



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110475787 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201880020490.8

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

(22)申请日 2018.01.26

务所(普通合伙) 11201

(30)优先权数据

代理人 宋融冰

1701351.7 2017.01.27 GB

(51)Int.Cl.

1713296.0 2017.08.18 GB

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2018/050239 2018.01.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/138521 EN 2018.08.02

(71)申请人 超人壹有限公司

地址 英国肯特

(72)发明人 威廉·詹姆斯·乔纳森·芬利

权利要求书4页 说明书35页 附图30页

(54)发明名称

结合剂

(57)摘要

本发明涉及特异性结合糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)的抗体分子及其抗原结合部分。在本发明的特定方面，抗体分子特异性结合人GITR和食蟹猴GITR。已经使用来源于鼠抗GITR抗体6C8的CDR序列开发和优化了本发明的抗GITR抗体分子。公开了抗体分子的医学用途。

1.一种特异性结合人糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)和食蟹猴GITR的人、人源化或嵌合抗体分子或其抗原结合部分,其中所述抗体分子或抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区具有:

HCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:F-S-L-S-T-S/F-G-Y-G (SEQ ID NO:7);

HCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:I-W-W-D-D-D-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:8);和

HCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:T-R-Q/L/V-Y-F-P-F-A (SEQ ID NO:9)。

2.根据权利要求1所述的抗体分子或抗原结合部分,其中:

所述HCDR1包含在序列中按以下顺序的氨基酸:G-F-S-L-S-T-S/F-G-Y-G-V-G (SEQ ID NO:25);

所述HCDR2包含在序列中按以下顺序的氨基酸:L-A-H-I-W-W-D-D-D-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:26);和

所述HCDR3包含在序列中按以下顺序的氨基酸:T-R-Q/L/V-Y-F-P-F-A-Y (SEQ ID NO:27)。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的抗体分子或抗原结合部分,包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:A-S-Q-N/S-V-G-T/S-N (SEQ ID NO:16);

LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S/Y-A-S-Y/N-R-Y-S/T (SEQ ID NO:17);和

LCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:Y-S-T/N-D-P-L (SEQ ID NO:18)。

4.根据权利要求3所述的抗体分子或抗原结合部分,其中:

所述LCDR1包含在序列中按以下顺序的氨基酸:R-A-S-Q-N/S-V-G-T/S-N-L-A (SEQ ID NO:28);

所述LCDR2包含在序列中按以下顺序的氨基酸:S/Y-A-S-Y/N-R-Y-S/T (SEQ ID NO:17);和

所述LCDR3包含在序列中按以下顺序的氨基酸:Q-Q-Y-S-T/N-D-P-L-T (SEQ ID NO:173)。

5.根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分,包含:

(a)氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVKG (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆D_A6];或

(b)氨基酸序列GFSLSTFGYGVG (SEQ ID NO:35) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVKG (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGTNLA (SEQ ID NO:36) (LCDR1)、YASYRYT (SEQ ID NO:37) (LCDR2) 和QQYSNDPLT (SEQ ID NO:38) (LCDR3) [克隆G_G10];或

(c)氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVKG (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRLYFPFAY (SEQ ID NO:39) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (SEQ ID NO:40) (LCDR1)、SASNRRS (SEQ ID NO:41) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆I_C2];或

(d) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRVYFPFAY (SEQ ID NO:42) (HCDR3)、RASQNVGTNLA (SEQ ID NO:43) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆H_B3]；或

(e) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆A6.1]。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆D_A6]。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，与W02006/105021中标记为“HuN6C8-Ag1y”的人源化鼠抗GITR IgG抗体相比，所述抗体分子或抗原结合部分具有改善的GITR活化。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，与W02006/105021中标记为“HuN6C8-Ag1y”的人源化鼠抗GITR IgG抗体相比，所述抗体分子或抗原结合部分具有改善的计算机模拟免疫原性。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，与W02006/105021中标记为“HuN6C8-Ag1y”的人源化鼠抗GITR IgG抗体相比，所述抗体分子或抗原结合部分对食蟹猴GITR具有改善的亲和力。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含一个或多个替换、缺失或插入，所述一个或多个替换、缺失或插入移除了翻译后修饰位点，例如糖基化位点、脱氨基位点、磷酸化位点或异构化/片段化位点。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含其中已插入了CDR的一个或多个人可变结构域框架支架。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含其中已插入了相应的HCDR序列的IGHV3-7人种系支架。

13. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含其中已插入了相应的LCDR序列的IGKV3-11人种系支架。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，包含免疫惰性恒定区。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体分子或抗原结合部分，是Fab片段、F(ab)2片段、Fv片段、四聚体抗体、四价抗体、多特异性抗体(例如，二价抗体)、结构域特异性抗体、单结构域抗体、单克隆抗体或融合蛋白。

16. 一种免疫缀合物，包含与治疗剂连接的如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分。

17. 一种核酸分子，编码如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分。

18. 一种载体,包含权利要求17所述的核酸分子。
19. 一种宿主细胞,包含如权利要求17所限定的核酸分子或如权利要求18所限定的载体。
20. 一种产生抗GITR抗体和/或其抗原结合部分的方法,包括在导致所述抗体和/或其抗原结合部分的表达和/或产生的条件下培养如权利要求19所限定的宿主细胞,和从所述宿主细胞或培养物中分离所述抗体和/或其抗原结合部分。
21. 一种药物组合物,包含如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分,或如权利要求17所限定的核酸分子,或如权利要求18所限定的载体。
22. 一种用于增强受试者中的免疫应答的方法,包括施用有效量的如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分,或如权利要求16所限定的免疫缀合物,或如权利要求17所限定的核酸分子,或如权利要求18所限定的载体,或如权利要求21所限定的药物组合物。
23. 一种用于治疗或预防受试者中的癌症的方法,包括施用有效量的如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分,或如权利要求16所限定的免疫缀合物,或如权利要求17所限定的核酸分子,或如权利要求18所限定的载体,或如权利要求21所限定的药物组合物。
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述癌症选自由以下所组成的组:胰腺癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、尿膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤和血液组织癌。
25. 如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分或如权利要求16所限定的免疫缀合物或如权利要求17所限定的核酸分子或如权利要求18所限定的载体或如权利要求21所限定的药物组合物,用于在治疗癌症中使用。
26. 根据权利要求25使用的所述抗体分子、或其抗原结合部分、或免疫缀合物、或核酸分子、或载体,或者根据权利要求23或24所述的治疗方法,其中所述抗体、其抗原结合部分、免疫缀合物、核酸、载体或药物组合物用于与第二治疗剂例如抗癌剂组合分开、顺序或同时使用。
27. 如权利要求1至15中任一项所限定的抗体分子或其抗原结合部分或如权利要求16所限定的免疫缀合物或如权利要求17所限定的核酸分子或如权利要求18所限定的载体或如权利要求21所限定的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
28. 一种产生特异性结合人GITR和食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分的方法,包括以下步骤:
- (1) 将来自非人来源的抗GITR CDR移植到人v-结构域框架中以产生人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分;
 - (2) 产生在CDR中包含一个或多个突变的所述人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分的克隆的噬菌体文库;
 - (3) 筛选所述噬菌体文库与人GITR和食蟹猴GITR的结合;
 - (4) 从所述筛选步骤(3)中选择对人GITR和食蟹猴GITR具有结合特异性的克隆;和

(5) 从选自步骤(4)的克隆产生特异性结合人GITR和食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分。

结合剂

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性结合糖皮质激素诱导的TNF受体 (GITR) 的抗体分子及其医学用途。

背景技术

[0002] GITR(也称为TNFRSF18)是TNF受体超家族的共刺激成员。GITR的表达主要存在于T细胞、NK细胞、B细胞上，并且较小程度上在一些其它造血细胞类型上。GITR在静息T细胞和NK细胞中表现为低表达，但在CD4+Foxp3+调节性T细胞(Treg)中组成型高水平表达。GITR被GITR配体或激动剂抗GITR抗体的体外或体内结合引起CD4+和CD8+T细胞的扩增，并改善T细胞对Treg抑制的抗性。

[0003] 临床前证据表明在实验性肿瘤中诱导GITR信号传导可以增强效应T细胞(Teff)的活化并降低Treg的活性。在多个鼠肿瘤模型中，施用激动剂抗GITR mAb导致增强的内源Teff应答，肿瘤微环境中Treg频率的降低，以及随后的肿瘤排斥。因此，抗GITR mAb具有作为癌症和其它环境中的免疫治疗剂的潜力，并且还有助于放大目前建立的癌症免疫疗法的有效性。

[0004] 目前批准的大部分抗体治疗剂来自经免疫的啮齿类动物。这些抗体中的大部分经历了通过将鼠CDR“移植”到人v基因框架序列中的称为“人源化”的过程，(参见Nelson等人，2010,Nat Rev Drug Discov 9:767-774)。该过程通常是不精确的并且导致所得抗体的靶结合亲和力降低。为了恢复原始抗体的结合亲和力，通常在移植的v-结构域的可变结构域框架中的关键位置处引入鼠残基(也称为“回复突变”)。

[0005] 虽然已经显示与具有完全鼠v-结构域的那些相比通过CDR移植和回复突变而人源化的抗体在临床中诱导较低的免疫应答率，但是由于潜在的物理不稳定性和免疫原性基序仍然存在于移植的CDR环中，使用该基本移植方法人源化的抗体仍然具有显著的临床发展风险。由于蛋白质免疫原性的动物测试通常不能预测人体中的免疫应答，因此用于治疗用途的抗体工程集中于使预测的人T细胞表位含量、非人种系氨基酸含量和纯化蛋白中的聚集潜力最小化。

[0006] 因此，理想的人源化激动性抗GITR抗体在v-结构域中具有尽可能多的与在充分表征的人种系序列的框架和CDR两者中发现的那些相同的残基。Townsend等人(2015;PNAS 112:15354-15359)描述了产生抗体的方法，其中将来源于大鼠、兔和小鼠抗体的CDR移植到优选的人框架中，然后进行称为“增强的二元替换(Augmented Binary Substitution)”的人种系化(germ-lining)方法。虽然该方法在原始抗体互补位(paratope)中表现出基本的可塑性，但在缺乏高精度的抗体-抗原共晶结构数据的情况下，仍然不可能可靠地预测任何给定抗体的CDR环中哪些个体残基可被转化人类种系，以及以什么样的组合。

[0007] 因此，CDR种系化是一个复杂的多因素问题，这是因为优选应保持分子的多种功能特性，在这种情况下包括：靶结合特异性，对来自人和动物测试物种(例如食蟹猴(cynomolgus monkey)，也称为食蟹猴(crab-eating macaque)，即食蟹猴(Macaca

fascicularis))两者的GITR的亲和力,v-结构域生物物理稳定性和/或IgG表达产量。抗体工程研究表明,即使关键CDR中的单个残基位置也可对所有这些期望的分子特性产生显著影响。

[0008] WO2006/105021描述了称为“6C8”的激动性鼠抗GITR IgG分子,以及6C8的人源化形式的制备。使用经典人源化技术,即通过将Kabat定义的鼠CDR移植到人重链和轻链框架序列中,并使一些人框架残基回复突变成相应定位的6C8鼠残基来产生6C8的那些人源化形式。在WO2006/105021中仅描述了对6C8的Kabat定义的鼠CDR之一的仅一个氨基酸修饰,以修饰潜在的糖基化位点。由于上述原因,WO2006/105021中描述的6C8的这种人源化形式的并不理想。

[0009] 本发明提供了多种优化的抗GITR抗体及其医学用途。

发明内容

[0010] 根据本发明的一个方面,提供了特异性结合人GITR和任选的食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分,其中所述抗体分子或抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区具有:

[0011] HCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:G-F-S或S的保守替换-L或L的保守替换-S-T或T的保守替换-S或任何氨基酸(例如F)-G或G的保守替换-M或任何氨基酸(例如Y、F、L或W)-G或G的保守替换-V或V的保守替换-G或G的保守替换(SEQ ID NO:1);

[0012] HCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:L或L的保守替换-A或A的保守替换-H或H的保守替换-I或I的保守替换-W-W-D或D的保守替换-D或D的保守替换-D或D的保守替换-K-Y-Y-N或任何氨基酸(例如,V)-P或任何氨基酸(例如,D)-S-L或L的保守替换-K-S或任何氨基酸(例如,G)(SEQ ID NO:2);和

[0013] HCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:T或任何氨基酸(例如,G、A、N、S或I)-R或任何氨基酸(例如,D、T或V)-R或任何氨基酸(例如,Q、L、M、I或V)-Y-F或F的保守替换-P-F-A-Y(SEQ ID NO:3);

[0014] 并且其中,HCDR1、HCDR2或HCDR3中的至少一个分别与以下氨基酸序列相比在允许的地方具有至少一个氨基酸差异:GFSLSTSGMGVG(SEQ ID NO:4;6C8鼠HCDR1),LAHIWWDDDKYYNPSLKS(SEQ ID NO:5;6C8鼠HCDR2),LAHIWWDDDKEYQPSLKS(SEQ ID NO:65;6C8突变体HCDR2)和TRRYFPFAY(SEQ ID NO:6;6C8鼠HCDR3)。

[0015] 在本发明的在另一个方面,抗体分子或抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区具有:HCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:F-S-L-S-T-S/F-G-Y-G(SEQ ID NO:7);

[0016] HCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:I-W-W-D-D-D-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G(SEQ ID NO:8);和

[0017] HCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:T-R-Q/L/V-Y-F-P-F-A(SEQ ID NO:9)。

[0018] 在本发明的优选方面,抗体分子特异性结合人GITR并且还结合食蟹猴GITR。

[0019] 抗体分子或抗原结合部分可还包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

[0020] LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:K或K的保守替换-A或A的保守替换-S-

Q-N或N的保守替换-V-G或G的保守替换-T或T的保守替换-N或任何氨基酸(例如,Y)-V或V的保守替换-A(SEQ ID NO:10);

[0021] LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S或任何氨基酸(例如,Y、E、D、F、L或N)-A-S或任何氨基酸(例如,Y)-Y或任何氨基酸(例如,N)-R-Y或任何氨基酸(例如,A或D)-S或S的保守替换(SEQ ID NO:11);和

[0022] LCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:Q-Q或Q的保守替换-Y或任何氨基酸(例如,R或H)-N或N的保守替换-T或任何氨基酸(例如,K或N)-D或任何氨基酸(例如,W、L、S、E、V或N)-P-L-T(SEQ ID NO:12);

[0023] 并且其中,LCDR1、LCDR2或LCDR3中的至少一个分别与以下氨基酸序列相比在允许的地方具有至少一个氨基酸差异:KASQNVGTNVA(SEQ ID NO:13)(6C8鼠LCDR1),SASYRYS(SEQ ID NO:14)(6C8鼠LCDR2)和QQYNTDPLT(SEQ ID NO:15)(6C8鼠LCDR3)。

[0024] 在另一个方面,本发明的抗体分子或抗原结合部分包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

[0025] LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:A-S-Q-N/S-V-G-T/S-N(SEQ ID NO:16);

[0026] LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S/Y-A-S-Y/N-R-Y-S/T(SEQ ID NO:17);和

[0027] LCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:Y-S-T/N-D-P-L(SEQ ID NO:18)。

[0028] 根据本发明还提供了免疫缀合物,包含与治疗剂连接的如本文所限定的抗体分子或其抗原结合部分。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了编码如本文所限定的抗体分子或其抗原结合部分的核酸分子。

[0030] 还提供了包含本发明核酸分子的载体。

[0031] 还提供了包含如本文所限定的本发明的核酸分子或载体的宿主细胞。

[0032] 在另一个方面,提供了产生抗GITR抗体和/或其抗原结合部分的方法,包括在导致抗体和/或其抗原结合部分表达和/或产生的条件下培养本发明的宿主细胞,和从宿主细胞或培养物中分离抗体和/或其抗原结合部分。

[0033] 在本发明的另一个方面,提供了药物组合物,包含如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所限定的本发明的载体。

[0034] 还提供了用于增强受试者中的免疫应答的方法,包括施用有效量的如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的免疫缀合物,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所限定的本发明的载体,或如本文所限定的本发明的药物组合物。

[0035] 在另一个方面,提供了用于治疗或预防受试者中的癌症的方法,包括施用有效量的如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的免疫缀合物,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所限定的本发明的载体,或如本文所限定的本发明的药物组合物。

[0036] 本发明还提供如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所

限定的本发明的免疫缀合物或如本文所限定的本发明的核酸分子或如所限定的本发明的载体或如本文限定的本发明的药物组合物,用于在治疗癌症中使用。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了如本文所限定使用的抗体分子、或其抗原结合部分、或免疫缀合物、或核酸分子、或载体,或者本发明的治疗方法,用于与第二治疗剂(例如抗癌剂)组合分开、顺序或同时使用。

[0038] 在另一个方面,提供了如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所限定的本发明的免疫缀合物或如本文所限定的本发明的核酸分子或如本文所限定的本发明的载体或如本文所限定的本发明的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0039] 本发明还提供了产生特异性结合人GITR和任选的食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分的方法,包括以下步骤:

[0040] (1) 将来自非人源的抗GITR CDR移植到人v-结构域框架中以产生人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分;

[0041] (2) 产生在CDR中包含一个或多个突变的人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分的克隆的噬菌体文库;

[0042] (3) 筛选噬菌体文库与人GITR和食蟹猴GITR的结合;

[0043] (4) 从筛选步骤(3)中选择对人GITR和食蟹猴GITR具有结合特异性的克隆;和

[0044] (5) 从选自步骤(4)的克隆产生特异性结合人GITR和食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分。

附图说明

[0045] 图1.与人GITR-Fc结合的IgG的直接滴定ELISA。用人GITR-Fc蛋白滴定(以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计)人IgG1形式的嵌合抗GITR和人种系移植物。展现与嵌合IgG相当的结合活性的克隆(VH1和VL3家族)显示在A中,并且具有受损结合(VH2和VH4家族)的克隆显示在B中。在每个图中,X轴显示IgG浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$),并且Y轴显示结合信号(OD 450nm)。

[0046] 图2.GITR Jurkat细胞报道分子测定(GITR激动)。将人IgG1形式的人种系移植抗体应用于Promega GITR+Jurkat细胞报道分子测定中。该测定显示,在移植家族VH1、VH3和VH4的IgG中,克隆VH3/VL2表现出最有效的浓度依赖性激动活性。由于缺少通过ELISA的有效靶结合,省略了VH2家族的移植物。X轴显示mAb浓度(ng/ml),并且Y轴显示倍数诱导。在图例中,“LM”是指配体多聚体,并且“C”是指对照。

[0047] 图3.文库来源的抗GITR scFv对人和食蟹猴GITR-Fc蛋白的直接结合ELISA。A显示分支A periprep ELISA(hum-cyno-hum-cyno),B显示分支B periprep ELISA(cyno-hum-cyno-hum),并且C显示分支C periprep ELISA(hum-hum-hum-hum)。各克隆来源于3个单独的噬菌体选择分支(A、B、C),其中在每轮中在生物素化的人(hum)或食蟹猴(cyno)GITR-Fc蛋白上选择噬菌体群。在每轮选择后,每轮利用hum和cyno GITR-Fc二者筛选92个文库来源的克隆(黑色圆圈)加上两个阳性对照(灰色星形)和两个阴性对照scFv(灰色方块)。每轮的平均值±SD值用灰色条表示。在每个图中,X轴显示选择轮次(“R”),其中“H”表示人,而“C”表示食蟹猴,并且Y轴显示结合信号(OD 450nm)。

[0048] 图4.所选抗GITR scFv对于人和食蟹猴GITR-Fc蛋白的直接结合ELISA的线性回归

相关性分析。绘制来自3个单独的噬菌体选择分支(A、B、C)的结合值,显示了在轮次(“R”)2、3和4之后单个克隆对于人(X轴)和食蟹猴(Y轴)GITR-Fc二者的结合信号(OD 450nm)。文库来源的抗GITR克隆用黑色圆圈表示,每次分析具有相关性趋势线。分支C值显示仅在人GITR蛋白上选择导致更具偏差的群体,更多克隆显示对人而非食蟹猴的反应性。

[0049] 图5.对于种系突变的CDR残基耐受性的分析。分别对于(A) V_L和(B) V_H结构域显示了132个独特的GITR结合scFv克隆的ELISA阳性群体的CDR中鼠氨基酸保留频率的图。除HCDR3中外,仅绘制了人/鼠残基诱变靶向的那些残基。在每个图中,Y轴显示鼠残基的保留百分比,CDR残基显示在X轴上。在X轴上的括号中记录的CDR残基与用于移植的人种系(IGKV3-11和IGHV3-7)中发现的那些相同。那些不在括号中但其值设定为0的残基在移植过程中突变为人种系。在A和B两者中,75%处的灰色虚线表示人种系替代鼠残基的耐受性的截止值。

[0050] 图6.与人和食蟹猴GITR-Fc蛋白结合的IgG的直接滴定ELISA。在直接结合ELISA中用人(A、C)和食蟹猴(B、D)GITR-Fc蛋白滴定($\mu\text{g}/\text{ml}$)人IgG1形式的嵌合抗GITR(mVH/mVL)、人种系移植物(VH1/VL1、VH3/VL2)和文库来源的克隆。对于人和食蟹猴两者,展现出与VH1/VL1和VH3/VL2 IgG相等或改善的结合活性的克隆显示在(A)和(B)中。对于人GITR-Fc、食蟹猴GITR-Fc或其两者,展现出比VH1/VL1和VH3/VL2 IgG差的结合活性的克隆显示在(C)和(D)中。在每个图中,X轴显示IgG浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$),并且Y轴显示结合信号(OD 450nm)。

