



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101331150 B

(45) 授权公告日 2012.06.13

(21) 申请号 200680044085.7

C12N 15/13(2006.01)

(22) 申请日 2006.11.27

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

(30) 优先权数据

60/739,659 2005.11.25 US

(56) 对比文件

W0 2004019866 A, 2004.03.11, 全文.

W0 2004019866 A, 2004.03.11, 全文.

孙建军等. 鼠抗人 OX40 功能性单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定. 《中国免疫学杂志》. 2005, 第 21 卷 (第 6 期), 第 403-405、410 页.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008.05.26

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2006/045522 2006.11.27

王艳艳等. 人 OX40Fc 分子的构建、真核表达及活性研究. 《免疫学杂志》. 2005, 第 21 卷 (第 1 期), 第 13-16 页.

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/062245 EN 2007.05.31

审查员 岳礼溪

(73) 专利权人 麒麟医药株式会社

地址 日本东京都

专利权人 拉霍拉敏感及免疫学研究所

(72) 发明人 加藤慎一郎 R·索洛夫努根特

吉田均 M·克罗特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 刘健 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 59 页

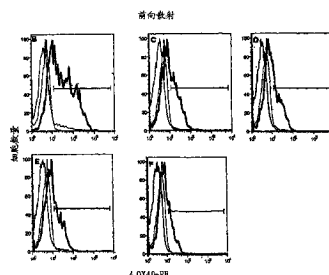
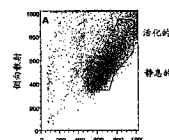
序列表 24 页 附图 10 页

(54) 发明名称

人单克隆抗体人 CD134(OX40) 及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了特异性结合 OX40(CD134) 的抗体,称为 OX40 抗体、抗-OX40 或抗-OX40 抗体。本发明特异性结合 OX40 的抗体包括哺乳动物(人、灵长类动物等)、人源化或嵌合的抗-OX40 抗体。本发明特异性结合 OX40 的抗体和抗体子序列(片段)包括用于多种方法包括治疗、筛选和检测方法的纯化和分离的抗体,及其药物配方。



1. 一种特异性结合 OX40 胞外域氨基酸序列中的表位的分离或纯化的抗体,其中抗体选自人、人源化或嵌合抗体,其中抗体具有 OX40 拮抗活性,并且其中抗体由选自 ATCC No. PTA-7219、ATCC No. PTA-7218 或 ATCC No. PTA-7220 的杂交瘤细胞系所产生。

2. 权利要求 1 的抗体,其中重链和轻链可变区选自下述 (1)-(3):

(1) 由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

(2) 由 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列组成的轻链可变区;

(3) 由 SEQ ID NO:46 所示的氨基酸序列组成的重链可变区和由 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

3. 一种包含权利要求 1 和 2 任一项的抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

4. 一种编码如 SEQ ID NO:9-10 和 SEQ ID NO:44-47 所示的成熟的重链或轻链可变区序列的序列的分离的核酸。

5. 包含权利要求 4 的分离的核酸的载体。

6. 包含权利要求 4 的分离的核酸的宿主细胞。

7. 权利要求 1 和 2 任一项的抗体或权利要求 3 的药物组合物在制备用于治疗需要治疗的个体中慢性或急性免疫性疾病或病症或慢性或急性免疫性疾病或病症的症状的药物中的用途。

8. 权利要求 1 和 2 任一项的抗体或权利要求 3 的药物组合物在制备治疗需要治疗的个体中的自身免疫性疾病的药物中的用途。

9. 权利要求 8 的用途,其中自身免疫性疾病选自:类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、克罗恩氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、银屑病、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病和多发性肌炎。

人单克隆抗体人 CD134 (OX40) 及其制备方法和应用

[0001]

相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2005 年 11 月 25 日提交的申请序列号 60/739,659 的优先权,在此特别并入作为参考。引言

[0003] 免疫系统由多种起作用以使身体免于感染性疾病的细胞类型组成。其取决于对外来抗原的识别以及区分自身抗原和非自身抗原的能力。有时自身抗原和非自身抗原之间的屏障会被破坏,造成由我们自身免疫系统所导致的组织破坏。这些自身免疫应答能引起使人虚弱的疾病如糖尿病、多发性硬化和炎性肠病。一种这些自身免疫应答的主要介质是 T 淋巴细胞或 T 细胞。一般地, T 细胞耐受自身抗原,但在某些自身免疫性疾病中,该耐受消失并且 T 细胞发动针对健康组织的免疫应答。除去自身免疫 T 细胞或阻断它们的活化或生存改善了疾病症状。然而,该 T 细胞的一般耗竭或阻止它们的活化引起了免疫抑制,由此患者变得对传染物高度易感。因此,需要能特异性靶向效应 T 细胞并只减少自身反应性 T 细胞的新疗法。发明概述

[0004] 本发明提供了特异性结合 OX40 胞外域氨基酸序列(如 SEQ IDNO:50)中的表位的分离或纯化的抗体。抗体包括结合哺乳动物(如灵长类动物或人)OX40 序列(如 SEQ IDNO:49)的人、人源化和嵌合抗体。抗体还包括具有 OX40 拮抗活性的那些抗体。抗体进一步包括具有 OX40 激动活性的那些抗体。

[0005] 在具体的实施方案中,一种抗体具有 OX40 拮抗活性并减少或增加细胞因子或干扰素的产生,活化、效应、记忆或调节 T 细胞的生存或增殖,抗凋亡蛋白或凋亡前体蛋白的表达。在具体的非限制性方面中,细胞因子选自 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、干扰素 γ 和 GM-CSF;以及抗凋亡蛋白或凋亡前体蛋白选自 Bcl-xL、Bcl-2、Bad 和 Bim。

[0006] 在其他具体的实施方案中,OX40 抗体由称为 112F32(ATCC 编号 PTA-7217,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112V8(ATCC 编号 PTA-7219,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y55(ATCC 编号 PTA-7220,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y131(ATCC 编号 PTA-7218,2005 年 11 月 17 日保藏的)和 112Z5(ATCC 编号 PTA-7216,2005 年 11 月 17 日保藏的)杂交瘤细胞系所产生。在另外的实施方案中,OX40 抗体结合由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体结合的氨基酸序列;具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 1-5000 倍范围内的 OX40 结合亲和力;具有与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相比更大或更小的 OX40 结合亲和力;具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 10^{-6} M- 约 10^{-13} M 范围内的 OX40 结合亲和力;具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的结合特异性;与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争与 OX40 结合;如在 ELISA 测定法中所测定的,抑制或阻止由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体与 OX40 结合(如抑制至少 50%的由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体与 OX40 结合);或

结合与 112V8、112Y55 和 Y131 所结合的表位相同的表位,以及抑制或阻止 OX40 与 OX40 配体 (OX40L) 结合 (如 85%或更多)。

[0007] 抗体额外包括特异性结合细胞上表达的 OX40 的那些抗体。在具体的实施方案中,抗体特异性结合非 T 细胞 (如自然杀伤细胞、粒细胞、单核细胞、B 细胞),或用 OX40 转染的细胞系 (如 CHO 细胞、L929 细胞或 HELA 细胞) 上表达的 OX40。在具体的方面中,抗体特异性结合活化的人 T 细胞,而非静息的 T 细胞。

[0008] 抗体包括如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列。抗体还包括如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的抗体成熟的重链或轻链可变区序列的修饰和可变形式,如在恒定区、互补决定区 (CDR) 或构架区 (FR) 之内或之外的取代。在具体的方面中,取代包括保守氨基酸取代。在另外的具体方面中,取代包括 1-3 个、3-5 个、5-10 个或更多个氨基酸残基的氨基酸取代。在另外的具体方面中,抗体与如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列的序列具有 80% -85%、85% -90%、90% -95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性。

[0009] 抗体还包括如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列的子序列。在具体的方面中,子序列选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、单链 Fvs(scFv)、二硫键连接的 Fvs(sdFv) 和 V_L 或 V_H。

[0010] 抗体还包括异源结构域。在具体的方面中,异源结构域包括标签、可检测的标记或细胞毒素剂。

[0011] 诸如取代、子序列和添加的修饰和可变的抗体能保留可检测的如本文中所述的 OX40 抗体的活性。在一个实施方案中,修饰的抗体保留可检测的由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的活性。在另一个实施方案中,修饰的抗体调节 T 细胞增殖或生存,或调节活化、效应、记忆或调节 T 细胞的数量,或耗竭活化、效应、记忆或调节 T 细胞。在具体的方面中,修饰的抗体抑制 OX40 信号传导或减少或耗竭特异性针对自身抗原 (如诸如髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白、含蛋白脂质蛋白、胶原、滑膜关节组织抗原、胰岛素、谷氨酸脱羧酶、肠抗原、甲状腺抗原、组蛋白、肌肉抗原和皮肤抗原的自身抗原) 的自身反应性 T 细胞的数量。

[0012] 抗体还包括与抗体 L106 竞争或不与其竞争与 OX40 结合的那些抗体。在一个具体的实施方案中,如在 ELISA 测定法中所测定的,抗体不抑制或阻止抗体 L106 与 OX40 结合。

[0013] 抗体进一步包括影响 OX40 功能或活性的那些抗体。在具体的实施方案中,抗体抑制或阻止 OX40 配体与 OX40 结合;抑制或阻止 OX40 配体与活化 T 细胞结合;调节 OX40 介导的细胞信号传导 (如抑制或阻止);调节 OX40 介导的细胞应答;或 OX40 介导的细胞信号传导 (如抑制或阻止)。在具体的方面中,OX40 介导的细胞应答包括淋巴细胞增殖、细胞因子表达、淋巴细胞生存、NF- κ B 活化、PKB(Akt) 活性的维持或存活蛋白的增量调节。在另外的实施方案中,抗体通过自然杀伤细胞、巨噬细胞或嗜中性白细胞介导,诱导 EL4- 人 OX40 表达细胞或活化的人 T 细胞溶解,例如,在 10 μ g/ml 抗体下诱导的特异性细胞溶解百分率 (%) 为约 15-75%、25-65%、或 30-60%、或 50-100%。

[0014] 抗体进一步包括具有体内功能或活性的那些抗体。在具体的实施方案中,抗体减轻、减少或预防急性或慢性异种移植物宿主病模型中的移植物抗宿主病的症状,或使急性或慢性异种移植物宿主疾病模型 (如在给予抗 -IL2R β 链抗体和亚致死剂量辐射后接受人

外周血单核细胞 (PBMC) 的免疫缺陷型 (SCID) 小鼠) 中的移植物抗宿主病缓解或消退。在具体的方面中, 移植物抗宿主病的症状是体重减轻, 脱发, 皮疹, 血尿, 腹水和肝、肠道、肺、皮肤中炎性细胞浸润或死亡。

[0015] 在另外的实施方案中, 抗体减轻、减少或预防肺、皮肤或肠中的炎症, 或减轻、减少或预防自身免疫性疾病的症状。在具体的方面中, 抗体缓解或预防类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、克罗恩氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、银屑病、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病、或多发性肌炎的症状。

[0016] 抗体包括单克隆和多克隆抗体, 其的任何同种型或亚类。在具体的方面中, 抗体是 IgG (如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgA、IgM、IgE 或 IgD 同种型。

[0017] 抗体可包含在药物组合物中。在一个实施方案中, 抗体包括药学上可接受的载体或赋形剂。

[0018] 抗体可由核酸序列编码。在一个实施方案中, 核酸编码如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列的序列或其子序列。在具体的方面中, 核酸序列包括 SEQ ID NO :3-6 和 SEQ ID NO :38-43, 或 SEQ ID NO :3-6 和 SEQ ID NO :38-43 的简并序列。在另外的具体方面中, 核酸编码具有如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的重链或轻链可变区序列经一个或多个氨基酸残基取代、添加或缺失的氨基酸序列。在另外的具体方面中, 核酸编码具有如 SEQ ID NO :7-10 和 SEQ ID NO :44-49 所示的重链或轻链可变区序列经一个或多个氨基酸残基取代、添加或缺失的氨基酸序列, 所属氨基酸序列具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的活性 (如具有针对 OX40 胞外域表位的结合亲和力)。在更进一步的具体实施方案, 核酸序列包括表达控制序列或载体。

[0019] 抗体可由宿主细胞和分离的细胞所产生。在具体的实施方案中, 宿主或分离的细胞是杂交瘤细胞或 CHO 细胞。在另外的具体实施方案中, 分离的细胞表达具有与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体一样的结合特异性的抗体。

[0020] 本发明提供了试剂盒。在具体的实施方案中, 试剂盒包括由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体, 和用于将抗体给予需要用该抗体治疗的个体的说明书。

[0021] 本发明提供了包括处理和治疗方法的方法。在具体的实施方案中, 一种用于治疗需要治疗的个体中慢性或急性免疫性疾病或病症、或慢性或急性免疫性疾病或病症的症状的方法包括给予个体能有效治疗个体中慢性或急性免疫性疾病或病症、或慢性或急性免疫性疾病或病症的症状的抗体或药物组合物。在具体的方面中, 治疗导致缓解或改善一种或多种与慢性或急性免疫性疾病或病症相关的不利症状或身体后果。

[0022] 在另外的具体实施方案中, 一种用于治疗移植物抗宿主病的方法包括给予需要治疗的个体能有效治疗移植物抗宿主病的抗体或药物组合物。在具体的方面中, 治疗减轻、减少或预防一种或多种与移植物抗宿主病相关的不利症状或身体后果 (如体重减轻、脱发、皮疹、血尿、腹水、肝、肠道、肺中炎性细胞浸润或死亡) 的发作、频率、持续时间或严重性, 引起移植物抗宿主病的缓解或消退, 或造成预防移植物抗宿主病。在另外的方面中, 移植物可包括骨髓、造血干细胞、外周血干细胞或脐带血干细胞。

[0023] 在另外的具体实施方案中,一种用于治疗移植排斥的方法包括给予需要治疗的个体能有效治疗移植排斥的抗体或药物组合物。在具体的方面中,治疗减轻、减少或预防一种或多种与移植排斥(如针对移植物或移植细胞的免疫应答或组织破坏)相关的不利症状或身体后果(如体重减轻、脱发、皮疹、血尿、腹水、肝、肠道、肺中炎性细胞浸润或死亡)的发作、频率、持续时间或严重性,引起移植排斥的缓解或消退,或造成预防移植排斥。在另外的方面中,移植物可包括肾、心、肺、皮肤、肝或胰脏细胞、组织或器官。

[0024] 在更进一步的具体实施方案中,一种用于减轻、减少或预防炎症的方法包括给予需要治疗的个体能有效减轻、减少或预防炎症的发作、频率、持续时间或严重性的抗体或药物组合物。在具体的方面中,炎症存在于肺、关节、肌肉、皮肤、中枢或末梢神经系统或肠中。在另外的方面中,治疗导致减轻一种或多种与炎症相关的不利症状或身体后果的发作、频率、持续时间或严重性。

[0025] 还在另外的具体实施方案中,一种用于治疗自身免疫性疾病的方法包括给予需要治疗的个体能有效减轻、减少或预防自身免疫性疾病的症状的发作、频率、持续时间或严重性的抗体或药物组合物。在具体的方面中,自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、克罗恩氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、银屑病、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病或多发性肌炎。在另外的方面中,治疗导致减轻、减少或预防一种或多种与自身免疫性疾病相关的不利症状或身体后果的发作、频率、持续时间或严重性。

[0026] 当在体内实施时,能导致处理或治疗的另外的方法包括调节 OX40 活性或功能。在具体的实施方案中,一种用于抑制或阻止 OX40- 介导的细胞应答的方法包括给予需要抑制或阻止 OX40- 介导的细胞应答的个体能有效抑制或阻止 OX40- 介导的细胞应答(如淋巴细胞增殖、细胞因子表达或淋巴细胞生存)的抗体或药物组合物。在另外的实施方案中,一种用于抑制或封闭 OX40 配体与活化 T 细胞结合的方法包括给予需要封闭、抑制或阻止 OX40 配体与活化 T 细胞结合的个体能有效抑制或阻止 OX40 配体与活化 T 细胞结合的抗体或药物组合物。在另外的实施方案中,一种用于抑制或封闭 OX40 配体与 OX40 结合的方法包括给予需要封闭、抑制或阻止 OX40 配体与 OX40 结合的个体能有效抑制或阻止 OX40 配体与 OX40 结合的抗体或药物组合物。在更进一步的具体实施方案中,一种用于调节 OX40- 介导的细胞信号传导的方法包括给予需要调节 OX40- 介导的细胞信号传导的个体能有效调节 OX40- 介导的细胞信号传导的抗体或药物组合物。还在另外的具体实施方案中,一种用于减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的方法包括给予需要减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的个体足以减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的量的抗体。

[0027] 还在另外的具体实施方案中,一种用于减少急性或慢性异种移植物宿主疾病模型的血、脾、淋巴结、肠、肝、肺或皮肤中活化 T 细胞数量的方法包括将足以减少血、脾、淋巴结、肠、肝、肺或皮肤中活化 T 细胞数量的量的抗体给予急性或慢性异种移植物宿主疾病模型。

[0028] 还在另外的具体实施方案中,一种用于治疗由活化、效应、记忆或调节 T 细胞所引起的疾病或病症的方法包括给予个体足以减轻、减少或预防由活化、效应、记忆或调节 T 细胞所引起的疾病或病症的进展或耗竭活化、效应、记忆或调节 T 细胞的量的抗体。在具体的方面中,疾病或病症包括移植物抗宿主病、炎症或自身免疫性疾病。

[0029] 根据本发明可治疗的个体包括哺乳动物(如人)。在具体的实施方案中,个体是

慢性或急性免疫性疾病或病症的候选人或已进行慢性或急性免疫性疾病或病症治疗；个体是移植物抗宿主病的候选人或已进行移植物抗宿主病治疗；个体是移植排斥的候选人或已进行移植排斥治疗；个体是炎症的候选人或已进行炎症治疗；或个体是自身免疫性疾病的候选人或已进行自身免疫性疾病治疗；个体是 OX40- 介导的细胞应答的候选人或已进行 OX40- 介导的细胞应答治疗。

[0030] 可通过任何可接受的方法实施包括给予或递送 OX40 抗体的本发明的方法。在具体的实施方案中，OX40 抗体局部、区域或全身性给予个体。

[0031] 本发明还提供了用于产生具有 OX40 拮抗活性的人 OX40 抗体的方法。在一个实施方案中，一种方法包括将缀合有人 Fc 重组蛋白的人 OX40 胞外域或活化的人 T 细胞给予能表达人免疫球蛋白的动物（如转基因小鼠或转基因牛）；筛选表达人 OX40 抗体的动物；选择产生人 OX40 抗体的动物；从所选择的动物中分离抗体；以及确定人 OX40 抗体是否具有 OX40 拮抗活性。

[0032] 本发明进一步提供了用于产生抑制或阻止 OX40 与 OX40 配体 (OX40L) 结合的人 OX40 抗体的方法。在一个实施方案中，一种方法包括将缀合有人 Fc 重组蛋白的人 OX40 胞外域或活化的人 T 细胞给予能表达人免疫球蛋白的动物（如转基因小鼠或转基因牛）；筛选表达人 OX40 抗体的动物；选择产生人 OX40 抗体的动物；从所选择的动物中分离抗体；以及确定人 OX40 抗体是否抑制或阻止 OX40 与 OX40 配体 (OX40L) 结合。

[0033] 此外，本发明提供了表达 OX40 抗体的非人转基因动物。在多个实施方案中，所表达的 OX40 抗体与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相同；结合由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体所结合的 OX40 胞外域氨基酸序列中的表位；具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 1-5000 倍范围内的 OX40 结合亲和力；具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 10^{-6} M- 约 10^{-12} M 范围内的 OX40 结合亲和力；具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的结合特异性；或与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争与 OX40 结合。附图简述

[0034] 图 1A-F：用人抗 - 人 OX40 抗体进行的流式细胞检测分析。A. 在用 PHA 和 IL2 刺激 3 天后，人 CD4T 细胞的前向散射对侧向散射分布图。B-F. 用人抗 - 人 OX40 抗体或对对照标记的活化的人 T 细胞。粗线表示在活化的门限中染色的细胞，而细线表示在静息门限中的细胞。在频率分布图中同种型对照 IgG 抗体标记的活化细胞以点线表示。B. 112F32、C. 112V8、D. 112Y55、E. 112Y131 和 F. 112Z5。

[0035] 图 2：活化的人 T 细胞的人抗 - 人 OX40 单克隆抗体染色。所呈现的几何平均荧光强度数据来源于类似于图 1A 中所描述的活化 T 细胞门限。这些数据用于测定示于表 3 中的 KD 和 BMAX。

[0036] 图 3A-B：5 种 OX40 抗体竞争结合 OX40。A. 用抗 - 小鼠 IgG-HRP 检测 hOX40:mFc 与包被的抗体结合的抑制百分数。B. 用绵羊抗 - 人 IgG-HRP 检测 hOX40:hFc 与小鼠抗体结合的抑制百分数。阴性数量未显示。

[0037] 图 4A-B：5 种 OX40 抗体竞争结合 OX40。A. 用 SA-PE 检测的用封闭抗体和生物素化的抗 - OX40 抗体染色的活化 T 细胞的抑制百分数。B. 用 SA-PE 检测用小鼠抗 - 人 OX40

抗体和生物素化的抗-OX40 抗体标记的活化的人 T 细胞的抑制百分数。阴性数量未显示。

[0038] 图 5A-B:通过 ELISA 和流式细胞术测定的人抗-人 OX40 单克隆抗体对 OX40L 与 OX40 结合的封闭。A. 通过 ELISA 用抗-FLAG-HRP 第二抗体检测配体结合的抑制百分数。B. 通过流式细胞术用抗-FLAG-PE 抗体检测 OX40L 结合的抑制百分数。

[0039] 图 6A-C:图 A-C 代表使用三种不同的供体对三个研究,并描述了抗-OX40 抗体对 T 细胞增殖的效应。

[0040] 图 7A-C:抗体 112V8G1 重组抗体改善了急性异种移植物抗宿主病。A. 总宏观病理学评分。B. 通过流式细胞仪分析脾的单一细胞悬浮液中人 T 细胞的存在。显示了 T 细胞的平均数和每一处理组中每个群体的标准偏差。C. 测定了小鼠血清中的人干扰素 γ 。显示了每组小鼠以 pg/ml 计的干扰素 γ 的平均数量加标准偏差。

[0041] 图 8A-C:抗体 112V8G1 改善了慢性异种移植物抗宿主病。A. 小鼠个体的总的宏观病理学评分。B. 通过流式细胞仪测定的小鼠脾中人 T 细胞的平均数加标准偏差。C. 在 CD4T 细胞移植后第 48 天, SCID 小鼠外周淋巴节中人 T 细胞的平均数量。

[0042] 图 9A-C:当在第 0、3 或 6 天给予时,抗体 112V8G4PE 改善了急性异种移植物抗宿主病。A. 在第 0 天处理的小鼠个体的总宏观病理学评分。B. 在第 0 天处理的小鼠中第 12 天脾中人 T 细胞的平均数加组平均偏差。C. 在第 3 天或第 6 天处理的小鼠个体的总宏观病理学评分。

[0043] 图 10:抗-人 OX40 人 IgG1 抗体的特异性溶解百分数。抗-人 OX40 人 IgG1 抗体介导 EL4-人 OX40 靶的 ADCC。发明详述

[0044] 本发明至少部分基于特异性结合 OX40 (CD134) 的抗体,其例如可称为 OX40 抗体、抗-OX40 或抗 OX40 抗体。特异性结合 OX40 的本发明的抗体包括哺乳动物(人、灵长类动物等)、人源化和嵌合的抗-OX40 抗体。特异性结合 OX40 的本发明的抗体和抗体子序列(片段)包括纯化和分离的抗体及其药物配方。

[0045] OX40 是一种 50 千道尔顿 (kDa) 的糖蛋白和肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF) 成员。已报道了在内皮细胞、活化的抗原呈递细胞包括巨噬细胞、树突细胞、B 细胞和自然杀伤细胞上表达 OX40 的配体 -OX40L (也称为 TNFSF4、CD252)。尽管不希望受理论约束,但如同对脂多糖 (LPS) 一样,抗原呈递细胞上 CD40 之间的结合增加了 OX40L 的表达。在通过 T 细胞抗原受体传导信号之后,可诱导 T 细胞上 OX40 表达。例如,在炎症部位处 OX40 在新近活化的 T 细胞上表达。在炎性环境下 CD4 和 CD8T 细胞可上调 OX40。

[0046] OX40 也称为 CD 134、TNFRSF4、ACT35 和 TXGP 1L。OX40 包括哺乳动物(如灵长类动物、人)形式的 OX40。因此,本发明的 OX40 抗体包括特异性结合哺乳动物 OX40 序列如人 OX40 的抗体。OX40 序列如人 OX40 包括多态变体。全长人 OX40 的一个非限制性例子是如下所示的序列:

**MCVGARRLG RGP CAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG
MVSRCRSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTV
RCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSD
AICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGL
GLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
(SEQ ID NO:49).**

[0047] OX40 抗体、抗 -OX40 和抗 -OX40 抗体指特异性结合 OX40 的抗体。特异性结合是抗体对 OX40 上所存在表位的选择。使用本领域已知的测定法（如免疫沉淀、ELISA、流式细胞术、蛋白质印迹）可区分特异性结合和非特异性结合。

[0048] 当抗体特异性结合的所有或部分抗原表位存在于不同的蛋白之上时，OX40 抗体可结合不同的蛋白。因此，取决于 OX40 表位序列或结构同源性的程度，OX40 抗体可特异性结合另一种与该 OX40 表位具有高序列或结构同源性的蛋白。因此，当足够的序列或结构同源性表位存在于不同的蛋白之上时，OX40 抗体可结合不同的蛋白。

[0049] 本发明的 OX40 抗体包括分离的和纯化的抗体。因此，包括分离或纯化的 OX40 抗体的本发明的抗体不包括人类抗体。

[0050] 用作组合物修饰词的术语“分离的”意指该组合物为人工制备或与一种或多种天然存在于体内环境中的其他成分分离，通常通过一步或多步操纵的步骤或过程。一般而言，这样分离的组合物基本上不含有一种或多种在自然界中与它们通常相关的物质，例如一种或多种蛋白、核酸、脂类、碳水化合物、细胞膜。因此，分离的组合物与该组合物天然存在的生物体细胞中其他生物成分分离，或与产生其（如合成或通过细胞培养）的人工培养基分离。例如，分离的 OX40 抗体可获得自其中产生该抗体的动物（如非转基因哺乳动物或转基因哺乳动物，例如啮齿类动物（小鼠）或有蹄类动物（牛））并与其他多肽和核酸分离。因此，含有获得自该动物的抗体的血清被认为是分离的。术语“分离的”并不排除可选的物质形式，例如，分离的抗体可包括抗体子序列、嵌合体、多聚体或衍生形式。

[0051] 用作为组合物修饰语的术语“纯化的”指组合物几乎或基本上不含在自然界中所有与之通常相关的物质。纯化的抗体通常除去了抗体环境中一般存在的成分。因此，与产生抗体的杂交瘤细胞培养物分离的抗体上清液被认为是纯化的。因此，纯化的无需绝对的纯度且该纯度是处于特定的范围中。此外，“纯化的”组合物可与一种或多种其他分子结合。因此，术语“纯化的”并不排除组合物的结合。可通过任何适当的方法测定纯度，包括例如 UV 光谱法、层析法（如 HPLC，气相）、凝胶电泳（如银或考马斯染色）以及序列分析（肽和核酸）。

[0052] “纯化的”蛋白和核酸包括通过标准的纯化方法产生的蛋白和核酸。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达以及化学合成产生的蛋白和核酸。“纯化的”还可指其中污染物水平低于管理机构例如美国食品和药物管理局（FDA）对于人或非人动物用药的可接受的水平的水的组合物。

[0053] 本发明的 OX40 抗体包括特异性结合 OX40 胞外域氨基酸序列中表位的抗体。在具体的实施方案中，如通过交叉封闭测定法所测定的，例证性的 OX40 抗体特异性结合 OX40 上三个“表位”。例证性的非限制性人 OX40 胞外域序列如下所示：

**MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND
RCCHCRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR
SGSERKQLCT-ATQDTVCR CR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA
CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ
PTEAWPRTSQ GPS (SEQ ID NO:50).**

[0054] 肽表位通常是短的氨基酸序列，如长度为约 5-15 个氨基酸的氨基酸序列。用于鉴定表位的技术是本领域熟知的并描述于例如美国专利号 4,708,871 中。简言之，可合成来

源于 OX40 多肽的一组重叠寡肽并将其结合在固相阵列的引脚上,每个引脚上的寡肽都是不同的。引脚阵列可包含 96 孔微量滴定板,使得一次可同时测定 96 种寡肽。同样地,可利用以高密度固定在膜载体上的不同长度(如 6-15 个单体)的高度重叠肽扫描鉴定不连续表位。使用高抗体浓度,并且通过间接的免疫测定检测结合。如果多条结合序列被鉴定并为间隔序列所分隔,但单条肽不被识别,则已鉴定出不连续表位。分隔的表位将预计能在靶蛋白表面上形成连续区域并代表着一种构象表位(Reineke,等 *Protein Sci.* 7:951(1998))。可选地,商业上可获得的噬菌体展示肽文库试剂盒(New England BioLabs)能用于表位作图。这些方法和其他方法可用于测定对可能的每一亚组相邻氨基酸的结合亲和力,以便鉴定特定抗体结合的表位。当表位长度肽序列被用于免疫接种动物,由该动物获得结合该肽序列的抗体时,还可通过推断鉴定表位。还可使用计算机程序如 BEPITOPE 预测连续表位(Odorico 等, *J. Mol. Recognit.* 16:20(2003))。

[0055] 本发明的抗体是属于任何抗体类型如 IgM、IgG、IgA、IgE、IgD 及其任何亚类的单克隆或多克隆免疫球蛋白分子。例证性的 IgG 亚类是 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。“单克隆”抗体指一种基于、获得自或来源于单一克隆包括任何真核、原核或噬菌体克隆的抗体。因此,“单克隆”抗体在结构上得到了定义,而非通过产生其的方法进行定义。

