抗体、化疗剂、酶或其组合。在一个实施方案中,治疗剂可以是卡培他滨、顺铂、曲妥珠单抗、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾内酯、伏氯唑、福美司坦、法倔唑、来曲唑、埃罗替尼、拉法替尼、达沙替尼、吉非替尼、伊马替尼、帕唑帕尼(pazopanib)、拉帕替尼、舒尼替尼、尼洛替尼、索拉非尼、nab-紫杉醇、卡利奇霉素、抗有丝分裂剂、单甲基澳瑞他汀E、美坦新(DM1)、奥佐米星或其衍生物或组合。

[0031] 接受治疗的受试者可以是人。在一个实施方案中,提供了包含有效浓度的分离的mAb或抗原结合片段的溶液,其中该溶液是受试者的血浆。

[0032] 通过下面的详细描述,其他实施方案对于本领域技术人员将变得显而易见,其中,通过示出预期的最佳模式来描述实施方案。如将认识到的,其他和不同的实施方案是可能的,并且实施方案的若干细节能够在各种显而易见的方面进行修改,所有这些都不脱离它们的精神和范围。因此,附图和详细描述应被认为本质上是说明性的而非限制性的。

附图说明

[0033] 结合附图,根据以下描述和所附权利要求书,本发明的前述和其他特征将变得更加完全显而易见。应理解,这些附图仅描绘了根据本公开安排的多个实施方案,并且因此不应被认为是对其范围的限制,将通过使用附图以附加的特性和细节来描述本公开,在附图中:

[0034] 图1是用人41BB或食蟹猴41BB瞬时转染的HEK293细胞免疫第1组和第2组兔子的时间表。

[0035] 图2表示B细胞培养上清液中的41BB特异性兔IgG抗体增强抗CD3激活的人T细胞的活化以及从亲本B细胞培养孔拯救的嵌合兔/人IgG 41BB特异性抗体与重组人和食蟹猴41BB蛋白的相应结合。

[0036] 图3表示对41BB具有特异性的嵌合兔/人IgG抗体增强了T细胞的活化、增殖和 γ 干

扰素分泌。

[0037] 图4是人源化41BB特异性IgG抗体解离速率的八位位组分析。

[0038] 图5表示人源化41BB特异性IgG抗体增强了T细胞的活化、增殖和 γ 干扰素的分泌。

[0039] 图6是分析与亲本CHO或人或食蟹猴41BB转染的CHO细胞结合的41BB特异性IgG抗体,该抗体来自用表达人或食蟹猴41BB的HEK293免疫的兔血清。

[0040] 图7表示B细胞培养上清液中41BB特异性IgG抗体增强 γ 干扰素分泌与人T细胞增殖的相关性。

具体实施方式

[0041] 在以下详细说明中,参考形成本文一部分的附图。在附图中,除非上下文另有说明,否则类似的符号通常标识类似的部件。在具体实施方案、附图和权利要求中描述的说明性实施方案并不意味着是限制性的。可利用其他实施方式,且可作出其他改变,而不背离本文所呈现的主题的精神或范围。将容易理解的是,如在此总体描述的并且在附图中示出的本公开的这些方面可以被安排、替代、组合、分开,并且被设计成多种不同的构型,所有这些都在此明确地预期。

[0042] 本公开尤其提供了分离的抗体、制备此类抗体、双特异性或多特异性分子、由此类抗体或抗原结合片段组成的抗体-药物缀合物和/或免疫缀合物以及含有此类抗体、双特异性或多特异性分子、抗体-药物缀合物和/或免疫缀合物的药物组合物的方法。

[0043] 在一方面,本公开提供了结合人或食蟹猴4-1BB的分离的单克隆抗体。抗体可以表现出一种或多种期望的功能特性,例如与4-1BB的高亲和力结合、增强T细胞活化包括增殖、IFN- γ 和/或CD3+T细胞增殖、IL-2分泌、存活和细胞溶解活性的能力、刺激抗体应答的能力和/或逆转免疫抑制细胞(例如T调节细胞)的抑制功能的能力。另外,本公开的抗体衍生自特定的重链和轻链氨基酸序列和/或结构特征,例如由特定氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)。

[0044] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且特别涵盖单一单克隆抗体(包括激动剂和拮抗剂抗体),具有多表位特异性的抗体组合物,以及抗体片段(例如Fab,F(ab')₂和Fv),只要它们表现出所需的生物活性即可。在一些实施方案中,抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体或双效抗体、猿抗体(simianized antibody)、人抗体和人源化抗体及其活性片段。与已知抗原结合的分子的活性片段的实例包括Fab、F(ab')₂、scFv和Fv片段,以及Fab免疫球蛋白表达文库的产物和任何上述抗体和片段的表位结合片段。在一些实施方案中,抗体可以包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的结合位点的分子。免疫球蛋白可以是任何类型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)或类别(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。在一个实施方案中,抗体可以是完整抗体和衍生自该完整抗体的任何抗原结合片段。典型的抗体是指典型地包含两条重(H)链和两条轻链(L)的异四聚体蛋白链。每条重链由重链可变结构域(缩写为VH)和重链恒定结构域组成。每条轻链由轻链可变区(缩写为VL)和轻链恒定区组成。VH和VL区可进一步细分为超变互补决定区(CDR)的结构域和称为构架区(FR)的更为保守的区域。每个可变区(VH或VL)通常由三个CDR和四个FR组成,按以下顺序排列:从氨基末端到羧基末端为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在轻链和重链的可变区

内存在与抗原相互作用的结合区。

[0045] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可能以少量存在的天然存在的突变之外,包含该群体的单个抗体是相同的。