[0051] 图7.对于优化的先导的GITR Jurkat细胞报道分子测定。细胞表面人GITR对于人IgG1形式的先导克隆D-A6(A)、I-C2(B)和G-G10(C)的交联的二重分析表明,所有3种克隆均在与抗HA抗体交联的人GITRL蛋白(x-连锁的[“x-L”]GITRL)类似的浓度范围引起浓度依赖性激动活性,其中D-A6是配体活性的最接近模拟物。在每个图中,X轴显示mAb浓度(ng/ml),Y轴显示相对光单位(RLU),对照^kIgG1指定为“C^kIgG1”。

[0052] 图8.对于优化的先导克隆的结合特异性分析。通过GITR-Fc直系同源物和一组13种人TNFRSF和免疫球蛋白超家族蛋白(如在每个X轴上标记的)的直接ELISA,检查mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)和先导工程化IgG克隆G-G10(C)、I-C2(D)和D-A6(E)的脱靶同源物结合风险。以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG浓度进行与人、食蟹猴和鼠GITR-Fc(h/c/mGITR-Fc)的结合。以 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG浓度进行与所有其它蛋白质的结合。在每个图中,Y轴显示结合信号(OD 450nm)。对于所有IgG,观察到与单独hGITR-Fc和cGITR-Fc的结合。对于mGITR-Fc或任何同源人蛋白,未观察到高于背景的结合。

[0053] 图9.先导和对照IgG相对于VH1/VL1 IgG与人GITR-Fc结合的HTRF竞争测定。在经滴定的竞争性IgG的存在下检查VH1/VL1 IgG的HTRF结合信号,所述竞争性IgG包括文库来源的先导D-A6、I-C2和G-G10,作为阴性对照的同种型(“I”)IgG1,加上作为阳性对照的未标记的VH1/VL1。X轴显示IgG1浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$),Y轴显示HTRF 665/615比例。所有文库来源的IgG均显示出VH1-VL1结合的浓度依赖性降低,表明保持了共有的表位。

[0054] 图10.先导和对照IgG与人和食蟹猴GITR+稳定转染的鼠细胞结合的流式细胞术测试。检测先导文库来源的IgG和对照IgG(“I IgG1”代表同种型IgG1)对(A)人和(B)食蟹猴转染的鼠细胞的特异性结合。观察到对于两种细胞系的浓度依赖性结合。如在人GITR转染的人Jurkat细胞的GITR激动测定中一样,对于所有人类化和移植的克隆,在约 $1000\text{ng}/\text{ml}$ 下观察到该实验中的最大结合信号。对于用不相关的人受体(C)转染的鼠细胞,未观察到高于背景的结合信号。在每个图中,X轴显示IgG1的浓度(ng/ml),Y轴显示平均荧光强度(MFI)。

[0055] 图11.在GITR Jurkat细胞报道分子测定中双重纯化的单体形式的D-A6和VH1/VL1 IgG1抗体的相对效力。将ProA-SEC纯化的人IgG1形式的D-A6和VH1/VL1抗体应用于Promega GITR+Jurkat细胞报道分子测定中。该测定显示克隆D-A6在诱导GITR信号传导方面明显比VH1/VL1更有效。X轴显示mAb浓度(nM),Y轴显示RLU。

[0056] 图12.表达GITR的细胞的流式细胞术中膜结合的特异性。A) 在该测定中,在存在或不存在过量可溶性、纯化的重组人GITR配体(GITRL)蛋白的情况下,通过流式细胞术染色证明抗体与CHO-K1人GITR+细胞结合的特异性。对于VH1/VL1和D-A6抗体两者,在10 μ g/ml可溶性GITRL蛋白存在下,GITR+细胞对于1.1 μ g/ml抗体的结合信号降低>10倍。阴性对照抗GFP抗体没有显示可测量的与CHO-K1 GITR细胞的结合。“N”表示幼稚细胞(*naïve cell*) ;“A”表示活化细胞。B) 当细胞通过CD3/CD28刺激活化时,D-A6 IgG1和VH1/VL1 IgG1也显示出对人HuT78 T细胞系的明显反应性,但是当未活化(*naive*)时,则没有。通过用抗人GITR单克隆试剂抗体108-17强阳性染色证实了活化细胞的GITR上调。“Ab”表示1.11 μ g/ml抗体;“Ab+GITRL”表示1.11 μ g/ml抗体+10 μ g/ml GITRL。X轴显示抗体,y轴显示活细胞的MFI。在每个图中,Y轴显示活细胞的MFI。

[0057] 图13.在使用CHO-K1人细胞(图A)和食蟹猴GITR+细胞(图B)的Jurkat细胞报道分子测定中,D-A6 VH1/VL1 IgG1、D-A6 IgG1-N297A和VH1/VL1 IgG1-N297A(非糖基化(aglycosylated))抗体在诱导Fc γ RIIIa信号传导中的相对效力。在每个图中,x轴显示抗体浓度(ng/ml),并且y轴显示RLU。该测定显示IgG1形式的D-A6和VH1/VL1抗体能够诱导Fc γ RIIIa信号传导(代表NK细胞中ADCC活性的诱导),而D-A6 IgG1-N297A和VH1/VL1 IgG1-N297A抗体不诱导信号传导。重要的是,D-A6 IgG1在诱导信号传导方面比VH1/VL1 IgG1显著更有效。

[0058] 图14.发展风险ELISA。该测定显示IgG1和IgG1-N297A形式的D-A6抗体对于与带负电荷的生物分子胰岛素(图A)、双链DNA(dsDNA)(图B)和单链DNA(ssDNA)(图C)的结合是阴性的。在每个图中,X轴显示IgG浓度(μ g/ml),并且Y轴显示结合信号(OD450nm)。已显示与这些分子的强脱靶结合是治疗性抗体不良临床表现的高风险指标。

[0059] 图15.对于优化先导的GITR Jurkat细胞报道分子测定。细胞表面人GITR对于IgG1未突变(null)和IgG1-N297A形式的先导克隆D-A6(A)、D-A6.1(B)和IgG1形式的文库来源的先导G-G10(C)和I-C2(D)的交联的二重分析表明,与VH1/VL1 IgG1相比,所有克隆都引起更强的浓度依赖性激动活性。在C和D中,“I IgG1”表示同种型IgG1。在每个图中,x轴显示IgG浓度(ng/ml),并且y轴显示RLU。

[0060] 发明详述

[0061] 根据本发明的第一方面,提供了特异性结合人GITR和任选的食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分,其中所述抗体分子或抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区具有:

[0062] HCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:G-F-S或S的保守替换-L或L的保守替换-S-T或T的保守替换-S或任何氨基酸(例如F)-G或G的保守替换-M或任何氨基酸(例如Y、F、L或W)-G或G的保守替换-V或V的保守替换-G或G的保守替换(SEQ ID NO:1);

[0063] HCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:L或L的保守替换-A或A的保守替换-H或H的保守替换-I或I的保守替换-W-W-D或D的保守替换-D或D的保守替换-D或D的保守替

换-K-Y-Y-N或任何氨基酸(例如,V)-P或任何氨基酸(例如,D)-S-L或L的保守替换-K-S或任何氨基酸(例如,G)(SEQ ID NO:2);和

[0064] HCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:T或任何氨基酸(例如,G、A、N、S或I)-R或任何氨基酸(例如,D、T或V)-R或任何氨基酸(例如,Q、L、M、I或V)-Y-F或F的保守替换-P-F-A-Y(SEQ ID NO:3);

[0065] 并且其中,HCDR1、HCDR2或HCDR3中的至少一个分别与以下氨基酸序列相比在根据上述定义允许的地方具有至少一个氨基酸差异,例如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸差异:GFSLSTSGMGVG(SEQ ID NO:4;6C8鼠HCDR1),LAHIWWDDDKEYNPSLKS(SEQ ID NO:5;6C8鼠HCDR2),LAHIWWDDDKEYQPSLKS(SEQ ID NO:65;6C8突变体HCDR2)和TRRYFPFAY(SEQ ID NO:6;6C8鼠HCDR3)。

[0066] 如W02006/105021中公开的限定来自6C8鼠抗体的HCDR2的序列LAHIWWDDDKEYNPSLKS(SEQ ID NO:5)包括在位置N处具有N的野生型鼠序列。其在W02006/105021中公开其中位置N处具有Q的突变体形式(LAHIWWDDDKEYQPSLKS;SEQ ID NO:65)据称移除了推定的糖基化位点。

[0067] 抗体分子或其抗原结合部分的HCDR1、HCDR2或HCDR3中可各自分别与以下氨基酸序列相比在根据上述定义允许的地方具有至少一个氨基酸差异,例如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸差异:GFSLSTSGMGVG(SEQ ID NO:4;6C8鼠HCDR1),LAHIWWDDDKEYNPSLKS(SEQ ID NO:5;6C8鼠HCDR2),LAHIWWDDDKEYQPSLKS(SEQ ID NO:65;6C8突变体HCDR2)和TRRYFPFAY(SEQ ID NO:6;6C8鼠HCDR3)。

[0068] 根据本发明的抗体分子或其抗原结合部分可还包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

[0069] LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:K或K的保守替换-A或A的保守替换-S-Q-N或N的保守替换-V-G或G的保守替换-T或T的保守替换-N或任何氨基酸(例如,Y)-V或V的保守替换-A(SEQ ID NO:10);

[0070] LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S或任何氨基酸(例如,Y、E、D、F、L或N)-A-S或任何氨基酸(例如,Y)-Y或任何氨基酸(例如,N)-R-Y或任何氨基酸(例如,A或D)-S或S的保守替换(SEQ ID NO:11);和

[0071] LCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:Q-Q或Q的保守替换-Y或任何氨基酸(例如,R或H)-N或N的保守替换-T或任何氨基酸(例如,K或N)-D或任何氨基酸(例如,W、L、S、E、V或N)-P-L-T(SEQ ID NO:12);

[0072] 并且其中,LCDR1、LCDR2或LCDR3中的至少一个分别与以下氨基酸序列相比在根据上述定义允许的地方具有至少一个氨基酸差异,例如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸差异:KASQNVGTNVA(SEQ ID NO:13;6C8鼠LCDR1),SASYRYS(SEQ ID NO:14;6C8鼠LCDR2)和QQYNTDPLT(SEQ ID NO:15;6C8鼠LCDR3)。

[0073] 抗体分子或其抗原结合部分的LCDR1、LCDR2和LCDR3可各自分别与以下氨基酸序列相比在根据上述定义允许的地方具有至少一个氨基酸差异,例如一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸差异:KASQNVGTNVA(SEQ ID NO:13;6C8鼠LCDR1),SASYRYS(SEQ ID NO:14;6C8鼠LCDR2)和QQYNTDPLT(SEQ ID NO:15;6C8鼠LCDR3)。

[0074] 如本文详述的,本发明人首次成功地使用来源于W02006/105021中公开的鼠抗

GITR抗体6C8的CDR序列产生了多种优化的抗GITR抗体分子。已经选择本发明的优选抗体分子以具有对人GITR和食蟹猴GITR两者的结合特异性(为了促进在动物测试物种中的研究)。进一步提炼如本文所述的优化的抗体分子提供了对GITR的食蟹猴直系同源物的改善的结合,在人GITR信号传导的激动中改善的效力,改善的Fc γ RIIIa受体结合以驱动体内ADCC应答,良好的可变结构域稳定性,高表达产量和/或降低的免疫原性。

[0075] 本发明优选的优化的抗GITR抗体分子不一定在相应的鼠CDR或其它(例如框架)氨基酸位置具有最大数目的人种系替换。如在下文实验部分详述的,我们发现就抗GITR结合特征和/或其它期望特征而言,“最大人源化的”抗体分子未必是“最大优化的”。

[0076] 本发明包括对如本文所限定的抗体分子或其抗原结合部分的氨基酸序列的修饰。例如,本发明包括包含不会显著影响其性质的功能等同的可变区和CDR的抗体分子及其相应的抗原结合部分,并且具有增强或降低的活性和/或亲和力的变体。例如,可以使氨基酸序列突变以获得对GITR具有期望结合亲和力的抗体。设想了插入(包括氨基末端和/或羧基末端的长度从一个残基到包含数百个或更多个残基的多肽的融合),和单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酸残基的抗体分子或与表位标签融合的抗体分子。抗体分子的其它插入变体包括酶或多肽与抗体的N-或C-末端的融合,以提高抗体在血液循环中的半衰期。

[0077] 本发明的抗体分子或抗原结合部分可包含糖基化和非糖基化多肽,以及具有其它翻译后修饰的多肽,例如,利用不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。可以使本发明的抗体分子或抗原结合部分突变以改变这种翻译后修饰,例如通过添加、去除或替换一个或多个氨基酸残基以形成或移除糖基化位点。

[0078] 可以例如通过氨基酸替换对本发明的抗体分子或抗原结合部分进行修饰以移除抗体中潜在的蛋白水解位点。

[0079] 在抗体分子或其抗原结合部分中,HCDR1可具有氨基酸序列G-F-S/T-L/F-S-T/A-S/F-G/S-M/Y/F/L/W-G/A-V/M-G/S (SEQ ID NO:19) ;

[0080] HCDR2可具有氨基酸序列L/V-A/S-H/N-I/V-W-W-D/E-D/S-D/E-K-Y-Y-N/V-P/D-S-L/V-K-S/G (SEQ ID NO:20) ;并且

[0081] HCDR3可具有氨基酸序列T/G/A/N/S/I-R/D/T/V-R/Q/L/M/I/V-Y-F/Y-P-F-A-Y (SEQ ID NO:21) 。

[0082] 例如,HCDR1可具有氨基酸序列G-F-S/T-L/F-S-T/A-S/F-G/S-M/Y/F/L/W-G/A-V/M-G/S (SEQ ID NO:19) ;

[0083] HCDR2可具有氨基酸序列L/V-A/S-H/N-I/V-W-W-D/E-D/S-D/E-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:30) ;并且

[0084] HCDR3可具有氨基酸序列T/G/A/N/S/I-R/D/T/V-R/Q/L/M/I/V-Y-F/Y-P-F-A-Y (SEQ ID NO:21) 。

[0085] 在抗体分子或其抗原结合部分中,LCDR1可具有氨基酸序列K/R-A/T-S-Q-N/D/S-V-G/S-T/S/N-N/Y-V/L-A (SEQ ID NO:22) ;

[0086] LCDR2可具有氨基酸序列S/Y/E/D/F/L/N-A-S/Y-Y/N-R-Y/A/D-S/T (SEQ ID NO:23) ;并且

[0087] LCDR3可具有氨基酸序列Q-Q/H-Y/R/H-N/S/R-T/K/N-D/W/L/S/E/V/N-P-L-T (SEQ

ID NO:24)。

[0088] 例如,LCDR1可具有氨基酸序列R-A/T-S-Q-N/D/S-V-G/S-T/S/N-N/Y-V/L-A (SEQ ID NO:174)；

[0089] LCDR2可具有氨基酸序列S/Y/E/D/F/L/N-A-S/Y-Y/N-R-Y/A/D-S/T (SEQ ID NO:23)；并且

[0090] LCDR3可具有氨基酸序列Q-Q/H-Y/R/H-N/S/R-T/K/N-D/W/L/S/E/V/N-P-L-T (SEQ ID NO:24)。

[0091] 在本发明的在另一个方面,提供了特异性结合人糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)和食蟹猴GITR的抗体分子其或其抗原结合部分,其中所述抗体分子或抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区具有

[0092] HCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:F-S-L-S-T-S/F-G-Y-G (SEQ ID NO:7)；

[0093] HCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:I-W-W-D-D-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:8)；和

[0094] HCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:T-R-Q/L/V-Y-F-P-F-A (SEQ ID NO:9)。

[0095] 如表1所示,上述CDR序列使用较短的“AHo”定义而不是“统一(Unified)”定义来定义。AHo定义基于结构生物学,并且旨在统一所有免疫球蛋白v结构域的命名法。

[0096] 使用Aho CDR定义如上限定的抗体分子或抗原结合部分可以可替代地使用统一定义来定义,使得:

[0097] HCDR1包含在序列中按以下顺序的氨基酸:G-F-S-L-S-T-S/F-G-Y-G-V-G (SEQ ID NO:25)；

[0098] HCDR2包含在序列中按以下顺序的氨基酸:L-A-H-I-W-W-D-D-K-Y-Y-V-D-S-V-K-G (SEQ ID NO:26)；和

[0099] HCDR3包含在序列中按以下顺序的氨基酸:T-R-Q/L/V-Y-F-P-F-A-Y (SEQ ID NO:27)。

[0100] 在本发明的这个方面,抗体分子或其抗原结合可以包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

[0101] LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:A-S-Q-N/S-V-G-T/S-N (SEQ ID NO:16)；

[0102] LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S/Y-A-S-Y/N-R-Y-S/T (SEQ ID NO:17)；和

[0103] LCDR3,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:Y-S-T/N-D-P-L (SEQ ID NO:18)。

[0104] 同样,使用AHo定义来定义上述CDR序列。或者,使用统一定义,抗体分子或其抗原结合可包含轻链可变区,所述轻链可变区具有:

[0105] LCDR1,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:R-A-S-Q-N/S-V-G-T/S-N-L-A (SEQ ID NO:28)；

[0106] LCDR2,具有在序列中按以下顺序的氨基酸:S/Y-A-S-Y/N-R-Y-S/T (SEQ ID NO:17)；和

[0107] LCDR3, 具有在序列中按以下顺序的氨基酸: Q-Q-Y-S-T/N-D-P-L-T (SEQ ID NO: 173)。

[0108] 本发明该方面的具体实施方案包括这样的抗体分子或其抗原结合部分, 包含:

[0109] (a) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO: 29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO: 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO: 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO: 32) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO: 33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO: 34) (LCDR3) [克隆D_A6]; 或

[0110] (b) 氨基酸序列GFSLSTFGYGVG (SEQ ID NO: 35) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO: 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO: 31) (HCDR3)、RASQSVGTNLA (SEQ ID NO: 36) (LCDR1)、YASYRYT (SEQ ID NO: 37) (LCDR2) 和QQYSNDPLT (SEQ ID NO: 38) (LCDR3) [克隆G_G10]; 或

[0111] (c) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO: 29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO: 26) (HCDR2)、TRLYFPFAY (SEQ ID NO: 39) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (SEQ ID NO: 40) (LCDR1)、SASNRYS (SEQ ID NO: 41) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO: 34) (LCDR3) [克隆I_C2]; 或

[0112] (d) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO: 29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO: 26) (HCDR2)、TRVYFPFAY (SEQ ID NO: 42) (HCDR3)、RASQNVGTNLA (SEQ ID NO: 43) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO: 33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO: 34) (LCDR3) [克隆H_B3]; 或

[0113] (e) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO: 29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO: 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO: 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO: 32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO: 44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO: 34) (LCDR3) [克隆A6.1]。

[0114] 包含如上限定的克隆D_A6的CDR序列的抗体分子或其抗原结合部分是本发明的特定具体实施方案。

[0115] 与在W02006/105021中标记为“HuN6C8-Ag1y”的人源化鼠抗GITR IgG抗体相比, 根据本发明的抗体分子或抗原结合部分可具有改善的GITR活化。

[0116] 已知抗体HuN6C8-Ag1y被理解为与目前正由Leap Therapeutics, Inc开发的抗体“TRX-518”(或“TRX518”)同义。HuN6C8-Ag1y/TRX-518抗体包含如W02006/105021中所限定的“SEQ ID NO: 53”(并且对应于下表2中的“GITR-VH1”序列)和如W02006/105021中所限定的“SEQ ID NO: 44”(并且对应于下表2中的GITR-VL1序列)。HuN6C8-Ag1y/TRX-518轻链的完整序列由W02006/105021的“SEQ ID NO: 58”限定, 并且HuN6C8-Ag1y/TRX-518重链的完整序列由W02006/105021的“SEQ ID NO: 61”限定。

[0117] 如本文所用, 改善的GITR活化可定义为在Promega GITR生物测定试剂盒(CS184006)中显示最大信号(RLU值或倍数活化), 例如如下文实施例1中所述, 最大信号是对于抗体TRX-518观察到的至少1.5倍。

[0118] 与抗体TRX-518相比, 根据本发明的抗体分子或抗原结合部分可具有改善的计算机模拟免疫原性(*in silico immunogenicity*)。

[0119] 计算机模拟免疫原性可以使用Lonza Epibase IS系统(第3版)确定, 例如如下文

实施例1中所述。

[0120] 根据本发明的抗体分子或抗原结合部分的计算机模拟免疫原性总DRB1评分可小于1600,例如小于1500,小于1100,或特别是小于900,如通过Lonza Epibase IS系统(第3版)确定的。

[0121] 与抗体TRX-518相比,根据本发明的抗体分子或抗原结合部分对食蟹猴GITR具有改善的亲和力。可以使用如下面实施例1中所述的SPR分析来确定亲和力。

[0122] 在本发明的其它具体实施方案中,抗体分子或其抗原结合部分可包含:

[0123] (a) 氨基酸序列GFSLSTSGMGMS (SEQ ID NO:61) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (SEQ ID NO:40) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSNDPLT (SEQ ID NO:38) (LCDR3) [克隆C_B10];或

[0124] (b) 氨基酸序列GFSLSTSGYGV (SEQ ID NO:47) (HCDR1)、LAHVWWDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:48) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQSVGTNVA (SEQ ID NO:49) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYNNWPLT (SEQ ID NO:50) (LCDR3) [克隆C_D5];或

[0125] (c) 氨基酸序列GFSFSTSGYGV (SEQ ID NO:51) (HCDR1)、LAHIWWDDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:52) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQNVGTNLA (SEQ ID NO:43) (LCDR1)、SASYRAS (SEQ ID NO:53) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆C_F2];或

[0126] (d) 氨基酸序列GFSLSTSGMGVS (SEQ ID NO:54) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆F_B11];或

[0127] (e) 氨基酸序列GFSFSTSGMGVS (SEQ ID NO:56) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQSVGSNVA (SEQ ID NO:57) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆F_B9];或

