



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112566935 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 13

(21) 申请号 201980034638.8

(22) 申请日 2019.05.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112566935 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2018/088101 2018.05.23 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2019/088013 2019.05.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/223733 EN 2019.11.28

(73) 专利权人 百济神州有限公司

地址 英国开曼群岛大开曼岛卡玛纳海湾索
纳瑞斯大道94号

(72) 发明人 刘晔 张彤 王作白 李康

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101578296 A, 2009.11.11

CN 106604742 A, 2017.04.26

审查员 戎晓媛

权利要求书2页 说明书40页
序列表12页 附图15页

(54) 发明名称

抗OX40抗体和使用方法

(57) 摘要

本公开文本提供了与人OX40 (ACT35、CD134或TNFRSF4) 结合的抗体及其抗原结合片段、包含所述抗体的药物组合物以及所述抗体或所述组合物用于治疗疾病如癌症的用途。特别地, 本发明的抗OX40抗体不干扰OX40配体与其受体的结合。

1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与人OX40特异性地结合并且包含:

重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:(a)如SEQ ID NO:3所示的HCDR(重链互补决定区)1、(b)如SEQ ID NO:24所示的HCDR2和(c)如SEQ ID NO:5所示的HCDR3;所述轻链可变区包含:(d)如SEQ ID NO:25所示的LCDR(轻链互补决定区)1、(e)如SEQ ID NO:19所示的LCDR2和(f)如SEQ ID NO:8所示的LCDR3。

2. 权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

包含与SEQ ID NO:26至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区(VH),以及包含与SEQ ID NO:28至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

3. 权利要求2的抗体或其抗原结合片段,其中SEQ ID NO:26和/或28内的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸已被插入、缺失或取代。

4. 权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO:26的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:28的轻链可变区(VL)。

5. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人工程化抗体、单链抗体(scFv)、Fab片段、Fab'片段或F(ab')₂片段。

6. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其具有OX40激动剂活性。

7. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153至D170的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

8. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153、T154、I165、E167和D170的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

9. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153、I165和E167的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

10. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其在SEQ ID NO:30处或之内与人OX40结合。

11. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

12. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有减少的糖基化或无糖基化或被低岩藻糖基化。

13. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含增加的二等分GlcNac结构。

14. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的Fc结构域属于IgG1。

15. 权利要求1至4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的Fc结构域属于IgG4。

16. 权利要求15的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG4具有S228P取代(根据EU编号系统)。

17. 权利要求16的抗体或其抗原结合片段,其中所述IgG4具有S228P和R409K取代(根据EU编号系统)。

18. 权利要求1-4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其具有以下特性中的一种或多种:

- (i) 能够与cyno 0X40交叉反应;
- (ii) 不干扰0X40-0X40L相互作用;
- (iii) 能够共刺激T细胞产生IL-2;
- (iv) 能够共激活CD4⁺T细胞,如在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中所测量的;
- (v) 能够介导ADCC,如在基于乳酸脱氢酶 (LDH) 释放的ADCC测定中所测量的;
- (vi) 能够耗尽CD4⁺Treg;
- (vii) 能够增加CD8⁺Teff/Treg比率;或
- (viii) 能够在动物肿瘤模型中介导0X40相关肿瘤的部分消退。

19. 一种药物组合物,其包含权利要求1至18中任一项的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

20. 有效量的权利要求1至18中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗有此需要的患者的0X40相关癌症或降低0X40相关癌症的可能性的药物中的用途,其中所述0X40相关癌症是乳腺癌、头颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、皮肤癌、间皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或肉瘤。

21. 权利要求20的用途,其中将所述抗体或其抗原结合片段与另一种治疗剂组合给予。

22. 权利要求21的用途,其中所述治疗剂是紫杉醇或紫杉醇剂、多西他赛、卡铂、拓扑替康、顺铂、伊立替康、多柔比星、来那度胺或5-氮杂胞苷。

23. 权利要求22的用途,其中所述治疗剂是紫杉醇剂、来那度胺或5-氮杂胞苷。

24. 一种分离的核酸,其编码权利要求1至18中任一项的抗体或其抗原结合片段。

25. 一种载体,其包含权利要求24的核酸。

26. 一种宿主细胞,其包含权利要求24的核酸或权利要求25的载体。

27. 一种用于产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养权利要求26的宿主细胞并回收所述抗体或其抗原结合片段。

28. 一种诊断试剂,其包含经标记的权利要求1至18中任一项的抗体或其抗原结合片段。

29. 权利要求28的诊断试剂,其中所述标记选自放射性标记、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。

抗OX40抗体和使用方法

技术领域

[0001] 本文公开了与人OX40结合的抗体或其抗原结合片段、包含所述抗体的组合物以及用于治疗癌症的使用方法。

背景技术

[0002] OX40 (也称为ACT35、CD134或TNFRSF4) 是大约50KD的I型跨膜糖蛋白,并且是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的成员(Croft, 2010; Gough和Weinberg, 2009)。成熟的人OX40由249个氨基酸(AA)残基组成,具有37个AA的胞质尾区和185个AA的胞外区。OX40的胞外结构域含有三个完整的和一个不完整的富含半胱氨酸的结构域(CRD)。OX40的胞内结构域含有一个保守的信号传导相关QEE基序,其介导与包括TRAF2、TRAF3和TRAF5在内的几种TNFR相关因子(TRAF)的结合,从而使OX40与胞内激酶连接(Arch和Thompson, 1998; Willoughby等人, 2017)。

[0003] 最初在激活的大鼠CD4⁺T细胞上发现了OX40,随后从T细胞中克隆了鼠和人同源物(al-Shamkhani等人, 1996; Calderhead等人, 1993)。除了在激活的CD4⁺T细胞(包括T辅助(Th)1细胞、Th2细胞、Th17细胞以及调节性T(Treg)细胞)上表达外,还在激活的CD8⁺T细胞、自然杀伤(NK)T细胞、嗜中性粒细胞和NK细胞的表面上发现了OX40表达(Croft, 2010)。相比之下,在原初CD4⁺和CD8⁺T细胞上以及在大多数静息记忆T细胞上发现低OX40表达(Croft, 2010; Soroosh等人, 2007)。OX40在原初T细胞上的表面表达是短暂的。在TCR激活后,T细胞上的OX40表达在24小时内大大增加,并且峰值出现在2-3天内,持续5-6天(Gramaglia等人, 1998)。

[0004] OX40的配体(OX40L,也称为gp34、CD252或TNFSF4)是OX40的唯一配体。与其他TNFSF(肿瘤坏死因子超家族)成员相似,OX40L是II型糖蛋白,其含有183个AA,具有23个AA的胞内结构域和133个AA的胞外结构域(Croft, 2010; Gough和Weinberg, 2009)。OX40L在细胞表面上天然地形成同聚体三聚体复合物。所述配体三聚体与OX40的三个拷贝主要通过受体的CRD1、CRD2和部分CRD3区而不涉及CRD4在配体单体-单体界面处相互作用(Compaan和Hymowitz, 2006)。OX40L主要在激活的抗原呈递细胞(APC)上表达,所述激活的抗原呈递细胞包括激活的B细胞(Stuber等人, 1995)、成熟的常规树突细胞(DC)(Ohshima等人, 1997)、浆细胞样DC(pDC)(Ito等人, 2004)、巨噬细胞(Weinberg等人, 1999)和朗格汉斯细胞(Sato等人, 2002)。此外,已发现OX40L在其他细胞类型上表达,所述其他细胞类型是如NK细胞、肥大细胞、激活的T细胞亚群以及血管内皮细胞和平滑肌细胞(Croft, 2010; Croft等人, 2009)。

[0005] 经由通过三聚体OX40L而连接的OX40三聚作用或通过激动性抗体的二聚作用有助于适配体分子TRAF2、TRAF3和/或TRAF5募集和对接至其胞内QEE基序(Arch和Thompson, 1998; Willoughby等人, 2017)。TRAF2和TRAF3的募集和对接可以进一步导致经典NF- κ B1和非经典NF- κ B2途径二者的激活,所述途径在调节T细胞的存活、分化、扩增、细胞因子产生和效应子功能中起关键作用(Croft, 2010; Gramaglia等人, 1998; Huddleston等人, 2006;

Rogers等人,2001;Ruby和Weinberg,2009;Song等人,2005a;Song等人,2005b;Song等人,2008)。

[0006] 在正常组织中,OX40表达低并且主要在淋巴器官中的淋巴细胞上(Durkop等人,1995)。然而,在患有病理性病症(Redmond和Weinberg,2007)(如自身免疫性疾病(Carboni等人,2003;Jacquemin等人,2015;Szypowska等人,2014)和癌症(Kjaergaard等人,2000;Vetto等人,1997;Weinberg等人,2000))的动物模型和人类患者中都经常观察到免疫细胞上OX40表达的上调。值得注意的是,OX40的表达增加与患有结直肠癌和皮肤黑色素瘤的患者的生存期延长相关,并且与远处转移的发生和更晚期的肿瘤特征呈负相关(Ladanyi等人,2004;Petty等人,2002;Sarff等人,2008)。还已显示抗OX40抗体治疗可以在多种小鼠模型中引发抗肿瘤功效(Aspeslagh等人,2016),指示了OX40作为免疫治疗靶标的潜力。在由Curti等人进行的癌症患者的第一个临床试验中,用激动性抗OX40单克隆抗体观察到抗肿瘤功效和肿瘤特异性T细胞的激活的证据,指示OX40抗体可用于促进抗肿瘤T细胞反应(Curti等人,2013)。

[0007] 已在小鼠肿瘤模型中初步研究了激动性抗OX40抗体在介导抗肿瘤功效中的作用机制(Weinberg等人,2000)。直到最近,激动性抗OX40抗体在肿瘤中的作用机制归因于它们在效应T细胞中触发共刺激信号传导途径的能力、以及对Treg细胞的分化和功能的抑制作用(Aspeslagh等人,2016;Ito等人,2006;St Rose等人,2013;Voo等人,2013)。最近的研究已显示,在动物肿瘤模型和癌症患者中,肿瘤浸润的Treg表达OX40的水平都高于效应T细胞(CD4⁺和CD8⁺二者)和外周Treg(Lai等人,2016;Marabelle等人,2013b;Montler等人,2016;Soroosh等人,2007;Timperi等人,2016)。因此,抗OX40抗体触发抗肿瘤反应所凭借的二级作用依赖于它们在经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)耗尽肿瘤内OX40⁺Treg细胞中的Fc介导的效应子功能(Aspeslagh等人,2016;Bulliard等人,2014;Marabelle等人,2013a;Marabelle等人,2013b;Smyth等人,2014)。这项工作证明,具有Fc介导的效应子功能的激动性抗OX40抗体可以优先耗尽肿瘤内Treg并提高肿瘤微环境(TME)中CD8⁺效应T细胞与Treg的比率,从而导致抗肿瘤免疫反应改善、肿瘤消退增加以及生存期延长(Bulliard等人,2014;Carboni等人,2003;Jacquemin等人,2015;Marabelle等人,2013b)。基于这些发现,对于开发具有激动活性和Fc介导的效应子功能二者的激动性抗OX40抗体存在未满足的医学需求。

[0008] 迄今为止,临床中的激动性抗OX40抗体主要是阻断OX40-OX40L相互作用的配体竞争性抗体(例如WO 2016196228A1)。由于OX40-OX40L相互作用对于增强有效的抗肿瘤免疫至关重要,因此OX40-OX40L的阻断限制了这些配体竞争性抗体的功效。因此,与OX40特异地结合而不干扰OX40与OX40L相互作用的OX40激动剂抗体可用于治疗癌症和自身免疫性障碍。

发明内容

[0009] 本公开文本针对激活OX40并诱导免疫细胞中的信号传导从而促进抗肿瘤免疫的激动性抗OX40抗体及其抗原结合片段。

[0010] 在一个实施方案中,本公开文本提供了与人OX40结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一个方面,本公开文本的抗体不与OX40L竞争,或不干扰OX40与其配体OX40L的结

合。

[0011] 本公开文本包括以下实施方案。

[0012] 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与人OX40特异性地结合并且包含:(i)包含(a)SEQ ID NO:3的HCDR(重链互补决定区)1、(b)SEQ ID NO:24的HCDR2、(c)SEQ ID NO:5的HCDR3的重链可变区;以及包含(d)SEQ ID NO:25的LCDR(轻链互补决定区)1、(e)SEQ ID NO:19的LCDR2和(f)SEQ ID NO:8的LCDR3的轻链可变区;(ii)包含(a)SEQ ID NO:3的HCDR1、(b)SEQ ID NO:18的HCDR2、(c)SEQ ID NO:5的HCDR3的重链可变区;以及包含(d)SEQ ID NO:6的LCDR1、(e)SEQ ID NO:19的LCDR2和(f)SEQ ID NO:8的LCDR3的轻链可变区;(iii)包含(a)SEQ ID NO:3的HCDR1、(b)SEQ ID NO:13的HCDR2、(c)SEQ ID NO:5的HCDR3的重链可变区;以及包含(d)SEQ ID NO:6的LCDR1、(e)SEQ ID NO:7的LCDR2和(f)SEQ ID NO:8的LCDR3的轻链可变区;或(iv)包含(a)SEQ ID NO:3的HCDR1、(b)SEQ ID NO:4的HCDR2、(c)SEQ ID NO:5的HCDR3的重链可变区;以及包含(d)SEQ ID NO:6的LCDR1、(e)SEQ ID NO:7的LCDR2和(f)SEQ ID NO:8的LCDR3的轻链可变区。

[0013] 权利要求1的抗体或抗原结合片段,其包含:(i)包含与SEQ ID NO:26至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区(VH),以及包含与SEQ ID NO:28至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区(VL);(ii)包含与SEQ ID NO:20至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区(VH),以及包含与SEQ ID NO:22至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区(VL);(iii)包含与SEQ ID NO:14至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区(VH),以及包含与SEQ ID NO:16至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区(VL);或(iv)包含与SEQ ID NO:9至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区(VH),以及包含与SEQ ID NO:11至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0014] 所述抗体或抗原结合片段,其中SEQ ID NO:26、28、20、22、14、16、9和/或11内的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸已被插入、缺失或取代。

[0015] 所述抗体或抗原结合片段,其包含:(i)包含SEQ ID NO:26的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:28的轻链可变区(VL);(ii)包含SEQ ID NO:20的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:22的轻链可变区(VL);(iii)包含SEQ ID NO:14的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:16的轻链可变区(VL);或(iv)包含SEQ ID NO:9的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:11的轻链可变区(VL)。

[0016] 所述抗体或抗原结合片段,其是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人工程化抗体、单链抗体(scFv)、Fab片段、Fab'片段或F(ab')₂片段。

[0017] 所述抗体或抗原结合片段,其具有OX40激动剂活性。

[0018] 所述抗体或抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153至D170的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

[0019] 所述抗体或抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153、T154、I165、E167和D170

的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

[0020] 所述抗体或抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153、I165和E167的一个或多个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。所述抗体或抗原结合片段,其在包含选自人OX40的H153、I165和E167的一个氨基酸残基的表位处与人OX40结合。

[0021] 所述抗体或抗原结合片段,其在SEQ ID NO.30处或之内与人OX40结合。

[0022] 所述抗体或抗原结合片段,其以如通过表面等离子共振 (SPR) 所测量的等于或高于7.28nM、9.47nM、13.5nM或17.1nM的平衡解离常数 (K_D) 与人OX40结合。

[0023] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0024] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段具有减少的糖基化或无糖基化或被低岩藻糖基化。

[0025] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含增加的二等分GlcNac结构。

[0026] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述Fc结构域属于IgG1。

[0027] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述Fc结构域属于IgG4。

[0028] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述IgG4具有S228P取代(根据EU编号系统)。

[0029] 所述抗体或抗原结合片段,其中所述IgG4具有S228P和R409K取代(根据EU编号系统)。

[0030] 所述抗体或抗原结合片段,其具有以下特性中的一种或多种:

[0031] (i) 能够与cyno OX40交叉反应;

[0032] (ii) 不干扰OX40-OX40L相互作用;

[0033] (iii) 能够刺激T细胞,特别是以等于或高于0.06ng/ml的 EC_{50} ;

[0034] (iv) 能够激活 $CD4^+$ T细胞,特别是如在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中所测量的;

[0035] (v) 能够介导ADCC,特别是如在基于乳酸脱氢酶 (LDH) 释放的ADCC测定中所测量的;

[0036] (vi) 能够耗尽 $CD4^+$ Treg;

[0037] (vii) 能够增加 $CD8^+$ Teff/Treg比率;或

[0038] (viii) 能够在动物肿瘤模型中介导肿瘤的部分消退。

[0039] 一种包含所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体。

[0040] 一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者给予有效量的所述抗体或抗原结合片段。

[0041] 所述方法,其中所述癌症包括但不限于乳腺癌、头颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、皮肤癌、间皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤等。

[0042] 所述方法,其中将所述抗体或所述药物组合物与另一种治疗剂组合给予。

[0043] 所述方法,其中所述治疗剂是紫杉醇或紫杉醇剂、多西他赛、卡铂、拓扑替康、顺铂、伊立替康、多柔比星、来那度胺、5-氮杂胞苷。

[0044] 所述方法,其中所述治疗剂是紫杉醇剂、来那度胺或5-氮杂胞苷。

[0045] 一种分离的核酸,其编码所述抗体或抗原结合片段。

[0046] 一种包含所述核酸的载体。

[0047] 一种包含所述核酸的宿主细胞。

[0048] 一种用于产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞并从所述培养物中回收所述抗体或抗原结合片段。

[0049] 所述抗体或其抗原结合片段,用于治疗乳腺癌、头颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、皮肤癌、间皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤或者降低所述癌症的可能性。

[0050] 一种诊断试剂,其包含经标记的所述抗体或其抗原结合片段。

[0051] 所述诊断试剂,其中所述标记选自放射性标记、荧光团、发色团、显像剂和金属离子。

[0052] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的一个或多个互补决定区(CDR)。

[0053] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含具有选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一个或多个互补决定区(HCDR)的重链可变区;和/或(b)包含具有选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的一个或多个互补决定区(LCDR)的轻链可变区。

[0054] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含三个互补决定区(HCDR)的重链可变区,所述三个互补决定区是具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1;具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2;和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和/或(b)包含三个互补决定区(LCDR)的轻链可变区,所述三个互补决定区是具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1;具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2;和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0055] 在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含三个互补决定区(HCDR)的重链可变区,所述三个互补决定区是具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和/或(b)包含三个互补决定区(LCDR)的轻链可变区,所述三个互补决定区是具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3;或具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3;或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0056] 在另一个实施方案中,本公开文本的抗体或抗原结合片段包含:包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3的重链可变区;以及包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3的轻链可变区。

[0057] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体或抗原结合片段包含:包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3的重链可变区;以及包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3的轻链可变区。

[0058] 在另一个实施方案中,本公开文本的抗体或抗原结合片段包含:包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3的重链可变区;以及包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3的轻链可变区。

[0059] 在另一个实施方案中,本公开文本的抗体或抗原结合片段包含:包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3的重链可变区;以及包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3的轻链可变区。

[0060] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体或其抗原结合片段包含:(a)如下重链可变区,其具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26中的任何一个至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或(b)如下轻链可变区,其具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28中的任何一个至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0061] 在另一个实施方案中,本公开文本的抗体或其抗原结合片段包含:(a)如下重链可变区,其具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列中具有一个、两个或三个氨基酸取代的氨基酸序列;和/或(b)如下轻链可变区,其具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸中具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述氨基酸取代是保守氨基酸取代。

[0062] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体或其抗原结合片段包含:

[0063] (a)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0064] (b)具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0065] (c) 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0066] (d) 具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区。

[0067] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一个更具体的实施方案中,本公开文本的抗体包含野生型人IgG1(也称为人IgG1wt或huIgG1)或IgG2的Fc结构域。在另一个实施方案中,本公开文本的抗体包含具有S228P和/或R409K取代(根据EU编号系统)的人IgG4的Fc结构域。

[0068] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体以 1×10^{-6} M至 1×10^{-10} M的结合亲和力(K_D)与OX40结合。在另一个实施方案中,本公开文本的抗体以约 1×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M或约 1×10^{-10} M的结合亲和力(K_D)与OX40结合。

[0069] 在另一个实施方案中,本发明的抗人OX40抗体显示出与食蟹猴OX40的跨物种结合活性。

[0070] 在一个实施方案中,本公开文本的抗OX40抗体在OX40-OX40L相互作用界面外与人OX40的表位结合。在另一个实施方案中,本公开文本的抗OX40抗体不与OX40配体竞争结合OX40。在又一个实施方案中,本公开文本的抗OX40抗体不阻断OX40与其配体OX40L之间的相互作用。

