



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201942135 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：108110741

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 27 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/03/28

中國大陸

201810267050.4

(71)申請人：大陸商江蘇恒瑞醫藥股份有限公司(中國大陸)JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：黃浩 HUANG, HAO (CN)；方言 FANG, YAN (CN)；顏貞 YAN, ZHEN (CN)；石瑞君 SHI, RUIJUN (CN)；蔣家驊 JIANG, JIAHUA (CN)；曹國慶 CAO, GUOQING (CN)；張連山 ZHANG, LIANSHAN (CN)

(74)代理人：洪蘭心

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：6 共 46 頁

(54)名稱

抗 CD27 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

(57)摘要

本發明關於一種抗 CD27 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。更進一步，本發明關於一種包含所述抗 CD27 抗體 CDR 區的人源抗體，以及包含人抗 CD27 抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。尤其，本發明關於一種人抗 CD27 抗體及其在製備用於治療 CD27 媒介的疾病或病症的藥物中的用途。

The invention relates to an anti-CD27 antibody, an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutical use thereof. Further, the invention relates to a humanized antibody including CDR regions of the anti-CD27 antibody, and a pharmaceutical composition including human anti-CD27 antibodies and antigen binding fragments thereof, and a use thereof as anticancer drugs. Especially, the invention relates to a human anti-CD27 antibody and a use thereof of preparation of a medicine for the treatment of CD27-mediated diseases or disorders.

指定代表圖：

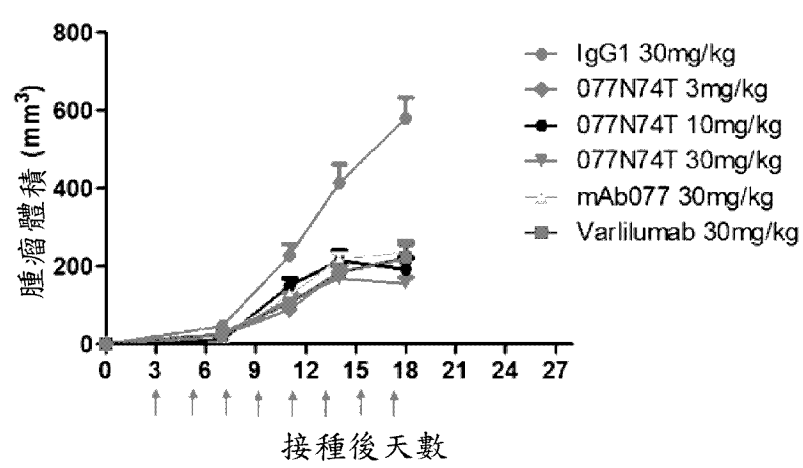


圖5

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗CD27抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

【英文發明名稱】ANTI-CD27 ANTIBODY, ANTIGEN BINDING FRAGMENT THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本申請要求申請日為2018年3月28日的中國專利申請CN201810267050.4的優先權。本申請引用上述中國專利申請的全文。

【0002】本發明關於一種抗CD27抗體、CD27的抗原結合片段，包含所述抗體CDR區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人抗CD27抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【先前技術】

【0003】腫瘤免疫療法是抗癌藥物領域的一個長期熱點。它充分利用和調動腫瘤患者體內的細胞毒性T細胞，對腫瘤進行殺傷摧毀，可能是最有效且最安全的腫瘤治療途徑之一。人體內T細胞的活化是具備兩條訊號通路的系統，除了需通過抗原呈現細胞呈現MHC抗原肽給T細胞提供第一訊號，同時需要一系列協同刺激分子提供第二訊號，才能使T細胞產生正常的免疫反應。

【0004】T細胞和抗原呈現細胞之間的相互作用包括有利於產生免疫反應的多種輔助分子，而CD27正是其中重要一種，它屬腫瘤壞死因子受體(TNF-R)超家族並結合T細胞表面的CD70。CD27是糖基化的I型穿膜蛋白，通常是由雙硫鍵連結的同源二聚體。雙硫鍵處在胞外域的近細胞膜區域(Camerini等，J Immunol. 147: 3165-69, 1991)。在T細胞上，交聯的CD27抗原可提供

協同刺激訊號，而與T細胞受體一起交聯時可誘導T細胞增殖和細胞免疫活化。

【0005】CD27在成熟胸腺細胞、大多數CD4⁺和CD8⁺外周血T細胞、自然殺手細胞和B細胞上表現，也在B細胞非何杰金氏淋巴瘤和B細胞慢性淋巴細胞性白血病中高表現；而在寄生蟲、巨細胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)等感染、多發性硬化症、類肉瘤病和B細胞慢性淋巴細胞性白血病中，血清或疾病活動性部位也觀測到可溶CD27蛋白含量升高(Kobata T等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995(24): 11249-53；Ranheim EA等，Blood. 1995 85(12): 3556-65；Loenen WA等，Eur. J. Immunol. 1992 22: 447)。

【0006】近年的研究闡明，抗CD27單株抗體促效劑可促進T細胞反應，並可作為潛在的抗癌治療劑(參見專利WO2008051424、WO2011130434、PCT/CN2017/103842)。雖然迄今獲得的研究結果已將CD27鑑定為免疫療法的有用標靶，但抗CD27單株抗體哪些具體特徵對治療尤為有利則仍然有待探明。本領域仍然需要深入瞭解抗CD27抗體的哪些具體功能特性在治療學上有效，以至進一步獲得潛在的對防治疾病更有效的改進型抗CD27抗體。

【0007】目前已有多家國際公司研發針對CD27標靶的腫瘤抗體藥物。美國Celldex的抗CD27抗體已處在II期臨床試驗階段，而默克、Aduro和Apogenix等公司的相關產品尚在臨床前開發之中。

【0008】因此，提供具備高親和力、高選擇性、高生物活性和高穩定性的抗CD27抗體，且所述抗體具有可與期望的有利治療效果相關聯的特定功能特性，是本領域極需解決的問題。

【發明內容】

【0009】本發明的一些實施方式中，提供一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中，所述的抗體輕鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 6所示的LCDR1、SEQ ID NO: 7所示的LCDR2、和/或SEQ ID NO: 8所示的LCDR3；和/或所述的抗體重鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 3所示的HCDR1、SEQ ID NO: 4所示的HCDR2、和/或SEQ ID NO: 5所示的HCDR3。

【0010】一些實施方式中，提供一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中所述的抗體輕鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；和/或所述的抗體重鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

【0011】一些實施方式中，上述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其為鼠源抗體、嵌合抗體、人抗體、人源化抗體或其片段。

【0012】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列輕鏈變異區V_K1序列的框架區或其衍生序列，在至少一個實施方式中，所述抗體輕鏈變異區的框架區衍生自V_K1-12序列；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列重鏈變異區V_H3序列的框架區或其衍生序列；在至少一個實施方式中，所述重鏈變異區序列的框架區衍生自V_H3-74序列。

【0013】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體重鏈變異區V_H3序列的框架區序列中Kabat位置73的天門冬醯胺酸被蘇胺酸替換。

【0014】一些實施方式中，上述人源化抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，抗原結合片段為Fab、Fab'-SH、Fv、

scFv和/或(Fab')₂片段。在至少一個實施方式中，所述人源化抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2或IgG4的重鏈恆定區。

【0015】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述輕鏈變異區的胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，或與SEQ ID NO: 2有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性；和/或所述重鏈變異區序列的胺基酸序列如SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11所示，或與SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。在至少一個實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體輕鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與SEQ ID NO: 9有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體重鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12所示，或與SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

【0016】一些實施方式中，提供一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中所述的抗體輕鏈變異區包含分別如SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。抗CD27抗體或其抗原結合片段包含人類生殖系列輕鏈變異區V_κ1序列的框架區；所述的抗體重鏈變異區包含分別如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，還包含人類生殖系列重鏈變異區V_H3序列的框架區。

【0017】在至少一個實施方式中，所述抗CD27抗體輕鏈變異區的框架區選自衍生自V_κ1-12序列的框架區；重鏈變異區序列的框架區選自衍生自V_H3-74序列的框架區。

【0018】如下提供了人類生殖系列 V_H3-74 的序列(IMG_T 登錄號 IGHV3-74*01)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVW
VSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AR

SEQ ID NO: 13

【0019】如下提供了人類生殖系列 V_K1-12 的序列(IMG_T 登錄號 IGKV1-12*01)：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP

SEQ ID NO: 14

【0020】在至少一個實施方式中，所述的抗體重鏈變異區V_H3序列的框架區序列中Kabat位置73的天門冬醯胺酸(Asn)被蘇胺酸(Thr)替換。

【0021】在至少一個實施方式中，所述的抗CD27抗體輕鏈變異區序列為 SEQ ID NO: 1，重鏈變異區序列為SEQ ID NO: 11。

【0022】在至少一個實施方式中，所述的抗 CD27 抗體或其抗原結合片段為人抗體或其片段。

【0023】在至少一個實施方式中，所述的抗 CD27 抗體輕鏈序列為：SEQ ID NO: 9；所述的抗體重鏈序列為：SEQ ID NO: 12。

【0024】一些實施方式中，提供一種抗 CD27 抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中所述的抗體輕鏈變異區序列為 SEQ ID NO: 1，抗體重鏈變異區序列為 SEQ ID NO: 11。

【0025】在至少一個實施方式中，所述的抗CD27抗體輕鏈序列為SEQ ID NO: 9；所述的抗體重鏈序列為：SEQ ID NO: 11。

【0026】一些實施方式中，提供一種分離的單株抗體或抗原結合片段，能與上述的單株抗體或其抗原結合片段競爭結合CD27。

【0027】一些實施方式中，提供一種多專一性抗體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。

【0028】一些實施方式中，提供一種單股抗體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。

【0029】一些實施方式中，提供一種抗體-藥物複合體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。所述的抗體-藥物複合體是本領域習知的，其由抗體-接頭-藥物(毒素)相互連接形成，已知的接頭包括裂解接頭、分裂解接頭，例如接頭包括但不限於SMCC、SPDP等等；毒素也是本領域習知的，例如DM1、DM4、MMAE、MMAF等。

【0030】一些實施方式中，提供一種轉譯如上所述的抗CD27抗體或抗原結合片段的核酸。

【0031】一些實施方式中，提供一種含有如上所述的核酸的表現載體。

【0032】一些實施方式中，提供一種用如上所述的表現載體轉殖的宿主細胞。

【0033】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為細菌，優選為大腸桿菌。

【0034】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為酵母菌，優選為畢赤酵母菌。

【0035】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為哺乳動物細胞，優選為中國倉鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)細胞或人胎腎(Human embryonic kidney, HEK)293細胞。

【0036】一些實施方式中，提供了一種用於製備抗CD27抗體及其抗原結合片段的方法，包括在如前所述的宿主細胞中表現該抗體或其抗原結合片段，並自該宿主細胞中分離該抗體或其抗原結合片段。

【0037】一些實施方式中，提供一種藥物組合物，其含有如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段和可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【0038】一些實施方式中，提供一種如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或包含其的藥物組合物在製備用於治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的藥物中的用途；其中所述的疾病優選為癌症和自身免疫疾病；更優選為表現CD27的癌症和自身免疫疾病；所述的癌症最優選為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤；所述的自身免疫疾病最優選為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【0039】一些實施方式中，提供一種治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的方法，該方法包括給予所需患者治療有效量的如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或包含其的藥物組合物，其中所述的疾病優選為癌症和自身免疫疾病；更優選為表現CD27的癌症和自身免疫疾病；所述的癌症最優選為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤；所述的自身免疫疾病最優選為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【0040】術語

以下具體定義了某些技術和科學術語。除顯而易見在本文件中的它處另有明確定義，否則本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0041】所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968)中所述。

【0042】術語「抗體」指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈通過鏈間雙硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈和 ϵ 鏈。同一類Ig根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈雙硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞型，如IgG可分為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈通過恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類Ig中第每類Ig都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0043】抗體輕鏈抗體進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

【0044】抗體重鏈抗體進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的IgG1、2、3、4或其變體。

【0045】抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的胺基酸的序列變化很大，為變異區(V區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區(C區)。輕重鏈變異區分別由 110 個左右胺基酸組成其中有些區域的胺基酸殘基變化較變異區其他部位更大，如輕鏈第 24-34、50-56、89-97 位和重鏈第 31-35、50-65、95-102 位。這些區域稱為高度變異區(hypervariable region, HVR)，由於高度變異區是抗體與抗原決定位直接接觸的部位，因此又稱為互補決定區(complementarity-determining region, CDR)。變異區中的非高度變異區，其胺基酸組成與序列變化相對較少，這些胺基酸殘基組成變異區穩定的立體結構，即框架結構或支架結構(framework region, FR)。變異區包括 3 個高度變異區(HVR)和 4 個序列相對保守的骨架區(FR)。每條輕鏈變異區(V_L)和重

鏈變異區(V_H)由 3 個 CDR 區和 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。根據 Kabat 庫的資料，抗體分子各區段的胺基酸編號如下：

V 區	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
H	1-30	31-35	36-49	50-65	66-94	95-102	103-113
L	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