[0056] 具体例证性的与 OX40 特异性结合的抗体称为 112F32(ATCC 编号 PTA-7217,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112V8(ATCC 编号 PTA-7219,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y55(ATCC 编号 PTA-7220,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y131(ATCC 编号 PTA-7218,2005 年 11 月 17 日保藏的)和 112Z5(ATCC 编号 PTA-7216,2005 年 11 月 17 日保藏的),其是人单克隆抗-人 OX40 抗体(结合人 OX40 的人抗体)。例证性的本发明的 OX40 抗体 112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 具有如 SEQ ID NO:7-10 和 SEQ ID NO:44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列。112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 的名称可指抗体或产生该 OX40 抗体的细胞系(如杂交瘤、CHO 细胞或其他宿主细胞)。

[0057] 使用经不同类型的可溶性重组人 OX40(OX40-hIgG1)、融合蛋白(hOX40:hFc 或表达 OX40 的活化的人 T 细胞免疫接种的转染色体(trans-chromosomic)小鼠(KM miceTM)(WO 02/43478,WO 02/092812 和 Ishida,等,IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract(2000))产生例证性的本发明的人抗-人 OX40 抗体。鉴定了特异性标记活化的人 T 细胞而非静息的 T 细胞的例证性的抗体。例证性的抗体可检测地染色了人 OX40 稳定转染的细胞系(EL4-OX40 和 CHO-OX40),但不染色非转化的亲本细胞系,表明该抗体特异性结合人 OX40。例证性的抗体还结合猕猴 OX40 和短尾猴 OX40,但并不可检测地结合鼠 OX40。

[0058] 本发明的抗体可具有 κ 和 λ 轻链序列,或如天然存在的抗体一样是全长序列,或是它们的混合物(即 κ 和 λ 链序列的融合体)、以及它们的子序列/片段。天然存在的抗体分子含有两条 κ 或两条 λ 轻链。

[0059] 本发明的 OX40 抗体还包括,例如特异性结合由称为 112F32(ATCC 编号 PTA-7217,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112V8(ATCC 编号 PTA-7219,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y131(ATCC 编号 PTA-7218,2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y55(ATCC 编号 PTA-7220,2005 年 11 月 17 日保藏的)或 112Z5(ATCC 编号 PTA-7216,2005 年 11 月 17 日保藏的)的杂交瘤细胞系所产生的抗体所结合的氨基酸序列的抗体。本发明的 OX40 抗体进一步包括,例如特异性结合由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗

体所结合的 OX40 胞外域的抗体。本发明的 OX40 抗体额外地包括,例如具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的结合特异性的抗体。上述 OX40 抗体通常显示部分或完全封闭、降低或抑制 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 抗体与 OX40 结合。

[0060] 可使用竞争结合测定法鉴定特异性结合由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体所结合的氨基酸序列的 OX40 抗体,以及具有 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 抗体结合特异性的抗体。可基于与 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 抗体竞争结合 OX40 的能力选择抗体。可通过包括酶联免疫吸附测定 (ELISA) 在内的本领域中已知的多种测定法测定抗体与 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 抗体竞争结合 OX40 的能力,或抑制、降低、减少、阻止或封闭 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 抗体与 OX40 的结合的能力。在具体的方面中,如在 ELISA 测定法中所测定的,本发明的抗体抑制或阻止由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体与 OX40 结合。在更进一步的方面中,如在 ELISA 测定法中所测定的,本发明的抗体抑制至少 50% 的由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体与 OX40 结合。

[0061] 本发明的 OX40 抗体还包括特异性结合 OX40 且不阻止或封闭小鼠抗 - 人 OX40 抗体 L106 (Becton Dickinson, 目录号 340420) 与 OX40 结合的抗体。进一步包括的是特异性结合 OX40 且不抑制、降低或减少抗体 L106 与 OX40 结合的 OX40 抗体。抗体 L106 描述于例如美国专利号 6,277,962, WO 95/12673 和 Schlossman 等, 编. (Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, Oxford: Oxford University Press (1995) pp 1157-60) 中。

[0062] 本发明的 OX40 抗体包括与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相比,具有更大或更小的对 OX40 亲和力的特异性结合 OX40 的抗体。例如,提供了具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 1-10,000 倍 (如 2-5、5-10、10-100、100-1000 或 1000-10,000 倍更大或更小的亲和力,或位于上述数值之内或包含上述数值的任何数值或范围) 范围内的 OX40 结合亲和力的抗体。因此,本发明的 OX40 抗体还包括与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相比,具有更大或更小的 OX40 结合亲和力的抗体。在具体的实施方案中,本发明的 OX40 抗体具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的在约 $KD\ 10^{-6}M$ - 约 $KD\ 10^{-13}M$ 范围内,或位于上述数值之内或包含上述数值的任何数值或范围的 OX40 结合亲和力。

[0063] 可通过缔合速率 (K_a) 和离解速率 (K_d) 测定结合亲和力。平衡亲和常数 KD 是 K_a/K_d 的比率。可使用表面等离子共振法 (SPR) 测定缔合速率 (K_a) 和离解速率 (K_d) (Rich 和 Myska, Curr. Opin. Biotechnol 11:54(2000); Englebienne, Analyst. 123:1599(1998))。已知用于实时检测以及监测结合速率的装置和方法并可从商业渠道获得 (BiaCore2000, Biacore AB, Upsala, Sweden; 和 Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335(1999))。KD 值可定义为饱和一半 (50%) 的 OX40 上结合位点所需要的 OX40 抗体浓度。

[0064] 本发明的 OX40 抗体包括能结合存在于体内一种或多种细胞上,原代细胞分离物、传代细胞、培养细胞和无限增殖化细胞中的 OX40 的抗体。能表达 OX40 的具体的非限制性细

胞类型包括活化的和其他 T 细胞（如活化、效应、记忆或调节 T 细胞）以及非 T 细胞。非 T 细胞的例子包括自然杀伤（NK）细胞、粒细胞（嗜中性白细胞）、单核细胞和 B 细胞。例如，通过用 OX40 编码核酸转染或转化细胞，可将不天然表达 OX40 的细胞制备为表达 OX40 的细胞。能结合 OX40 的 OX40 抗体可结合一种或多种表达或产生 OX40 的转染的或转化的细胞。

[0065] 本发明的抗体包括结合 OX40 并在体内或体外（如在个体中）调节 OX40 功能或活性的抗体。如本文所使用的，当涉及 OX40 活性或功能使用术语“调节”及其语法变化时，意指 OX40 活性或功能被可检测地影响、改变或变化了。因此，调节 OX40 活性或功能的 OX40 抗体是一种可检测地影响、改变或变化一种或多种 OX40 活性或功能的抗体，所述 OX40 活性或功能可包括例如 OX40 与 OX40 配体的结合、OX40 介导的信号传导或 OX40 介导的或 OX40 可调节的细胞应答，或如本文中所列的或其他已知或可知的另外的 OX40 活性或功能。

[0066] 可被调节的多种非限制性的 OX40 活性和功能包括例如 OX40 介导的信号传导或 OX40 介导的或 OX40 可调节的细胞应答、细胞增殖或扩增（如淋巴细胞例如活化、效应、记忆或调节 T 细胞）、细胞生存或凋亡（如淋巴细胞例如活化、效应、记忆或调节 T 细胞），细胞因子（如 Th1、Th2 和非 Th1/Th2 细胞因子）和干扰素表达或产生，抗凋亡蛋白或凋亡前体蛋白表达或产生，以及治疗、预防或改善病症、疾病、它们的生理状态、病理和症状。特异性细胞因子调节包括但不限于 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、干扰素 γ 和 GM-CSF（在体内或体外）。特异性抗凋亡蛋白或凋亡前体蛋白表达包括但不限于 Bcl-xL、Bcl-2、Bad 和 Bim。其他非限制性的可被调节的 OX40 活性和功能包括例如 NF- κ B 激活、PKB(Akt) 活性维持以及存活蛋白的增量调节（Ambrosini 等，*Nat. Med.* 3 :917(1997) 和 Song 等，*Immunity* 22 :621(2005)）。

[0067] 因此，如本文所示的例证性的抗体包括调节一种或多种 OX40 调节的信号传导或 OX40 调节的或诱导的细胞应答、细胞增殖（如活化、效应、记忆或调节 T 细胞）、细胞生存或凋亡（如活化、效应、记忆或调节 T 细胞），细胞因子（如 Th1、Th2 和其他非 Th1/Th2 细胞因子，如 IL-17、IL-23 和 IL-26）和干扰素表达或产生如 Th1、Th2、非 Th1/Th2、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、干扰素 γ 和 GM-CSF（在体内或体外），抗凋亡蛋白或凋亡前体蛋白表达（如 Bcl-xL、Bcl-2、Bad 或 Bim），和治疗、预防或改善病症、疾病、它们的病理和症状的抗体。在具体的方面中，本发明的抗体调节 T 细胞增殖或生存，调节活化、效应、记忆或调节 T 细胞的数量，或耗竭活化、效应、记忆或调节 T 细胞。在另外的具体方面中，本发明的抗体减少或耗竭特异于自身抗原（如髓磷脂碱蛋白（MBP）、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白（MOG）、含蛋白脂质蛋白（PLP）、胶原、滑膜关节组织抗原、胰岛素、谷氨酸脱羧酶、肠抗原、甲状腺抗原、组蛋白、肌肉抗原或皮肤抗原的自身反应性 T 细胞的数量。

[0068] 涉及 OX40 抗体使用的术语“拮抗”及其语法变化意指 OX40 抗体减少、减弱、抑制、推延、阻止或封闭 OX40 与 OX40 配体结合，或减少、减弱、抑制、推延、阻止或封闭 OX40 活性或功能。涉及 OX40 抗体使用的术语“激动”及其语法变化意指 OX40 抗体刺激、增加、增强、促进或诱导 OX40 与 OX40 配体结合，或刺激、增加、增强、促进或诱导通过 OX40 所诱导的活性或功能。因此，本发明的 OX40 抗体包括拮抗抗体和激动抗体。

[0069] 例如，本发明的 OX40 拮抗抗体在体外或体内封闭、减少、减弱、抑制或阻止一种或多种 OX40 活性或功能。在具体的实施方案中，提供了能封闭、减少、减弱、抑制或阻止 OX40

配体 (OX40L) 与可溶形式的 OX40 (CD134) 或在活化 T 细胞表面上表达的 OX40 结合的 OX40 抗体。在另外的实施方案中,在溶解效应细胞 (如自然杀伤细胞、巨噬细胞或嗜中性白细胞) 存在下,OX40 抗体诱导 EL4- 人 OX40 表达细胞或活化的人 T 细胞溶解。在具体的方面中,取决于研究中的背景水平,在 10 μ g/ml 抗体下诱导的特异性细胞溶解百分率 (%) 为约 15-75%、25-65% 或 30-60%,并可高达 100%。此外,温育例证性的 OX40 抗体和与来自同种异体供体 PBMC 共培养的人外周血单核细胞 (PBMC) 能通过抑制同种异体反应性的 CD4 和 / 或 CD8T 细胞从而减少细胞增殖。

[0070] 本发明的 OX40 抗体包括修饰形式,如取代 (如氨基酸取代)、添加或缺失 (如子序列或片段),其可称为“变体”。上述修饰的抗体形式和变体保留了参照 OX40 抗体如称为 112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 的 OX40 抗体的至少部分的功能或活性,如与 OX40 结合、或调节 OX40 的活性或功能 (如 OX40 信号传导)。因此,修饰的 OX40 抗体例如可保留至少部分的 OX40 结合或调节一种或多种 OX40 功能或活性 (如信号传导、细胞应答等) 的能力。

[0071] 如本文所使用的,术语“修饰”及其语法变化意指组合物背离了参照组合物。与参照的未修饰蛋白、核酸或其他组合物相比,修饰的蛋白、核酸和其他组合物可具有更大或更小的活性或不同的功能。

[0072] 在具体的方面中,本发明修饰的抗体保留一种或多种调节 T 细胞增殖或生存,调节活化、效应、记忆或调节 T 细胞的数量,或耗竭活化、效应、记忆或调节 T 细胞的能力。在更进一步的具体方面中,本发明修饰的抗体保留一种或多种减少或耗竭特异于自身抗原的自身反应性 T 细胞或特异于自身抗原 (如髓磷脂碱蛋白 (MBP)、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)、含蛋白脂质蛋白 (PLP)、胶原、滑膜关节组织抗原、胰岛素、谷氨酸脱羧酶、肠抗原、甲状腺抗原、组蛋白、肌肉抗原或皮肤抗原的 B 细胞产生抗体的数量的能力。

[0073] 在多个实施方案中,如 SEQ ID NOs :7-10 和 SEQ ID NOs :44-49 所示的抗体成熟的重链或轻链可变区序列在恒定区、互补决定区 (CDR) 或构架区 (FR) 之内或之外具有一个或多个氨基酸取代。在具体的方面中,氨基酸取代是在恒定区、互补决定区 (CDR) 或构架区 (FR) 之内或之外的保守取代。在另外的多个实施方案中,本发明的抗体与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链或轻链序列 (SEQ ID NOs :7-10 或 SEQ ID NOs :44-49) 具有至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的同一性,或任何位于上述百分值之内或包含上述百分值的数值或范围。取代的残基的典型数目包括 1-3、3-5、5-10 个氨基酸残基,或任何位于上述值之内或包含上述值的数值或范围,或更多的氨基酸残基。

[0074] 这样的包括氨基酸取代的抗体可为核酸所编码。因此,还提供了编码包括氨基酸取代的抗体的核酸序列。

[0075] 术语“同一性”或“同一的”意指两个或更多个参照实体是相同的。因此,当两条蛋白序列 (如 OX40 抗体) 是同一时,它们至少在参照区域或部分中具有相同的氨基酸序列。“同一性区域”指相同的两个或更多个参照实体的一部分。因此,当两条蛋白序列在一个或多个序列区域范围内是同一时,它们在该区域内享有同一性。“实质的同一性”意指分子是在结构上或功能上保守的,使得其具有或预计具有一种或多种参照分子功能或活性的至少部分的功能或活性、或其享有同一性的参照分子的相关的 / 相应的区域或部分的至少部分

的功能或活性。因此,具有实质的同一性的多肽(如 OX40 抗体)具有或预计具有参照多肽(如 OX40 抗体)的至少部分的活性或功能。例如,在一个具体的实施方案中,保留未修饰的 OX40 抗体的至少部分的活性或功能的具有一个或多个修饰(如氨基酸取代、缺失或添加)的 OX40 抗体被认为具有与参照 OX40 抗体的实质的同一性。

[0076] 由于结构上和功能上相关的蛋白之间的差异,保留功能或活性所需要的序列同一性的值取决于该蛋白、区域和该区域的功能或活性。尽管对于蛋白而言,少至 30% 的氨基酸序列同一性能保留给定的活性或功能,但通常需要与参照序列更多的同一性如 50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 的同一性。可使用本领域已知的计算机程序和数学算法确定两条序列之间的同一性程度。上述计算序列同一性(同源性)百分数的算法通常能解决在整个比对范围内的序列缺口和错配。例如,BLAST(如 BLAST 2.0)搜索算法(参见如 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215:403(1990),公众可通过 NCBI 获得)具有如下的例证性搜索参数:错配 -2;缺口打开 5;缺口延伸 2。对于多肽序列比对,BLASTP 算法通常与评分矩阵如 PAM100、PAM 250、BLOSUM 62 或 BLOSUM50 结合使用。FASTA(如 FASTA2 和 FASTA3)和 SSEARCH 序列比对程序也用于定量同一性的程度(Pearson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444(1988);Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185(2000);和 Smith 等, *J. Mol. Biol.* 147:195(1981))。还已开发了利用基于德洛内(Delaunay)拓扑映射的用于定量蛋白质结构相似性的程序(Bostick 等, *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320(2003))。

[0077] “保守取代”是一个氨基酸为生物学上、化学上或结构上相似的残基所取代。生物学上相似的意指该取代不破坏生物活性如 OX40 结合活性。结构上相似的意指氨基酸具有相似长度的侧链,如丙氨酸、甘氨酸或丝氨酸,或具有相似大小的侧链。化学相似性意指残基具有相同的荷电或都是亲水或疏水的。具体的例子包括用一种疏水残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一种,或用一种极性残基取代另一种,如用精氨酸取代赖氨酸,用谷氨酸取代天冬氨酸,或用谷氨酰胺取代天冬酰胺,用丝氨酸取代苏氨酸等等。

[0078] 修饰的抗体还包括用一个或多个 D-氨基酸取代 L-氨基酸(及其混合物),结构和功能类似物,例如,具有合成或非天然的氨基酸或氨基酸类似物及衍生形式的肽模拟物。修饰包括环状结构如在分子的氨基和羧基末端之间的端对端的酰胺键或分子内和分子间二硫键。

[0079] 氨基酸修饰的额外的具体的非限制性例子包括 OX40 子序列和片段。例证性的 OX40 子序列和片段包含本发明的例证性的 OX40 抗体与之结合的 OX40 序列的一部分。例证性的 OX40 子序列和片段还包括免疫原性部分,例如包括本发明的例证性的 OX40 抗体所结合的序列的 OX40 的一部分。

[0080] 根据本发明,提供了 OX40 抗体和编码保留未修饰的或参照的 OX40 抗体的至少部分的功能或活性的 OX40 抗体子序列或片段的核酸。如本文所使用的,术语“子序列”或“片段”意指全长分子的一部分。与全长 OX40 相比,编码 OX40 抗体的 OX40 抗体的子序列至少少一个氨基酸(如一个或多个内部氨基酸或氨基或羧基末端的末端氨基酸缺失)。与全长 OX40 抗体相比,OX40 抗体的子序列至少少一个氨基酸。与全长对照核酸序列相比,核酸子序列至少少一个核苷酸。因此,子序列可具有任何直至全长天然 OX40 的长度。

[0081] 本发明的 OX40 抗体子序列和片段包括如 SEQ ID NOs:7-10 和 SEQ ED NOs:44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列。本发明的 OX40 抗体子序列和片段还包括 Fab、Fab'

和 $F(ab')_2$ 、Fv、Fd、单链 Fv(scFv)、二硫键连接的 Fvs(sdFv)、 V_L 和 V_H 结构域片段。

[0082] OX40 抗体子序列和片段可具有与全长抗体一样的结合亲和力,与全长抗体一样的结合特异性,或与全长抗体一样的一种或多种活性或功能,如 OX40 拮抗或激动抗体的功能或活性。当涉及抗体时,术语“功能性子序列”和“功能性片段”意指保留至少一部分的与全长参照抗体一样的一种或多种功能或活性如 OX40 抗体的功能或活性的抗体部分。例如,与 OX40 或 OX40 的片段结合的抗体子序列或片段被认为是功能性子序列。

[0083] 可组合抗体子序列和片段。例如,可通过接头序列连接 V_L 或 V_H 子序列,从而形成 V_L - V_H 嵌合体。可通过接头序列连接单链 Fvs(scFv) 子序列的组合,从而形成 scFv-scFv 嵌合体。OX40 抗体子序列和片段,包括单链抗体或单独的可变区或可变区与其他 OX40 抗体子序列的全部或一部分的组合。

[0084] 可通过蛋白水解抗体制备抗体子序列和片段,例如,通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全抗体。通过胃蛋白酶酶切割产生的抗体子序列和片段提供了称为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段。使用硫醇还原剂可进一步切割该片段以产生 3.5S Fab' 单价片段。可选地,使用胃蛋白酶切割直接产生了两条单价的 Fab' 片段和 Fc 片段(参见如美国专利号 4,036,945 和 4,331,647;以及 Edelman 等,Methods Enzymol. 1:422(1967))。其他切割抗体的方法如分离重链以形成单价轻链-重链片段,进一步切割片段,或还可使用其他酶或化学方法。

[0085] 可通过遗传方法产生蛋白和抗体及其子序列和片段。技术包括在宿主细胞如 Cos 细胞或大肠杆菌中表达所有或部分的编码蛋白或抗体的基因。重组宿主细胞合成了全长序列或子序列,例如 scFv(参见如 Whitlow 等,在 Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:97(1991)中,Bird 等,Science 242:423(1988);和美国专利号 4,946,778)。可如美国专利号 4,946,778 和 5,258,498;Huston 等,Methods Enzymol 203:46(1991);Shu 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995(1993);以及 Skerra 等,Science 240:1038(1988)中所述的产生单链 Fvs 和抗体。

[0086] 修饰的形式包括衍生的序列,例如氨基酸中游离氨基形成胺盐酸化物、对甲苯磺酰基、苄氧羰基;游离的羧基形成盐、甲酯或乙酯;有羟基形成 O-酰基或 O-烷基衍生物,以及天然存在的氨基酸衍生物,例如对于脯氨酸的 4-羟基脯氨酸、对于赖氨酸的 5-羟基赖氨酸、对于丝氨酸的高丝氨酸、对于赖氨酸的鸟氨酸等。可使用本领域已知的方法来产生修饰(如基于 PCR 的位点定向、缺失和插入诱变,化学修饰和诱变,交联等)。

[0087] 蛋白(如抗体)、核酸和其他组合物的修饰形式包括添加和插入。例如,添加可以是任何类型的分子与蛋白(如抗体)、核酸或其他组合物的共价或非共价连接。添加和插入通常赋予不同的功能或活性。

[0088] 添加和插入包括融合(嵌合)多肽或核酸序列,其是一种具有一个或多个与参照的天然(野生型)序列共价连接且不通常存在于该序列中的分子的序列。具体的例子是用于产生多功能蛋白(如多特异性抗体)的另一种蛋白(如抗体)的氨基酸序列。

[0089] 本发明的抗体还包括具有与其共价连接以赋予截然不同或互补的功能或活性的一个或多个额外的结构域的嵌合体 and 融合体。抗体包括在自然界中非天然存在的其中两条或多条氨基酸序列连接在一起的嵌合体或融合体。

[0090] 根据本发明,提供了 OX40 抗体和编码包括异源结构域的 OX40 抗体的核酸。异源结构域可以是氨基酸添加或插入,但不限于氨基酸残基。因此,异源结构域可由多种不同类

型的小的或大的功能部分的任何一种组成。上述部分包括核酸、肽、碳水化合物、脂类或小的有机化合物如药物、金属（金、银）等。

[0091] 异源结构域的具体的非限制例子包括例如标签、可检测的标记和细胞毒素剂。标签和可检测的标记的具体例子包括 T7-、His-、myc-、HA- 和 FLAG- 标签；酶（辣根过氧化物酶、脲酶、过氧化氢酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素转移酶）；酶底物；配体（如生物素）；受体（抗生物素蛋白）；放射性核素（如 C^{14} 、 S^{35} 、 P^{32} 、 P^{33} 、 H^3 、 I^{125} 和 I^{131} ）；高电子密度试剂；能量传递分子；顺磁标记；荧光团（荧光素、若丹明、藻红蛋白）；发色团；化学发光剂（咪唑、荧光素酶）和生物发光剂。细胞毒素剂的具体例子包括白喉毒素、霍乱毒素和蓖麻毒素。

[0092] 接头序列可插入蛋白（如抗体）、核酸或其他组分之间，该添加或插入（如异源结构域）使得这两个实体至少部分保持各自的功能或活性。接头序列克具有一种或多种特性，包括柔性结构、不能形成有序的二级结构或疏水或荷电特性，其能促进或影响任何一个结构域。典型地见于柔性蛋白区中氨基酸包括甘氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。其他接近中性的氨基酸如苏氨酸和丙氨酸也可用于接头序列中。接头序列的长度可以改变（参见如美国专利号 6,087,329）。接头进一步包括化学交联剂和缀合剂，例如磺基琥珀酰亚胺衍生物（磺基-SMCC、磺基-SMPB）、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯（DSS）、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯（DSG）和二琥珀酰亚胺基酒石酸酯（DST）。

[0093] 更多的添加的例子包括糖基化、脂肪酸、脂类、乙酰化、磷酸化、酰胺化、甲酰化、遍在蛋白化和通过保护或封端基团以及诸多化学修饰中任何一种的衍生化。其他转变和可能性对于本领域技术人员而言是显而易见的，并被认为处于本发明的范围内。

[0094] 可使用重组 DNA 技术通过细胞表达或体外翻译制备上述修饰的序列。还可使用本领域已知方法通过化学合成产生多肽和核酸序列，例如自动化肽合成装置（参见如 Applied Biosystems, Foster City, CA）。

[0095] 可通过多种标准的蛋白纯化或重组表达技术的任何一种产生适于产生抗体的 OX40 蛋白。例如，可通过标准的肽合成技术如固相合成产生 OX40 序列。蛋白的一部分可含有诸如 T7 标签或多组氨酸序列的氨基酸序列以利于纯化表达或合成的蛋白。蛋白可在细胞中被表达并纯化。蛋白可通过重组方法作为更大的蛋白（如融合或嵌合蛋白）的一部分被表达。

[0096] 产生多克隆和单克隆抗体的方法是本领域已知的。例如，OX40 或其免疫原性片段，任选地缀合有载体如匙孔血蓝蛋白（KLH）或卵白蛋白（如 BSA）或与佐剂如弗氏完全或不完全佐剂混合，并用于免疫接种动物。使用杂交瘤技术，可分离来自应答 OX40 的经免疫动物的脾细胞并与骨髓瘤细胞融合。可根据与 OX40 或其免疫原性片段的反应性筛选通过杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0097] 可免疫接种的动物包括灵长类动物、小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、牛或豚鼠。可通过静脉内、腹膜内、肌内或皮下途径进行初次免疫接种和任何可选的后继免疫接种。此外，为增强免疫应答，可将抗原与另一种蛋白如卵白蛋白或匙孔血蓝蛋白（KLH）、甲状腺球蛋白和破伤风类毒素偶联，或与佐剂如弗氏完全或不完全佐剂混合。可通过腹膜内、肌内、眼内或皮下途径进行初次免疫接种和任何可选的后继免疫接种。可用相同或不同浓度的 OX40 制品进行后继免疫接种，间隔可以是定期或不定期的。

[0098] 动物包括那些经遗传修饰以包括人基因座位,可用于产生人抗体的动物。具有一个或多个免疫球蛋白基因的转基因动物描述于例如美国专利号 5,939,598、WO 02/43478 和 WO 02/092812 中。使用常规的杂交瘤技术,可分离来自抗原高应答个体的免疫接种小鼠的脾细胞并与骨髓瘤细胞融。可获得与 OX40 结合的单克隆抗体。

[0099] 描述了用于产生人多克隆抗体和人单克隆抗体的其他方法(参见如 Kuroiwa 等, Nat. Biotechnol. 20 :889 (2002) ;WO 98/24893 ;WO92/01047 ;WO 96/34096 ;WO 96/33735 ;美国专利号 5,413,923 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,569,825 ;5,661,016 ;5,545,806 ;5,814,318 ;5,885,793 ;5,916,771 和 5,939,598)。

[0100] 当涉及抗体使用术语“人”时,意指该抗体的氨基酸序列完全是人的,即人重链和人轻链可变区和人恒定区。因此,所有的氨基酸都是人的或存在于人抗体中。通过用人抗体中存在的氨基酸残基取代非人氨基酸残基,可将非人抗体制备位全人抗体。本领域已知存在于人抗体中氨基酸残基、CDR 区作图和人抗体共有残基(参见如 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第 4 版,US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987) ;Chothia 和 Lesk (1987))。基于调查 22 种已知的人 V_H III 序列的人 V_H 亚组 III 的共有序列以及基于调查 30 种已知的人 κ I 序列的人 $V_L \kappa$ - 链亚组 I 的共有序列描述于 Padlan Mol. Immunol. 31 :169 (1994) 以及 Padlan Mol. Immunol. 28 :489 (1991) 中。因此,人抗体包括其中一个或多个氨基酸残基已被一个或多个存在于任何其他抗体中的氨基酸取代的抗体。

[0101] OX40 抗体包括可使用本领域已知技术产生的人源化抗体,所述技术包括例如 CDR- 嫁接 (EP 239,400 ;WO91/09967 ;美国专利号 5,225,539 ;5,530,101 和 5,585,089)、镶嵌或重建 (EP 592,106 ;EP 519,596 ;Padlan, Molecular Immunol. 28 :489 (1991) ;Studnicka 等, Protein Engineering 7 :805 (1994) ;Roguska. 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91 :969 (1994)) 和链改组 (美国专利号 5,565,332)。之前人共有序列 (Padlan, Mol. Immunol. 31 :169 (1994) ;和 Padlan, Mol. Immunol. 28 :489 (1991)) 已被用于产生人源化抗体 (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4285 (1992) ;和 Presta 等, J. Immunol. 151 :2623 (1993))。

[0102] 当涉及抗体使用术语“人源化的”时,意指抗体的氨基酸序列具有在受体人免疫球蛋白分子中特异性结合期望抗原的一个或多个互补决定区 (CDRs) 的非人氨基酸残基(如小鼠、大鼠、山羊、兔等),以及 Fv 构架区 (FR) 中的一个或多个氨基酸残基,所述人氨基酸残基是侧接 CDR 的氨基酸残基。除受体人免疫球蛋白分子和构架区氨基酸残基可以是除任何人残基之外的任何灵长类动物的氨基酸残基(如类人猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴)之外,称为“灵长类化的”抗体处于“人源化的”抗体的含义中。免疫球蛋白的人 FR 残基可为相应的非人残基所取代。因此,例如 CDR 或人构架区中的残基可为来自供体抗体的非人 CDR 或构架区的相应残基所取代以改变,通常是改善抗原亲和力或特异性。人源化抗体可包括既不见于人抗体也不见于供体 CDR 或构架序列的残基。例如,并不见于人抗体或供体非人抗体的特定位置的 FR 取代可预计能改善在该位置人抗体的结合亲和力或特异性。基于分子模建的抗体构架和 CDR 取代是本领域众所周知的,如通过模建 CDR 和构架残基的相互作用以鉴定对于抗原结合起重要作用的构架残基以及进行序列比较以鉴定在特定位置稀有的构架残基(参见如美国专利号 5,585,089 和 Riechmann 等, Nature 332 :

323(1988))。

[0103] OX40 抗体包括嵌合抗体。如本文中所使用的,当涉及抗体使用术语“嵌合”及其语法变化时,意指抗体的氨基酸序列含有一个或多个来源于、获得或分离自、或基于两种或更多种不同物种的部分。例如,抗体的一部分可以来自人(如恒定区)以及抗体的另一部分可以来自非人(如鼠重链或鼠轻链可变区)。因此,嵌合抗体的一个例子是一种其中抗体的不同部分为不同物种来源的抗体。不同于人源化或灵长类抗体,嵌合抗体在抗体的任何区域中可具有不同的物种序列。