[0128] (f) 氨基酸序列GFSLSTSGMGMG (SEQ ID NO:58) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、SRRYFPFAY (SEQ ID NO:59) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (SEQ ID NO:40) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆H_A3];或

[0129] (g) 氨基酸序列GFSLSTSSYGV (SEQ ID NO:60) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRLYFPFAY (SEQ ID NO:39) (HCDR3)、RASQSVGTNLA (SEQ ID NO:36) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSNDPLT (SEQ ID NO:38) (LCDR3) [克隆J_C5];或

[0130] (h) 氨基酸序列GFSLSTSGMGMS (SEQ ID NO:61) (HCDR1)、LAHIWWDDDEKYYVDSVK (SEQ ID NO:52) (HCDR2)、NRRYFPFAY (SEQ ID NO:45) (HCDR3)、RASQSVGTNVA (SEQ ID NO:49) (LCDR1)、SASYRAS (SEQ ID NO:53) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆K_A12];或

[0131] (i) 氨基酸序列GFSLSTSGYGM (SEQ ID NO:62) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH]；或

[0132] (j) 氨基酸序列GFSLSTSGMGMS (SEQ ID NO:61) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH-1]；或

[0133] (k) 氨基酸序列GFSLSTSGYGV (SEQ ID NO:47) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH-2]；或

[0134] (l) 氨基酸序列GFSLSTSGYGM (SEQ ID NO:62) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (SEQ ID NO:40) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH-3]；或

[0135] (m) 氨基酸序列GFSLSTSGYGM (SEQ ID NO:62) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNVA (SEQ ID NO:57) (LCDR1)、SASYRAT (SEQ ID NO:46) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH-4]；或

[0136] (n) 氨基酸序列GFSLSTSGYGM (SEQ ID NO:62) (HCDR1)、VAHIWWDDKEKYYVDSVK (SEQ ID NO:55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASYRYT (SEQ ID NO:33) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆MH-5]；或

[0137] (o) 氨基酸序列GFSLSTSGYGVG (SEQ ID NO:29) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTNPLT (SEQ ID NO:63) (LCDR3) [克隆A6.2]；或

[0138] (p) 氨基酸序列GFSLSTSGYGV (SEQ ID NO:47) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆A6.3]；或

[0139] (q) 氨基酸序列GFSLSTSGYGM (SEQ ID NO:62) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆A6.4]；或

[0140] (r) 氨基酸序列GFSLSTSGYGMG (SEQ ID NO:64) (HCDR1)、LAHIWWDDDKEYVDSVK (SEQ ID NO:26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (SEQ ID NO:31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:32) (LCDR1)、SASNRYT (SEQ ID NO:44) (LCDR2) 和QQYSTDPLT (SEQ ID NO:34) (LCDR3) [克隆

A6.5]。

[0141] 在本发明的其它具体实施方案中,抗体分子或其抗原结合部分可包含对于下表3和4中鉴定的其它各个克隆所述的HCDR1-3和LCDR1-3序列。

[0142] 如果特定克隆在其名称中包含下划线,则对于同一克隆下划线可以用连字符代替。例如,名称“D_A6”和“D-A6”指的是相同的克隆,并且这些名称在本文中可互换使用。

[0143] 如本文所限定的抗体分子或抗原结合部分可包含一个或多个替换、缺失和/或插入,所述一个或多个替换、缺失和/或插入移除翻译后修饰(PTM)位点,例如糖基化位点(N-连接或O-连接)、脱氨基位点、磷酸化位点或异构化/片段化位点。

[0144] 已知超过350种类型的PTM。PTM的关键形式包括磷酸化、糖基化(N-和O-连接的)、类泛素化(sumoylation)、棕榈酰化、乙酰化、硫酸化、豆蔻酰化、异戊烯化和甲基化(K和R残基)。鉴定负责特定PTM的推定氨基酸位点的统计学方法是本领域熟知的(参见Zhou等人,2016,Nature Protocols 1:1318-1321)。考虑了通过例如替换、缺失和/或插入移除这样的位点,然后任选地(实验和/或理论上)测试(a)结合活性和/或(b)PTM的损失。

[0145] 例如,已经鉴定出6C8鼠LCDR1(如本文所限定,即氨基酸序列KASQNVGTNVA(SEQ ID NO:13))在残基8(T)处具有推定的O-连接糖基化位点。设想了例如通过保守替换(例如替换为S、A或N)移除该位点(例如在表3和4中的克隆D_A6和其它克隆中)。

[0146] 类似地,已经鉴定出6C8鼠LCDR3(如本文所限定,即氨基酸序列QQYNTDPLT(SEQ ID NO:15))在残基4(N)处具有推定的脱酰胺位点。设想了例如通过保守替换(例如替换为S、H、D、T、K、G、E、Q或R)移除该位点(例如在表3和4中的克隆D_A6和其它克隆中)。

[0147] 同样作为实例,已经鉴定出6C8鼠HCDR1(如本文所限定,即氨基酸序列GFSLSTSGMVG(SEQ ID NO:4))在残基9(M)处具有推定的氧化位点。设想例如通过替换为任何氨基酸(例如替换为Y、F、L或W)移除该位点(例如在表3和4中的克隆D_A6和其它克隆中)。

[0148] 抗体分子或其抗原结合部分可以是人的、人源化的或嵌合的。

[0149] 抗体分子或其抗原结合部分可包含其中已插入了CDR的一个或多人可变结构域框架支架。

[0150] 抗体分子或其抗原结合部分可包含其中已插入了相应的HCDR序列的IGHV3-7人种系支架。

[0151] 抗体分子或其抗原结合部分可包含其中已插入了相应的LCDR序列的IGKV3-11人种系支架。

[0152] 抗体分子或其抗原结合部分可包含免疫惰性恒定区。

[0153] 抗体分子或其抗原结合部分可以是Fab片段、F(ab)₂片段、Fv片段、四聚体抗体、四价抗体、多特异性抗体(例如,二价抗体)、结构域特异性抗体、单结构域抗体、单克隆抗体或融合蛋白。抗体分子及其构建和使用方法描述于例如Holliger&Hudson(2005,Nature Biotechnol.23(9):1126-1136)中。

[0154] 在本发明的另一个方面,提供了免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与治疗剂连接的如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分。

[0155] 合适的治疗剂的实例包括细胞毒素、放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促凋亡剂和细胞抑制剂和溶细胞酶(例如RNA酶)。其它治疗剂包括治疗性核酸,例如编码免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促凋亡剂的基因。这些药物

叙述不是相互排斥的,因此可以使用一个或多个上述术语描述治疗剂。

[0156] 用于与免疫缀合物使用的合适治疗剂的实例包括紫杉烷、美登素、CC-1065和倍瘤霉素(duocarmycin)、卡奇霉素(calicheamicin)和其它烯二炔类(enediyne),和奥利斯他汀(auristatin)。其它实例包括抗叶酸、长春花生物碱和蒽环类。植物毒素、其它生物活性蛋白质、酶(即ADEPT)、放射性同位素、光敏剂也可与免疫缀合物使用。另外,可以使用第二载体作为细胞毒性剂(例如脂质体或聚合物)制备缀合物。合适的细胞毒素包括抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏的试剂。代表性的细胞毒素包括抗生素,微管蛋白聚合的抑制剂,结合并破坏DNA的烷化剂,和破坏蛋白质合成或必需细胞蛋白质(例如蛋白激酶、磷酸酶、拓扑异构酶、酶和细胞周期蛋白)的功能的试剂。

[0157] 代表性的细胞毒素包括但不限于多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、伊达比星(idarubicin)、阿柔比星(aclarubicin)、佐柔比星(zorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、表柔比星(epirubicin)、卡柔比星(carubicin)、诺加霉素(nogalamycin)、美诺立尔(menogaril)、吡柔比星(pitarubicin)、戊柔比星(valrubicin)、阿糖胞昔(cytarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、三氟尿昔(trifluridine)、安西他滨(ancitabine)、依诺他滨(enocitabine)、阿扎胞昔(azacitidine)、去氧氟尿昔(doxifluhdine)、喷司他丁(pentostatin)、溴尿昔(broxuhdine)、卡培他滨(capecitabine)、克拉屈滨(cladhbine)、地西他滨(decitabine)、氟尿昔(floxuhdine)、氟达拉滨(fludarabine)、谷氏菌素(gougerotin)、嘌呤霉素(puromycin)、替加氟(tegafur)、噻唑呋林(tiazofuhn)、阿霉素(adhamycin)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(dacarbazine)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、米托蒽醌(mitoxantrone)、博来霉素(bleomycin)、氮芥(mechlorethamine)、泼尼松(prednisone)、丙卡巴肼(procarbazine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、氟尿嘧啶(flurouracil)、依托泊昔(etoposide)、紫杉醇(taxol)、紫杉醇类似物、铂(例如顺铂和卡铂)、丝裂霉素(mitomycin)、塞替派(thiotepa)、紫杉烷(taxane)、长春新碱、柔红霉素、表柔比星、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、他莫昔芬(tamoxifen)、伊达比星、海兔毒素/奥利斯他汀(dolastatin/auristatin)、哈米特林(hemiasterlin)、埃斯培拉霉素(esperamicin)和美登素类化合物(maytansinoids)。

[0158] 合适的免疫调节剂包括阻断对肿瘤的激素作用的抗激素,和抑制细胞因子产生、下调自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的免疫抑制剂。

[0159] 还提供了编码如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分的核酸分子。

[0160] 还提供了包含如本文所限定的本发明的核酸分子的载体。

[0161] 还提供了包含如本文所限定的本发明的核酸分子或载体的宿主细胞。

[0162] 在另一个方面,提供了产生抗GITR抗体和/或其抗原结合部分的方法,包括在导致抗体和/或其抗原结合部分表达和/或产生的条件下培养本发明的宿主细胞,和从宿主细胞或培养物中分离抗体和/或其抗原结合部分。

[0163] 在本发明的另一个方面,提供了药物组合物,该药物组合物包含如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所

限定的本发明的载体。

[0164] 还提供了用于增强受试者中的免疫应答的方法,该方法包括施用有效量的如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的免疫缀合物,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所限定的本发明的载体,或如本文所限定的本发明的药物组合物。

[0165] 在另一个方面,提供了用于治疗或预防受试者中的癌症的方法,该方法包括施用有效量的如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分,或如本文所限定的本发明的免疫缀合物,或如本文所限定的本发明的核酸分子,或如本文所限定的本发明的载体,或如本文所限定的本发明的药物组合物。

[0166] 癌症可以例如选自由以下所组成的组:胰腺癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、尿膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤和血液组织癌。

[0167] 本发明还提供了如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所限定的本发明的免疫缀合物或如本文所限定的本发明的核酸分子或如所限定的本发明的载体或如本文限定的本发明的药物组合物,其用于在治疗癌症中使用。

[0168] 在另一个方面,本发明提供了如本文所限定使用的抗体分子、或其抗原结合部分、或免疫缀合物、或核酸分子、或载体,或者本发明的治疗方法,用于与第二治疗剂(例如抗癌剂)组合分开、顺序或同时使用。

[0169] 在另一个方面,提供了如本文所限定的本发明的抗体分子或其抗原结合部分或如本文所限定的本发明的免疫缀合物或如本文所限定的本发明的核酸分子或本文所限定的本发明的载体或如本文所限定的本发明的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0170] 本发明的药物组合物可包含药学上可接受的辅料。药学上可接受的辅料可以是进入药物组合物的化合物或化合物的组合,它们不会引起继发反应并且允许例如促进抗GITR抗体分子的施用,提高抗GITR抗体分子寿命和/或抗GITR抗体分子在体内的效力,或增加抗GITR抗体分子在溶液中的溶解度。这些药学上可接受的溶媒是众所周知的,并且本领域技术人员将根据抗GITR抗体分子的施用方式进行调整。

[0171] 在一些实施方案中,抗GITR抗体分子可以以冻干形式提供,用于在施用前重构。例如,冻干的抗体分子可以在向个体施用之前在无菌水中重构并与盐水混合。

[0172] 抗GITR抗体分子通常以药物组合物的形式施用,除抗体分子外,药物组合物可还包含至少一种组分。因此,除抗GITR抗体分子外,药物组合物可还包含药学上可接受的辅料、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其它材料。这些材料应该是无毒的并且不应干扰抗GITR抗体分子的功效。载体或其它材料的确切性质将取决于施用途径,施用可以通过如下所述的推注、输注、注射或任何其它合适的途径。

[0173] 对于肠胃外(例如皮下或静脉内)施用,例如通过注射,包含抗GITR抗体分子的药物组合物可以是肠胃外可接受的水溶液的形式,其是无热原的并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗溶媒制备合适的溶液,例如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液。可根据需要使用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂

和/或其它添加剂,包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,例如抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵(benzalkonium chloride);苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁基醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例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);低分子量多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如锌-蛋白质配合物);和/或非离子表面活性剂,例如TWEENTM,PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0174] 包含抗GITR抗体分子的药物组合物可以单独施用或与其它治疗组合施用,根据待治疗的病症同时或顺序地进行。

[0175] 如本文所述的抗GITR抗体分子可用于治疗人体或动物体的方法,包括预防或预防性治疗(例如在个体中病症发作之前进行治疗以降低个体中病症发生的风险;延迟病症发作;或在发作后降低病症严重程度)。治疗方法可包括向有此需要的个体施用抗GITR抗体分子。

[0176] 施用通常以“治疗有效量”,该“治疗有效量”足以显示对患者的益处。这样的益处可以是至少一种症状的至少改善。施用的实际量、施用的频率(rate)和时间过程将取决于所治疗病症的性质和严重程度,所治疗的特定哺乳动物,个体患者的临床状况,疾病的原因,组合物的递送部位,施用方法,施用方案和医师已知的其它因素。治疗的处方(例如关于剂量等的决定)由全科医生和其他医生负责,并且可能取决于症状的严重程度和/或所治疗疾病的进展。抗体分子的合适剂量是本领域熟知的(Ledermann J.A.等人,1991,Int.J.Cancer 47:659-664;Bagshawe K.D.等人,1991,Antibody,Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922)。对于可能采用的欲施用的药物类型,具体剂量可以酌情在本文中或在Physician's Desk Reference(2003)中指出。抗体分子的治疗有效量或合适剂量可以通过比较抗体体外活性和在动物模型中的体内活性来确定。用于将小鼠和其它试验动物中的有效剂量外推至人类的方法是已知的。精确剂量将取决于许多因素,包括抗体是用于预防还是用于治疗,待治疗区域的大小和位置,抗体的确切性质(例如完整抗体、片段)和与抗体连接的任何可检测标记或其它分子的性质。

[0177] 典型的抗体剂量对于全身应用为100μg至1g,并且对于局部应用为1μg至1mg。可以施用较高的初始负荷剂量,然后施用一个或多个较低剂量。通常,抗体是完整抗体,例如IgG1或IgG4同种型。这是针对成年患者的单次治疗的剂量,该剂量可以针对儿童和婴儿按比例调整,并且还针对与分子量成比例的其它抗体形式进行调整。治疗可以按每天、每周两次、每周或每月的间隔重复,这由医生决定。个体的治疗方案可取决于抗体组合物的药代动力学和药效学特性、施用途径和所治疗病症的性质。

[0178] 治疗可以是周期性的,并且施用之间的时间段可以是约两周或更长时间,例如,约三周或更长时间,约四周或更长时间,约每月或更长时间一次,约五周或更长时间,或约六周或更长时间。例如,治疗可以是每两到四周或每四到八周。可以在手术之前和/或之后给予治疗,和/或可以在外科手术治疗或侵入性手术的解剖部位直接施用或应用。合适的制剂

和施用途径如上所述。

[0179] 在一些实施方案中,如本文所述的抗GITR抗体分子可以作为皮下注射施用。可以使用自动注射器施用皮下注射,例如用于长期预防/治疗。

[0180] 在一些优选的实施方案中,取决于剂量,抗GITR抗体分子的治疗效果可持续若干半衰期。例如,单剂量的抗GITR抗体分子的治疗效果可在个体中持续1个月或更长时间,2个月或更长时间,3个月或更长时间,4个月或更长时间,5个月或更长时间,或6个月或更长时间

[0181] 本发明还提供了产生特异性结合人GITR和任选的食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分的方法,该方法包括以下步骤:

[0182] (1) 将来自非人源的抗GITR CDR移植到人v-结构域框架中以产生人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分;

[0183] (2) 产生在CDR中包含一个或多个突变的人源化抗GITR抗体分子或其抗原结合部分的克隆的噬菌体文库;

[0184] (3) 筛选噬菌体文库与人GITR和任选的食蟹猴GITR的结合;

[0185] (4) 从筛选步骤(3)中选择对人GITR和任选的食蟹猴GITR具有结合特异性的克隆;和

[0186] (5) 从选自步骤(4)的克隆产生特异性结合人GITR和任选的食蟹猴GITR的抗体分子或其抗原结合部分。

[0187] 适用于上述方法的细化如下面的实施例1中所述。

[0188] 如本文所用,术语“糖皮质激素诱导的TNF受体”和“GITR”是指保留GITR的至少部分生物学活性的糖皮质激素诱导的TNF受体及其变体。如本文所用,GITR包括天然序列GITR的所有哺乳动物物种,包括人、大鼠、小鼠和鸡。术语“GITR”用于包括人GITR的变体、同种型和物种同源物。本发明的抗体可以与来自人以外物种的GITR,特别是与来自食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的GITR交叉反应。在某些实施方案中,抗体可以对人GITR完全特异,并且可以不表现出非人交叉反应性。

[0189] 如本文所用,在本发明抗体的上下文中使用的“拮抗剂”或“抗GITR拮抗剂抗体”(可互换地称为“抗GITR抗体”)是指能够与GITR结合并抑制GITR生物活性和/或由GITR信号传导介导的下游通路的抗体。抗GITR拮抗剂抗体包括可以阻断、拮抗、抑制或降低(包括显著地)GITR生物活性,包括由GITR信号传导介导的下游通路,例如受体结合和/或引发对GITR的细胞应答的抗体。出于本发明的目的,可以明确理解术语“抗GITR拮抗剂抗体”涵盖使GITR本身、或GITR生物活性(包括但不限于其增强Teff活化和降低Treg活性的能力)、或者活性或生物活性的后果在任何有意义的程度上基本上无效、降低或中和的所有术语、标题和功能状态和特征。

[0190] 如果与GITR与其它受体的结合相比,GITR以更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合,则GITR“特异性结合”、“特异性相互作用”、“优先结合”、与GITR“结合”或“相互作用”。

[0191] “抗体分子”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标(例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体分子”不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,还涵盖其任何抗原结合片段

(例如，“抗原结合部分”)或其单链，包含抗体的融合蛋白，和包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型，包括例如但不限于scFv、单结构域抗体(例如，鲨鱼抗体和骆驼科动物抗体)、大型抗体(maxibodies)、微型抗体(minibodies)、胞内抗体(intrabodies)、双价抗体、三价抗体、四价抗体、v-NAR和bis-scFv。

[0192] “抗体分子”涵盖任何类别的抗体，例如IgG、IgA或IgM(或其亚类)，并且抗体不需要是任何特定类别。取决于其重链恒定区的抗体氨基酸序列，可以将免疫球蛋白分配到不同的类别。免疫球蛋白有五大类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中一些可以进一步分为亚类(同种型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0193] 如本文所用，术语抗体分子的“抗原结合部分”是指完整抗体的一个或多个片段，该完整抗体的一个或多个片段保留特异性结合GITR的能力。抗体分子的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。涵盖在抗体分子的术语“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括Fab;Fab';F(ab')2;由VH和CH1结构域组成的Fd片段；由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段；单结构域抗体(dAb)片段和分离的互补决定区(CDR)。

[0194] 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能不同，但人IgG重链Fc区通常定义为从位置Cys226或从Pro230的氨基酸残基延伸至其羧基末端。Fc区中残基的编号是如Kabat中的EU索引的编号。免疫球蛋白的Fc区通常包含两个恒定结构域，CH2和CH3。如本领域所知，Fc区可以以二聚体或单体形式存在。

[0195] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。如本领域已知的，重链和轻链的可变区各自由通过三个互补决定区(CDR)连接的四个框架区(FR)组成，所述三个互补决定区也称为高变区，有助于抗体的抗原结合位点的形成。当选择FR侧接CDR时，例如当人源化或优化抗体时，优选来自含有相同典型类别的CDR序列的抗体的FR。然而，这样的FR可以进行修饰，例如通过突变或缺失，包括通过增加或缩短它们的长度(如果需要)。

[0196] 本申请中使用的“统一”CDR定义组合了在该领域中产生的许多不同的、通常相互矛盾的方案中使用的结构域，这些方案基于免疫球蛋白库集分析以及在分离和在抗体与抗原的共晶体中的抗体的结构分析(参见Swindells等人，2016, abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure-Management, Analysis, and Prediction. J Mol Biol. [PMID:27561707; Epub 22 August 2016]的综述)。本文使用的CDR定义(当称为“统一”定义或“Ours”)包含所有此类先前见解的经验教训，并包括对可能介导靶标结合互补性的完整残基景观采样所需的所有合适的环位置。

[0197] 表1显示了根据“统一”定义的本文定义的6C8鼠抗GITR抗体CDR的氨基酸序列，与用于定义相同CDR的周知的替代系统相比较。可以使用表1中列出的任何CDR定义来定义本发明的抗原结合部分的抗体分子。

[0198] 出于参考目的，C68鼠抗GITR抗体重链和轻链可变区的完整经典Kabat编号(如W02016/105021中所公开)如下。

[0199] 可变重链：

[0200] H1 Q,H2 V,H3 T,H4 L,H5 K,H6 E,H7 S,H8 G,H9 P,H10 G,H11 I,H12 L,H13 K,

H14 P,H15 S,H16 Q,H17 T,H18 L,H19 S,H20 L,H21 T,H22 C,H23 S,H24 F,H25 S,H26 G,H27 F,H28 S,H29 L,H30 S,H31 T,H32 S,H33 G,H34 M,H35 G,H35A V,H35B G,H36W, H37 I,H38 R,H39 Q,H40 P,H41 S,H42 G,H43 K,H44 G,H45 L,H46 E,H47 W,H48 L,H49 A,H50 H,H51 I,H52 W,H53 W,H54 D,H55 D,H56 D,H57 K,H58 Y,H59 Y,H60 N,H61 P,H62 S,H63 L,H64 K,H65 S,H66 Q,H67 L,H68 T,H69 I,H70 S,H71 K,H72 D,H73 T,H74 S,H75 R,H76 N,H77 Q,H78 V,H79 F,H80 L,H81 K,H82 I,H82A T,H82B S,H82CV,H83 D,H84 T, H85 A,H86 D,H87 A,H88 A,H89 T,H90 Y,H91 Y,H92 C,H93 A,H94 R,H95 T,H96 R,H97 R,H98 Y,H99 F,H100 P,H100A F,H101 A,H102 Y,H103 W,H104 G,H105 Q,H106 G,H107 T,H108 L,H109 V,H110 T,H111 V,H112 S,H113 S,H114-..。

[0201] 可变轻链：

[0202] L1 D,L2 I,L3 V,L4 M,L5 T,L6 Q,L7 S,L8 Q,L9 K,L10 F,L11 M,L12 S,L13 T, L14 S,L15 V,L16 G,L17 D,L18 R,L19 V,L20 S,L21 V,L22 T,L23 C,L24 K,L25 A,L26 S,L27 Q,L28 N,L29 V,L30 G,L31 T,L32 N,L33 V,L34 A,L35 W,L36 Y,L37 Q,L38 Q,L39 K,L40 P,L41 G,L42 Q,L43 S,L44 P,L45 K,L46 A,L47 L,L48 I,L49 Y,L50 S,L51 A,L52 S,L53 Y,L54 R,L55 Y,L56 S,L57 G,L58 V,L59 P,L60 D,L61 R,L62 F,L63 T,L64 G,L65 S,L66 G,L67 S,L68 G,L69 T,L70 D,L71 F,L72 T,L73 L,L74 T,L75 I,L76 N,L77 N,L78 V,L79 H,L80 S,L81 E,L82 D,L83 L,L84 A,L85 E,L86 Y,L87 F,L88 C,L89 Q,L90 Q,L91 Y,L92 N,L93 T,L94 D,L95 P,L96 L,L97 T,L98 F,L99 G,L100 A,L101 G,L102 T,L103 K,L104 L,L105 E,L106 I,L107K..。

[0203] 如本文所用,术语“保守替换”是指将氨基酸替换为不会显著有害地改变功能活性的另一氨基酸。“保守替换”的优选实例是将一个氨基酸替换为以下BLOSUM 62替换矩阵中值 ≥ 0 另一氨基酸(参见Henikoff&Henikoff,1992,PNAS 89:10915-10919)：

[0204]

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	0	-2	-1	-1	-1	-1	1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-2	-2	1	3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-2
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-2	-2	0	
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11	2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4.