【0046】所述的抗體或抗原結合片段的V_L區和V_H區的CDR胺基酸殘基在數量和位置符合已知的Kabat編號規則。

【0047】在本發明中，針對人CD27抗原的人源抗體片段篩選使用了體外噬菌體顯示系統，篩選鑑定了一系列抗CD27抗體，其中選定SEQ ID NO: 1所述重鏈變異區和SEQ ID NO: 2所述輕鏈抗體用於進一步研究。其中SEQ ID NO: 1序列來自V_H3家族，與V_H3-74生殖系列序列最相似。SEQ ID NO: 2序列來自V_κ1家族，與V_κ1-12生殖系列序列最相似。

【0048】V_H3家族是人V_H生殖系列所有組成成分的一部分，V_H生殖系列所有組成成分可根據核苷酸序列同源性分為7個家族，即V_H1-V_H7(Tomlinson等(1992) J. Mol. Biol., 227: 776-798和Cook等(1995) Immunology Today, 16: 237-242)。對於任何給定的人V_H3生殖系列抗體序列，在整個V_H3家族中的胺基酸序列同一性是最高的(參見例如Tomlinson等(1992) J. Mol. Biol., 227: 776-798和Cook等(1995) Immunology Today, 16: 237-242)。任何2個V_H3家族生殖系列V_H序列之間的胺基酸序列同一性變化範圍為約100個V_H殘基中的69-98個殘基(即任何2個生殖系列V_H序列之間的胺基酸序列同源性為

69-98%)。對於大多數生殖系列序列對，具有至少80個或80個以上的相同胺基酸殘基(即至少80%胺基酸序列同源性)。

【0049】V κ 1家族是人V κ 生殖系列所有組成成分的一部分，V κ 生殖系列所有組成成分可根據核苷酸序列同源性分為7個家族，即V κ 1-V κ 7(Enrique等(1997) Int Immunol. Dec; 9(12): 1801-15)。對於大多數生殖系列序列對，V κ 1家族生殖系列V κ 序列之間具有至少80%胺基酸序列同源性。

【0050】鑒於V_H3家族序列之間高度的胺基酸序列相似性和結構相似性，技術人員可以通過鏈改組技術(Winter等(1994) Annual Rev. Immunol., 12: 433-55)或者將齧齒類動物抗體或其他人抗體的CDR(包括本發明抗體的CDR)移植到V_H3家族的框架區上，並選擇合適的V_L與其配對。同樣的，V κ 1家族序列之間也具有高度的胺基酸序列相似性和結構相似性，技術人員可以通過鏈改組技術(Winter等(1994) Annual Rev. Immunol., 12: 433-55)或者將齧齒類動物抗體或其他人抗體的CDR(包括本發明抗體的CDR)移植到V κ 1家族的框架區上，並選擇合適的V_H與其配對。

【0051】術語「抗原呈現細胞」或「antigen-presenting cell, APC」是在其表面上呈現與MHC複合的外來抗原的細胞。T細胞利用T細胞受體(T cell receptor, TCR)識別這種複合物。APC的實例包括但不限於樹突細胞(Dendritic cell, DC)、外周血單核細胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、單核細胞、B淋巴母細胞和單核細胞衍生的樹突細胞(DC)。術語「抗原呈現」是指APC捕獲抗原和使它們能夠被T細胞識別的過程，例如作為MHC-I/MHC-II複合體的成分。

【0052】術語「CD27」是指為TNF受體超家族成員的細胞表面受體。CD27是產生和長期維持T細胞免疫所必需的分子，並在調節B細胞活化和免疫球蛋白合成中發揮關鍵作用。術語「CD27」包括由細胞天然表現的CD27(例

如以登錄號AAH12160.1登記於GENBANK的人CD27)的任何變體或同種型。本發明的抗體可與得自非人物種的CD27交叉反應。作為另一種選擇，該抗體也可以是人CD27專一性的，可不表現出與其他物種的交叉反應性。CD27或其任何變體或同種型可從天然表現它們的細胞或組織中分離而得，或使用本領域通用以及本文所述的那些技術通過重組技術產生。優選地，抗CD27抗體靶向具有正常糖基化模式的人源CD27。

【0053】術語「人抗體」包括具有人生殖系列免疫球蛋白序列的變異區和恆定區的抗體。本發明的人抗體可包括不由人生殖系列免疫球蛋白序列轉譯的胺基酸殘基(如通過體外隨機或位點專一性誘變或通過體內體細胞突變所引入的突變)。然而，術語「人抗體」不包括這樣的抗體，即其中已將衍生自另一種哺乳動物物種(諸如小鼠)生殖系列的CDR序列移植到人框架序列上(即「人源化抗體」)。

【0054】術語「人源化抗體(humanized antibody)」，也稱為CDR移植抗體(CDR-grafted antibody)，是指將小鼠的CDR序列移植到人的抗體變異區框架中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的免疫反應。為避免在免疫原性下降的同時引起活性的下降，可對所述的人抗體變異區可進行最少回復突變，以保持活性。

【0055】術語「嵌合抗體(chimeric antibody)」，是將鼠源性抗體的變異區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫反應。建立嵌合抗體，要選建立分泌鼠源性專一性單株抗體的雜交瘤，然後從小鼠雜交瘤細胞中選殖變異區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將小鼠變異區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核系統或原核系統中表現嵌合抗體分子。人抗體的恆定區可選自人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，優選包含人源IgG2

或IgG4重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞媒介的細胞毒性作用)毒性的IgG1。

【0056】「抗原結合片段」，指具有抗原結合活性的Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段，以及與人CD27結合的Fv片段、sFv片段；包含本發明所述抗體的選自SEQ ID NO: 3至SEQ ID NO: 8中的一個或多個CDR區。Fv片段含有抗體重鏈變異區和輕鏈變異區，但沒有恆定區，並具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。一般，Fv抗體還包含在V_H和V_L框架區之間的多肽接頭，且能夠形成抗原結合所需的結構。也可以用不同的連接物將兩個抗體變異區連接成一條多肽鏈，稱為單股抗體(single chain antibody)或單股Fv(sFv)。本發明的術語「與CD27結合」，指能與人CD27相互作用。本發明的術語「抗原結合位點」指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

【0057】術語「多專一性抗體」按其最廣義使用，涵蓋具有多抗原決定位專一性的抗體。這些多專一性抗體包括但不限於：包含重鏈變異區(V_H)和輕鏈變異區(V_L)的抗體，其中該V_H-V_L單元具有多抗原決定位專一性；具有兩個或多個V_L和V_H區的抗體，每個V_H-V_L單元與不同的標靶或同一個標靶的不同抗原決定位結合；具有兩個或更多個單變異區的抗體，每個單變異區與不同的標靶或同一個標靶的不同的抗原決定位結合；全長抗體、抗體片段、雙抗體(diabodies)、雙專一性雙抗體和三抗體(triabodies)、以共價或非共價連接在一起的抗體片段等。

【0058】術語「抗體-藥物複合體」(ADC)指與一種或多種異源的化學合成分子，包括但不限於細胞毒劑偶合的抗體或抗體片段。

【0059】術語「單股抗體」是由抗體的重鏈變異區(V_H)和輕鏈變異區(V_L)通過一段連接肽連接而成的單股重組蛋白，它是具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。

【0060】術語「抗原決定位」是指抗原上與免疫球蛋白或抗體專一性結合的位點。抗原決定位可以由相鄰的胺基酸、或通過蛋白質的三級折疊而並列的不相鄰的胺基酸形成。由相鄰的胺基酸形成的抗原決定位通常在暴露於變性溶劑後保持，而通過三級折疊形成的抗原決定位通常在變性溶劑處理後喪失。抗原決定位通常以獨特的空間構形包括至少3-15個胺基酸。確定什麼抗原決定位由給定的抗體結合的方法在本領域中是習知的，包括西方點墨法和免疫沉澱檢測分析等。確定抗原決定位的空間構形的方法包括本領域中的技術和本文所述的技術，例如X光晶體繞射分析法和二維核磁共振等。

【0061】「專一性結合」、「選擇性結合」是指抗體與預定的抗原上的抗原決定位結合。通常，當使用重組人CD27作為分析物並使用抗體作為配體，在儀器中通過表面等表面電漿共振(Surface plasmon resonance, SPR)技術測定時，抗體以大約低於 10^{-7} M或甚至更小的平衡解離常數(K_D)與預定的抗原結合，並且其與預定抗原結合的親和力是其與預定抗原或緊密相關的抗原之外的非專一性抗原(如BSA等)結合的親和力的至少兩倍。術語「識別抗原的抗體」在本文中可以与術語「專一性結合的抗體」互換使用。

【0062】術語「競爭結合」是指與本發明的單株抗體識別人CD27的胞外區上的相同抗原決定位或相同抗原決定位的一部分並與所述抗原結合的抗體。與本發明的單株抗體結合相同抗原決定位的抗體是指識別並結合於本發明的單株抗體所識別的人CD27的胺基酸序列的抗體。

【0063】術語「核酸分子」是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是單股或雙股的，但首選是雙股DNA。當將核酸與另一個核酸序列置於功能關係中時，核酸是「有效連接的」。例如，如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，那麼啟動子或增強子有效地連接至所述編碼序列。

【0064】術語「交叉反應」是指本發明的抗體與來自不同物種的CD27結合的能力。例如，結合人CD27的本發明的抗體也可以結合另一物種的CD27。交叉反應性是通過在結合測定(例如SPR和ELISA)中檢測與純化抗原的專一性反應性，或與生理表現CD27的細胞的結合或功能性相互作用來測量。確定交叉反應性的方法包括如本文所述的標準結合測定，例如表面等表面電漿共振(SPR)分析，或流式細胞術。

【0065】術語「抑制」或「阻斷」可互換使用，並涵蓋部分和完全抑制/阻斷這兩者。CD70的抑制/阻斷首選地降低或改變無抑制或阻斷的情況下發生CD70結合時出現活性的正常水平或類型。抑制和阻斷也旨在包括與抗CD27抗體接觸時，與未與抗CD27抗體接觸的CD70相比，任何可測量的CD70結合親和力降低。

【0066】術語「抑制生長」(例如關於細胞)旨在包括細胞生長任何可測量的降低。

【0067】術語「誘導免疫反應」和「增強免疫反應」可互換使用，並指免疫反應對特定抗原的刺激(即，被動或適應性的)。針對誘導CDC或ADCC的術語「誘導」是指刺激特定的直接細胞毒性作用機制。

【0068】「ADCC」，即antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞媒介的細胞毒性作用，是指表現Fc受體的細胞通過識別抗體的Fc段直接殺傷被抗體包覆的目標細胞。可通過對IgG上Fc段的修飾，降低或消除抗體的ADCC效應功能。所述的修飾指在抗體的重鏈恆定區進行突

變，如選自IgG1的N297A、L234A、L235A、IgG2/4 chimera、IgG4的F235E或L234A/E235A突變。

【0069】生產和純化抗體和抗原結合片段的方法在現有技術中習知和能找到，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8章和15章。如，老鼠可以用人CD27或其片段免疫，所得到的抗體能被再摺疊，純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的CDR區加上一個或多個人FR區。人FR生殖系列序列可以從ImMunoGeneTics(IMGt)的網站<http://imgt.cines.fr>得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351上獲得。

【0070】基因工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。相應抗體的cDNA序列可以選殖並重組至GS表現載體。重組的免疫球蛋白表現載體可以穩定地轉染CHO細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳類動物表現系統會導致抗體的醣基化，特別是在Fc區的高度保守N端。通過度表現與人源抗原專一性結合的抗體得到穩定的選殖。陽性的選殖在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化、收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩，離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者冷凍乾燥。

【0071】抗體指單株抗體，所述的單株抗體(mAb)，指由單一的選殖細胞株得到的抗體，所述的細胞株不限於真核的，原核的或噬菌體的選殖細胞株。單株抗體或抗原結合片段可以用如雜交瘤技術、重組技術、噬菌體顯示技術，合成技術(如CDR-grafting)，或其它現有技術進行重組得到。

【0072】「給予」和「處理」當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。「給予」和「處理」可以指例如治療、藥物動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。「給予」和「處理」還意指通過試劑、診斷、結合組合物或通過另一種細胞體外和離體處理例如細胞。「處理」當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0073】「治療」意指給予患者內用或外用治療劑，諸如包含本發明的任一種結合化合物的組合物，所述患者具有一種或多種疾病症狀，而巳知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，無論是通過誘導這類症狀退化還是抑制這類症狀發展到任何臨床能測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作「治療有效量」)可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。通過醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實施方式(例如治療方法或製品)在緩解單個患者的目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如Student t檢驗、卡方檢驗、依據Mann和Whitney的U檢驗、Kruskal-Wallis檢驗(H檢驗)、Jonckheere-Terpstra檢驗和Wilcoxon檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0074】「基本上由.....組成」或其變形表示包括所有所述元件或元件組，並且任選包括與所述元件類似或不同性質的其它元件，所述其它元件非顯