[0071] 本公开文本的抗体是激动性的并且显著增强免疫反应。本发明提供了用于测试抗OX40抗体的激动能力的方法。在一个实施方案中,本公开文本的抗体可以在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中显著刺激原代T细胞产生IL-2。

[0072] 在一个实施方案中,本公开文本的抗体具有强Fc介导的效应子功能。所述抗体通过NK细胞介导针对OX40^{Hi}靶细胞(如调节性T细胞(Treg细胞))的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一个方面,本公开文本提供了基于不同的OX40表达水平评价抗OX40抗体介导的特定T细胞亚群的体外耗尽的方法。

[0073] 本公开文本的抗体或抗原结合片段不阻断OX40-OX40L相互作用。此外,如动物模型中所示,所述OX40抗体在体内展示出剂量依赖性抗肿瘤活性。所述剂量依赖性活性与阻断OX40-OX40L相互作用的抗OX40抗体的活性谱不同。

[0074] 本公开文本涉及分离的核酸,其包含编码所述抗体或抗原结合片段的氨基酸序列的核苷酸序列。在一个实施方案中,所述分离的核酸包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:27的VH核苷酸序列,或与SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:27具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列,并且编码本公开文本的抗体或抗原结合片段的VH区。可替代地或另外地,所述分离的核酸包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:29的VL核苷酸序列,或与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:29具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列,并且编码本公开文本的抗体或抗原结合片段的VL区。

[0075] 在另一个方面,本公开文本涉及药物组合物,其包含所述OX40抗体或其抗原结合片段和任选的药学上可接受的赋形剂。

[0076] 在又一个方面,本公开文本涉及治疗受试者的疾病的方法,其包括向有需要的受试者给予治疗有效量的所述OX40抗体或其抗原结合片段或OX40抗体药物组合物。在另一

个实施方案中,待通过所述抗体或所述抗原结合片段治疗的疾病是癌症或自身免疫性疾病。

[0077] 本公开文本涉及所述抗体或其抗原结合片段或OX40抗体药物组合物用于治疗疾病(如癌症或自身免疫性疾病)的用途。

附图说明

[0078] 图1是OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His构建体的示意图。OX40ECD:OX40胞外结构域。N:N末端。C:C末端。

[0079] 图2显示了通过表面等离子体共振 (SPR) 进行的经纯化的嵌合 (ch445) 和人源化 (445-1、445-2、445-3和445-3IgG4) 抗OX40抗体的亲和力测定。

[0080] 图3展示了通过流式细胞术进行的OX40结合的测定。将OX40阳性HuT78/OX40细胞与各种抗OX40抗体 (抗体ch445、445-1、445-2、445-3和445-3IgG4) 一起孵育并进行FACS分析。用平均荧光强度 (MFI, Y轴) 显示结果。

[0081] 图4显示了通过流式细胞术得到的OX40抗体的结合。将HuT78/OX40和HuT78/cynoOX40细胞用抗体445-3染色,并通过流式细胞术测定平均荧光强度 (MFI, 显示在Y轴上)。

[0082] 图5描绘了通过表面等离子体共振 (SPR) 进行的445-3Fab对OX40野生型和点突变体的亲和力测定。

[0083] 图6显示了抗体445-3与其在OX40上的表位之间的详细的相互作用。抗体445-3和OX40分别以浅灰色和黑色描绘。氢键或盐桥、 π - π 堆叠和范德华 (VDW) 相互作用分别用虚线、双虚线和实线指示。

[0084] 图7证明抗体445-3不干扰OX40L结合。在对HEK293/OX40L细胞染色之前,将OX40-小鼠IgG2a (OX40-mIgG2a) 融合蛋白与人IgG (+HuIgG)、抗体445-3 (+445-3) 或抗体1A7.gr1 (+1A7.gr1, 参见US 2015/0307617) 以摩尔比1:1一起预孵育。OX40L与OX40-mIgG2a/抗OX40抗体复合物的结合通过HEK293/OX40L细胞与OX40-mIgG2a/抗OX40抗体复合物共孵育,然后与抗小鼠IgG二级Ab反应以及流式细胞术来测定。以两次重复的平均值 $\pm$ SD显示结果。统计显著性:*, $P<0.05$;**, $P<0.01$ 。

[0085] 图8显示了OX40/445-3Fab与所报道的OX40/OX40L复合物 (PDB码:2HEV) 的结构比对。OX40L以白色显示,445-3Fab以灰色显示,并且OX40以黑色显示。

[0086] 图9A至图9B显示抗OX40抗体445-3诱导IL-2产生以及TCR刺激。将OX40阳性HuT78/OX40细胞 (图9A) 与人工抗原呈递细胞 (APC) 系 (HEK293/OS8^低-Fc γ RI) 在抗OX40抗体的存在下共培养过夜,并将IL-2产量用作T细胞刺激的读出 (图9B)。通过ELISA检测培养上清液中的IL-2。以三次重复的平均值 $\pm$ SD显示结果。

[0087] 图10指示抗OX40抗体增强MLR反应。将体外分化的树突细胞 (DC) 与同种异体CD4⁺T细胞在抗OX40抗体 (0.1-10 μ g/ml) 的存在下共培养2天。通过ELISA检测上清液中的IL-2。所有测试均进行四次重复,并将结果显示为平均值 $\pm$ SD。统计显著性:*, $P<0.05$;**, $P<0.01$ 。

[0088] 图11证明抗OX40抗体445-3诱导ADCC。使用NK92MI/CD16V细胞作为效应细胞并且使用HuT78/OX40细胞作为靶细胞,在抗OX40抗体 (0.004-3 μ g/ml) 或对照的存在下进行ADCC测定。在检测乳酸脱氢酶 (LDH) 释放之前,将相同数目的效应细胞和靶细胞共培养5小时。如

实施例12中所述,基于制造商的方案计算细胞毒性百分比(Y轴)。以三次重复的平均值 $\pm$ SD显示结果。

[0089] 图12A至图12C显示抗OX40抗体445-3与NK细胞的组合增加在体外激活的PBMC中CD8⁺效应T细胞与Treg的比率。将人PBMC通过PHA-L (1 μ g/ml) 预激活,随后与NK92MI/CD16V细胞在抗OX40抗体或对照的存在下共培养。通过流式细胞术测定不同T细胞亚群的百分比。进一步计算CD8⁺效应T细胞与Treg的比率。图12A显示了CD8⁺/总T细胞的比率。图12B是Treg/总T细胞比率。图12C显示了CD8⁺/Treg比率。数据显示为两次重复的平均值 $\pm$ SD。显示了在指定浓度下445-3与1A7.gr1之间的统计显著性。*:P<0.05; **:P<0.01。

[0090] 图13A至图13B显示抗OX40抗体445-3而非1A7.gr1在OX40人源化小鼠的MC38结肠癌同基因模型中揭示出剂量依赖性抗肿瘤活性。将MC38鼠结肠癌细胞(2 $\times$ 10⁷个)皮下植入雌性人OX40转基因小鼠中。在根据肿瘤体积随机化后,将动物如所示每周一次腹膜内注射抗OX40抗体或同种型对照,共三次。图13A比较了增加445-3抗体的剂量与增加1A7.gr1抗体的剂量和肿瘤生长的减少。图13B展现了用该特定剂量处理的所有小鼠的数据。数据表示为平均肿瘤体积 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM),每组6只小鼠。统计显著性*:与同种型对照相比P<0.05。

[0091] 图14A至图14B是在OX40抗体中作出的氨基酸改变的表。

[0092] 定义

[0093] 除非在本文件的其他地方明确定义,否则本文使用的所有其他技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0094] 如本文(包括所附权利要求书)所用,除非上下文另外清楚地指示,否则单数形式的词语如“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括它们对应的复数指示物。

[0095] 除非上下文另外清楚地指示,否则术语“或”用于意指术语“和/或”,并且可与术语“和/或”互换使用。

[0096] 如本文所用的术语“抗癌剂”是指可以用于治疗细胞增殖性障碍(如癌症)的任何药剂,包括但不限于细胞毒性剂、化学治疗剂、放射疗法和放射治疗剂、靶向抗癌剂和免疫治疗剂。

[0097] 术语“OX40”是指大约50KD的I型跨膜糖蛋白,它是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。OX40也称为ACT35、CD134或TNFRSF4。人OX40的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)也能以登录号NP_003318找到,并且编码OX40蛋白的核苷酸序列是登录号:X75962.1。术语“OX40配体”或“OX40L”是指OX40的唯一配体,并且与gp34、CD252或TNFSF4可互换。

[0098] 当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,本文的术语“给予”(“administration”、“administering”)、治疗(“treating”和“treatment”)意指外源性药剂、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。细胞的治疗包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中流体与细胞接触。术语“给予”和“治疗”还意指通过试剂、诊断剂、结合化合物或者通过另一种细胞对例如细胞的体外和离体治疗。本文的术语“受试者”包括任何生物,优选动物,更优选哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、狗、猫、兔)并且最优选人。治疗任何疾病或障碍在一个方面是指改善疾病或障碍(即,减缓或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个方面,“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)是指缓解或改善至少一种物理参数,包括患者可能无法辨别的

那些。在又另一个方面,“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)是指在物理上(例如,使可辨别的症状稳定)、生理上(例如,使物理参数稳定)或两者上调节疾病或障碍。在又另一个方面,“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)是指预防或延迟疾病或障碍的发作或发展或进展。

[0099] 在本公开文本的上下文中,术语“受试者”是哺乳动物,例如灵长类动物,优选高等灵长类动物,例如人(例如,患有本文所述障碍或有患本文所述障碍风险的患者)。

[0100] 如本文所用的术语“亲和力”是指抗体与抗原之间相互作用的强度。在抗原内,抗体“臂”的可变区在许多位点通过非共价力与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0101] 如本文所用的术语“抗体”是指可以非共价地、可逆地且以特异性方式结合相应的抗原的免疫球蛋白家族的多肽。例如,天然存在的IgG抗体是四聚体,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0102] 术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和抗独特型(抗Id)抗体。抗体可以属于任何同种型/类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0103] 在一些实施方案中,抗OX40抗体包含至少一个抗原结合位点或至少一个可变区。在一些实施方案中,抗OX40抗体包含来自本文所述的OX40抗体的抗原结合片段。在一些实施方案中,抗OX40抗体是分离或重组的。

[0104] 本文的术语“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”意指基本上同质的抗体的群体,即除了能以少量存在的可能天然发生的突变,群体中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的。相比之下,常规(多克隆)抗体制剂通常包括在其可变结构域(特别是其互补决定区(CDR),其通常对不同表位具有特异性)中具有不同氨基酸序列的多种不同抗体。修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。单克隆抗体(mAb)可以通过本领域技术人员已知的方法获得。参见例如Kohler等人,Nature 1975 256:495-497;美国专利号4,376,110;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992;Harlow等人,ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL,Cold spring Harbor Laboratory 1988;以及Colligan等人,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993。本文公开的抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgD、IgE、IgA及其任何亚类,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。产生单克隆抗体的杂交瘤可以在体外或在体内进行培养。通过体内生产可以获得高滴度的单克隆抗体,其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射到小鼠(如原始引发的Balb/c小鼠)中,以产生含有高浓度所需抗体的腹水。可以使用本领域技术人员熟知的柱色谱法从此类腹水中或从培养上清液中纯化同种型IgM或IgG的单克隆抗体。

[0105] 一般而言,基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100个至110个或更多个氨基酸的可变区。重链的羧基末端部分可以限定主要负责效应子功能的恒定区。通常,将人轻链分类为 κ 和 λ 轻链。此外,将人重链通常分类为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区。

[0106] 每个轻链/重链(VL/VH)对的可变区形成抗体结合位点。因此,一般而言,完整抗体具有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体之外,两个结合位点一般而言是相同的。

[0107] 通常,重链和轻链二者的可变结构域包含三个高变区,也称为“互补决定区(CDR)”,其位于相对保守的框架区(FR)之间。CDR通常由框架区对齐,使得能够与特异性表位结合。一般而言,从N末端至C末端,轻链和重链可变结构域都包含FR-1(或FR1)、CDR-1(或CDR1)、FR-2(FR2)、CDR-2(CDR2)、FR-3(或FR3)、CDR-3(CDR3)和FR-4(或FR4)。CDR和框架区的位置可以使用各种本领域熟知的定义来确定,例如Kabat, Chothia和AbM(参见例如Johnson等人, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia等人, *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani等人, *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997))。抗原结合位点的定义也描述于以下文献中:Ruiz等人, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); 和Lefranc, M.P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum等人, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); 和Martin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin等人, *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); 以及Rees等人, 于Sternberg M.J.E. (编辑), *Protein Structure Prediction*, 牛津大学出版社, 牛津, 141-172 (1996)。在组合的Kabat和Chothia编号方案中, 在一些实施方案中, CDR对应于作为Kabat CDR、Chothia CDR或二者的一部分的氨基酸残基。例如, CDR对应于VH(例如哺乳动物VH, 例如人VH)中的氨基酸残基26-35(HC CDR1)、50-65(HC CDR2)和95-102(HC CDR3); 以及VL(例如哺乳动物VL, 例如人VL)中的氨基酸残基24-34(LC CDR1)、50-56(LC CDR2)和89-97(LC CDR3)。

[0108] 术语“高变区”意指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“CDR”(即, 轻链可变结构域中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3以及重链可变结构域中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3)的氨基酸残基。参见Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美国公共卫生署, 美国国立卫生研究院, 贝塞斯达, 马里兰州(根据序列定义抗体的CDR区); 还参见Chothia和Lesk(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917(根据结构定义抗体的CDR区)。术语“框架”或“FR”残基意指除了本文定义为CDR残基的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0109] 除非另有指示, 否则“抗原结合片段”意指抗体的抗原结合片段, 即保留与被全长抗体结合的抗原特异性地结合的能力的抗体片段, 例如保留一个或多个CDR区的片段。抗原结合片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段; 双抗体(diabody); 线性抗体; 单链抗体分子, 例如单链Fv(ScFv); 纳米抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0110] 抗体与靶蛋白“特异性地结合”意味着与其他蛋白质相比, 抗体表现出优先与该靶

标结合,但这种特异性不需要绝对结合特异性。抗体被认为对其预期靶标是“特异性的”,如果其结合决定了样品中靶蛋白的存在而例如没有产生不希望的结果(如假阳性)的话。可用于本公开文本的抗体或其抗原结合片段将以比与非靶蛋白的亲合力大至少2倍、优选大至少10倍、更优选大至少20倍、最优选大至少100倍的亲合力与靶蛋白结合。本文的抗体被说成与包含给定氨基酸序列(例如人OX40分子的氨基酸序列)的多肽特异性地结合,如果其与包含该序列的多肽结合但不与缺乏该序列的蛋白质结合的话。

[0111] 本文的术语“人抗体”意指仅包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果在小鼠、在小鼠细胞或在从小鼠细胞衍生的杂交瘤中产生,人抗体可能含有鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”分别意指仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。

[0112] 术语“人源化抗体”意指含有来自非人(例如,鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有从非人免疫球蛋白衍生的最小序列。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环与非人免疫球蛋白的高变环对应并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。当有必要区分人源化抗体与亲本啮齿动物抗体时,将前缀“hum”、“hu”、“Hu”或“h”添加到抗体克隆名称中。啮齿动物抗体的人源化形式将通常包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,尽管可以包括某些氨基酸取代以增加亲合力,提高人源化抗体的稳定性,去除翻译后修饰或者出于其他原因。

[0113] 术语“相应的人种系序列”是指编码如下人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,与所有其他已知的由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的可变区氨基酸序列相比,所述人可变区氨基酸序列或子序列与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高的测定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列也可以指如下人可变区氨基酸序列或子序列,与所有其他评价的可变区氨基酸序列相比,其与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列可以是仅框架区、仅互补决定区、框架和互补决定区、可变区段(如上所定义)或包含可变区的序列或子序列的其他组合。可以使用本文所述的方法测定序列同一性,例如使用BLAST、ALIGN或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0114] 术语“平衡解离常数(K_D , M)”是指解离速率常数(k_d , 时间⁻¹)除以缔合速率常数(k_a , 时间⁻¹, M⁻¹)。可以使用本领域任何已知的方法测量平衡解离常数。本公开文本的抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 10^{-8} M(例如小于约 10^{-9} M或 10^{-10} M,在一些方面,小于约 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M)的平衡解离常数。

[0115] 本文的术语“癌症”或“肿瘤”具有本领域所理解的最广泛的含义,并且是指哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。在本公开文本的上下文中,癌症不限于某种类型或位置。

[0116] 术语“组合疗法”是指给予两种或更多种治疗剂以治疗本公开文本中描述的治疗病症或障碍。这种给予包括以基本上同时的方式共给予这些治疗剂。这种给予还包括以对于每种活性成分的多个或分开的容器(例如,胶囊、粉末和液体)共给予。在给予之前,可以将粉末和/或液体重构或稀释至所需剂量。此外,这种给予还包括在大致相同的时间或在

同的时间以顺序方式使用每种类型的治疗剂。在任一种情况下,治疗方案在治疗本文所述的病症或障碍中将提供药物组合的有益效果。

[0117] 在本公开文本的上下文中,当提及氨基酸序列时,术语“保守取代”意指用新的氨基酸取代原始氨基酸,所述新的氨基酸基本上不改变抗体或片段的化学、物理和/或功能特性,例如其对OX40的结合亲和力。具体地,氨基酸的常见保守取代示于下表中,并且是本领域熟知的。

[0118] 示例性保守氨基酸取代

	原始氨基酸残基	单字母和三字母代码	保守取代
	丙氨酸	A或Ala	Gly; Ser
[0119]	精氨酸	R或Arg	Lys; His
	天冬酰胺	N或Asn	Gln; His
	天冬氨酸	D或Asp	Gln; Asn
	半胱氨酸	C或Cys	Ser; Ala
	谷氨酰胺	Q或Gln	Asn
[0120]	谷氨酸	E或Glu	Asp; Gln
	甘氨酸	G或Gly	Ala
	组氨酸	H或His	Asn; Gln
	异亮氨酸	I或Ile	Leu; Val
	亮氨酸	L或Leu	Ile; val
	赖氨酸	K或Lys	Arg; His
	甲硫氨酸	M或Met	Leu; Ile; Tyr
	苯丙氨酸	F或Phe	Tyr; Met; Leu
	脯氨酸	P或Pro	Ala
	丝氨酸	S或Ser	Thr
	苏氨酸	T或Thr	Ser
	色氨酸	W或Trp	Tyr; Phe
	酪氨酸	Y或Tyr	Trp; Phe
	缬氨酸	V或Val	Ile; Leu

[0121] 适合于测定序列同一性和序列相似性百分比的算法的例子是BLAST算法,其分别描述于Altschul等人,Nuc.Acids Res.25:3389-3402,1977;和Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1990中。用于进行BLAST分析的软件是可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得的。这种算法涉及首

先通过鉴定询问序列中长度W的短字码来鉴定高分序列对(HSP),所述短字码在与数据库序列中相同长度的字码比对时,匹配或符合一定的正值阈值得分T。T被称为相邻字码得分阈值。这些初始相邻字码命中用作开始搜索的值,以发现含有它们的较长HSP。沿每个序列在两个方向上延长字码命中,只要可以增加累积比对得分即可。对于核苷酸序列,累积得分是使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;始终>0)和N(错配残基的罚分;始终<0)来计算的。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。在累积比对得分从其最大达成值下降数量X时;在累积得分由于一个或多个负评分残基比对的积累而变为零或更低时;或在到达任一序列的末端时,停止每一方向上的字码命中延伸。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用以下项作为默认参数:字长(W)为11,期望(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLAST程序使用以下项作为默认参数:字长为3,期望(E)为10,BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915)比对(B)为50,期望(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较。

[0122] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787,1993)。BLAST算法提供的一个相似性量度是最小总和概率(P(N)),其提供两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,核酸被认为与参考序列相似,如果测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2、更优选小于约0.01、最优选小于约0.001的话。

[0123] 也可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和W.Miller,Comput.Appl.Biosci.4:11-17,(1988)的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。此外,可以使用已并入GCG软件包中的GAP程序中的Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:444-453,(1970)的算法,使用BLOSUM62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0124] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用,并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的骨架残基或连接的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸类似的结合特性并且以与参考核苷酸类似的方式代谢。此类类似物的例子包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