[0104] 用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的(如 Morrison, Science 229:1202(1985); Oi 等, BioTechniques 4:214(1986); Gillies 等, J. Immunol. Methods 125:191(1989); 以及美国专利号 5,807,715; 4,816,567 和 4,816,397)。例如在 Munro, Nature 312:597(1984); Neuberger 等, Nature 312:604(1984); Sharon 等, Nature 309:364(1984); Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984); Boulianne 等, Nature 312:643(1984); Capon 等, Nature 337:525(1989); 和 Traunecker 等, Nature 339:68(1989) 中描述了其中来自一种物种抗体的可变区被另一种物种的可变区所取代的嵌合抗体。

[0105] 还可使用杂交瘤技术、重组技术和噬菌体展示技术或它们的组合产生 OX40 抗体(参见美国专利号 4,902,614, 4,543,439 和 4,411,993; 还参见 Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn 和 Bechtol(编), 1980, 以及 Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1988)。

[0106] 可额外用于抗体方法中的合适的技术包括基于 OX40 的亲纯化、非变性凝胶纯化、HPLC 或 RP-HPLC、大小排阻、在蛋白 A 柱上纯化、或这些技术的任何组合。可使用 ELISA 测定法测定 OX40 抗体同种型,例如可使用鼠 Ig- 吸附的抗-人 Ig 鉴定人 Ig。

[0107] 可通过本领域已知的多种标准的蛋白纯化或重组表达技术中的任何一种来产生适于产生抗体的 OX40。适于产生免疫应答的 OX40 的形式包括 OX40 子序列如免疫原性片段。另外的 OX40 的形式包括 OX40 表达细胞、含有 OX40 的制品或细胞提取物或级分、部分纯化的 OX40。

[0108] 根据本发明,提供了表达 OX40 抗体、其子序列和片段以及编码本发明的 OX40 抗体、子序列和片段的核酸的分离或纯化的细胞。在一个实施方案中,分离的细胞表达具有称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的抗体的可变区氨基酸序列的抗体。在另一个实施方案中,分离的细胞表达具有与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相同的结合特异性的抗体。在一个更进一步的实施方案中,分离的抗体表达与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争结合 OX40 的抗体。在一个另外的实施方案中,分离的细胞表达与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体相比,具有更大或更小的对 OX40 结合亲和力的抗体。在具体的方面中,对 OX40 的结合亲和力在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 10^{-6} M- 约 10^{-13} M 范围内。在另外的具体方面中,对 OX40 的结合亲和力在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 10^{-6} M- 约 10^{-13} M 范围内。本发明的表达 OX40 抗体、其

子序列和片段,以及编码 OX40 抗体、其子序列和片段的核酸的分离或纯化的细胞的具体的非限制性例子包括脾细胞、杂交瘤细胞和 CHO 细胞。分离或纯化的细胞可以是来自原代细胞分离物(如脾细胞)、次级细胞或传代细胞分离物、或已建立的或无限增殖化的细胞培养物(杂交瘤或 CHO 细胞)的多个细胞或一群细胞。

[0109] 根据本发明,进一步提供了产生特异性结合 OX40 的抗体的方法。在一个实施方案中,一种用于产生 OX40 抗体的方法包括给予能表达人免疫球蛋白的动物(如转基因小鼠或转基因牛)任选地缀合有人 Fc 重组蛋白的人 OX40、子序列或片段(如 OX40 胞外域),筛选表达人 OX40 抗体的动物,以及选择产生人 OX40 抗体的动物,从所选择的动物中分离抗体。在一方面中,该方法确定人 OX40 抗体是否具有 OX40 拮抗或激动活性。

[0110] 根据本发明,额外提供的是产生抑制或阻止 OX40 结合 OX40 配体(OX40L)的人 OX40 抗体的方法。在一个实施方案中,一种用于产生人 OX40 抗体的方法包括给予能表达人免疫球蛋白的动物(如转基因小鼠或转基因牛)任选地缀合有人 Fc 重组蛋白的 OX40、子序列或片段(如 OX40 胞外域),筛选表达人 OX40 抗体的动物,选择产生人 OX40 抗体的动物,以及从所选择的产生人 OX40 抗体的动物中分离抗体。在一方面中,该方法确定人 OX40 抗体是否抑制或阻止 OX40 结合 OX40 配体(OX40L)。

[0111] 根据本发明,提供了表达 OX40 抗体的非人转基因动物,所述 OX40 抗体具有一种或多种下列特征:a) 相同于由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体;b) 结合由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体所针对的 OX40 胞外域氨基酸序列中的表位;c) 具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 1-5000 倍范围内的 OX40 结合亲和力;d) 具有在由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的约 $KD\ 10^{-6}M$ -约 $KD\ 10^{-12}M$ 范围内的 OX40 结合亲和力;e) 具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的结合特异性;或 f) 与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争结合 OX40。

[0112] 根据本发明,还提供了编码 OX40 抗体、其子序列和片段的分离或纯化的核酸。在多个实施方案中,核酸序列编码如 SEQ ID NOs:7-10 和 SEQ ID NOs:44-49 所示的成熟的重链或轻链可变区序列的序列,或其子序列。在另外的实施方案中,核酸序列包含 SEQ ID NOs:3-6 和 SEQ ID NOs:38-43 及其子序列的任一。在另外的实施方案中,核酸序列包含 SEQ ID NOs:3-6 和 SEQ ID NOs:38-43 及其子序列任一的简并序列。

[0113] 核酸可以具有不同的长度。编码本发明的 OX40 抗体或其子序列的核酸的长度通常为约 100-600 个核苷酸、或在上述长度之内或包含上述长度的任何数值或范围,100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、或约 550-600 个核苷酸、或在上述长度之内或包含上述长度的任何数值或范围。与编码本发明的 OX40 抗体或其子序列的核酸特异性杂交的核酸的长度通常为约 10-20、20-30、30-50、50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-600 个核苷酸,或在上述长度之内或包含上述长度的任何数值或范围。

[0114] 术语“核酸”和“多核苷酸”指通过磷酸酯键连接的至少两个或更多个核糖核酸或脱氧核糖核酸碱基对(核苷酸)或等价物。核酸包括多核苷酸和多核苷。核酸包括单链、

双链或三链、环形或线性分子。例证性的核酸包括但不限于：RNA、DNA、cDNA、基因组核酸、天然存在或非天然存在的核酸，如合成的核酸。短的核酸和多核苷酸（如 10-20 个、20-30 个、30-50 个、50-100 个核苷酸）通常称为“寡核苷酸”或单链或双链 DNA 的“探针”。

[0115] 提供了编码具有如 SEQ ID NOs :7-10 和 SEQ ID NOs :44-49 任一所示的重链或轻链可变区序列经一个或多个氨基酸残基取代、添加或缺失的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中，经取代、添加或缺失的重链或轻链可变区序列具有针对 OX40 胞外域表位的结合亲和力。在另一个实施方案中，经取代、添加或缺失的重链或轻链可变区序列具有由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的活性，例如调节 OX40 的功能或活性。

[0116] 本发明提供了与编码由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的 OX40 抗体的全部或子序列的核酸杂交的核酸，其至少 80-90% 互补或同源于编码由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的全部或子序列或片段的核酸序列。在一个实施方案中，该核酸序列具有约 10-20、20-30、30-50、50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-600 个核苷酸的长度，或在上述长度之内或包含上述长度的任何数值或范围。在具体的方面中，核酸序列与由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链或轻链可变区序列或其部分（如 CDR、FR 等）杂交。

[0117] 术语“杂交”及其语法变化指在核酸序列之间的结合。杂交序列通常与编码参照（如 OX40 抗体）序列的氨基酸序列的核酸会具有大于约 50% 的同源性。在杂交序列之间的杂交区通常为至少约 12-15 个核苷酸、15-20 个核苷酸、20-30 个核苷酸、30-50 个核苷酸、50-100 个核苷酸、100-200 个、300-400 个核苷酸或更多，或在上述长度之内或包含上述长度的任何数值或范围。

[0118] 核酸序列进一步包括核苷酸和核苷取代、添加和缺失，以及衍生形式和融合 / 嵌合序列（如编码与异源结构域融合的 OX40 抗体）。例如，由于遗传密码的简并性，核酸包括对于编码由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 和 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体的核酸简并的序列和子序列。其他的例子是与编码由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 或 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体、其子序列和片段的序列互补的核酸。

[0119] 可使用多种标准的克隆和化学合成技术产生核酸。技术包括但不限于核酸扩增，如利用能退火至抗体编码序列的引物（如简并引物混合物），采用基因组 DNA 或 cDNA 靶的聚合酶链反应 (PCR)。还可通过化学合成（如固相亚磷酰胺合成）或由基因转录产生核酸。然后，可在体外翻译所产生的序列，或将所产生的序列克隆入质粒中并增殖，接着在细胞中（如宿主细胞例如酵母或细菌、真核细胞例如动物或哺乳动物细胞或在植物中）表达。

[0120] 根据本发明，进一步提供了包括载体的本发明的核酸序列。在一个实施方案中，载体包括编码 OX40 抗体、其子序列或片段的核酸序列。在具体的实施方案中，载体包括编码由称为 112F32、112V8、112Y131、112Y55 和 112Z5 的杂交瘤细胞系所产生的抗体，其子序列或片段任一的核酸序列。

[0121] 载体是通过插入或掺入核酸能被操作的媒介物。载体包括质粒、病毒、原核（细菌）和真核（植物、真菌、哺乳动物）载体。载体可用于体外或体内表达核酸。这样的载体被称为“表达载体”，可用于导入核酸，包括编码 OX40 抗体、其子序列和片段的核酸，并在体

外（如在溶液中或在固相中）、细胞中或个体体内表达所编码的蛋白。

[0122] 载体还可用于核酸操作。对于遗传操作而言，可使用“克隆载体”，并在体外（如在溶液中或在固相中）、细胞中或个体体内转录或翻译所插入的核酸。

[0123] 载体通常含有用于在细胞中进行体外或体内增殖的复制起点。适当时，包括存在于载体中的表达控制元件在内的控制元件可包含于载体中以利于转录和翻译。

[0124] 载体可包括选择标记。“选择标记”是一种容许对含有该基因细胞进行选择的因素。“正选择”指在暴露于正选择条件下选择含有选择标记的细胞的过程。药物抗性是含有该标记的正选择标记细胞在含有药物的培养基中将生存而缺少该标记的细胞将死亡的一个例子。选择标记包括药物抗性基因如 neo，其赋予对 G418 的抗性；hygr，其赋予对潮霉素的抗性；和 puro，其赋予对嘌呤霉素的抗性。其他正选择标记基因包括容许鉴定或筛选含有该标记的细胞的基因。这些基因包括编码荧光蛋白（GFP 和 GFP-样发色团、荧光素酶）的基因、lacZ 基因、碱性磷酸酶基因和表面标志如 CD8 等。“负选择”指在暴露于适合的负选择剂下其中含有负选择标记的细胞被杀死的过程。例如，含有单纯疱疹病毒胸苷激酶（HSV-tk）基因的细胞（Wigler 等，Cell 11:223(1977)）对药物更昔洛韦（GANC）敏感。同样地，gpt 基因使细胞对 6-硫代黄嘌呤敏感。

[0125] 病毒载体包括基于逆转录病毒的那些载体（用于感染分裂和不分裂的细胞的慢病毒）、泡沫病毒（美国专利号 5,624,820,5,693,508,5,665,577,6,013,516 和 5,674,703；W092/05266 和 W092/14829）、腺病毒（美国专利号 5,700,470,5,731,172 和 5,928,944）、腺伴随病毒（AAV）（美国专利号 5,604,090）、单纯疱疹病毒载体（美国专利号 5,501,979）、基于巨细胞病毒（CMV）的载体（美国专利号 5,561,063）、呼肠孤病毒、轮状病毒基因组、猿猴病毒 40（SV40）或乳头状瘤病毒（Cone 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349(1984)；Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman 编，1982；Sarver 等，Mol. Cell. Biol. 1:486(1981)；美国专利号 5,719,054）。腺病毒能有效地感染缓慢复制的细胞和/或终末分化细胞并可用于靶向缓慢复制的细胞和/或终末分化细胞。其他用于表达的病毒载体包括细小病毒、诺瓦克病毒、冠状病毒、副粘病毒和杆状病毒、披膜病毒（如辛德比斯病毒和塞姆利基森林病毒）以及水泡性口膜炎病毒（VSV）。

[0126] 当核酸与表达控制元件可操作连接时，包含该核酸的载体可被表达。术语“可操作连接”指在所提及的元件之间一种容许它们能以它们所预期的方式进行操作的物理或功能上的关系。因此，核酸“可操作连接”表达控制元件意指该控制元件调节核酸转录以及适当时调节转录物的翻译。

[0127] “表达控制元件”或“表达控制序列”是影响可操作连接的核酸表达的多核苷酸。启动子和增强子是表达控制元件和序列的具体的非限制性例子。“启动子”是一种能启动下游（3' 方向）核酸序列转录的顺式作用 DNA 调节区。启动子序列包括促进转录启动的核苷酸。增强子也调节核酸表达，但能在远离其可操作连接的核酸的转录起始位点处起作用。无论位于核酸的 5' 或 3' 末端，还是在核酸内部（如内含子或编码序列），增强子都能起作用。额外的表达控制元件包括前导序列和融合配偶体序列，用于创建多基因的内部核糖体结合位点（IRES）元件，或用于内含子、维持正确基因读框以使 mRNA 进行符合读框的翻译的多顺反子、信使、剪接信号，提供给目标转录物适当的多腺苷酸的多腺苷酸化信号和终止密码子。

[0128] 表达控制元件包括其中可操作连接的核酸的转录发生无需信号或刺激物的“组成型”元件。赋予表达响应于增加或减少可操作连接的核酸表达的的信号或刺激物的表达控制元件是“可调节的”。增加响应于信号或刺激物的可操作连接的核酸表达的可调节的元件称为“诱导型元件”。减少响应于信号或刺激物的可操作连接的核酸表达的可调节的元件称为“阻遏型元件”(即该信号减少表达;当除去信号或不存在信号时,表达增加)。

[0129] 对于细菌表达,组成型启动子包括 T7,以及诱导型启动子如噬菌体 λ 的 pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac 杂合启动子)。在昆虫细胞系统中,可使用组成型或诱导型启动子(如蜕皮激素)。在酵母中,组成型启动子包括例如 ADH 或 LEU2,以及诱导型启动子如 GAL(参见如 Ausubel 等,在 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, 编辑, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988 中; Grant 等,在 Methods in Enzymology, 153: 516-544(1987), 编辑. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N. Y. 中; Glover, DNA Cloning. Vol. II, Ch. 3, IRL Press, Wash., D. C., 1986; Bitter, 在 Methods in Enzymology, 152: 673-684(1987), 编辑. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y. 中; 和 Strathern 等, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces 编辑. Cold Spring Harbor Press, Vols. I 和 II(1982))。

[0130] 对于哺乳动物表达,可使用病毒或其他来源的组成型启动子。例如 CMV、SV40 或病毒长末端重复(LTRs)等等,或使用来源于哺乳动物细胞基因组(如金属硫蛋白 IIA 启动子;热休克启动子、类固醇/甲状腺激素/视黄酸应答元件)或乳动物病毒(如腺病毒晚期启动子;小鼠乳腺癌病毒 LTR)的诱导型启动子。

[0131] 表达控制元件包括在特定组织或细胞类型中具有活性的元件,称为“组织特异性表达控制元件”。在特定细胞或组织类型中组织特异性表达控制元件通常是更具活性,这是因为与其他细胞或组织类型相比,它们为在特定细胞或组织类型中的转录激活因子蛋白或其他具有活性的转录调节物所识别。上述表达控制元件的具体的非限制性例子是启动子如己糖激酶 II、COX-2、甲胎蛋白、癌胚抗原、DE3/MUC1、前列腺特异性抗原、C-erbB2/neu、依赖于葡萄糖的促胰岛素多肽(GIP)、端粒末端转移酶逆转录酶和低氧反应性启动子。

[0132] 根据本发明,提供了用本发明的 OX40 核酸或载体转化或转染的宿主细胞。宿主细胞包括但不限于原核和真核细胞如细菌、真菌(酵母)、植物、昆虫和动物(如哺乳动物,包括灵长类动物和人)细胞。转化细胞的非限制性例子包括用重组噬菌体核酸、质粒核酸或粘粒核酸表达载体转化的细菌;用重组酵母表达载体转化的酵母;用重组病毒表达载体(如花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染的或用重组质粒表达载体(如 Ti 质粒)转化的植物细胞;用重组病毒表达载体(如杆状病毒)感染的昆虫细胞;以及用重组病毒表达载体(如逆转录病毒、腺病毒、痘苗病毒)感染的动物细胞或工程化以稳定表达的转化的动物细胞。表达 OX40 抗体及其子序列和片段的哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括 CHO 细胞。宿主细胞可以是来自原代细胞分离物、次级细胞或传代细胞分离物、或已建立的或无限增殖化的细胞培养物的多个细胞或一群细胞。

[0133] 当涉及细胞(如宿主细胞)或生物体使用术语“转化的”或“转染的”时,意指在将异源分子如蛋白或核酸(如转基因)整合入细胞后细胞中的遗传改变。因此,“转染的”或“转化的”细胞是一种异源分子业已经由操纵如通过重组 DNA 技术导入其中或其后代中的细胞。

[0134] 核酸或蛋白可在细胞及其后代中稳定地或瞬时地转染或转化（表达）。细胞可被增殖并表达所导入的蛋白或转录核酸。由于在复制过程中可能发生突变，因此转染或转化细胞的后代可以不同于亲本细胞。

[0135] 典型地，细胞转染或转化使用了载体。载体可包含于病毒颗粒或小泡中并任选地通过结合靶细胞配体或受体的在颗粒或小泡表面上所包含的蛋白从而靶向特定细胞类型。因此，病毒颗粒或小泡自身或病毒表面上的蛋白可使靶细胞能用于体外、离体或体内转染或转化。因此，包括了在体外、体内和离体递送至细胞、组织或器官中的病毒和非病毒载体工具。

[0136] 还可通过本领域已知的方法如渗透压休克（如磷酸钙）、电穿孔、显微注射、细胞融合等将核酸导入靶细胞（如宿主细胞）中。还可使用其他技术完成核酸和多肽的体外、离体和体内导入。例如，使用聚合物如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚烯吡酮、乙烯乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸精蛋白或丙交酯 / 乙交酯共聚物、聚交酯 / 乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物。例如分别或在胶体体系中通过利用羟甲基纤维素或明胶 - 微胶囊，或聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊，可将核酸包埋在通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊中。胶体分散体系包括大分子络合物、纳米胶囊、微球、珠子和基于脂质的体系，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

[0137] 用于将多种组合物导入细胞中的脂质体是本领域已知的，并包括例如磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、脂质转染试剂（lipofectin）和 DOTAP（如美国专利号 4,844,904, 5,000,959, 4,863,740 和 4,975,282；以及 GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md）。还已知用于基因治疗的基于的两亲阳离子脂质的哌嗪（参见如美国专利号 5,861,397）。阳离子脂质体系也是已知的（参见如美国专利号 5,459,127）。聚合物、微胶囊和胶体分散体系如脂质体在此一并称为“囊泡（vesicles）”。

[0138] 本发明的 OX40 抗体在包括临床和诊断方法的处理、治疗和诊断应用中是有用的。例如，在急性或慢性移植物抗宿主病（GVHD）的小鼠模型中，当人 PBMC 转移到受辐射的严重联合免疫缺陷（SCID）小鼠中时，当人抗 - 人 OX40 拮抗抗体在疾病发作前或发作后给予时减少了人 T 细胞数量和疾病病理。因此，本发明的 OX40 抗体能减轻、减少或预防急性或慢性异种移植物宿主疾病模型中的移植物抗宿主病（GVHD）症状；并使急性或慢性异种移植物宿主疾病模型（如免疫缺陷型（SCID）小鼠）中的移植物抗宿主病缓解或消退。本发明的抗体还能通过自然杀伤细胞诱导 OX40 表达细胞的溶解。尽管并不希望受任何理论约束，但 OX40 表达细胞的溶解可能是由于抗体依赖性细胞毒作用（ADCC）。

[0139] 因此，本发明的 OX40 抗体在能服从或可顺利地应答于通过调节 OX40 活性或功能的病症和疾病的处理或治疗中是有用的。因而，OX40 拮抗抗体可用于治疗能服从或可能顺利地应答于减少、减弱、抑制、阻止或阻断 OX40 活性或功能的病症、疾病、它们的生理状态、病理和症状，而 OX40 激动抗体则可用于治疗能服从或可能顺利地应答于刺激、增加、增强、促进或诱导 OX40 活性或功能的病症、疾病、它们的生理状态、病理和症状。

[0140] 根据本发明，提供了治疗与不合需要的或异常的免疫应答相关的病症、疾病、症状、病理和不利症状或异常的方法。如本文所使用的，“不合需要的免疫应答”或“异常的免疫应答”指任何大于或小于所需要的或生理学上正常的免疫应答、活性或功能。不合需要的免疫应答、功能或活性可以是正常的应答、功能或活性。因此，正常的免疫应答只要它们是

不合需要的,即使不被认为是异常的,都包括在这些术语的含义中。不合需要的免疫应答、功能或活性也可以是异常的应答、功能或活性。异常的(反常的)免疫应答、功能或活性背离了正常的免疫应答、功能或活性。不合需要的和异常的免疫应答可以是慢性或急性的体液应答、细胞介导的应答或它们的组合。

[0141] 不合需要的和异常的免疫应答的一个例子是高应答性的免疫应答,如在自身免疫性病症或疾病(如自身免疫性)情况下的免疫应答。不合需要的和异常的免疫应答的另一个例子是其中导致任何组织或器官中急性或慢性炎症的免疫应答。不合需要的和异常的免疫应答的又一个例子是其中导致细胞、组织或器官破坏的免疫应答,如移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、自身免疫性病症或疾病或炎症。不合需要的和异常的免疫应答的还一个例子是低应答性的免疫应答,如对抗原的应答低于所需要的,如出现耐受性。

[0142] 因此,不合需要的和异常的免疫应答包括取决于病症或疾病的特征在于生理状态、病理和不利症状或异常的慢性和急性免疫病症和疾病。本发明适用的免疫病症和疾病的具体的非限制性例子包括移植物抗宿主病(GVHD)、移植排斥、自身免疫性疾病和炎症。

[0143] 根据本发明,提供了至少部分基于 OX40 抗体调节 OX40 活性或功能的能力的体内处理和治疗方法。在具体的治疗方法的实施方案中,能服从于或可响应于用本发明的 OX40 抗体处理或治疗的病症、疾病、生理状态、病理和症状包括例如慢性或急性免疫性疾病或病症。在更多的治疗方法的实施方案中,能服从于用本发明的 OX40 抗体处理或治疗的病症、疾病、生理状态、病理和症状包括例如炎症、移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、自身免疫性病症或疾病如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病(如胰岛素依赖型糖尿病、IDDM、I 型糖尿病)、克罗恩氏病(CD)、炎性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎(UC)、乳糜泻、银屑病、全身性红斑狼疮(SLE)、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病、多发性肌炎和不合需要的或异常的 OX40-介导的细胞应答。

[0144] 因此,本发明提供了其中 OX40 抗体、子序列或片段用于减轻、减少、抑制、预防和阻断慢性或急性免疫性疾病或病症、炎症、移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)或自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病(如胰岛素依赖型糖尿病、IDDM、I 型糖尿病)、克罗恩氏病(CD)、炎性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎(UC)、乳糜泻、银屑病、全身性红斑狼疮(SLE)、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病、多发性肌炎或不合需要的或异常的 OX40-介导的细胞应答,治疗和减轻、减少、抑制、预防和阻断气道高反应性/超敏反应(如哮喘、变应性哮喘)以及其他组织和器官中的肺部炎症的方法。根据本发明可治疗的移植物抗宿主病症状的具体的非限制性的例子是体重减轻、脱发、皮疹、血尿、腹水和肝、肠道、肺、皮肤中炎性细胞浸润和死亡。

[0145] OX40 抗体还可用于减轻、减少、抑制、预防和阻断出现在肺、关节、肌肉、皮肤、中枢或末梢神经系统或肠中的炎症。OX40 抗体能额外地用于减轻、减少、抑制、预防和阻断因个体对传染物(如细菌、病毒或寄生性传染物)的反应所引起的炎症。

[0146] 能用 OX40 抗体处理或治疗的额外的病症包括例如骨关节炎、银屑病关节炎、脑脊髓炎、重症肌无力、自身免疫性甲状腺炎,特应性皮炎、湿疹性皮炎、银屑病、斯耶格伦氏综合征、口腔溃疡、虹膜炎、结膜炎、角膜结膜炎、皮肤红斑狼疮、硬皮病、阴道炎、直肠炎、麻风结节性红斑、自身免疫性葡萄膜炎、变应性脑脊髓炎、急性坏死性出血性脑病、特发性两侧进行性感觉神经性失聪、再生障碍性贫血,真性红细胞性贫血,特发性血小板减少症

(ITP), 多软骨炎、韦格纳氏肉芽肿病、慢性活动性肝炎, 斯-约二氏综合征、特发性口炎性腹泻 (idiopathic sprue)、扁平苔癣, 格雷夫斯氏病, 肉样瘤病、原发性胆汁性肝硬变、后葡萄膜炎、间质性肺纤维化、桥本甲状腺炎、自身免疫性多腺体综合征、免疫介导的不育症、自身免疫性阿狄森氏病、寻常天疱疮、落叶性天疱疮、疱疹样皮炎、自身免疫性脱发、白癜风、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、恶性贫血、格-巴二氏综合征、硬汉综合征、急性风湿热、交感性眼炎、古德帕斯彻氏综合征、系统性坏死性血管炎、抗磷脂综合征、哮喘 (如过敏性哮喘) 和变态反应。

[0147] 如本文所使用的, 术语“移植”、“移植术”及其语法变化意指将来自身体一部分的细胞、组织或器官嫁接、植入或移植到另一部分, 或将来自一个个体或动物的细胞、组织或器官嫁接、植入或移植到另一个体或动物。因此, 所移植的细胞、组织或器官可以是同种异体移植物或异种移植物。例证性的移植细胞包括骨髓干细胞、造血干细胞、外周血干细胞和脐带血干细胞、同种异体或非同种异体细胞以及神经细胞。例证性的移植组织包括皮肤、血管、眼睛和骨髓。例证性的移植器官包括肾、心、肺、胰和肝。该术语还包括遗传修饰的细胞、组织和器官, 如通过离体基因治疗而遗传修饰的细胞、组织和器官, 其中被转化的细胞、组织和器官获得自或来源于之后从不同的个体 (如人或动物) 接受移植物的个体 (如人或动物)。

[0148] 根据本发明可治疗的炎症包括 OX40 介导的炎症反应或由于调节 OX40 而能服从于用 OX40 抗体治疗, 而又能调节一种或多种淋巴细胞 (如活化、效应、记忆或调节 T 细胞) 的细胞增殖、生存、死亡或活性等的炎症反应。方法 (如治疗) 可引起炎症发生、频率、严重性、进展或持续时间的减少。例证性的炎症症状包括肿胀、疼痛、皮疹、头痛、发热、恶心、骨关节僵直或组织或细胞损伤的一种或多种。

[0149] 炎症可直接或间接导致对多种细胞、组织或器官或对单一细胞类型、组织类型或器官的细胞、组织或器官损害。可显示出损害的例证性的组织和器官包括表皮或粘膜组织、消化道、肠、胰腺、胸腺、肝、肾、脾、皮肤或骨骼关节 (如膝、踝、髌、肩、腕、指、趾或肘关节)。根据本发明的治疗可引起组织损害的缓解、抑制或阻止其进展或恶化, 或导致受损的器官或组织如皮肤、粘膜 (mucosum)、肝的再生。

[0150] 如本文所使用的, 术语“治疗”及其语法变化意指对个体个体或患者所进行的其中期望在患者中获得生理效应或结果的治疗方案、用药法、处理或治疗法。因此, 本发明的方法尤其包括在给定个体的病症、疾病、生理状态、病理或症状中提供可测量的改善或有益效果的处理和治疗方法。可测量的改善或有益结果是病症、疾病、生理状态、病理或症状中任何客观或主观的、短暂的、临时的或长期的改善, 或减少与病症、疾病、生理状态、病理或症状相关的或由病症、疾病、生理状态、病理或症状所引起的不利症状发生、严重性、持续时间或频率。本发明的方法无需即刻见效, 可以有一些延迟, 但随时间的过去, 在给定的个体中会出现最终的改善或有益效果、稳定作用或改进作用。

[0151] 例如, 当增量或部分降低或减少一种或多种与病症、疾病、病理或症状相关的病理、不利症状或并发症严重性、持续时间或频率, 或抑制、减少、预防或逆转一种或多种病症、疾病、生理状态、病理或症状 (如慢性或急性免疫性疾病或病症、GVHD、移植排斥、炎症或自身免疫性疾病) 的生理学、病理学、生物化学或细胞表现或特征时, 就达到了根据本发明的治疗方法的令人满意的临床终末点。因此, 治疗益处或改善可以不需要治愈, 或消除

大多数或全部的与病症、疾病、生理状态、病理或症状（如慢性或急性免疫性疾病或病症、GVHD、移植排斥、炎症或自身免疫性疾病）相关或由之所引起的病理、不利症状或并发症。因此，治疗益处或改善无需产生任何或全部的与病症、疾病、生理状态、或病理（如慢性或急性免疫性疾病或病症、GVHD、移植排斥、炎症或自身免疫性疾病）相关或由之所引起的病理、不利症状或并发症的完全治愈。例如，部分减少、降低或抑制，或稳定或减缓与病症、疾病、生理状态或病理（如慢性或急性免疫性疾病或病症、GVHD、移植排斥、炎症或自身免疫性疾病）相关或由之所引起的病理、不利症状或并发症的进展或恶化，即使只持续几天、几周或几个月，或即使一种或多种与疾病、病症、病理或症状（如慢性或急性免疫性疾病或病症、GVHD、移植排斥、炎症或自身免疫性疾病）相关或由之所引起的病理、不利症状或并发症仍然保留，也是令人满意的临床结果。