著改變指定給藥方案、方法或組合物的基本性質或新性質。作為非限制性例子，基本上由所提及的胺基酸序列組成的結合化合物還可以包括一種或多種胺基酸，其不顯著影響結合化合物的性質。

【0075】術語「天然存在的」是指這樣的事實，即該對象可在自然界中發現。例如存在於可從自然界來源分離得到的生物體(包括病毒)、且未經人工在實驗室中有意修飾的多肽序列或多核苷酸序列即是天然存在的。

【0076】「有效量」包含足以改善或預防醫學病症的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：如待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

【0077】「外源性」指根據背景在生物、細胞或人體外產生的物質。「內源性」指根據背景在細胞、生物或人體內產生的物質。

【0078】本文使用的敘述「細胞」、「細胞株」和「細胞培養物」可互換使用，並且所有這類名稱都包括其後代。因此，單詞「轉殖體」和「轉殖細胞」包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在DNA含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉殖細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0079】「任選」或「任選地」意味著隨後所描述的事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，「任選包含1-3個抗體重鏈變異區」意味著特定序列的抗體重鏈變異區可以但不必須存在。

【0080】「藥物組合物」表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前驅藥物與其他化學成分的混合物，以及其他成分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。藥物組合物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【圖式簡單說明】

【0081】

圖1：液相層析質譜儀鑑定mAb077酸峰成分和主峰成分的脫醯胺狀況，結果顯示酸峰成分主要為第74個胺基酸天門冬醯胺酸(Asn)脫醯胺，其反應比例達到59.6%。

圖2：使用SEC-HPLC方法鑑定突變前mAb077和突變後077N74T分子的酸鹼峰分佈狀態。mAb077在29分鐘處先於主峰溶析出明顯酸性峰。

圖3：40°C熱處理1個月後，使用ICE測定077N74T酸鹼等電點成分的分佈狀況及其相對起始狀態的變化情況。

圖4：使用不同濃度抗CD27抗體(突變前/後分子)或Herceptin對照，刺激人血PBMC增殖的功能強度。

圖5：用對照人IgG1抗體處理的小鼠中或用各抗CD27抗體處理的小鼠中，人源Raji移植淋巴瘤相對於腫瘤接種後的天數的腫瘤大小(以mm³表示)。誤差用標準差表示。

圖6：用對照人IgG1抗體處理的小鼠中或用各抗CD27抗體處理的小鼠中，小鼠體重的變化情況(g)。誤差用標準差表示。

【實施方式】

【0082】以下結合實施例用於進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，如冷泉港的《抗體技術實驗手冊》，《分子選殖手冊》；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

【0083】實施例 1 人 CD27 抗原結合抗體片段(Fab)的篩選發現
針對人CD27抗原的人源抗體片段篩選使用了體外噬菌體顯示系統。所用抗原包括CD27-HisFc(Sino Biological #10039-H03H)，CD27-Fc(Sino Biological #10039-H31H)和CD27-His(Sino Biological #10039-H08B1)。抗原被直接吸附固定在Maxisorp 96孔篩選盤(Thermo Scientific 446469)，或經生物素化後吸附在Dynabeads微顆粒(M280, Streptavidin, Invitrogen #60210)上，並使用KingFisher(Thermo Scientific)自動篩選工作站經標準噬菌體顯示篩選流程進行篩選。針對每種抗原進行了3-4輪以上篩選，在每輪中使用人源抗體Fc片段以消除背景。在最後一輪篩選之後，挑取單菌落選殖孵育上清液液，通過ELISA方法初步鑑定結合人CD27的抗體片段，初選標準為ELISA讀數至少是背景訊號的2倍以上。

【0084】實施例 2 生物膜干涉(BLI)測定抗體片段與人 CD27 親和力
每個獨特序列的抗體Fab片段在其C端增加組胺酸標記後使用大腸桿菌表現系統過度表現，然後由Ni-NTA親和樹脂進行純化。Fab使用ForteBio Octet RED96系統由以下方法測定其與人CD27的親和力：首先使用BLI系統的AHC(人源IgG抗體Fc片段特異)感測器捕獲人CD27-HisFc融合蛋白，然後將其浸入含有5-10 µg/ml每種純化Fab蛋白的測量緩衝液中。收集的數據由Data Acquisition 7.1軟體進行處理，並擬合為1:1結合的Langmuir模型曲線。

篩選得到結合力最優的抗體mAb077，用於進一步的分析和開發試驗。其與CD27結合與動力學常數如表1所示。

【0085】 表1

抗體	抗原	親和力 K _D (M)	結合速度k _a (1/M*s)	解離速度 k _d (1/s)
mAb077-Fab	人CD27-HisFc	4.08E-09	2.96E+05	1.21E-03
mAb077-IgG	人 CD27-HisFc	1.37E-10	1.58E+05	2.17E-05
1F5-IgG	人 CD27-His	1.39E-09	6.58E+04	9.15E-05
mAb077-IgG	鼠CD27-HisFc	3.04E-11	4.38E+05	1.33E-05
1F5-IgG	鼠CD27-HisFc	無結合	無結合	無結合
mAb077-IgG	猴CD27-Fc	5.62E-10	7.58E+04	4.26E-05
1F5-IgG	猴CD27-Fc	2.13E-09	1.14E+05	2.43E-04

1F5-IgG即抗體Varlilumab。

【0086】 人單株抗體mAb077的重鏈和輕鏈變異區序列如下：

mAb077 V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 1

【0087】 mAb077 V_L

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSDLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQDAWPPTFGQ
GTKVEIK

SEQ ID NO: 2

【0088】 其含有下列CDR序列：

名稱	序列	編號
----	----	----

HCDR1	GYGIH	SEQID NO: 3
HCDR2	WINPNRGSTKYAQKFQG	SEQID NO: 4
HCDR3	DPGYTWYFDV	SEQID NO: 5
LCDR1	RASQDISSDLA	SEQID NO: 6
LCDR2	AASTLQS	SEQID NO: 7
LCDR3	QQRDAWPPT	SEQID NO: 8

【0089】將篩選得到的抗體輕重鏈變異區序列與數據庫比對。將SEQ ID NO: 1序列與數據庫中的重鏈生殖系列序列比對，顯示其與V_H3-74生殖系列序列相似，屬生殖系列序列的V_H3家族。將SEQ ID NO: 2序列與數據庫中的輕鏈生殖系列序列比對，顯示其與V_κ1-12生殖系列序列相似，屬生殖系列序列的V_κ1家族。

【0090】 V_H3-74生殖系列序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVW
VSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AR

SEQ ID NO: 13

【0091】 V_κ1-12生殖系列序列

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP

SEQ ID NO: 14

【0092】 實施例3 抗體Fab片段轉為IgG及其表現純化

將每個抗體片段分別選殖進表現IgG1亞型抗體輕鏈和重鏈的哺乳動物細胞表現載體。配對的載體以瞬轉方式按標準流程轉染入HEK293細胞中。表現後收集上清液離心過濾，然後通過protein A親和力層析術純化IgG。溶析的蛋白經中和後離子交換轉入PB緩衝液(20 mM磷酸鈉, 150 mM NaCl, pH

7.0)。蛋白濃度通過紫外光分光光度計測定，並在變性、還原或非還原條件下測定其純度和性質。

【0093】輕鏈全長序列

mAb077 LC

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSDLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQQDAWPPTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9

【0094】重鏈全長序列

mAb077 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10

【0095】實施例4 mAb077分子質譜肽圖分析

第 22 頁，共 28 頁(發明說明書)

使用製備級IEC先分離mAb077的酸峰和主峰成分待測。取500 µg各抗體樣品，加入400 µL含6 M胍鹽酸鹽的0.25 M Tris-HCl緩衝液混勻，加入1 M的DTT至終濃度為20 mM，混勻後37°C水浴1小時。取出樣品平衡至室溫，加入IAM至終濃度為50 mM，避光孵育30分鐘，然後轉移至10 kDa超過濾管，13000 rpm，10 min，取出後加入含有2 M尿素的50 mM Tris-HCl (pH 7.4)溶液400 ul進行超過濾，置換原有緩衝液，重複置換上述Buffer 1次。將超過濾好的樣品，進行蛋白濃度檢測，用含有2 M尿素的50 mM Tris-HCl溶液將樣品濃度調整至0.5 mg/ml，按照樣品：酶=25:1加入Trypsin酶4 µL，37°C水浴4小時。將製備好的樣品使用Acquity UPLC_Q-TOF液相層析質譜儀、配ACQUITY UPLC BEH C18管柱進行LC-MS數據收集。管柱流動相A：0.1%甲酸水；流動相B：0.1%甲酸乙腈。利用Waters UNIFI提取各個肽段的質譜信息，並進行序列比對，確定抗體的肽段覆蓋率。修飾設置如下：G0F (+1444.53387)等糖基化設置為動態修飾，Carbamidomethyl C (+57.02146)設置為固定修飾，Oxidation M、Deamidation N為動態修飾Target match tolerance設置為20 ppm，Fragment match tolerance設置為50 ppm。

【0096】
$$\text{脫胺}\% = \frac{\text{發生脫胺修飾的胺基酸響應}}{\text{所有包含該位點的胺基酸響應}} \times 100\%$$

分析結果如圖1所示，mAb077分離後的酸峰成分在重鏈第74個胺基酸天門冬醯胺酸(Kabat位置編號為73位)脫醯胺比例為59.6%，而主峰成分脫醯胺比例僅為12.2%，證實mAb077樣品重鏈變異區第74個胺基酸天門冬醯胺酸(Kabat位置編號為73位)發生了非常顯著的脫醯胺，並且此位點脫醯胺導致抗體在IEC上出現了游離的酸峰成分。因此，我們將重鏈變異區第74個胺基酸天門冬醯胺酸(Asn)(Kabat位置編號為73位)替換為蘇胺酸(Thr)，突變後分子077N74T的重鏈變異區序列如下(輕鏈與原mAb077相同)：

077N74T V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDTSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 11

【0097】突變後077N74T抗體重鏈全長序列

077N74T HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12

【0098】實施例5 Biacore對比抗CD27抗體及其突變分子與人CD27抗原親和力

用Protein A生物感測芯片親和捕獲待測抗體分子，然後於芯片表面流經各梯度濃度的人CD27-his抗原(義翹神州#10039-H08H)，用Biacore T200儀器即時檢測反應訊號獲得結合和解離曲線。在每個實驗循環解離完成後，用甘胺酸-鹽酸再生溶液(pH 1.5)將生物感測芯片洗淨再生。用BIAevaluation version 4.1，GE軟體以(1:1) Langmuir模型擬合數據，得出親和力數值如下表，突變後分子077N74T的親和力略高於原mAb077分子但並無顯著差別。

【0099】表2

固定相	流動相	結合常數(1/Ms)	解離常數(1/s)	親和力(M)
077N74T	huCD27-his	2.59E5	6.75E-5	2.61E-10
mAb077	(Sino Biological)	2.49E5	8.34E-5	3.35E-10

【0100】實施例6 抗CD27抗體及其突變分子的離子交換酸鹼峰分析

使用Agilent-1260高效液相管柱層析儀，流動相A：20 mM HEPES (pH 7.50)，流動相B：20 mM HEPES+500 mM NaCl (pH 7.50)。待測抗體蛋白樣品脫鹽後，流動相A將試樣稀釋至終濃度約為5.0 mg/mL，進樣量50 µg，流速0.8 mL/min，分別空白緩衝液和試樣於進樣瓶或內襯管中，用96.0%流動相A+4.0%流動相B以0.8 mL/min的流速平衡系統至基線平穩後開始進樣，並記錄層析圖。樣品檢測結束後，使用1 M NaCl以0.2-0.5 mL/min的流速清洗管柱。分析結果如圖2所示，抗CD27抗體mAb077在IEC液相圖約29分鐘處產生明顯的酸峰成分，而突變後的077N74T分子不發生脫醯胺，此酸峰成分消失。

【0101】實施例7 抗CD27抗體077N74T加速熱穩定性測試

將077N74T抗體溶液靜置於40°C恆溫箱中進行加速熱穩定性測試，分別在第15天和第30天時間點取樣，使用iCIEF-全柱成像毛細管等電聚焦電泳 (ProteinSimple E50634全柱成像毛細管等電聚焦分析儀；聚焦時間1：1500V 1分鐘；聚焦時間2：3000V 8分鐘)，分析待測抗體蛋白的等電點(pI)不勻性及其酸鹼成分分佈在加熱放置前後不同時間點的變化趨勢。結果如圖3和表3所示，077N74T在40°C放置15天後，各成分比例無明顯變化；而在放置一個月後，pI 9.0的偏酸性成分增加10.4%，pI 9.1的中性成分比例下降12.3%。總體顯示出了此突變後抗體也具備較好的熱穩定性，不會進一步因脫醯胺發生劇烈的酸峰增加。

【0102】表3

放樣時間	ICE%			主峰
	酸性峰	主峰	鹼性峰	
D0	40.4	56.0	3.6	/
40°C D15	40.6	55.4	4.0	0.6
40°C D30	51.0	43.7	5.2	12.3