[0125] 在核酸的上下文中,术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如,DNA)区段之间的功能关系。通常,它是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如,启动子或增强子序列与编码序列可操作地连接,如果其刺激或调节编码序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中的转录的话。通常,与转录序列可操作地连接的启动子转录调节序列与转录序列在物理上连续,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调节序列(如增强子)不需要与它们增强其转录的编码序列在物理上连续或位于非常接近的位置。

[0126] 在一些方面,本公开文本提供了组合物(例如,药学上可接受的组合物),其包括与至少一种药学上可接受的赋形剂一起配制的本文所述的抗OX40抗体。如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。赋形剂可能适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮给予(例如通过注射

或输注)。

[0127] 本文公开的组合物可以呈各种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如,可注射和输注溶液)、分散体或悬浮液、脂质体和栓剂。合适的形式取决于预期的给予方式和治疗应用。典型的合适组合物呈可注射或输注溶液的形式。一种合适的给予方式是肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一些实施方案中,抗体通过静脉内输注或注射给予。在某些实施方案中,抗体通过肌肉内或皮下注射给予。

[0128] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指当向受试者给予以用于治疗疾病、或疾病或障碍的至少一种临床症状时,足以对疾病、障碍或症状的这种治疗产生效果的抗体的量。“治疗有效量”可随以下项变化:抗体;疾病、障碍和/或疾病或障碍的症状;疾病、障碍和/或疾病或障碍的症状的严重程度;待治疗的受试者的年龄和/或待治疗的受试者的体重。在任何给定的例子中,适当的量对于本领域技术人员来说是清楚的,或者可以通过常规实验来确定。在组合疗法的情况下,“治疗有效量”是指用于有效治疗疾病、障碍或病症的组合对象的总量。

具体实施方式

[0129] 本公开文本提供了特异性地结合人OX40的抗体、抗原结合片段。此外,本公开文本提供了具有所需药代动力学特征和其他所需属性,因此可以用于降低癌症的可能性或治疗癌症的抗体。本公开文本还提供了包含所述抗体的药物组合物、以及制备和使用此类药物组合物来预防和治疗癌症和相关障碍的方法。

[0130] 抗OX40抗体

[0131] 本公开文本提供了与OX40特异性地结合的抗体或其抗原结合片段。本公开文本的抗体或抗原结合片段包括但不限于如下所述产生的抗体或其抗原结合片段。

[0132] 本公开文本提供了与OX40特异性地结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有SEQ ID NO:14、20或26的氨基酸序列的VH结构域(表3)。本公开文本还提供了特异性地结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表3中列出的任何一个VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。在一个方面,本公开文本提供了与OX40特异性地结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包含一个、两个、三个或更多个具有表3中列出的任何VH CDR的氨基酸序列的VH CDR(或者可替代地,由其组成)。

[0133] 本公开文本提供了与OX40特异性地结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:16、22或28的氨基酸序列的VL结构域(表3)。本公开文本还提供了与OX40特异性地结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表3中列出的任何一个VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。特别地,本公开文本提供了与OX40特异性地结合的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含一个、两个、三个或更多个具有表3中列出的任何VL CDR的氨基酸序列的VL CDR(或者可替代地,由其组成)。

[0134] 本公开文本的其他抗体或其抗原结合片段包括已经突变,但在CDR区中与表3所述序列中所描绘的CDR区具有至少60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性百分比的氨基酸。在一些方面,它包括突变型氨基酸序列,其中当与表3所述序列中所描绘的CDR区相比,在CDR区不多于1、2、3、4或5个氨基酸已经突变。

[0135] 本公开文本的其他抗体包括那些抗体,其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表3所述的序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性百分比。在一些方面,它包括突变型氨基酸序列,其中当与表3所述序列中所描绘的可变区相比时,在可变区中不多于1、2、3、4或5个氨基酸已经突变,但基本上保留相同的治疗活性。

[0136] 本公开文本还提供了编码与OX40特异性地结合的抗体的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。可以优化此类核酸序列以在哺乳动物细胞中表达。

[0137] 鉴定表位和与相同表位结合的抗体

[0138] 本公开文本提供了与人OX40的表位结合的抗体及其抗原结合片段。在某些方面,抗体和抗原结合片段可以与OX40的相同表位结合。

[0139] 本公开文本还提供了与表3所述的抗OX40抗体所结合的相同表位结合的抗体及其抗原结合片段。因此,另外的抗体及其抗原结合片段可以基于它们在结合测定中与其他抗体交叉竞争(例如,以统计学上显著的方式竞争性地抑制与其他抗体的结合)的能力来鉴定。测试抗体抑制本公开文本的抗体及其抗原结合片段与OX40结合的能力证明,测试抗体可以与该抗体或其抗原结合片段竞争结合OX40。在不受任何一种理论约束的情况下,这种抗体可以结合OX40上与它所竞争的抗体或其抗原结合片段相同或相关(例如,结构上相似或空间上邻近)的表位。在某个方面,结合OX40上与本公开文本的抗体或其抗原结合片段相同的表位的抗体是人或人源化单克隆抗体。可以如本文所述制备和分离此类人或人源化单克隆抗体。

[0140] Fc区框架的进一步改变

[0141] 在又其他方面,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变对其亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法描述于例如美国专利号5,624,821和5,648,260中,二者均出自Winter等人。

[0142] 在另一个方面,可以用一个或多个不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。该方法描述于Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0143] 在又另一个方面,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法描述于例如Bodmer等人的PCT公开案W0 94/29351中。在一个具体方面,本公开文本的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸被IgG1亚类和 κ 同种型的一个或多个异型氨基酸残基替代。异型氨基酸残基还包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链的恒定区以及如Jefferis等人,MAbs.1:332-338(2009)所述的 κ 同种型的轻链的恒定区。

[0144] 在另一个方面,修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体对Fc γ 受体的亲和力。该方法描述于例如Presta的PCT公开案W0 00/42072中。此外,已经在人IgG1上绘制了Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等人,J.Biol.Chem.276:6591-6604,2001)。

[0145] 在仍另一个方面,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备非糖基化抗体(即,抗体缺乏糖基化或具有减少的糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对“抗原”的亲和力。此类碳

水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的糖基化的一个或多个位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。这种方法描述于例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0146] 另外地或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明此类改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。本领域已经描述了具有改变的糖基化机制的细胞,并且可以将其用作表达重组抗体的宿主细胞,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如, Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能上破坏的编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因的细胞系,使得在这种细胞系中表达的抗体展现出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开案W0 03/035835描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖附接至Asn(297)连接的碳水化合物的能力,还导致了在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(还参见Shields等人, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开案W0 99/54342描述了如下细胞系,其被工程化为表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N乙酰基葡萄糖胺转移酶III (GnTIII)),使得在工程化细胞系中表达的抗体展现出增加的二等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人, Nat. Biotech. 17:176-180, 1999)。

[0147] 在另一个方面,如果需要降低ADCC,则在许多先前的报道中显示人抗体亚类IgG4仅具有适度的ADCC且几乎没有CDC效应子功能(Moore G L等人2010 Mabs, 2:181-189)。另一方面,发现天然IgG4在应激条件下(如在酸性缓冲液中或在升高的温度下)不稳定(Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall'Acqua, W. 等人, 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse等人2002 Immunol, 105:9-19)。可以通过以下方式降低ADCC:将抗体与用具有降低或无效的Fc γ R结合或C1q结合活性的改变的组合工程化的IgG4连接,从而降低或消除ADCC和CDC效应子功能。考虑到抗体作为生物药物的物理化学特性, IgG4的一个不太期望的固有特性是其两条重链在溶液中动态分离以形成半抗体,这导致在体内经由称为“Fab臂交换”的过程产生双特异性抗体(Van der Neut Kolfschoten M等人2007 Science, 317:1554-157)。在228位(EU编号系统)丝氨酸突变为脯氨酸似乎抑制IgG4重链分离(Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse等人2002 Immunol, 105:9-19)。据报道,铰链和 γ Fc区中的一些氨基酸残基对抗体与Fc γ 受体的相互作用具有影响(Chappel S M等人1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee, J. 等人, 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour, K.L. 等人1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes, R.A. 等人, 2000 Nature Medicine, 6:443-446; Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol, 25:21-50)。此外,人群中一些很少出现的IgG4同种型也可以引发不同的物理化学特性(Brusco, A. 等人1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse等人2002 Immunol, 105:9-19)。为了产生具有低ADCC、CDC和不稳定性的OX40抗体,可以修饰人IgG4的铰链和Fc区并引入许多改变。这些经修饰的IgG4 Fc分子可以在Li等人的美国专利号8,735,553的SEQ ID NO:83-88中找到。

[0148] OX40抗体产生

[0149] 抗OX40抗体及其抗原结合片段可以通过本领域已知的任何方式产生,所述方式包括但不限于抗体四聚体的重组表达、化学合成和酶促消化,而全长单克隆抗体可以通过例

如杂交瘤或重组产生来获得。重组表达可以来自本领域已知的任何适当的宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[0150] 本公开文本还提供了编码本文所述抗体的多核苷酸,例如编码包含如本文所述的互补决定区的重链或轻链可变区或区段的多核苷酸。在一些方面,编码重链可变区的多核苷酸与选自SEQ ID NO:15、21或27的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些方面,编码轻链可变区的多核苷酸与选自SEQ ID NO:17、23或29的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[0151] 本公开文本的多核苷酸可以编码抗OX40抗体的可变区序列。它们还可以编码抗体的可变区和恒定区二者。一些多核苷酸序列编码包含示例性抗OX40抗体之一的重链和轻链二者的可变区的多肽。一些其他多核苷酸编码两个多肽区段,这两个多肽区段分别与鼠抗体之一的重链和轻链的可变区基本上相同。

[0152] 在本公开文本中还提供了用于产生抗OX40抗体的表达载体和宿主细胞。表达载体的选择取决于待表达的载体的预期宿主细胞。通常,表达载体含有启动子和其他调节序列(例如,增强子),它们与编码抗OX40抗体链或抗原结合片段的多核苷酸可操作地连接。在一些方面,除了在诱导条件的控制下,均使用诱导型启动子来阻止插入序列的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。转化生物的培养物可以在非诱导条件下扩增,而不会使群体偏向编码序列,宿主细胞更好地耐受所述编码序列的表达产物。除了启动子之外,还可能需要或期望其他调节元件以有效表达抗OX40抗体或抗原结合片段。这些元件通常包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.,153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0153] 用于包含和表达抗OX40抗体链的宿主细胞可以是原核的或真核的。大肠杆菌(E.coli)是一种可用于克隆和表达本公开文本的多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌纲(bacilli)(如枯草杆菌(Bacillus subtilis))和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae)(如沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)和各种假单胞菌属(Pseudomonas)物种)。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)。此外,将存在任何数目的各种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常任选地用操纵序列控制表达,并具有核糖体结合位点序列等以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物(如酵母)也可以用于表达抗OX40多肽。也可以使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

[0154] 在其他方面,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本公开文本的抗OX40多肽。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系或者是具有外源表达载体的哺乳动物细胞系。这些哺乳动物细胞系包括任何正常致死的或正常或异常的永生的动物或人细胞。例如,已经开发出了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HEK293细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。哺乳动物组织细胞培养物用于表达多肽的用途一般性地在例如Winnacker,From Genes to Clones,VCH

Publishers, 纽约市, 纽约州, 1987 中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列, 如复制起点、启动子和增强子 (参见例如, Queen 等人, Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986), 以及必要的处理信息位点, 如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有从哺乳动物基因或从哺乳动物病毒衍生的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型 MMTV 启动子、SV40 启动子、MRP polIII 启动子、组成型 MPSV 启动子、四环素诱导型 CMV 启动子 (如人立即早期 CMV 启动子)、组成型 CMV 启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0155] 检测和诊断方法

[0156] 本公开文本的抗体或抗原结合片段可用于多种应用, 包括但不限于检测 OX40 的方法。在一个方面, 抗体或抗原结合片段可用于检测生物样品中 OX40 的存在。如本文所用的术语“检测”包括定量或定性检测。在某些方面, 生物样品包括细胞或组织。在其他方面, 此类组织包括相对于其他组织以更高水平表达 OX40 的正常和/或癌性组织。

[0157] 在一个方面, 本公开文本提供了检测生物样品中 OX40 的存在的方法。在某些方面, 所述方法包括在允许抗体与抗原结合的条件下使生物样品与抗 OX40 抗体接触、以及检测抗体与抗原之间是否形成复合物。生物样品可以包括但不限于尿液或血液样品。

[0158] 还包括诊断与 OX40 的表达相关的障碍的方法。在某些方面, 所述方法包括使测试细胞与抗 OX40 抗体接触; 通过检测抗 OX40 抗体与 OX40 多肽的结合, 测定测试细胞中 OX40 的表达水平 (定量地或定性地); 以及将测试细胞中的表达水平与对照细胞 (例如, 与测试细胞或非 OX40 表达细胞相同的组织起源的正常细胞) 中的 OX40 表达水平进行比较, 其中与对照细胞相比测试细胞中更高的 OX40 表达水平指示与 OX40 的表达相关的障碍的存在。

[0159] 治疗方法

[0160] 本公开文本的抗体或抗原结合片段可用于多种应用, 包括但不限于治疗 OX40 相关障碍或疾病的方法。在一个方面, OX40 相关障碍或疾病是癌症。

[0161] 在一个方面, 本公开文本提供了治疗癌症的方法。在某些方面, 所述方法包括向有需要的患者给予有效量的抗 OX40 抗体或抗原结合片段。癌症可以包括但不限于乳腺癌、头颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、皮肤癌、间皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤。

[0162] 本发明的抗体或抗原结合片段可以通过任何合适的方式给予, 所述合适的方式包括肠胃外、肺内和鼻内, 并且如果需要局部治疗的话, 可以是病灶内给予。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。给药可以通过任何合适的途径, 例如通过注射, 如静脉内或皮下注射, 这部分取决于给予是短暂的还是长期的。本文考虑了各种给药方案, 包括但不限于在不同时间点的单次或多次给予、推注给予和脉冲输注。

[0163] 本发明的抗体或抗原结合片段将以符合良好医学实践的方式配制、给药和给予。在此背景下考虑的因素包括所治疗的特定障碍、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、障碍的原因、药剂的递送部位、给予方法、给予时间表、以及执业医师已知的其他因素。抗体不必, 但任选地用一种或多种目前用于预防或治疗讨论中的障碍的药剂来配制。此类其他药剂的有效量取决于配制品中存在的抗体的量、障碍或治疗的类型以及上面讨论的

其他因素。这些药剂通常以与本文所述相同的剂量和给予途径,或以本文所述剂量的约1%至99%,或以根据经验/临床上确定为适当的任何剂量和任何途径来使用。

[0164] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体或抗原结合片段的适当剂量将取决于待治疗的疾病类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、给予抗体用于预防还是治疗目的、先前疗法、患者的临床病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。抗体适合一次或在一系列治疗中向患者给予。根据疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至100mg/kg的抗体可以是用于向患者给予的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次单独给予还是通过连续输注。取决于上述因素,一种典型的日剂量范围可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于数天或更长时间的重复给予,取决于病症,通常持续治疗直至出现所需疾病症状抑制。此类剂量可以例如每周或每三周间歇地给予(例如,使得患者接受约二至约二十或例如约六个剂量的抗体)。可以给予初始较高负荷剂量,然后给予一个或多个较低剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术和测定可以容易地监测此疗法的进展。

[0165] 组合疗法

[0166] 在一个方面,本公开文本的OX40抗体可以与其他治疗剂组合使用。可与本公开文本的OX40抗体一起使用的其他治疗剂包括但不限于化学治疗剂(例如,紫杉醇或紫杉醇剂;(例如Abraxane®)、多西他赛;卡铂;拓扑替康;顺铂;伊立替康、多柔比星、来那度胺、5-氮杂胞苷、异环磷酰胺、奥沙利铂、培美曲塞二钠、环磷酰胺、依托泊苷、地西他滨、氟达拉滨、长春新碱、苯达莫司汀、苯丁酸氮芥、白消安、吉西他滨、美法仑、喷司他丁、米托蒽醌、培美曲塞二钠)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,EGFR抑制剂(例如,厄洛替尼)、多激酶抑制剂(例如,MGCD265、RGB-286638)、CD-20靶向剂(例如,利妥昔单抗、奥法木单抗、R05072759、LFB-R603)、CD52靶向剂(例如,阿仑单抗)、泼尼松龙、达依泊汀 α 、来那度胺、Bcl-2抑制剂(例如,奥利默森钠)、极光激酶抑制剂(例如,MLN8237、TAK-901)、蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)、CD-19靶向剂(例如,MEDI-551、MOR208)、MEK抑制剂(例如,ABT-348)、JAK-2抑制剂(例如,INCB018424)、mTOR抑制剂(例如,坦罗莫司、依维莫司)、BCR/ABL抑制剂(例如,伊马替尼)、ET-A受体拮抗剂(例如,ZD4054)、TRAIL受体2(TR-2)激动剂(例如,CS-1008)、HGF/SF抑制剂(例如,AMG 102)、EGEN-001、Polo样激酶1抑制剂(例如,BI 672)。

[0167] 药物组合物和配制品

[0168] 还提供了包含抗OX40抗体或抗原结合片段或含有编码抗OX40抗体或抗原结合片段的序列的多核苷酸的组合物(包括药物配制品)。在某些实施方案中,组合物包含与OX40结合的一种或多种抗体或抗原结合片段、或含有编码与OX40结合的一种或多种抗体或抗原结合片段的序列的一种或多种多核苷酸。这些组合物还可以包含本领域熟知的合适的载体,如药学上可接受的赋形剂,包括缓冲剂。

[0169] 通过将具有所需纯度的这种抗体或抗原结合片段与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合,以冻干配制品或水溶液的形式来制备如本文所述的OX40抗体或抗原结合片段的药物配制品(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编辑(1980))。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-

戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(HYLENEX[®],Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rHuPH20)描述于美国专利号US7,871,607和2006/0104968中。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(如软骨素酶)组合。

[0170] 示例性的冻干抗体配制品描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体配制品包括美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些,后者配制品包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0171] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有所述抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成型制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。

[0172] 用于体内给予的配制品通常是无菌的。无菌性可以例如通过无菌过滤膜进行过滤容易地实现。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1:抗OX40单克隆抗体的产生

[0175] 基于常规杂交瘤融合技术(de StGroth和Sheidegger,1980J Immunol Methods 35:1;Mechetner,2007Methods Mol Biol 378:1)稍作修改而产生抗OX40单克隆抗体。选择在酶联免疫吸附测定(ELISA)和荧光激活细胞分选(FACS)测定中具有高结合活性的抗体用于进一步表征。

[0176] 用于免疫和结合测定的OX40重组蛋白

[0177] 编码全长人OX40(SEQ ID NO:1)的cDNA由Sino Biological(中国北京)基于GenBank序列(登录号:X75962.1)合成。将由OX-40的氨基酸(AA)1-216(SEQ ID NO:2)组成的信号肽和胞外结构域(ECD)的编码区进行PCR扩增,并克隆到内部开发的表达载体中,其中C末端融合至小鼠IgG2a的Fc结构域、人IgG1野生型重链的Fc结构域或His标签,这分别产生三种重组融合蛋白表达质粒OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His。OX40融合蛋白的示意图示于图1中。对于重组融合蛋白的产生,将OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His表达质粒瞬时转染到293G细胞中,并在配备有旋转振荡器的CO₂培养箱中培养7天。收集含有重组蛋白的上清液并通过离心澄清。使用蛋白A柱(目录号:17-5438-02,GE Life Sciences)纯化OX40-mIgG2a和OX40-huIgG1。使用Ni琼脂糖柱(目录号:17-5318-02,GE Life Science)纯化OX40-His。将OX40-mIgG2a、OX40-huIgG和OX40-His蛋白用磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析,并以小等分试样存储在-80℃冰箱中。

[0178] 稳定的表达细胞系

[0179] 为了产生表达全长人OX40(OX40)或食蟹猴OX40(cynoOX40)的稳定细胞系,将这些基因克隆到逆转录病毒载体pFB-Neo(目录号:217561,Agilent,美国)中。基于先前描述的方案进行逆转录病毒转导(Zhang等人,2005)。分别用含有人OX40或cynoOX40的病毒将HuT78和HEK293细胞进行逆转录病毒转导,以产生HuT78/OX40、HEK293/OX40和HuT78/

cynoOX40细胞系。

[0180] 免疫、杂交瘤融合和克隆

[0181] 用含有10 μ g OX40-mIgG2a和Quick-Antibody免疫佐剂(目录号:KX0210041, KangBiQuan, 中国北京)的200 μ L抗原混合物对八至十二周龄的Balb/c小鼠(来自HFK BIOSCIENCE CO., LTD, 中国北京)进行腹膜内免疫。将所述过程在三周内重复进行。在第2次免疫后两周,通过ELISA和FACS评价小鼠血清的OX40结合。在血清筛选后十天,具有最高抗OX40抗体血清滴度的小鼠经由腹膜内注射10 μ g OX40-mIgG2a加强免疫。在加强免疫后三天,使用标准技术(Somat Cell Genet, 1977 3:231)将脾细胞分离并与鼠骨髓瘤细胞系SP2/0细胞(ATCC, 弗吉尼亚州马纳萨斯)融合。