[0046] 单克隆抗体针对单个抗原位点具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们由杂交瘤培养物合成,不被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,根据本公开内容使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler&Milstein,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法制备(参见,例如,美国专利No.4,816,567)。

[0047] 单克隆抗体可包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定种类或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与衍生自另一种类或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这些抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性即可(美国专利No.4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855[1984])。

[0048] 单克隆抗体可以使用各种方法产生,包括小鼠杂交瘤或噬菌体展示(参见Siegel.Transfus.Clin.Biol.9:15-22(2002)综述)或直接来自原代B细胞的抗体的分子克隆(参见Tiller.新型生物技术(New Biotechnol).28:453-7(2011))。在本公开中,通过用在细胞表面瞬时表达人或食蟹猴4-1BB的细胞免疫兔产生抗体。已知兔子可产生高亲和力、多样性和特异性的抗体(Weber等人,Exp.Mol.Med.49:e305)。体外培养来自免疫动物的B细胞并筛选产生抗4-1BB抗体。使用重组DNA技术分离抗体可变基因,重组表达所得抗体,并进一步筛选所需特征,例如增强人T细胞活化的能力。这种抗体发现的一般方法类似于Seeber等人PLOS One.9:e86184(2014)。

[0049] 术语“抗原或表位结合部分或片段”是指能够结合抗原(在这种情况下是4-1BB)的抗体片段。这些片段可以具有完整抗体的抗原结合功能和附加功能。结合片段的实例包括但不限于单链Fv片段(scFv)或Fab片段,单链Fv片段由通过合成接头连接的单多肽链中的抗体的单臂的VL和VH结构域组成,Fab片段是由VL、恒定轻链(CL)、VH和恒定重链1(CH1)结构域组成的单价片段。抗体片段可以是甚至更小的亚片段并且可以由与单个CDR结构域一样小的结构域组成,特别是来自VL和/或VH结构域的CDR3区(例如参见Beiboer等人,J.Mol.Biol.296:833-49(2000))。使用本领域技术人员已知的常规方法产生抗体片段。可以使用与完整抗体相同的技术筛选抗体片段的效用。

[0050] “抗原或表位结合片段”可以通过许多本领域已知的技术衍生自本公开的抗体。例如,可以用酶如胃蛋白酶切割纯化的单克隆抗体,并进行HPLC凝胶过滤。然后可收集含有Fab片段的适当级分并通过膜过滤等浓缩。关于分离抗体活性片段的一般技术的进一步描述,参见例如Khaw,B.A.等.J.nucl.Med.23:1011-1019(1982);Rousseaux等人,酶学方法(Methods Enzymology),121:663-69,学术出版社(Academic Press),1986。

[0051] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点,和残余的“Fc”片段,其名称反映其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0052] Fab片段可含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是指Fab',其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')₂抗体片段最初产生为Fab'片段对,它们之间具有铰链半胱氨酸。另外,抗体片段的化学偶联也是已知的。

[0053] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密非共价结合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体组成。在这种构型中,每个可变域的三个CDR相互作用以限定VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。总起来说,六个CDR赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对抗原特异的三个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0054] 基于其恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以归属于两种明显不同的类型之一,称为kappa(κ)和lambda(λ)。

[0055] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同的类别。免疫球蛋白有主要五大类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为α、δ、ε、γ和μ。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0056] “人源化抗体”是指一类工程化抗体,其CDR衍生自非人供体免疫球蛋白,分子的剩余免疫球蛋白衍生部分衍生自一种(或多种)人免疫球蛋白。此外,可以改变框架支持残基以保持结合亲和力。获得“人源化抗体”的方法是本领域技术人员熟知的。(参见例如Queen等人,Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032(1989),Hodgson等,Bio/Technology,9:421(1991))。

[0057] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是可互换的,并且定义为意指由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0058] 如本文所用的术语“一个(a、an)”和“该(the)”被定义为意指“一个或多个”并且包括复数,除非上下文不适当。

[0059] “分离的”是指不含其天然存在的至少一些组分的生物分子。“分离的”当用于描述本文公开的各种多肽时,是指已经从其表达的细胞或细胞培养物中鉴定和分离和/或回收的多肽。通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。

[0060] “重组”是指使用重组核酸技术在外源宿主细胞中产生抗体。

[0061] 术语“抗原”是指可以在生物体、特别是动物、更特别是包括人在内的哺乳动物中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包括免疫原及其负责抗原性或抗原决定簇的区域。

[0062] 同样如本文所用,术语“免疫原性”是指引发或增强针对免疫原性剂的抗体,T细胞或其他反应性免疫细胞的产生并有助于人或动物中的免疫应答的物质。当个体针对本公开的施用的免疫原性组合物产生足够的抗体、T细胞和其他反应性免疫细胞以缓和或减轻治疗的病症时,发生免疫应答。

[0063] “特异性结合(specific binding、specifically binds to)”或“特异性针对(specific for)”特定抗原或表位是指与非特异性相互作用显著不同的结合。特异性结合可以例如通过测定与对照分子的结合相比的分子的结合来测量,所述对照分子通常是具有

不具有结合活性的类似结构的分子。例如,特异性结合可以通过与类似于靶的对照分子竞争来确定。

[0064] 对特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过抗体对抗原或表位的KD来表示,所述KD至少约 10^{-4} M、至少约 10^{-5} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、或者至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M或更高,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。典型地,特异性结合抗原的抗体相对于抗原或表位对于对照分子将具有20、50、100、500、1000、5,000、10,000或更多倍的KD。