[0205] 术语“单克隆抗体”(Mab)是指来源于单个拷贝或克隆(包括例如任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体或其抗原结合部分,而不是指产生抗体的方法。优选地,本发明的单克隆抗体存在于同质或基本上同质的群体中。

[0206] “人源化”抗体分子是指非人(例如鼠)抗体分子或其抗原结合部分的形式,其是包含最少的源自非人免疫球蛋白的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如,Fv、Fab、Fab'、F(ab')2或抗体的其它抗原结合子序列)。人源化抗体可以是人免疫球蛋白(受方抗体(recipient antibody)),其中来自受方的CDR的残基被具有所需特异性、亲和力和容量(capacity)的来自非人物种(供方抗体(donor antibody))(例如,小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基替换。

[0207] “人抗体或完全人抗体”是指来源于携带人抗体基因的转基因小鼠或来自人细胞的抗体分子或其抗原结合部分。

[0208] 术语“嵌合抗体”意指抗体分子或其抗原结合部分,其中可变区序列来源于一个物种而恒定区序列来源于另一物种,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体而恒定区序列来源于人抗体的抗体分子。

[0209] “抗体-药物缀合物”和“免疫缀合物”是指抗体分子或其抗原结合部分,包括与

GITR结合并与细胞毒性剂、细胞抑制剂和/或治疗剂缀合的抗体衍生物。

[0210] 本发明的抗体分子或其抗原结合部分可以使用本领域熟知的技术产生,例如重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或这些技术的组合或本领域熟知的其它技术。

[0211] 术语“表位”是指能够在抗体分子的一个或多个抗原结合区域被抗体分子或其抗原结合部分识别并被其结合的分子的部分。表位可以由一级、二级或三级蛋白质结构的限定区域组成,并且包括由抗体或其抗原结合部分的抗原结合区域识别的靶标的二级结构单元或结构结构域的组合。表位同样可以由分子的限定的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且具有特定的三维结构特征和特定的电荷特征。如本文所用,术语“抗原表位”定义为抗体分子可以特异性结合的多肽部分,如通过本领域熟知的任何方法确定的,例如,通过常规免疫测定、抗体竞争性结合测定或通过X射线晶体学或相关的结构测定方法(例如NMR)。

[0212] 术语“结合亲和力”或“KD”是指特异性抗原-抗体相互作用的解离速率。 K_D 是解离速率(也称为“off-rate (k_{off})”)与结合速率(或“on-rate (k_{on})”)的比率。因此, K_D 等于 k_{off}/k_{on} 并表示为摩尔浓度(M)。因此, K_D 越小,结合的亲和力越强。因此,与1nM的 K_D 相比,1μM的 K_D 表示较弱的结合亲和力。抗体的 K_D 值可以使用本领域中充分建立的方法测定。用于确定抗体的 K_D 的一种方法是通过使用表面等离子体共振(SPR),通常使用生物传感器系统,例如Biacore®系统。

[0213] 术语“效力”是生物活性的量度,并且可以指定为IC₅₀,或在如本文所述的GITR活性测定中测量的使活性抑制50%的与抗原GITR缀合的抗体或抗体药物的有效浓度。

[0214] 本文所用的短语“有效量”或“治疗有效量”是指达到期望治疗结果所需的量(在剂量和时间段以及施用方式下)。有效量是至少赋予受试者治疗益处所必需的活性剂的最小量,但小于毒性量。

[0215] 本文关于本发明抗体分子的生物活性所使用的术语“抑制”或“中和”是指抗体基本上拮抗、阻止、预防、抑制、减缓、破坏、消除、停止、减少或逆转例如抗体所抑制的(包括但不限于抗体分子的生物活性或与GITR的结合相互作用)的进展或严重程度的能力。

[0216] “宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物,其可以是或已经是用于导入多核苷酸插入物的载体的受方。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于天然的、偶然的或故意的突变,后代可能未必与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组DNA互补物中)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸体内转染的细胞。

[0217] 如本文所用,“载体”意指能够在宿主细胞中递送,并且优选表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体,与阳离子缩合剂(cationic condensing agent)结合的DNA或RNA表达载体,包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体,和某些真核细胞,例如生产细胞。

[0218] 除非另有说明,否则本文所用的术语“治疗”是指对于应用该术语的疾病或病症或者这样的疾病或病症的一种或多种症状,逆转、缓解、抑制其进展,延迟其进展,延迟其发作或预防。除非另有说明,否则本文所用的术语“治疗”是指如上定义的治疗行为。术语“治疗”还包括受试者的辅助和新辅助治疗。为避免疑义,本文提及的“治疗”包括治愈性、姑息性和预防性治疗的提及。为避免疑义,本文提及“治疗”还包括对治愈性、姑息性和预防性治疗的提及。

[0219] 应当理解,在本文中无论何时用语言“包括”描述任何实施方案时,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”形式描述的其它类似实施例。

[0220] 在以马库什组或其它替代组的形式描述本发明的方面或实施方案的情况下,本发明不仅包括作为整体列出的整个组,而且还包括该组中的每个单独成员以及主要组的所有可能的子组,以及缺少一个或多个小组成员的主要组。本发明还设想明确排除要求保护的发明中的任何组成员中的一个或多个。

[0221] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如果发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。在整个说明书和权利要求书中,词语“包括”或诸如“包含”或“含有”的变体将被理解为暗示包含所述整体或整体的组但不排除任何其它整体或整体的组。除非上下文另有要求,否则未用数量词限定的名词包括单数和复数指示对象。术语“例如”或“如”之后的任何实例并不意味着穷举或限制。

[0222] 除非另有说明,否则本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。

[0223] 现在将参考附图描述本发明的特定非限制性实例。

[0224] 实例1.优化的抗GITR治疗性抗体的产生

[0225] 引言

[0226] 在该实例中,我们成功地产生了一组激动性、优化的抗GITR抗体。这些抗GITR抗体表达良好,生物物理稳定,高度可溶并且与优选的人种系具有最大的同一性。

[0227] 材料和方法

[0228] IgG克隆、瞬时表达、纯化

[0229] 通过限制性连接克隆将编码抗体v-结构域的DNA序列克隆到不同质粒载体中的IgG重链和轻链各自的表达盒中。根据制造商的方案,在用无内毒素的IgG表达质粒制剂转染后,在HEK-293expi细胞中瞬时表达IgG。使用单步骤方案纯化IgG:将条件培养基(纯)加载到在PBS pH7.4中预平衡的1ml ProA琼脂糖柱上。用5倍柱体积的PBS pH 7.4洗涤柱,然后用100mM的甘氨酸pH2.7洗脱蛋白质,并使用30kDa截留透析膜在PBS pH7.4中进行透析。

[0230] IgG滴定结合ELISA

[0231] 为了包被Greiner Bio-One High bind ELISA板,将靶蛋白在碳酸盐缓冲液中稀释至1 μ g/ml,并以每孔100 μ l添加,在40°C、o/n下。将包被的板用PBS pH7.4洗涤3次,用1% BSA的PBS(380 μ l/孔)在室温下封闭1小时,然后用PBS-Tween 20(PBST)洗涤3次。然后添加GITR抗体(100 μ l/孔;在PBST中稀释),然后在室温下孵育1小时。然后将板用PBST洗涤3次并添加山羊抗人κ链-HRP(100 μ l/孔),在室温下1小时。然后将板用PBST洗涤3次并用PBS洗涤两次,然后每孔添加100 μ l TMB。通过添加100 μ l 2M H₂SO₄/孔终止反应,并在板读数器上在450nm处读取OD。如前所述,通过对带负电荷的生物分子表面上进行ELISA而分析IgG结合(参见Mouquet等人,2010,Nature 467:591-595)。

[0232] 基于GITR细胞的分析

[0233] 使用来自Promega的GITR生物测定试剂盒(CS184006)分析抗GITR IgG与GITR交联并激动受体的能力。该测定基于“GloResponse”NFkB-1uc2/GITR Jurkat细胞。根据制造商的说明书进行测定,使用HA标记的人GITRL蛋白加抗HA标签抗体作为阳性对照。使用对无关

受体具有特异性的人IgG1作为同种型阴性对照。

[0234] 使用来自Promega的ADCC生物测定试剂盒(G7015)分析抗GITR IgG在与表达人或食蟹猴GITR的CHO-K1细胞结合后诱导ADCC的能力。该测定基于稳定表达Fc γ RIIIa受体、V158(高亲和力)变体和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的工程改造的Jurkat效应细胞。根据制造商的说明书,使用IgG1和非糖基化IgG1形式的抗GITR抗体进行测定。

[0235] G-VL1-VH3文库的产生和选择

[0236] 通过大规模oligo合成和PCR组装G-VL2-VH3 scFv库。然后通过限制性连接将扩增的scFv库克隆到噬菌粒载体中,转化到大肠杆菌TG-1细胞中,表征并释放噬菌体库,其基本上如先前详细描述的(Finlay等人,2011,Methods Mol Biol 681:383-401)。

[0237] 如下进行噬菌体选择:用GITR-Fc蛋白(人或食蟹猴)包被链霉亲和素磁性微珠,用PBS洗涤珠三次并重悬于PBS pH7.4加5%脱脂乳蛋白(MPBS)中。在选择的第1轮中以200nM靶蛋白包被这些珠,然后在随后的轮中以100、50和10nM包被。

[0238] HTRF结合竞争测定

[0239] 建立竞争HTRF测定以检查移植克隆和文库来源的克隆相对于VH1/VL1 IgG的表位竞争。使用标记试剂盒(CisBio)按照制造商的说明用铽标记纯化的VH1/VL1 IgG。最终反应混合物在1×测定缓冲液[50mM磷酸钠,pH 7.5、400mM氟化钾和0.1%BSA(w/v)]中的20 μ l总反应体积含有生物素化的人GITR-Fc、SA-XL665(CisBio)、铽标记的亲本XT-M4和如上所述制备的目的竞争IgG。将试剂在MiniTrak Liquid Handling Platform(Perkin-Elmer)上依次添加到384孔低容量黑色板(Nunc)中。反应在室温下进行1小时,随后在板读数器上读取板,激发波长为340nm,两个发射读取为615nm(测量来自VH1-VL1-穴状物的输入供体荧光)和665nm(测量来自SAXL665的输出受体荧光)。读数表示为665nm/615nm比率。

[0240] 结合特异性分析

[0241] 通过ELISA测试抗GITR抗体的多反应性。将纯化、重组的靶和非靶抗原在碳酸盐缓冲液中以100ng/孔包被在96孔Nunc maxisorp板中,在4℃下过夜。然后将板用PBS洗涤3次,用1%BSA的PBS封闭,然后用PBS-Tween20洗涤3次。然后施加一抗的稀释系列,将板用PBS-Tween20洗涤3次,然后施加山羊抗人 κ 链-HRP 1:4,000二抗。然后将孔用PBS-Tween20洗涤3次,用PBS洗涤2次,每孔添加100 μ l TMB过氧化物酶底物,通过添加100 μ l 2M H₂SO₄终止反应,并在450nm处读取吸光度。

[0242] 还通过流式细胞术测试抗GITR抗体的结合特异性。通过与抗CD3/抗CD28珠孵育3天来激活HuT78细胞。将幼稚细胞培养在单独培养基中。在孵育结束时,收获细胞并使用磁体从活化的细胞中除去珠。将细胞与活力染料(viability dye)一起孵育,然后在4℃下用抗GITR抗体染色。还包括市售抗人GITR单克隆抗体108-17(用PE直接标记;获自BioLegend Inc.,Cat.#371202)作为阳性对照。通过随后用PE标记的山羊抗人IgG孵育来检测VH1/VL1和D-A6 IgG1蛋白的结合。将细胞用4%PFA固定,然后在4℃下在PBS中储存过夜。第二天,使用运行Diva软件的BD Fortessa流式细胞仪分析细胞。使用FlowJo软件进行分析。通过散点图为单细胞设置门,并使用活力染料对活细胞染色。测定并绘制单个活细胞的PE通道中的中值荧光强度(MFI)。每种染色条件一式两份进行。

[0243] 抗GITR Fab片段的Biacore亲和力分析

[0244] 由于IgG1和GITR-Fc蛋白均为多聚体,因此通过表面等离子体共振(SPR)实现精确

的1:1结合亲和力测量是具有挑战性的。为了使该问题最小化,使用GingisKHAN试剂盒(Genovis)从VH1/VL1和D-A6 IgG1蛋白制备单体Fab片段(“Fab”)。然后将Fab缓冲液交换至HBS-EP缓冲液用于Biacore分析。

[0245] 对于亲和力评估,将抗人IgG Fc抗体在pH 5下胺偶联到Biacore CM5芯片的三个流动池(Fc 1至Fc 3)上。固定在芯片上的抗Fc抗体水平为约550RU。然后将人和食蟹猴GITR-Fc和无关受体-Fc蛋白捕获到抗-Fc抗体上(通过在抗体表面上注射直至几乎/完全饱和),以便捕获80–100RU。然后在37°C下将Fab单体以50μl/min的流速注射到芯片上捕获的Fc蛋白上,持续120秒,然后将Biacore运行缓冲液(HBS-EP)以50μl/min流过芯片,持续240秒。使用10mM甘氨酸pH 2进行2×15秒注射,在循环之间再生芯片。测试的Fab样品的浓度为400、200、100、50、25、12.5和6.25nM。还包括Biacore运行缓冲液对照(0nM)作为对照。

[0246] 结果和讨论

[0247] 将CDR移植到优选的人种系v基因上

[0248] 最初使用CDR移植将激动性鼠抗GITR IgG 6C8的CDR(mVH/mVL;参见WO2006/105021和表2)引入人种系免疫球蛋白v-结构域框架序列支架。为了使我们的工程改造工作偏向具有最佳药物样特性的最终先导治疗性IgG化合物,我们选择将亲本抗体的CDR移植到已知具有高稳定性并且以高频率用于表达的人抗体库的“优选”种系支架上。

[0249] 作为参考分子,我们还将CDR移植到最接近的种系框架(hVH1/VL1)。这些支架和移植的CDR定义在表2中列出。鼠抗GITR抗体的重链和轻链序列也显示在表2中。虽然该CDR移植过程是众所周知的,但是预测给定的一组人v-结构域序列是否将作为非人CDR移植的合适受体框架仍然存在问题。使用不合适的框架可导致靶结合功能损失,蛋白质稳定性问题或甚至最终IgG的表达受损。在该研究中,由于亲本抗体使用在人抗体库中以低频率使用的经典的HCDR1结构(H1-15-1),因此该过程进一步复杂化。该观察结果可能导致技术人员假设抗体应该人源化到“最接近种系”的序列(具有最接近的氨基酸同源性的那些人种系),但是最接近的重链种系(IGHV2-70)在功能性表达的人抗体库中很少使用,使得所得抗体具有不利的药理学和制造质量的风险。

[0250] 使用如表1中概述的CDR定义,在计算机上设计七种v-结构域移植物(4种VH,3种VL)。作为双链DNA盒合成移植的和mVH/mVL v-结构域的v-结构域基因序列,并克隆到设计用于表达全长人IgG1抗体的质粒中。这些质粒用于进行HEK-293细胞的瞬时转染,并且通过蛋白A柱纯化表达的IgG。为了测试移植CDR的v-结构域的所有可能组合的功能,将所有4种人源化重链与3种人源化轻链中的每一种共表达,产生分组为4个家族(VH1-4)的12种IgG。

[0251] 首先通过在直接结合ELISA中用人GITR-Fc滴定来检测纯化的IgG1蛋白中GITR结合功能的保留。对于VH2和VH4家族,这些实验显示与mVH/mVL IgG相比受损的靶结合(EC₅₀≥0.004μg/ml),在VH2家族中所有结合功能基本上被消除(图1B)。该发现表明,如果要保留功能,则不能简单地将亲本抗体的CDR移植到任何随机选择的人v-结构域框架中。重要的是,VH2 IgG家族中>100倍的结合功能损失进一步说明HCDR1不能完全先验人种系化,以匹配用于移植的框架中发现的人种系HCDR1的天然序列(IGHV3-7)。对于VH1和VH3家族中的抗体,观察到与mVH/mVL IgG1等同或改进的结合功能(图1A)。

[0252] 基于ELISA结合数据,在基于细胞的重组受体报道分子测定中测试mVH/mVL、VH1、VH3和VH4家族IgG对GITR的浓度依赖性激动剂活化。该测定证明VH3/VL2组合产生最强的浓

度依赖性受体活化(图2)。因此,该移植物被用作CDR诱变和选择改良克隆的模板。

[0253] 文库产生和筛选

[0254] 将v结构域序列VL2和VH3组合成VL-VH scFv形式,并通过大规模oligo合成和组装产生诱变文库盒。将最终的scFv文库(命名为G-VL2-VH3)连接到噬菌体展示载体中,并通过电穿孔转化到大肠杆菌中以产生 3.0×10^8 个独立的克隆。通过深度测序>100,000个克隆验证了文库构建质量。该测序数据显示,在每个可变位置编码鼠或人种系残基的位置已经以50%的频率有效地取样。使用辅助噬菌体M13释放文库,并用生物素化的人和食蟹猴GITR-Fc蛋白进行选择。

[0255] 选择后筛选(图3A、B、C)和DNA测序揭示132个独特的人和食蟹猴GITR结合scFv克隆的存在,其在CDR内具有显著增加的人含量,而框架序列保持完全种系。在这132个克隆中,发现74个克隆在所有CDR中具有种系化突变(表3)。基于CDR种系化水平对比于与人和食蟹猴GITR-Fc二者结合的ELISA信号,对先导克隆进行排名(图4)。然后将来自该排名的前11个克隆的v结构域亚克隆到IgG表达载体中,用于如下进一步测试(参见表4)。

[0256] 虽然在直接来自文库选择的先导克隆的所有CDR中观察到种系化突变,但仍然可能的是,序列分析可能允许设计具有最大人源化的另外的克隆。因此,使用具有针对人和食蟹猴蛋白的结合信号的132个序列独特命中(hit)来分析该功能特征群体的CDR中鼠氨基酸的保留频率(RF)。定位氨基酸RF表示为在VL和VH结构域中发现的百分比(图5A和B)。在一系列组合设计中,RF<75%的鼠残基被认为是对靶结合互补位不重要的位置,并且可能对种系化开放。

[0257] 仅含有RF>75%的鼠残基的设计称为“MH”(MH=最大人源化)。通过基因合成产生该克隆和将鼠残基添加回CDR中的5个另外的设计克隆(MH-1至MH-5;参见表4)并与上文概述的11个文库来源的克隆一样克隆到人IgG1表达载体中用于生产。从HEK-293细胞的瞬时转染中容易地表达和纯化所有17种IgG。在单个蛋白A柱纯化步骤后,分析型HPLC尺寸排阻色谱显示所有先导具有97.65%至99.75%的单体IgG含量。