[0182] 通过ELISA和FACS评估抗体的OX40结合活性

[0183] 如在(Methods in Molecular Biology(2007) 378:33-52)中所述进行一些修改通过ELISA对杂交瘤克隆的上清液进行初始筛选。简而言之,将OX40-His蛋白在96孔板中在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。用PBS/0.05% Tween-20洗涤后,将板通过PBS/3% BSA在室温下封闭2小时。随后,将板用PBS/0.05% Tween-20洗涤,并在室温下与细胞上清液一起孵育1小时。使用HRP连接的抗小鼠IgG抗体(目录号:115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, 过氧化物酶 AffiniPure 山羊抗小鼠IgG, Fc γ 片段特异性的)和底物(目录号:00-4201-56, eBioscience, 美国)来显现450nm的波长处的有色吸光度信号,其通过使用读板器(SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/PERAstar, BMG LABTECH)来测量。通过间接ELISA从融合筛选中挑选阳性亲本克隆。使用上述HuT78/OX40和HuT78/cynoOX40细胞通过FACS进一步验证ELISA阳性克隆。将表达OX40的细胞(10⁵个细胞/孔)与ELISA阳性杂交瘤上清液一起孵育,然后与抗小鼠IgG eFluor[®]660抗体(目录号:50-4010-82, eBioscience, 美国)结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, 美国)定量细胞荧光。

[0184] 对来自在ELISA和FACS两种筛选中都显示阳性信号的杂交瘤的条件培养基进行功能测定,以鉴定在基于人免疫细胞的测定中具有良好功能活性的抗体(参见以下章节)。进一步亚克隆并表征具有所需功能活性的抗体。

[0185] 杂交瘤的亚克隆和对无血清或低血清培养基的适应

[0186] 在通过ELISA、FACS和如上所述的功能测定进行初步筛选之后,通过有限稀释将阳性杂交瘤克隆进行亚克隆,以确保克隆性。通过功能测定验证最佳抗体亚克隆,并将其适于在含3% FBS的CDM4MAb培养基(目录号:SH30801.02, Hyclone, 美国)中生长。

[0187] 单克隆抗体的表达和纯化

[0188] 将表达最佳抗体克隆的杂交瘤细胞在CDM4MAb培养基(目录号:SH30801.02, Hyclone)中培养,并在CO₂培养箱中于37 $^{\circ}$ C下孵育5至7天。通过离心收集条件培养基,并在纯化之前通过0.22 μ m膜进行过滤。按照制造商的指导,将上清液中的鼠抗体施加到蛋白A柱(目录号:17-5438-02, GE Life Sciences)上并与其结合。所述程序通常产生纯度高于90%的抗体。将蛋白A亲和纯化的抗体用PBS透析,或者如果必要的话,使用HiLoad 16/60 Superdex 200柱(目录号:28-9893-35, GE Life Sciences)进一步纯化以去除聚集物。通过测量在280nm处的吸光度来确定蛋白质浓度。将最终的抗体制剂以等分试样存储在-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0189] 实施例2:抗OX40抗体的克隆和序列分析

[0190] 收获鼠杂交瘤克隆,以基于制造商的方案使用Ultrapure RNA试剂盒(目录号:74104,QIAGEN,德国)制备总细胞RNA。使用来自Invitrogen的cDNA合成试剂盒(目录号:18080-051)合成第1链cDNA,并且使用PCR试剂盒(目录号:CW0686,CWBio,中国北京)进行对杂交瘤抗体的VH和VL的PCR扩增。用于重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗体cDNA克隆的寡核苷酸引物通过Invitrogen(中国北京)基于先前报道的序列(Brocks等人2001Mol Med 7:461)来合成。将PCR产物直接用于测序或亚克隆到pEASY-Blunt克隆载体(目录号:CB101 TransGen,中国)中,然后通过Genewiz(中国北京)测序。从DNA测序结果推导出VH和VL区的氨基酸序列。

[0191] 基于Kabat(Wu和Kabat 1970J.Exp.Med.132:211-250)系统,通过序列注释和通过计算机程序序列分析来定义鼠抗体的互补决定区(CDR)。将代表性最佳克隆Mu445(VH和VL)的氨基酸序列列于表1中(SEQ ID NO.9和11)。将Mu445的CDR序列列于表2中(SEQ ID NO.3-8)。

[0192] 表1.Mu445 VH和VL区的氨基酸序列

[0193]	Mu445 VH	SEQ ID NO: 9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG YKFTSYIIHWVKQKPGQGLEWIGYINP YNDGTRYNEKFKGKATLTSDKSSSTAY MEYSSLTSEDSAVYYCARGYYGSSYAM DYWGQGTSVTVSS
	Mu445 VL	SEQ ID NO: 11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITSCSASQGI SNYLNWYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYS GVPSRFSGSGSGTDYFLTISNLEPEDAT YYCQQYSKLPYTFGGGTKLEKK

[0194] 表2.小鼠单克隆抗体Mu445 VH和VL区的CDR序列(氨基酸)

抗体	SEQ ID NO	CDR	序列
[0195] Mu445	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	SEQ ID NO: 4	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
[0196]	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

[0197] 实施例3:鼠抗人OX40抗体445的人源化

[0198] 抗体人源化和工程化

[0199] 对于Mu445的人源化,通过在IMGT中针对人免疫球蛋白基因数据库进行序列比较,搜索人种系IgG基因中与Mu445可变区的cDNA序列具有高度同源性的序列。将以高频率存在

于人抗体库中 (Glanville等人, 2009PNAS106:20216-20221) 并与Mu445高度同源的人IGHV和IGKV基因选择作为人源化的模板。

[0200] 通过CDR移植进行人源化 (Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods and Protocols, 第248卷: Humana Press), 并且通过使用内部开发的表达载体将人源化抗体工程化为人IgG1野生型形式。在首轮人源化中, 通过模拟的3D结构分析指导框架区中从鼠到人氨基酸残基的突变, 并且将对于维持CDR的典型结构具有结构重要性的鼠框架残基保留在人源化抗体445的第一形式中 (参见445-1, 表3)。445-1的六个CDR具有HCDR1 (SEQ ID NO:3)、HCDR2 (SEQ ID NO:13)、HCDR3 (SEQ ID NO:5) 和LCDR1 (SEQ ID NO:6)、LCDR2 (SEQ ID NO:7) 和LCDR3 (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列。445-1的重链可变区具有由SEQ ID NO:15的核苷酸序列编码的 (VH) SEQ ID NO:14的氨基酸序列, 并且轻链可变区具有由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码的 (VL) SEQ ID NO:16的氨基酸序列。具体地, 将Mu445的LCDR (SEQ ID NO:6-8) 移植到人种系可变基因IGVK1-39的框架中, 其中保留两个鼠框架残基 (I_{44} 和 Y_{71}) (SEQ ID NO:16)。将HCDR1 (SEQ ID NO:3)、HCDR2 (SEQ ID NO:13) 和HCDR3 (SEQ ID NO:5) 移植到人种系可变基因IGHV1-69的框架中, 其中保留两个鼠框架残基 (L_{70} 和 S_{72}) (SEQ ID NO:14)。在445人源化变体 (445-1) 中, 仅移植了Kabat HCDR2的N末端一半, 因为根据模拟的3D结构, 预测仅N末端一半对抗原结合是重要的。

[0201] 使用内部开发的分别含有人野生型IgG1 (IgG1wt) 和 κ 链的恒定区与易于适配的亚克隆位点的表达载体将445-1构建为人源化全长抗体。将445-1抗体通过将上述两种构建体共转染到293G细胞中来表达并使用蛋白A柱 (目录号: 17-5438-02, GE Life Sciences) 来纯化。将经纯化的抗体在PBS中浓缩至0.5-10mg/mL, 并以等分试样储存在-80℃冰箱中。

[0202] 使用445-1抗体, 进行几个单个氨基酸改变, 从而将VH和VL的框架区中保留的鼠残基转化为相应的人种系残基, 如VL中的I44P和Y71F以及VH中的L70I和S72A。此外, 在CDR中进行几个单个氨基酸改变以降低潜在的异构化风险并提高人源化水平。例如, 在LCDR2中进行T51A和D50E的改变, 并在HCDR2中进行改变D56E、G57A和N61A。所有人源化改变均使用在特定位置含有突变的引物和定点诱变试剂盒 (目录号: AP231-11, TransGen, 中国北京) 来进行。通过测序验证所需改变。

[0203] 针对其与OX40的结合和热稳定性评价445-1抗体中的氨基酸改变。包含SEQ ID NO:3的HCDR1、SEQ ID NO:18的HCDR2、SEQ ID NO:5的HCDR3、SEQ ID NO:6的LCDR1、SEQ ID NO:19的LCDR2和SEQ ID NO:8的LCDR3的抗体445-2 (参见表3) 由上述的特定改变的组合构建而来。在比较两种抗体时, 结果显示抗体445-2和445-1均展示出相当的结合亲和力 (参见以下表4和表5)。

[0204] 从445-2抗体开始, 在VL的框架区中进行几个另外的氨基酸改变以进一步改善结合亲和力/动力学, 例如氨基酸G41D和K42G的改变。此外, 在VH和VL二者的CDR中进行几个单个氨基酸改变以降低免疫原性风险并提高热稳定性, 例如LCDR1中的S24R和HCDR2中的A61N。与445-2相比, 所得到的改变显示出改善的结合活性或热稳定性。

[0205] 将人源化445抗体通过在CDR和框架区中引入特定氨基酸改变来进一步工程化, 以改善用于人类治疗用途的分子和生物物理特性。考虑因素包括去除有害的翻译后修饰、改善的热稳定性 (T_m)、表面疏水性和等电点 (pI), 同时保持结合活性。

[0206] 包含SEQ ID NO:3的HCDR1、SEQ ID NO:24的HCDR2、SEQ ID NO:5的HCDR 3、SEQ ID

NO:25的LCDR1、SEQ ID NO:19的LCDR2和SEQ ID NO:8的LCDR3的人源化单克隆抗体445-3 (参见表3) 由上述成熟过程构建而来,并对其进行详细表征。抗体445-3也被制成包含人IgG2的野生型重链的Fc结构域的IgG2形式(445-3IgG2)、以及包含具有S228P和R409K突变的人IgG4的Fc结构域的IgG4形式(445-3IgG4)。结果显示445-3和445-2展示出相当的结合亲和力(参见表4和表5)。

[0207] 表3.445抗体序列

[0208]

<u>抗体</u>	<u>SEQ ID NO</u>		<u>序列</u>
445-1	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO:14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YKFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINP YNDGTRYNQKFQGRVTLTSDKSTSTAY MELSSLRSEDYAVYYCARGYYGSSYA MDYWVGQGTITVTVSS
	SEQ ID NO:16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQG ISNYLNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQQYSKLPYTFGGGTKVEIK
445-2	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	SEQ ID NO: 18	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID	LCDR1	SASQGISNYLN

[0209]

	NO: 6	(Kabat)	
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO:20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YKFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINP YNEGTRYAQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARGYYGSSYA MDYWGGQGT TVTVSS
	SEQ ID NO:22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQG ISNYLNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQYSKLPYTFGGG TKVEIK
	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
445-3	SEQ ID NO: 24	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 25	LCDR1 (Kabat)	RASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YKFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINP YNEGTRYNQKFQGRVTLTADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARGYYGSSYA MDYWGGQGT TVTVSS

[0210]

SEQ ID NO: 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQG ISNYLNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQYSKLPYTFGGGTKVEIK
------------------	----	--

[0211] 实施例4:通过SPR进行抗OX40抗体的结合动力学和亲和力测定

[0212] 使用BIAcore™ T-200(GE Life Sciences)通过SPR测定表征抗OX40抗体的结合动力学和亲和力。简而言之,将抗人IgG抗体固定在激活的CM5生物传感器芯片(目录号:BR100530,GE Life Sciences)上。使具有人IgG Fc区的抗体在芯片表面上流过并由抗人IgG抗体捕获。然后使具有His标签的重组OX40蛋白(目录号:10481-H08H,Sino Biological)的连续稀释液在芯片表面上流过,并且分析表面等离子体共振信号的变化,以通过使用一对一朗格缪尔结合模型(BIA Evaluation Software,GE Life Sciences)计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。平衡解离常数(K_D)计算为比率 k_d/k_a 。SPR测定的抗OX40抗体的结合概况的结果汇总在图2和表4中。具有抗体445-3(9.47nM)的平均 K_D 的结合概况略好于抗体445-2(13.5nM)和445-1(17.1nM),并且类似于ch445。445-3IgG4的结合概况类似于445-3(具有IgG1 Fc),指示IgG4与IgG1之间Fc的改变不改变445-3抗体的特异性结合。

[0213] 表4.通过SPR得到的抗OX40抗体的结合亲和力

测试参数		ch445*	445-1	445-2	445-3	445-3 IgG4
测试1	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	1.74×10^5	1.56×10^5	2.76×10^5	1.82×10^5	1.61×10^5
	k_d (s^{-1})	1.43×10^{-3}	2.77×10^{-3}	3.90×10^{-3}	1.67×10^{-3}	1.61×10^{-3}
	K_D (nM)	8.26	17.8	14.2	9.16	10.0
	K_A (M^{-1})	1.22×10^8	0.56×10^8	0.71×10^8	1.09×10^8	1.00×10^8
测试2	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	2.65×10^5	2.37×10^5	2.06×10^5	1.63×10^5	—
	k_d (s^{-1})	1.67×10^{-3}	3.89×10^{-3}	2.64×10^{-3}	1.59×10^{-3}	—
	K_D (nM)	6.3	16.4	12.8	9.77	—
	K_A (M^{-1})	1.59×10^8	0.61×10^8	0.78×10^8	1.03×10^8	—
平均值	K_D (nM)	7.28	17.1	13.5	9.47	10.0
	K_A (M^{-1})	1.41×10^8	0.59×10^8	0.75×10^8	1.06×10^8	1.00×10^8

[0215] *ch445由与人IgG1wt/ κ 恒定区融合的Mu445可变结构域组成

[0216] 实施例5:测定抗OX40抗体对在HuT78细胞上表达的OX40的结合亲和力

[0217] 为了评价抗OX40抗体结合活细胞表面上表达的OX40的结合活性,如实施例1所述用人OX40转染HuT78细胞以产生表达OX40的系。将活的HuT78/OX40细胞接种在96孔板中,并与各种抗OX40抗体的连续稀释液一起孵育。将山羊抗人IgG-FITC(目录号:A0556,Beyotime)用作二级抗体,以检测与细胞表面结合的抗体。通过使用GraphPad Prism将剂量-反应数据拟合到四参数逻辑模型来确定与人OX40的剂量依赖性结合的 EC_{50} 值。如图3和表5所示,OX40抗体对OX40具有高亲和力。还发现本公开文本的OX40抗体具有通过流式细胞

术测量的相对较高的最高荧光强度水平(参见表5的最后一列),指示抗体与OX40的解离较慢,这是更理想的结合概况。

[0218] 表5. 人源化445变体与OX40的剂量依赖性结合的EC₅₀

抗体	EC ₅₀ (μg/mL)			最高 (MFI)
	测试1	测试2	平均值	平均值
ch445	0.321	0.277	0.299	725
445-1	0.293	0.278	0.285	525
445-2	0.323	0.363	0.343	620
445-3	0.337	0.319	0.328	910
445-3 IgG4	0.263	N/A	0.263	892

[0220] 实施例6:测定抗OX40抗体的交叉反应性

[0221] 为了评价抗体445-3与人和食蟹猴(cyno) OX40的交叉反应性,将表达人OX40(HuT78/OX40)和cyno OX40(HuT78/cynoOX40)的细胞接种在96孔板中,并与OX40抗体的一系列稀释液一起孵育。将山羊抗人IgG-FITC(目录号:A0556,Beyotime)用作二级抗体用于检测。通过使用GraphPad Prism将剂量-反应数据拟合到四参数逻辑模型来确定与人和食蟹猴天然OX40的剂量依赖性结合的EC₅₀值。结果示于以下图4和表6中。抗体445-3与人和食蟹猴OX40二者以如下所示的类似EC₅₀值交叉反应。

[0222] 表6. 抗体445-3与人和食蟹猴OX40结合的EC₅₀

细胞系	445-3的EC ₅₀ (ug/mL)	最高 (MFI)
HuT78/OX40	0.174	575
HuT78/cynoOX40	0.171	594

[0225] 实施例7:OX40与445-3 Fab的共结晶和结构测定

[0226] 为了理解OX40与本公开文本的抗体的结合机制,解析了OX40和445-3的Fab的共晶体结构。在残基T148和N160处引入突变以阻断OX40的糖基化并改善蛋白质的同质性。将编码突变型人OX40(残基M1-D170,具有两个突变位点T148A和N160A)的DNA克隆到包含六-His标签的表达载体中,并将该构建体在37℃下瞬时转染到293G细胞中用于蛋白质表达,持续7天。收获细胞,收集上清液并将其与His标签亲和树脂在4℃下一起孵育1小时。用含有20mM Tris(pH 8.0)、300mM NaCl和30mM咪唑的缓冲液冲洗树脂三次。然后将OX40蛋白用含有20mM Tris(pH 8.0)、300mM NaCl和250mM咪唑的缓冲液洗脱,然后在含有20mM Tris(pH 8.0)、100mM NaCl的缓冲液中用Superdex 200(GE Healthcare)进一步纯化。

[0227] 将445-3Fab的重链和轻链的编码序列克隆到在重链的C末端包含六-His标签的表达载体中,并将这些表达载体在37℃下瞬时共转染到293G细胞中用于蛋白质表达,持续7

天。445-3Fab的纯化步骤与用于上述突变型OX40蛋白的纯化步骤相同。

[0228] 将经纯化的OX40和445-3Fab以1:1的摩尔比混合并在冰上孵育30分钟,然后在含有20mM Tris(pH 8.0)、100mM NaCl的缓冲液中用Superdex 200(GE Healthcare)进一步纯化。收集复合物峰并浓缩至大约30mg/ml。

[0229] 通过将蛋白质复合物与储器溶液以1:1的体积比混合来进行共晶体筛选。从用含有0.1M HEPES(pH 7.0)、1%PEG 2,000MME和0.95M琥珀酸钠的储器溶液在20℃下通过蒸汽扩散培养的悬滴获得共晶体。

[0230] 使用尼龙环收获共晶体,并将晶体浸入补充有20%甘油的储器溶液中10秒。在Shanghai Synchrotron Radiation Facility的BL17U1上收集衍射数据,并用XDS程序处理。使用IgG Fab的结构(PDB的链C和D:5CZX)和OX40的结构(PDB的链R:2HEV)作为分子替代搜索模型,用程序PHASER解析相。将Phenix.refine图形界面用于针对X射线数据执行刚体、TLS和限制精修,然后用COOT程序调节,并在Phenix.refine程序中进一步精修。表7汇总了X射线数据收集和精修统计。

[0231] 表7.数据收集和精修统计

[0232]

数据收集	
光束线	BL17U1, SSRF
空间群	P 31 2 1
晶胞尺寸 (Å)	a=183.96 b=183.96 c=79.09
角度 (°)	α =90.00 β =90.00 γ =120.00
分辨率 (Å)	159.3-2.55 (2.63-2.55)
总反射数	988771 (81305)
独特反射数	50306 (4625)
完全度 (%)	99.9 (99.9)
平均冗余	19.7 (17.6)
$R_{\text{合并}} (R_{\text{merge}})^a$	0.059 (0.962)
$I/\sigma(I)$	29.4 (3.5)
威尔逊B因子 (Å)	73.9
精修	
分辨率 (Å)	60.22-2.55
反射数	50008
键长的rmsd (Å)	0.010
键角rmsd (°)	0.856
$R_{\text{工作}} (R_{\text{work}})^b$ (%)	19.27
$R_{\text{自由}} (R_{\text{free}})^c$ (%)	21.60
蛋白质的平均B因子	97.10
拉马钱德兰图 (%)	
偏向值	96.34
容许值	3.48
极端值	0.17