[0065] 同样,对于特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过抗体对抗原或表位的KA或Ka来表示,所述抗体对抗原或表位的KA或Ka相对于对照对所述表位的,大至少20、50、100、500、1000、5,000、10,000倍或更多倍,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率。

[0066] 两个序列之间的“同源性”由序列一致性决定。如果相互比较的两个序列长度不同,则序列同一性优选涉及与较长序列的核苷酸残基相同的较短序列的核苷酸残基的百分比。可以使用计算机程序常规地确定序列同一性。在给定序列与本公开的上述序列之间的比较中出现的偏差可以由例如添加、缺失、取代、插入或重组引起。

[0067] 在另一方面,本申请提供了包含本文公开的mAb及其抗原结合片段的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物可包括本文公开的分离的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在一个实施方案中,药物组合物包括本文公开的免疫缀合物以及药学上可接受的载体。可以根据本领域普通技术人员已知的标准方法得到根据本公开的药物组合物的制剂。

[0068] 可以使用已知技术以生理上可接受的制剂制备根据本发明的抗体,并且其可以包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。例如,根据本公开的抗体可包括任何功能等效抗体或其功能部分,特别地,包括任何功能等效抗体或其功能部分的单克隆抗体与药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂组合以形成治疗组合物。

[0069] 合适的药物载体、稀释剂和/或赋形剂是本领域熟知的,包括例如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳剂如油/水乳剂。

[0070] “药学上可接受的”是指那些化合物、材料、组合物和剂型,它们在合理的医学判断范围内适合用于与人或动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。

[0071] 在一个实施方案中,药物组合物可以包括蛋白质载体,例如举例而言,血清白蛋白或免疫球蛋白,特别是人源的。根据预期用途,其他生物活性剂可以存在于本公开的药物组合物中。蛋白质药物活性物质可以每剂量1ng至10mg的量存在。在一些实施方案中,施用方案可以在根据本公开的抗体的0.1 μ g至10mg的范围内,特别地在1.0 μ g至1.0mg的范围内,并且更特别地在1.0 μ g至100 μ g的范围内,落入这些范围内的所有个体数也是本公开的一部分。如果通过连续输注进行给药,则更合适的剂量可以在0.01 μ g至10mg单位/千克体重/小时的范围内,落入这些范围内的所有单个数值也是本公开的一部分。

[0072] 在另一方面,本申请提供了使用抗4-1BB抗体或含有抗4-1BB抗体的抗原结合部分的其他分子来治疗受试者的方法。在一个实施方案中,该方法用于抑制肿瘤细胞的生长。在一个实施方案中,本申请提供了使用抗体刺激保护性自身免疫应答、修饰免疫应答或刺激

抗原特异性免疫应答的方法。

[0073] 在一个实施方案中,治疗癌症的方法包括向需要这种治疗的受试者施用有效量的本文公开的mAb或它们的抗原结合片段。在一个实施方案中,组合物可以与包含生物活性物质或化合物的其他组合物组合施用。在一个实施方案中,所述生物活性物质可包括卡培他滨、顺铂、曲妥珠单抗、氟维司群、他莫昔芬、来曲唑、依西美坦、阿那曲唑、氨鲁米特、睾内酯、伏氯唑、福美司坦、法倔唑、来曲唑、埃罗替尼、拉法替尼、达沙替尼,吉非替尼、伊马替尼、帕唑帕尼(pazopanib)、拉帕替尼、舒尼替尼、尼洛替尼、索拉非尼、nab-紫杉醇、其衍生物或组合。

[0074] 组合物可以以固体、液体或气雾剂的形式以合适的药学有效剂量施用于受试者。固体组合物的实例包括丸剂、乳膏和可植入的剂量单位。丸剂可以口服施用。治疗乳膏可以局部施用。可植入的剂量单位可以局部施用,例如在肿瘤部位施用,或者可以例如皮下施用植入以系统释放治疗组合物。液体组合物的实例包括适于肌内、皮下、静脉内、动脉内注射的制剂,以及用于局部和眼内给药的制剂。气溶胶制剂的实例包括用于向肺给药的吸入剂制剂。

[0075] 组合物可以通过标准给药途径给药。例如,组合物可以通过局部、口服、直肠、鼻、皮内、腹膜内、或肠胃外(例如静脉内、皮下或肌内)途径施用。在一个实施方案中,施用可以是肠胃外施用,例如静脉内施用。用于肠胃外给药的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性溶剂可以选自水、醇/水溶液、乳液或悬浮液(包括盐水和缓冲介质)。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂,例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0076] 在一个实施方案中,可以将组合物掺入诸如生物可降解聚合物的缓释基质中,将聚合物植入需要递送的部位附近,例如肿瘤部位。该方法可包括施用单剂量、以预定时间间隔施用重复剂量以及持续施用预定时间。

[0077] 本领域普通技术人员众所周知,组合物的剂量将取决于各种因素,例如所治疗的病症,所使用的特定组合物以及其他临床因素,例如患者的体重、大小、性别和一般健康状况、体表面积、待施用的特定化合物或组合物、同时施用的其他药物和施用途径。

[0078] 在一个实施方案中,术语“治疗有效量”是指当施用于人或动物时引起足以在所述人或动物中产生治疗效果的应答的抗体的量。有效量易于由本领域普通技术人员按照常规方法确定。