[0258] 先导IgG亲和力、稳定性和特异性特征

[0259] 然后在直接滴定ELISA形式中测试上述17种纯化的IgG与人和食蟹猴GITR-Fc的结合。出人意料的是,该分析表明,尽管许多(14/17)克隆保留了与VH1/VL1和VH3/VL2 IgG相当的对人GITR的结合亲和力(包括设计克隆MH,MH1-4),但只有三个克隆(D-A6,I-C2和G-G10)保持了相当的或更好的对食蟹猴GITR-Fc的结合(图6)。在GITR激动报道分子测定中,D-A6,I-C2和G-G10均在与抗体交联的人GITRL相同的浓度范围内表现出人GITR的浓度依赖性受体活化(图7A-C)。在1000-2000ng/ml下观察到所有IgG和GITRL的最大信号。

[0260] 为了确保先导克隆在突变和重选过程中没有遭受靶特异性的损失;测试D-A6,I-C2,G-G10,mVH/mVL和VH3/VL2克隆与一组14种纯化蛋白质的结合,所述蛋白质包括鼠GITR-Fc和人TNFRSF成员以及一般免疫球蛋白超家族成员(图8A-E)。所有五种IgG均在1μg/ml下表现出与GITR-Fc的结合信号(人OD450nm>3.0,食蟹猴>1.0),并且没有对任何其他蛋白质的可检测的结合(OD450nm<0.1)。

[0261] 与VH1/VL1人IgG移植物的表位竞争的HTRF分析

[0262] 为了检查文库来源的克隆与VH1/VL1 IgG的未改变的、最接近种系移植的CDR的竞争,建立了均相时间分辨荧光(Homogeneous Time Resolved Fluorescence,HTRF)测定。该

测定在溶液相结合中引入铽标记的VH1/VL1 IgG、生物素化的hGITR-Fc和链霉亲和素-XL665。然后在宽的浓度范围(0.003–100 μ g/ml)中加添加未标记的IgG VH1/VL1(阳性对照)、同种型对照和先导IgG D-A6、G-G10和I-C2。IgG VH1/VL1、D-A6、G-G10和I-C2均显示结合信号的浓度依赖性减少,表明它们阻断VH1/VL1 IgG与GITR的结合(图9)。重要的是,克隆D-A6在线性相中显示出与未标记的VH1/VL1 IgG完全重叠的抑制曲线,表明尽管与mVH/mVL相比具有12个CDR突变(对人种系),但克隆D-A6中的亲和力和表位特异性完全维持。

[0263] 对D-A6 IgG1与VH1/VL1 IgG1的GITR激动效力的体外分析

[0264] 基于流式细胞术、表位竞争和受体激动数据,将IgG D-A6优先用于进一步的体外分析。在IgG表达和纯化过程中通常产生IgG的活性聚集体,例如二聚体。这些聚集体在受体激动测定中可产生假阳性或夸大的信号。为了确保在D-A6和VH1/VL1 IgG之间进行准确比较,将它们各自纯化两次:首先通过蛋白A柱结合,其次通过尺寸排阻色谱法,以去除大于人IgG1的预期分子(约150kD)的任何蛋白质种类。然后在基于细胞的报道分子测定中测试完全纯化的IgG1蛋白的GITR的浓度依赖性激动剂活化。该测定证明,出乎意料地,D-A6 IgG1表现出比VH1/VL1 IgG显著更强的浓度依赖性受体活化(图11)。在该测定中,使用两种抗体的一式两份式分析,D-A6克隆表现出:1.更高的总效力,D-A6的最大RLU值为21876,而VH1/VL1的最大RLU值为11664;2.与VH1/VL1相比,在从0.1到133nM的测试的D-A6 IgG1的所有浓度的下更高的信号。

[0265] 细胞膜上先导IgG结合特异性的流式细胞术分析

[0266] 使用流式细胞术分析对细胞表面的GITR的浓度依赖性结合。由于没有观察到IgG与小鼠GITR-Fc结合,因此用人或食蟹猴GITR全长cDNA稳定转染专有的鼠胚细胞瘤和CHO-K1细胞。然后在10,000–13.7ng/ml的浓度范围内测试IgG mVH/mVL、VH1/VL1、VH3/VL2、D-A6、G-G10、I-C2和同种型对照IgG1与人、食蟹猴或阴性对照(用不相关的人受体稳定转染)鼠胚细胞瘤细胞的结合(图10)。除同种型对照之外的所有IgG显示出对人和食蟹猴GITR+细胞的浓度依赖性结合,在每种情况下最大MFI为约1111ng/ml。在任何浓度下,没有观察到任何IgG与阴性对照细胞系的可测量的结合。

[0267] 为了检测先导IgG与GITR+人细胞的结合,通过与抗CD3/抗CD28珠孵育3天来激活HuT78细胞。t细胞的活化与GITR表达的上调相关。将幼稚细胞在单独培养基中孵育。然后在10 μ g/ml下测试IgG VH1/VL1、D-A6和抗GITR商业对照抗体‘108-17’与活化和幼稚细胞的结合。所有3种抗体均显示出与活化细胞的强结合,但与幼稚细胞没有明显的结合(图12A)。类似地,用1.1 μ g/ml的IgG1 VH1/VL1、D-A6和阴性对照人IgG1κ抗-GFP商业抗体‘AbD18705_hIgG1’对活化的HuT78细胞进行染色。在每种情况下,在存在或不存在10 μ g/ml人GITR配体蛋白的情况下进行染色。在任一分析中,抗GFP对照均未显示与活化细胞的结合,而IgG VH1/VL1和D-A6在不存在过量GITRL蛋白的情况下均显示结合(图12B)。该测定显示克隆D-A6特异性结合活化的人T细胞上的GITR,并且其结合位点与GITRL(GITR的天然结合配偶体)的结合位点重叠。

[0268] IgG1和IgG1-N297A抗体的浓度依赖性Fc γ RIIIa结合的体外分析

[0269] 单克隆6C8的人源化形式(也称为TRX-518)是非糖基化的人IgG1。通过在人IgG1 Fc CH2区域添加突变N297A来实现经典的n-连接糖基化的移除。该无糖基化的Fc区对于与所有人Fc受体结合而言是无效的,包括由NK细胞驱动的针对抗体结合细胞的ADCC相关的至

关重要的Fc γ RIIIa受体。抗GITR激动剂抗体中ADCC活性的存在可能是非常有益的,因为其可以允许免疫抑制性肿瘤浸润性Treg细胞的消耗,已知免疫抑制性肿瘤浸润性细胞表达高水平的GITR。

[0270] 为了检测VH1/VL1(其中v-结构域的氨基酸序列与TRX-518相同)和D-A6 v-结构域驱动ADCC的能力,两种抗体均以人IgG1和IgG1-N297A形式表达。对这些抗体如上所述进行proA-SEC纯化,然后用于Promega ADCC测定,其中稳定表达人或食蟹猴GITR的CHO-K1靶细胞作为靶细胞群。在人(图13A)和食蟹猴(图13B)CHO-K1细胞上,VH1/VL1和D-A6 IgG1抗体均显示剂量依赖性Fc γ RIIIa活化,而IgG1-N297A抗体在使用的任何浓度下均未诱导信号传导。重要的是,D-A6 IgG1比VH1/VL1 IgG1显著更有效(>2倍)(图13A,13B)。在人GITR细胞上,观察到的D-A6 IgG1的EC50值为15.4nM,而VH1/VL1 IgG1的EC50值为35.6nM。在食蟹猴GITR细胞上,观察到的D-A6 IgG1的EC50值为57.9nM,而VH1/VL1 IgG1的EC50值为160.0nM。

[0271] ‘可开发性’ ELISA测定中的先导IgG D-A6分析

[0272] 本领域已知,用于治疗用途的IgG与几种指示性生物学底物的结合是由于生物利用度差和体内半衰期短而导致患者中差的表现的高风险的指标。三种这样的生物学底物是胰岛素、dsDNA和ssDNA。因此,用这三种底物包被ELISA板,并且检查优化的先导D-A6的IgG1和IgG1-N297A形式的结合。将这些基于人IgG的抗体与已发现具有多反应性和差的表现而在临床试验中停止其进展的“阳性对照”人IgG抗体(Bococizumab和Briakinumab人IgG1类似物)的结合信号进行比较。对于阴性对照人IgG1抗体,使用IgG1优特克单抗(Ustekinumab)类似物,因为其和Briakinumab与相同的治疗靶标反应,但具有更长的pK并且被成功批准作为治疗产品。在图14所示的ELISA分析中,阳性对照抗体显示出对所有3种底物的预期的强反应性,而阴性对照显示低反应性。重要的是,D-A6 IgG1和IgG1-N297A蛋白均显示出对于所有3种底物的≤阴性对照的结合。该发现强调了优化的克隆D-A6中高度特异性靶驱动结合的维持。

[0273] 先导v-结构域的计算机免疫原性分析

[0274] 最近的美国FDA指南推荐了旨在用于治疗开发的所有抗体的t细胞表位风险的计算机模拟免疫原性评估(参见USFDA[2014]Guidance for Industry-Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products)。为了检测抗GITR抗体的人t细胞表位含量,将IgG mVH/mVL、VH3/VL2、D-A6、G-G10和I-C2的v-结构域序列提交给Lonza Epibase ISTM系统(版本3),用于基于全球人口统计数据的DRB1评分(表5)。在该分析中,对于两个v结构域,给出人t细胞免疫原性风险总分。起始鼠克隆mVH/mVL评分为1680.4,其处于目前批准用作治疗剂的嵌合抗体的预测免疫原性范围(1500至>2400)的下限。移植的克隆VH3/VL2(框架中没有回复突变的直接种系移植植物)表现出降低的评分994.0,在目前批准用作治疗剂的人源化抗体的预测免疫原性范围(1000至1600)较低端。先导克隆D-A6和G-G10分别得到932.5和842.8的评分。这些评分处于目前批准用作治疗剂的完全人抗体的预测免疫原性范围内(250至1200)。

[0275] 克隆D-A6(保留全功能)和MH(食蟹猴GITR结合和人GITR激动消除)的序列比较仅显示5个氨基酸差异。为了检查这些突变对免疫原性和功能的影响,还提交了另外五个设计突变体(A6.1至A6.5,参见表4的CDR序列)用于Epibase分析(表5)。该评估显示这些突变体的总DRB1评分可以进一步将D-A6的预测免疫原性降低至克隆A6.4中的低至845.9。然而,当

对A6.1至A6.5的IgG1蛋白质进行ELISA结合分析时,所有克隆保持与人GITR的结合,但只有A6.1保持了与VH1/VL1和D-A6相当的与食蟹猴GITR的结合。对于A6.2至A6.5的所有克隆,食蟹猴GITR结合极大降低。

[0276] 抗GITR Fab片段与hGITR-Fc和cGITR-Fc的SPR亲和力分析

[0277] 由于GITR激动和ADCC分析都表明先导克隆D-A6比VH1/VL1显著改善,我们在Biacore上分析了这两种抗体的亲和力值。产生单体Fab片段并在流动相中流过人和食蟹猴GITR-Fc包被的生物传感器芯片,以得到1:1的结合值。该数据显示在人GITR上VH1/VL1和D-A6 Fab的K_D值几乎相同,但是与ELISA数据一致,D-A6 Fab显示对食蟹猴GITR的亲和力约4倍提高(表6)。所有分析的Chi²值<0.15,表明数据精确地符合1:1Langmuir动力学模型。

[0278] 对另外的先导IgG1与VH1/VL1 IgG1的GITR激动效力的体外分析

[0279] 由于IgG D-A6在IgG1形式的受体激动中表现出改善的效力,因此将一系列其它先导优先用于另外的GITR激动分析。该测定证明了IgG1未突变和IgG1-N297A形式的D-A6克隆(图15A)、IgG1形式的D-A6.1克隆(图15B)和文库来源的先导G-G10(图15C)和I-C2(图15D)也都显示出比VH1/VL1 IgG显著更强的浓度依赖性受体活化。在该测定中,使用所有抗体的一式两份式分析,IgG克隆表现出:1.在其最大RLU值中更高的总效力;2.与VH1/VL1相比,除I-C2外在测试的所有IgG浓度下更高的信号。还包括同种型人IgG1(图15C,15D),其显示没有激动受体的能力。

[0280] 尽管已经参考优选或示例性实施例描述了本发明,但是本领域技术人员将认识到,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以实现对本发明的各种修改和变化,并且这些修改是本文清楚考虑的。对本文公开和所附权利要求中阐述的具体实施方案的限制未旨在也不应是任何推测。

[0281] 本文引用的所有文献均通过引用整体并入。

[0282] 在下表1-4的每一个中,SEQ ID NO显示在每个序列下面的括号中。

[0283] 表1.与替代定义相比,如本文所定义(“统一”方案)的鼠抗GITR CDR的氨基酸序列。

[0284]

<u>方 案</u>	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>HCDR3</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>LCDR3</u>
统 一	GFSLSTS <u>GMGVG</u> (4)	LA <u>HIWWDDD</u> KYYN <u>PSLKS</u> (5)	T <u>RRYFPFAY</u> (6)	KASQN <u>VGTNVA</u> (13)	SAS <u>YRYS</u> (14)	QQYNT <u>DPLT</u> (15)
Kabat	TSG <u>MVG</u> (66)	HIWW <u>DDD</u> KYYN <u>PSLKS</u> (67)	T <u>RRYFPFAY</u> (6)	KASQN <u>VGTNVA</u> (13)	SAS <u>YRYS</u> (14)	QQYNT <u>DPLT</u> (15)
Chotia	GFSLSTSGM (68)	WW <u>DDDK</u> (69)	AR <u>TRRYFPFAY</u> (70)	KASQN <u>VGTNVA</u> (13)	SAS <u>YRYS</u> (14)	QQYNT <u>DPLT</u> (15)
IMGT	GFSLSTSGMG (71)	IWW <u>DDD</u> KYYN <u>PSLKS</u> (72)	AR <u>TRRYFPFAY</u> (70)	Q <u>NVGTN</u> (73)	SAS	QQYNT <u>DPLT</u> (15)
AHo	FSLSTSGMG (74)	IWW <u>DDD</u> KYYN <u>PSLKS</u> (75)	T <u>RRYFPFA</u> (76)	ASQN <u>VGTN</u> (77)	SAS <u>YRYS</u> (14)	YNT <u>DPL</u> (78)
AbM	GFSLSTSGMVG (4)	HIWW <u>DDD</u> KYY (79)	T <u>RRYFPFAY</u> (6)	KASQN <u>VGTNVA</u> (13)	SAS <u>YRYS</u> (14)	QQYNT <u>DPLT</u> (15)
Contact	STSGMVG (80)	LA <u>HIWWDDD</u> KYY (81)	AR <u>TRRYFPFA</u> (82)	GTNVAWY (83)	LLIYSAS <u>YR</u> (84)	QQYNT <u>DPL</u> (85)

[0285] 表2.6C8鼠抗GITR v结构域(GITR-mVH/mVL)和人种系CDR移植物(GITR-VH1-4/VL1-3)的氨基酸序列。

[0286]

<u>V</u> 结构域	人 种系 (1)	氨基酸序列 (3)
GITR-mVR	n/a	QVTILKESCPGILKPSQTLSTCSFS <u>GFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWL</u> AH _{IWWDDDKYYNPSLK} SQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCAR <u>TTRYFPFAY</u> WQQGTLTVSS (SEQ ID NO: 86)
GITR-VH1	IGHV2-70	QVTLRESPGPALVKPQTQLTLCFS <u>GFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWL</u> AH _{IWWDDDKYYNPSLK} SRLTISKDTSKNQVVLTMTRMDPVDTATYYCAR <u>TTRYFPFAY</u> WQQGTLTVSS (SEQ ID NO: 87)
GITR-VH2	IGHV3-7-XE (2)	EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAAS <u>GFTFS-SYWMSWVRQAPGKGLEWL</u> AH _{IWWDDDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR} <u>TTRYFPFAY</u> WQQGTLTVSS (SEQ ID NO: 88)
GITR-VH3	IGHV3-7	EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAAS <u>GFSLSTSGMGVGWVRQAPGKGLEWL</u> AH _{IWWDDDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR} <u>TTRYFPFAY</u> WQQGTLTVSS (SEQ ID NO: 89)
GITR-VH4	IGHV5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLRKISCKGS <u>GFSLSTSGMGVGWVRQMPGKCLEWL</u> AH _{IWWDDDKYYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR} <u>TTRYFPFAY</u> WQQGTLTVSS (SEQ ID NO: 90)
GITR-mVL	n/a	DIVMTQSQKFMSTSVDGRSVTC <u>KASQNVTNVA</u> WYQQKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> GVPDFRTGSGSGTDFTLTINNVHSEDLAEYFC <u>QQYNTDPLT</u> FGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 91)
GITR-VL1	IGKV3-15	EIVMTQSPLTSVSPGERATL <u>SCKASQNVTNVA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASYRYS</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISSIQSEDFAVYYC <u>QQYNTDPLT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 92)
GITR-VL2	IGKV3-11	EIVLTQSPLTSLSPGERATL <u>CRASQNVTNVA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASYRYS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYNTDPLT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 93)
GITR-VL3	IGKV1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT <u>RASQNVTNVA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SASYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYNTDPLT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 94)

[0287] (1) 基于IMGT系统的用于移植的人种系定义。(2) 添加了该CDR中的序列短划线以显示基于序列比对的采样残基的间隔。(3) CDR残基以粗体和下划线表示。如上所述,与经典Kabat定义相比,本手稿中使用的一些CDR定义是扩展的定义。

[0288] 表3.74个独特的抗GITR v结构域的CDR的氨基酸序列和与CDR中人种系的序列同一性% (ID%)。

<u>克隆 名称</u>	<u>HCDR3</u>	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>LCDR3</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>% ID</u>
D_A6	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDKEYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRYT (33)	65 %
G_G10	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTFGYGVG (35)	LAHIWWDDDKEYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	YASYRYT (37)	63 %
I_C2	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDKEYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRYS (41)	63 %
C_A9	TRMYFPFAY (95)	GFTFSTSSYGM (96)	LANIWWDDKEYVDSVKG (97)	QQYNNNDPLT (98)	RASQSVGSYLA (99)	EASYRAS (100)	75 %
D_F8	TRIYFPFAY (101)	GFSLSTSSYGV (60)	VANIWWDDKEYVDSVKG (102)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTYVA (103)	DASNRYT (104)	74 %
H_G1	GRRYFPFAY (112)	GFSFSTSGYGM (105)	LANIWWDDDKEYVDSVKG (106)	QQYSNWPLT (107)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)	72 %
H_B5	ARRYFPFAY (108)	GFSFSTSGYGM (105)	LANIWWDDDKEYVDSVKG (106)	QQYNTWPLT (109)	RASQSVGSYLA (99)	SASYRAT (46)	72 %
D_B1	TRIYFPFAY (101)	GFSLSTSSMGM (110)	LANIWWDDKEYVDSVKG (97)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSYVA (111)	SASNRYT (44)	71 %
K_D10	GRRYFPFAY (112)	GFTFSTSGYGM (113)	VANIWWDDKEYVDSVKG (102)	QQYSTWPLT (114)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRAS (53)	71 %
E_D5	ARRYFPFAY (108)	GFTLSTSGYGV (115)	LANIWWDDKEYVDSVKG (116)	QQYSNWPLT (107)	RASQNVGTYLA (117)	SASN RAT (118)	71 %
H_B2	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGMGM (58)	LANIWWDDKEYVDSVKG (97)	QQYNTWPLT (109)	RASQDVGTYLA (119)	SASN RAT (118)	69 %
H_D11	ARRYFPFAY (108)	GFTLSASGYGM (120)	VANIWWDDDKEYVDSVKG (121)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGSYLA (122)	SASYRAS (53)	69 %
G_G3	TRMYFPFAY (95)	GFSLSTSSYGV (60)	LANIWWDDKEYVDSVKG (97)	QQYNNNDPLT (98)	RASQNVGTYVA (123)	DASNRYS (124)	69 %
J_C5	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSSYGV (60)	VAHIWWDDKEYVDSVKG (55)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRYT (33)	69 %
G_E9	TDRYFPFAY (125)	GFTFSTSGWAWG (126)	LAHIWWDDDKEYVDSVKG (26)	QQRNNDPLT (127)	RASQSVGTYVA (103)	DASN RAT (128)	69 %
E_C6	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGYGM (129)	LAHIWWDDDKEYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRAT (46)	69 %
A_F2	GRRYFPFAY (112)	GFSLSTSGYGM (64)	LANIWWDDSDKEYVDSVKG (116)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGSNLA (40)	SASN RAS (130)	69 %
E_E2	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGM (64)	LANIWWDDDKEYVDSVKG (106)	QQYSTWPLT (114)	RASQSVGTNLA (36)	SASN RAS (130)	69 %
E_C12	IRRYFPFAY	GFTLSTSGYGM (129)	LAHIWWDDSDKEYVDSVKG	QQYSNDPLT	RASQSVGSNLA	SASN RAS	69

[0289]

[0290]