[0152] 在多个具体的实施方案中，治疗方法包括缓解或改善一种或多种与慢性或急性免疫病症或疾病相关的不利（身体）症状或后果。在多个另外的具体实施方案中，治疗方法包括减轻、减少或预防一种或多种与移植物抗宿主病相关的不利症状或身体后果（如体重减轻、脱发、皮疹、血尿、腹水、肝、肠道、肺中炎性细胞浸润和死亡）的发作、频率、持续时间或严重性，或导致移植物抗宿主病的缓解或消退，或导致预防移植物抗宿主病。在多个更进一步的具体实施方案中，治疗方法包括减轻、减少或预防一种或多种与移植物或移植排斥相关的不利症状或身体后果（如针对移植体或移植物的免疫应答，或移植体或移植物细胞破坏）的发作、频率、持续时间或严重性，或导致移植物或移植排斥的缓解或消退，或导致预防移植物或移植排斥。在多个更进一步具体的实施方案中，治疗方法包括减轻、减少或预防一种或多种与类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病（如胰岛素依赖性糖尿病、IDDM、I 型糖尿病）、克罗恩氏病（CD）、炎性肠病（IBD）、溃疡性结肠炎（UC）、乳糜泻、银屑病、全身性红斑狼疮（SLE）、增生性狼疮性肾炎、肉芽肿性肌病、多发性肌炎或不合需要的或异常的 OX40- 介导的细胞应答相关的不利症状或身体后果的发作、频率、持续时间或严重性。在更进一步的多个具体实施方案中，治疗方法包括减少自身反应性细胞或产生抗自身蛋白抗体的细胞的数量或增殖，抑制或阻止自身反应性细胞或产生抗自身蛋白抗体的细胞的数量、增殖或生存的增加。

[0153] 就免疫病症或疾病而言，可测量的改善或有益效果包括朝着被认为是成功的治疗结果的生理学正常的基线水平调节淋巴细胞（如活化、效应、记忆或调节 T 细胞）的数量、增殖或活性。对于免疫病症或疾病而言，可测量的改善或有益效果的一个额外的例子是由该免疫病症或疾病所引起的或与之相关的组织病理学改变的改善。例如，进一步阻止或缓解骨骼关节浸润或组织破坏，或胰腺、胸腺、肾、肝、脾、表皮（皮肤）或粘膜组织、消化道或肠浸润或组织破坏。

[0154] 根据本发明，提供了封闭、抑制、阻止、减少或减弱 OX40 配体（OX40L）在体外或体内与活化 T 细胞或 OX40 结合的方法。在一个实施方案中，一种方法包括将活化 T 细胞与能有效地抑制或阻止 OX40 配体与活化 T 细胞结合的 OX40 抗体接触。在另一个实施方案中，一种方法包括将 OX40 与能有效地抑制或阻止 OX40 配体与 OX40 结合的 OX40 抗体接触。在具体的方面中，任选地用 OX40 药物组合物对需要封闭、减少、减弱、抑制或阻止 OX40 配体（OX40L）与活化 T 细胞结合的个体执行一种方法。

[0155] 根据本发明，提供了在体外或体内调节 OX40- 介导的细胞信号传导的方法。在一

个实施方案中,一种方法包括给予需要调节 OX40- 介导的细胞信号传导的个体能有效调节 OX40- 介导的细胞信号传导的 OX40 抗体。

[0156] 根据本发明,提供了在体外或体内减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的方法。在一个实施方案中,一种方法包括给予需要减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的个体足以减少活化、效应、记忆或调节 T 细胞数量的量的 OX40 抗体。

[0157] 根据本发明,提供了治疗由活化、效应、记忆或调节 T 细胞所引起的疾病或病症的方法。在一个实施方案中,一种方法包括给予个体足以减轻、减少或预防由活化、效应、记忆或调节 T 细胞所引起的疾病或病症进展或耗竭活化、效应、记忆或调节 T 细胞的量的 OX40 抗体。在具体的方面中,疾病或病症包括:移植物抗宿主病、炎症或自身免疫性疾病。

[0158] 根据本发明,提供了减少个体血液、脾、淋巴结、肠、肝、肺或皮肤中活化 T 细胞数量的方法。在一个实施方案中,一种方法包括给予个体足以减少血液、脾、淋巴结、肠、肝、肺或皮肤中活化 T 细胞数量的量的 OX40 抗体。在一个方面中,一种减少血液、脾、淋巴结、肠、肝、肺或皮肤中活化 T 细胞数量的方法是在急性或慢性异种移植物宿主疾病模型中进行的。

[0159] 本发明的组合物和方法可与任何其他提供所需效果的处理或治疗相组合。具体来说,特征在于具有补充或协同效应的处理和治疗是可采用的。例证性的处理和治疗包括免疫抑制剂或药物。可在本发明的任何其他方法如治疗或处理之前、基本上同时进行上述免疫抑制处理和治疗。

[0160] 因此,本发明提供了其中本发明的方法与任何治疗方案、处理方案或组合物如本文中所列的或本领域已知的免疫抑制治疗方案、试剂或药物组合使用的联合方法。在一个实施方案中,一种方法包括给予 OX40 抗体、其子序列或片段以及免疫抑制处理、试剂或药物。该免疫抑制处理、试剂或药物可在给予个体 OX40 抗体、其子序列或片段之前、基本上同时或之后给予。

[0161] 如本文所使用的,当涉及处理、治疗、试剂或药物使用术语“免疫抑制”或其语法变化时,意指该处理、治疗、试剂或药物提供了对体液或细胞介导的免疫应答的减弱、减少、抑制或阻止。上述治疗可一般或全身性地抑制免疫应答,或抑制特定区域或位置中的免疫应答。

[0162] 免疫抑制试剂和药物的具体非限制性的类别包括烷化剂、抗代谢物、植物提取物、植物生物碱、亚硝脲、激素(类固醇如糖皮质激素)、核苷和核苷酸类似物。免疫抑制药物的具体例子包括环磷酰胺、硫唑嘌呤、环孢霉素 A、他克莫司(FK506)、雷帕霉素、甲氨喋呤、FTY720、cox-2 抑制剂和白细胞介素(如 IL-12)。

[0163] 多克隆和单克隆抗体是免疫抑制处理或治疗的具体例子。免疫抑制抗体包括例如英夫利昔单抗(Remicade®)、Rituxan®、Atgam®、和 Thymoglobuline®、Xenapax®、Simulect®、Humira®、Raptiva®、Tysabri®以及 Orthoclone®(OKT3)。

[0164] 本发明的方法尤其还包括导致减少对另一种处理方案或治疗方案、处理或治疗的需要或利用的方法。例如,对于炎症、GVHD 或自身免疫性疾病而言,如果在给定的个体中本发明的一种方法具有治疗益处,则导致较不常用免疫抑制处理或治疗或减少免疫抑制处理或治疗的剂量或除去免疫抑制处理或治疗。

[0165] 因此,根据本发明,提供了减少对免疫抑制处理或治疗需要或利用的方法。在一个

实施方案中,一种方法包括给予正在经历或已经历免疫抑制治疗的个体 OX40 抗体、其片段或子序列。在一方面中,一种方法包括以能有效地减少炎症、GVHD 或自身免疫性疾病的免疫抑制处理或治疗的剂量、频率或持续时间或消除对该处理或治疗需要的量给予 OX40 抗体、其片段或子序列。该方法可在免疫抑制处理或治疗给予之前、基本上同时或之后进行。

[0166] 在其中期望获得治疗益处或改善的处理或治疗法中的剂量或“有效量”或“足够量”包括,例如任何客观或主观的缓解或改善一种、几种或所有的与目标疾病、病症、病理或不利症状或并发症相关或由之引起的病理、不利症状或并发症至可测量的或可检测的程度的量。阻止、抑制或推延目标疾病、病症、病理或不利症状或并发症的进展或恶化也是令人满意的结果。足够量或有效量意指在特定的个体而非一组个体或一般人群中足够或有效的量。因此,“有效量”或“足够量”应当足以提供治疗益处给所给定的个体。

[0167] 可以但无需在单次给药中,以及可以但无需单独或与另外的处理、治疗或治疗方案联合给予以提供足够量或有效量。例如,量可如个体的需要,所治疗的病症、疾病或症像的状况或治疗的副作用所指示的按比例增加。此外,如果以单次或多剂量给予而无第二处理、治疗或治疗方案,则足够量或有效量无需足够或有效,这是因为在所给定的个体中可包括额外的多于上述剂量的剂量、量或持续时间或额外的处理、治疗或治疗方案以致有效或足够。视为有效或足够的量还包括导致减少使用另外的处理、治疗方法或方案的量。

[0168] 例证性的非限制性的量(剂量)为约 0.1mg/kg- 约 100mg/kg,以及任何位于上述范围之内的数值或范围或值。可给予更多或更少的量(剂量),例如 0.01-500mg/kg,以及任何位于上述范围之内的数值或范围或值。另外的例证性的非限制性的量(剂量)为约 0.5-50mg/kg、1.0-25mg/kg、1.0-10mg/kg,以及任何位于上述范围之内的数值或范围或值。

[0169] 本发明的方法可通过任何给药或递送方式,或通过任何途径、全身性、区域或局部给药或递送实施。例证性的给药和递送途径包括静脉内、子宫内、真皮内、肌内、皮下、胸膜内、经皮(局部)、转化粘液质、颅内、脊柱内、眼内、直肠、经口(饮食)和粘膜途径。

[0170] 可每天、每周、每月或每年实施本发明的方法一次或多次(如 1-10 次、1-5 次或 1-3 次)。本领域技术人员应当知道什么时候适合于推迟或中断给药。非限制性的剂量日程表是每周 1-7 次,持续 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多周,以及任何位于上述范围之内的数值或范围或值。

[0171] 当然,与任何处理或治疗所常见的一样,不同的个体对于处理会显示不同的响应,某些个体可能不响应或对特定的处理方案、方法或程序响应不充分。因此,有效量或足够量将至少部分取决于所治疗的疾病、病症、病理(如炎症、GVHD、移植排斥或自身免疫性疾病,以及如果其是晚期、后期或早期的话)、期望的疗效以及个体个体(如在个体中的生物利用度、性别、年龄等),个体对该处理或治疗的响应将部分基于遗传和外遗传变异性(如药物基因组学)。此外,由于所有治疗的个体或患者可能都不响应于特定的处理或治疗方法、草案、方案、程序或药物,因此在每个或所有的个体或患者或如此治疗的给定的人群中该处理或治疗法无需达到特定的可测量的改善或有益效果、临床终末点或所需的结果。因此,给定的个体或患者或人群对本发明的处理或治疗方法可能无法响应、响应不充分或可能显示不合需要的响应如副作用。

[0172] 在本文中术语“个体”和“患者”可交换使用,并指动物,典型地是哺乳动物如人、非人灵长类动物(大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴、长臂猿)、家畜(狗和猫)、农场和大牧场动物

(马、牛、山羊、绵羊、猪)、实验室和实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。个体包括用于体内疗效研究疾病模型动物(如小鼠、大鼠和非人灵长类动物)(如GVHD动物模型)。人个体包括儿童,例如新生儿、婴儿、刚学步的小孩和青少年,1-5岁、5-10岁和10-18岁儿童,18-60岁成人,以及老年人如60-65岁、65-70岁和70-100岁老年人。

[0173] 个体包括需要治疗的哺乳动物(如人),更确切地说,他们具有服从于或可响应于用OX40抗体、子序列或片段处理或治疗的疾病、病症、其病理或症状。个体包括那些具有或处于具有慢性或急性免疫病症或疾病、炎症、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或OX40-介导的细胞应答的危险中的个体。个体还包括那些为慢性或急性免疫病症或疾病、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或OX40-介导的细胞应答的一种或多种的候选人或已对之进行治疗的个体。因此,作为细胞、组织或器官移植或嫁接如肾、心、肺、皮肤、眼睛、血管、肝或胰移植或骨髓、造血干细胞、外周血干细胞或脐带血干细胞、同种异体或非同种异体细胞、神经细胞的候选人或已接受该移植或嫁接的个体是使用OX40抗体进行治疗的候选人。

[0174] 个体进一步包括那些由于实验室或临床诊断使有理由需要这样的处理的需要免疫抑制处理或治疗的个体、正在经历免疫抑制处理或治疗(如由于移植)的个体和已经历免疫抑制处理或治疗的个体,以及处于再发或复发危险中的个体。处于危险中的个体包括那些具有慢性或急性免疫性疾病或病症、炎症、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或OX40-介导的细胞应答家族史、遗传倾向性或之前患有上述疾病的个体。可利用筛选如自身反应性T细胞或抗自身蛋白抗体来鉴定上述处于危险中的个体。例如,表达类风湿因子的个体处于类风湿性关节炎的危险中。表达针对MBP、MOG或PLP的抗体的个体处于多发性硬化的危险中。

[0175] 因此,为了抑制或降低发展为或遭受再发或复发为慢性或急性免疫性疾病或病症、炎症、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或OX40-介导的细胞应答的可能性,可对处于危险中的个体进行处理。上述处理的结果可减少发展为慢性或急性免疫性疾病或病症、炎症、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或OX40-介导的细胞应答的危险。

[0176] 本发明的抗体、核酸和其他组合物及方法可包括于或使用药物配方。这样的药物配方能用于体内局部、区域或全身性或离体治疗个体或给药或递送至个体。

[0177] 药物配方包括“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”载体、稀释剂或赋形剂。术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”包括与药物施用相容的溶剂(水溶剂或非水溶剂)、溶液、乳剂、分散介质、包衣、等渗和吸收促进或延迟剂。这样的配方可包含于液体;乳剂、混悬剂、糖浆剂或酏剂中,或包含于固体剂型;片剂(包衣或未包衣的片剂、直接释放、延迟释放、连续释放或脉冲式释放的片剂)、胶囊剂(硬胶囊剂或软胶囊剂、直接释放、延迟释放、连续释放或脉冲式释放的胶囊剂)、粉剂、颗粒剂、晶体或微珠中。补充的化合物(如防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)还可掺入配方中。

[0178] 可制备适合于特定的局部、区域或全身性给药或递送途径的药物配方。因此,药物配方包括适于通过特定途径给药的载体、稀释剂或赋形剂。对于本发明的组合物,给药途径的具体的非限制性例子是肠胃外如静脉内、动脉内、皮内、肌肉内、皮下、胸膜内、经皮(局部)、转化粘液质、颅内、脊柱内、眼内、直肠、经口(饮食)、粘膜给药,以及任何其他适于处理方法或给药方案的配方。

[0179] 用于肠胃外施用的溶液或混悬剂可包括：无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、固定油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂如苯甲醇或尼泊金甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及用于调节张度的试剂如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱如盐酸或氢氧化钠调节 pH。

[0180] 用于注射的药物配方包括无菌水溶液（水溶的）或分散剂以及用于临时制备无菌可注射的溶液或分散剂的无菌粉剂。对于静脉内给药，适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇）以及适合的它们的混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用诸如卵磷脂的被覆层、通过保持就分散而言所要求的颗粒大小以及通过使用表面活性剂从而维持流动性。抗菌剂和抗真菌剂包括例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。等渗剂例如糖类、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇，氯化钠可包括在组合物中。所包括的延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝或明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0181] 可通过将需要量的活性组合物掺入具有一种上述成分或上述成分组合的适合的溶剂中制备无菌可注射的配方。一般来说，通过将活性组合物掺入含有基础分散介质和任何其他成分的无菌载体中制备分散剂。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂而言，制备方法包括例如真空干燥和冷冻干燥，其由之前所制备的溶液生产出了活性成分外加任何额外的所需成分的粉剂。

[0182] 对于转化粘液质或经皮给药，在配方中使用适合于要被透过的屏障的渗透剂。上述渗透剂是本领域已知的，包括例如，对于转化粘液质给药，为去垢剂、胆汁盐类和梭链孢酸衍生物。可通过使用鼻腔喷雾、吸入装置（如吸气器）或栓剂实现转化粘液质给药。对于经皮给药，活性化合物可配制为软膏剂、油膏剂、凝胶剂、霜剂或贴剂。

[0183] 可用免于从体内快速排除的载体制备药物配方，例如控制释放配方或时间延迟材料如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。还可使用加工产品如植入物和微囊密封的递送体系递送配方以达到局部、区域或全身性递送或控制或持续释放。

[0184] 可使用生物可降解的、生物相容的聚合物，如乙二醇二乙酸酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。用于制备上述配方的方法是本领域技术人员所知道的。材料还可通过商业渠道获得自 Alza Corporation (Palo Alto, CA)。脂质体混悬剂（包括使用抗体或病毒外壳蛋白靶向细胞或组织的脂质体）也可用作药学上可接受的载体。可根据已知的方法如在美国专利号 4,522,811 中所描述的方法制备这些载体。

[0185] 其他适于给药的药物配方是本领域已知的（参见如 Gennaro (编), Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 第 20 版, Lippincott, Williams & Wilkins (2000); Ansel 等, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 第 7 版, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999); Kibbe (编), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 第 3 版. (2000) 和 Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993))。

[0186] 包括 OX40 抗体、核酸、处理、治疗、试剂、药物和药物配方在内的根据本发明所使用的组合物可包装为易于给药和统一剂量的剂量单位形式。如本文所使用的，“剂量单位形

式”指适合于单位剂量处理的物理上分离的单位；每单位含有被计算能产生所需处理或治疗（如有益）效果的量的与载体、赋形剂、稀释剂或媒介物结合的组合物。单位剂量形式取决于多种因素包括但无需受限于所使用的特定组合物、所要达到的效果以及待治疗的个体的药效动力学和药物基因组学。

[0187] 本发明进一步提供了试剂盒，包括包装于适合的包装材料中的 OX40 抗体、核酸、药剂、药物和药物配方，任选地包括用于使用试剂盒组分的说明书如用于执行本发明的方法的说明书。在一个实施方案中，试剂盒包括 OX40 抗体、子序列或片段以及用于检测 OX40 的说明书。在另一个实施方案中，试剂盒包括 OX40 抗体、子序列或片段以及用于用 OX40 抗体、子序列或片段治疗需要该治疗的个体（如具有能改善的或可响应于处理或治疗的疾病、病症、病理或状况的个体）的说明书。在一方面中，该说明书用于慢性或急性免疫性疾病或病症、炎症、GVHD、移植排斥、炎症、自身免疫性疾病或 OX40- 介导的细胞应答的治疗。在更进一步的方面中，试剂盒包括免疫抑制处理、治疗或药剂。

[0188] 术语“包装材料”指包覆试剂盒组分的物理结构。包装材料可保持组分无菌，并可由常用于这样目的的材料（如纸、瓦楞纸板、玻璃、塑料、金属箔、安瓿等）制成。标签或包装嵌入物可包括适当的书面说明书，如本发明的诊断或治疗方法。因此，该说明书可包括用于实施本文中所述的本发明任一方法的说明书。因此，在多个实施方案中，试剂盒包括标签或包装插入物包括用于在溶液中、体外、体内或离体实施本发明方法的说明书。在一个方面中，该说明书包括在本发明的处理或治疗方法中局部、区域或全身性给予或递送 OX40 抗体、子序列或片段至个体中。

[0189] 说明书可额外地包括令人满意的临床终点或任何可能出现的不利症状或并发症的指示。说明书可进一步包括贮藏信息、失效期或管理机构如美国食品和药物管理局对于在人个体中使用所要求的任何信息。

[0190] 说明书可印在“印刷品”上，如印在试剂盒中的纸或纸板上，印在贴在试剂盒或包装材料的标签上、或印在贴在含有试剂盒组分的管形瓶或试管的标签上。说明书可包含音频或视频媒介并可额外地包括在计算机可读介质如磁盘（软盘或硬盘）、光学 CD 如 CD- 或 DVD-ROM/RAM、磁带、电存储介质如 RAM 和 ROM 以及这些的混合物如磁性 / 光学存储介质上。

[0191] 本发明的试剂盒可额外地包含缓冲剂、防腐剂或稳定剂。该试剂盒还可包含用于活性测定的对照组分，如对照样品或标准。该试剂盒的每一组分可包装在单独的容器中或以混合物的形式存在，所有的各种容器可以单一包装或多重包装。

[0192] 根据本发明，进一步提供了无细胞（如在溶液中、在固相中）和基于细胞（如体外或体内）的筛选、检测和鉴定 OX40 的方法。可在溶液中、在体外使用生物材料或样品，以及在体内例如使用来自动物的细胞（如淋巴细胞）样品进行该方法。在一个实施方案中，一种方法包括在容许抗体与 OX40 结合的条件下，将生物材料或样品与结合 OX40 的抗体接触；并测定抗体与 OX40 的结合。抗体与 OX40 的结合检测出 OX40 的存在。在一个方面中，OX40 存在于细胞或组织上。在另一个方面中，生物材料或样品获得自哺乳动物个体。

[0193] 当涉及组分如蛋白（如 OX40 抗体）、材料、样品或处理使用术语“接触”时，意指组分（如 OX40 抗体）和其他参照实体之间直接或间接的相互作用。直接的相互作用的一个具体例子是结合。间接的相互作用的一个具体例子是其中组分作用于中间产物分子，该中间产物分子又依次作用于参照实体。因此，例如将细胞（如淋巴细胞）与 OX40 抗体接触包

括使抗体与细胞结合（如通过与 OX40 结合），或使抗体作用于中间产物，该中间产物又依次作用于细胞。

[0194] 术语“测定”和“测量”及其语法变化在本文中可交换地使用并指定性或定量测定，或同时定性及定量测定。当涉及结合使用该术语时，任何评估结合的相对量、亲和力或特异性的方法皆被考虑，包括本文中所列的和本领域已知的多种方法。例如，可通过 ELISA 测定法测定或测量 OX40 抗体与 OX40 的结合。

[0195] 除非另有规定，本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明相关领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管在本发明的实施或测试中可使用类似于或等价于本文中所描述的那些的方法和材料，但合适的方法和材料是本文中所描述的。

[0196] 所有本文引用的出版物、专利、Genbank 登录号以及其他参考文献以其全文并入作为参考。如有冲突，以包括定义在内的本说明书为准。

[0197] 除非上下文另有清楚指示，如本文所使用的单数形式“一种”、“和”和“该”包括复数对象。因此，例如就“一种抗体”而言，包括多种抗体，以及就“一种处理或治疗”而言，可包括多种、连续的或同时发生的处理或治疗等等。

[0198] 除非上下文另有清楚指示，如本文所使用的任何数值或数值范围包括处于这样的范围之中或包含这样的范围的全部整数和处于范围之中或包含范围的值或整数的分数。因此，例如就 90-100% 的范围而言，包括 91%、92%、93%、94%、95%、95%、97% 等，以及 91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5% 等，92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5% 等。在另一个例子中，就 1-5,000 倍的范围而言，包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 倍等，以及 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5 倍等，2.1、2.2、2.3、2.4、2.5 倍等。

[0199] 本发明被一般地披露于使用肯定的语言来描述诸多实施方案的本文中。本发明还明确地包括其中具体的主题如物质或材料、方法步骤和条件、实验方案、程序、测定法或分析被完全或部分排除的实施方案。因此，虽然在本发明没有包括的方面本发明一般不表达在本文中，但没有确切地包括于本发明中的方面仍然被披露了。

[0200] 业已描述了多个本发明的实施方案。尽管如此，很清楚可以进行多种修饰而不背离本发明的精神和范围。因此，下列实施例旨在举例说明而不限权利要求中所描述的本发明的范围。实施例

[0201] 实施例 1

[0202] 该实施例描述了多种原料和方法。

[0203] 抗原制备：使用 Tri 试剂 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)，由用植物血球凝集素 (PHA, Remel, Lenexa, KS) 活化两天的人外周血单核细胞分离 RNA。通过逆转录聚合酶链反应扩增编码人 OX40 胞外域的序列。对扩增产物测序并确认与所公布的人 OX40 序列 (W095/12673, SEQ NO:1) 相同。将产物按读框亚克隆入 pfastbac-hFc 杆状病毒供体质粒中。该载体产生自 pfastbac 质粒 (Invitrogen Corp.) 和人 IgG1 (“hIgG1”) 的 Fc 部分。从 pV11392.fc 载体上切下 hIgG1 序列。产生编码人 OX40:hIgG1 融合蛋白 (hOX40:hFc) 的重组杆状病毒。用 hOX40:hFc 重组杆状病毒感染粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) High-FiveBT1-TN-5b1-4 (“Tn5”) 昆虫细胞 (Invitrogen Corp.) 用于蛋白产生。扩增全长 OX40 序列并克隆入 pCDNA3.1 载体 (Invitrogen Corp.) 中用于在真核细胞中进行表达。用脂质转染胺 (lipofectamine) 2000 (Invitrogen Corp.) 转染 EL-4 (ATCC TIB-39) 和

CHO-K1 (ATCC CCL-61) 细胞并用潮霉素B(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA) 或遗传霉素 (Invitrogen Corp.) 分别选择稳定的转染子。通过戊二醛偶联将 hOX40:hFc 与卵白蛋白缀合。在 1ml 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中混合 1mg 的 hOX40:hFc 和 0.5mg 的卵白蛋白 (Pierce, Rockford, EL)。缓慢添加 50 μ l 的 1% EM 级戊二醛 (Sigma, St.Louis, MO) 并轻轻摇动 5 分钟混合溶液。在室温下 3 小时后,添加 50 μ l 的 1M 乙醇胺 (pH 7) 并温育溶液 2 小时,之后在 NAP10 柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 上用磷酸盐缓冲盐水进行缓冲液交换。

[0204] 由起始密码子 (ATG) 经人 OX40 胞外域至人 Fc 序列 (下划线的) 末端的人 OX40: 人 IgG1 融合蛋白的核苷酸序列 SEQ ID NO:1

```
ATGTGCGTGG GGGCTCGGCG GCTGGGCGCG GGGCCGTGTG CGGCTCTGCT CCTCCTGGGC      60
CTGGGGCTGA GCACCGTGAC GGGGCTCCAC TGTGTCTGGG ACACCTACCC CAGCAACGAC      120
CGGTGCTGCC ACGAGTGCAG GCCAGGCAAC GGGATGGTGA GCCGCTGCAG CCGCTCCCAG      180
AAACCGGTGT GCCGTCCGTG CGGGCCGGGC TTCTACAACG ACGTGGTCAG CTCCAAGCCG      240
TGCAAGCCCT GCACGTGGTG TAACCTCAGA AGTGGGAGTG AGCGGAAGCA GCTGTGCACG      300
GCCACACAGG ACACAGTCTG CCGCTGCCGG GCGGGCACCC AGCCCCTGGG CAGCTACAAG      360
CCTGGAGTTG ACTGTGCCCC CTGCCCTCCA GGGCACTTCT CCCCAGGCGA CAACCAGGCC      420
TGCAAGCCCT GGACCAACTG CACCTTGGCT GGGAAGCACA CCCTGCAGCC GGCCAGCAAT      480
AGCTCGGACG CAATCTGTGA GGACAGGGAC CCCCCAGCCA CGCAGCCCCA GGAGACCCAG      540
GGCCCCCGG CCAGGCCCAT CACTGTCCAG CCCACTGAAG CCTGGCCCAG AACCTCACAG      600
GGACCCTCCA GATCTTGTTGA CAAAACCTCAC ACATGCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC      660
CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC      720
CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG      780
```

<u>TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG</u>	840
<u>CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG</u>	900
<u>AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAACCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA</u>	960
<u>ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC</u>	1020
<u>CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTCTATCCC</u>	1080
<u>AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG</u>	1140
<u>CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG</u>	1200
<u>AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTOCACAAC</u>	1260
<u>CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA</u>	1320
[0205] 与人 IgG1 的 Fc 部分(下划线的)融合的人 OX40- 胞外域的氨基酸序列 SEQ ID NO :2	
<u>MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCHECRPGN GMVSRCSRSQ</u>	60
<u>NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK</u>	120
<u>PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ</u>	180
<u>GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSRSCDKTH TCPPCAPEL LGGPSVLEFP PKPKDTLMIS</u>	240
<u>RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHODWL</u>	300
<u>NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGOPR EPOVYTLPPS RDELTKNOVS LTCLVKGEYP</u>	360
<u>SDIAVEWESN GOPENNYKIT PPVLDSGSE FLYSKLTVDK SRWOOGNVFS CSYMHEALHN</u>	420
<u>HYTOKSLSLSPGK</u>	433

[0206] 小鼠:含有编码人免疫球蛋白区域的人染色体片段的人转染色体 KM miceTM(W0 02/43478, W0 02/092812, Ishida, 等, IBC' s 11thAntibody Engineering Meeting. Abstract(2000); Kataoka, S. IBC' s 13thAntibody Engineering Meeting. Abstract(2002)) 获得自 Kirin Brewery Co., Ltd., Japan, 并安置在 La Jolla 变态反应和免疫学研究所 (La Jolla Institute for Allergy and Immunology) 的动物实验室内。产生人抗体的技术综述描述于 Lonberg (Lonberg, 等, Int Rev Immunol 13(1):65-93(1995)) 中。不表达内源性免疫球蛋白的带有一种或多种人免疫球蛋白基因(κ 或 λ)的转基因动物描述于例如美国专利号 5,939,598 中。描述了用于产生人抗体和人单克隆抗体的其他方法(参见如 W0 98/24893; W092/01047; W0 96/34096; W0 96/33735; 美国专利号 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771 和 5,939,598)。携带人免疫球蛋白基因的牛-TC 母牛的开发描述于 (Kuroiwa, 等, Nat Biotechnol 20(9):889-94(2002); Kuroiwa, 等, Nat Genet 36(7):775-80(2004)) 中。免疫接种:将 hOX40:hFc 重组蛋白与等体积的完全弗氏佐剂 (CFA,