[0079] 可以使用本文公开的mAb、它们的抗原结合片段和组合物来治疗各种癌症。可以治疗的癌症的实例包括但不限于乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、食管癌、鼻咽癌、肛门癌、直肠癌、胃癌、膀胱癌、宫颈癌或脑癌。在一个实施方案中,癌症可以表达4-1BB基因。用抗4-1BB单克隆抗体或抗原结合片段抑制4-1BB活性提供治疗效果。在一个实施方案中,施用治疗有效量的包含抗4-1BB单克隆抗体或抗原结合片段的组合物可通过药物单元的作用治愈、预防、改善和延迟癌症的发展或转移。

[0080] 通过参考以下包括在此的具体实施方案的详细描述,可以更容易地理解本公开。

尽管已经参考本发明的某些实施例的具体细节描述了本发明,但是并不意味着这些细节应当被认为是对本发明范围的限制。

[0081] 实施例

[0082] 实施例1:抗4-1BB抗体的产生

[0083] 通过免疫新西兰白兔开发抗人4-1BB的单克隆抗体。如图1所示,用重组人胚肾293 (HEK) 细胞免疫动物并通过皮下注射进行,其中所述重组人胚肾293 (HEK) 细胞用人或食蟹猴4-1BB瞬时转染,人或食蟹猴4-1BB以1:1v/v与TiterMax Gold (第1组)或完全或不完全弗氏佐剂(第2组)混合,并交替添加铝明胶2% (Alum) 和CpG2007。如图1所示,在免疫程序期间的不同时间点抽取血样。如图6所示,在第62天从所有4只动物抽取的血清通过FACS测定分析人或食蟹猴4-1BB特异性IgG。所有4只动物在免疫后都产生人或食蟹猴特异性IgG。

[0084] 抗原特异性B细胞用生物素化人和食蟹猴4-1BB重组蛋白标记,然后用链霉亲和素-AlexaFluor647标记,然后以每孔1个抗原特异性IgG+B细胞分选到多个96孔组织培养板中,并培养9天以使它们分化成浆细胞并分泌抗体。通过ELISA和功能性试验筛选来自这些B细胞培养(BCC)板的上清液中4-1BB特异性抗体的存在,试验如下:

[0085] 结合重组人和食蟹猴4-1BB-IgG ELISA

[0086] 增强CD3诱导的纯化人CD3+T细胞的T细胞活化-通过ELISA检测 γ 干扰素分泌并通过Alamar Blue细胞生存力测定定量CD3+T细胞增殖

[0087] 来自BCC板的共693个孔具有人和食蟹猴4-1BB特异性IgG。然后分析来自这些693个BCC孔的4-1BB特异性抗体的激动剂活性以增强抗CD3诱导的CD3+人T细胞活化。将固定浓度的对照抗人CD3特异性抗体与来自BCC上清液的固定浓度的4-1BB特异性抗体组合,然后在预先用山羊抗兔IgG Fc多克隆抗体包被的ELISA板上捕获。每个测定孔以100,000的量加入纯化的人CD3+T细胞,将板温育5天。如图7所示,在试验的第5天,收集每个测定孔的内容物,分析分泌到培养物上清液中的 γ 干扰素的量和每个测定孔中CD3+T细胞的数量。从这些数据中,最好的92个BCC孔通过RT-PCR进行兔抗体重链和轻链可变区的分子拯救。

[0088] 在B细胞培养的第9天,将上清液从B细胞中分离并储存在单独的平板中用于以后的分析。将RNAlater组织储存试剂加入到B细胞培养板中的每个孔中,以保存B细胞中的RNA,用于抗体可变区的RT-PCR扩增。将这组92个BCC孔进行抗体可变区的分子“拯救”。利用简并引物通过多重RT-PCR扩增轻链和重链可变区序列,该简并引物设计与兔IgG和兔 κ 序列的前导序列和恒定区退火。使用含有限制性位点的嵌套引物分别对轻链和重链进行第二次PCR。将来自可变重链PCR的扩增子克隆到含有人IgG1的表达载体中。将轻链扩增子克隆到含有人IgK的表达载体中。测序并分析所得克隆。

[0089] 将从各孔产生的重链和轻链表达质粒瞬时共转染以产生兔/人嵌合抗体。使用Fortebio Octt Red 96仪器上的生物层干涉测量分析,证实重组抗体上清液含有人和食蟹猴4-1BB特异性的抗体。使用抗人Fc生物传感器(Pall Fortebio)捕获上清液中的抗体。通过将生物传感器置于含有重组人或食蟹猴4-1BB胞外域蛋白的孔中,通过实时干涉测量法观察与人或食蟹猴4-1BB的缔合。在将生物传感器转移到含有10X动力学缓冲液(PallFortebio)的孔中之后测量解离。制造商提供的软件用于分析干涉测量数据。图2显示了34种重组嵌合兔/人IgG抗体的初级BCC筛选数据和相应筛选数据的总结。从最初的92个BCC孔拯救34个嵌合抗体,并显示其结合人和食蟹猴重组4-1BB蛋白(图2)。

[0090] 然后测定34种人和食蟹猴4-1BB特异性嵌合兔/人IgG抗体组的激动剂活性,该激动剂活性增强抗CD3诱导的人CD3+T细胞活化。如图3所示,针对每种嵌合抗体以及人CD3+T细胞增殖增强的背景倍数计算了 γ 干扰素分泌的 EC_{50} 。不添加其他4-1BB抗体的情况下,仅使用抗CD3抗体的人CD3+T细胞的增殖设置为背景值1.0,然后计算不同浓度的嵌合4-1BB抗体的背景倍数。根据这些数据,将18种嵌合4-1BB特异性抗体进行人源化。