	(131)	(129)	(132)	(38)	(32)	(130)	%
F_B11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)	68 %
C_B10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)	68 %
G_A6	TRMYFPFAY (95)	GFSLSTFSYGVG (133)	LAHIWWDDSDKYYVDSVKG (132)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTYLA (117)	DASYRYT (134)	68 %
C_B12	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGVS (135)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)	68 %
E_A1	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGMGMS (136)	LAHIWWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAS (53)	68 %
F_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QHYSTDPLT (137)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRSAS (130)	68 %
H_G4	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGMS (138)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAT (46)	68 %
E_E4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LSHIWWDDDEKYYVDSVKG (140)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRSAS (130)	68 %
F_B9	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGMGVS (56)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)	68 %
H_G5	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGMG (62)	LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAT (46)	68 %
H_C8	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGMG (62)	VAHIWWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRSAS (130)	68 %
C_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGYGVG (51)	LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)	66 %
D_E3	TTRYFPFAY (142)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (52)	QQYNNNDPLT (98)	RASQNVGSYLA (122)	SASYRAS (53)	66 %
E_C4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAT (46)	66 %
E_B10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVG (47)	LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRAS (53)	66 %
D_G11	HRIYFPFAY (143)	GFSLSTSSMGMC (144)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTYVA (103)	DASNRYS (124)	66 %
E_G11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (52)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASN RAT (118)	66 %
H_C5	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	NASNRSAS (146)	66 %
K_D6	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRAS (53)	66 %
E_F10	GRRYFPFAY (112)	GFSLSTSGYGVG (29)	VANIWWDDDKYYVDSVKG (121)	QQYNTWPLT (109)	RASQNVGSYLA (122)	SAYYRAT (147)	66 %
E_G3	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGVG (29)	LANIWWDDDKYYVDSVKG (106)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGTYLA (117)	SASYRAS (53)	66 %
C_D5	NRRYFPFAY	GFSLSTSGYGVG	LAHVWWDDDEKYYVDSVKG	QQYNNWPLT	RASQSVGTNVA	SASYRAT	65

[0291]

	(45)	(47)	(48)	(50)	(49)	(46)	%
F_H9	TTRYFPFAY (142)	GFSLSTSGMGMG (58)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSTPLT (148)	RASQNVGSNLIA (40)	SASYRAT (46)	65 %
E_D9	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGMGS (62)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)	65 %
D_A9	SRLYFPFAY (149)	GFTLSTSGMVGVS (150)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (55)	QQHNNDPLT (151)	RASQNVGTYVA (123)	FASN RAT (152)	65 %
C_C11	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMVGVS (135)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	DASN RYS (124)	65 %
E_F4	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGYGVGS (153)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLIA (40)	SASYRAS (53)	65 %
F_F1	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMVGVS (135)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYNNDPLT (98)	RASQNVGSNLIA (40)	SASN RYS (41)	65 %
C_C10	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGMVGVS (54)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAT (46)	65 %
J_G8	TROYFPFAY (31)	GFSLSTSGMVGVS (54)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRYT (33)	65 %
E_G12	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYNNDPLT (98)	RASONVGSYLA (122)	SASYRYT (33)	65 %
I_B7	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVGS (47)	VAHVWWDDDKEYVDSVKKG (154)	QQYSNWPLT (107)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRDT (155)	65 %
H_A7	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGMGS (62)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	65 %
K_A12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMGS (61)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	65 %
H_E11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGFGMGS (156)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	65 %
D_A4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMGS (61)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63 %
D_A11	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGMGMGS (136)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63 %
E_D10	TVRYFPFAY (157)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASN RYS (41)	63 %
E_C8	TRYYFPFAY (158)	GFSLSTSGYGVG (29)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSTSPLT (159)	RASQSVGTYVA (103)	SASYRAS (53)	63 %
C_D10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMGS (61)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRYT (134)	63 %
J_C6	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRYT (33)	63 %
D_B7	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (64)	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63 %
K_E12	SRRYFPFAY (59)	GFTLSTSGMGMGS (136)	VAHIWWDDDKEYVDSVKKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAS (53)	63 %
H_A3	SRRYFPFAY	GFSLSTSGMGMG	LAHIWWDDDKEYVDSVKKG	QQYSTDPLT	RASQNVGSNLIA	SASYRYT	63

[0292]

	(59)	(58)	(26)	(34)	(40)	(33)	%
G_C11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGV (47)	VAHIWWDDDEKYYVDSVK (55)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	63 %
I_E12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGFGVS (160)	LAHIWWDDDEKYYVDSVK (52)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAT (46)	63 %
J_G10	NRLYFPFAY (161)	GFSLSTSSLGMS (162)	VAHIWWDDDKEYVDSVK (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	DASYRYT (134)	63 %
H_B3	TRVYFPFAY (42)	GFSLSTSGYGV (29)	LAHIWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRYT (33)	62 %
E_G7	TRQYFPFAY (31)	GFTLSTSGMGVG (163)	VAHIWWDDDEKYYVDSVK (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVSTNVA (164)	SASYRYT (33)	62 %
E_F6	TRIYFPFAY (101)	GFSLSTSGYGV (29)	LAHIWWDDDEKYYVDSVK (52)	QQYNNVPLT (165)	RASQNVGTNVA (145)	SASNRYS (41)	62 %
K_G9	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWWDEDEKYYVDSVK (166)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGNNA (167)	SASNRRAS (130)	62 %
J_G6	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGV (47)	VAHVWWDDDEKYYVDSVK (154)	QQYSTEPLT (168)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	62 %
F_D2	TRLYFPFAY (39)	GFTLSTSGMGVG (163)	LAHIWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYRTDPLT (169)	RASQNVGTNLA (43)	DASYRYT (134)	60 %
F_A8	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASNRYS (41)	60 %
D_A10	SRLYFPFAY (149)	GFTLSTSGMGVS (150)	VAHIWWDDDEKYYVDSVK (55)	QQHNDPLT (170)	RTSQNVGTYVA (171)	LASNRT (172)	58 %

[0293]

表4. 22个独特文库来源的和设计抗GITR IgG的CDR的氨基酸序列。

[0294]

克隆名称	<u>HCDR3</u>	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>LCDR3</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>
C_B10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)
C_D5	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGV (47)	LAHVWWDDDEKYYVDSVK (48)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAT (46)
C_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGYGV (51)	LAHIWWDDDEKYYVDSVK (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)
D_A6	TRQYFPFAY (31)	GFSTSTSGYGV (29)	TAHTWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNTA (32)	SASYRYT (33)
F_B11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWWDDDEKYYVDSVK (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
F_B9	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGMGVS (56)	VAHIWWDDDEKYYVDSVK (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)
G_G10	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTFGYGV (35)	LAHIWWDDDKEYVDSVK (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	YASYRYT (37)
H_A3	SRRYFPFAY	GFSLSTSGMGMG	LAHIWWDDDKEYVDSVK (55)	QQYSTDPLT	RASQNVGSNLA	SASYRYT

[0295]

	(59)	(58)	(26)	(34)	(40)	(33)
I_C2	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSCYGVG (29)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRYS (41)
J_C5	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSSYGVG (60)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNL (36)	SASYRYT (33)
K_A12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMG (61)	LAHIWWDDEKYYVDSVKKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)
MH	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (62)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
MH-1	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGMGMG (61)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
MH-2	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (47)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
MH-3	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (62)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)
MH-4	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (62)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRAT (46)
MH-5	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (62)	VAHIWWDDEKYYVDSVKKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRYT (33)

A6.1	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.2	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTNPLT (63)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.3	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (47)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.4	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (62)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.5	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (64)	LAHIWWDDDKYYVDSVKKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)

[0296] 表5.先导抗GITR IgG CDR的Epibase DRB1评分。

[0297]

克隆名称	总DRB1	VL	VH
mVH/mVL	1680.4	720.4	960
G-VH3/VL2	994	426.3	567.7
I-C2	1022.7	412.1	610.6
G-G10	842.8	442.4	400.4
D-A6	932.5	499.7	432.8
A6.1	888.7	455.9	432.8
A6.2	888.7	455.9	432.8
A6.3	895.4	455.9	439.5
A6.4	845.9	455.9	390
A6.5	900.3	455.9	444.4

[0298] 表6.抗GITR Fab对hGITR和cGITR的SPR衍生的亲和力值。

[0299] Fab名称 (靶标)	<u>K_{on}</u>	<u>K_{off}</u>	<u>K_D</u>	<u>chi²</u>
	$M^{-1} S^{-1}$	S^{-1}	M	
VH1/VL1 (hGITR)	4.5×10^4	5.1×10^{-3}	1.1×10^{-7}	0.0568
VH1/VL1 (cGITR)	2.2×10^4	6.1×10^{-3}	2.7×10^{-7}	0.0747
D-A6 (hGITR)	9.2×10^4	1.1×10^{-2}	1.2×10^{-7}	0.0574
D-A6 (cGITR)	3.7×10^4	2.1×10^{-3}	5.7×10^{-8}	0.140