Sigma) 混合并制备乳剂。用 10–25 μ g 蛋白向腹膜内免疫接种小鼠,并用在不完全弗氏佐剂 (IFA, Sigma) 中乳化的 5–10 μ g 蛋白向腹膜内加强免疫,间隔 2 周进行 2–4 次加强免疫。最后在融合前 5 天向腹腔内注射不含有佐剂的 5–10 μ g 可溶性 hOX40:hFc。另一组小鼠用通过在 PBS 中于 80 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟热变性,然后以 1 : 1 与 RIBI 佐剂 (Sigma) 混合的 hOX40:hFc 免疫接种。对小鼠免疫接种描述如上。第三组小鼠用缀合有卵白蛋白的 hOX40:hFc 免疫接种。用 30 μ g 的 hOX40:hFc–OVA 单独接种或用处于 RIBI 中的 10 μ g 和 20 μ g 的 hOX40:hFc 的混合物分别接种小鼠。前者接受处于 RIBI 中的 30 μ g hOX40:hFc–OVA 的加强免疫,之后以 2 周间隔接受处于 RIBI 中的 10 μ g 的 hOX40:hFc。在 5 周后,进行处于 PBS 中的 20 μ g hOX40:hFc–OVA 的最终加强免疫。后者组的两次加强免疫以 2 周间隔由处于 RIBI 中的 5 μ g hOX40:hFc–OVA+10 μ g hOX40:hFc 组成,最后的加强免疫为处于 PBS 中的 10 μ g hOX40:hFc。所有的注射都是在腹膜内进行的。最后一组小鼠用已用 PHA (1 μ g/ml) 和重组人白细胞介素 2 (IL2, 10ng/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA) 刺激 2 天的 CD4+ 人 T 细胞免疫接种。在注射前,细胞接受 25Gy 的铯源辐射并在 RIBI 佐剂中 1 : 1 稀释。杂交瘤产生:选择在它们的血清中具有最高的抗 –OX40 IgG 特异性抗体效价的小鼠用于产生单克隆抗体。收集脾脏并使用 50% 聚乙二醇 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 将单细胞悬液以 3 : 1 的比例与骨髓瘤细胞系 (SP2/0–Ag14) (ATCC, Rockville, MD) 融合。将融合物以最佳密度铺在 96 孔平底平板中并于 10% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 保温箱中,在完全 DMEM–10 培养基 (含有 10% 胎牛血清的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (FBS, Invitrogen Corp.))、1% 非必需氨基酸、2mM L–谷氨酰胺、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 硫酸链霉素 (所有的都来自 Bio Whittaker, Walkersville, MD)、HAT 补充物 (Sigma) 和 10% 杂交瘤克隆因子 (HCF, Biovaris, San Diego, CA) 中培养。通过 ELISA 对来自四个融合物的大约 4000 孔筛选含有人 κ 的 OX40 特异性抗体。通过流式细胞检测分析确认人抗 –人 OX40 IgG 抗体。增殖阳性孔并对其进行 3–4 轮有限稀释克隆以获得单克隆抗体。抗体和蛋白纯化:对于抗体纯化,在 2 升滚瓶中以 350 毫升–1 升/瓶或在具有补充有超低 IgG 胎牛血清 (Invitrogen Corp.) 的杂交瘤–SFM 培养基 (Invitrogen Corp.) 的 1 升 Integra 系统 (INTEGRA Bioscience, Inc. Ijamsville, MD) 中培养杂交瘤。通过用 1 升的 Tn5 细胞感染 4 天产生人 OX40:hFc 重组蛋白。使用重组蛋白 A–Sepharose Fast Flow 凝胶 (Amersham Biosciences) 从培养基中纯化人单克隆抗体和 OX40:hFc。首先用 Ultrasette 切向流系统 (Pall Corp., East Hills, NY) 浓缩滚瓶中所产生的条件培养基。接着用 0.22 μ m 真空过滤装置 (Millipore, Bedford, MA) 过滤条件培养基并加载到对于培养基中人抗体的量而言是适当尺寸的蛋白 A–Sepharose Fast Flow 柱 (Amersham Biosciences) 上。用 20 柱体积的 PBS 充分地洗涤柱子,然后用 0.1M Gly–HCl, pH 3.6, 0.15M NaCl 洗脱抗体,接着用 1M Tris–HCl, pH 8.0 中和抗体。通过 SDS–PAGE 分析级分,汇集阳性级分并用离心浓缩机 (Vivaspin, 50, 000MWC0 : Sartorius, Gettingen, Germany) 浓缩。Sephadex G–25 脱盐柱 (NAP, Amersham Biosciences) 用于对 PBS, pH 7.4 的缓冲液交换。最后,使用具有 0.22 μ m 孔径的注射器式过滤器对抗体进行过滤消毒,并通过 Lowry 法测定抗体浓度。使用鲎阿米巴样细胞溶解物 (“LAL”) 测定法 (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA) 测定热原含量。该测定法的检测极限为 0.06EU/mg。如果该测试是阴性的,则样品被认为是无内毒素的。人 IgG 定量 ELISA:为测定存在于上清液和纯化的贮存物中人抗体的量,使用了下列实验方案。将处于

碳酸盐缓冲液中的山羊抗-人Fc γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 以 0.5 μ g/孔包被 96 孔平板 (Nunc, Denmark) 上,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。然后用 Superblock (Pierce, Rockford, IL) 封闭平板 30 分钟,接着添加样品到平板中。使用总人 IgG (Sigma) 或纯化的人 IgG1 或 IgG4 (Kirin Brewery Co., Ltd) 产生标准曲线。在 37 $^{\circ}$ C 下温育平板 1 小时,在 PBS/1% BSA/0.1% Tween20 (Sigma) 中洗涤,并用缀合有辣根过氧化物酶 (HRP, Jackson ImmunoResearch) 的山羊抗-人Fc γ 特异性抗体检测结合的抗体,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。添加 TMB 底物 (Sigma),温育 10 分钟,并用 H₂SO₄ (LabChem Inc., Pittsburgh, PA) 停止反应。在酶标仪上测定 450nm 处的光密度 (OD)。

OX40 特异性抗体检测 ELISA:通过 ELISA 测定抗体效价、特异性以及杂交瘤产量。简单地说,用处于碳酸盐缓冲液 (pH 9.4) 中的 50 μ l 的 hOX40:hFc 以 5 μ g/ml 包被 96 孔平底平板,在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜或在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。在用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤两次后,用 PBS/1% BSA/0.1% Tween20 封闭平板,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。在封闭缓冲液中稀释血清、上清液或纯化的抗体,添加到孔中,然后在 37 $^{\circ}$ C 下温育平板 1 小时。用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤平板 4 次,添加 1:2000 稀释的过氧化物酶缀合的绵羊抗-人 κ 检测抗体 (The Binding Site, Birmingham, UK)。在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时后,洗涤平板并添加 TMB (Sigma) 底物,在室温下温育 10-30 分钟。用 H₂SO₄ (LabChem) 停止反应,并通过酶标仪测定 450nm 处的光密度。

流式细胞术:通过使用人 OX40 稳定的 CHO-K1 转染子或三天 PHA+IL2 活化的人 PBMC 的流式细胞检测分析测定抗体效价、特异性和相对结合亲和力。在染色缓冲液:PBS+2% FBS+0.1% NaN₃+10mMEDTA 中洗涤细胞一次,然后重悬于 50 μ l 体积的血清、上清液或纯化的抗体中。在冰上细胞与抗体温育 20 分钟,在染色缓冲液中洗涤两次,然后重悬于抗-人 IgG-藻红蛋白标记的第二抗体中。使用了两种不同的抗体:(1) 山羊抗-人 IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 或 (2) 小鼠抗-人 IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA)。在冰上温育 20 分钟后,洗涤细胞一次并 1% 多聚甲醛用固定 10 分钟。在最后一次洗涤后,将细胞重悬于染色缓冲液中并使用 FACScan 或 FACS Calibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA) 获取样品,使用 Cellquest (Becton Dickinson Biosciences) 或 FlowJo (TreeStar, Inc., San Carlos, CA) 软件分析数据。还用小鼠抗-人 OX40 抗体 L106 (Becton Dickinson) 染色活化 T 细胞,该抗体直接缀合有藻红蛋白或用抗-小鼠 IgG-PE (Southern Biotechnology Associates.) 检测其结合。

OX40L 封闭测定法:为测定抗-人 OX40 抗体是否能封闭 OX40L 与可溶性 OX40 的结合,使用了 ELISA 和流式细胞术实验方案。在 ELISA 中,用处于碳酸盐缓冲液 (pH 9.4) 中的重组的可溶性 hOX40:hFc 以 2 μ g/ml 包被 96 孔 Nunc 平底平板,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤平板,并添加 Superblock (Pierce) 到孔中以封闭非特异性结合。在 PBS/Tween 中将测试抗体稀释到 1 μ g/ml 并添加到平板中。在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时后,添加 FLAG 标记的重组的可溶性人 OX40L (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) 到没有洗去抗-OX40 抗体的适当的孔中。在 1 小时温育后,洗涤平板并添加抗-FLAG-过氧化物酶缀合的抗体 (Sigma) 到孔中,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。添加 TMB 底物,10 分钟后用 H₂SO₄ 停止反应,使用酶标仪阅读 450nm 处的结果。在流式细胞计数测定中,纯化人 CD4⁺T 细胞并用 PHA+IL2 活化 2 天。洗涤细胞并重悬于染色缓冲液中,然后在冰上与 0.005-50 μ g/ml 增加量的人抗-人 OX40 抗体温育 20 分钟。接着,添加可溶性的重组 OX40L-FLAG 到细胞中。洗涤细胞并与缀合 PE 的抗-FLAG (Sigma)

温育。在另一次洗涤后,用 1%多聚甲醛固定细胞并在 FACScan 或 FACScalibur 上进行分析。在下列公式中使用 OD 或阳性百分数测定抑制百分数: %抑制 = $100 - ((\text{样品} / \text{最大结合}) \times 100)$ 。抗-OX40 抗体交叉封闭测定法:为了测定抗体是否结合相同的人 OX40“表位”,使用了 ELISA 实验方案。用处于碳酸盐缓冲液中的人抗-人 OX40 抗体以 $2 \mu\text{g/ml}$ 包被 Nunc 96 孔平底 ELISA 平板,在 37°C 下温育 1 小时。洗涤平板,然后用 PBS/1% BSA/Tween 20 封闭。接着, $2-20 \mu\text{g/ml}$ 的人抗-人 OX40 抗体和小鼠抗人-OX40 抗体 L106(BDBiosciences, San Jose, CA)、克隆 315(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) 或 ACT35(BD Pharmingen) 与 $2 \mu\text{g/ml}$ 重组人 OX40:mFc 融合蛋白(Alexis Corporation, San Diego, CA) 在室温下预温育 30 分钟。添加抗体-OX40:mFc 蛋白的组合到平板中并在 37°C 下温育 1 小时。在 3 次洗涤后,用过氧化物酶缀合的绵羊抗-小鼠 Ig(Amersham Biosciences) 检测结合的 OX40:mFc。如上所述完成 ELISA。在下列公式中使用每个样品的 OD 测定抑制百分数: %抑制 = $100 - ((\text{样品} / \text{最大结合}) \times 100)$ 。为确定这些人抗-人 OX40 抗体是否封闭小鼠抗-人 OX40 抗体,进行了该 ELISA 的变型。除小鼠抗-人 OX40 抗体包被在平板上以及 112V8、112F32、112Y131 和 112Z5 与人 OX40:hFc 蛋白预温育之外,该方法与上述方法相同。用绵羊抗-人 IgG-辣根过氧化物酶第二抗体(Amersham Biosciences) 检测 OX40 蛋白与包被的抗体的结合。流式细胞计数测定也用于确定抗体是否彼此交叉封闭。如下所述由外周血单核细胞中纯化人 CD4T 细胞,并用 $1 \mu\text{g/ml}$ 植物血球凝集素(Remel, Lenexa, KS) 和 10ng/ml 重组人白细胞介素 2(BD Pharmingen) 活化 2-3 天。洗涤细胞并在补充有 2%胎牛血清和 0.1%叠氮化钠的 PBS 中用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的测试抗体标记,在冰上温育 30 分钟。无需洗涤,添加 $10 \mu\text{g/ml}$ 的相同抗体的生物素化形式到孔中,并在冰上再温育细胞 30 分钟。接着,通过添加缓冲液洗涤细胞并在 4°C 下以 1200RPM 离心 3 分钟。通过与抗生物素蛋白链菌素-藻红蛋白(SA-PE, BD Pharmingen) 温育 20 分钟,继之以如所述的另一次洗涤来检测生物素化的抗体的结合。在 1%多聚甲醛中固定细胞 10 分钟。在最后一次洗涤后,将细胞重悬于染色缓冲液中,并使用 FACS Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA) 获取样品。使用 Cellquest(Becton Dickinson Biosciences) 或 Flow Jo(TreeStar, Inc., San Carlos, CA) 软件分析数据。所测试的抗体包括 112F32、112V8、112Y55、112Y131、112Z5、抗-DNP(人 IgG1 阴性对照)、小鼠抗-人 OX40 抗体、克隆 L106、克隆 315 和克隆 ACT35。使用下列公式确定抑制百分数: $100 - ((\text{测试抗体的几何平均值} / \text{最大的几何平均值}) \times 100)$ 。对抗体测试自身以及彼此结合的抑制。由全血纯化人 PBMC:通过 Scripps Green 医院(La Jolla, CA) 正常的供血者程序,从 18-50 岁健康供体收集全血。添加肝素以防止血液凝结。没有具体标明人种、种族性或性别。在 PBS 中稀释血液,然后用 Ficoll-Plaque Plus(Amersham Biosciences) 铺在下面。从血清中分离单核细胞并通过没有制动的 1800RPM 离心沉淀。收集含有 PBMC 的界面并用 PBS 洗涤两次。纯化 CD4+T 细胞:使用来自 Miltenyi Biotec. (Auburn, CA) 的阴性分离试剂盒纯化人 CD4+T 细胞。于 PBS/0.5% BSA/2mM EDTA 中用特异于 CD8、CD11b、CD16、CD19、CD36 和 CD56 的半抗原缀合的抗体混合物标记 PBMC,在 4°C 下温育 15 分钟。在洗涤两次后,将细胞重悬于抗-半抗原磁珠(MACS 珠子)中,并在 4°C 下温育细胞 15 分钟。接着洗涤细胞并施加到已预洗涤并嵌入磁体的 LS/VS+ 柱上。用缓冲液洗涤柱子 3 次。“未接触的”CD4+ 细胞包含在穿过柱子的缓冲液流中。通过流式细胞检测分析确定纯度,使用了特异于人 CD3 和人 CD4 的抗体,两者

都直接缀合有荧光染料 (BD Pharmingen)。可选地,用 CD4 微珠 (Miltenyi Biotec.) 选择的 CD4⁺ 细胞是阳性的。该操作类似于上述操作,不同之处在于通过除去柱子中的磁体并用活塞加压输送 5ml 缓冲液通过柱子,洗脱附着于柱子上的细胞。混合的淋巴细胞反应测定法:纯化来自两位供体的 PBMC,并将来自每位供体的 1×10^5 细胞添加到存在或不存在人抗-人 OX40 抗体或阴性对照人 IgG4(抗-人血清白蛋白,Kirin Brewery Co.,Ltd.) 的 96 孔 U 底平板中 (Ukyo, 等, Immunology 109(2):226(2003))。取决于该研究,由 0.005-100 μ g/ml 测试抗体。测试多个供体对。所使用的培养基为补充有 10% 人 AB 血清 (MP Biomedical, Irvine, CA)、青霉素 / 链霉素、L- 谷氨酰胺和 2- 巯基乙醇的 RPMI-1640。在第 6 天,添加 1 μ Ci 氚化胸腺嘧啶 (3 HTdR) 到每个孔中,进行最后的 18 小时培养。溶解细胞并转移到玻璃滤垫上,使用闪烁计数器 (Wallac, Turku, Finland) 计数。急性移植抗宿主病体内模型:用 20 μ g 大鼠抗-小鼠 IL2 受体 β 链抗体 (TM β 1, Tanaka, 等, J Exp Med 178(3):1103-7(1993)) 注射 5-10 周龄的严重联合免疫缺陷 (SCID) 雄性小鼠以耗竭内源性自然杀伤细胞。第二天,使用铯源让小鼠接受 2.5Gy 辐射。4 小时后,通过腹膜内注射让小鼠接受处于 PBS 中的总共 10^7 个的人 PBMC,接着马上静脉注射处于 100 μ l PBS 中的 2、20、100 或 200 μ g 的人抗-人 OX40 或阴性对照 hTgG1(抗-二硝基酚(抗-DNP), Kirin Brewery Co.Ltd.) 抗体。可选地,抗体处理延迟至第 3-6 天以测试抗-OX40 抗体的治疗潜能。每 3-4 天对小鼠称重,每周接受抗-IL2R β 抗体一次。在第 12 天,处死小鼠并评估宏观病理学。切下脾用于流式细胞检测分析,肝和肠用于组织学分析,并收集血清用于人细胞因子和抗体分析 (Watanabe, 等, Clin. Immunol. 120:247(2006))。慢性移植抗宿主病体内模型:慢性 GVHD 的模型由急性异种 GVHD 模型 (Watanabe, 等, Clin. Immunol. 120:247(2006)) 改造而来。通过转移正选择的人 CD4T 细胞到使用与上述方法相同的方法制备的 SCID 小鼠中诱发疾病。通过在第 0 天腹膜内注射让小鼠接受 10^6 个正选择的 CD4T 细胞,在第 0 天开始每周静脉注射一次 2、20 或 100 μ g 的抗-OX40 或对照抗体。到第 30 天疾病明显,并在第 48 天评估小鼠。切下脾和淋巴结用于流式细胞检测分析,皮肤和肺用于组织学分析,以及血清用于人细胞因子分析。人细胞因子分析:根据厂商说明书 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),使用多路传输技术测定小鼠血清中一组 8 种人细胞因子。纯化人自然杀伤细胞:使用来自 Miltenyi Biotec. (Auburn, CA) 的阴性分离试剂盒纯化人自然杀伤 (“NK”) 细胞。于 PBS/0.5% BSA/2mM EDTA 中用特异于 T 细胞、B 细胞、干细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞和红系细胞的生物素缀合的抗体混合物标记 PBMC,在 4°C 下温育 15 分钟。接着添加抗生物素磁珠 (“MACS 珠子”)。细胞在 4°C 下温育 15 分钟,然后洗涤并施加到已预洗涤并嵌入磁体的 LS/VS+ 柱上。用缓冲液洗涤柱子 3 次。“未接触的”CD56+NK 细胞包含在穿过柱子的缓冲液流中。通过流式细胞检测分析确定纯度,使用了特异于人 CD56 和人 CD3 的抗体,两者都直接缀合有荧光染料 (BD Pharmingen)。抗体依赖性细胞毒作用测定法 (ADCC):由人 PBMC 纯化 NK 细胞并与处于补充有 10% 人 AB 血清 (MP Biomedical, Irvine, CA)、青霉素 / 链霉素、L- 谷氨酰胺和 2- 巯基乙醇的 RPMI-1640 中的 20ng/ml 重组人白细胞介素 2 (BD Pharmingen) 培养 48 小时。在 Cytotox 96 非放射性细胞毒性测定 (Promega Corp., Madison, WI) 中将这些细胞用作效应细胞。靶细胞是亲本或人 OX40 转染的 EL-4 细胞。在圆底 96 孔组织培养平板中,于冰上将 5000 个靶细胞与 0.005-10 μ g/ml 的抗-人 OX40 抗体或对照抗体温育 30 分钟。添加 20 倍数量的效应 NK 细

胞到孔中,最终体积为 100 μ l,并在 37℃下与 5% CO₂ 温育 4 小时前以 200xg 离心平板 3 分钟。以 250×g 离心平板 5 分钟并将 50 μ l 的上清液转移到 ELISA 平板中。添加 50 μ l 体积的测定缓冲液到平板中。在室温下温育 30 分钟后,添加 50 μ l 的停止溶液到孔中并测定 490nm 处的吸光度。所必需的对照包括单独的靶细胞(天然的)、在温育的最后 45 分钟用溶解缓冲液处理的单独的靶细胞(最大值)、单独的效应细胞、仅含有培养基(添加(体积校正)及不添加溶解缓冲液)的孔。在从所有孔中扣除培养基背景以及从靶细胞最大值中扣除体积校正值后,使用下列公式确定特异性溶解百分数:细胞毒性百分数 = ((实验值 - 天然的效应细胞值 - 天然的靶细胞值) / (靶细胞最大值 - 天然的靶细胞值)) × 100。

分离人抗 -OX40 抗体基因:通过离心收集产生 112V8 抗体 (IgG4) 的培养的杂交瘤细胞 (112V8 (ATCC 编号 PTA-7219, 2005 年 11 月 17 日保藏的))。根据厂商说明书,使用 Rneasy 试剂盒 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) 从这些细胞中纯化总 RNA。SMART RACE™ cDNA 扩增试剂盒 (Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA) 用于从杂交瘤细胞总 RNA 克隆编码免疫球蛋白基因可变区的 cDNA。简言之,通过逆转录酶由 2 μ g 的 RNA 制备第一链 cDNA。该 cDNA 用作模板用于聚合酶链反应 (“PCR”) 来扩增重链和轻链可变区和恒定区的一部分 (分别为 “HV” 和 “LV”)。所扩增的序列还含有前导序列。反应如下: 2.5U Pfu Ultra DNA 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, CA); 0.2 μ M 3' 引物 (用于重链: IgG1p, 用于轻链: hk5, 表 1); 1X 通用引物混合物 A, 用于 5' 末端 (包括在 SMART RACE 试剂盒中的 UMP 引物混合物 A); 200 μ M dNTP 混合物; 1mM MgCl₂; Pfu Ultra 缓冲液 (终浓度为 1X); 和 cDNA 模板。

[0207] 热循环程序为 94℃ × 30 秒、72℃ × 3 分钟的 5 个循环。94℃ × 30 秒、70℃ × 30 秒、72℃ × 3 分钟的 5 个循环。94℃ × 30 秒、68℃ × 30 秒、72℃ × 3 分钟的 25 个循环,之后在 72℃ 下延伸 7 分钟。通过琼脂糖凝胶电泳收集并通过 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen Co., Ltd., Germany) 纯化扩增的 DNA 片段。使用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen Corp.) 将纯化的 HV 和 LV 的 DNA 片段整合入 pCR4 Blunt-TOPO 载体中,并将每个构建质粒转化入大肠杆菌中,然后进行克隆。使用特异性引物 (M13F、M13R, 表 1) 分析构建质粒中每个插入物 (HV 和 LV) 的核苷酸序列。基于获得自 HV 和 LV 的序列,设计寡核苷酸引物用于扩增 VH (V8H38、V8H39) 和 VL (V8L42、V8L43) (表 1)。

[0208] 将 112V8 VH 和 VL 克隆入 IgG1 表达载体中。简言之,设计含有 5' -SalI 和 3' -NheI 限制性内切酶识别位点的寡核苷酸引物用于通过 PCR 扩增 HV 的可变区。使用 pTopoV8VH miniprep DNA 作为模板、V8H38 和 V8H39 作为引物 (表 1) 以及 Pfu Ultra DNA 聚合酶进行 PCR。在用 NheI 和 SalI 消化 PCR 产物后,将 410bp 片段亚克隆入用 NheI 和 SalI 预消化的 IgG1 表达载体 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KG1-Va1 Lark (一种 N5KG1 的改良载体,美国专利号 6,001,358)) (8.9kb DNA 片段) 中。通过限制性内切酶酶切消化分析 HV 的可变区的存在。

[0209] 作为第二步,如下将 LV 插入 N5KG1-Va1 Lark-VH 载体中:通过两种 DNA 限制性内切酶 BglII 和 BsiWI 消化 DNA 载体。分离 9.1-kb DNA 片段。类似于重链构建体,设计用于 PCR LV 的一组引物以包含针对 5' BglII 和 3' BsiWI 的识别位点。这些引物 V8L42 和 V8L43 用于从 pTopoV8VL miniprep 质粒 DNA 扩增 VL。用 BglII 和 BsiWI 消化 PCR 产物,并通过琼脂糖凝胶电泳和凝胶纯化分离。用 T4DNA 连接酶将该含有 V8VL 的片段与已制备的 9.1kb 载体连接,并用于转化 Top10 细胞 (Invitrogen Corp.)。选择阳性的大肠杆菌转化

体。纯化表达载体 pG1K112V8, 并通过限制性分析确认存在 112V8LV 和 112V8HV 区。

[0210] 分离 112Y55(ATCC 编号 PTA-7220, 2005 年 11 月 17 日保藏的)、112Y131(ATCC 编号 PTA-7218, 2005 年 11 月 17 日保藏的) 和 112Z5(ATCC 编号 PTA-7216, 2005 年 11 月 17 日保藏的)HV 和 LV 可变区, 并使用相同的实验方案进行测序。用于扩增特异性 HV 和 LV 的引物列于表 1 中。

[0211] 抗体亚类部分决定了第二种效应子作用, 如补体激活或 Fc 受体 (FcR) 结合以及抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) (Huber, 等, *Nature* 229 (5284) :419-20 (1971); Brunhouse, 等, *MoI Immunol* 16 (11) :907-17 (1979))。在鉴定最佳类型的用于特定应用的抗体中, 可考虑抗体的效应子作用。例如, hIgG1 抗体具有相对长的半衰期, 在固定补体中是非常有效的, 并且它们能结合 FcRI 和 FcRII。与此相反, 人 IgG4 抗体具有较短的半衰期, 无法固定补体且对 FcR 具有较低的亲和力。在 IgG4 的 Fc 区中用脯氨酸取代第 228 位丝氨酸 (S228P) 减少了使用 hIgG4 所观察到的异质性并增加了血清半衰期 (Kabat, 等, *Sequences of proteins of immunological interest* 第 5 版 (1991). ; Angal, 等, *MoI Immunol* 30 (1) : 105-8 (1993))。用谷氨酸取代第 235 位亮氨酸 (L235E) 的另一突变消除了残留的 FcR 结合和补体结合活性 (Alegre, 等, *J Immunol* 148 (11) :3461-8 (1992))。所得到的具有这两种突变的抗体称为 IgG4PE。hIgG4 氨基酸的编号方式来源于 Kabat (Kabat, 等, *Sequences of proteins of immunological interest* 第 5 版 (1991))。

[0212] 通过用 NheI 和 BglIII 消化 pG1K112V8 以释放含有 112V8VH 和 112V8VL 的片段, 从而产生表达重组 112V8 IgG4PE 的载体。将该载体与使用相同的酶切割的 IgG4PE 表达载体 (pN5KG4PE-Lark, IDEC Pharmaceuticals, 美国专利号 6, 001, 358) 连接。通过限制性内切酶酶切消化确认所得到的质粒 pG4PEK112V8。

[0213] 以相同的方法, 将来自 112F32 杂交瘤 (ATCC 编号 PTA-7217, 保藏日期 2005 年 11 月 17 日) 的 RNA 用于生成产生重组 112F32G1 和 112F32G4 抗体的载体, 在 RACE 反应中分别用于扩增重链和轻链基因的 3' 引物是 HH-2 和 HK-2。使用 H725' 和 M2H3' 进行 112F32HV 的扩增。112F32LV 扩增引物是 F32K5' 和 K52D3' (表 1)。IgG4 表达载体 pN5KG4 获得自 IDEC Pharmaceuticals (美国专利号 6, 001, 358.)。通过限制性内切酶酶切消化和测序确认所得到的载体 pKLG1/F32K3H 和 pKLG4/F32K3H。112F32 HV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID NO :3

```
ATGGAGTGGG GGCCGTGCTG GGTTCCTT GTTGTTATT TAGAAGGTGT CCAGTGTTGGG      60
GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC      120
TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTACC TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA      180
GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTAGTACCAT ATACTATGCA      240
GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGTATCTG      300
CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGGAGTGTAT      360
CACAATGGCT GGTCTTCTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTACTCAC CGTCTCCTCA      420
```

[0214] 112F32 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID

NO :4

ATGGACATGA GGGTCCTCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGTTT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAAACAGA 120
 GTCACCATTA CTTGTCCGGC GAGTCAGGAT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCTCATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC CCTCACCTTC 360
 GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGA 390

[0215] 112V8 HV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID NO : 5

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTGTCCAG 60
 ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTA GTGAAGCCCA AACAGACCCT CACGCTGAAC 120
 TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAATGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG 180
 CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA GTCATTTATT GGGATGATCA TCAACTCTAC 240
 AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC 300
 CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACAGACGA 360
 GGGGCCTTCC AGCACTGGGG CCAGGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC TTCCACCAA 419
 GGGC 423

[0216] 112V8 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID NO : 6

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTCTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGT CAG CAGTATGATA GCTCGCTCAC TTTCGGCGGA 360
 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGAACT 387

[0217] 112F32 HV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO : 7

MEWGPCWVFL VVILEGVQCG VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YSMNWVRQAP	60
GKGLEWVSYI SSSSSTIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRDEDV AVYYCARGVY	120
HNGWSFFDYW GQGTLLTVSS	140
[0218] 112F32 κ LV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :8	
MDMRVLAQLL GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SLSASVGNR VTITCRASQD ISSWLAWYQQ	60
KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC QQYNSYPLTF	120
GQGTRLEIKR	130
[0219] 112V8 HV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :9	
MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPKQTLTLT CTFSGFSLST SGMGVGWIRQ	60
PPGKALEWLA VIYWDDHQLY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCAHRR	120
GAFQHWGQGT LVTVSSASTK G	141
[0220] 112V8 LV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :10	
METPAQLLFL LLLWLPTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK	60
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFVYYCQ QYDSSLTFGG	120
GTKVEIKRT	129
[0221] <u>表 1:合成的 DNA 引物 (SEQ ID NOS :11-37)</u>	

编号	名称	序列 5' → 3'	长度
11	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22- 单体
12	IgG1p	TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31- 单体
13	HK5	AGGCACACAACAGAGGCACCTTCCAGATTTC	30- 单体
14	M13F	GTAAACGACGGCCAGTG	18- 单体
15	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17- 单体
16	V8H38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACACGGGT	37- 单体
17	V8H39	AGAGAGAGAGGTCGACCACTGGACACACTTTGCTCCAGG	41- 单体
18	V8L42	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATTGGAACCCAGCGCAGCTTC	42- 单体
19	V8L43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCCTCC	40- 单体
20	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCACCGCTG	25- 单体
21	HK-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGGCGAGC	26- 单体
22	F725'	ACCGTGTGCGACTGGATTCCAAGGCATTTCAC	32- 单体
23	M2H3'	GGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC	24- 单体
24	F32K5'	AATCAAGATCTGTCAGGACACA	22- 单体