【0103】實施例8 抗CD27抗體及其突變分子的體外PBMC激活功能

人血PBMC通過Ficoll密度梯度離心方法從新鮮肝素抗凝血劑中分離得到。將3 μg/mL抗CD3抗體與不同濃度的各個待測抗體藥物(以Herceptin作IgG1亞型對照)被覆於ELISA板中，4°C孵育過夜。第二天洗板後，加入2×10⁵/孔的外周血單核細胞(PBMC)，37°C，5% CO₂培養箱孵育7天。孵育結束後，用CCK-8試劑盒檢測PBMC的增殖，並根據OD₄₅₀值計算出EC₅₀。結果如圖4所示，突變後分子077N74T的刺激PBMC增殖活性略強於原mAb077分子。

【0104】實施例9 抗CD27抗體及其突變分子的體內藥效對比

54隻CB17-SCID小鼠，雌性，5-6周，18-20 g，購自北京維通利華，分6組，每組9隻。體外培養Raji細胞在含10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培養液中。收集指數生長期的Raji細胞，無菌條件下，移植於CB17-SCID小鼠皮下，每隻小鼠接種2×10⁶個細胞。對照抗體Varlilumab為Celldex公司開發的抗CD27抗體(具體見CN103154034B)。腫瘤接種當天為第0天。在接種第3天開始第一次給藥，之後按如下方案進行：

第1組：IgG1 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17天；

第2組：077N74T 3 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17天；

第3組：077N74T 10 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17天；

第 4 組：077N74T 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 5 組：mAb077 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 6 組：Varlilumab 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

給藥後每天監測動物日常行為表現，共進行18天。用游標卡尺測量腫瘤的長徑及短徑後，用長 $\times$ 寬²/2計算腫瘤體積。腫瘤抑制率採用公式

$TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。T和C分別為給藥組和對照組在某一特定時間點的腫瘤體積(TV)。體重變化用公式 $RCBW\% = (BW_i - BW_0)/BW_0 \times 100\%$ ，BW_i是小鼠當前體重，BW₀是分組當日的小鼠體重。所有實驗結果以平均瘤體積 $\pm$ 標準差(SEM)表示。用T-Test檢驗方法比較治療組腫瘤體積和瘤重與對照組相比有無顯著性差異。所有的數據均用Graphpad進行分析，p<0.05為具有顯著性差異。

【0105】如圖5和圖6所示，在Raji移植腫瘤模型中，077N74T表現出抗腫瘤作用及劑量依賴，低、中、高劑量組抑瘤率(Tumor growth inhibition, TGI)分別為62%、67%和73%，且最高劑量組(30 mg/kg)的077N74T抑瘤效果略強於同劑量突變前的mAb077(59%)或對照抗體Varlilumab(61%)。各給藥組均沒有出現顯著的小鼠體重下降情況，闡明小鼠對不同劑量下的各個抗體耐受性均良好。

【0106】雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

【0107】 無

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司

<120> 抗CD27抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

<150> CN201810267050.4

<151> 2018-03-28

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Thr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 107
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ala Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3
Gly Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Trp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210>	5
<211>	10
<212>	PRT
<213>	智人(Homo sapiens)

<400> 5
Asp Pro Gly Tyr Thr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210>	6
<211>	11
<212>	PRT
<213>	智人(Homo sapiens)

<400> 6
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asp Leu Ala
1 5 10

<210>	7
<211>	7
<212>	PRT
<213>	智人(Homo sapiens)

<400> 7
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

$\langle 210 \rangle$	8
$\langle 211 \rangle$	9
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Gln Gln Arg Asp Ala Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ala Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

	195		200		205
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
	210				
<210> 10					
<211> 449					
<212> PRT					
<213> 智人(Homo sapiens)					
<400> 10					
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu
1		5		10	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys
		20		25	
Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg
		35		40	
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn
50			55		60
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile
65			70		75
Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu
		85		90	
Ala	Arg	Asp	Pro	Gly	Tyr
		100		105	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
		115		120	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
130			135		140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
145			150		155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
		165		170	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
		180		185	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
		195		200	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp

210

215

220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225230235240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

245250255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260265270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275280285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290295300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305310315320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

325330335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340345350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355360365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370375380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385390395400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405410415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420425430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435440445

Lys

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Thr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Thr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100					105					110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
115					120					125						
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
130					135					140						
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
165					170					175						
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
180					185					190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
195					200					205						
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
225					230					235					240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
245					250					255						
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
260					265					270						
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
275					280					285						
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
305					310					315					320	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
325					330					335						
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
340					345					350						
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
355					360					365						
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
385					390					395					400	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	

405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45
Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 14
<211> 95
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

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



201942135

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗CD27抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

【英文發明名稱】ANTI-CD27 ANTIBODY, ANTIGEN BINDING FRAGMENT

THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【中文】

本發明關於一種抗 CD27 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。更進一步，本發明關於一種包含所述抗 CD27 抗體 CDR 區的人源抗體，以及包含人抗 CD27 抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。尤其，本發明關於一種人抗 CD27 抗體及其在製備用於治療 CD27 媒介的疾病或病症的藥物中的用途。

【英文】

The invention relates to an anti-CD27 antibody, an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutical use thereof. Further, the invention relates to a humanized antibody including CDR regions of the anti-CD27 antibody, and a pharmaceutical composition including human anti-CD27 antibodies and antigen binding fragments thereof, and a use thereof as anticancer drugs. Especially, the invention relates to a human anti-CD27 antibody and a use thereof of preparation of a medicine for the treatment of CD27-mediated diseases or disorders.

【指定代表圖】圖5

【代表圖之符號簡單說明】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中，所述的抗體輕鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；和/或

所述的抗體重鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

【第2項】 如請求項1所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列輕鏈變異區V κ 1序列的構架區或其衍生序列；優選地，所述抗體輕鏈變異區的框架區衍生自V κ 1-12序列；和/或

所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列重鏈變異區V H 3序列的框架區或其衍生序列；優選地，所述重鏈變異區序列的框架區衍生自V H 3-74序列。

【第3項】 如請求項1或2所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體重鏈變異區V H 3序列的框架區序列中Kabat位置73的天門冬醯胺酸被蘇胺酸替換。

【第4項】 如前述任一項請求項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述的輕鏈變異區的胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示或與SEQ ID NO: 2有至少90%同一性；和/或所述重鏈變異區序列的胺基酸序列如SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11所示，或與SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11有至少90%同一性。

【第5項】 如前述任一項請求項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其為人抗體或其片段。

【第6項】 如前述任一項請求項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，所述人抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，抗原結合片段為Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段；優選地，所述人抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2或IgG4的重鏈恆定區。

【第7項】 如前述任一項請求項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的抗體輕鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與SEQ ID NO: 9有至少90%同一性；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的抗體重鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12所示，或與SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12有至少90%同一性。

【第8項】 一種多核苷酸，其轉譯如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段。

【第9項】 一種載體，其含有如請求項8所述的多核苷酸；所述的載體為真核表現載體、原核表現載體或病毒載體。

【第10項】 一種宿主細胞，其是用如請求項9所述的載體轉殖獲得的；

優選地，所述宿主細胞為細菌、酵母菌或者哺乳動物細胞；

更優選地，所述宿主細胞為大腸桿菌、畢赤酵母菌、中國倉鼠卵巢細胞或人胎腎293細胞。

【第11項】 一種用於製備如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體及其抗原結合片段的方法，所述方法包括在如請求項10所述的宿主細胞中表現所述抗體或其抗原結合片段，並分離所述抗體或其抗原結合片段。

【第12項】 一種抗體-藥物複合體，其中的所述抗體含有如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段。

【第13項】一種藥物組合物，其含有如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，以及可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【第14項】一種如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段、或者如請求項12所述的抗體-藥物複合體，或如請求項13所述的藥物組合物在製備用於治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的藥物中的用途；

優選地，所述疾病或病症為癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述疾病或病症為表現CD27的癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述癌症為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤，所述自身免疫疾病為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【第15項】一種治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的方法，所述方法包括給予所需患者治療有效量的如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或者如請求項12所述的抗體-藥物複合體，或者如請求項13所述的藥物組合物；

優選地，所述疾病或病症為癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述疾病或病症為表現CD27的癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述癌症為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤，所述自身免疫疾病為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【發明圖式】