[0233] 括号中的值是指最高分辨率槽(shell)。

[0234] $^a R_{\text{合并}} = \sum \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum \sum_i |I(h)_i|$, 其中 $\langle I(h) \rangle$ 是等同物的平均强度。[0235] $^b R_{\text{工作}} = \sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$, 其中 F_o 和 F_c 分别是观察到的和计算的结构因子振幅。[0236] $^c R_{\text{自由}} = \sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$, 使用测试数据集(随机地选自观察到的反射的总数据

的5%)计算的。

[0237] 实施例8:通过SPR进行抗体445-3的表位鉴定

[0238] 在OX40和抗体445-3Fab的共晶体结构的指导下,我们选择并产生了人OX40蛋白中的一系列单个突变,以进一步鉴定本公开文本的抗OX40抗体的关键表位。使用定点诱变试剂盒(目录号:AP231-11,TransGen)对人OX40/IgG1融合构建体进行单点突变。通过测序验证所需突变。通过转染到293G细胞中实现OX40突变体的表达和制备,并将其使用蛋白A柱(目录号:17-5438-02,GE Life Sciences)纯化。

[0239] 使用BIAcore 8K(GE Life Sciences)通过SPR测定表征OX40点突变体对445-3Fab的结合亲和力。简而言之,使用EDC和NHS将OX40突变体和野生型OX40固定在CM5生物传感器芯片(目录号:BR100530,GE Life Sciences)上。然后使用接触时间180s和解离时间600s以30 μ l/min使HBS-EP+缓冲液(目录号:BR-1008-26,GE Life Sciences)中的445-3Fab的连续稀释液在芯片表面上流过。通过使用一对一朗格缪尔结合模型(BIA Evaluation Software,GE Life Sciences)分析表面等离子体共振信号的变化以计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。平衡解离常数(K_D)计算为比率 k_d/k_a 。突变体的 K_D 移位倍数计算为比率突变型 K_D /WT K_D 。通过SPR测定的表位鉴定的概况汇总在图5和表8中。结果指示,OX40中残基H153、I165和E167突变为丙氨酸显著地降低了抗体445-3与OX40的结合,并且残基T154和D170突变为丙氨酸使抗体445-3与OX40的结合适度降低。

[0240] 抗体445-3与OX40的残基H153、T154、I165、E167和D170的详细相互作用示于图6中。OX40上的H153的侧链被相互作用界面上的445-3的小口袋包围,从而与_重S31和_重G102形成氢键,并与_重Y101形成 π - π 堆叠。E167的侧链与_重Y50和_重N52形成氢键,而D170分别与_重S31和_重K28形成氢键和盐桥,这可以进一步稳定复合物。T154与_重Y105、I165与_重R59之间的范德华(VDW)相互作用有助于抗体445-3对OX40的高亲和力。

[0241] 总之,OX40的残基H153、I165和E167被鉴定为与抗体445-3相互作用的重要残基。此外,OX40的氨基酸T154和D170也是抗体445-3的重要接触残基。该数据指示抗体445-3的表位是OX40的残基H153、T154、I165、E167和D170。这些表位存在于序列**HTLQPASNSSDAICEDRD**(SEQ ID NO: 30)中,其中重要的接触残基用粗体和下划线表示。

[0242] 表8.通过SPR测定的抗体445-3的表位鉴定

突变体	突变型 K_D /WT K_D
H153A	未检测到结合
T154A	8
Q156A	1.9
S161A	1.1
S162A	0.6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

[0244] 显著影响:未检测到结合,或突变型 K_D /WT K_D 的值大于10。适度影响:突变型 K_D /WT

K_D 在5与10之间取值。非显著影响：突变型 K_D /WT K_D 的值小于5。

[0245] 实施例9：抗OX40抗体445-3不阻断OX40-OX40L相互作用。

[0246] 为了确定抗体445-3是否干扰OX40-OX40L相互作用，建立了基于细胞的流式细胞术测定。在该测定中，将抗体445-3、参考抗体1A7.gr1、对照huIgG或单独的培养基与人OX40和鼠IgG2a Fc的融合蛋白(OX40-mIgG2a)一起预孵育。然后将抗体和融合蛋白复合物添加到表达OX40L的HEK293细胞中。如果OX40抗体不干扰OX40-OX40L相互作用，那么OX40抗体-OX40 mIgG2a复合物仍将与表面OX40L结合，并且使用抗小鼠Fc二级抗体可检测到这种相互作用。

[0247] 如图7所示，抗体445-3即使在高浓度下也不会降低OX40与OX40L的结合，指示445-3不会干扰OX40-OX40L相互作用。这指示445-3不在OX40L结合位点结合或不会结合足够接近以在空间上阻碍OX40L结合。相比之下，阳性对照抗体1A7.gr1完全阻断OX40与OX40L的结合，如图7所示。

[0248] 此外，解析了复合物中OX40与445-3Fab的共晶体结构，并与OX40/OX40L复合物(PDB码：2HEV)对齐，如图8所示。OX40配体三聚体主要通过OX40的CRD1(富含半胱氨酸的结构域)、CRD2和部分CRD3区与OX40相互作用(Compaan和Hymowitz, 2006)，而抗体445-3仅通过CRD4区与OX40相互作用。总之，445-3抗体和OX40L三聚体在OX40的不同区域结合并且抗体445-3不干扰OX40/OX40L相互作用。该结果与上述实施例中描述的表位作图数据相关。OX40的CRD4位于氨基酸127-167处，并且抗体445-3的表位与该区域部分重叠。OX40 CRD4的序列(氨基酸127-167)如下所示，并且445-3表位的部分重叠用粗体和下划线表示：

[0249] PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHITLQPASNSSDAICE (SEQ ID NO: 31)。

[0250] 实施例10：抗OX40抗体445-3的激动活性

[0251] 为了研究抗体445-3的激动功能，将OX40阳性T细胞系HuT78/OX40与人工抗原呈递细胞(APC)系(HEK293/OS8^低-Fc γ RI)在445-3或1A7.gr1的存在或不存在下共培养过夜，并将IL-2产量用作T细胞刺激的读出。在HEK293/OS8^低-Fc γ RI细胞中，编码膜结合的抗CD3抗体OKT3(OS8)(如美国专利号8,735,553中披露的)和人Fc γ RI(CD64)的基因被稳定地共转导到HEK293细胞中。由于抗OX40抗体诱导的免疫激活取决于抗体交联(Voo等人, 2013)，HEK293/OS8^低-Fc γ RI上的Fc γ RI提供了在抗OX40抗体与OX40和Fc γ RI二者的双重接合后抗OX40抗体介导的OX40的交联的基础。如图9所示，抗OX40抗体445-3以剂量依赖性方式以0.06ng/ml的EC₅₀高度有效地增强TCR信号传导。还观察到参考Ab 1A7.gr1的略弱的活性。相比之下，对照人IgG(10 μ g/mL)或空白显示出对IL-2产生没有影响。

[0252] 实施例11：抗OX40抗体445-3在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中促进免疫反应

[0253] 为了确定抗体445-3是否可以刺激T细胞激活，如前所述建立混合淋巴细胞反应(MLR)测定(Tourkova等人, 2001)。简而言之，通过用GM-CSF和IL-4培养，然后LPS刺激，从人PBMC衍生的CD14⁺骨髓细胞诱导成熟DC。接下来，在抗OX40 445-3抗体(0.1-10 μ g/ml)存在下，将丝裂霉素C处理的DC与同种异体CD4⁺T细胞共培养2天。通过ELISA检测共培养物中的IL-2产量，将其作为MLR反应的读出。

[0254] 如图10所示，抗体445-3显著地促进IL-2产生，指示了445-3激活CD4⁺T细胞的能力。相比之下，参考抗体1A7.gr1在MLR测定中显示出显著(P<0.05)较弱的活性。

[0255] 实施例12:抗OX40抗体445-3显示出ADCC活性

[0256] 建立基于乳酸脱氢酶 (LDH) 释放的ADCC测定以研究抗体445-3是否可以杀死表达OX40^{Hi}的靶细胞。通过将CD16v158 (V158等位基因) 和FcR γ 基因共转导到NK细胞系NK92MI (ATCC, 弗吉尼亚州马纳萨斯) 中, 产生NK92MI/CD16V细胞系作为效应细胞。将表达OX40的T细胞系HuT78/OX40用作靶细胞。将相同数目 (3×10^4) 的靶细胞和效应细胞在抗OX40抗体 (0.004-3 μ g/ml) 或对照Ab的存在下共培养5小时。使用CytoTox 96非放射性细胞毒性测定试剂盒 (Promega, 威斯康星州麦迪逊) 通过LDH释放评价细胞毒性。通过下面所示的公式计算特异性裂解。

$$[0257] \quad \text{特异性裂解\%} = \frac{\text{实验值} - \text{效应细胞自发裂解值} - \text{靶细胞自发裂解值}}{\text{靶细胞裂解最大值} - \text{靶细胞自发裂解值}} \times 100$$

[0258] 如图11所示, 抗体445-3在以剂量依赖性方式 (EC_{50} : 0.027 μ g/mL) 经由ADCC杀死OX40^{Hi}靶标中显示出高效力。抗体445-3的ADCC作用类似于1A7.gr1对照抗体的ADCC作用。相比之下, 与对照人IgG或空白相比, 具有S228P和R409K突变的IgG4 Fc形式的445-3 (445-3-IgG4) 未显示出任何显著的ADCC作用。结果与先前的发现一致, 即IgG4 Fc的ADCC是弱的或沉默的 (An Z等人mAbs 2009)。

[0259] 实施例13: 抗OX40抗体445-3在体外优先耗尽CD4⁺Treg并增加CD8⁺Teff/Treg比率

[0260] 已经在几种动物肿瘤模型中显示, 抗OX40抗体可以耗尽肿瘤浸润的OX40^{Hi}Treg并增加CD8⁺T细胞与Treg的比率 (Bulliard等人, 2014; Carboni等人, 2003; Jacquemin等人, 2015; Marabelle等人, 2013b)。因此, 免疫反应增强, 从而导致肿瘤消退和生存期延长。

[0261] 考虑到体外激活的或肿瘤内的CD4⁺Foxp3⁺Treg优先表达OX40而不是其他T细胞亚群的事实 (Lai等人, 2016; Marabelle等人, 2013b; Montler等人, 2016; Soroosh等人, 2007; Timperi等人, 2016), 建立基于人PBMC的测定以研究抗体445-3杀死OX40^{Hi}细胞 (特别是Treg) 的能力。简而言之, 将PBMC通过PHA-L (1 μ g/mL) 预激活1天以诱导OX40表达, 并将其用作靶细胞。然后将效应NK92MI/CD16V细胞 (如实施例12中所述, 5×10^4) 与相等数目的靶细胞在抗OX40抗体 (0.001-10 μ g/mL) 或安慰剂的存在下共培养过夜。通过流式细胞术测定每个T细胞亚群的百分比。如图12A和图12B所示, 用抗体445-3处理以剂量依赖性方式诱导CD8⁺T细胞百分比的增加和CD4⁺Foxp3⁺Treg百分比的降低。结果是CD8⁺T细胞与Treg的比率大大提高 (图12C)。用1A7.gr1处理获得较弱的结果。该结果证明了445-3通过增强CD8⁺T细胞功能诱导抗肿瘤免疫但限制Treg介导的免疫耐受的治疗性应用。

[0262] 实施例14: 抗OX40抗体445-3在小鼠肿瘤模型中发挥剂量依赖性抗肿瘤活性

[0263] 在小鼠肿瘤模型中显示了抗OX40抗体445-3的功效。将鼠MC38结肠肿瘤细胞皮下植入对于人OX40转基因的C57小鼠 (Biocytogen, 中国北京) 中。植入肿瘤细胞后, 每周测量两次肿瘤体积, 并使用下式以mm³为单位进行计算: $V = 0.5 (a \times b^2)$, 其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。当肿瘤大小达到大约190mm³的平均体积时, 将小鼠随机分成7组, 并每周腹腔内注射一次445-3或1A7.gr1抗体, 持续三周。将人IgG作为同种型对照给予。部分消退 (PR) 定义为在三次连续测量中在给药的第一天小于起始肿瘤体积的50%的肿瘤体积。使用下式计算肿瘤生长抑制 (TGI):

$$[0264] \quad \text{生长抑制}\% = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{处理}_t) - (\text{处理}_{t_0})}{(\text{安慰剂}_t) - (\text{安慰剂}_{t_0})} \right) \right)$$

[0265] 处理_t = 在时间_t处理的肿瘤体积

[0266] 处理_{t₀} = 在时间0处理的肿瘤体积

[0267] 安慰剂_t = 在时间_t安慰剂的肿瘤体积

[0268] 安慰剂_{t₀} = 在时间0安慰剂的肿瘤体积

[0269] 结果证明, 445-3以0.4mg/kg、2mg/kg和10mg/kg的剂量通过腹膜内注射的方式具有剂量依赖性抗肿瘤功效。445-3的给予导致53% (0.4mg/kg)、69% (2mg/kg) 和94% (10mg/kg) 肿瘤生长抑制, 并导致从基线的0% (0.4mg/kg)、17% (2mg/kg) 和33% (10mg/kg) 部分消退。相比之下, 未观察到抗体1A7.gr1实现的部分消退。体内数据指示配体非阻断抗体445-3比OX40-OX40L阻断抗体1A7.gr1更适合于抗肿瘤疗法 (图13A和图13B, 表9)。

[0270] 表9. 445-3和1A7.gr1在鼠MC38结肠肿瘤小鼠模型中的功效

[0271]

<u>处理</u>	<u>QW剂量</u> <u>(mg/kg)</u>	<u>N</u>	<u>部分消退率</u>	<u>第21天的平均肿瘤</u> <u>体积 (mm³)</u>	<u>第21天的</u> <u>TGI (%)</u>
445-3	0.4	6	0%	953	53
	2	6	17%	696	69
	10	6	33%	280	94
1A7.gr1	0.4	6	0%	886	57
	2	6	0%	1163	41
	10	6	0%	1030	49

[0272] 实施例15: 抗OX40抗体的氨基酸改变

[0273] 选择几个氨基酸进行改变用于改善OX40抗体。进行氨基酸改变以改善亲和力或增加人源化。针对适当的氨基酸改变设计PCR引物组, 合成并用于修饰抗OX40抗体。例如, 重链中K28T和轻链中S24R的改变导致通过FACS测定的EC₅₀比原始的445-2抗体增加了1.7倍。重链中Y27G和轻链中S24R的改变导致通过Biacore测定的K_d比原始的445-2抗体增加了1.7倍。这些改变汇总在图14A至图14B中。

[0274] 参考文献

[0275] al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavek, M., Brown, M.H., James, W., and Barclay, A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. European journal of immunology 26, 1695-1699.

[0276] An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. (2009). IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. MAbs. 1, 572-579.

[0277] Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB and OX40 are members of a

tumor necrosis factor(TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB.Molecular and cellular biology 18,558-565.

[0278] Aspeslagh,S.,Postel-Vinay,S.,Rusakiewicz,S.,Soria,J.C.,Zitvogel,L., and Marabelle,A. (2016) .Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy.Eur J Cancer 52,50-66.

[0279] Bulliard,Y.,Jolicoeur,R.,Zhang,J.,Dranoff,G.,Wilson,N.S.,and Brogdon, J.L. (2014) .OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγRs,leading to antitumor efficacy.Immunology and cell biology 92,475-480.

[0280] Calderhead,D.M.,Buhlmann,J.E.,van den Eertwegh,A.J.,Claassen,E., Noelle,R.J.,and Fell,H.P. (1993) .Cloning of mouse OX40:a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions.J Immunol 151,5261-5271.

[0281] Carboni,S.,Aboul-Enein,F.,Waltzinger,C.,Killeen,N.,Lassmann,H.,and Pena-Rossi,C. (2003) .CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis.Journal of neuroimmunology 145,1-11.

[0282] Compaan,D.M.,and Hymowitz,S.G. (2006) .The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex.Structure 14,1321-1330.

[0283] Croft,M. (2010) .Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134) .Annual review of immunology 28,57-78.

[0284] Croft,M.,So,T.,Duan,W.,and Soroosh,P. (2009) .The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease.Immunological reviews 229,173-191.

[0285] Curti,B.D.,Kovacs-Bankowski,M.,Morris,N.,Walker,E.,Chisholm,L., Floyd,K.,Walker,J.,Gonzalez,I.,Meeuwsen,T.,Fox,B.A.,et al. (2013) .OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients.Cancer research 73,7189-7198.

[0286] Durkop,H.,Latza,U.,Himmelreich,P.,and Stein,H. (1995) .Expression of the human OX40(hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues.British journal of haematology 91,927-931.

[0287] Gough,M.J.,and Weinberg,A.D. (2009) .OX40 (CD134) and OX40L.Advances in experimental medicine and biology 647,94-107.

[0288] Gramaglia,I.,Weinberg,A.D.,Lemon,M.,and Croft,M. (1998) .Ox-40 ligand:a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses.J Immunol 161,6510-6517.

[0289] Guo,Z.,Cheng,D.,Xia,Z.,Luan,M.,Wu,L.,Wang,G.,and Zhang,S. (2013) .Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer.Journal of translational

medicine 11,215.

[0290] Hori,S.,Nomura,T.,and Sakaguchi,S. (2003).Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.Science 299,1057-1061.

[0291] Huddleston,C.A.,Weinberg,A.D.,and Parker,D.C. (2006).OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+T cells to effector cells.European journal of immunology 36,1093-1103.

[0292] Ito,T.,Amakawa,R.,Inaba,M.,Hori,T.,Ota,M.,Nakamura,K.,Takebayashi,M.,Miyaji,M.,Yoshimura,T.,Inaba,K.,and Fukuhara,S. (2004).Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs.J Immunol 172,4253-4259.

[0293] Ito,T.,Wang,Y.H.,Duramad,O.,Hanabuchi,S.,Perng,O.A.,Gilliet,M.,Qin,F.X.,and Liu,Y.J. (2006).OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103,13138-13143.

[0294] Jacquemin,C.,Schmitt,N.,Contin-Bordes,C.,Liu,Y.,Narayanan,P.,Seneschal,J.,Maurouard,T.,Dougall,D.,Davizon,E.S.,Dumortier,H.,et al. (2015).OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response.Immunity 42,1159-1170.

[0295] Kjaergaard,J.,Tanaka,J.,Kim,J.A.,Rothchild,K.,Weinberg,A.,and Shu,S. (2000).Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth.Cancer research 60,5514-5521.

[0296] Ladanyi,A.,Somlai,B.,Gilde,K.,Fejos,Z.,Gaudi,I.,and Timar,J. (2004).T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 10,521-530.

[0297] Lai,C.,August,S.,Albibas,A.,Behar,R.,Cho,S.Y.,Polak,M.E.,Theaker,J.,MacLeod,A.S.,French,R.R.,Glennie,M.J.,et al. (2016).OX40+Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 22,4236-4248.

[0298] Marabelle,A.,Kohrt,H.,and Levy,R. (2013a).Intratumoral anti-CTLA-4therapy:enhancing efficacy while avoiding toxicity.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 19,5261-5263.

[0299] Marabelle,A.,Kohrt,H.,Sagiv-Barfi,I.,Ajami,B.,Axtell,R.C.,Zhou,G.,Rajapaksa,R.,Green,M.R.,Torchia,J.,Brody,J.,et al. (2013b).Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors.The Journal of clinical investigation 123,2447-2463.

- [0300] Montler, R., Bell, R.B., Thalhoffer, C., Leidner, R., Feng, Z., Fox, B.A., Cheng, A.C., Bui, T.G., Tucker, C., Hoen, H., and Weinberg, A. (2016). OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clinical & translational immunology* 5, e70.
- [0301] Morris, N.P., Peters, C., Montler, R., Hu, H.M., Curti, B.D., Urban, W.J., and Weinberg, A.D. (2007). Development and characterization of recombinant human Fc: OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.
- [0302] Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-3848.
- [0303] Petty, J.K., He, K., Corless, C.L., Vetto, J.T., and Weinberg, A.D. (2002). Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *American journal of surgery* 183, 512-518.
- [0304] Redmond, W.L., and Weinberg, A.D. (2007). Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Critical reviews in immunology* 27, 415-436.
- [0305] Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.
- [0306] Ruby, C.E., and Weinberg, A.D. (2009). OX40-enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age. *J Immunol* 182, 1481-1489.
- [0307] Sarff, M., Edwards, D., Dhungel, B., Wegmann, K.W., Corless, C., Weinberg, A.D., and Vetto, J.T. (2008). OX40 (CD134) expression in sentinel lymph nodes correlates with prognostic features of primary melanomas. *American journal of surgery* 195, 621-625; discussion 625.
- [0308] Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L.C., and Sugamura, K. (2002). Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *European journal of immunology* 32, 3326-3335.
- [0309] Smyth, M.J., Ngiow, S.F., and Teng, M.W. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. *Immunology and cell biology* 92, 473-474.
- [0310] Song, A., Tang, X., Harms, K.M., and Croft, M. (2005a). OX40 and Bcl-xL promote the persistence of CD8 T cells to recall tumor-associated antigen. *J Immunol* 175, 3534-3541.
- [0311] Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., and Croft, M. (2005b). Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* 22, 621-631.
- [0312] Song, J., So, T., and Croft, M. (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40

contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol* 180, 7240-7248.