25	K52D3'	TATCCCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC	30- 单体
26	Y131HF	AGAGAGAGAGGTCGACCAACCATGGACACACTTTGCTCCACG	41- 单体
27	Y131HR	AGAGAGAGA GGCTAGCTG AAGAGA CGGTGA CCAATTGT	37- 单体
28	Y131LF5	AGAGAGAGA GGTCGACCAACCATGG AAACCCAG CGCAGCTT	41- 单体
29	Y131LR	AGAGAGAGA GCGTACGT TTGA TTT CCA CCTTGGTCCCCTTG	40- 单体
30	Y55HF	AGAGAGAGAGGTCGACCAACCATGGACACACTTTGCTCCACG	41- 单体
31	Y55HR	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTTGT	37- 单体
32	Y55LF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAACCCAGCGCAGCTTC	42- 单体
33	Y55LR	AGAGAGAGAGGTAAGTTGATTTCACCTTGGTCCCCTG	40- 单体
34	Z5HF	AGA GAGAGAGGTCGACCAACCATGACCATGATTACGCCAAGC	41- 单体

编号	名称	序列 5' → 3'	长度
35	Z5HR	GAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37- 单体
36	Z5LF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAGCCCCAGCTCAGCTTC	42- 单体
37	Z5LR	AGAGAGAGAGCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCTTG	40- 单体

[0222] 112Y55 HV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端)SEQ ID NO :38

ATGGACACAC TTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTTCATGGGT CTTGTCCCAQ
60

ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGTCC
120

TGCACCTTCT CTGGGTTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG
180

CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA ATGGCTTGCA CTCATTTCATT GGGATGATGC TGAGCGCTAC
240

AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC
300

CTTACAATGA CCAACATGGA CCTTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACACCCGG
360

GGGGCTTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA
408

[0223] 112Y55 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID
NO :39

ATGGAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
60

GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCATC
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAACAGAAA
180

CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATTTA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA
240

GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG
300

CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGATA GCTCACGGAC GTTCGGCCAG
360

GGGACCAAGG TGGAAATCAA A
381

[0224] 112Y131 HV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID
NO :40

ATGGACACAC TTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTTCATGGGT CTTGTCCCAG
60

ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGACC
120

TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG
180

CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA CTCATTTATT GGGATGATCA TAGCCCCTAC
240

AGCCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC
300

CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACGCACCCGG
360

GGGGCTTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA
408

[0225] 112Y131 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID

ATGGAAGCCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
60

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GGGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT
180

NO :41 GGCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
240

AGGTTCAAGT GCAGTGGGCC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
300

GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCATCCGAC GTTCGGCCAA
360

GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT C
381

[0226] 112Z5 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID NO :

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTAAC GGCCGCCAGT
60

GTGCTGGAAT TCGCCCTTCT AATACGACTC ACTATAGGGC AAGCAGTGGT ATCAACGCAG
120

AGTACGGGGG GAGGCTTGGT ACAGCCTGGC AGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAGCCTCT
180

GGATTACCC TTGATGATTA TGGCATGCAC TGGGTCCGGC AAGCTCCAGG GAAGGGCCTG
240

42

GAGTGGGTCT CAGGTATTAG TTGGAATAGT GATAGTATAG GCTATGTGGA CTCTGTGAAG
300

GGCCGATTCA CCATCTCCAG AGACAAAGCC AAGAACTCCC TGTATCTGCA AATGAACAGT
360

CTGAGAGTTG AGGACACGGC CTTGTATTAC TGTGTAAAAG ATATTAGTGG CTGGTACAGC
420

TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT CA
462

[0227] 112Z5 LV 的 cDNA 的核苷酸序列 (从起始密码子 (ATG) 到可变区末端) SEQ ID
NO : 43 **ATGGAAGCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCAGAG TACCAACCGGA**
60

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT
180

GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
240

AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
300

GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCGATCAC CTTGGGCCAA
360

GGGACACGAC TGGAGATTAA A
381

[0228] 112Y55 HV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTSL CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ
60

44 **PPGKALEWLA LIHWDDAERY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDLVD TATYYCAHTR**
120

GAFDIWGQGT MVTVSS
136

[0229] 112Y55 LV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :
METPAQLLFL LLLWL PDDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAI LSCRASQSVS SSFLAWYQQK
60

45 **PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSRTFGQ**
120

GTKVEIK
127

[0230] 112Y131 HV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :
MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTSL CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ
60

46 **PPGKALEWLA LIYWDDHSPY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCARTR**
120

GAFDIWGQGT MVTVSS
136

[0231] 112Y131 LV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :
MEAPAQLLFL LLLWL PDDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVV SYLAWYQQKP
60

47 **GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGPCTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPTFGQ**
120

GTKVEIK
127

[0232] 112Z5 HV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :
MTMITPSLVP SSDPLVTAAS VLEFALLIRL TIGQAVVSTQ STGGGLVQPG RSLRLSCAAS
60

48 **GFTLDDYGMH WVRQAPGKGL EWVSGISWNS DSIGYVDSVK GRFTISRDNK KNSLYLQMNS**
120

LRVEDTALYY CVKDISGWYS FDYWGQGTLV TVSS
154

[0233] 112Z5 LV 的 cDNA 的氨基酸序列 (前导序列 (粗体) 和可变区) SEQ ID NO :

MEAPAQLLFL LLLWLPTDTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP

60

49 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ

120

GTRLEIK

127

[0234] 由 CHO 细胞产生重组人抗 -OX40 抗体 :为了产生重组抗体,将含有抗 -OX40 抗体的单个抗体载体电穿孔入宿主细胞—中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞, ATCC#CRL-9096) 的 dhfr- 缺陷型细胞株中,并从转染细胞的上清液中分离重组抗体。简言之,通过 DNA 限制酶 NruI 线性化 10 μ g 纯化的 DNA 表达载体,并使用 Bio Rad 电穿孔仪 (0.8kV, 25 μ F) 将 DNA 转染入 3×10^6 个 CHO 细胞中。将转染细胞接种在 96 孔培养平板中,在补充有青霉素 / 链霉 (BioWhittaker)、HT (Sigma) 和遗传霉素 (Invitrogen Corp.) 的含有谷氨酰胺的 EX-CELL 325PF CHO 无血清培养基 (JRH Bioscience, Lenexa, KS) 中选择含有该 DNA 载体的 CHO 细胞。在选择出几株稳定的转染细胞系后,通过 ELISA 鉴定高的人 IgG 产生细胞系,并用于产生重组抗体。

[0235] 实施例 2

[0236] 该实施例描述了针对人 OX40 的人单克隆抗体的多个特征。

[0237] 用处于 CFA/BFA 中的可溶性的重组 hOX40:hFc、处于 RIBI 中的 hOX40:hFc+hOX40:hFc-ova 缀合物、处于 RIBI 中的热变性的 hOX40:hFc 或处于 RIBI 中的经辐射的、活化的人 T 细胞免疫接种 KMmiceTM。一些小鼠产生在人 IgG OX40 特异性效价范围内的抗 - 人 OX40 特异性抗体。将来自最高应答者的脾细胞与骨髓瘤细胞融合以生成产生人抗 - 人 OX40 的杂交瘤。通过 ELISA 和流式细胞术测定抗 -OX40 抗体的产生,分别使用了重组的可溶性 hOX40:hFc 和 CHO-OX40 转染子。通过有限稀释克隆阳性杂交瘤以产生单克隆杂交瘤 (表 2)。

[0238] 表 2 :用于产生抗体的抗原

抗体	抗原
112F32	hOX40:hFc
112V8	活化的人 T 细胞
112Y55	hOX40:hFc+hOX40:hFc- 卵白蛋白
112Y131	hOX40:hFc+hOX40:hFc- 卵白蛋白
112Z5	热变性的 hOX40:hFc

[0239] 对一些抗体进一步鉴定对人 OX40 的相对结合亲和力、体外封闭人 OX40 配体结合的能力、彼此交叉封闭的能力、体外阻断增殖的能力、体内阻断炎症的能力以及介导 ADCC 的能力 (表 3)。

[0240] 112F32、112V8、112Y131、112Y55 和 112Z5 全都特异性结合活化的人 T 细胞,但不

特异性结合静息的人 T 细胞 (图 1)。用不同浓度的人抗 - 人 OX40 抗体标记活化 3 天的人 T 细胞并用抗 - 人 IgG-PE 检测。这些人抗 - 人 OX40 抗体的结合是可饱和的。通过滴定标记的活化人 T 细胞需要的抗体量测定每种抗体的最大结合 (图 2)。获得相对结合亲和力的变化范围 (KD 和 BMAX, 表 3)。还测定了纯化的小鼠抗 - 人 OX40 抗体 L106 的结合, 与 L106 相比, 112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 全都具有对活化 T 细胞更高的 BMAX。

[0241] 表 3: 人抗 - 人 OX40 单克隆抗体的特性

抗体	最初的亚类	表位	活化 T 细胞的标记		通过 ELISA 的 OX40L 封闭	在 T 细胞上 通过 FACAS 的 OX40L 封闭	体外效力	体内效力	ADCC 在 10 μ g/ml 的 % 溶解 [@]
			KD μ M	BMAX 几何平均	IC50 (μ g/ml)	IC50 (μ g/ml)			
112F32	IgG4	A	0.013	103.5	0.650	ni*	+^	IgG1 + IgG4 +	IgG1 37% IgG4 NT
112V8	IgG4	B	0.036	180.8	0.051	0.62	+	IgG1 + IgG4 +	IgG1 55.6% IgG4 18%
112Y55	IgG1	B	0.014	161.8	0.073	0.90	+	+	54.2%
112Y131	IgG4	B	0.025	170.7	0.069	0.91	+	+	18%
112Z5	IgG1	C	0.011	118.2	0.081	14.65	+	+	35%
L106	小鼠 IgG1	L	0.001	52.0	0.982	60.91	NT	NT	NT

*: ni; 在 50 μ g/ml 下不抑制 ^: +: 在体外抑制增殖或在体内抑制疾病, 未定量 #: NT; 未测试 @: 使用 10 μ g/ml 不相关抗体的溶解百分数为 14%

[0242] 通过 ELISA 分析 OX40 抗体以确定是否彼此竞争结合可溶性 OX40。将单种人抗体包被在 96 孔平板的孔中。将 hOX40:mFc 与可溶性抗 - OX40 抗体 (封闭抗体) 预温育, 然后添加到包被的孔中。用抗 - 小鼠 IgG-HRP 检测 hOX40:mFc 与包被的抗体的结合。使用下列公式确定抑制百分数: $(100 - (\text{OD 样品} / \text{OD 最大结合样品})) * 100$ (图 3A)。

[0243] 此外, 将小鼠抗体包被在 96 孔平板的孔中 (L106、315、ACT35 湖小鼠 IgG), 并让 hOX40:hFc 与封闭抗体预温育。用绵羊抗 - 人 IgG-HRP 检测 hOX40:hFc 的结合 (图 3B)。

[0244] 对于这些人抗 - 人 OX40 抗体, 已鉴定了三组“表位”。112V8、112Y55 和 112Y131 都彼此交叉封闭, 而 112F32 和 112Z5 则各自具有独特的结合位点。112V8、112Y131 和 112Y55 部分降低 112Z5 的结合, 但反过来却不这样, 112Z5 仅封闭其自身。这暗示与 112V8、112Y55 和 112Y131 相比, 112Z5 识别不同的表位, 结合的任何降低可能是由于空间位阻之故。这些人抗 - OX40 抗体并不封闭 L106、315 或 ACT35 结合 OX40 (图 3A 和 3B), 而 L106 封闭其自身和 ACT35, 与不结合 O40 的对照抗体 (实线) 相比, 其仅降低 10% 的 112V8 和 112Y131 结合。

这表明在此所述的抗体识别不同于 L106 的表位。克隆 315 降低 112V8 和 112Y131 结合,但由于后两种抗体并不封闭 315 结合,因此它们必定结合不同的表位。

[0245] 还使用流式细胞计数测定来评估抗体封闭结合活化人 T 细胞表面表达的 OX40 的能力。用封闭抗体染色活化 T 细胞,然后添加生物素化的抗-OX40 抗体。此外,用小鼠抗-人 OX40 抗体标记活化的人 T 细胞以封闭 OX40 结合。用 SA-PE 检测生物素化的抗-OX40 抗体与这些细胞的结合。通过流式细胞仪分析细胞。使用相同的公式,将阳性 SA-PE 染色的几何平均值用于计算抑制百分数,即 $(100 - (\text{OD 样品} / \text{OD 最大结合样品})) * 100$ 。将这些数据(图 4A 和 4B)与 ELISA 分析相关联。

[0246] 人抗-人 OX40 抗体识别 3 个表位,112F32 识别第 1 个,112Z5 识别第 2 个,112V8 和 112Y131 识别第 3 个。照 ELISA 数据的情况看,112Z5 仅封闭其自身,但其结合为 112V8 和 112Y131 所降低。对于 112V8 和 112Y131 的 L106 封闭同样如此。如果 L106 首先结合细胞,则 112V8 和 112Y131 仍能有效结合人 OX40。无论如何,112V8 和 112Y131 抑制了 L106 的结合。这些数据一并考虑暗示抗体在空间上阻碍了 L106 的结合,但不识别相同的表位。112F32 和 112Z5 并不封闭 L106 的结合。ACT35 并不抑制 112F32、112V8、112Y131 或 112Z5 的结合,但克隆 315 降低 50% 的 112V8 和 112Y131 的结合。对活细胞的抗体结合和检测可包括内在化表面分子,使得单种抗体的结合水平可由于 OX40 的表面表达整体上降低而被降低,但不封闭抗体的结合。与较低亲和力抗体相比,更高亲和力抗体可导致更多的内在化。这就可以解释在 ELISA 和流式细胞计数数据之间的差异以及取决于用于封闭的抗体而导致的结果差异。

[0247] 使用 ELISA 实验方案测试 112F32、112V8、112Y131、112Y55 和 112Z5 封闭可溶性 hOX40L 结合包被的 hOX40:hFc 融合蛋白的能力(图 5A,表 3)。用 hOX40:hFc 包被平板,并在封闭非特异性位点后,让抗-OX40 抗体进行结合。不洗涤就添加 OX40L-FLAG 到孔中。用抗-FLAG-HRP 第二抗体检测结合的配体。使用下列公式确定抑制百分数: $(100 - (\text{OD 样品} / \text{OD 最大 OX40L 结合})) * 100$ 。112V8、112Y55 和 112Y131 阻止了 85% 的可溶性 OX40L 与 hOX40:hFc 的结合。112F32 阻止了大约 70% 的可溶性 hOX40L 与 hOX40:hFc 的结合,以及 112Z5 封闭了 67% 的最大结合。这些数据暗示这些人抗-人 OX40 抗体与涉及配体结合的 OX40 的一部分结合。

[0248] 当基于流式细胞计数的测定被用于监测封闭可溶性 OX40L 与表达 OX40 的活化的人 T 细胞结合时,获得了稍有不同的结果(图 5B)。先用抗-OX40 抗体再用可溶性 flag 标记的-人 OX40L 标记活化的人 T 细胞。用抗-FLAG-PE 抗体检测 OX40L 的结合。使用相同的公式确定抑制百分数,即 $(100 - (\text{样品} / \text{最大结合})) * 100$ 。在该研究中,112F32 不能阻止 OX40L 结合,112Z5 的封闭降低了,而其他抗体 112V8、112Y55 和 112Y131 则持续不断地具有类似的封闭能力。结果差异可取决于 112F32 和 112Z5 对 OX40 的亲和力。还可取决于与可溶性 OX40:mFc 融合蛋白的二聚化相反的细胞表面上 OX40 蛋白的三聚化。

[0249] 可选地,在活化 T 细胞表面上表达的 OX40 可与阻止 112F32 或降低 112Z5 结合 OX40、但不封闭 OX40L 结合 OX40 的 4-1BB(Ma, 等, Blood 106(6):2002-10(2005)) 或类似于 BTLA 的抑制分子(Cheung, 等, Proc Natl Acad Sci USA 102(37):13218-23(2005); Compaan, 等, J Biol Chem 280(47):39533-6(2005); Croft, Trends Immunol 26(6):292-4(2005); Gonzalez, 等, Proc Natl Acad Sci USA 102(4):1116-21(2005); Sedy, 等,

Nat Immunol 6(1):90-8(2005)) 形成复合物。最后三种可能性可指向单种抗体的特异性表位结合。L106(一种小鼠抗-人 OX40 抗体) 所识别的表位也依赖于 OX40 配体和 OX40 的确定, 如 L106 封闭了 95% 的 OX40L 与重组 OX40 蛋白的结合, 但仅封闭 60% 的活化 T 细胞结合。这些数据表明在 OX40 上有多个表位, 某些表位完全干扰了与 OX40L 的结合, 而其他表位仅部分封闭该相互作用。这些抗体与不同表位的结合可能或不可能具有独特的功能结果。

[0250] 通过任何一种不需要支配 OX40 信号传导的方法对配体结合的封闭将为给定的抗体所削弱。为确定人抗-人 OX40 抗体是否能阻止经由 OX40 的信号传导, 由同种异体供体使用总 PBMC 建立双向混合的淋巴细胞培养物。在不同剂量的抗-OX40 抗体或对照抗体存在或不存在下, 在 96 孔 U 底平板中共培养来自同种异体供体的外周血单核细胞 7 天, 重复三次。将 1×10^5 个细胞/供体添加到每个孔中。在培养的最后 18 小时用 $1 \mu\text{Ci}/\text{孔}$ $^3\text{HtdR}$ 使平板受脉冲作用。收获细胞并在闪烁计数器上计数。在对照或抗-OX40 抗体存在或不存在下测定增殖(图 6)。112V8(图 6A)、112Y55 和 112Z5(图 6B) 以及 112Y55、112Y131 和 112F32(图 6C) 全都能以剂量依赖性方式减少由同种异体细胞诱导的增殖的量, 而阴性对照 hIgG4、抗-人血清白蛋白则对增殖没有影响(图 6A)。进行多次研究, 应答量值、CPM 掺入的最大值取决于用于每次测定的供体 PBMC 的组合。在混合的淋巴细胞培养物中, CD4 和 CD8T 细胞应答于同种异体抗原。由于人抗-人 OX40 抗体而减少的增殖响应可能归因于对 CD4 和 CD8T 细胞的直接抑制。

[0251] 实施例 3 该实施例描述了用人 OX40 的线性肽进行人抗-人 OX40 抗体的表位作图。

[0252] 选择人 OX40 胞外域中的三种肽(表 4) 用于开始进行为 112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 所识别的表位作图。

[0253] 表 4: 人 OX40 肽

肽名称	肽序列	抗体				
		112F32	112V8	112Y55	112Y131	112Z5
112A	RPAGPGFYNDVVSSKPC	-	-	-	-	-
112B	RAGTQPLDSYKPGVDC	-	-	-	-	-
112C	LAGKHTLQPASNSSDAIC	-	-	-	-	-

[0254] 根据厂商说明书(Pierce), 通过 A&A Lab, LLC 产生肽并用马来酰亚胺接头缀合匙孔血蓝蛋白("KLH")。将处于碳酸盐缓冲液中的肽以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 包被 96 孔 Maxisorp ELISA 平板(Nunc), 在 4°C 下温育过夜。用 PBS/0.1% Tween 20 洗涤平板, 然后在室温下用酪蛋白缓冲液(Pierce) 封闭 3 小时。添加 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的在处于 PBS/0.1% Tween 20 中的 10% 酪蛋白中稀释的候选抗体。如对 OX40 特异性抗体检测 ELISA 所述的, 进行其余的 ELISA。

[0255] 没有一种人抗-人 OX40 抗体能可检测地与这些人 OX40 肽反应, 而来自用这些肽免疫接种的小鼠的血清结合了适当的肽。这些结果表明在所使用的检测条件下, 112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5 不能可检测地结合这些来自人 OX40 胞外序列的短的线性表位。如果这些序列包括在更长的肽序列中, 则这些数据并不排除这些序列来自于为人抗-人 OX40 抗体所识别的序列。

[0256] **实施例 4** 该实施例描述了人抗 - 人 OX40 单克隆抗体的体内功能分析。

[0257] 将急性异种移植抗宿主病 (XGVHD) 模型用于测试 112V8G1 人抗 - 人 OX40 抗体的体内治疗潜能 (Watanabe, 等, Clin Immunol 120 :247-259 (2006))。在该模型中, 将人外周血单核细胞转移到严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中。在转移到小鼠之前, 用抗 -IL2R β 链抗体处理小鼠以耗竭内源性鼠自然杀伤细胞, 然后对它们进行亚致死量的辐射以使人细胞迁移到肠道中。人 T 细胞增殖并诱导移植抗宿主样病, 导致体重减轻、血尿、腹水、肝和肠道中炎性细胞浸润以及最终的死亡。与纯化的 T 细胞转移诱导类似的症状一样, 该疾病主要由人 T 细胞所介导的。

[0258] SCID 小鼠按如上所述进行处理, 外加在第 0 天给予 112V8G1 或人 IgG1 同种型对照 (抗 -DNP) 重组抗体以测试 OX40 封闭的预防性潜能。在第 0 天, 通过静脉注射让小鼠接受 100、20 或 2 μ g 的 112V8G1 抗体或 100 μ g 抗 -DNP。每 3-4 天测定体重一次。在第 12 天, 杀死小鼠并分析疾病症状, 收集脾进行流式细胞检测分析。对第 12 天所观察到的宏观病理学评分如下, 腹泻 (0-1)、肠和腹膜腔中出血以及腹膜炎 (各自为 0-5), 具有更高的分数表明疾病更严重。所有疾病症状之和被用于确定总宏观病理学评分。接受对照抗体的小鼠全都显示有 XGVHD 症状, 与接受 112V8G1 的小鼠相比具有更高的病理学评分。所有测试剂量的 112V8G 都缓解或预防了这些症状 (图 7A)。

[0259] 脾的分析结果与该观察结果一致。通过流式细胞仪分析脾的单细胞悬液中人 T 细胞的存在。人 T 细胞存在于用对照抗体处理的小鼠脾中, 但与对照动物中 T 细胞的数量相比, 在 112V8G1 处理的动物中人 T 细胞的数量明显更低 (图 7B)。此外, 使用多路传输技术测定血清中的炎性人细胞因子 (干扰素 - γ 、肿瘤坏死因子和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)。与对照相比, 在 112V8G1 处理的动物中炎性人细胞因子减少。最具戏剧性的影响是针对干扰素 γ 水平的 (图 7C)。已使在同种异体骨髓移植患者的外周血中 OX40+T 细胞的出现与慢性 GVHD 发病相关 (Gadisseur, 等, Bone Marrow Transplant 23(10) :1013-7 (1999) ;Kotani, 等, Blood 98(10) :3162-4 (2001) ;Sanchez, 等, Br J Haematol 126(5) :697-703 (2004))。

[0260] 为了在慢性 GVHD 的治疗中评估 OX40 封闭的有效性, 建立慢性异种 GVHD 的动物模型系统。该模型类似于急性异种 GVHD 模型, 不同之处在于将 10^6 个纯化的 CD4⁺ 细胞而非 PBMC 注射入 SCID 小鼠中。辐射剂量也降低到 2.12Gy 以减少肠损伤的程度。该疾病最初的迹象是脱发和体重减轻, 之后是死亡, 其部分归因于在肺中 T 细胞浸润。在约第 30 天疾病症状变得明显。5 只一组的小鼠分别用 100、20 或 2 μ g 的 112V8G1 重组抗体每周处理一次, 持续 5 周, 或用 100 μ g 的抗 -DNPhlgG1 对照抗体每周处理一次, 持续 5 周。在第 7 周分析生存下来的小鼠。通过脱发、出血和腹膜炎 (各自为 0-5) 和腹泻 (0-1) 的程度确定宏观病理学评分。

[0261] 最初观察到的病理是脱发, 与对照处理的小鼠相比所有这三种剂量的 112V8G1 都缓解了该疾病症状 (图 8A)。该观察结果与转移 CD4T 细胞后第 48 天 112V8G1 处理的小鼠脾中人 T 细胞的减少相一致 (图 8B)。在该模型中, 人 T 细胞迁移到淋巴结中, 其在对照动物中容易检测到, 但在抗 -OX40 处理的动物中则人 T 细胞明显减少或没有发现 (图 8C)。注意, 在用 20 或 100 μ g 的 112V8G1 处理的动物中没有发现淋巴结。

[0262] 此外, 不同于急性模型, 在对照处理的小鼠脾和淋巴结中可容易地检测到 OX40 阳

性细胞,而在 112V8G1 处理的动物中 OX40+ 细胞的数量则减少(图 8B 和 8C)。在接受人 CD4T 细胞的小鼠血清中检测到炎性细胞因子,与用对照人 IgG1 相比,在用 112V8G1 抗-人 OX40 处理的小鼠中被检测到的细胞因子的量减少。在该疾病模型中产生的细胞因子包括但不限于白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 6、白细胞介素 8、白细胞介素 10、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、干扰素 γ 和肿瘤坏死因子 α 。通过用 112V8G1 处理,除白细胞介素 6 之外的所有细胞因子都明显地减少了,证实了通过耗竭和 / 或封闭的 OX40 信号传导抑制的抗炎活性。

[0263] 利用预防性用药法在急性 XGVHD 模型中研究 112V8G4PE。该抗体不具有耗竭活性,这是因为其无法固定补体或结合 Fc 受体,因此疾病预防应当依赖于阻断 OX40 信号传导或下行性调节 OX40。在第 0 天,向每组 5 只小鼠单次注射 200、20 或 2 μ g 的 112V8G4PE。在第 0、3 或 6 天,让对照处理的小鼠接受 200 μ g 抗-DNP 人 IgG4 抗体。在第 12 天分析小鼠的宏观病理学和脾中人 T 细胞的数量(图 9A 和 9B,表 5)。在第 12 天,按 0-3 分对腹泻、腹膜出血或血性腹水以及肠出血的宏观病理学评分,0 分代表没有观察到病理,3 分代表严重的疾病。200 和 20 μ g 的 112V8G4PE 阻止了明显病理的发展,而 2 μ g 剂量并不足以预防疾病。在第 12 天宏观病理学的量与脾中人 T 细胞的数量相关。与对照处理的动物相比,200 或 20 μ g 的 112V8G4PE 显著减少了人 T 细胞在脾中的蓄积,而 2 μ g 剂量则无效。在 112V8G4PE(图 9A 和 9B) 和 112V8G1(图 7) 滴定中所观察到的差异可归因于 112V8G4PE 抗体的耗竭活性缺乏。

[0264] 迟至第 3 或 6 天给予 112V8G4PE 以测试阻断 OX40 信号传导的治疗效能。在转移人 PBMC 后第 3 或 6 天用 200 μ g 的 112V8G4PE 或对照人 IgG4 抗体处理小鼠。在第 14 天评估宏观病理学。与对照抗体处理的动物中观察到疾病程度相比,当在第 3 或 6 天给予 112V8G4PE 抗-人 OX40 抗体时,OX40 信号传导的阻断改善了疾病(图 9C)。与对照处理的小鼠相比,抗-OX40 处理的小鼠脾中人 T 细胞的数量也明显减少。如果在第 6 天给予,112V8G1 也缓解了疾病。这些数据证实了作为治疗方法用于缓解疾病病理的通过 OX40 特异性抗体封闭 OX40 的有效性。

[0265] 在急性和慢性异种移植物抗宿主病模型中,与对照处理的动物相比,112V8(一种人抗-人 OX40 抗体)显著地缓解了疾病病理,减少了炎性细胞因子的产生以及脾和淋巴结中人 T 细胞的数量。这些数据证实了直接靶向 OX40 阳性细胞是适合于预防(预防性)和改善(治疗)T 细胞介导的疾病的疗法。在使用 112F32、112Y55、112Y131 和 112Z5 的一种或两种模型中获得了类似的结果(表 3)。

[0266] 在急性 GVHD 模型中,CD4 和 CD8 人 T 细胞都是疾病所需要的。CD4T 细胞对于诱导是必需的,而 CD8T 细胞则介导大多数的发病机理。通过给予一种所述的人抗-人 OX40 抗体对疾病的预防和改善可能是由于直接拮抗了 CD4 和 CD8T 细胞,或可能是由于通过减少 CD4 帮助功能从而直接封闭了具有对 CD8T 细胞间接影响的 CD4T 细胞。此外,OX40 抗体可促进一些调节 T 细胞产生或增加其数量。尽管不希望受任何理论约束,有可能这些机制的一种或全部可介导疾病改善。

[0267] 尽管不希望受任何理论约束,这些抗-人 OX40 抗体可能的作用机制是通过自然杀伤细胞或嗜中性效应细胞诱导抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。该过程依赖于效应细胞表达的 Fc 受体与结合活化 T 细胞上表达的 OX40 的抗-OX40 抗体结合的能力。免疫球蛋白

白结合 Fc 受体的能力取决于抗体亚类以及 Fc 受体类型。人 IgG1 抗体结合自然杀伤细胞和嗜中性白细胞上的 Fc 受体,而人 IgG4 抗体并不结合 (Huber, 等, Nature 229(5284) : 419-20 (1971) ;Brunhouse, 等, Mol Immunol 16(11) :907-17 (1979))。测试人抗 - 人 OX40 抗体 112F32 (IgG1)、112V8 (IgG1 和 IgG4PE)、112Y55 (IgG1)、112Y131 (IgG4) 和 112Z5 (IgG1) 通过人自然杀伤细胞介导 OX40 表达靶细胞的 ADCC 的能力。在与人抗 - 人 OX40 抗体以及以 20 个效应细胞 :1 个靶细胞的比例的人自然杀伤细胞温育 4 小时后,将非放射性细胞毒性测定用于测定靶细胞特异性溶解百分数 (图 10)。用 0.001-10 μ g/ml 抗 -OX40 或阴性对照抗体标记 EL4- 人 OX40 靶细胞,然后与人自然杀伤细胞温育。通过非放射性细胞毒性测定中乳糖脱氢酶的释放测定靶细胞的溶解。如该方法中所述的测定特异性溶解百分数。人 IgG1 抗 - 人 OX40 抗体以剂量依赖性方式诱导了 EL4- 人 OX40 靶细胞的 ADCC。人 IgG4 抗 -OX40 抗体和对照人 IgG1 抗体无法诱导靶细胞的特异性溶解。ADCC 活性水平与相对结合亲和力和表位组相关,如与组 A(112F32) 和 C(112Z5) 中的抗体相比,那些在表位组 B 中的抗体 (112V8 和 112Y55) 具有更高的 ADCC 活性抗体。

[0268] 在此描述的分析结果鉴定了具有结合亲和力变化范围的抗体、三种不同的表位并证实了它们在阻断 OX40 配体结合和预防或改善 T 细胞介导的炎症反应中的有效性。这些人抗 - 人 OX40 抗体 (112F32、112V8、112Y55、112Y131 和 112Z5) 减少增殖、减缓疾病进展以及减少炎症细胞因子产生的能力证实了直接封闭 OX40 作为一种用于治疗 T 细胞介导的炎症或自身免疫性疾病,包括但不限于类风湿性关节炎、多发性硬化、银屑病、克罗恩氏病、移植抗宿主病和移植排斥的方法的潜力。对于减少增殖或改善疾病,抗 -OX40 抗体的耗竭活性是不需要的,这样能减少由于 T 细胞耗竭所致的潜在不利影响。

[0269] 文献目录

[0270] Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." J Exp Med 191(2) :375-80.