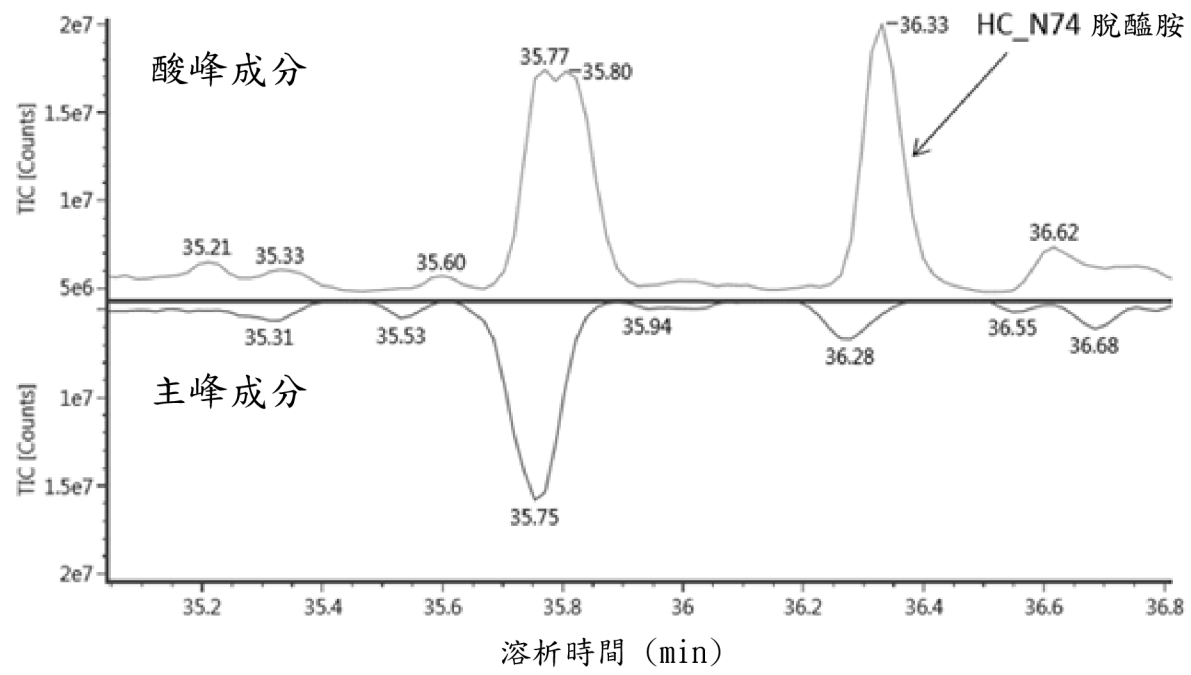


圖1

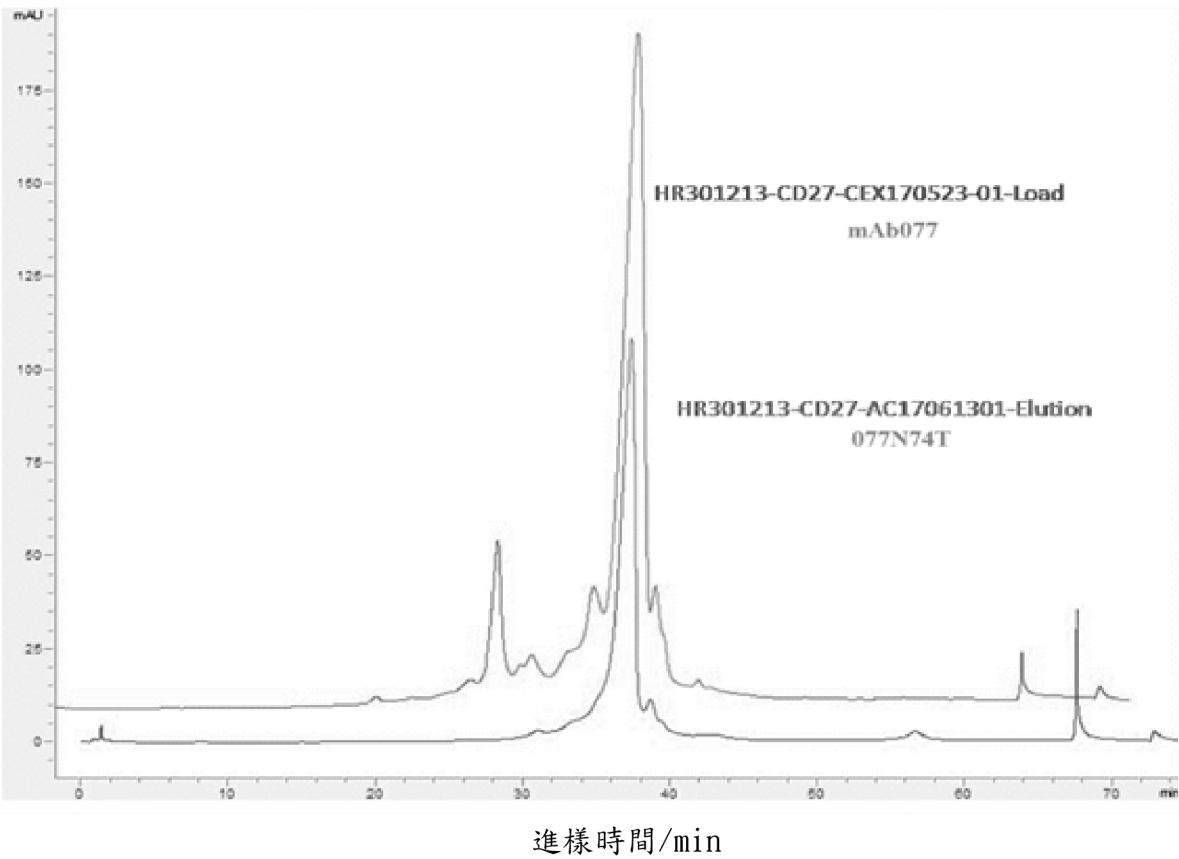


圖2

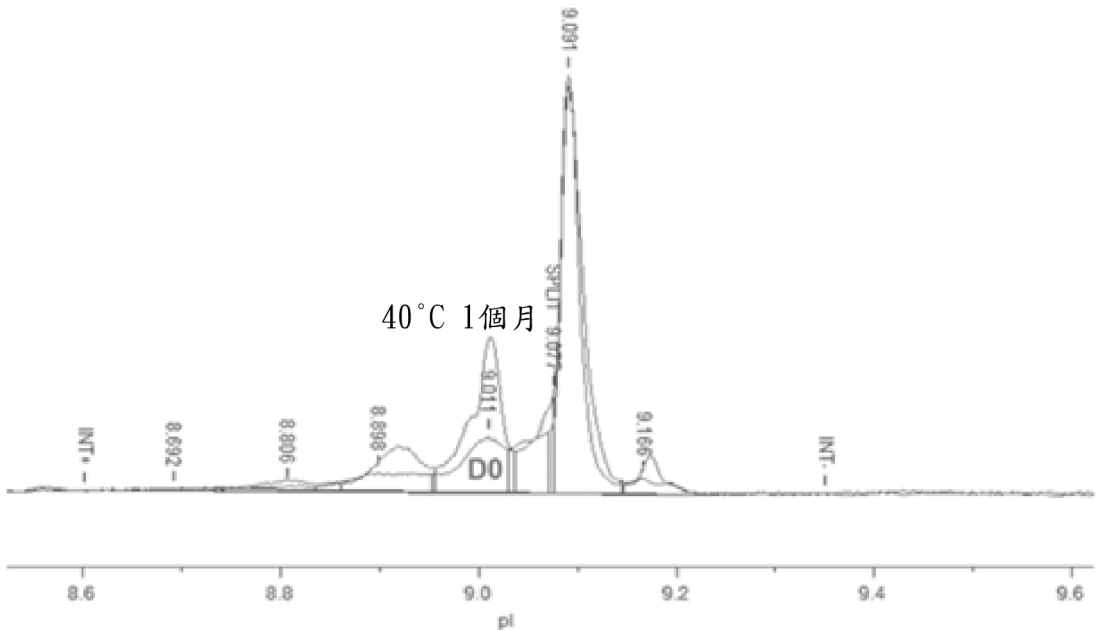


圖3

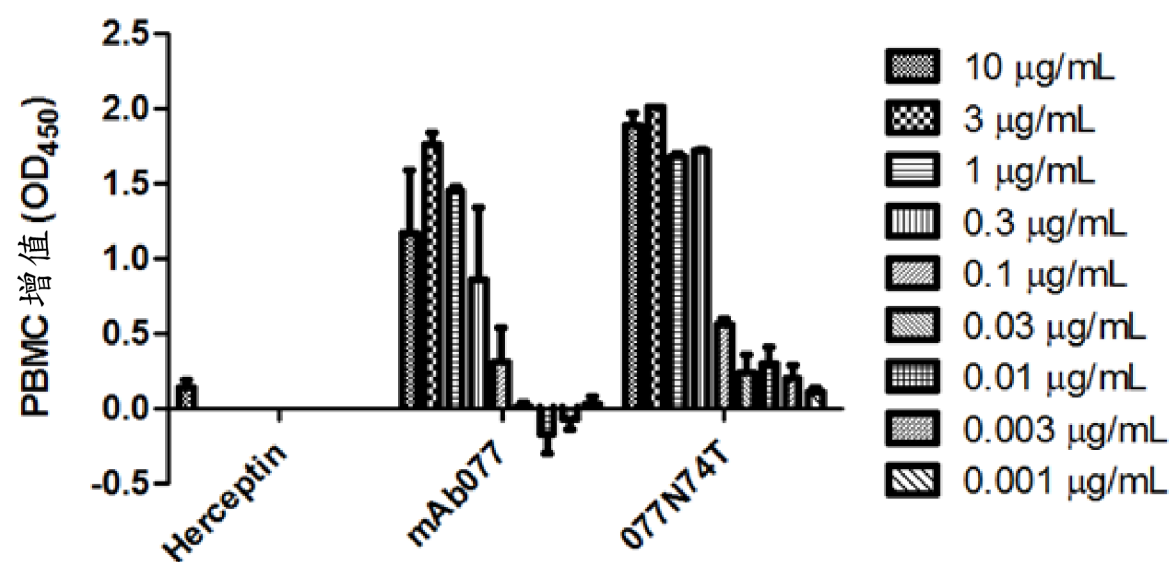


圖4

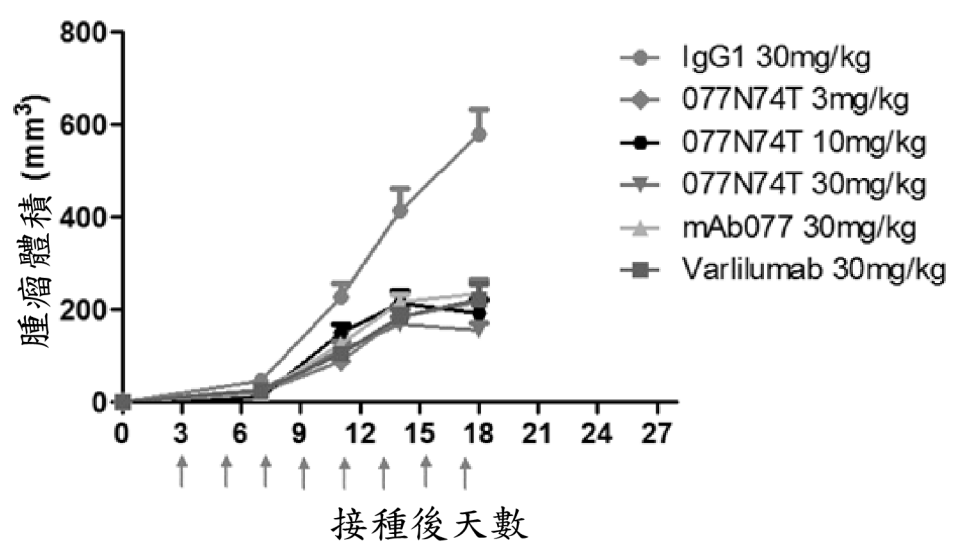


圖5

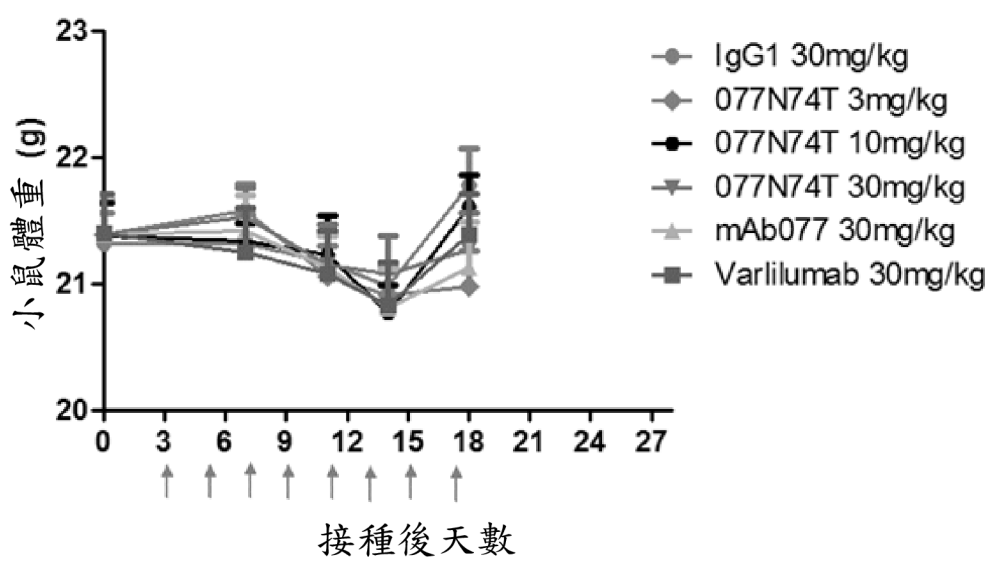


圖6

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗CD27抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

【英文發明名稱】ANTI-CD27 ANTIBODY, ANTIGEN BINDING FRAGMENT THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【技術領域】

【0001】本申請要求申請日為2018年3月28日的中國專利申請CN201810267050.4的優先權。本申請引用上述中國專利申請的全文。

【0002】本發明關於一種抗CD27抗體、CD27的抗原結合片段，包含所述抗體CDR區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人抗CD27抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【先前技術】

【0003】腫瘤免疫療法是抗癌藥物領域的一個長期熱點。它充分利用和調動腫瘤患者體內的細胞毒性T細胞，對腫瘤進行殺傷摧毀，可能是最有效且最安全的腫瘤治療途徑之一。人體內T細胞的活化是具備兩條訊號通路的系統，除了需通過抗原呈現細胞呈現MHC抗原肽給T細胞提供第一訊號，同時需要一系列協同刺激分子提供第二訊號，才能使T細胞產生正常的免疫反應。

【0004】T細胞和抗原呈現細胞之間的相互作用包括有利於產生免疫反應的多種輔助分子，而CD27正是其中重要一種，它屬腫瘤壞死因子受體(TNF-R)超家族並結合T細胞表面的CD70。CD27是糖基化的I型穿膜蛋白，通常是由雙硫鍵連結的同源二聚體。雙硫鍵處在胞外域的近細胞膜區域(Camerini等，J Immunol. 147: 3165-69, 1991)。在T細胞上，交聯的CD27抗原可提供

第 1 頁，共 27 頁(發明說明書)

協同刺激訊號，而與T細胞受體一起交聯時可誘導T細胞增殖和細胞免疫活化。

【0005】CD27在成熟胸腺細胞、大多數CD4⁺和CD8⁺外周血T細胞、自然殺手細胞和B細胞上表現，也在B細胞非何杰金氏淋巴瘤和B細胞慢性淋巴細胞性白血病中高表現；而在寄生蟲、巨細胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)等感染、多發性硬化症、類肉瘤病和B細胞慢性淋巴細胞性白血病中，血清或疾病活動性部位也觀測到可溶CD27蛋白含量升高(Kobata T等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995(24): 11249-53；Ranheim EA等，Blood. 1995 85(12): 3556-65；Loenen WA等，Eur. J. Immunol. 1992 22: 447)。

【0006】近年的研究闡明，抗CD27單株抗體促效劑可促進T細胞反應，並可作為潛在的抗癌治療劑(參見專利WO2008051424、WO2011130434、PCT/CN2017/103842)。雖然迄今獲得的研究結果已將CD27鑑定為免疫療法的有用標靶，但抗CD27單株抗體哪些具體特徵對治療尤為有利則仍然有待探明。本領域仍然需要深入瞭解抗CD27抗體的哪些具體功能特性在治療學上有效，以至進一步獲得潛在的對防治疾病更有效的改進型抗CD27抗體。

【0007】目前已有多家國際公司研發針對CD27標靶的腫瘤抗體藥物。美國Celldex的抗CD27抗體已處在II期臨床試驗階段，而默克、Aduro和Apogenix等公司的相關產品尚在臨床前開發之中。

【0008】因此，提供具備高親和力、高選擇性、高生物活性和高穩定性的抗CD27抗體，且所述抗體具有可與期望的有利治療效果相關聯的特定功能特性，是本領域極需解決的問題。

【發明內容】

【0009】本發明的一些實施方式中，提供一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中，所述的抗體輕鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 6所示的LCDR1、SEQ ID NO: 7所示的LCDR2、和/或SEQ ID NO: 8所示的LCDR3；和/或所述的抗體重鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 3所示的HCDR1、SEQ ID NO: 4所示的HCDR2、和/或SEQ ID NO: 5所示的HCDR3。

【0010】一些實施方式中，上述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其為鼠源抗體、嵌合抗體、人抗體、人源化抗體或其片段。