[0091] 如图4所示,从34种人和食蟹猴4-1BB特异性的嵌合兔/人IgG抗体组中,成功地人源化了18种嵌合兔/人IgG抗体,其中通过八位位组分析与人和重组4-1BB的结合。然后测定这18种人或食蟹猴4-1BB特异性的人源化抗体的激动剂活性,该激动剂活性增强抗CD3诱导的人CD3+T细胞活化。如图5所示,针对每种人源化抗体以及人CD3+T细胞增殖增强的背景倍数计算了 γ 干扰素分泌的 EC_{50} 。不添加其他4-1BB抗体的情况下,仅使用抗CD3抗体的人CD3+T细胞的增殖设置为背景值1.0,然后计算不同浓度的人源化4-1BB抗体的背景倍数。根据这些数据,18种人源化4-1BB特异性抗体中的17种显示出增强抗CD3诱导的人CD3+T细胞活化。

[0092] 尽管已经参考本公开的实施方案具体示出和描述了本公开,但是本领域技术人员将理解,在不脱离其精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行前述和其他改变。本公开中引用或提及的所有参考文献在此全文引入作为参考。

天数	分组	抗原	佐剂
0	1	人41BB转染的293细胞	Titermax
7	1	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
14	1	人41BB转染的293细胞	Titermax
21	1	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
27	1	血清采集	
28	1	人41BB转染的293细胞	Titermax
37	1	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
44	1	血清采集	
	1	人41BB转染的293细胞	Titermax
51	1	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
58	1	人41BB转染的293细胞	Titermax
62	1	血清采集	

天数	分组	抗原	佐剂
0	2	人41BB转染的293细胞	完全弗氏
7	2	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
14	2	人41BB转染的293细胞	不完全弗氏
21	2	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
27	2	血清采集	
28	2	人41BB转染的293细胞	不完全弗氏
37	2	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
44	2	血清采集	
	2	人41BB转染的293细胞	不完全弗氏
51	2	食蟹猴41BB转染的293细胞	铝胶2% + CpG 2007
58	2	人41BB转染的293细胞	Titermax
62	2	血清采集	

图1

	原始BCC孔 编号	B细胞培养上清液		转染上清液	
		增殖	γ 干扰素	与重组41BB的八位位组结合 kdis(1/s)	
		RLU	OD ₄₅₀	人	食蟹猴
1	419D9	8.0E+07	2.2	6.3E-04	1.4E-03
2	418H5	8.9E+07	1.8	1.4E-03	1.6E-03
3	411H11	3.3E+07	2.2	1.0E-03	1.5E-03
4	413F3	1.8E+07	0.3	5.4E-04	7.9E-04
5	416G1	9.0E+07	2.0	1.4E-03	1.9E-03
6	416H5	7.8E+07	2.1	1.1E-02	3.2E-03
7	418E10	7.6E+07	1.5	1.1E-03	1.5E-03
8	418E4	9.4E+07	2.5	3.6E-03	5.0E-03
9	420H6	7.0E+07	2.5	9.4E-04	2.0E-03
10	459F1	3.2E+07	0.3	7.5E-04	7.5E-03
11	464C11	5.5E+07	1.0	4.5E-03	8.3E-03
12	470B6	1.4E+08	2.4	1.3E-03	1.2E-03
13	472E4	8.8E+07	1.9	1.1E-03	1.8E-03
14	418E8	9.8E+07	3.0	3.0E-03	3.6E-03
15	468C11	6.6E+07	2.2	2.7E-03	1.2E-03
16	470H2	5.5E+07	2.2	4.3E-03	6.9E-03
17	460C3	3.6E+07	0.3	6.7E-04	4.1E-03
18	413G3	2.4E+07	0.5	4.2E-04	7.9E-04
19	414A8	2.2E+07	0.4	2.9E-04	3.9E-04
20	415E8	5.4E+07	2.2	2.2E-03	5.8E-04
21	416G6	8.0E+07	2.5	7.0E-04	5.6E-03
22	416H7	8.1E+07	2.4	3.1E-03	2.5E-03
23	418H1	1.5E+08	2.4	1.4E-02	1.0E-02
24	420A11	7.6E+07	1.1	3.1E-03	1.1E-01
25	420G12	0.0E+00	2.2	1.4E-02	1.1E-03
26	459E8	4.4E+07	0.9	3.1E-04	6.4E-04
27	459H12	5.5E+07	2.2	1.4E-03	1.4E-03
28	464B12	7.5E+07	2.4	1.3E-03	6.4E-04
29	466G10	4.4E+07	0.3	2.8E-03	2.3E-03
30	468E5	0.0E+00	0.4	4.2E-04	1.1E-03
31	416F8	7.7E+07	1.8	4.3E-03	3.0E-03
32	420H5	8.1E+07	1.7	1.3E-03	2.3E-03
33	466F6	8.6E+07	1.7	2.1E-03	2.6E-03
34	470C6	8.1E+07	2.3	1.0E-03	1.4E-03

图2

第一激动剂测定
增殖（背景变化倍数）
41BB特异性嵌合抗体的浓度[ng/ml]