[0271] Al-Shamkhani, A., S. Mallett, et al. (1997). "Affinity and kinetics of the interaction between soluble trimeric OX40 ligand, a member of the tumor necrosis factor superfamily, and its receptor OX40 on activated T cells." J Biol Chem 272(8) :5275-82.

[0272] Alegre, M. L., A. M. Collins, et al. (1992). "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody." J Immunol 148(11) :3461-8.

[0273] Angal, S., D. J. King, et al. (1993). "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody." Mol Immunol 30(1) :105-8.

[0274] Bachmann, M. F., M. Barner, et al. (1999). "CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation." J Exp Med 190(10) :1383-92.

[0275] Bansal-Pakala, P., A. G. Jember, et al. (2001). "Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance." Nat Med 7(8) :907-12.

[0276] Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Molecular characterization

of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. "Embo J 13(17) :3992-4001.

[0277] Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Identification of OX40 ligand and preliminary characterization of its activities on OX40 receptor." Circ Shock 44(1) :30-4.

[0278] Blazar, B. R., A. H. Sharpe, et al. (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow-transplant recipients." Blood 101(9) :3741-8.

[0279] Brocker, T., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles." Eur J Immunol 29(5) :1610-6.

[0280] Brugnoli, D., A. Bettinardi, et al. (1998). "CD134/OX40 expression by synovial fluid CD4+ T lymphocytes in chronic synovitis." Br J Rheumatol 37(5) :584-5.

[0281] Brunhouse, R. and J. J. Cebra (1979). "Isotypes of IgG: comparison of the primary structures of three pairs of isotypes which differ in their ability to activate complement." Mol Immunol 16(11) :907-17.

[0282] Calderhead, D. M., J. E. Buhlmann, et al. (1993). "Cloning of mouse OX40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions." J Immunol 151(10) :5261-71.

[0283] Cheung, T. C., I. R. Humphreys, et al. (2005). "Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 102(37) :13218-23.

[0284] Compagnon, D. M., L. C. Gonzalez, et al. (2005). "Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the btlA-hvEm complex." J Biol Chem.

[0285] Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." Cytokine Growth Factor Rev 14(3-4) :265-73.

[0286] Croft, M. (2005). "The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA." Trends Immunol 26(6) :292-4.

[0287] Evans, D. E., R. A. Prell, et al. (2001). "Engagement of OX40 enhances antigen-specific CD4(+) T cell mobilization/memory development and humoral immunity: comparison of alphaOX-40 with alphaCTLA-4." J Immunol 167(12) :6804-11.

[0288] Gadisseur, A. P., J. W. Gratama, et al. (1999). "Expression of T cell activation antigen CD134 (OX40) has no predictive value for the occurrence or response to therapy of acute graft-versus-host disease in partial T

cell-depleted bone marrow transplantation.” Bone Marrow Transplant 23(10) : 1013-7.

[0289] Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). “A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator.” Proc Natl Acad Sci USA 102(4) : 1116-21.

[0290] Gramaglia, I., A. Jember, et al. (2000). “The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion.” J Immunol 165(6) : 3043-50.

[0291] Gramaglia, I., A. D. Weinberg, et al. (1998). “Ox-40 ligand : a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses.” J Immunol 161(12) : 6510-7.

[0292] Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). “CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.” Annu Rev Immunol 16 : 111-35.

[0293] Higgins, L. M., S. A. McDonald, et al. (1999). “Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction : amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein.” J Immunol 162(1) : 486-93.

[0294] Huber, H., S. D. Douglas, et al. (1971). “IgG subclass specificity of human monocyte receptor sites.” Nature 229(5284) : 419-20.

[0295] Humphreys, I. R., G. Walzl, et al. (2003). “A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection.” J Exp Med 198(8) : 1237-42.

[0296] Imura, A., T. Hori, et al. (1996). “The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells.” J Exp Med 183(5) : 2185-95.

[0297] Imura, A., T. Hori, et al. (1997). “OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells : implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration.” Blood 89(8) : 2951-8.

[0298] Ishida and Lonberg (2000). 11th Antibody Engineering Meeting.

[0299] Kabat, e. a. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. Fifth Edition.

[0300] Kaleeba, J. A., H. Offner, et al. (1998). “The OX-40 receptor provides a potent co-stimulatory signal capable of inducing encephalitogenicity in myelin-specific CD4+ T cells.” Int Immunol 10(4) : 453-61.

[0301] Kjaergaard, J., J. Tanaka, et al. (2000). “Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth.” Cancer Res 60(19) : 5514-21.

- [0302] Kotani, A., T. Ishikawa, et al. (2001). "Correlation of peripheral blood OX40⁺(CD134⁺) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Blood 98(10) : 3162-4.
- [0303] Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2002). "Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin." Nat Biotechnol 20(9) : 889-94.
- [0304] Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2004). "Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle." Nat Genet 36(7) : 775-80.
- [0305] Lane, P. (2000). "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper(Th)1 and Th2 cells." J Exp Med 191(2) : 201-6.
- [0306] Latza, U., H. Durkop, et al. (1994). "The human OX40 homolog: cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen." Eur J Immunol 24(3) : 677-83.
- [0307] Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." J Exp Med 173(3) : 721-30.
- [0308] Linton, P. J., B. Bautista, et al. (2003). "Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo." J Exp Med 197(7) : 875-83.
- [0309] Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptors super families: integrating mammalian biology." Cell 104(4) : 487-501.
- [0310] Lonberg, N. and D. Huszar (1995). "Human antibodies from transgenic mice." Int Rev Immunol 13(1) : 65-93.
- [0311] Ma, B. Y., S. A. Mikolajczak, et al. (2005). "The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells." Blood 106(6) : 2002-10.
- [0312] Mallett, S., S. Fossum, et al. (1990). "Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor." Embo J 9(4) : 1063-8.
- [0313] Maxwell, J. R., C. Ruby, et al. (2002). "Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity." J Immunol 168(9) : 4372-81.
- [0314] Maxwell, J. R., A. Weinberg, et al. (2000). "Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion." J Immunol 164(1) : 107-12.
- [0315] Pakala, S. V., P. Bansal-Pakala, et al. (2004). "Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions." Eur J

Immunol 34(11) :3039-46.

[0316] Paterson, D. J., W.A. Jefferies. et al. (1987). "Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4positive T blasts." Mol Immunol 24(12) :1281-90.

[0317] Rogers, P. R. and M. Croft (2000). "CD28, OX-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." J Immunol 164(6) :2955-63.

[0318] Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." Immunity 15(3) :445-55.

[0319] Salek-Ardakani, S. and M. Croft (2005). "Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134)." Vaccine.

[0320] Sanchez, J., J. Casano, et al. (2004). "Kinetic of regulatory CD25high and activated CD134+(OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." Br J Haematol 126(5) :697-703.

[0321] Sedy, J. R., M. Gavrieli. et al. (2005). "B and T lymphocyte interaction regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol 6(1) :90-8.

[0322] Seko, Y., N. Takahashi, et al. (1999). "Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L, and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3." J Pathol 188(4) :423-30.

[0323] Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol 2(2) :116-26.

[0324] Stuber, E., M. Neurath, et al. (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells." Immunity 2(5) :507-21.

[0325] Sugamura, K., N. Ishii, et al. (2004). "Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40." Nat Rev Immunol 4(6) :420-31.

[0326] Takasawa, N., N. Ishii, et al. (2001). "Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones." Jpn J Cancer Res 92(4) :377-82.

[0327] Tanaka, T., F. Kitamura, et al. (1993). "Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice." J Exp Med 178(3) :1103-7.

[0328] Taylor, L., M. Bachler, et al. (2002). "In vitro and in vivo activities of OX40 (CD134)-IgG fusion protein isoforms with different levels of immune-effector functions." J Leukoc Biol 72(3) :522-9.

[0329] Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation

pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." Proc Natl Acad Sci USA 86(4):1333-7.

[0330] Tittle, T. V., A. D. Weinberg, et al. (1997). "Expression of the T-cell activation antigen, OX-40, identifies alloreactive T cells in acute graft-versus-host disease." Blood 89(12):4652-8.

[0331] Totsuka, T., T. Kanai, et al. (2003). "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- α MAbs in a murine model of chronic colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284(4):G595-603.

[0332] Tsukada, N., H. Akiba, et al. (2000). "Blockade of CD134(OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation." Blood 95(7):2434-9.

[0333] Ukyo, N., T. Hori, et al. (2003). "Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response." Immunology 109(2):226-31.

[0334] Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXCR4 chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers." J Exp Med 190(8):1115-22.

[0335] Watanabe, T., J. Masuyama, et al. (2006). "CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4⁺ regulatory T cells." Clin Immunol 120:247-259.

[0336] Weatherill, A. R., J. R. Maxwell, et al. (2001). "OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells in vivo." Cell Immunol 209(1):63-75.

[0337] Weinberg, A. D. (2002). "OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines." Trends Immunol 23(2):102-9.

[0338] Weinberg, A. D., M. Lemon, et al. (1996). "OX-40 antibody enhances for autoantigen specific V β 8.2⁺ T cells within the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci Res 43(1):42-9.

[0339] Weinberg, A. D., K. W. Wegmann, et al. (1999). "Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol 162(3):1818-26.

[0340] Zingoni, A., T. Sornasse, et al. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." J Immunol 173(6):3716-24.

[0341] WO 95/12673 WO 95/21251.

序列表

<110>KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA

KATO, SHINICHIRO

SOLOFF NUGENT, RACHEL

YOSHIDA, HITISHI

CROFT, MICHAEL

<120> 人单克隆抗体人 CD134 (OX40) 及其制备方法和应用

<130>021286-0368858

<140>TO BE ASSIGNED

<141>HEREWITH

<150>PCT/US2006/045522

<151>2006-11-27

<150>60/739, 659

<151>2005-11-25

<160>54

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1302

<212>DNA

<213> 智人

<400>1

atgtgcgtgg gggctcggcg gctgggccgc gggccgtgtg cggctctgct cctcctgggc	60
ctggggctga gcaccgtgac ggggctccac tgtgtcgggg acacctaccc cagcaacgac	120
cgggtgctgcc acgagtgcag gccaggcaac gggatggtga gccgctgcag ccgctcccag	180
aacacggtgt gccgtccgtg cgggccgggc ttctacaacg acgtggtcag ctccaagccg	240
tgaagccct gcacgtggtg taacctcaga agtgggagtg agcggaagca gctgtgcacg	300
gccacacagg acacagtctg ccgctgccgg gggggcaccc agcccctgga cagctacaag	360
cctggagttg actgtgcccc ctgccctcca gggcacttct ccccaggcga caaccaggcc	420
tgaagccct ggaccaactg caccttggct gggaagcaca ccctgcagcc ggccagcaat	480

```

agctcggacg caatctgtga ggacagggac cccccagcca cgcagcccca ggagacccag 540
ggccccccgg ccaggeccat cactgtccag cccactgaag cctggcccag aacctcacag 600
ggaccctcca gatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 660
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 720
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 780
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 840
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 900
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 960
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1020
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1080
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1140
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1200
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1260
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1302

```

<210>2

<211>433

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
           20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
           35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
           50           55           60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65           70           75           80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
           85           90           95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
           100          105          110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
           115          120          125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp

```

130	135	140	
Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn			
145	150	155	160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro			
	165	170	175
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr			
	180	185	190
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Arg Ser Cys Asp Lys			
	195	200	205
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	210	215	220
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
225	230	235	240
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	245	250	255
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	260	265	270
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	275	280	285
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	290	295	300
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
305	310	315	320
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	325	330	335
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	340	345	350
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	355	360	365
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	370	375	380
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
385	390	395	400
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	405	410	415
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	420	425	430
Lys			

<210>3

<211>420

<212>DNA

<213> 智人

<400>3

atggagtgagg	ggccgtgctg	ggttttcctt	gttgttat	tagaagggtg	ccagtgtggg	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcttg	gtacagcctg	gggggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	cttcagtagc	tatagcatga	actgggtccg	ccaggctcca	180
gggaaggggc	tggagtgggt	ttcatacatt	agtagtagta	gtagtaccat	atactatgca	240
gactctgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatg	ccaagaactc	actgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagaga	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgagag	aggagtgtat	360
cacaatggct	ggtccttctt	tgactactgg	ggccagggaa	ccctactcac	cgtctcctca	420

<210>4

<211>390

<212>DNA

<213> 智人

<400>4

atggacatga	gggtcctcgc	tcagctcctg	gggtcctcgc	tgctctgttt	cccaggtgcc	60
agatgtgaca	tccagatgac	ccagtcacca	tcctcactgt	ctgcatctgt	aggaaacaga	120
gtcaccatta	cttgctgggc	gagtcaggat	attagcagct	ggtagcctg	gtatcagcag	180
aaaccagaga	aagcccctaa	gtccctgac	tatgctgcat	ccagtttgca	aagtggggtc	240
ccatcaaggt	tcagcggcag	tggatctggg	acagatttca	ctctcaccat	cagcagcctg	300
cagcctgaag	attttgcaac	ttattactgc	caacagtata	atagttaccc	cctcaccttc	360
ggccaaggga	cacgactgga	gattaaacga				390

<210>5

<211>423

<212>DNA

<213> 智人

<400>5

atggacacac	tttgctccac	gtcctgctg	ctgaccatcc	cttcattgggt	cttgctccag	60
atcaccttga	aggagtctgg	tcctacgcta	gtgaagccca	aacagaccct	cacgtgacc	120
tgcaccttct	ctggattctc	actcagcact	agtggaaatgg	gtgtgggctg	gatccgtcag	180
cccccaggaa	aggccctgga	gtggcttgca	gtcatattatt	gggatgatca	tcaactctac	240
agtccatctc	tgaagagcag	gtccaccatc	accaaggaca	cctccaaaaa	ccaggtggtc	300

	115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser			
130	135	140	

<210>8

<211>130

<212>PRT

<213> 智人

<400>8

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys			
1	5	10	15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser			
20	25	30	
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asn Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser			
35	40	45	
Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys			
50	55	60	
Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val			
65	70	75	80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
85	90	95	
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
100	105	110	
Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile			
115	120	125	
Lys Arg			
130			

<210>9

<211>141

<212>PRT

<213> 智人

<400>9

Met Asp Thr Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Trp			
1	5	10	15

Val	Leu	Ser	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Lys
			20					25						30	
Pro	Lys	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
		35						40					45		
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
	50					55						60			
Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Val	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	His	Gln	Leu	Tyr
65					70					75					80
Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys
				85						90				95	
Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala
			100						105					110	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	His	Arg	Arg	Gly	Ala	Phe	Gln	His	Trp	Gly	Gln
		115						120					125		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly			
	130						135					140			

 $\langle 400 \rangle_{10}$

Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
			20						25					30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
			35						40					45	
Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
	50						55					60			
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
65						70					75				80
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				85						90					95
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
			100						105					110	
Asp	Ser	Ser	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			115					120						125	

Thr

<210>11

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>11

ctaatacgac tcactatagg gc

22

<210>12

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>12

tcttggtccac cttggtgttg ctgggcttgt g

31

<210>13

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>13

aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc

30

<210>14

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>14

gtaaaacgac ggccagtg

18

<210>15

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>15

caggaaacag ctatgac

17

<210>16

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>16

gagagagaga gctagctgag gagacggtga ccagggt

37

<210>17

<211>41

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>17

agagagagag gtcgaccacc atggacacac tttgctccac g

41

<210>18

<211>42

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>18

agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgagct tc

42

<210>19

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>19

agagagagag cgtacgtttg atctccacct tggtcacctcc

40

<210>20

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>20

gctggagggc acggtcacca cgctg

25

<210>21

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>21

gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc

26

<210>22

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>22

accgtgtcga ctggattcca aggcatttcc ac

32

<210>23

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>23

ggtgctagct gaggagacgg tgac

24

<210>24

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>24

aatcaagatc tgtcaggaca ca

22

<210>25

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>25

tatcccgtag gtttaatctc cagtcgtgtc

30

<210>26

<211>41

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>26

agagagagag gtcgaccacc atggacacac ttgctccac g

41

<210>27

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>27

agagagagag gctagctgaa gagacggtga ccattgt

37

<210>28

<211>41

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>28

agagagagag gtcgaccacc atggaaaccc cagcgcagct t

41

<210>29

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>29

agagagagag cgtacgtttg atttccacct tggtccttg

40

<210>30

<211>41

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>30

agagagagag gtcgaccacc atggacacac tttgctccac g

41

<210>31

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>31

agagagagag gctagctgaa gagacggtga ccattgt

37

<210>32

<211>42

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>32

agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc 42

<210>33

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>33

agagagagag cgtacgtttg atttccacct tggccccctg 40

<210>34

<211>41

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>34

agagagagag gtcgaccacc atgaccatga ttacgccaaag c 41

<210>35

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>35

gagagagaga gctagctgag gagacggtga ccagggt 37

<210>36

<211>42

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>36

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct tc

42

<210>37

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>37

agagagagag cgtacgttta atctccagtc gtgtcccttg

40

<210>38

<211>408

<212>DNA

<213> 智人

<400>38

atggacacac tttgctccac gctcctgctg ctgaccatcc cttcatgggt cttgtcccag	60
atcaccttga aggagtctgg tectacgctg gtgaaacca cacagaccct cacgctgtcc	120
tgcaccttct ctgggttctc actcagcact agtggagtgg gtgtgggctg gatccgtcag	180
ccccaggaa aggccctgga atggcttgca ctcatcatt gggatgatgc tgagcgtac	240
agtccatctc tgaagagcag gtcaccatc accaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc	300
cttacaatga ccaacatgga ctttgtggac acagccacat attactgtgc acacacccgg	360
ggggcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca	408

<210>39

<211>381

<212>DNA

<213> 智人

<400>39

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccatc	120
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagcttct tagcctggta ccaacagaaa	180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattta gcagggccac tggcatccca	240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gctcacggac gttcggccag	360
gggaccaagg tggaaatcaa a	381

<210>40

<211>408

<212>DNA

<213> 智人

<400>40

atggacacac ttigtctcac gctcctgctg ctgaccatcc cttcatgggt cttgtcccag	60
atcaccttga aggagtctgg tcttacgctg gtgaaacca cacagaccct cacgctgacc	120
tgcaccttct ctggattctc actcagcact agtggagtgg gtgtgggctg gatccgtcag	180
ccccaggaa aggccctgga gtggcttgca ctcatattatt gggatgatca tagcccctac	240
agcccatctc tgaagagcag gctcaccatc accaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc	300
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacat attactgtgc acgcacccgg	360
ggggcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca	408

<210>41

<211>401

<212>DNA

<213> 智人

<400>41

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaatttgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca ggggttagc agctacttag cctggtagca gcagaaacct	180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	240
aggttcagtg gcagtgggcc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcacccgac gttcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat c	401

<210>42

<211>462

<212>DNA

<213> 智人

<400>42

atgaccatga ttacgccaag cttggtaccg agctcggatc cactagtaac ggccgccagt	60
gtgctggaat tcgcccttct aatacgactc actatagggc aagcagtggg atcaacgcag	120
agtacggggg gaggcttggt acagcctggc aggtccctga gactctcctg tgcagcctct	180
ggattcaccc ttgatgatta tggcatgcac tgggtccggc aagctccagg gaagggcctg	240
gagtgggtct caggtattag ttggaatagt gatagtatag gctatgtgga ctctgtgaag	300
ggccgattca ccatctccag agacaacgcc aagaactccc tgtatctgca aatgaacagt	360
ctgagagttg aggacacggc cttgtattac tgtgtaaaag atattagtgg ctggtacagc	420
tttgactact ggggccaggg aaccctgggc accgtctcct ca	462

<210>43

<211>381

<212>DNA

<213> 智人

<400>43

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa	360
gggacacgac tggagattaa a	381

<210>44

<211>136

<212>PRT

<213> 智人

<400>44

Met Asp Thr Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Trp

1

5

10

15

Val	Leu	Ser	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Lys
Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
Ser	Thr	Ser	Gly	Val	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	His	Trp	Asp	Asp	Ala	Glu	Arg	Tyr
Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys
Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Leu	Val	Asp	Thr	Ala
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	His	Thr	Arg	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln
Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser								

<210>45

<211>127

<212>PRT

<213> 智人

<400>45

Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
Val	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Phe	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
Asp	Ser	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	

35	40	45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
50	55	60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala		
65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
85	90	95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser		
100	105	110
Asn Trp His Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
115	120	125

<210>48

<211>154

<212>PRT

<213> 智人

<400>48

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp Pro Leu Val		
1	5	10
Thr Ala Ala Ser Val Leu Glu Phe Ala Leu Leu Ile Arg Leu Thr Ile		
20	25	30
Gly Gln Ala Val Val Ser Thr Gln Ser Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln		
35	40	45
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu		
50	55	60
Asp Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
65	70	75
Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Val		
85	90	95
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		
100	105	110
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu		
115	120	125
Tyr Tyr Cys Val Lys Asp Ile Ser Gly Trp Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp		
130	135	140
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
145	150	

<210>49

<211>127

<212>PRT

<213> 智人

<400>49

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
           20           25           30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
           35           40           45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
           50           55           60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65           70           75           80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
           85           90           95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
           100          105          110
Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
           115          120          125

```

<210>50

<211>277

<212>PRT

<213> 智人

<400>50

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
           20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
           35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80
 Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95
 Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser
 195 200