【0011】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列輕鏈變異區V_k1序列的框架區或其衍生序列，在至少一個實施方式中，所述抗體輕鏈變異區的框架區衍生自V_k1-12序列；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列重鏈變異區V_H3序列的框架區或其衍生序列；在至少一個實施方式中，所述重鏈變異區的框架區衍生自V_H3-74序列。

【0012】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體重鏈變異區V_H3序列的框架區序列中Kabat位置73的天門冬醯胺酸被蘇胺酸替換。

【0013】一些實施方式中，上述人源化抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，抗原結合片段為Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和/或(Fab')₂片段。在至少一個實施方式中，所述人源化抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2或IgG4的重鏈恆定區。

【0014】一些實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述輕鏈變異區的胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，或與SEQ ID NO: 2有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性；和/或所述重鏈變異區

的胺基酸序列如SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11所示，或與SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。在至少一個實施方式中，上述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體輕鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與SEQ ID NO: 9有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的所述抗體重鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12所示，或與SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

【0015】如下提供了人類生殖系列 V_H3-74 的序列(IMG T 登錄號 IGHV3-74*01)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVW
VSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AR

SEQ ID NO: 13

【0016】如下提供了人類生殖系列 V_K1-12 的序列(IMG T 登錄號 IGKV1-12*01)：

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP

SEQ ID NO: 14

【0017】在至少一個實施方式中，所述的抗CD27抗體輕鏈變異區序列為SEQ ID NO: 2，重鏈變異區序列為SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 11。

【0018】在至少一個實施方式中，所述的抗 CD27 抗體輕鏈序列為：SEQ ID NO: 9；所述的抗體重鏈序列為：SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 12。

【0019】在至少一個實施方式中，所述的抗 CD27 抗體或其抗原結合片段為人抗體或其片段。

【0020】一些實施方式中，提供一種分離的單株抗體或抗原結合片段，能與上述的單株抗體或其抗原結合片段競爭結合CD27。

【0021】一些實施方式中，提供一種多專一性抗體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。

【0022】一些實施方式中，提供一種單股抗體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。

【0023】一些實施方式中，提供一種抗體-藥物複合體，其含有如前所述的輕鏈變異區和重鏈變異區。所述的抗體-藥物複合體是本領域習知的，其由抗體-接頭-藥物(毒素)相互連接形成，已知的接頭包括裂解接頭、分裂解接頭，例如接頭包括但不限於SMCC、SPDP等等；毒素也是本領域習知的，例如DM1、DM4、MMAE、MMAF等。

【0024】一些實施方式中，提供一種轉譯如上所述的抗CD27抗體或抗原結合片段的核酸。

【0025】一些實施方式中，提供一種含有如上所述的核酸的表現載體。

【0026】一些實施方式中，提供一種用如上所述的表現載體轉殖的宿主細胞。

【0027】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為細菌，優選為大腸桿菌。

【0028】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為酵母菌，優選為畢赤酵母菌。

【0029】在至少一個實施方式中，一種如上所述的宿主細胞，所述的宿主細胞為哺乳動物細胞，優選為中國倉鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)細胞或人胎腎(Human embryonic kidney, HEK)293細胞。

【0030】一些實施方式中，提供了一種用於製備抗CD27抗體及其抗原結合片段的方法，包括在如前所述的宿主細胞中表現該抗體或其抗原結合片段，並自該宿主細胞中分離該抗體或其抗原結合片段。

【0031】一些實施方式中，提供一種藥物組合物，其含有如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段和可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【0032】一些實施方式中，提供一種如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或包含其的藥物組合物在製備用於治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的藥物中的用途；其中所述的疾病優選為癌症和自身免疫疾病；更優選為表現CD27的癌症和自身免疫疾病；所述的癌症最優選為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤；所述的自身免疫疾病最優選為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【0033】一些實施方式中，提供一種治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的方法，該方法包括給予所需患者治療有效量的如上所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或包含其的藥物組合物，其中所述的疾病優選為癌症和自身免疫疾病；更優選為表現CD27的癌症和自身免疫疾病；所述的癌症最優選為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤；所述的自身免疫疾病最優選為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【0034】術語

以下具體定義了某些技術和科學術語。除顯而易見在本文件中的它處另有明確定義，否則本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0035】所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968)中所述。

【0036】術語「抗體」指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈通過鏈間雙硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈和 ϵ 鏈。同一類Ig根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈雙硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞型，如IgG可分為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈通過恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類Ig中第每類Ig都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0037】抗體輕鏈可進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

【0038】抗體重鏈可進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的IgG1、2、3、4或其變體。

【0039】抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的胺基酸的序列變化很大，為變異區(V 區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區(C 區)。輕重鏈變異區分別由 110 個左右胺基酸組成其中有些區域的胺基酸殘基變化較變異區其他部位更大，如輕鏈第 24-34、50-56、89-97 位和重鏈第 31-35、50-65、95-102 位。這些區域稱為高度變異區(hypervariable region, HVR)，由於高度變異區是抗體與抗原決定位直接接觸的部位，因此又稱為互補決定區(complementarity-determining region, CDR)。變異區中的非高度變異區，其

第 7 頁，共 27 頁(發明說明書)

胺基酸組成與序列變化相對較少，這些胺基酸殘基組成變異區穩定的立體結構，即框架區或支架結構(*framework region*, FR)。變異區包括 3 個互補決定區(CDR)和 4 個序列相對保守的框架區(FR)。每條輕鏈變異區(V_L)和重鏈變異區(V_H)由 3 個 CDR 區和 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。根據 Kabat 庫的資料，抗體分子各區段的胺基酸編號如下：

V 區	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
H	1-30	31-35	36-49	50-65	66-94	95-102	103-113
L	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

【0040】所述的抗體或抗原結合片段的V_L區和V_H區的CDR胺基酸殘基在數量和位置符合已知的Kabat編號規則。

【0041】在本發明中，針對人CD27抗原的人源抗體片段篩選使用了體外噬菌體顯示系統，篩選鑑定了一系列抗CD27抗體，其中選定SEQ ID NO: 1所述重鏈變異區和SEQ ID NO: 2所述輕鏈抗體變異區用於進一步研究。其中SEQ ID NO: 1序列來自V_H3家族，與V_H3-74生殖系列序列最相似。SEQ ID NO: 2序列來自V_κ1家族，與V_κ1-12生殖系列序列最相似。

【0042】V_H3家族是人V_H生殖系列所有組成成分的一部分，V_H生殖系列所有組成成分可根據核苷酸序列同源性分為7個家族，即V_H1-V_H7(Tomlinson等(1992) J. Mol. Biol., 227: 776-798和Cook等(1995) Immunology Today, 16: 237-242)。對於任何給定的人V_H3生殖系列抗體序列，在整個V_H3家族中的胺基酸序列同一性是最高的(參見例如Tomlinson等(1992) J. Mol. Biol., 227: 776-798和Cook等(1995) Immunology Today, 16: 237-242)。任何2個V_H3家族

生殖系列V_H序列之間的胺基酸序列同一性變化範圍為約100個V_H殘基中的69-98個殘基(即任何2個生殖系列V_H序列之間的胺基酸序列同源性為69-98%)。對於大多數生殖系列序列對，具有至少80個或80個以上的相同胺基酸殘基(即至少80%胺基酸序列同源性)。

【0043】 V_κ1家族是人V_κ生殖系列所有組成成分的一部分，V_κ生殖系列所有組成成分可根據核苷酸序列同源性分為7個家族，即V_κ1-V_κ7(Enrique等(1997) Int Immunol. Dec; 9(12): 1801-15)。對於大多數生殖系列序列對，V_κ1家族生殖系列V_κ序列之間具有至少80%胺基酸序列同源性。

【0044】鑒於V_H3家族序列之間高度的胺基酸序列相似性和結構相似性，技術人員可以通過鏈改組技術(Winter等(1994) Annual Rev. Immunol., 12: 433-55)或者將齧齒類動物抗體或其他人抗體的CDR(包括本發明抗體的CDR)移植到V_H3家族的框架區上，並選擇合適的V_L與其配對。同樣的，V_κ1家族序列之間也具有高度的胺基酸序列相似性和結構相似性，技術人員可以通過鏈改組技術(Winter等(1994) Annual Rev. Immunol., 12: 433-55)或者將齧齒類動物抗體或其他人抗體的CDR(包括本發明抗體的CDR)移植到V_κ1家族的框架區上，並選擇合適的V_H與其配對。

【0045】術語「抗原呈現細胞」或「antigen-presenting cell, APC」是在其表面上呈現與MHC複合的外來抗原的細胞。T細胞利用T細胞受體(T cell receptor, TCR)識別這種複合物。APC的實例包括但不限於樹突細胞(Dendritic cell, DC)、外周血單核細胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、單核細胞、B淋巴母細胞和單核細胞衍生的樹突細胞(DC)。術語「抗原呈現」是指APC捕獲抗原和使它們能夠被T細胞識別的過程，例如作為MHC-I/MHC-II複合體的成分。

【0046】術語「CD27」是指為TNF受體超家族成員的細胞表面受體。CD27是產生和長期維持T細胞免疫所必需的分子，並在調節B細胞活化和免疫球蛋白合成中發揮關鍵作用。術語「CD27」包括由細胞天然表現的CD27(例如以登錄號AAH12160.1登記於GENBANK的人CD27)的任何變體或同種型。本發明的抗體可與得自非人物種的CD27交叉反應。作為另一種選擇，該抗體也可以是人CD27專一性的，可不表現出與其他物種的交叉反應性。CD27或其任何變體或同種型可從天然表現它們的細胞或組織中分離而得，或使用本領域通用以及本文所述的那些技術通過重組技術產生。優選地，抗CD27抗體靶向具有正常醣基化模式的人源CD27。

【0047】術語「人抗體」包括具有人生殖系列免疫球蛋白序列的變異區和恆定區的抗體。本發明的人抗體可包括不由人生殖系列免疫球蛋白序列轉譯的胺基酸殘基(如通過體外隨機或位點專一性誘變或通過體內體細胞突變所引入的突變)。然而，術語「人抗體」不包括這樣的抗體，即其中已將衍生自另一種哺乳動物物種(諸如小鼠)生殖系列的CDR序列移植到人框架序列上(即「人源化抗體」)。

【0048】術語「人源化抗體(humanized antibody)」，也稱為CDR移植抗體(CDR-grafted antibody)，是指將小鼠的CDR序列移植到人的抗體變異區框架中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的免疫反應。為避免在免疫原性下降的同時引起活性的下降，可對所述的人抗體變異區可進行最少回復突變，以保持活性。

【0049】術語「嵌合抗體(chimeric antibody)」，是將鼠源性抗體的變異區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫反應。建立嵌合抗體，要選建立分泌鼠源性專一性單株抗體的雜交瘤，然後從小鼠雜交瘤細胞中選殖變異區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基

因，將小鼠變異區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入載體中，最後在真核系統或原核系統中表現嵌合抗體分子。人抗體的恆定區可選自人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，優選包含人源IgG2或IgG4重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞媒介的細胞毒性作用)毒性的IgG1。

【0050】「抗原結合片段」，指具有抗原結合活性的Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段，以及與人CD27結合的Fv片段、sFv片段；包含本發明所述抗體的選自SEQ ID NO: 3至SEQ ID NO: 8中的一個或多個CDR區。Fv片段含有抗體重鏈變異區和輕鏈變異區，但沒有恆定區，並具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。一般，Fv抗體還包含在V_H和V_L框架區之間的多肽接頭，且能夠形成抗原結合所需的結構。也可以用不同的連接物將兩個抗體變異區連接成一條多肽鏈，稱為單股抗體(single chain antibody)或單股Fv(sFv)。本發明的術語「與CD27結合」，指能與人CD27相互作用。本發明的術語「抗原結合位點」指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

【0051】術語「多專一性抗體」按其最廣義使用，涵蓋具有多抗原決定位專一性的抗體。這些多專一性抗體包括但不限於：包含重鏈變異區(V_H)和輕鏈變異區(V_L)的抗體，其中該V_H-V_L單元具有多抗原決定位專一性；具有兩個或多個V_L和V_H區的抗體，每個V_H-V_L單元與不同的標靶或同一個標靶的不同抗原決定位結合；具有兩個或更多個單變異區的抗體，每個單變異區與不同的標靶或同一個標靶的不同的抗原決定位結合；全長抗體、抗體片段、雙抗體(diabodies)、雙專一性雙抗體和三抗體(triabodies)、以共價或非共價連接在一起的抗體片段等。

【0052】術語「抗體-藥物複合體」(ADC)指與一種或多種異源的化學合成分子，包括但不限於細胞毒劑偶合的抗體或抗體片段。

【0053】術語「單股抗體」是由抗體的重鏈變異區(V_H)和輕鏈變異區(V_L)通過一段連接肽連接而成的單股重組蛋白，它是具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。

【0054】術語「抗原決定位」是指抗原上與免疫球蛋白或抗體專一性結合的位點。抗原決定位可以由相鄰的胺基酸、或通過蛋白質的三級折疊而並列的不相鄰的胺基酸形成。由相鄰的胺基酸形成的抗原決定位通常在暴露於變性溶劑後保持，而通過三級折疊形成的抗原決定位通常在變性溶劑處理後喪失。抗原決定位通常以獨特的空間構形包括至少3-15個胺基酸。確定什麼抗原決定位由給定的抗體結合的方法在本領域中是習知的，包括西方點墨法和免疫沉澱檢測分析等。確定抗原決定位的空間構形的方法包括本領域中的技術和本文所述的技術，例如X光晶體繞射分析法和二維核磁共振等。