[0313] Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺T cells. *J Immunol* 179, 5014-5023.

[0314] St Rose, M.C., Taylor, R.A., Bandyopadhyay, S., Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Vella, A.T., and Adler, A.J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN- γ maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and cell biology* 91, 173-183.

[0315] Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., and Strober, W. (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, 507-521.

[0316] Szypowska, A., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Luczynski, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4⁺CD25^{high} cells in children with type 1 diabetes. *Advances in medical sciences* 59, 39-43.

[0317] Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., Caronna, R., Del Bene, G., Longo, F., Ciardi, A., et al. (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 5, e1175800.

[0318] Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunology letters* 78, 75-82.

[0319] Vetto, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M., and Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *American journal of surgery* 174, 258-265.

[0320] Voo, K.S., Bover, L., Harline, M.L., Vien, L.T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L.W., and Liu, Y.J. (2013). Antibodies targeting human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *J Immunol* 191, 3641-3650.

[0321] Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J.T., Urba, W.J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol* 164, 2160-2169.

[0322] Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C., and Whitham, R.H. (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, 1818-1826.

[0323] Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M.S. (2017). OX40:

Structure and function-What questions remain?Molecular immunology 83,13-22.

[0324] Zander,R.A.,Obeng-Adjei,N.,Guthmiller,J.J.,Kulu,D.I.,Li,J.,Ongoiba,A.,Traore,B.,Crompton,P.D.,and Butler,N.S.(2015).PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk Regulates Helper T Cell Differentiation and Anti-Plasmodium Humoral Immunity.Cell hostµbe 17,628-641.

[0325] Zhang,T.,Lemoi,B.A.,and Sentman,C.L.(2005).Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy.Blood 106,1544-1551.

[0001] 序列表
 [0002] <110> 百济神州有限公司(BeiGene, Ltd.)
 [0003] Liu, Ye
 [0004] Zhang, Tong
 [0005] Wang, Zuobai
 [0006] Li, Kang
 [0007] <120> 抗OX40抗体和使用方法
 [0008] <130> F19W0526PCT
 [0009] <160> 31
 [0010] <170> PatentIn 3.5版
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 277
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> 智人
 [0015] <400> 1
 [0016] Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 [0019] 20 25 30
 [0020] Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 [0021] 35 40 45
 [0022] Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 [0023] 50 55 60
 [0024] Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 [0027] 85 90 95
 [0028] Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 [0029] 100 105 110
 [0030] Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 [0031] 115 120 125
 [0032] Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 [0033] 130 135 140
 [0034] Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 [0035] 145 150 155 160
 [0036] Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 [0037] 165 170 175
 [0038] Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr

[0039]	180							185							190								
[0040]	Glu	Ala	Trp	Pro	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Thr	Arg	Pro	Val	Glu							
[0041]	195							200							205								
[0042]	Val	Pro	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val							
[0043]	210							215							220								
[0044]	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu							
[0045]	225							230							235							240	
[0046]	Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly							
[0047]	245							250							255								
[0048]	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser							
[0049]	260							265							270								
[0050]	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile																		
[0051]	275																						
[0052]	<210>	2																					
[0053]	<211>	216																					
[0054]	<212>	PRT																					
[0055]	<213>	智人																					
[0056]	<400>	2																					
[0057]	Met	Cys	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ala	Leu							
[0058]	1	5				10							15										
[0059]	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Val							
[0060]	20				25							30											
[0061]	Gly	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asn	Asp	Arg	Cys	Cys	His	Glu	Cys	Arg	Pro							
[0062]	35				40							45											
[0063]	Gly	Asn	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Cys							
[0064]	50				55							60											
[0065]	Arg	Pro	Cys	Gly	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Asp	Val	Val	Ser	Ser	Lys	Pro							
[0066]	65				70							75							80				
[0067]	Cys	Lys	Pro	Cys	Thr	Trp	Cys	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Lys							
[0068]	85							90							95								
[0069]	Gln	Leu	Cys	Thr	Ala	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly							
[0070]	100							105							110								
[0071]	Thr	Gln	Pro	Leu	Asp	Ser	Tyr	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Cys	Ala	Pro	Cys							
[0072]	115							120							125								
[0073]	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Gln	Ala	Cys	Lys	Pro	Trp							
[0074]	130							135							140								
[0075]	Thr	Asn	Cys	Thr	Leu	Ala	Gly	Lys	His	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Asn							
[0076]	145				150							155							160				
[0077]	Ser	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Glu	Asp	Arg	Asp	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro							

[0078]	165										170					175					
[0079]	Gln	Glu	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr	Val	Gln	Pro	Thr					
[0080]	180										185					190					
[0081]	Glu	Ala	Trp	Pro	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Thr	Arg	Pro	Val	Glu					
[0082]	195										200					205					
[0083]	Val	Pro	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Ala													
[0084]	210										215										
[0085]	<210> 3																				
[0086]	<211> 5																				
[0087]	<212> PRT																				
[0088]	<213> 小家鼠																				
[0089]	<400> 3																				
[0090]	Ser	Tyr	Ile	Ile	His																
[0091]	1	5																			
[0092]	<210> 4																				
[0093]	<211> 17																				
[0094]	<212> PRT																				
[0095]	<213> 小家鼠																				
[0096]	<400> 4																				
[0097]	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys					
[0098]	1	5										10					15				
[0099]	Gly																				
[0100]	<210> 5																				
[0101]	<211> 11																				
[0102]	<212> PRT																				
[0103]	<213> 小家鼠																				
[0104]	<400> 5																				
[0105]	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr										
[0106]	1	5										10									
[0107]	<210> 6																				
[0108]	<211> 11																				
[0109]	<212> PRT																				
[0110]	<213> 小家鼠																				
[0111]	<400> 6																				
[0112]	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn										
[0113]	1	5										10									
[0114]	<210> 7																				
[0115]	<211> 7																				
[0116]	<212> PRT																				

[0117]	<213>	小家鼠
[0118]	<400>	7
[0119]	Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser	
[0120]	1	5
[0121]	<210>	8
[0122]	<211>	9
[0123]	<212>	PRT
[0124]	<213>	小家鼠
[0125]	<400>	8
[0126]	Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr	
[0127]	1	5
[0128]	<210>	9
[0129]	<211>	120
[0130]	<212>	PRT
[0131]	<213>	小家鼠
[0132]	<400>	9
[0133]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[0134]	1	5 10 15
[0135]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr	
[0136]	20	25 30
[0137]	Ile Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0138]	35	40 45
[0139]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe	
[0140]	50	55 60
[0141]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0142]	65	70 75 80
[0143]	Met Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0144]	85	90 95
[0145]	Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
[0146]	100	105 110
[0147]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
[0148]	115	120
[0149]	<210>	10
[0150]	<211>	360
[0151]	<212>	DNA
[0152]	<213>	小家鼠
[0153]	<400>	10
[0154]	gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60	
[0155]	tcctgcaagg cttctggata taaattcact agctatatta tacactgggt gaagcagaag 120	

[0156] cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaggtac 180
 [0157] aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 [0158] atggagtaca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggggttac 300
 [0159] tacggtagta gctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
 [0160] <210> 11
 [0161] <211> 107
 [0162] <212> PRT
 [0163] <213> 小家鼠
 [0164] <400> 11
 [0165] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 [0166] 1 5 10 15
 [0167] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0168] 20 25 30
 [0169] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
 [0170] 35 40 45
 [0171] Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0172] 50 55 60
 [0173] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 [0174] 65 70 75 80
 [0175] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
 [0176] 85 90 95
 [0177] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Lys Lys
 [0178] 100 105
 [0179] <210> 12
 [0180] <211> 321
 [0181] <212> DNA
 [0182] <213> 小家鼠
 [0183] <400> 12
 [0184] gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 [0185] atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 [0186] gatggaacta ttaaactcct gatctatgac acatcaacct tatactcagg agtcccatca 180
 [0187] aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattttctca ccatcagcaa cctggaacct 240
 [0188] gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
 [0189] gggaccaagc tggaaaaaa a 321
 [0190] <210> 13
 [0191] <211> 17
 [0192] <212> PRT
 [0193] <213> 人工序列
 [0194] <220>

[0195]	<223> 445-1 HCDR2
[0196]	<400> 13
[0197]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
[0198]	1 5 10 15
[0199]	Gly
[0200]	<210> 14
[0201]	<211> 120
[0202]	<212> PRT
[0203]	<213> 人工序列
[0204]	<220>
[0205]	<223> 445-1 VH pro
[0206]	<400> 14
[0207]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0208]	1 5 10 15
[0209]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
[0210]	20 25 30
[0211]	Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0212]	35 40 45
[0213]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
[0214]	50 55 60
[0215]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0216]	65 70 75 80
[0217]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0218]	85 90 95
[0219]	Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0220]	100 105 110
[0221]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0222]	115 120
[0223]	<210> 15
[0224]	<211> 360
[0225]	<212> DNA
[0226]	<213> 人工序列
[0227]	<220>
[0228]	<223> 445-1 VH DNA
[0229]	<400> 15
[0230]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaagggtg 60
[0231]	tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
[0232]	ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgacgg cacacggtac 180
[0233]	aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acaagcgata agtctaccag cacagcctat 240

[0234]	atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac	300
[0235]	tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgc agtgagctcc	360
[0236]	<210> 16	
[0237]	<211> 107	
[0238]	<212> PRT	
[0239]	<213> 人工序列	
[0240]	<220>	
[0241]	<223> 445-1 VK pro	
[0242]	<400> 16	
[0243]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0244]	1 5 10 15	
[0245]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr	
[0246]	20 25 30	
[0247]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile	
[0248]	35 40 45	
[0249]	Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0250]	50 55 60	
[0251]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0252]	65 70 75 80	
[0253]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr	
[0254]	85 90 95	
[0255]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0256]	100 105	
[0257]	<210> 17	
[0258]	<211> 321	
[0259]	<212> DNA	
[0260]	<213> 人工序列	
[0261]	<220>	
[0262]	<223> 445-1 VK DNA	
[0263]	<400> 17	
[0264]	gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc	60
[0265]	atcacatgca gcgcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca	120
[0266]	ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac acctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc	180
[0267]	agattctctg gcageggctc cggaaccgac tacaccctga caatctctag cctgcagccc	240
[0268]	gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc	300
[0269]	ggcacaaagg tggagatcaa g	321
[0270]	<210> 18	
[0271]	<211> 17	
[0272]	<212> PRT	

[0273]	<213>	人工序列
[0274]	<220>	
[0275]	<223>	445-2 HCDR2
[0276]	<400>	18
[0277]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln	
[0278]	1	5 10 15
[0279]	Gly	
[0280]	<210>	19
[0281]	<211>	7
[0282]	<212>	PRT
[0283]	<213>	人工序列
[0284]	<220>	
[0285]	<223>	445-2 LCDR2
[0286]	<400>	19
[0287]	Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser	
[0288]	1	5
[0289]	<210>	20
[0290]	<211>	120
[0291]	<212>	PRT
[0292]	<213>	人工序列
[0293]	<220>	
[0294]	<223>	445-2 VH pro
[0295]	<400>	20
[0296]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0297]	1	5 10 15
[0298]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr	
[0299]	20	25 30
[0300]	Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0301]	35	40 45
[0302]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0303]	50	55 60
[0304]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0305]	65	70 75 80
[0306]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0307]	85	90 95
[0308]	Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
[0309]	100	105 110
[0310]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0311]	115	120

[0312]	<210> 21
[0313]	<211> 360
[0314]	<212> DNA
[0315]	<213> 人工序列
[0316]	<220>
[0317]	<223> 445-2 VH DNA
[0318]	<400> 21
[0319]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60
[0320]	tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
[0321]	ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac 180
[0322]	gcccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat 240
[0323]	atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300
[0324]	tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgc agtgagctcc 360
[0325]	<210> 22
[0326]	<211> 107
[0327]	<212> PRT
[0328]	<213> 人工序列
[0329]	<220>
[0330]	<223> 445-2 VK pro
[0331]	<400> 22
[0332]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0333]	1 5 10 15
[0334]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
[0335]	20 25 30
[0336]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
[0337]	35 40 45
[0338]	Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0339]	50 55 60
[0340]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0341]	65 70 75 80
[0342]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
[0343]	85 90 95
[0344]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0345]	100 105
[0346]	<210> 23
[0347]	<211> 321
[0348]	<212> DNA
[0349]	<213> 人工序列
[0350]	<220>

[0351] <223> 445-2 VK DNA
 [0352] <400> 23
 [0353] gacatccaga tgacccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga taggggtgacc 60
 [0354] atcacatgca ggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120
 [0355] ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc 180
 [0356] agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttcaccctga caatctctag cctgcagccc 240
 [0357] gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300
 [0358] ggcacaaagg tggagatcaa g 321
 [0359] <210> 24
 [0360] <211> 17
 [0361] <212> PRT
 [0362] <213> 人工序列
 [0363] <220>
 [0364] <223> 445-3 HCDR2
 [0365] <400> 24
 [0366] Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 [0367] 1 5 10 15
 [0368] Gly
 [0369] <210> 25
 [0370] <211> 11
 [0371] <212> PRT
 [0372] <213> 人工序列
 [0373] <220>
 [0374] <223> 445-3 LCDR1
 [0375] <400> 25
 [0376] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 [0377] 1 5 10
 [0378] <210> 26
 [0379] <211> 120
 [0380] <212> PRT
 [0381] <213> 人工序列
 [0382] <220>
 [0383] <223> 445-3 VH pro
 [0384] <400> 26
 [0385] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0386] 1 5 10 15
 [0387] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 [0388] 20 25 30
 [0389] Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0390]	35	40	45
[0391]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0392]	50	55	60
[0393]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0394]	65	70	75
[0395]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0396]	85	90	95
[0397]	Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0398]	100	105	110
[0399]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0400]	115	120	
[0401]	<210> 27		
[0402]	<211> 360		
[0403]	<212> DNA		
[0404]	<213> 人工序列		
[0405]	<220>		
[0406]	<223> 445-3 VH DNA		
[0407]	<400> 27		
[0408]	caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaagggtg	60	
[0409]	tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca	120	
[0410]	ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacgggtac	180	
[0411]	aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat	240	
[0412]	atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac	300	
[0413]	tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc	360	
[0414]	<210> 28		
[0415]	<211> 107		
[0416]	<212> PRT		
[0417]	<213> 人工序列		
[0418]	<220>		
[0419]	<223> 445-3 VK pro		
[0420]	<400> 28		
[0421]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0422]	1	5	10
[0423]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr		
[0424]	20	25	30
[0425]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Ile Lys Leu Leu Ile		
[0426]	35	40	45
[0427]	Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0428]	50	55	60

[0429]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0430]	65	70 75 80
[0431]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr	
[0432]		85 90 95
[0433]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0434]		100 105
[0435]	<210> 29	
[0436]	<211> 321	
[0437]	<212> DNA	
[0438]	<213> 人工序列	
[0439]	<220>	
[0440]	<223> 445-3 VK DNA	
[0441]	<400> 29	
[0442]	gacatccaga tgacccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc	60
[0443]	atcacatgcc gggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca	120
[0444]	gacggcgcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc	180
[0445]	agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttcaccctga caatctctag cctgcagccc	240
[0446]	gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc	300
[0447]	ggcacaaagg tggagatcaa g	321
[0448]	<210> 30	
[0449]	<211> 18	
[0450]	<212> PRT	
[0451]	<213> 智人	
[0452]	<400> 30	
[0453]	His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp	
[0454]	1	5 10 15
[0455]	Arg Asp	
[0456]	<210> 31	
[0457]	<211> 41	
[0458]	<212> PRT	
[0459]	<213> 智人	
[0460]	<400> 31	
[0461]	Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys	
[0462]	1	5 10 15
[0463]	Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala	
[0464]		20 25 30
[0465]	Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu	
[0466]		35 40