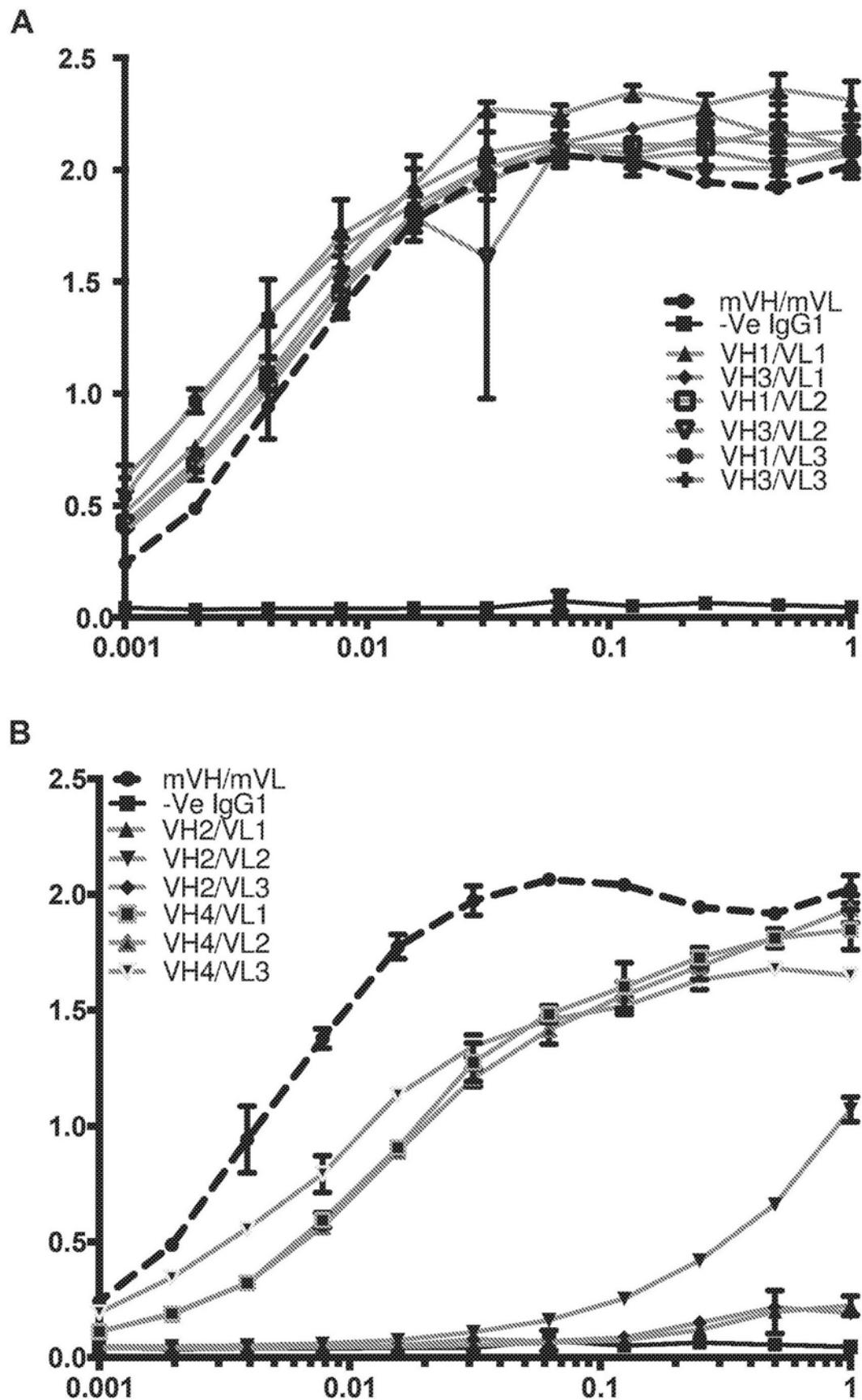


图1

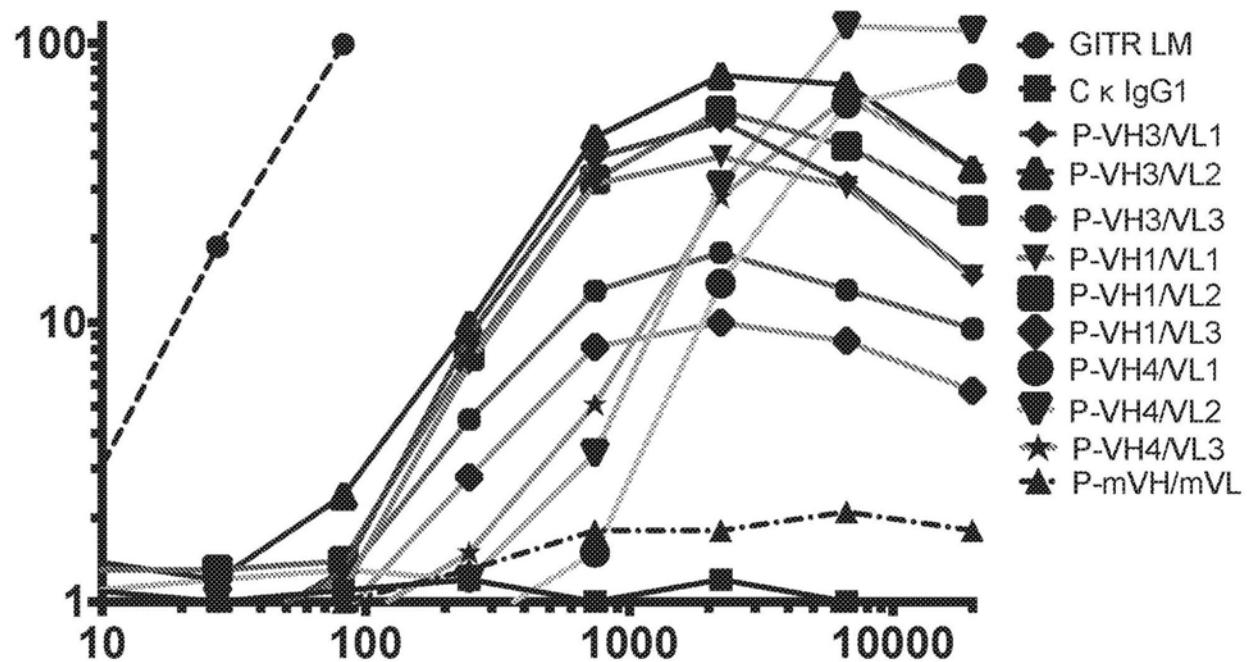


图2

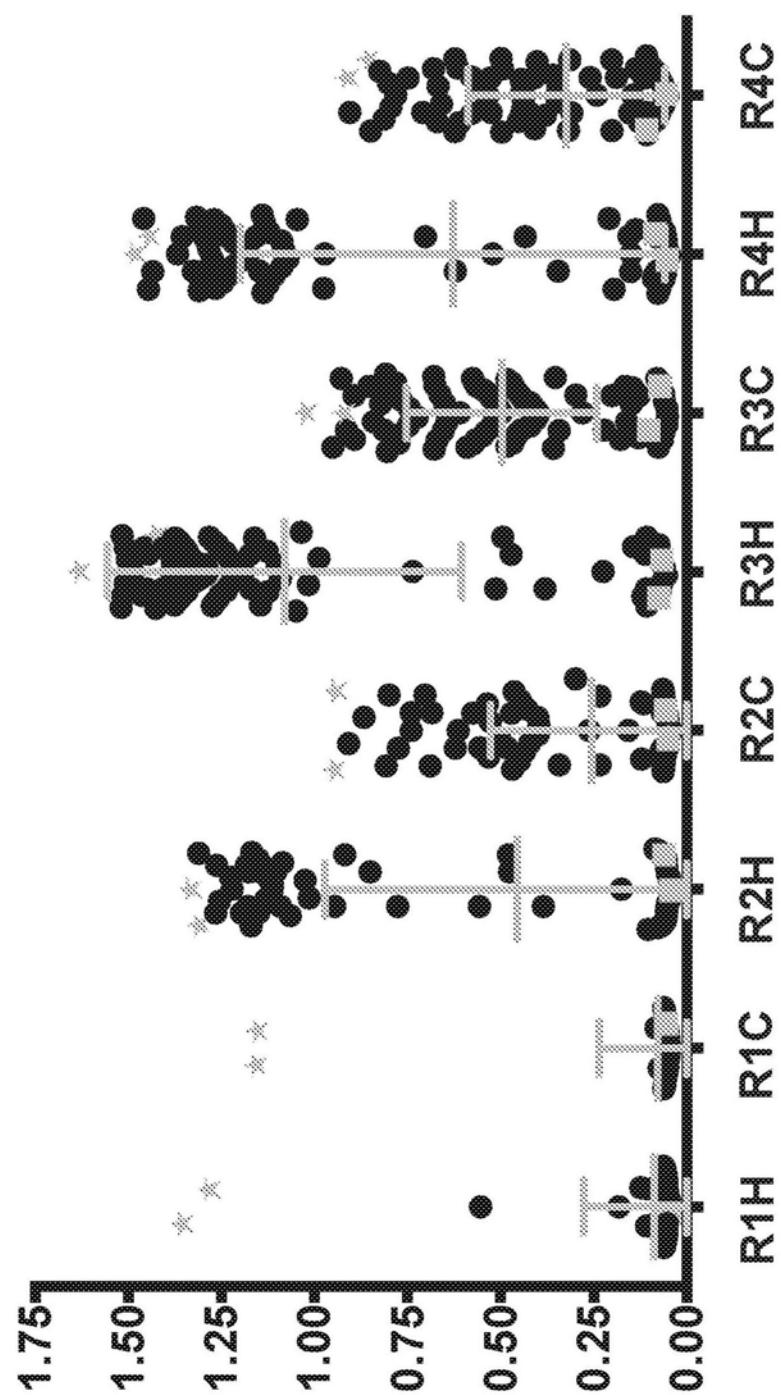


图3A

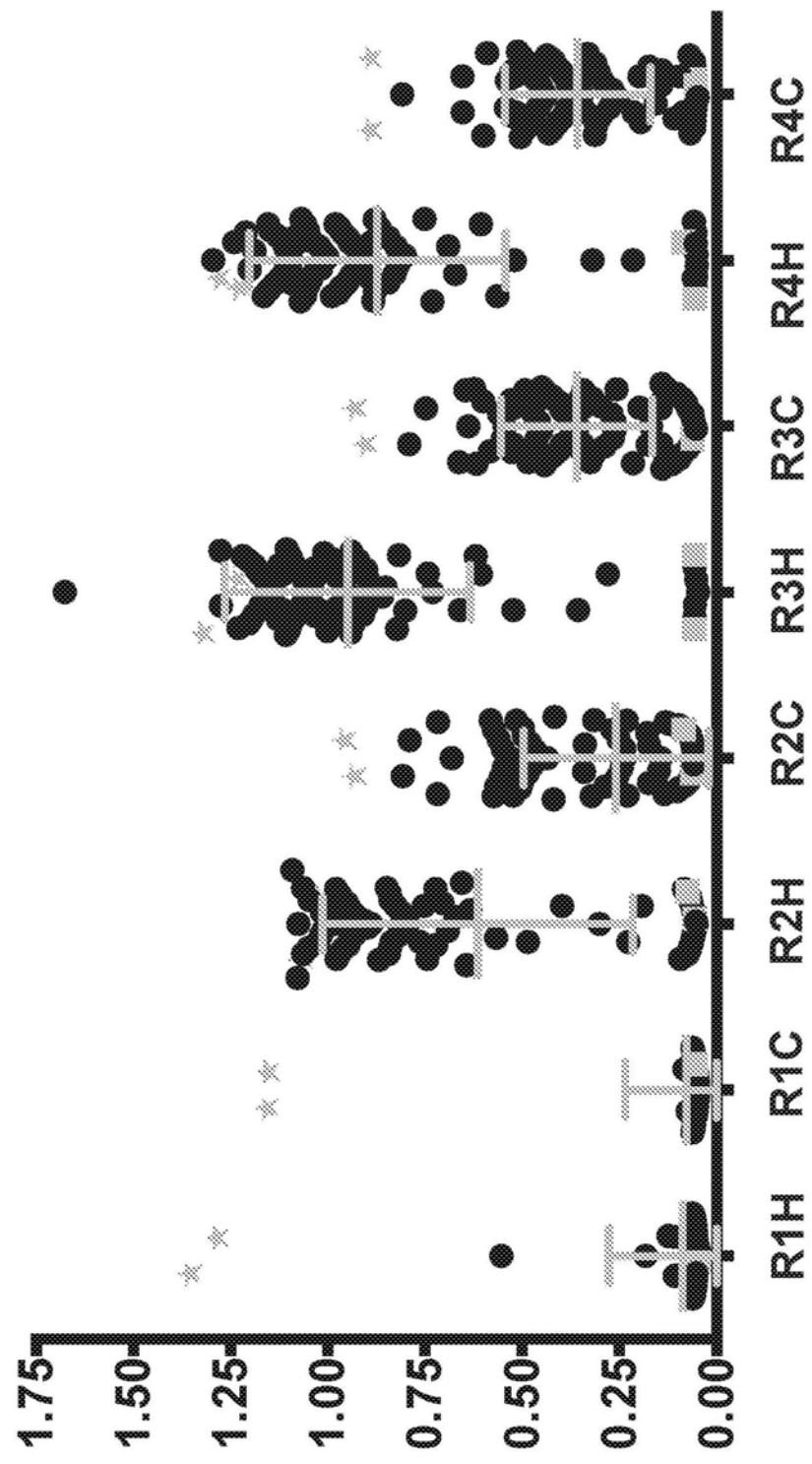


图3B

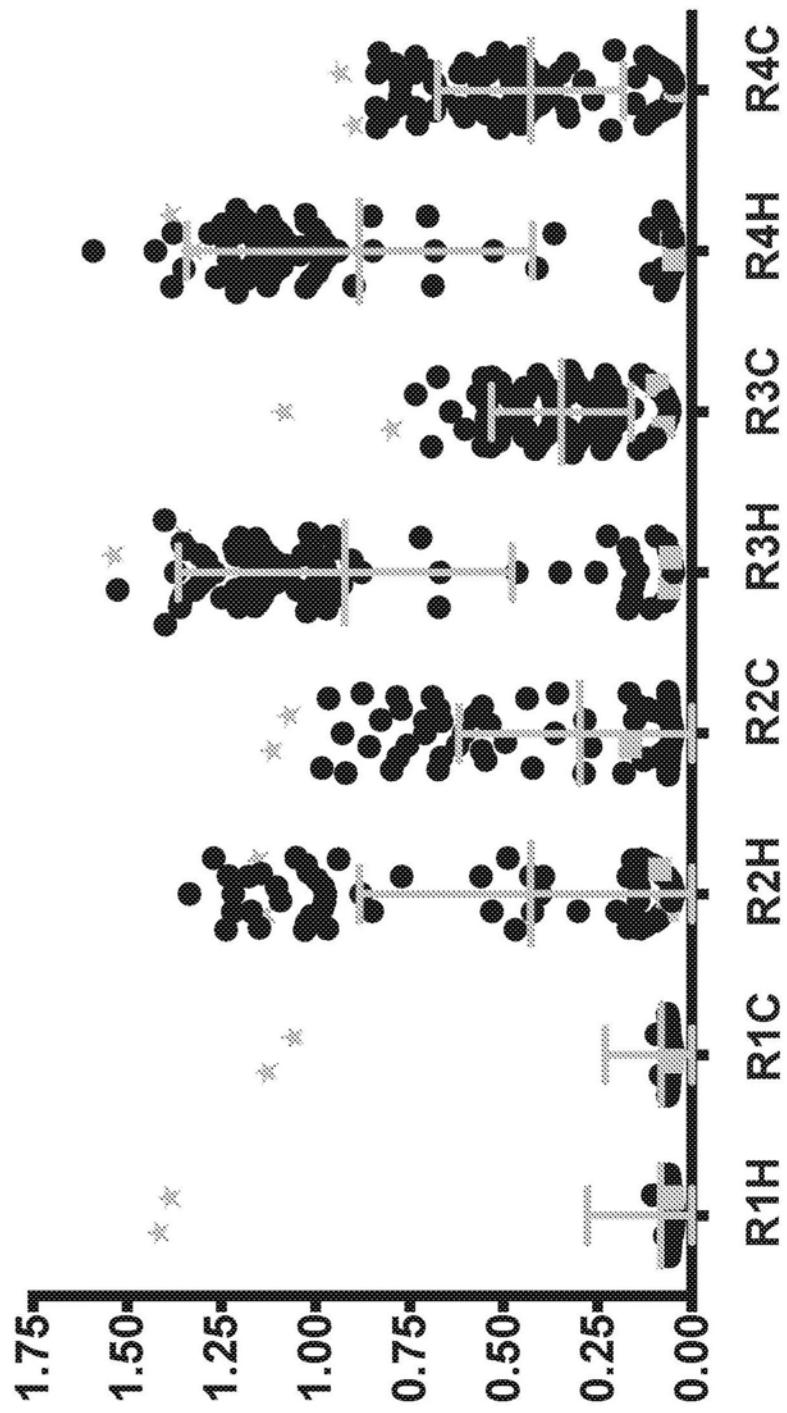


图3C

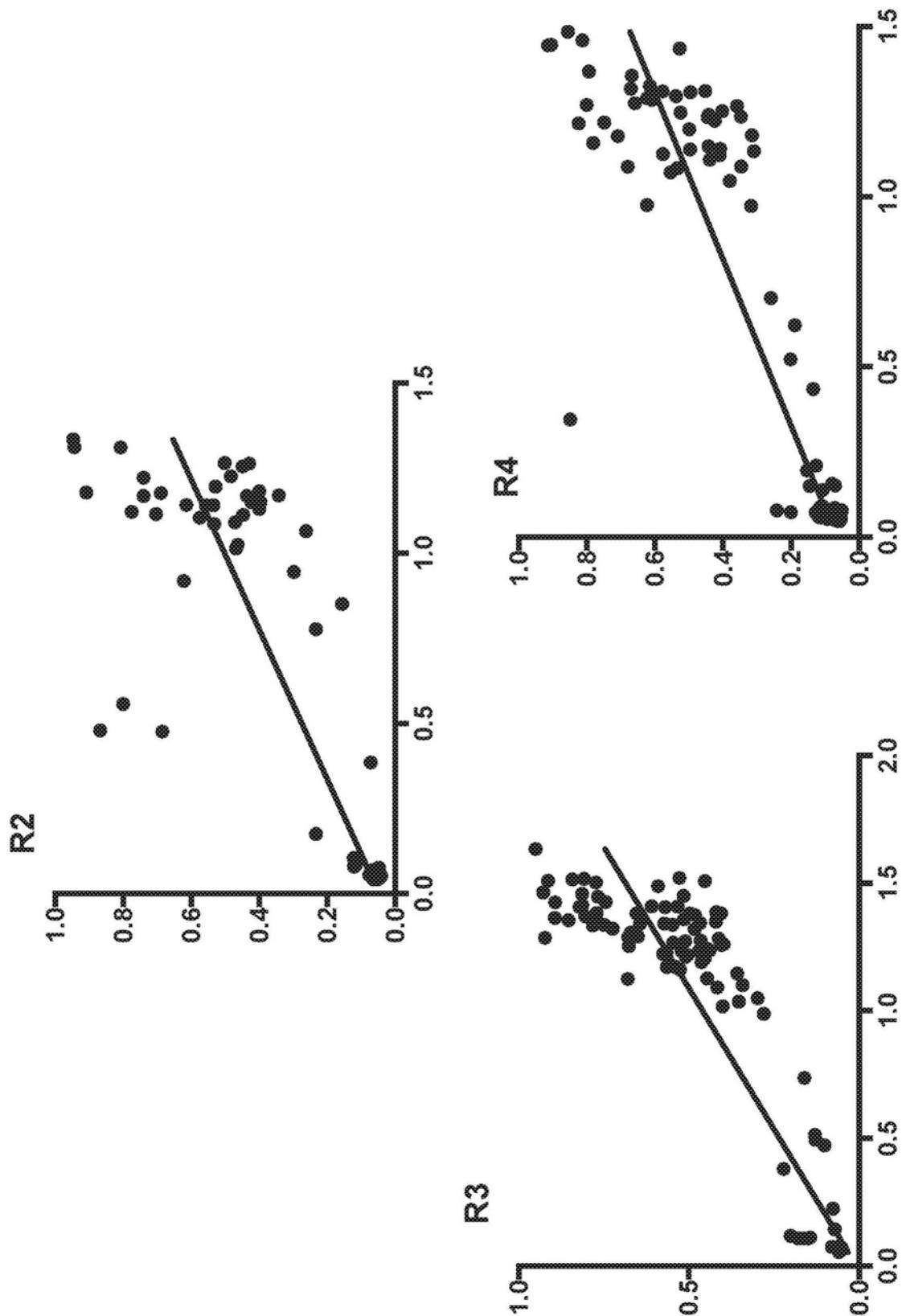


图4A

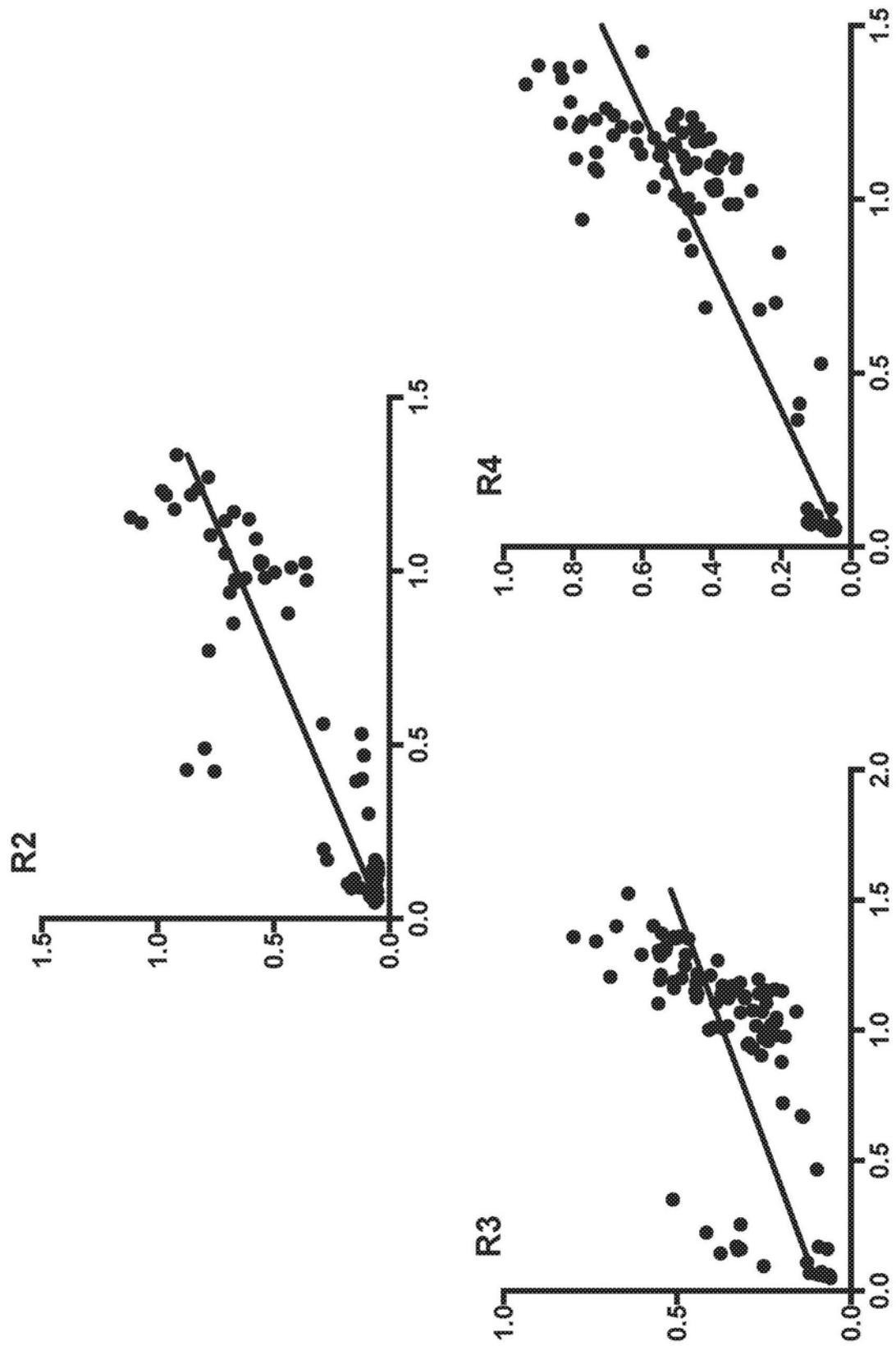


图4B

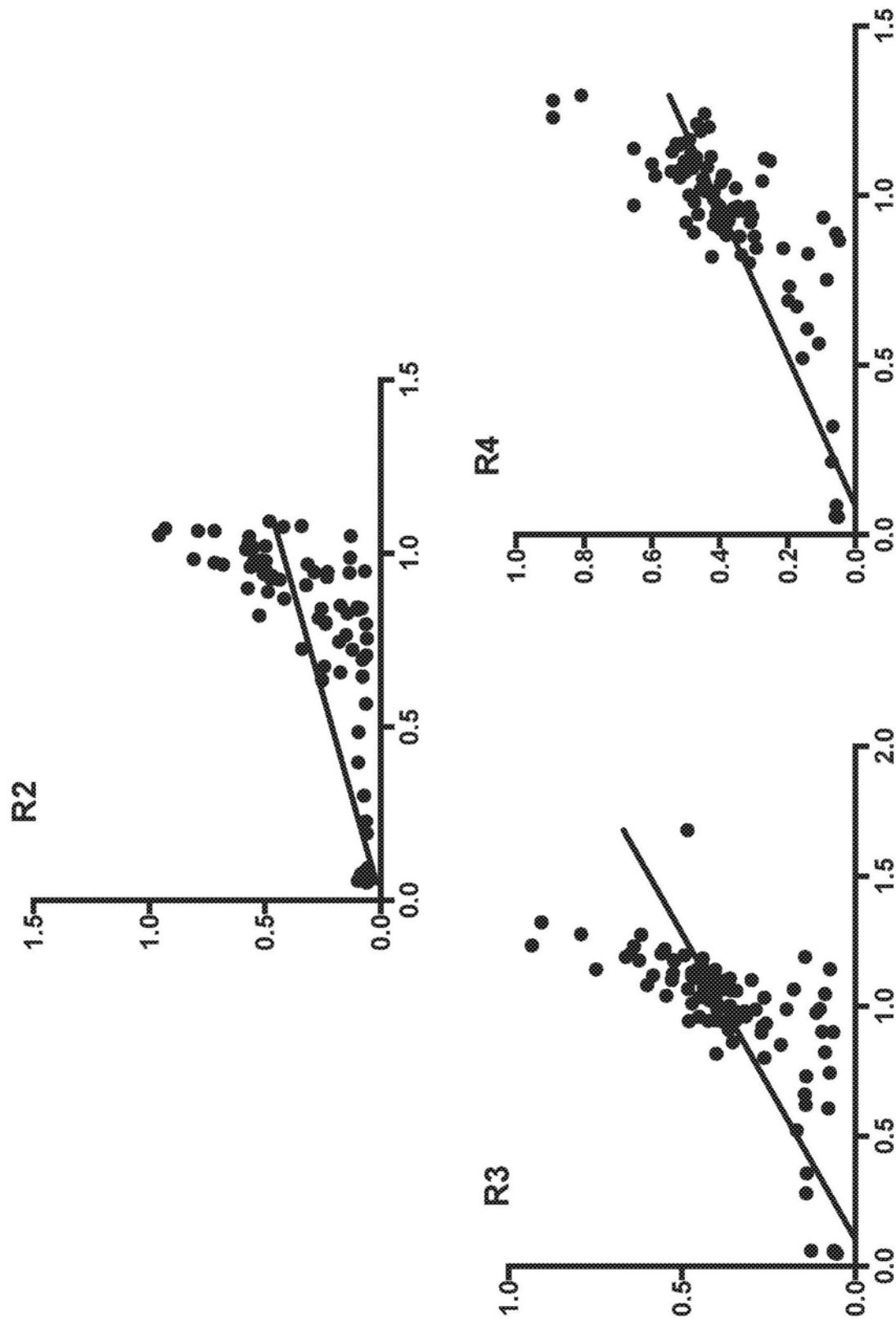


图4C

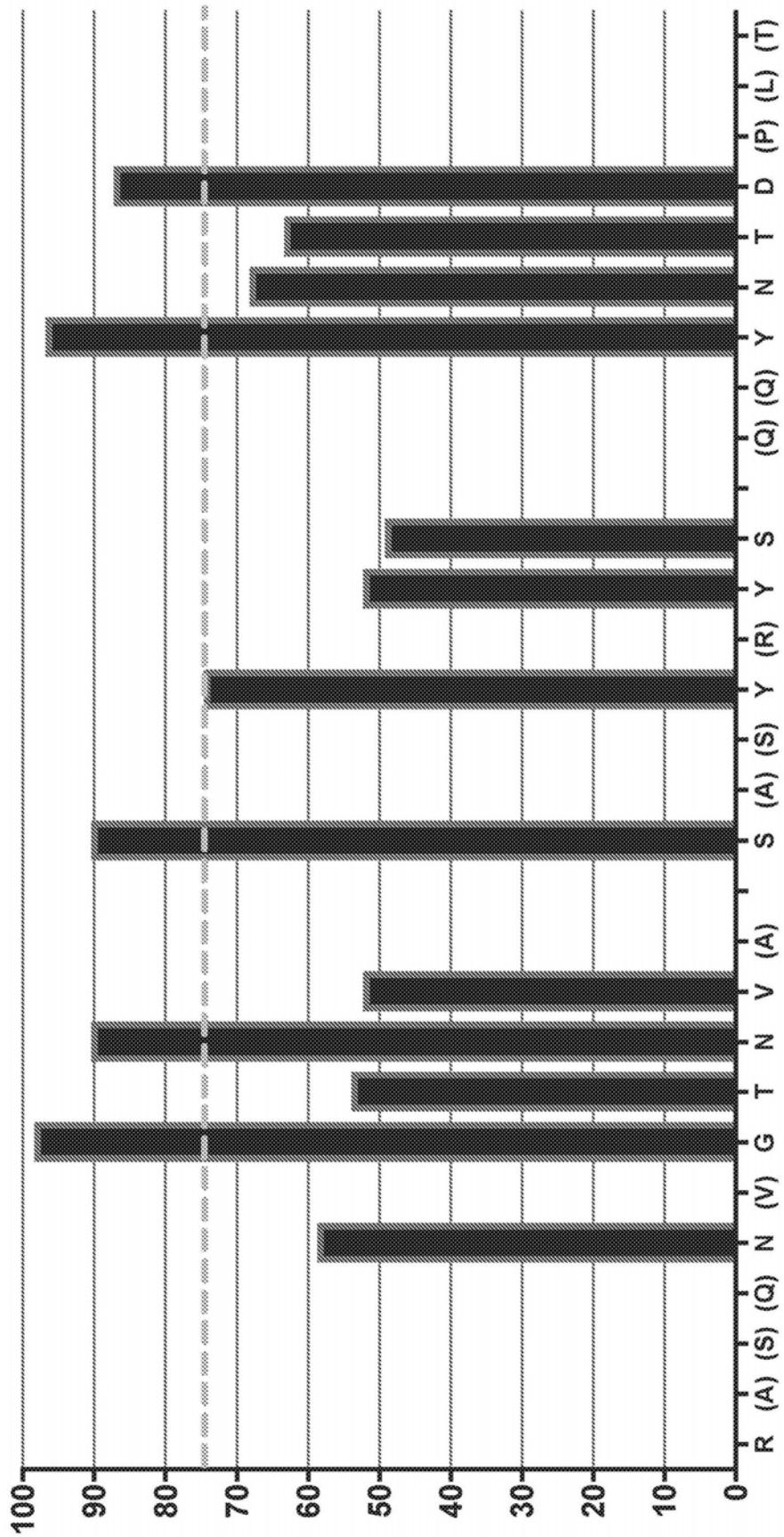


图5A

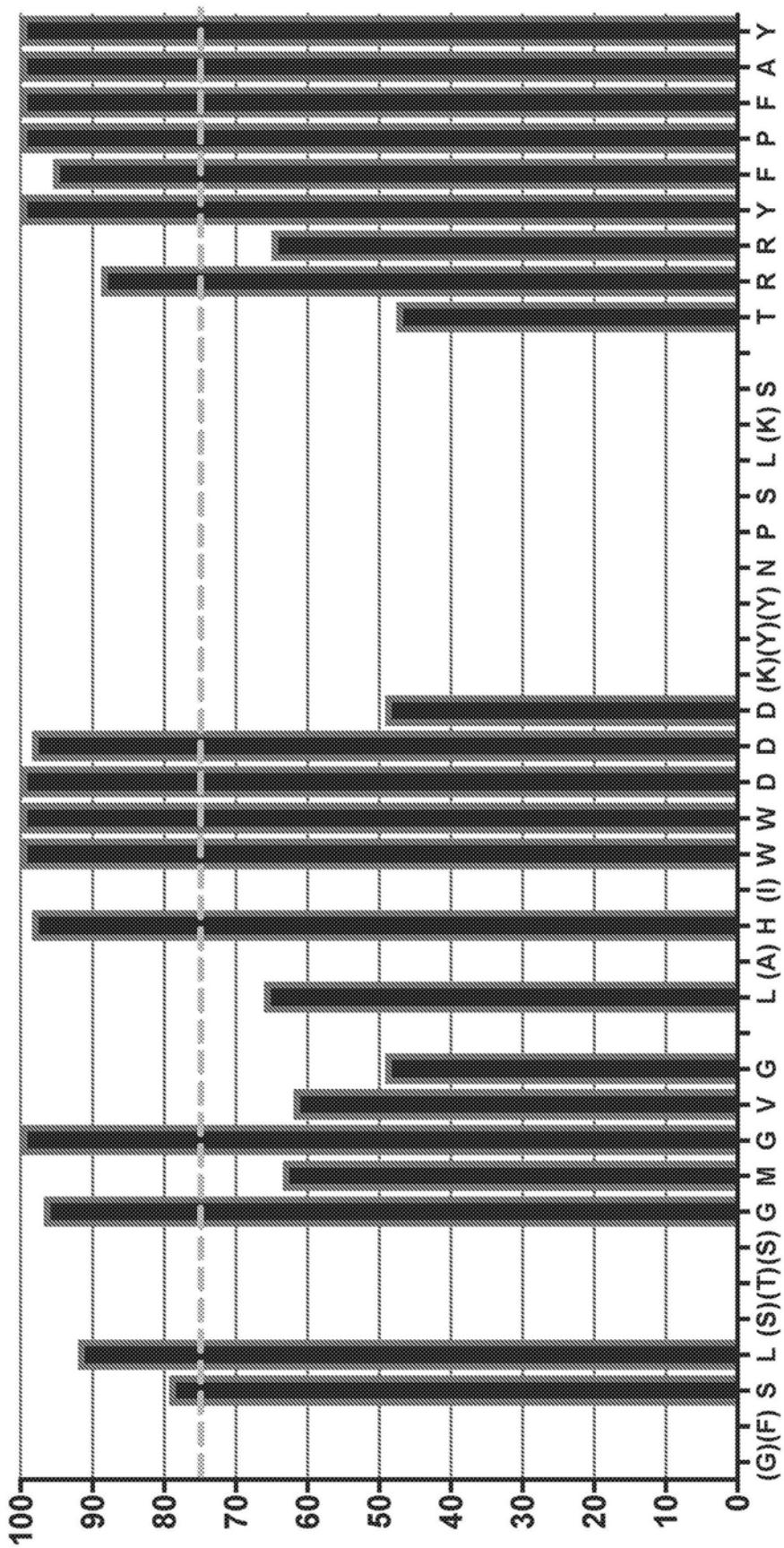