【0055】「專一性結合」、「選擇性結合」是指抗體與預定的抗原上的抗原決定位結合。通常，當使用重組人CD27作為分析物並使用抗體作為配體，在儀器中通過表面等表面電漿共振(Surface plasmon resonance, SPR)技術測定時，抗體以大約低於 10^{-7} M或甚至更小的平衡解離常數(K_D)與預定的抗原結合，並且其與預定抗原結合的親和力是其與預定抗原或緊密相關的抗原之外的非專一性抗原(如BSA等)結合的親和力的至少兩倍。術語「識別抗原的抗體」在本文中可以与術語「專一性結合的抗體」互換使用。

【0056】術語「競爭結合」是指與本發明的單株抗體識別人 CD27 的胞外區上的相同抗原決定位或相同抗原決定位的一部分並與所述抗原結合的抗

體。與本發明的單株抗體結合相同抗原決定位的抗體是指識別並結合於本發明的單株抗體所識別的人 CD27 的胺基酸序列的抗體。

【0057】術語「核酸分子」是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是單股或雙股的，但優選是雙股DNA。當將核酸與另一個核酸序列置於功能關係中時，核酸是「有效連接的」。例如，如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，那麼啟動子或增強子有效地連接至所述編碼序列。

【0058】術語「交叉反應」是指本發明的抗體與來自不同物種的CD27結合的能力。例如，結合人CD27的本發明的抗體也可以結合另一物種的CD27。交叉反應性是通過在結合測定(例如SPR和ELISA)中檢測與純化抗原的專一性反應性，或與生理表現CD27的細胞的結合或功能性相互作用來測量。確定交叉反應性的方法包括如本文所述的標準結合測定，例如表面等表面電漿共振(SPR)分析，或流式細胞術。

【0059】術語「抑制」或「阻斷」可互換使用，並涵蓋部分和完全抑制/阻斷這兩者。CD70的抑制/阻斷優選地降低或改變無抑制或阻斷的情況下發生CD70結合時出現活性的正常水平或類型。抑制和阻斷也旨在包括與抗CD27抗體接觸時，與未與抗CD27抗體接觸的CD70相比，任何可測量的CD70結合親和力降低。

【0060】術語「抑制生長」(例如關於細胞)旨在包括細胞生長任何可測量的降低。

【0061】術語「誘導免疫反應」和「增強免疫反應」可互換使用，並指免疫反應對特定抗原的刺激(即，被動或適應性的)。針對誘導CDC或ADCC的術語「誘導」是指刺激特定的直接細胞毒性作用機制。

【0062】「ADCC」，即antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞媒介的細胞毒性作用，是指表現Fc受體的細胞通過識別抗體的

Fc段直接殺傷被抗體包覆的目標細胞。可通過對IgG上Fc段的修飾，降低或消除抗體的ADCC效應功能。所述的修飾指在抗體的重鏈恆定區進行突變，如選自IgG1的N297A、L234A、L235A、IgG2/4 chimera、IgG4的F235E或L234A/E235A突變。

【0063】生產和純化抗體和抗原結合片段的方法在現有技術中習知和能找到，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8章和15章。如，老鼠可以用人CD27或其片段免疫，所得到的抗體能被再摺疊，純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的CDR區加上一個或多個人框架區。人框架區生殖系列序列可以從ImMunoGeneTics(IMGt)的網站<http://imgt.cines.fr>得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351上獲得。

【0064】基因工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。相應抗體的cDNA序列可以選殖並重組至GS表現載體。重組的免疫球蛋白表現載體可以穩定地轉染CHO細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳類動物表現系統會導致抗體的醣基化，特別是在Fc片段的高度保守N端。通過度表現與人源抗原專一性結合的抗體得到穩定的選殖。陽性的選殖在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化、收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩，離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者冷凍乾燥。

【0065】抗體指單株抗體，所述的單株抗體(mAb)，指由單一的選殖細胞株得到的抗體，所述的細胞株不限於真核的，原核的或噬菌體的選殖細胞株。

單株抗體或抗原結合片段可以用如雜交瘤技術、重組技術、噬菌體顯示技術，合成技術(如CDR-grafting)，或其它現有技術進行重組得到。

【0066】「給予」和「處理」當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。「給予」和「處理」可以指例如治療、藥物動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。「給予」和「處理」還意指通過試劑、診斷、結合組合物或通過另一種細胞體外和離體處理例如細胞。「處理」當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0067】「治療」意指給予患者內用或外用治療劑，諸如包含本發明的任一種結合化合物的組合物，所述患者具有一種或多種疾病症狀，而己知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，無論是通過誘導這類症狀退化還是抑制這類症狀發展到任何臨床能測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作「治療有效量」)可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。通過醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實施方式(例如治療方法或製品)在緩解單個患者的目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如Student t檢驗、卡方檢驗、依據Mann和Whitney的U檢驗、Kruskal-Wallis檢驗(H檢驗)、Jonckheere-Terpstra檢驗和Wilcoxon檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0068】「基本上由……組成」或其變形表示包括所有所述元件或元件組，並且任選包括與所述元件類似或不同性質的其它元件，所述其它元件非顯著改變指定給藥方案、方法或組合物的基本性質或新性質。作為非限制性例子，基本上由所提及的胺基酸序列組成的結合化合物還可以包括一種或多種胺基酸，其不顯著影響結合化合物的性質。

【0069】術語「天然存在的」是指這樣的事實，即該對象可在自然界中發現。例如存在於可從自然界來源分離得到的生物體(包括病毒)、且未經人工在實驗室中有意修飾的多肽序列或多核苷酸序列即是天然存在的。

【0070】「有效量」包含足以改善或預防醫學病症的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：如待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

【0071】「外源性」指根據背景在生物、細胞或人體外產生的物質。「內源性」指根據背景在細胞、生物或人體內產生的物質。

【0072】本文使用的敘述「細胞」、「細胞株」和「細胞培養物」可互換使用，並且所有這類名稱都包括其後代。因此，單詞「轉殖體」和「轉殖細胞」包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在DNA含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉殖細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0073】「任選」或「任選地」意味著隨後所描述的事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，「任選包

含1-3個抗體重鏈變異區」意味著特定序列的抗體重鏈變異區可以但不必須存在。

【0074】「藥物組合物」表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前驅藥物與其他化學成分的混合物，以及其他成分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。藥物組合物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【圖式簡單說明】

【0075】

圖1：液相層析質譜儀鑑定mAb077酸峰成分和主峰成分的脫醯胺狀況，結果顯示酸峰成分主要為第74個胺基酸天門冬醯胺酸(Asn)脫醯胺，其反應比例達到59.6%。

圖2：使用SEC-HPLC方法鑑定突變前mAb077和突變後077N74T分子的酸鹼峰分佈狀態。mAb077在29分鐘處先於主峰溶析出明顯酸性峰。

圖3：40°C熱處理1個月後，使用ICE測定077N74T酸鹼等電點成分的分佈狀況及其相對起始狀態的變化情況。

圖4：使用不同濃度抗CD27抗體(突變前/後分子)或Herceptin對照，刺激人血PBMC增殖的功能強度。

圖5：用對照人IgG1抗體處理的小鼠中或用各抗CD27抗體處理的小鼠中，人源Raji移植淋巴瘤相對於腫瘤接種後的天數的腫瘤大小(以 mm^3 表示)。誤差用標準差表示。

圖6：用對照人IgG1抗體處理的小鼠中或用各抗CD27抗體處理的小鼠中，小鼠體重的變化情況(g)。誤差用標準差表示。

【實施方式】

【0076】 以下結合實施例用於進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，如冷泉港的《抗體技術實驗手冊》，《分子選殖手冊》；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

【0077】 實施例 1 人 CD27 抗原結合抗體片段(Fab)的篩選發現
針對人CD27抗原的人源抗體片段篩選使用了體外噬菌體顯示系統。所用抗原包括CD27-HisFc(Sino Biological #10039-H03H)，CD27-Fc(Sino Biological #10039-H31H)和CD27-His(Sino Biological #10039-H08B1)。抗原被直接吸附固定在Maxisorp 96孔篩選盤(Thermo Scientific 446469)，或經生物素化後吸附在Dynabeads微顆粒(M280, Streptavidin, Invitrogen #60210)上，並使用KingFisher(Thermo Scientific)自動篩選工作站經標準噬菌體顯示篩選流程進行篩選。針對每種抗原進行了3-4輪以上篩選，在每輪中使用人源抗體Fc片段以消除背景。在最後一輪篩選之後，挑取單菌落選殖孵育上清液液，通過ELISA方法初步鑑定結合人CD27的抗體片段，初選標準為ELISA讀數至少是背景訊號的2倍以上。

【0078】 實施例 2 生物膜干涉(BLI)測定抗體片段與人 CD27 親和力
每個獨特序列的抗體Fab片段在其C端增加組胺酸標記後使用大腸桿菌表現系統過度表現，然後由Ni-NTA親和樹脂進行純化。Fab使用ForteBio Octet RED96系統由以下方法測定其與人CD27的親和力：首先使用BLI系統的AHC(人源IgG抗體Fc片段特異)感測器捕獲人CD27-HisFc融合蛋白，然後將其浸入含有5-10 µg/ml每種純化Fab蛋白的測量緩衝液中。收集的數據由Data Acquisition 7.1軟體進行處理，並擬合為1:1結合的Langmuir模型曲線。

篩選得到結合力最優的抗體mAb077，用於進一步的分析和開發試驗。其與CD27結合與動力學常數如表1所示。

【0079】表1

抗體	抗原	親和力 K _D (M)	結合速度k _a (1/M*s)	解離速度 k _d (1/s)
mAb077-Fab	人CD27-HisFc	4.08E-09	2.96E+05	1.21E-03
mAb077-IgG	人 CD27-HisFc	1.37E-10	1.58E+05	2.17E-05
1F5-IgG	人 CD27-His	1.39E-09	6.58E+04	9.15E-05
mAb077-IgG	鼠CD27-HisFc	3.04E-11	4.38E+05	1.33E-05
1F5-IgG	鼠CD27-HisFc	無結合	無結合	無結合
mAb077-IgG	猴CD27-Fc	5.62E-10	7.58E+04	4.26E-05
1F5-IgG	猴CD27-Fc	2.13E-09	1.14E+05	2.43E-04

1F5-IgG即抗體Varlilumab。

【0080】人單株抗體mAb077的重鏈和輕鏈變異區序列如下：

mAb077 V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 1

【0081】mAb077 V_L

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISDLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRDAWPPTFGQ
GTKVEIK

SEQ ID NO: 2

【0082】其含有下列CDR序列：

名稱	序列	編號
----	----	----

HCDR1	GYGIH	SEQID NO: 3
HCDR2	WINPNRGSTKYAQKFQG	SEQID NO: 4
HCDR3	DPGYTWYFDV	SEQID NO: 5
LCDR1	RASQDISSDLA	SEQID NO: 6
LCDR2	AASTLQS	SEQID NO: 7
LCDR3	QQRDAWPPT	SEQID NO: 8

【0083】將篩選得到的抗體輕重鏈變異區序列與數據庫比對。將SEQ ID NO: 1序列與數據庫中的重鏈生殖系列序列比對，顯示其與V_H3-74生殖系列序列相似，屬生殖系列序列的V_H3家族。將SEQ ID NO: 2序列與數據庫中的輕鏈生殖系列序列比對，顯示其與V_κ1-12生殖系列序列相似，屬生殖系列序列的V_κ1家族。

【0084】 V_H3-74生殖系列序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVW
VSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AR

SEQ ID NO: 13

【0085】 V_κ1-12生殖系列序列

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFP

SEQ ID NO: 14

【0086】 實施例3 抗體Fab片段轉為IgG及其表現純化

將每個抗體片段分別選殖進表現IgG1亞型抗體輕鏈和重鏈的哺乳動物細胞表現載體。配對的載體以瞬轉方式按標準流程轉染入HEK293細胞中。表現後收集上清液離心過濾，然後通過protein A親和力層析術純化IgG。溶析的蛋白經中和後離子交換轉入PB緩衝液(20 mM磷酸鈉, 150 mM NaCl, pH

7.0)。蛋白濃度通過紫外光分光光度計測定，並在變性、還原或非還原條件下測定其純度和性質。

【0087】輕鏈全長序列

mAb077 LC

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSDLAWYQQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRDWPPTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9

【0088】重鏈全長序列

mAb077 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10

【0089】實施例4 mAb077分子質譜肽圖分析

第 21 頁，共 27 頁(發明說明書)