<210>52

<211>17

<212>PRT

<213> 智人

<400>52

Arg Pro Ala Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 1 5 10 15
 Cys

<210>53

<211>16

<212>PRT

<213> 智人

<400>53

Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys
1 5 10 15

<210>54

<211>18

<212>PRT

<213> 智人

<400>54

Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala
1 5 10 15
Ile Cys

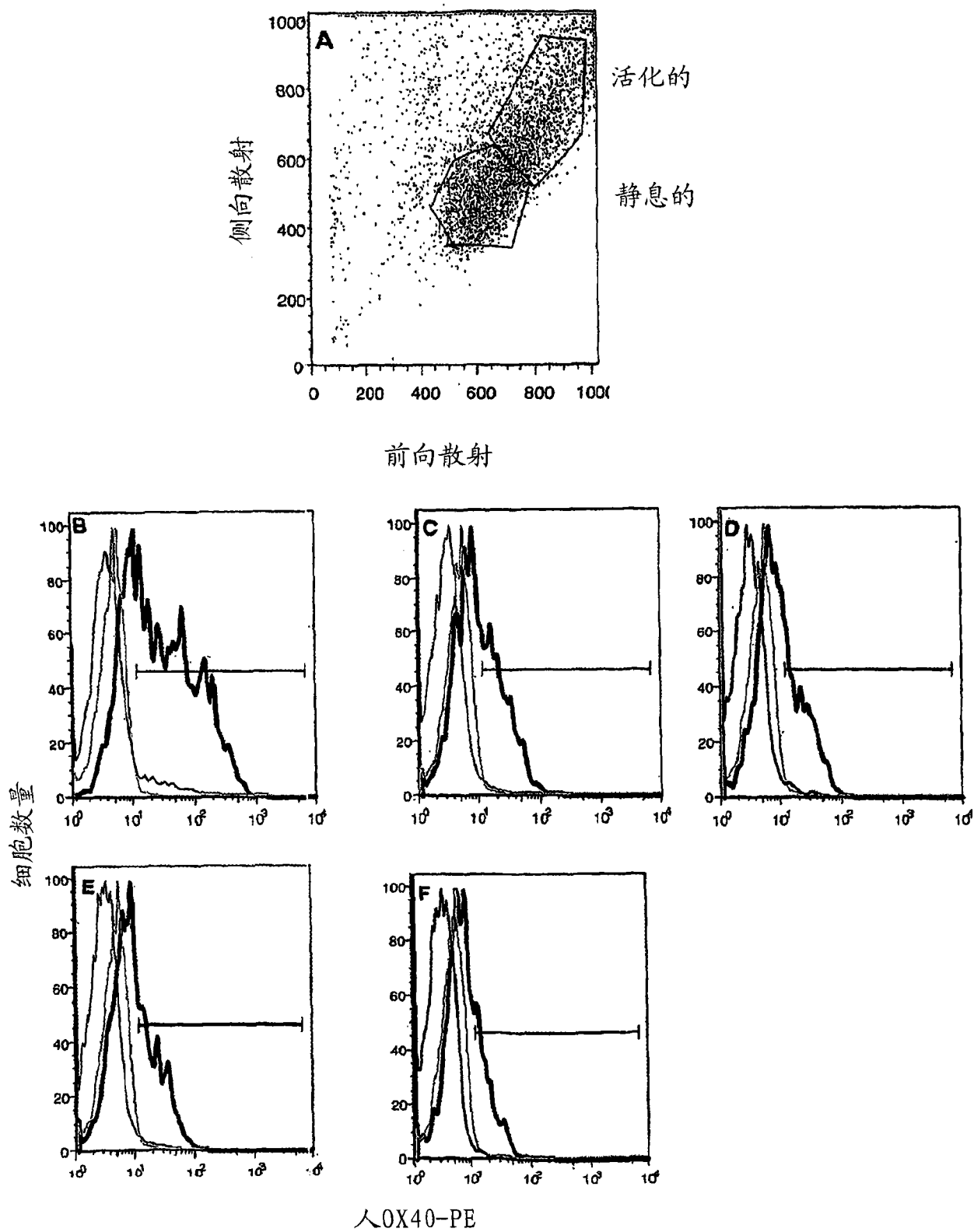


图 1

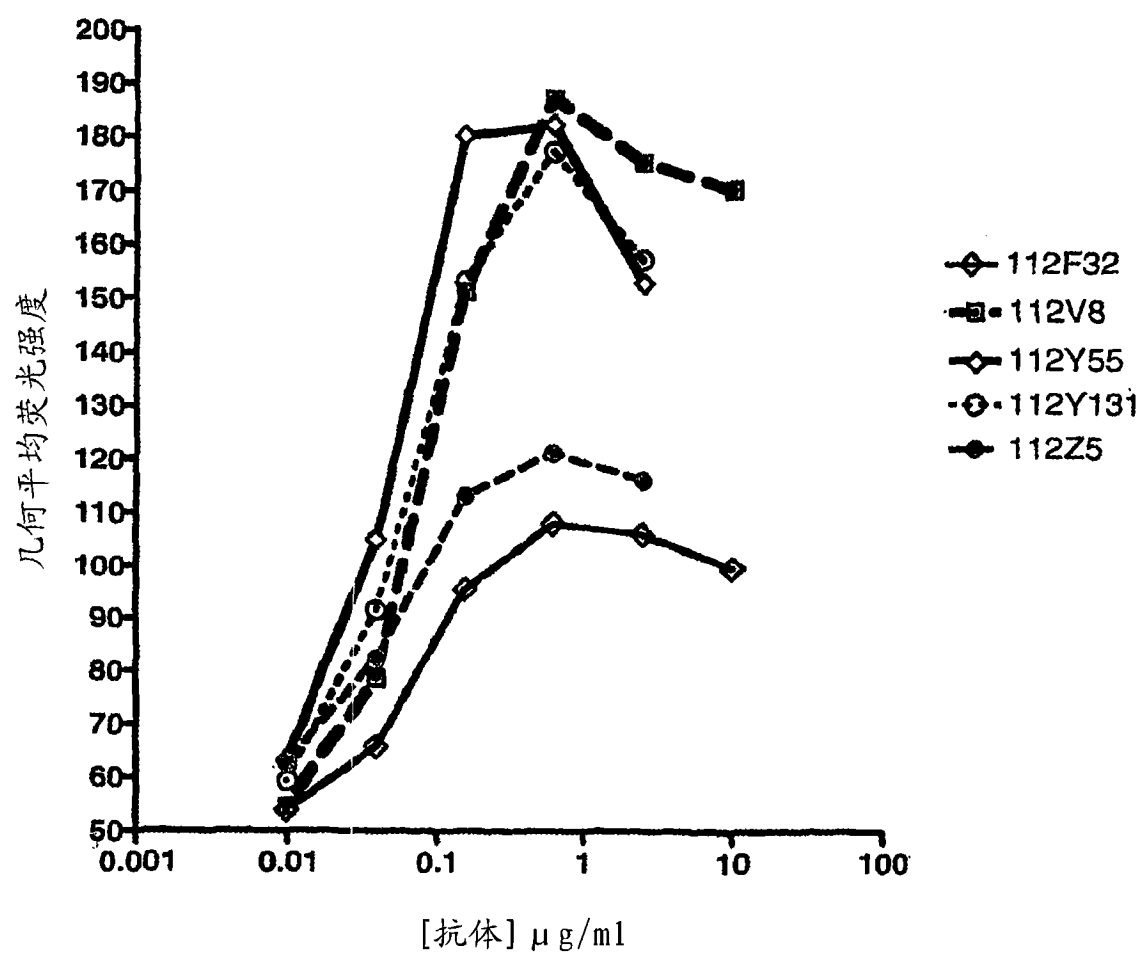


图 2

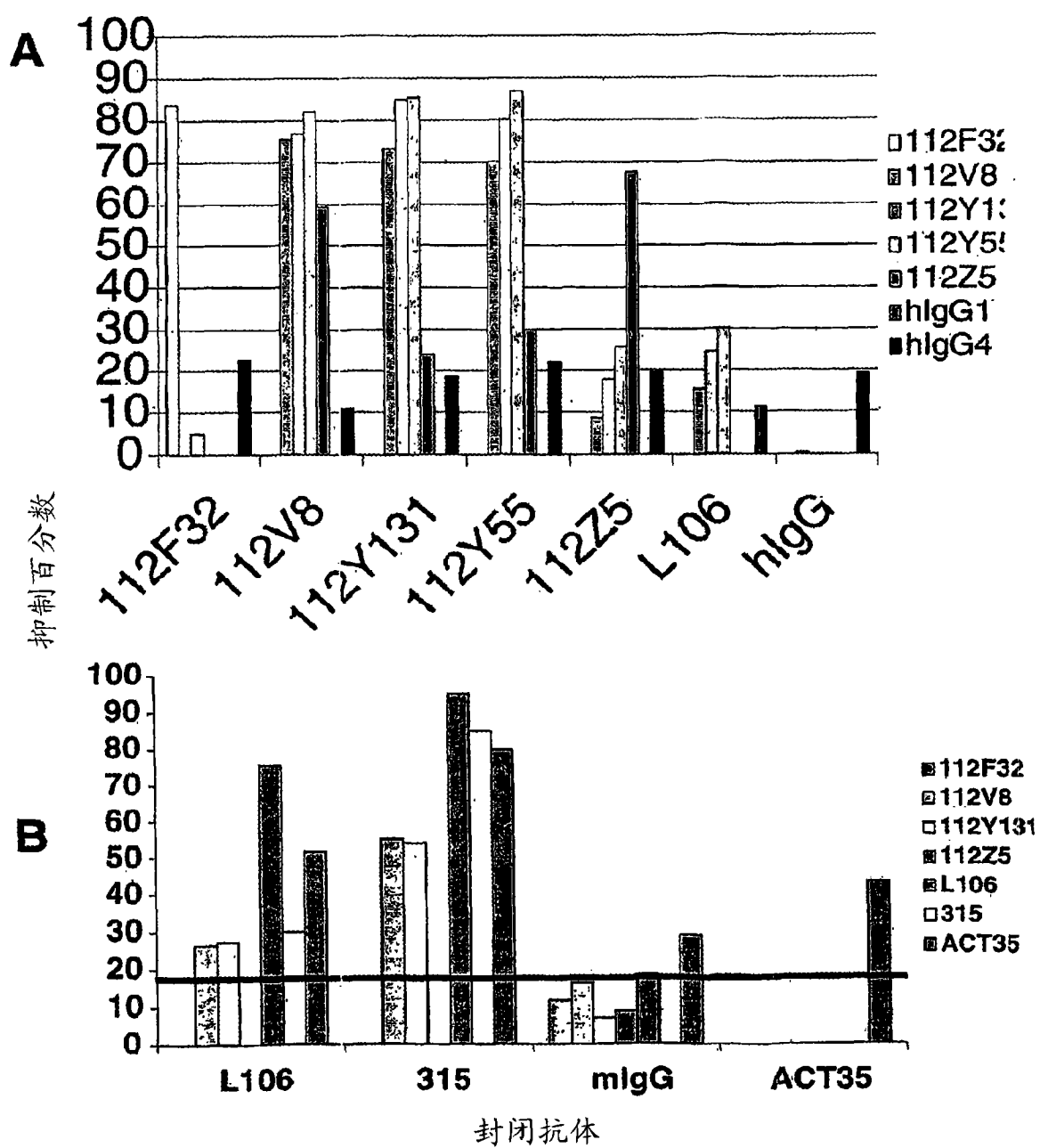


图 3

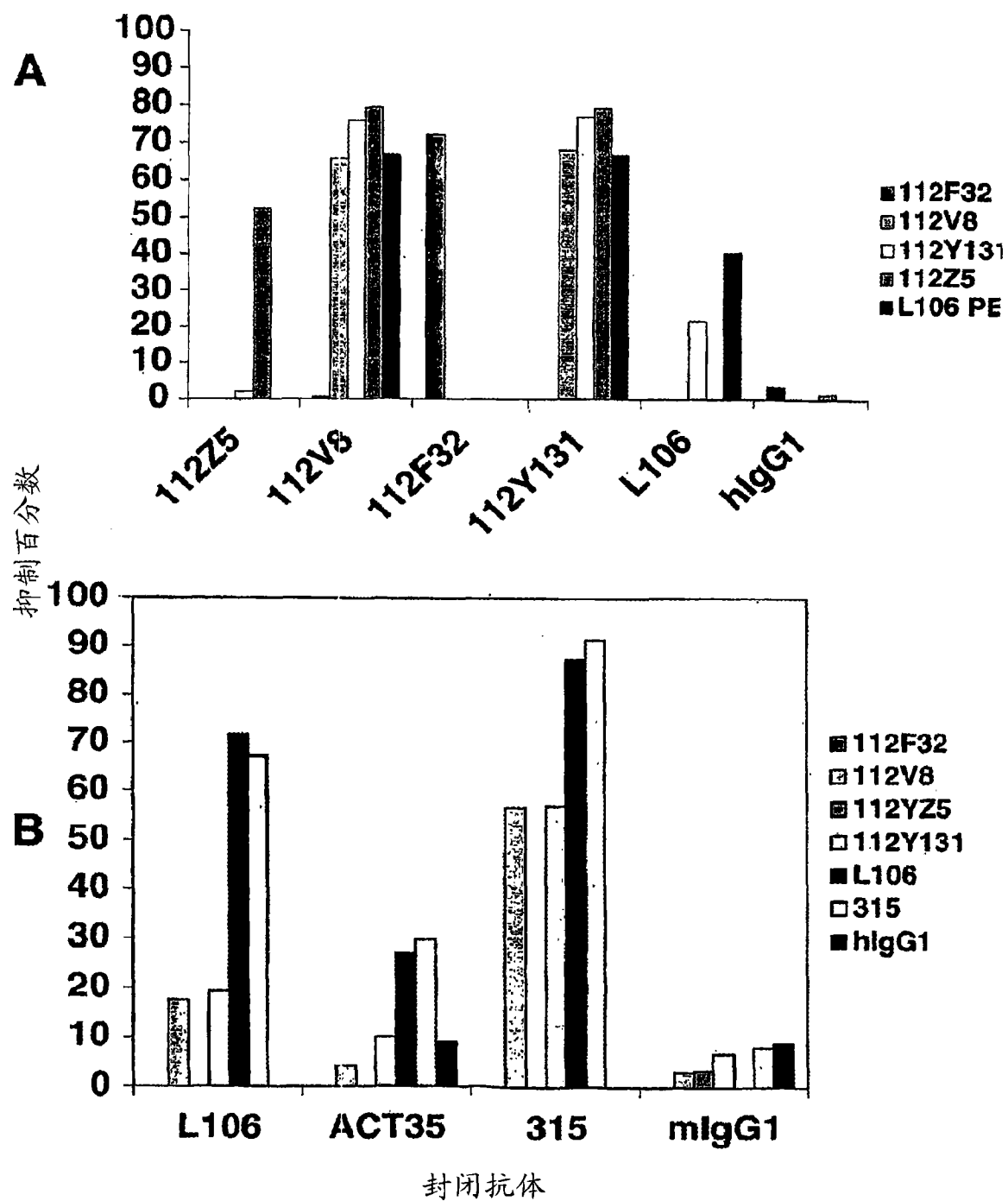


图 4

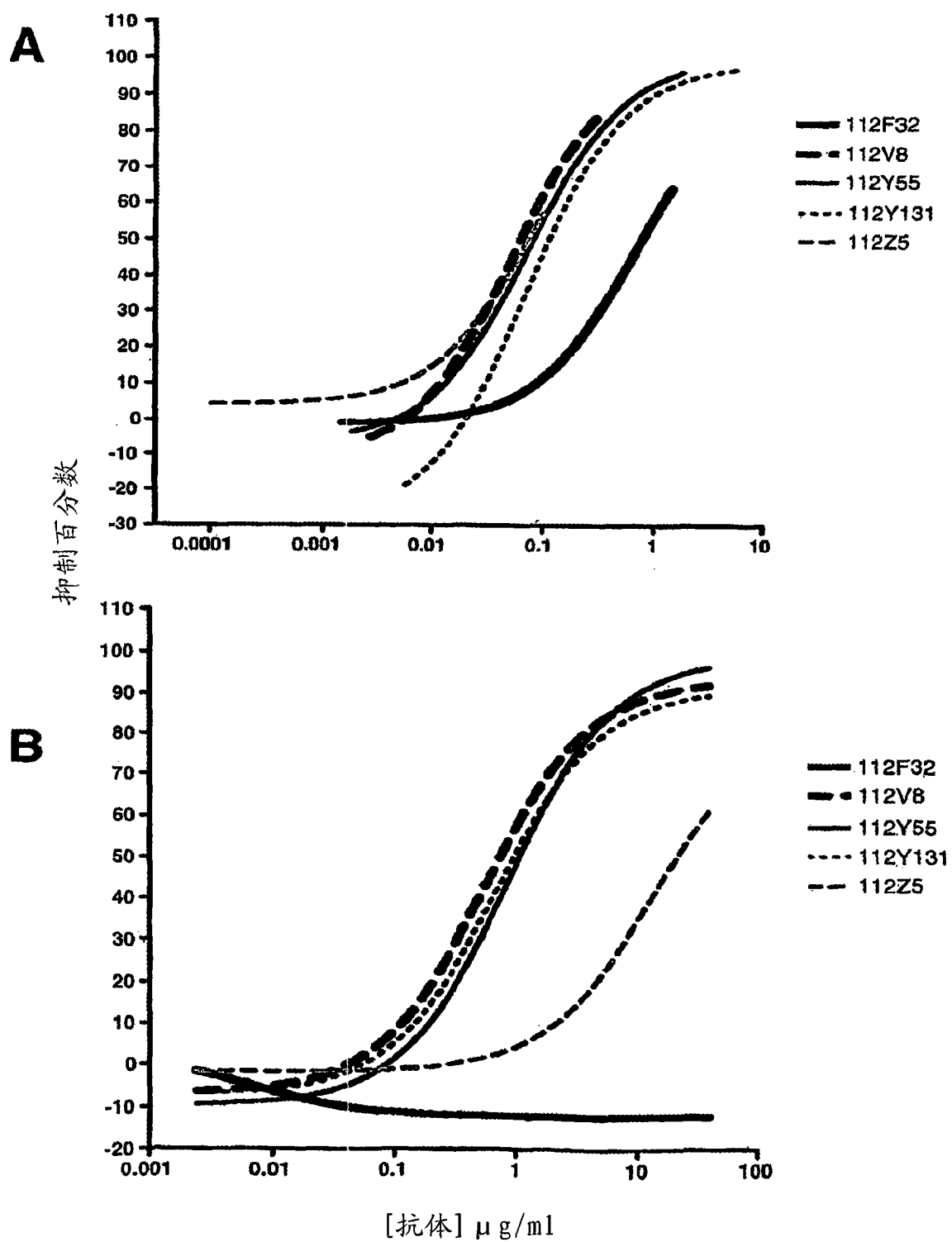


图 5

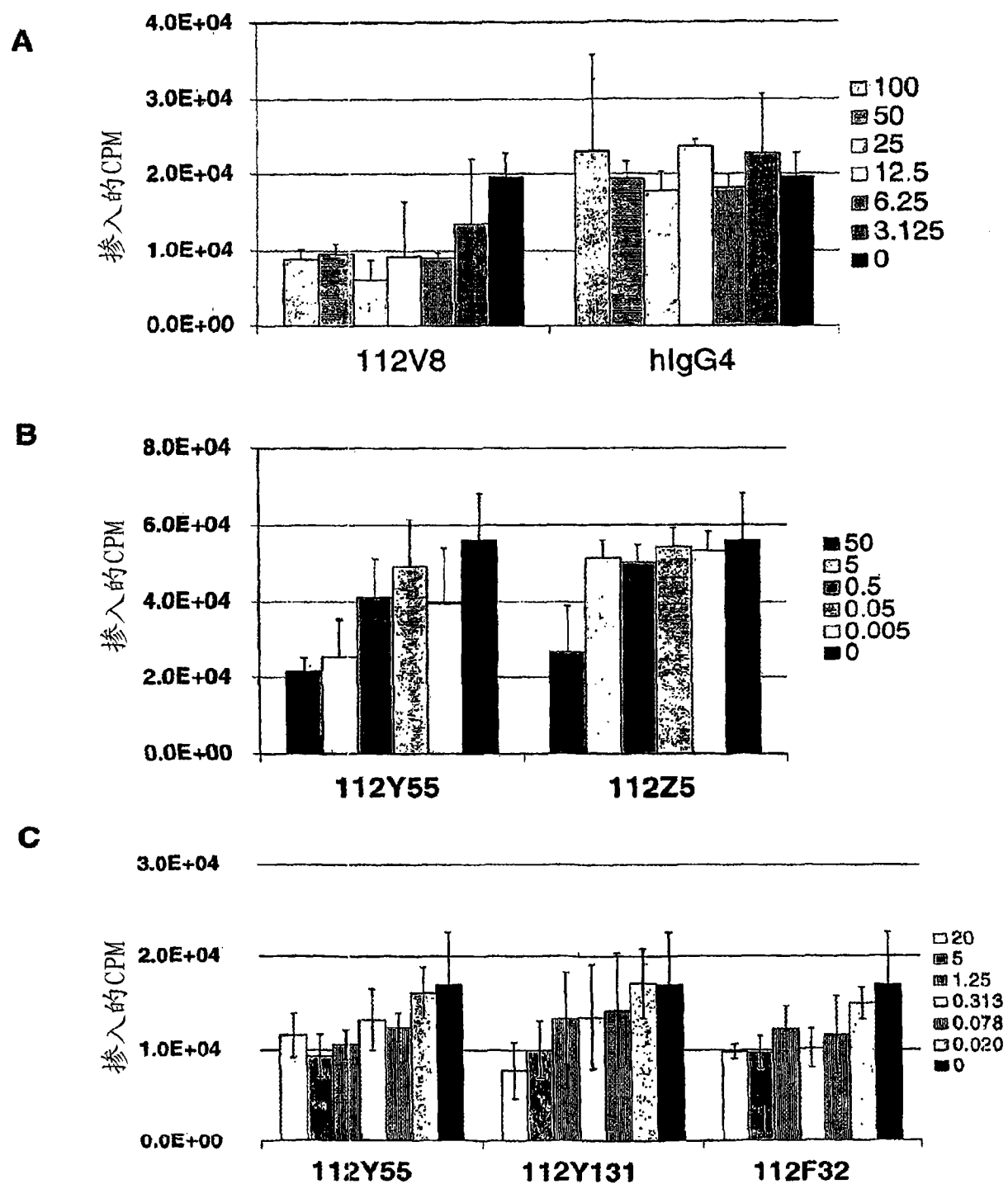
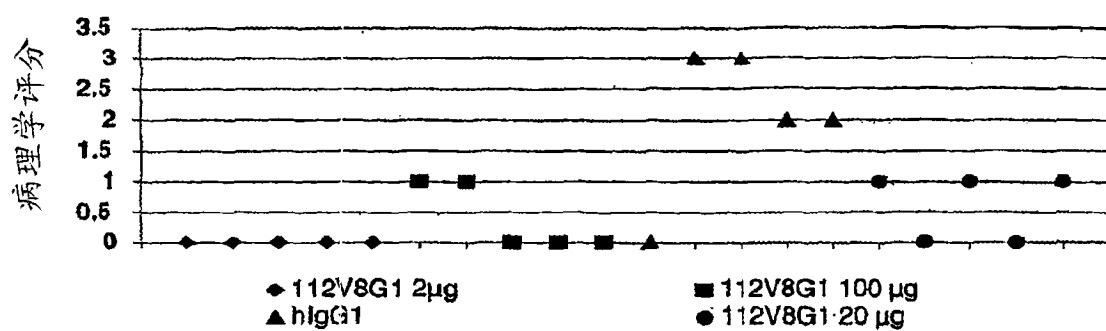
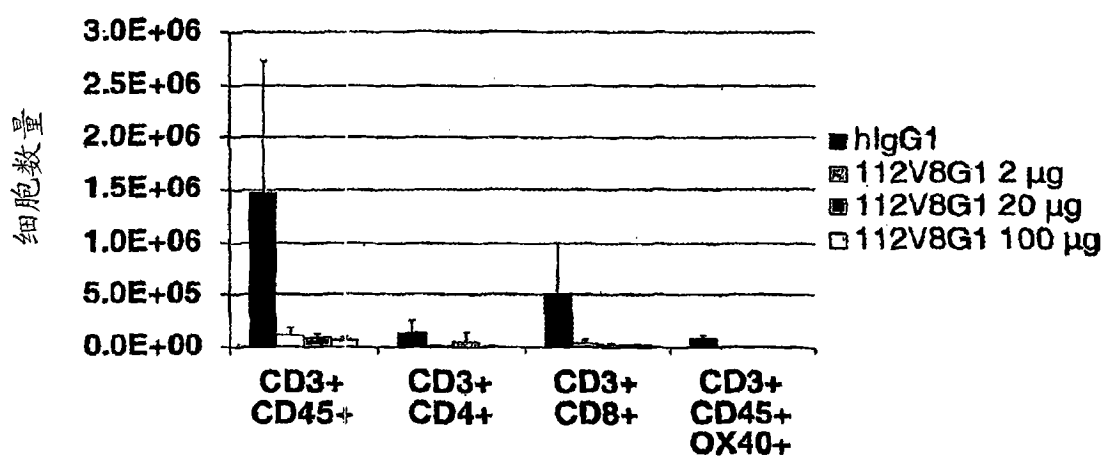


图 6

A.



B.



C.

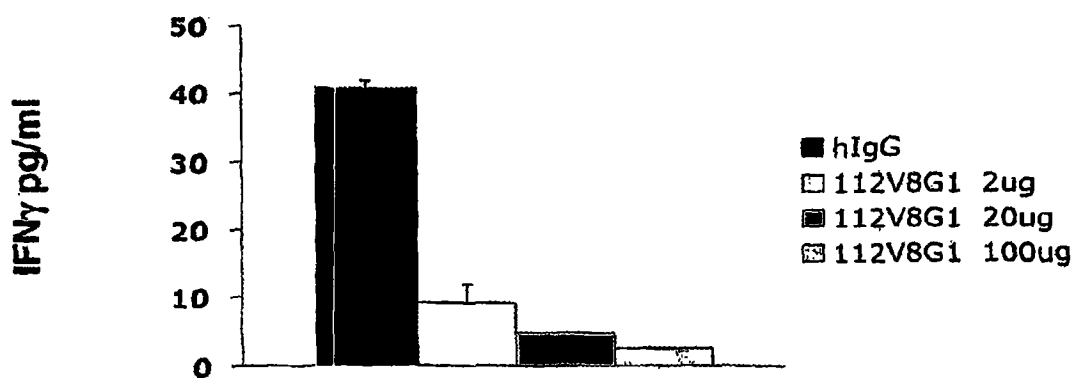


图 7

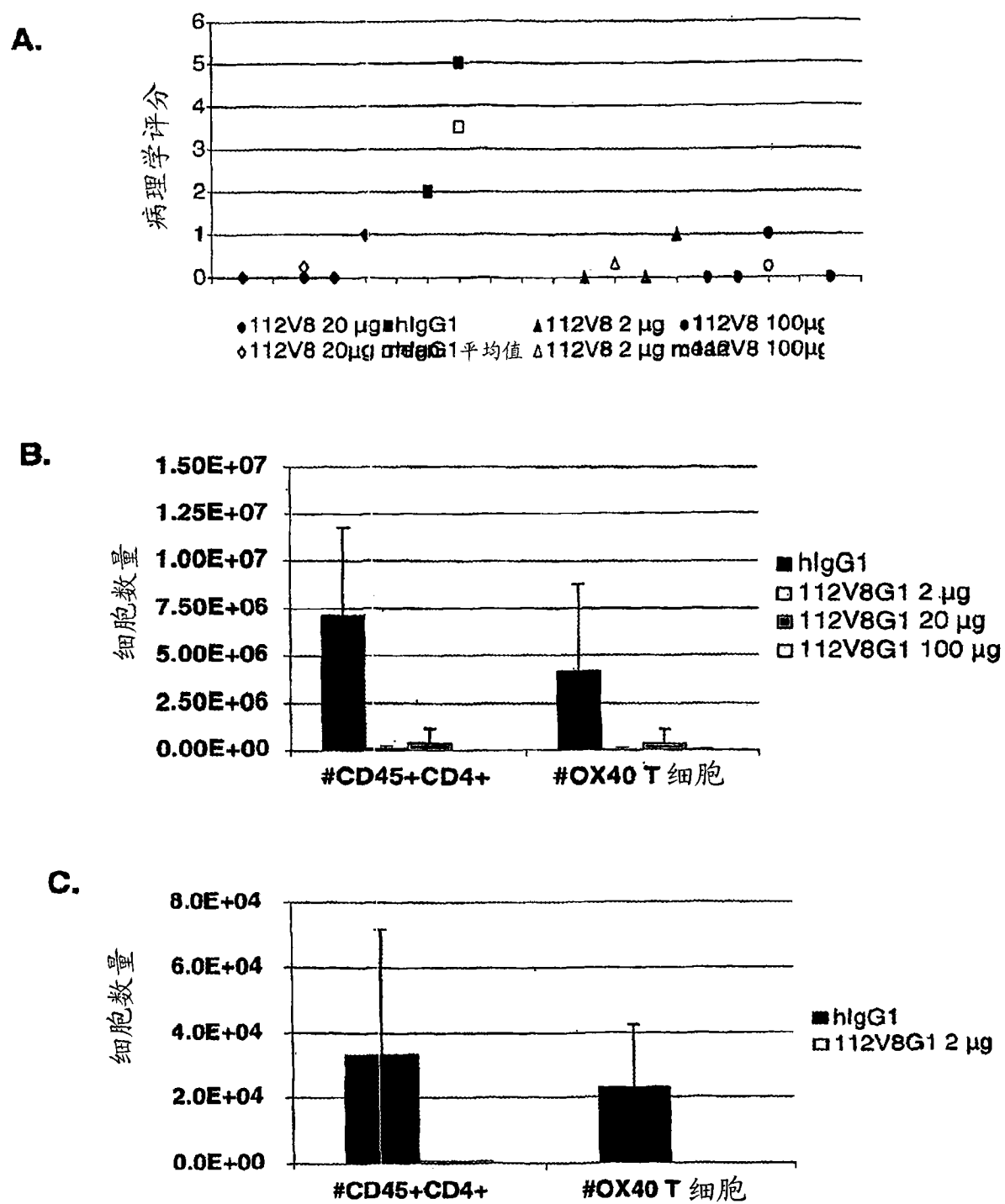


图 8

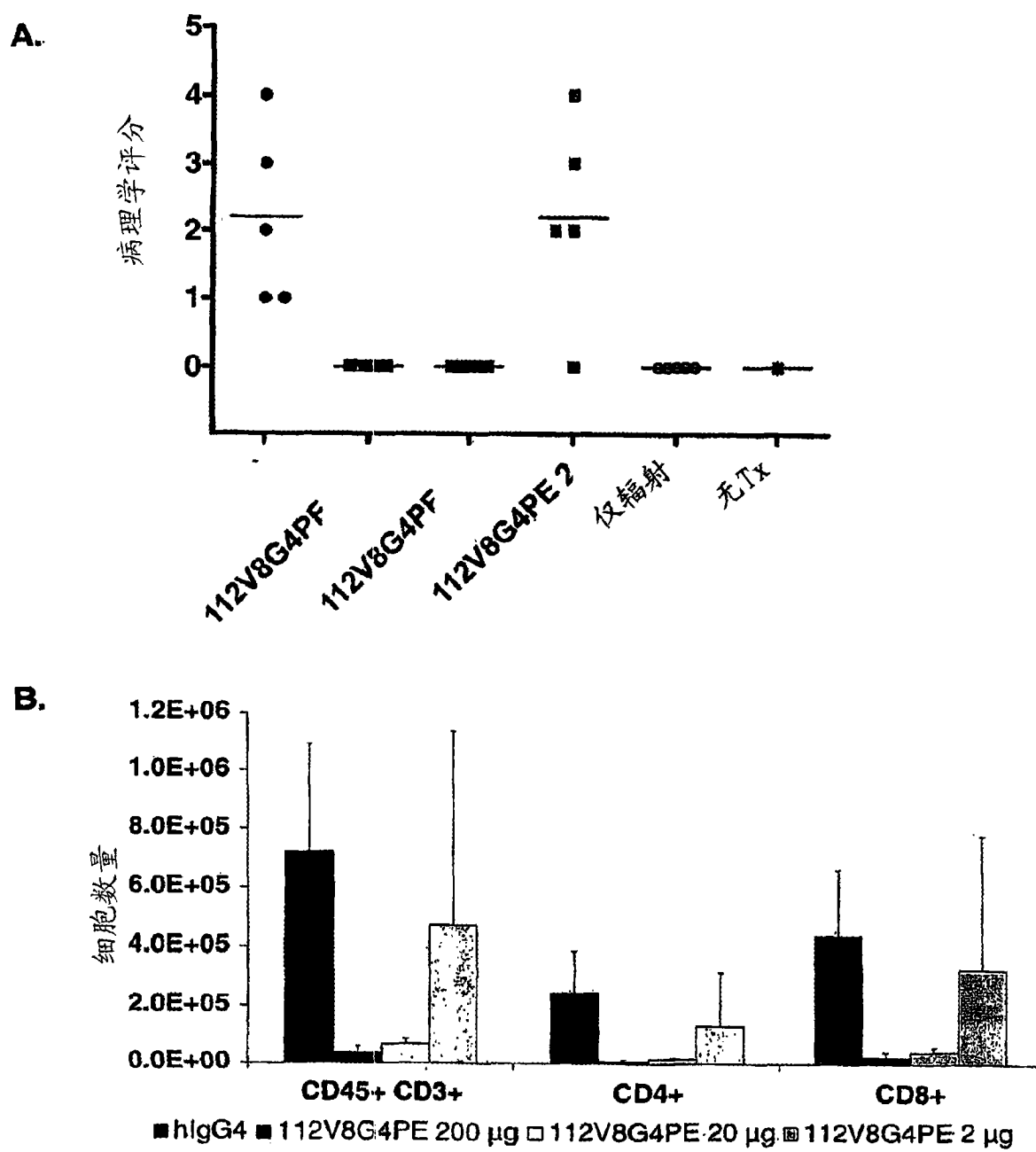


图 9

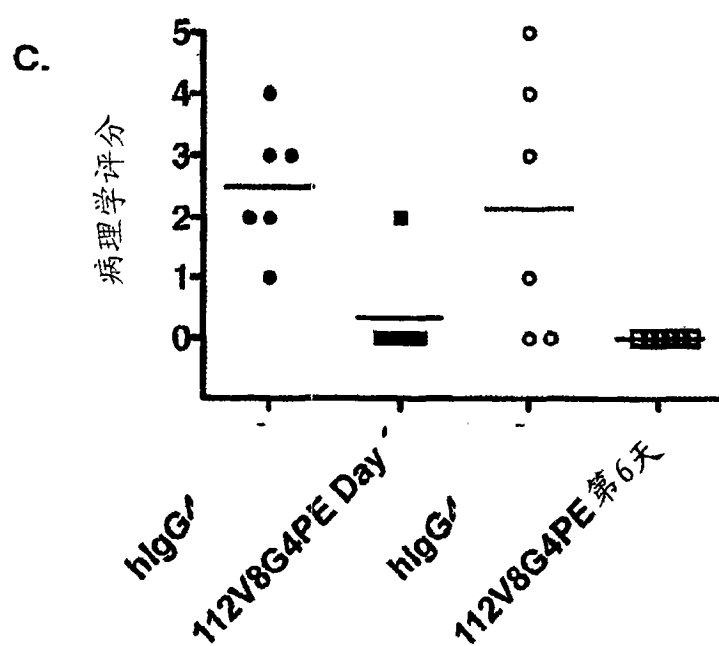


图 9

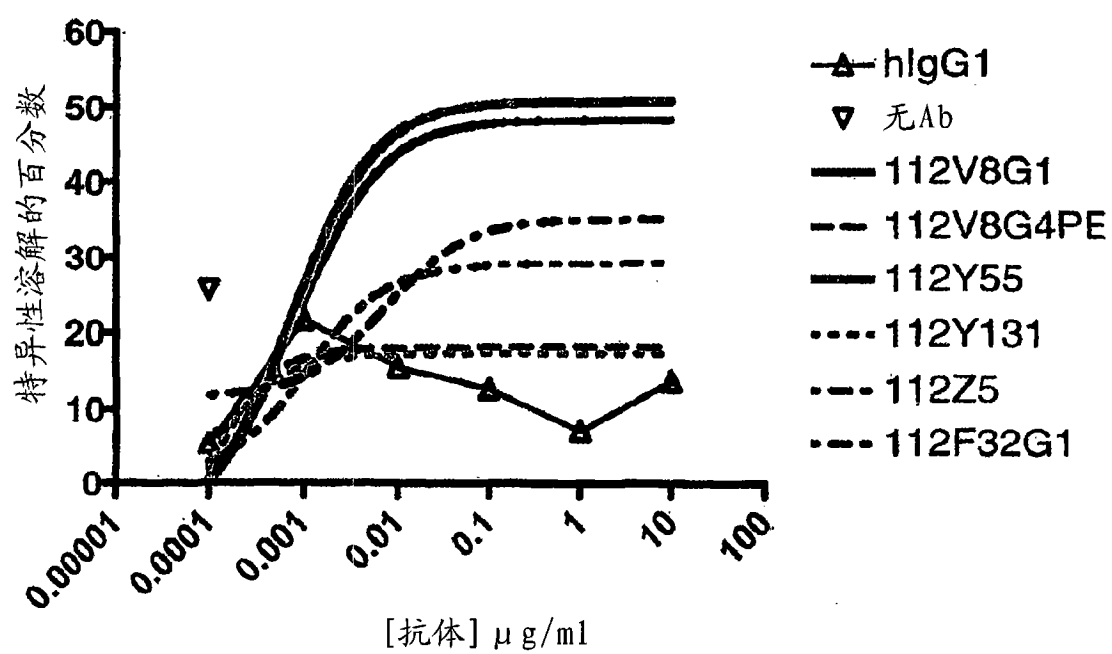


图 10