原始BCC孔 编号	γ 干扰素EC ₅₀ [ng/ml]	3000	1000	333.3	111.1	37.0	12.3	4.1	1.4	0.5	0.2	0
411H11	18.9	2.9	2.4	2.2	2.7	2.5	1.8	1.4	1.5	1.4	1.3	1.0
413F3	11.3	1.4	1.4	1.3	1.2	1.5	1.3	1.1	1.1	1.0	1.1	1.0
413G3	23.7	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.2	1.0	1.0	1.1	0.9	1.0
414A8	90.3	1.1	1.5	1.2	1.4	1.4	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.0
415E8	10.3	1.7	1.6	1.8	1.8	1.5	1.4	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0
416F8	7.3	1.3	1.6	1.6	1.8	1.6	2.2	1.3	1.1	1.2	1.2	1.0
416G1	11.9	1.3	1.6	1.1	1.5	1.6	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0
416G6	7.3	1.5	1.8	1.8	1.8	1.9	1.8	1.7	1.1	1.1	1.1	1.0
416H5	39.1	1.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0
416H7	17.1	1.9	1.9	2.3	2.6	1.9	1.7	1.2	1.3	1.2	1.2	1.0
418E10	20.9	1.6	1.6	1.7	1.7	1.8	1.3	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0
418E4	24.4	2.3	1.6	1.5	1.5	1.5	1.8	1.0	1.1	0.8	0.9	1.0
418E8	5.6	1.7	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.5	1.3	1.2	1.0	1.0
418H1	28.9	1.7	1.6	1.9	1.8	1.7	1.4	1.0	1.3	1.1	1.1	1.0
418H5	25.5	1.6	1.4	1.8	2.0	1.9	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0
419D9	17.6	1.1	1.6	1.7	1.8	1.8	1.3	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0
420A11	23.8	1.4	1.4	1.6	1.6	1.6	1.2	0.9	0.7	0.9	0.9	1.0
420G12	5.7	1.6	1.9	1.6	1.6	1.7	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0
420H5	5.2	1.6	1.9	2.1	2.2	2.2	2.2	1.7	1.4	1.5	1.3	1.0
420H6	17.1	1.2	1.8	2.0	2.0	2.0	1.4	1.3	1.1	1.3	1.2	1.0
459E8	71.9	1.1	1.3	1.2	1.5	1.3	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0
459F1	23.7	1.6	1.9	2.2	2.3	2.3	1.5	1.5	1.4	1.3	1.3	1.0
459H12	8.4	1.1	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0
460C3	8.8	1.4	1.7	1.9	2.6	1.7	1.6	1.4	1.1	1.0	1.2	1.0
464B12	18.1	1.9	1.8	2.0	1.9	1.7	1.3	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0
464C11	25.3	1.2	1.4	1.5	1.5	1.6	1.3	1.6	1.1	1.1	1.1	1.0
466F6	8.8	1.7	1.7	1.8	1.9	2.1	1.5	1.3	1.1	1.2	1.0	1.0
466G10	11.1	2.5	2.1	2.5	2.3	1.9	2.1	1.4	1.3	1.3	1.3	1.0
468C11	12.4	1.8	1.9	1.9	1.9	1.8	1.5	1.2	1.1	1.0	1.1	1.0
468E5	22.7	0.9	1.3	1.2	1.4	1.5	1.2	1.4	1.1	1.1	1.2	1.0
470B6												
470C6	6.9	2.3	2.5	2.4	2.8	2.8	2.4	1.7	1.6	1.4	1.4	1.0
470H2	10.5	1.4	1.6	1.7	1.7	1.9	1.6	1.5	1.1	0.9	1.1	1.0
472E4	14.1	1.9	1.4	1.5	1.5	1.5	1.3	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0
阳性对照1	14.1	1.9	1.9	2.1	2.7	2.7	1.7	1.3	1.1	1.0	1.1	1.0

图3

第二激动剂测定

增殖(背景变化倍数)

41BB特异性嵌合抗体的浓度[ng/ml]

原始BCC孔 编号	γ 干扰素EC ₅₀ [ng/ml]	3000	1000	333.3	111.1	37.0	12.3	4.1	1.4	0.5	0.2	0
411H11	14.6	1.1	2.0	1.7	2.1	2.1	1.5	1.2	1.0	0.9	1.0	1.0
413F3	44.7	0.7	0.8	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0
413G3	21.3	0.9	1.0	1.4	2.0	1.7	1.2	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0
414A8	71.3	1.1	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0
415E8	17.5	0.8	1.1	1.4	1.6	1.5	1.0	0.8	0.7	0.6	0.8	1.0
416F8	11.2	1.0	1.0	1.3	1.2	1.4	1.2	0.9	0.7	0.6	0.7	1.0
416G1	12.8	0.9	1.3	1.4	2.3	2.3	1.6	1.1	1.0	0.8	1.0	1.0
416G6	13.1	0.6	1.4	1.3	2.0	1.7	1.1	0.6	0.7	0.7	0.9	1.0
416H5	44.5	1.6	1.6	1.8	1.8	1.4	1.1	0.9	0.7	0.8	0.9	1.0
416H7	28.0	0.9	1.5	1.6	1.5	1.6	1.0	0.7	0.8	0.7	0.9	1.0
418E10	20.4	2.0	2.2	2.2	2.1	2.0	1.2	1.0	0.9	0.9	0.7	1.0
418E4	31.0	1.2	1.6	1.8	1.7	1.7	1.0	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0
418E8	12.8	1.2	1.8	1.6	2.2	1.9	1.4	1.0	0.9	0.8	0.9	1.0
418H1	25.0	0.8	1.2	1.3	1.4	1.4	1.0	0.9	0.7	0.8	0.8	1.0
418H5	37.5	2.2	1.8	1.6	2.0	1.1	1.0	0.7	0.9	0.9	1.1	1.0
419D9	13.0	1.5	1.4	1.5	2.0	1.8	1.2	0.7	0.9	0.7	0.8	1.0
420A11	25.3	2.3	1.7	1.9	1.7	1.4	1.0	0.8	0.8	0.9	0.8	1.0
420G12	20.8	1.0	1.2	1.4	1.7	1.6	1.1	0.8	0.8	0.8	0.9	1.0
420H5	8.9	3.2	2.6	2.3	2.4	3.0	1.9	1.2	1.0	0.9	1.0	1.0
420H6	14.9	1.5	1.9	1.7	2.8	1.9	1.2	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0
459E8	42.3	1.1	1.2	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.8	1.0	1.1	1.0
459F1	17.4	1.1	1.7	1.9	2.4	2.1	1.6	1.0	1.1	1.2	0.8	1.0
459H12	19.2	1.8	1.1	1.2	1.5	1.3	1.2	0.9	0.8	1.0	0.8	1.0
460C3	10.4	1.1	1.4	1.7	2.0	2.3	1.5	1.1	0.9	1.1	0.8	1.0
464B12	13.1	0.8	1.3	1.2	1.9	1.7	1.3	0.9	0.8	0.9	0.6	1.0
464C11	40.3	1.5	1.4	1.1	1.6	1.3	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0
466F6	8.2	1.1	1.7	2.0	3.1	2.8	2.3	1.6	1.0	1.2	1.1	1.0
466G10	15.8	0.8	1.1	1.1	1.4	1.5	1.2	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0
468C11	15.2	0.7	1.5	1.3	2.2	2.0	1.4	0.9	0.8	0.8	0.8	1.0
468E5	22.1	1.2	1.0	1.2	0.8	1.2	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8	1.0
470B6	24.1	0.7	1.5	1.6	2.1	1.5	1.3	1.0	1.0	0.9	0.8	1.0
470C6	7.2	1.0	1.5	1.4	2.1	3.2	2.6	1.4	1.2	1.0	1.1	1.0
470H2	22.0	2.4	2.0	1.9	2.6	2.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1	1.0
472E4	16.4	0.7	1.1	1.2	1.4	1.4	1.1	1.0	0.8	1.0	0.8	1.0
阳性对照1	12.5	0.7	1.5	2.1	2.1	2.7	1.7	1.2	1.0	0.9	0.9	1.0