使用製備級IEC先分離mAb077的酸峰和主峰成分待測。取500 µg各抗體樣品，加入400 µL含6 M胍鹽酸鹽的0.25 M Tris-HCl緩衝液混勻，加入1 M的DTT至終濃度為20 mM，混勻後37°C水浴1小時。取出樣品平衡至室溫，加入IAM至終濃度為50 mM，避光孵育30分鐘，然後轉移至10 kDa超過濾管，13000 rpm，10 min，取出後加入含有2 M尿素的50 mM Tris-HCl (pH 7.4)溶液400 ul進行超過濾，置換原有緩衝液，重複置換上述Buffer 1次。將超過濾好的樣品，進行蛋白濃度檢測，用含有2 M尿素的50 mM Tris-HCl溶液將樣品濃度調整至0.5 mg/ml，按照樣品：酶=25:1加入Trypsin酶4 µL，37°C水浴4小時。將製備好的樣品使用Acquity UPLC_Q-TOF液相層析質譜儀、配ACQUITY UPLC BEH C18管柱進行LC-MS數據收集。管柱流動相A：0.1%甲酸水；流動相B：0.1%甲酸乙腈。利用Waters UNIFI提取各個肽段的質譜信息，並進行序列比對，確定抗體的肽段覆蓋率。修飾設置如下：G0F (+1444.53387)等醮基化設置為動態修飾，Carbamidomethyl C (+57.02146)設置為固定修飾，Oxidation M、Deamidation N為動態修飾Target match tolerance設置為20 ppm，Fragment match tolerance設置為50 ppm。

【0090】
$$\text{脫醮}\% = \frac{\text{發生脫醮修飾的胺基酸響應}}{\text{所有包含該位置的胺基酸響應}} \times 100\%$$

分析結果如圖1所示，mAb077分離後的酸峰成分在重鏈第74個胺基酸天門冬醮胺酸(Kabat位置編號為73位)脫醮胺比例為59.6%，而主峰成分脫醮胺比例僅為12.2%，證實mAb077樣品重鏈變異區第74個胺基酸天門冬醮胺酸(Kabat位置編號為73位)發生了非常顯著的脫醮胺，並且此位點脫醮胺導致抗體在IEC上出現了游離的酸峰成分。因此，我們將重鏈變異區第74個胺基酸天門冬醮胺酸(Asn)(Kabat位置編號為73位)替換為蘇胺酸(Thr)，突變後分子077N74T的重鏈變異區序列如下(輕鏈與原mAb077相同)：

077N74T V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDTSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 11

【0091】突變後077N74T抗體重鏈全長序列

077N74T HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGIHWVRQAPGKGLEWI
GWINPNRGSTKYAQKFQGRVTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC
ARDPGYTWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12

【0092】實施例5 Biacore對比抗CD27抗體及其突變分子與人CD27抗原親和力

用Protein A生物感測芯片親和捕獲待測抗體分子，然後於芯片表面流經各梯度濃度的人CD27-his抗原(義翹神州#10039-H08H)，用Biacore T200儀器即時檢測反應訊號獲得結合和解離曲線。在每個實驗循環解離完成後，用甘胺酸-鹽酸再生溶液(pH 1.5)將生物感測芯片洗淨再生。用BIAevaluation version 4.1，GE軟體以(1:1) Langmuir模型擬合數據，得出親和力數值如下表，突變後分子077N74T的親和力略高於原mAb077分子但並無顯著差別。

第 23 頁，共 27 頁(發明說明書)

【0093】表2

固定相	流動相	結合常數(1/Ms)	解離常數(1/s)	親和力(M)
077N74T	huCD27-his	2.59E5	6.75E-5	2.61E-10
mAb077	(Sino Biological)	2.49E5	8.34E-5	3.35E-10

【0094】實施例6 抗CD27抗體及其突變分子的離子交換酸鹼峰分析

使用Agilent-1260高效液相管柱層析儀，流動相A：20 mM HEPES (pH 7.50)，流動相B：20 mM HEPES+500 mM NaCl (pH 7.50)。待測抗體蛋白樣品脫鹽後，流動相A將試樣稀釋至終濃度約為5.0 mg/mL，進樣量50 µg，流速0.8 mL/min，分別空白緩衝液和試樣於進樣瓶或內襯管中，用96.0%流動相A+4.0%流動相B以0.8 mL/min的流速平衡系統至基線平穩後開始進樣，並記錄層析圖。樣品檢測結束後，使用1 M NaCl以0.2-0.5 mL/min的流速清洗管柱。分析結果如圖2所示，抗CD27抗體mAb077在IEC液相圖約29分鐘處產生明顯的酸峰成分，而突變後的077N74T分子不發生脫醯胺，此酸峰成分消失。

【0095】實施例7 抗CD27抗體077N74T加速熱穩定性測試

將077N74T抗體溶液靜置於40°C恆溫箱中進行加速熱穩定性測試，分別在第15天和第30天時間點取樣，使用iCIEF-全柱成像毛細管等電聚焦電泳(ProteinSimple E50634全柱成像毛細管等電聚焦分析儀；聚焦時間1：1500V 1分鐘；聚焦時間2：3000V 8分鐘)，分析待測抗體蛋白的等電點(pI)不勻性及其酸鹼成分分佈在加熱放置前後不同時間點的變化趨勢。結果如圖3和表3所示，077N74T在40°C放置15天後，各成分比例無明顯變化；而在放置一個月後，pI 9.0的偏酸性成分增加10.4%，pI 9.1的中性成分比例下降12.3%。總體顯示出了此突變後抗體也具備較好的熱穩定性，不會進一步因脫醯胺發生劇烈的酸峰增加。

【0096】表3

放樣時間	ICE%			主峰
	酸峰	主峰	鹼峰	
D0	40.4	56.0	3.6	/
40°C D15	40.6	55.4	4.0	0.6
40°C D30	51.0	43.7	5.2	12.3

【0097】實施例8 抗CD27抗體及其突變分子的體外PBMC激活功能

人血PBMC通過Ficoll密度梯度離心方法從新鮮肝素抗凝血劑中分離得到。將3 μg/mL抗CD3抗體與不同濃度的各個待測抗體藥物(以Herceptin作IgG1亞型對照)被覆於ELISA板中，4°C孵育過夜。第二天洗板後，加入2×10⁵/孔的外周血單核細胞(PBMC)，37°C，5% CO₂培養箱孵育7天。孵育結束後，用CCK-8試劑盒檢測PBMC的增殖，並根據OD₄₅₀值計算出EC₅₀。結果如圖4所示，突變後分子077N74T的刺激PBMC增殖活性略強於原mAb077分子。

【0098】實施例9 抗CD27抗體及其突變分子的體內藥效對比

54 隻 CB17-SCID 小鼠，雌性，5-6 周，18-20 g，購自北京維通利華，分 6 組，每組 9 隻。體外培養 Raji 細胞在含 10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 培養液中。收集指數生長期的 Raji 細胞，無菌條件下，移植於 CB17-SCID 小鼠皮下，每隻小鼠接種 2×10⁶個細胞。對照抗體 Varlilumab 為 Celldex 公司開發的抗 CD27 抗體(具體見 CN103154034B)。腫瘤接種當天為第 0 天。在接種第 3 天開始第一次給藥，之後按如下方案進行：

第 1 組：IgG1 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 2 組：077N74T 3 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 3 組：077N74T 10 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 4 組：077N74T 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 5 組：mAb077 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

第 6 組：Varlilumab 30 mg/kg，i.p.，N=9，Q2D，3、5、7、9、11、13、15、17 天；

給藥後每天監測動物日常行為表現，共進行18天。用游標卡尺測量腫瘤的長徑及短徑後，用長×寬²/2計算腫瘤體積。腫瘤抑制率採用公式 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。T和C分別為給藥組和對照組在某一特定時間點的腫瘤體積(TV)。體重變化用公式 $RCBW\% = (BW_i - BW_0) / BW_0 \times 100\%$ ，BW_i是小鼠當前體重，BW₀是分組當日的小鼠體重。所有實驗結果以平均瘤體積±標準差(SEM)表示。用T-Test檢驗方法比較治療組腫瘤體積和瘤重與對照組相比有無顯著性差異。所有的數據均用Graphpad進行分析，p<0.05為具有顯著性差異。

【0099】如圖5和圖6所示，在Raji移植腫瘤模型中，077N74T表現出抗腫瘤作用及劑量依賴，低、中、高劑量組抑瘤率(Tumor growth inhibition, TGI)分別為62%、67%和73%，且最高劑量組(30 mg/kg)的077N74T抑瘤效果略強於同劑量突變前的mAb077(59%)或對照抗體Varlilumab(61%)。各給藥組均沒有出現顯著的小鼠體重下降情況，闡明小鼠對不同劑量下的各個抗體耐受性均良好。

【0100】雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

【0101】 無



【發明摘要】

【中文發明名稱】抗CD27抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

【英文發明名稱】ANTI-CD27 ANTIBODY, ANTIGEN BINDING FRAGMENT

THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【中文】

本發明關於一種抗 CD27 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。更進一步，本發明關於一種包含所述抗 CD27 抗體 CDR 區的人抗體，以及包含人抗 CD27 抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。尤其，本發明關於一種人抗 CD27 抗體及其在製備用於治療 CD27 媒介的疾病或病症的藥物中的用途。

【英文】

The invention relates to an anti-CD27 antibody, an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutical use thereof. Further, the invention relates to a humanized antibody including CDR regions of the anti-CD27 antibody, and a pharmaceutical composition including human anti-CD27 antibodies and antigen binding fragments thereof, and a use thereof as anticancer drugs. Especially, the invention relates to a human anti-CD27 antibody and a use thereof of preparation of a medicine for the treatment of CD27-mediated diseases or disorders.

【指定代表圖】圖5

【代表圖之符號簡單說明】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種抗CD27抗體或其抗原結合片段，其包含：輕鏈變異區和重鏈變異區，其中，所述的抗體輕鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；和/或

所述的抗體重鏈變異區包含胺基酸序列分別如SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

【第2項】如請求項1所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列輕鏈變異區V κ 1序列的框架區或其衍生序列；優選地，所述抗體輕鏈變異區的框架區衍生自V κ 1-12序列；和/或

所述抗CD27抗體或其抗原結合片段還包含人類生殖系列重鏈變異區V μ 3序列的框架區或其衍生序列；優選地，所述重鏈變異區的框架區衍生自V μ 3-74序列。

【第3項】如請求項2所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體重鏈變異區V μ 3序列的框架區序列中Kabat位置73的天門冬醯胺酸被蘇胺酸替換。

【第4項】如請求項2所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述的輕鏈變異區的胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示或與SEQ ID NO: 2有至少90%同一性；和/或所述重鏈變異區的胺基酸序列如SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11所示，或與SEQ ID NO: 1或者SEQ ID NO: 11有至少90%同一性。

【第5項】如請求項1至4中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其為人抗體或其片段。

【第6項】如請求項1至4中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，所述抗CD27抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其變體的重鏈恆定區，抗原結合片段為Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段；優選地，所述抗CD27抗體的重鏈包含人源IgG1、IgG2或IgG4的重鏈恆定區。

【第7項】如請求項1至4中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，其中所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的抗體輕鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或與SEQ ID NO: 9有至少90%同一性；和/或所述抗CD27抗體或其抗原結合片段的抗體重鏈的胺基酸序列如SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12所示，或與SEQ ID NO: 10或者SEQ ID NO: 12有至少90%同一性。

【第8項】一種多核苷酸，其轉譯如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段。

【第9項】一種載體，其含有如請求項8所述的多核苷酸；所述的載體為真核表現載體、原核表現載體或病毒載體。

【第10項】一種宿主細胞，其是用如請求項9所述的載體轉殖獲得的；

優選地，所述宿主細胞為細菌、酵母菌或者哺乳動物細胞；

更優選地，所述宿主細胞為大腸桿菌、畢赤酵母菌、中國倉鼠卵巢細胞或人胎腎293細胞。

【第11項】一種用於製備如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體及其抗原結合片段的方法，所述方法包括在如請求項10所述的宿主細胞中表現所述抗體或其抗原結合片段，並分離所述抗體或其抗原結合片段。

【第12項】一種抗體-藥物複合體，其中的所述抗體含有如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段。

【第13項】一種藥物組合物，其含有如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，以及可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【第14項】一種如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段、或者如請求項12所述的抗體-藥物複合體，或如請求項13所述的藥物組合物在製備用於治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的藥物中的用途；

優選地，所述疾病或病症為癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述疾病或病症為表現CD27的癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述癌症為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤，所述自身免疫疾病為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。

【第15項】一種治療和/或預防CD27媒介的疾病或病症的方法，所述方法包括給予所需患者治療有效量的如請求項1-7中任一項所述的抗CD27抗體或其抗原結合片段，或者如請求項12所述的抗體-藥物複合體，或者如請求項13所述的藥物組合物；

優選地，所述疾病或病症為癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述疾病或病症為表現CD27的癌症或自身免疫疾病；

更優選地，所述癌症為直腸癌、腦癌、腎癌、肺癌、肝癌、多發性骨髓瘤和黑色素瘤，所述自身免疫疾病為自身免疫性腦脊髓炎、系統性紅斑狼瘡、多發性硬化症和類風濕性關節炎。