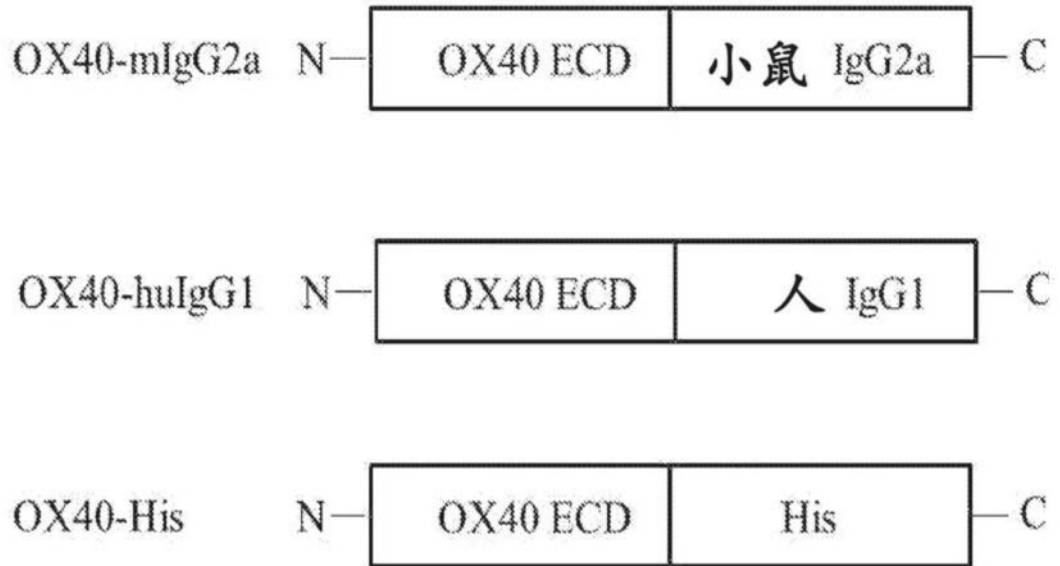


图1

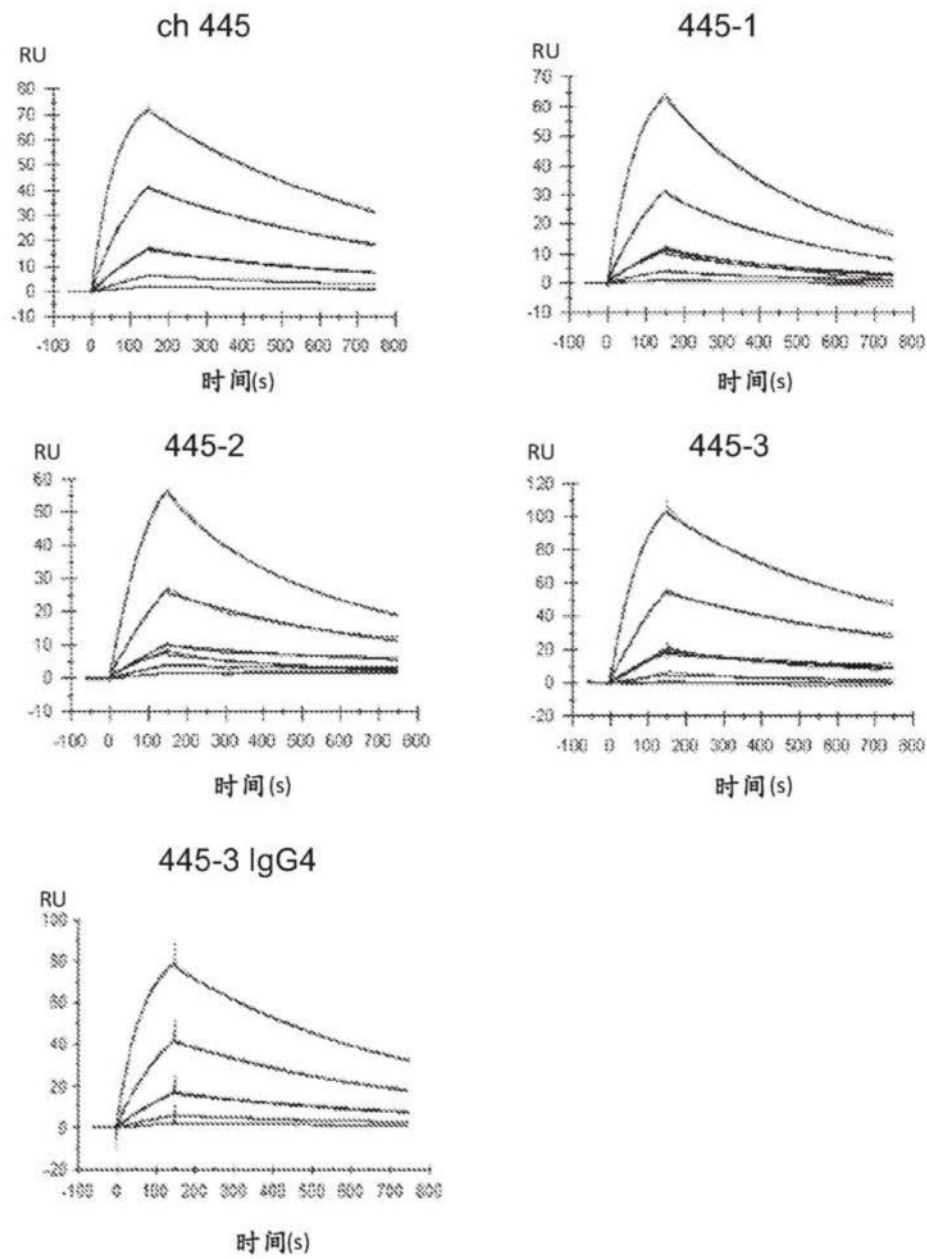


图2

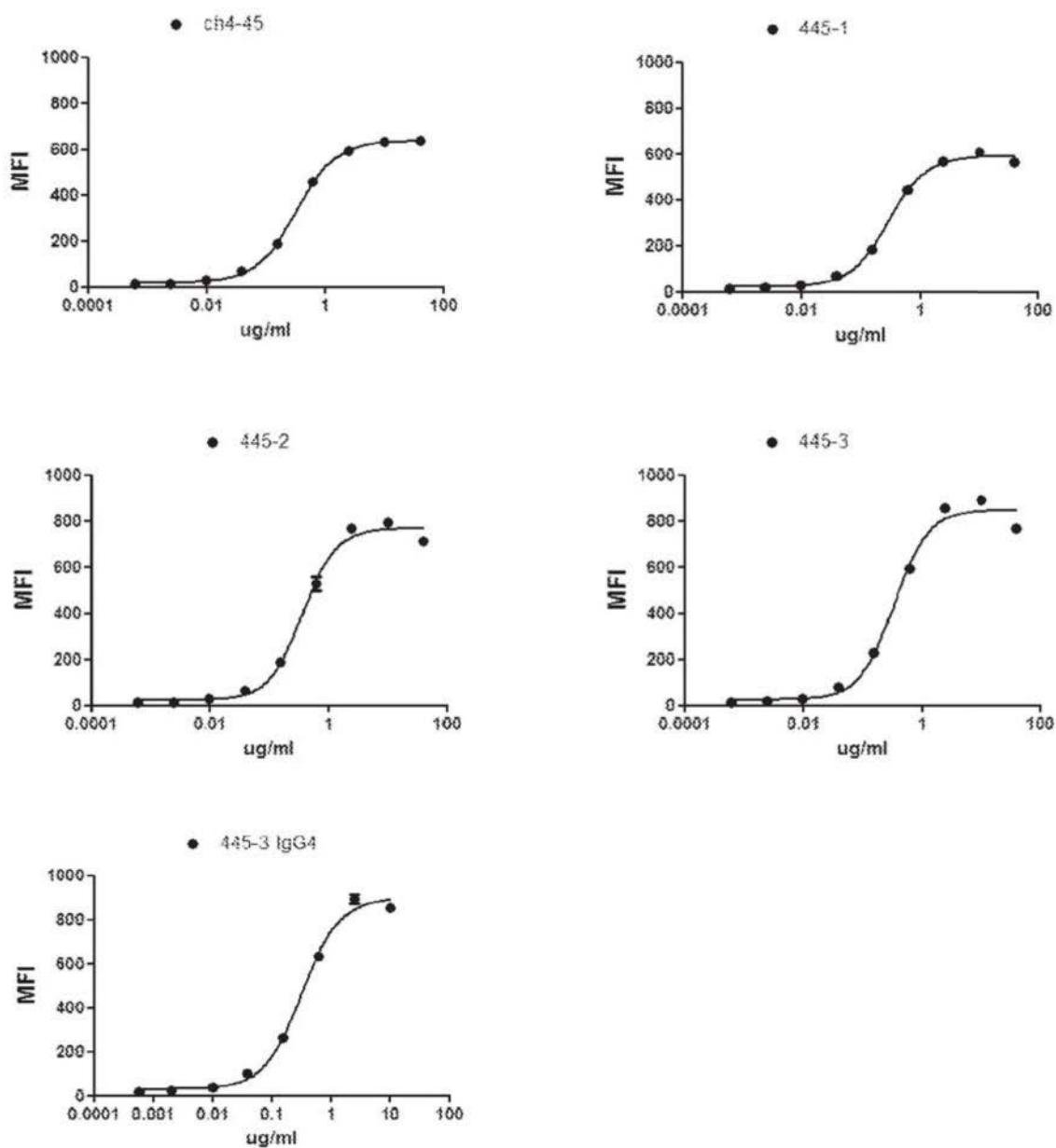


图3

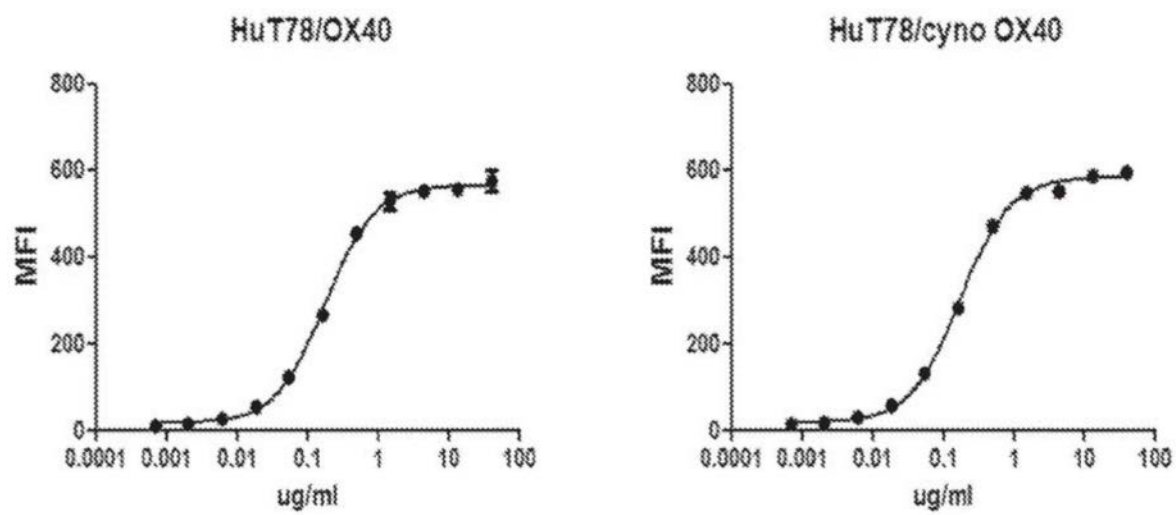


图4

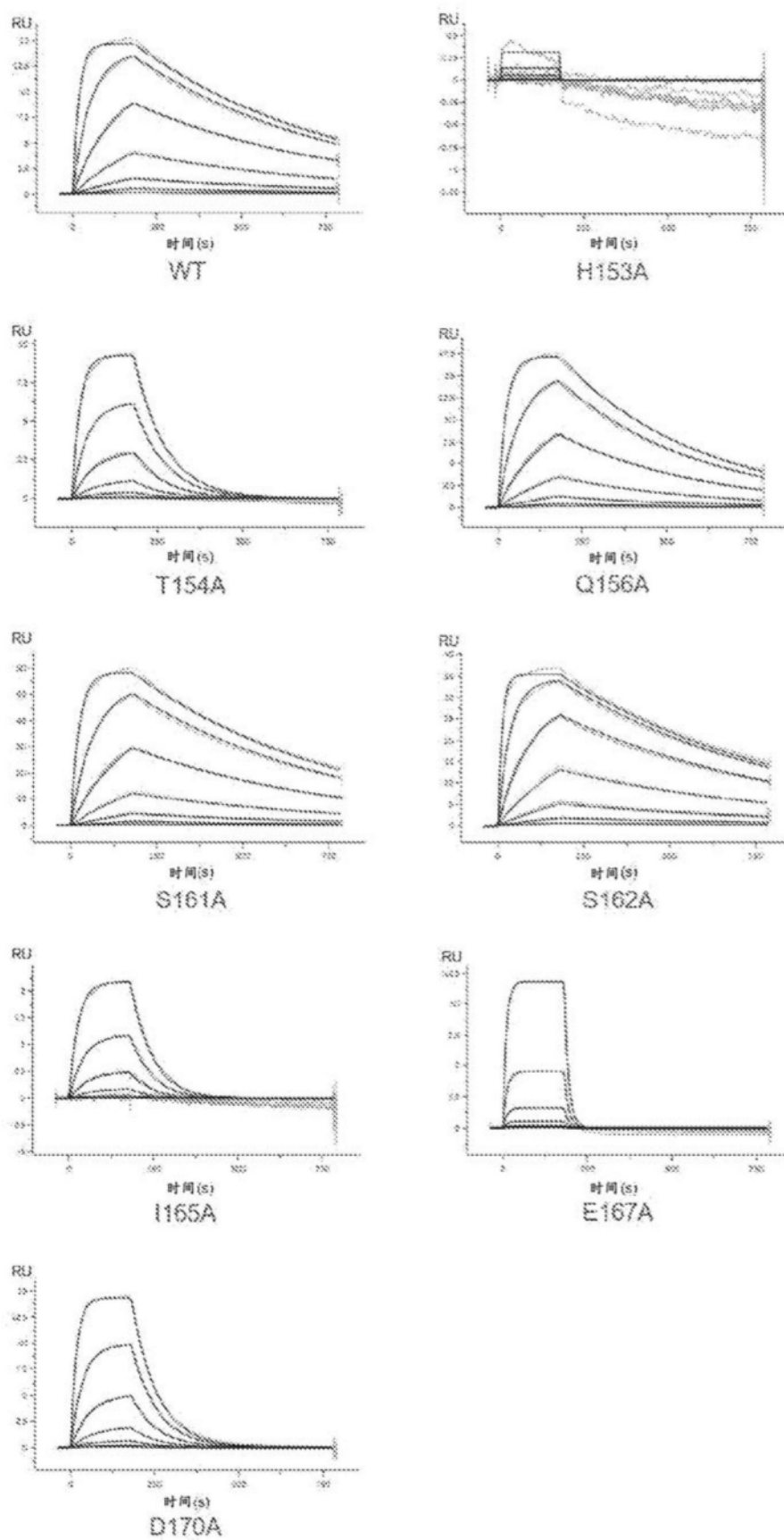


图5

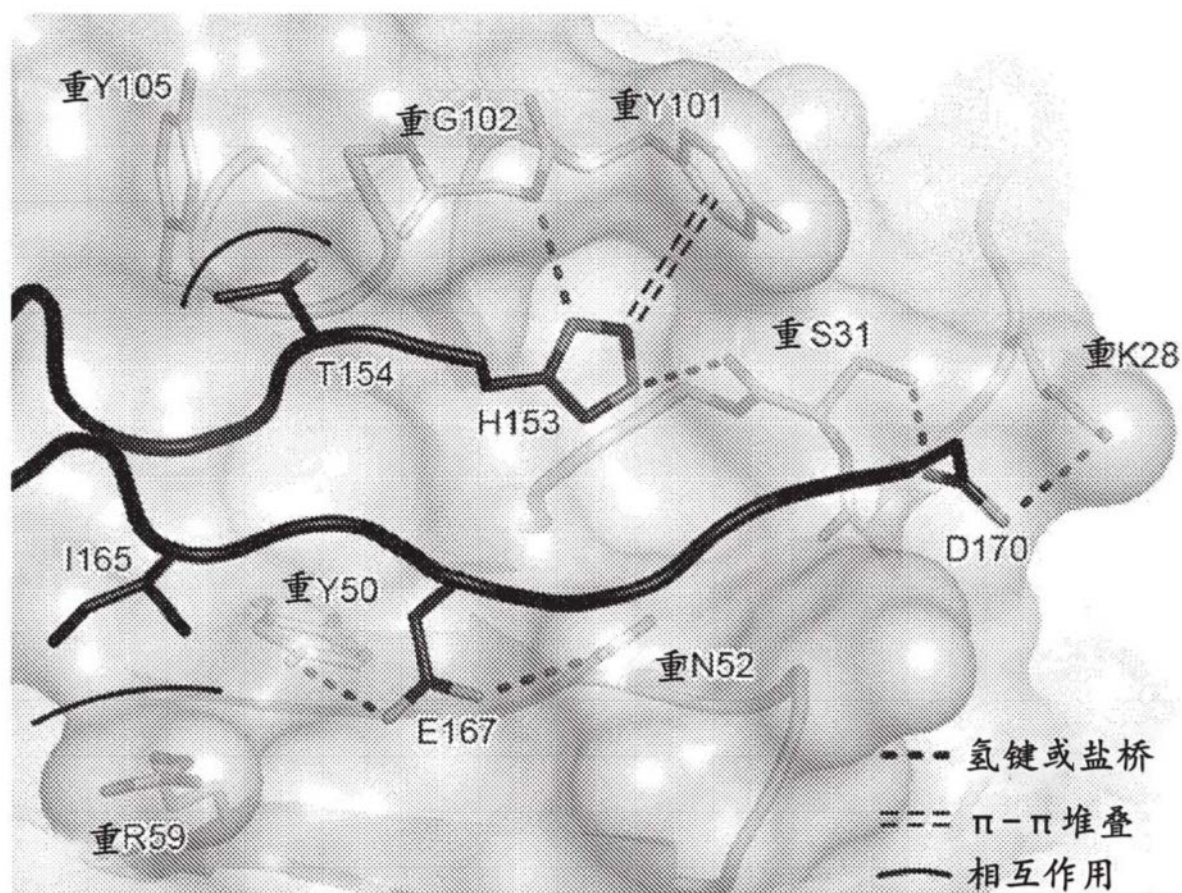


图6

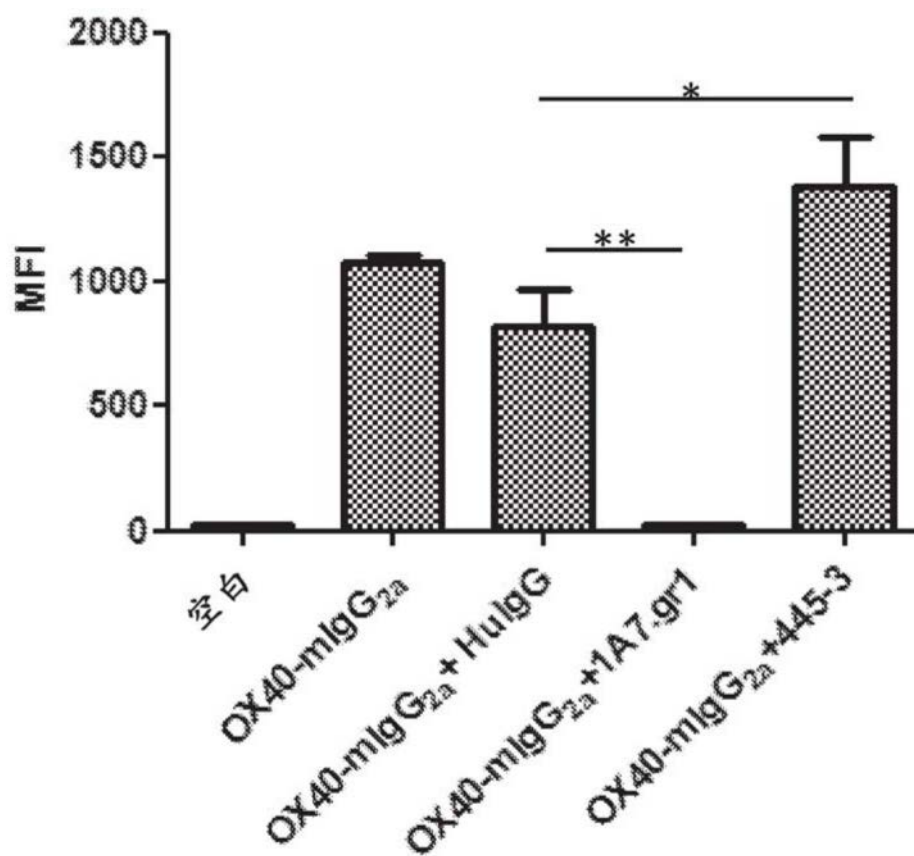


图7

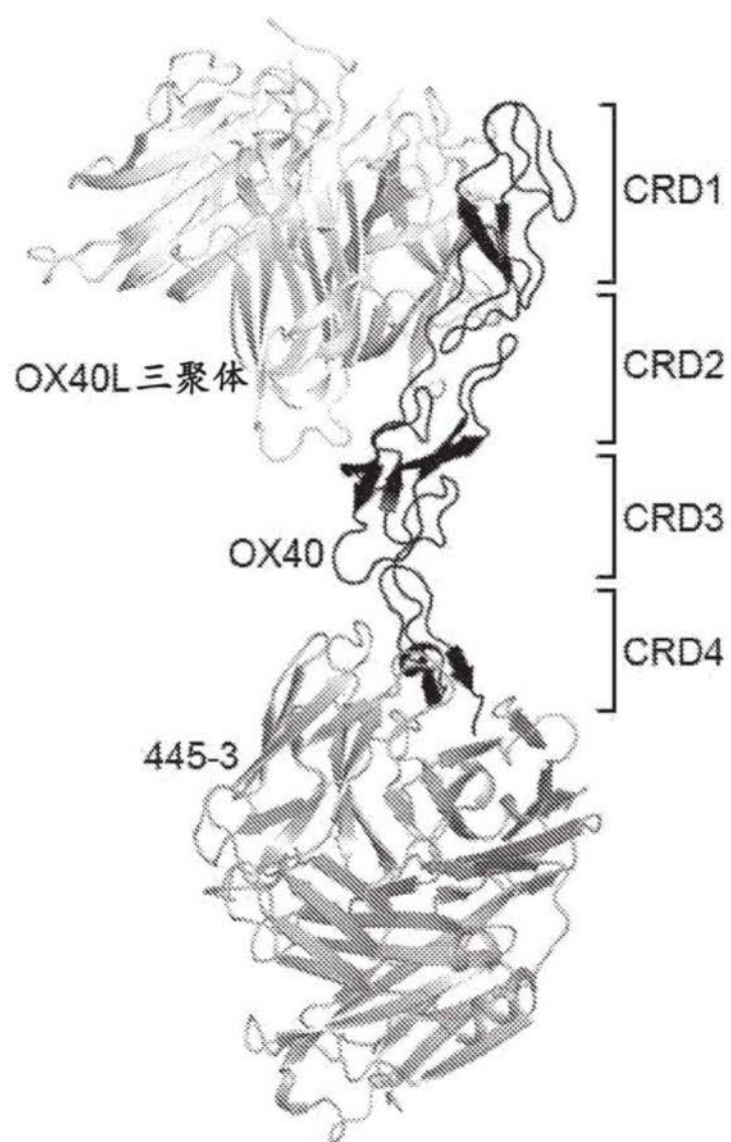


图8

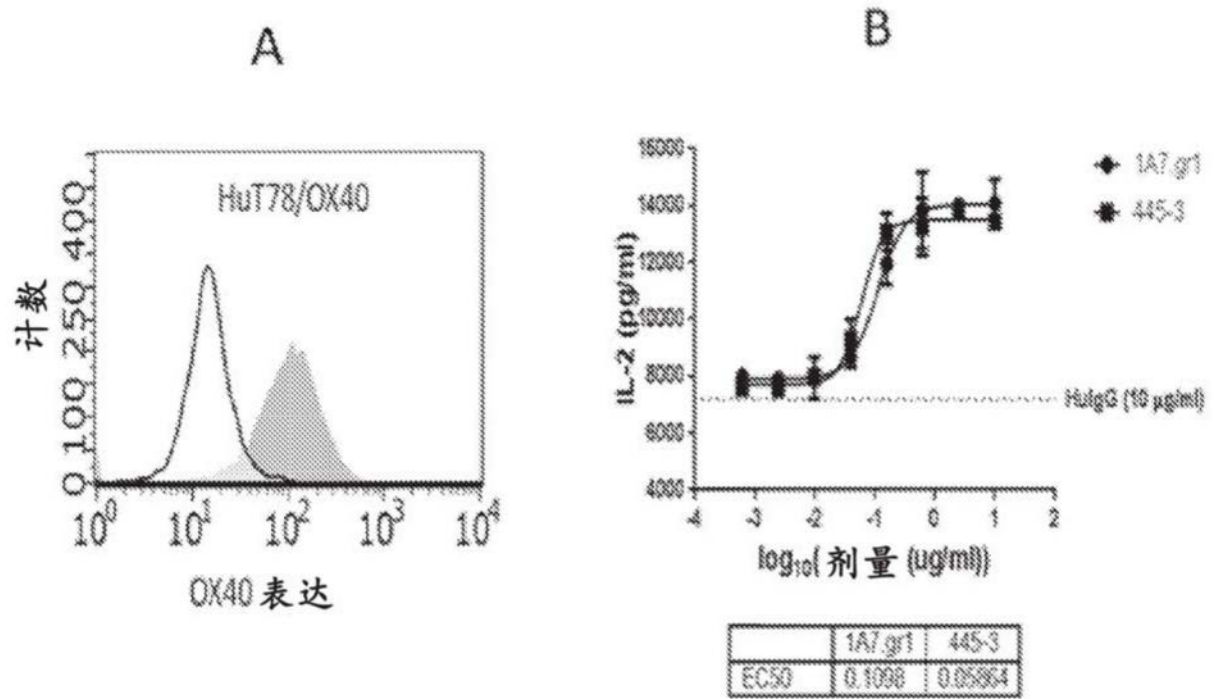


图9A-B

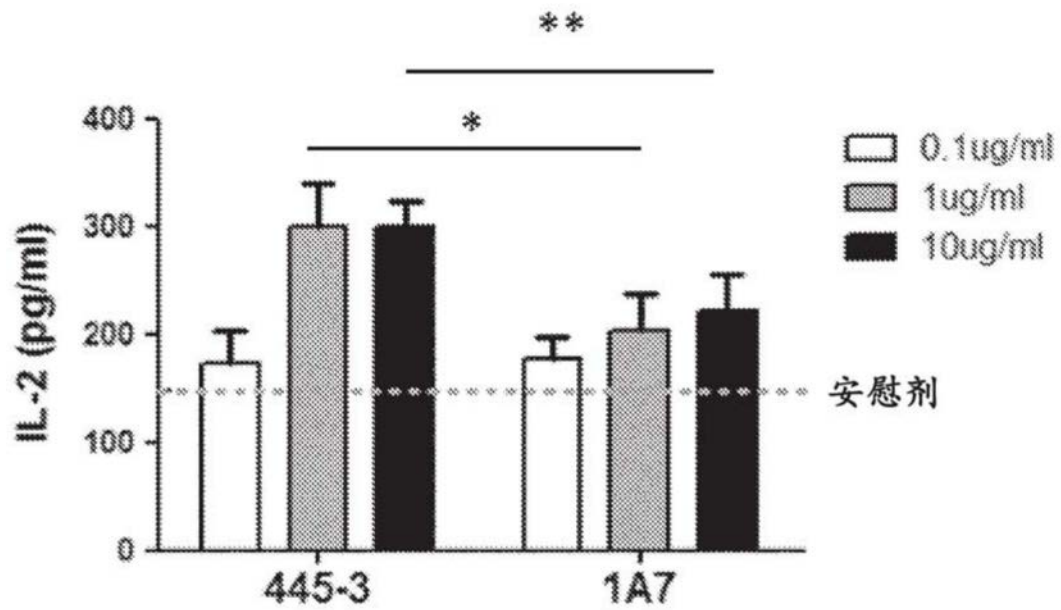


图10

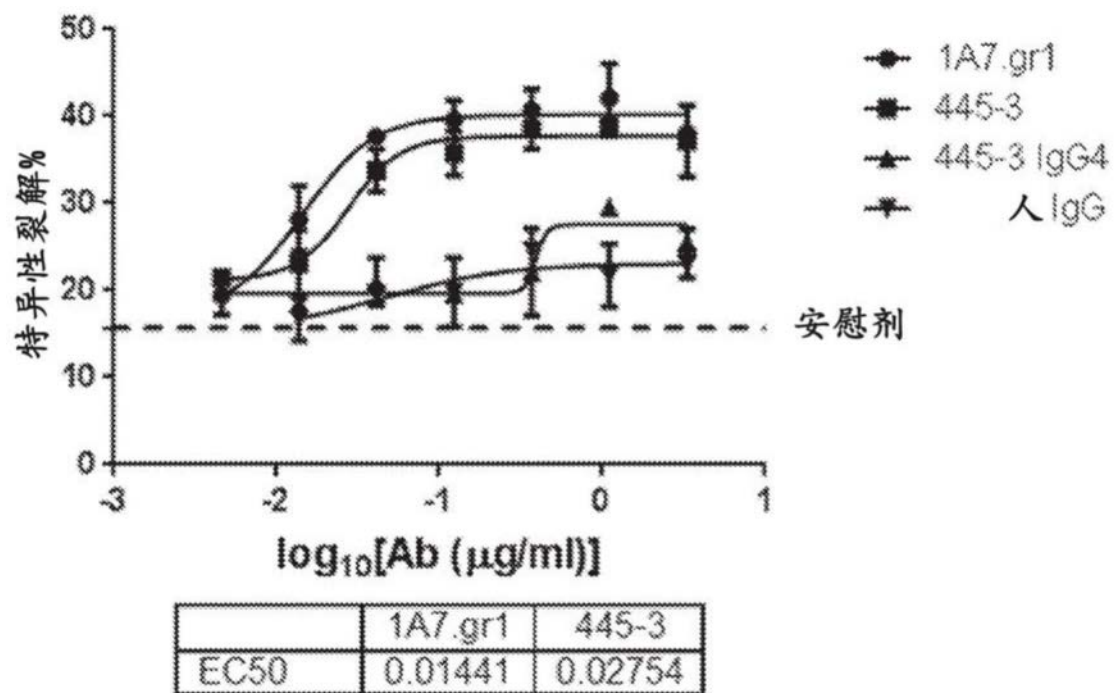


图11

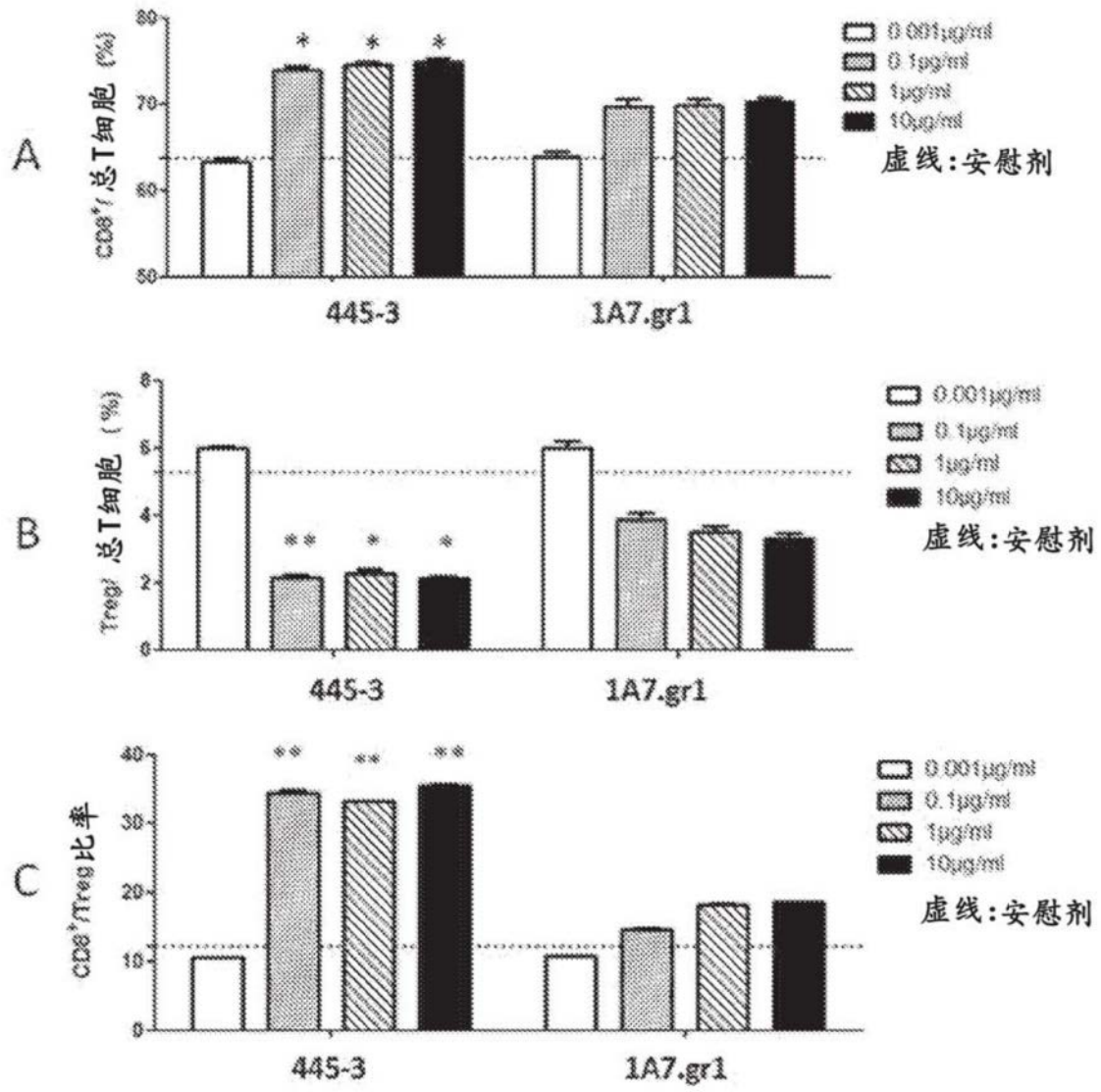


图12A-12C

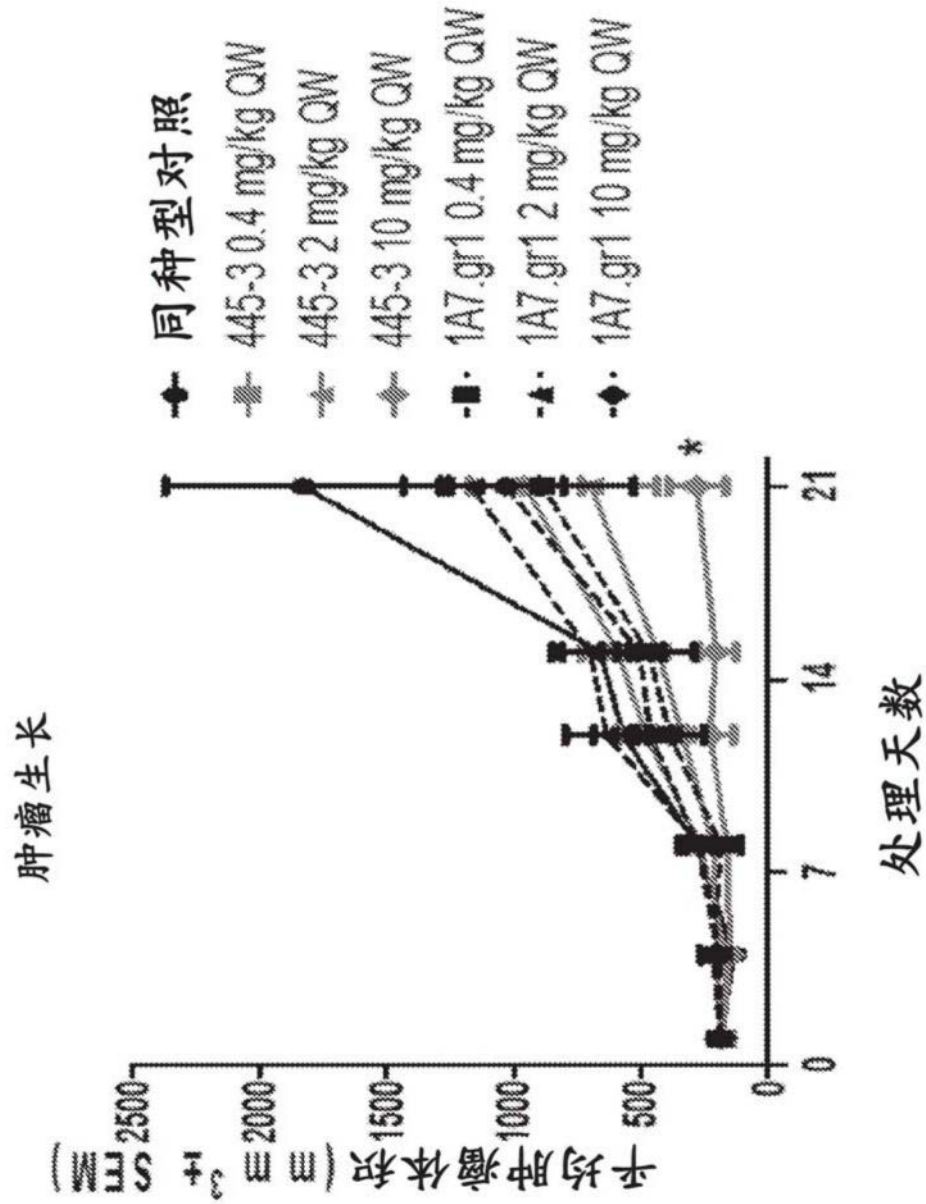


图13A

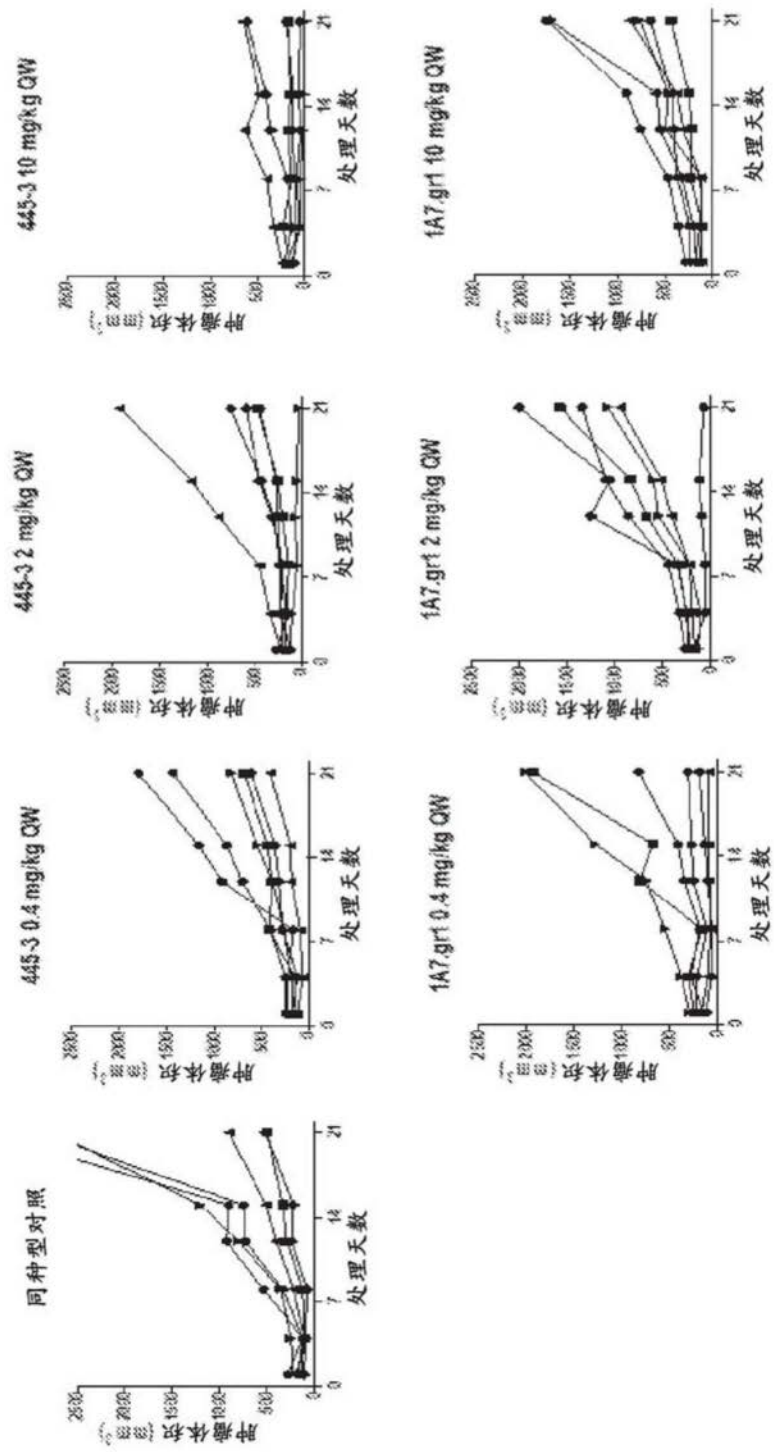


图13B

重链		轻链		用重链和轻链共转染	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR		EC ₅₀ (ng/ml)	最高(MFI)	K _d (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (M)
445-1VH	-	445-1VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.89E-03	1.64E-08
445-1VH-M48I	FR2	445-1VL	-	445-2(M48I)-1 (在VH上具有M48I变的445-1)	353	480	2.30E+05	3.50E-03	1.55E-08
445-1VH	-	445-1VL-S24G	CDR1	445-1-2(S24G) (在VL上具有S24G变的445-1)	307	470	2.22E+05	3.60E-03	1.63E-08
445-1VH	-	445-1VL-S10T/ES1D/D70E	FR1/FR3	445-1-2(S10T/ES1D/D70E) (在VL上具有S10T、E81D和D70E变的445-1)	280	510	2.28E+05	3.40E-03	1.49E-08

图14A

重链		轻链		用重链和轻链共转染		FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC ₅₀ (ng/ml)	最高(MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (M)	