图3(续)

抗体编号	人源化变体	结合解离速率 k _{dis} (1/s)
411H11	VHv1VLv1	1.79E-03
413F3	VHv1VLv1	2.24E-03
416F8	VHv3VLv1	6.45E-03
416G1	VHv1VLv1	1.66E-03
418E10	VHv1VLv1	9.58E-04
418E4	VHv1VLv1	2.77E-03
418H5	VHv2VLv1	2.45E-03
419D9	VHv3VLv3	2.84E-03
420H5	VHv3VLv3	1.78E-03
420H6	VHv1VLv1	1.28E-03
459F1	VHv1VLv1	1.31E-03
460C3	VHv1VLv1	7.28E-04
464C11	VHv1VLv1	7.84E-04
466F6	VHv2VLv5	2.54E-03
470B6	VHv1VLv1	9.10E-04
470C6	VHv3VLv3	1.83E-03
472E4	VHv1VLv1	2.65E-03

图4

增殖（背景变化倍数）
41BB特异性嵌合抗体的浓度[ng/ml]

原始BCC孔 编号	γ 干扰素EC ₅₀ [ng/ml]	3000	1000	333.3	111.1	37.0	12.3	4.1	1.4	0.5	0.2	0
411H11	5.8	0.9	1.3	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	0.9	1.0	0.8	1.0
413F3	139.4	0.8	1.5	1.3	0.9	1.0	1.1	1.3	1.1	1.3	1.0	1.0
416F8	37.5	1.1	1.4	1.7	2.1	1.4	1.6	1.2	1.6	0.8	1.2	1.0
416G1	36.7	1.5	1.7	2.4	2.3	1.7	1.8	1.4	1.6	1.5	1.2	1.0
416H5	-	0.5	0.7	0.6	0.7	0.7	1.1	0.9	1.3	1.1	0.9	1.0
418E4	12.3	1.1	1.7	1.7	1.6	2.3	1.4	1.1	1.3	1.2	1.2	1.0
418E10	7.1	0.9	1.3	1.8	1.5	2.2	2.2	1.4	1.4	1.0	1.1	1.0
418H5	14.5	1.2	2.0	1.5	2.1	2.2	1.4	1.3	0.9	1.2	0.7	1.0
419D9	13	1.0	1.1	1.4	1.5	1.9	1.3	1.0	0.9	1.1	0.8	1.0
420H5	50.7	1.8	1.8	1.3	1.3	1.7	1.3	1.0	1.4	1.1	1.1	1.0
420H6	26	0.9	1.4	1.7	1.8	1.5	1.5	1.3	0.9	1.0	1.0	1.0
459F1	21.2	0.5	0.7	0.8	1.1	1.3	1.4	0.9	1.2	0.9	0.8	1.0
460C3	11.5	0.7	0.9	1.2	1.4	1.8	1.6	1.2	1.6	1.4	1.1	1.0
464C11	8.4	1.1	1.4	1.8	2.0	2.1	1.8	1.0	1.0	1.1	0.9	1.0
466F6	9.8	1.1	0.9	1.8	1.4	1.4	2.0	1.4	1.2	0.8	1.1	1.0
470B6	17.8	1.1	2.2	1.4	1.3	1.8	1.8	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0
470C6	5.7	1.6	2.1	2.0	2.3	2.6	2.2	2.1	1.7	1.4	1.4	1.0
472E4	11.6	1.2	2.0	1.9	2.4	2.0	1.6	1.2	1.2	1.4	0.9	1.0
阳性对照1	4.3	1.5	1.8	1.5	1.5	1.7	1.7	1.4	1.4	1.2	1.3	1.0

图5

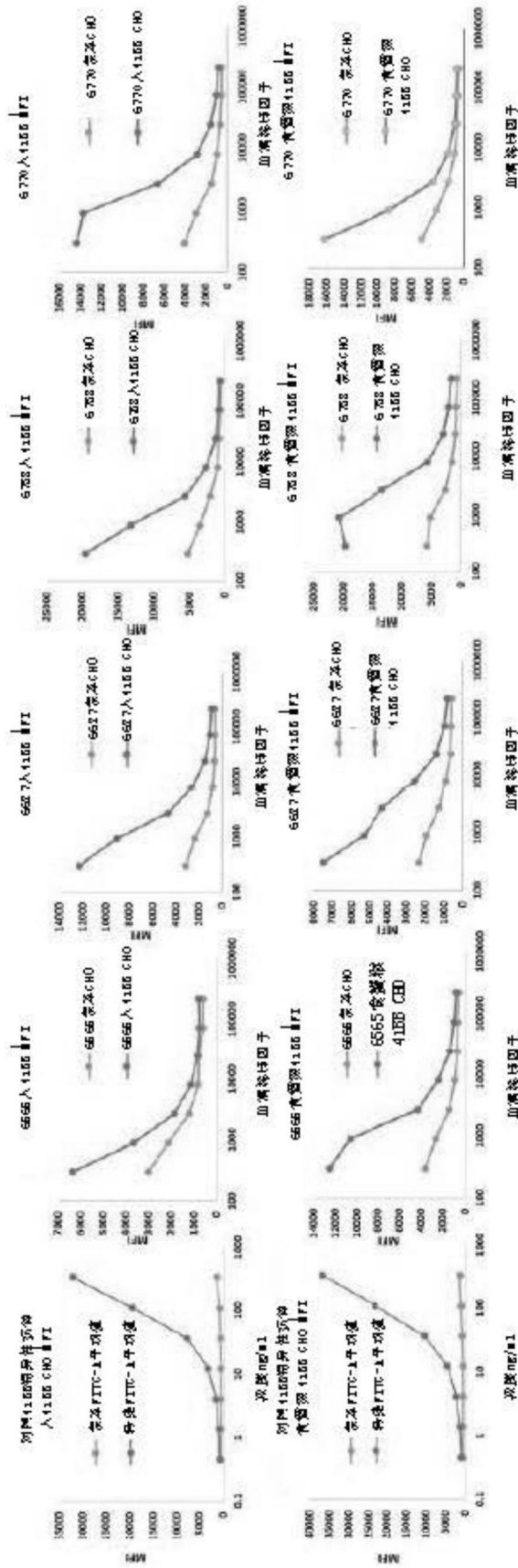


图6

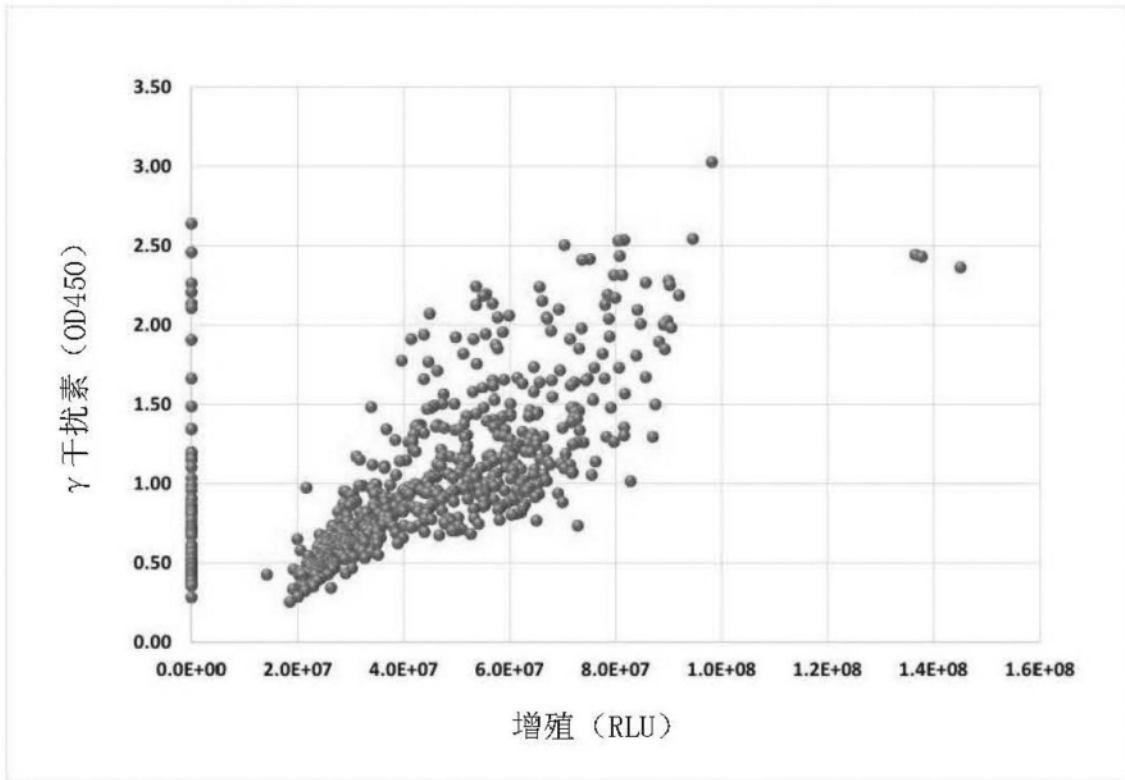


图7