445-2VH	-	445-2VL	-	445-2	397	760	2.06E±05	2.64E-03	1.28E-08	
445-2VH-Q62E-Q65K	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E/Q65K)-3(S24R) (在VH上具有062E和065K突变并且在VL上具有S24R突变的445-2)	318	790	1.87E±05	2.32E-03	1.24E-08	
445-2VH-Q62E	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E)-3(S24R) (在VH上具有062E突变并且在VL上具有S24R突变的445-2)	363	760	1.94E±05	2.27E-03	1.17E-08	
445-2VH-K28T	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(K28T)-3(S24R) (在VH上具有K28T突变并且在VL上具有S24R突变的445-2)	660	750	4.44E±05	5.74E-03	1.29E-08	
445-2VH-Y27G	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Y27G)-3(S24R) (在VH上具有Y27G突变并且在VL上具有S24R突变的445-2)	755	630	6.25E±04	1.35E-03	2.15E-08	
445-2VH-T30S	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(T30S)-3(S24R) (在VH上具有T30S突变并且在VL上具有S24R突变的445-2)	405	800	2.91E±05	3.81E-03	1.31E-08	
445-3VH	-	445-3VL	-	445-3	462	990	1.74E±05	1.48E-03	8.51E-09	
445-2VH-A61N-K28R	CDR2/FR1	445-3VL	-	445-3(A61N-K28R)-3 (具有A61N和K28R突变的445-2 VH以及445-3 VL)	369	1080	1.57E±05	1.15E-03	7.35E-09	
445-2VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N-K63R)-3 (具有A61N和K63R突变的445-2 VH以及445-3 VL)	483	1100	1.61E±05	1.55E-03	9.65E-09	
445-3VH	-	445-2VL-G41D-K42G-S24R-K93R	FR2/CDR1/CDR3	445-3-(G41D-K42G-S24R-K93R) (445-3 VH以及具有G41D、K42G、S24R和K93R突变的445-2 VL)	337	1050	2.12E±05	1.68E-03	7.90E-09	

图14B