图5B

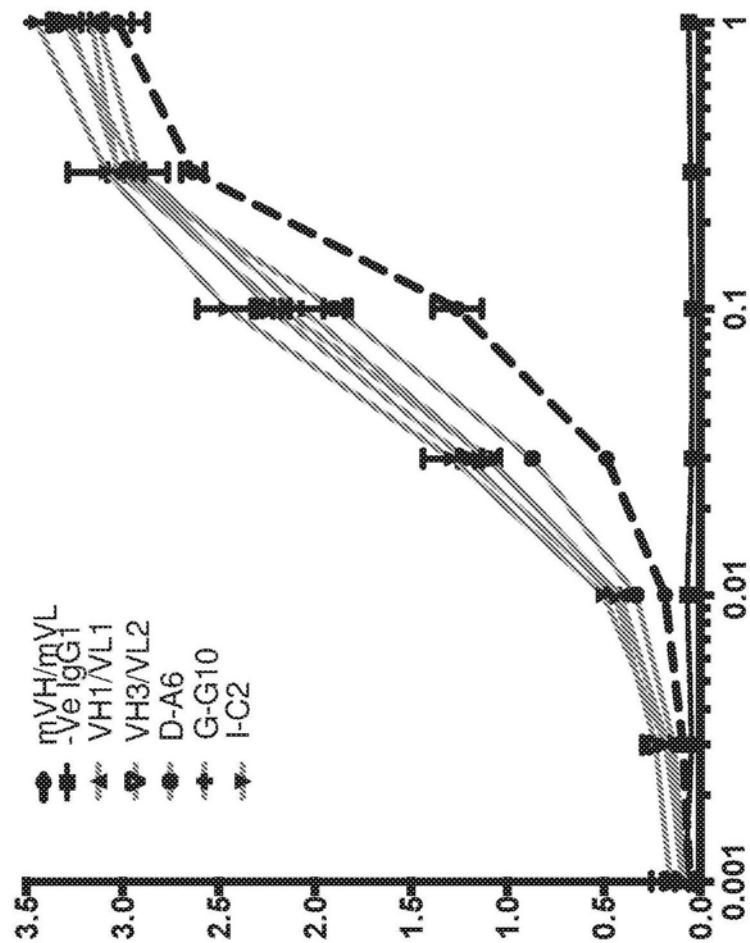


图6A

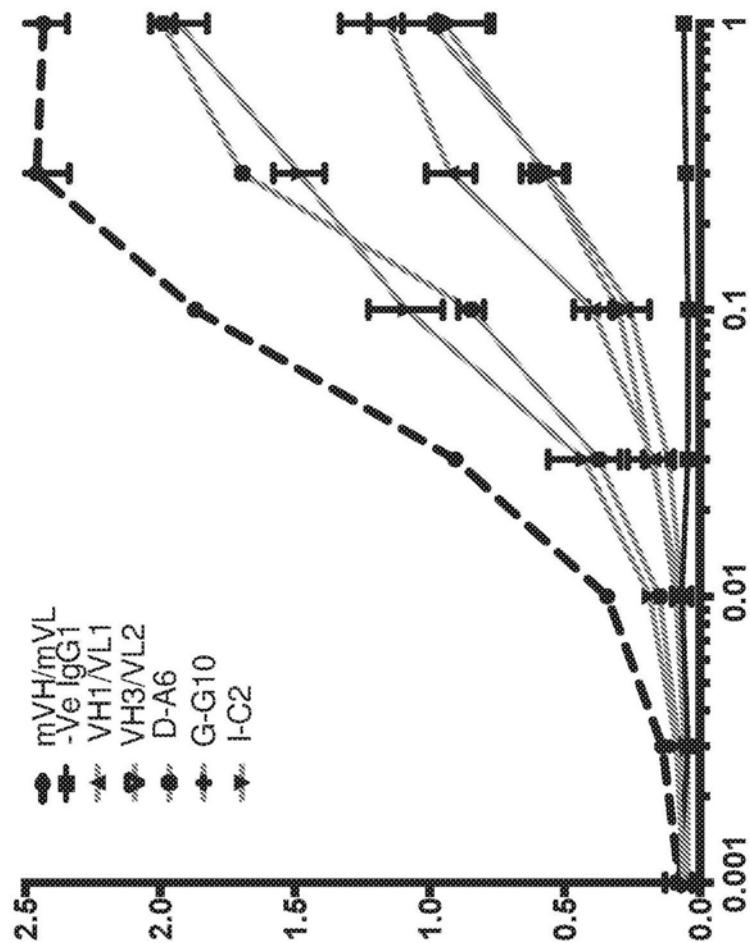


图6B

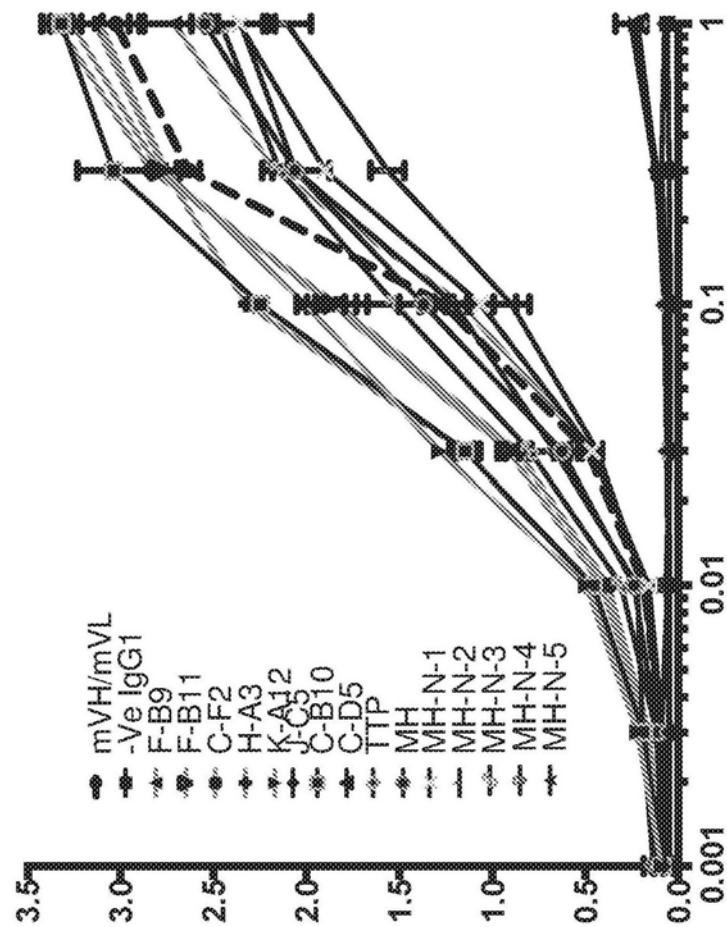


图6C

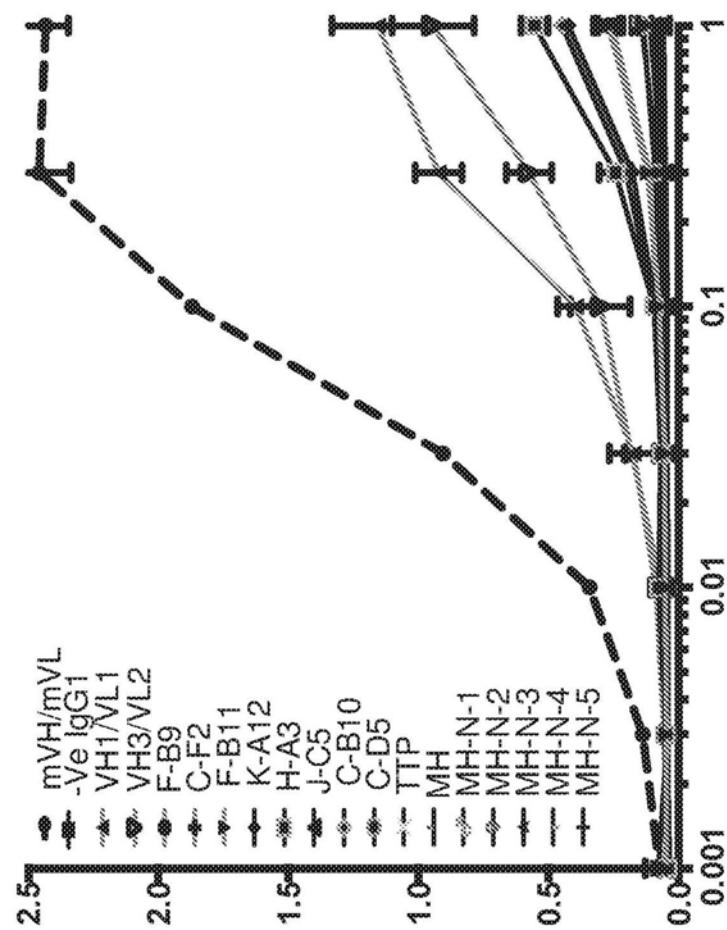


图6D

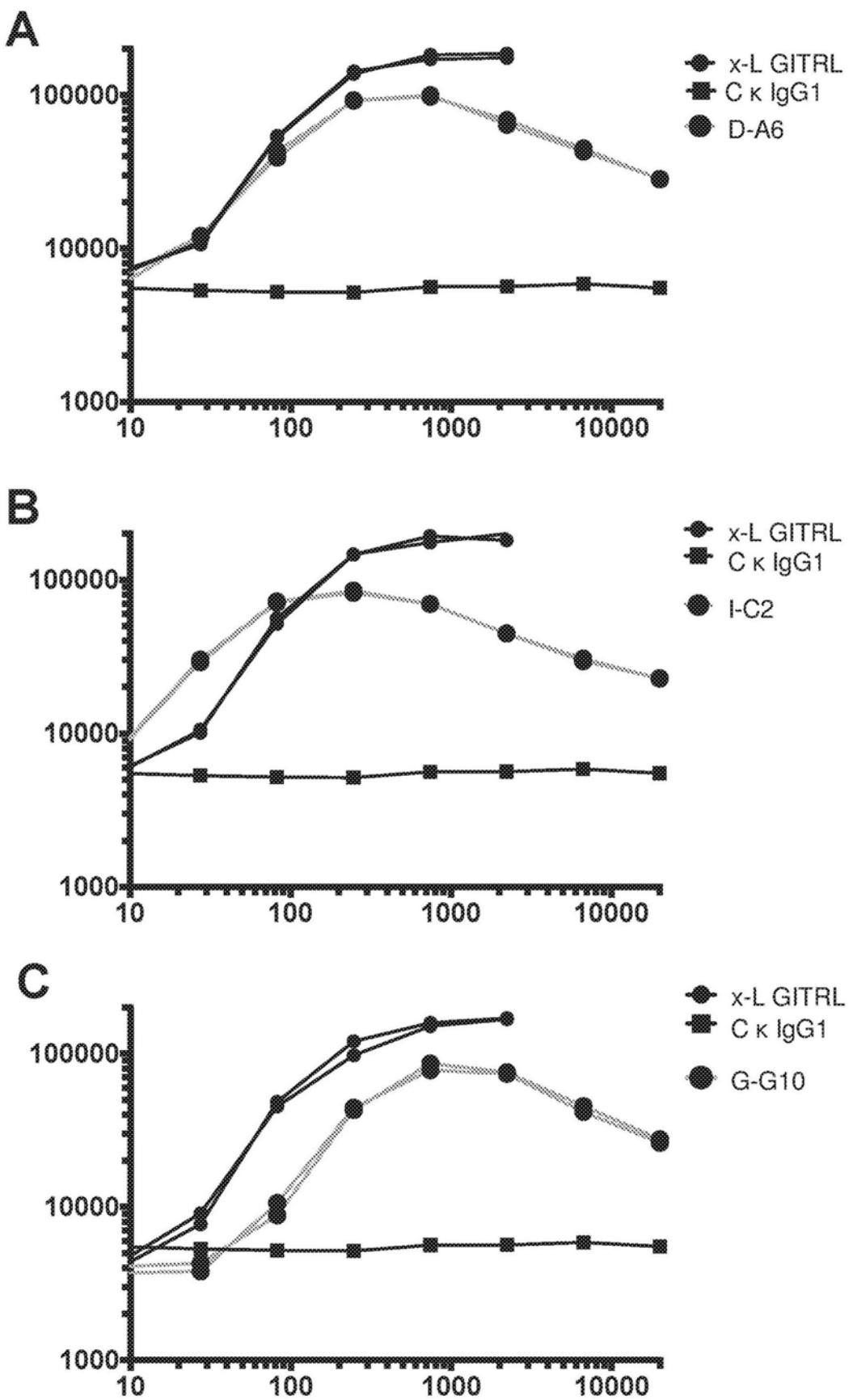


图7

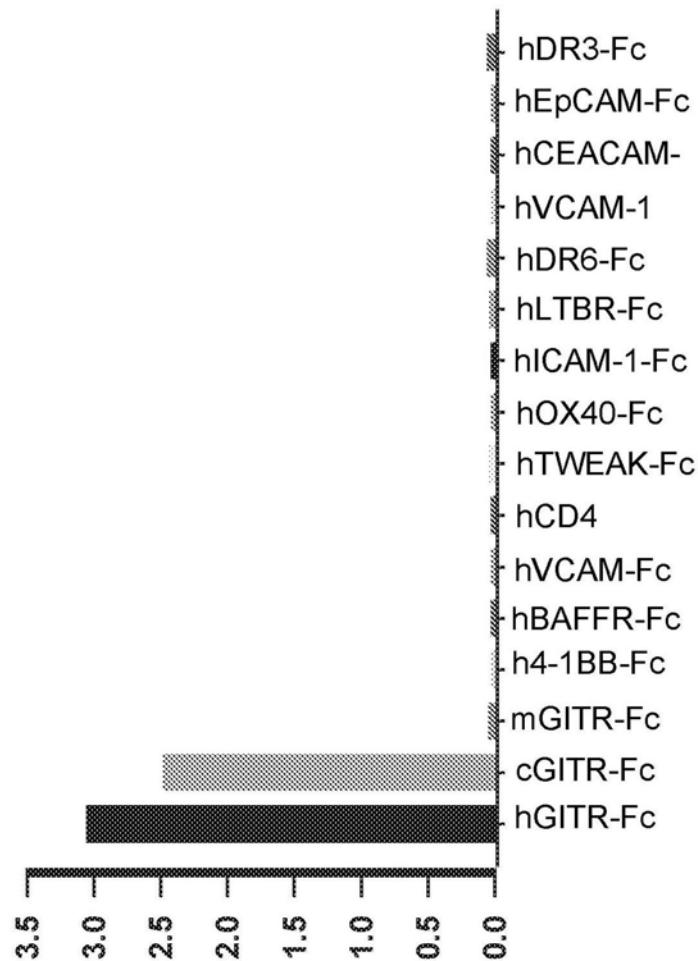


图8A

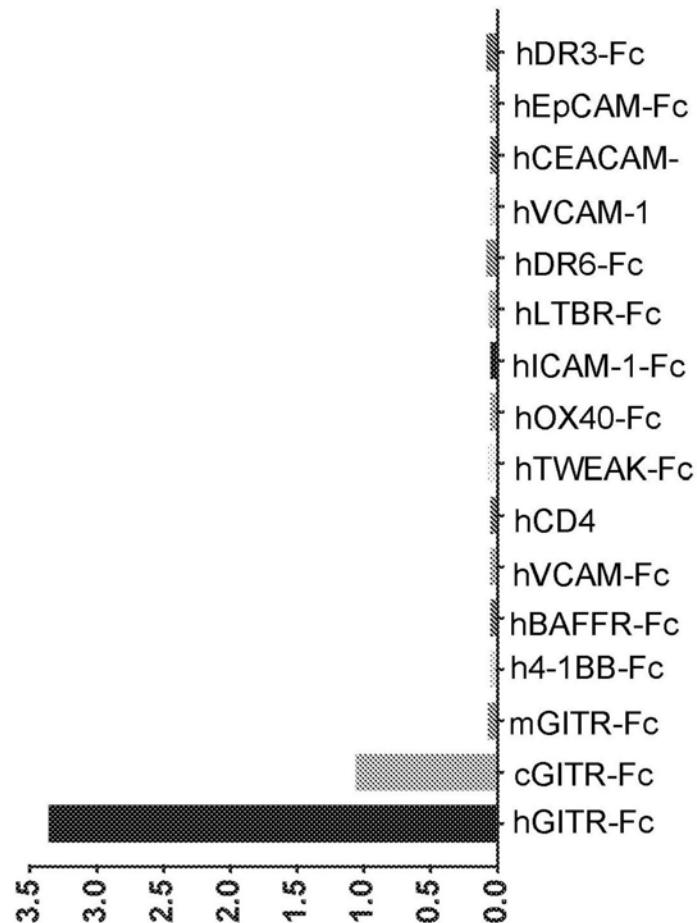


图8B

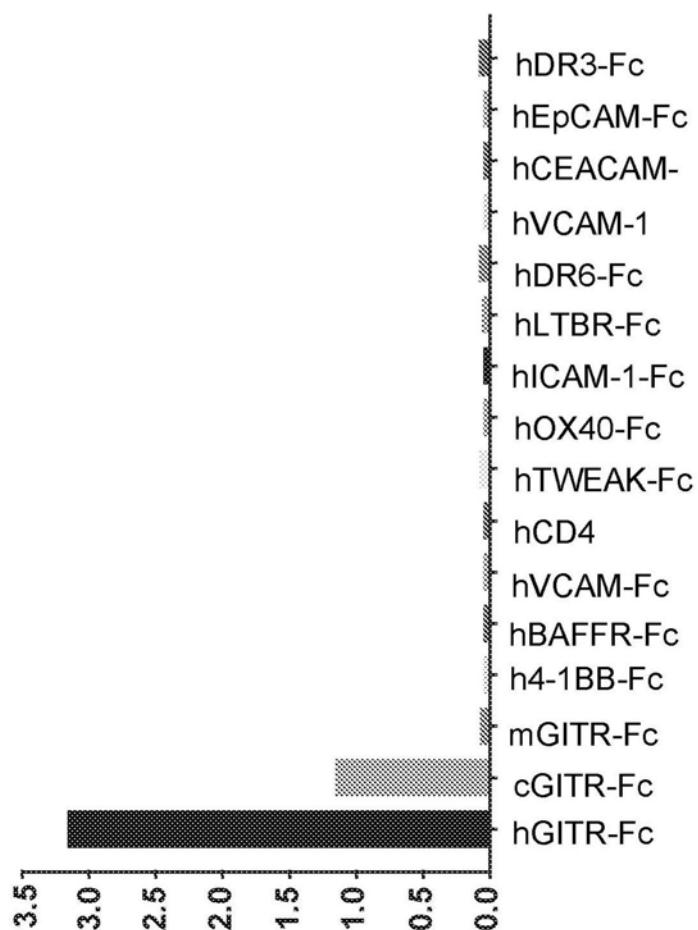


图8C

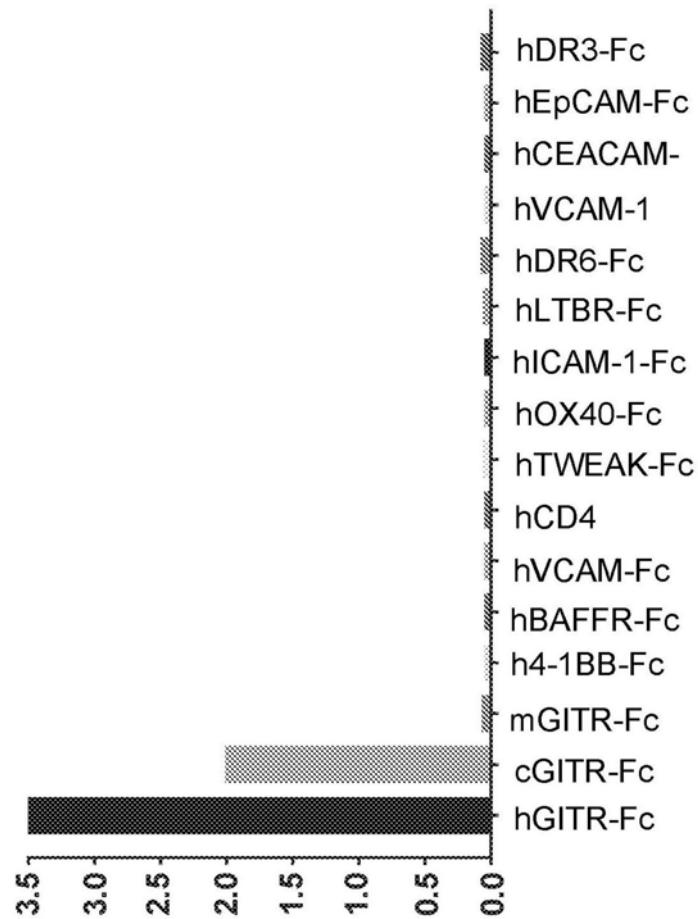


图8D

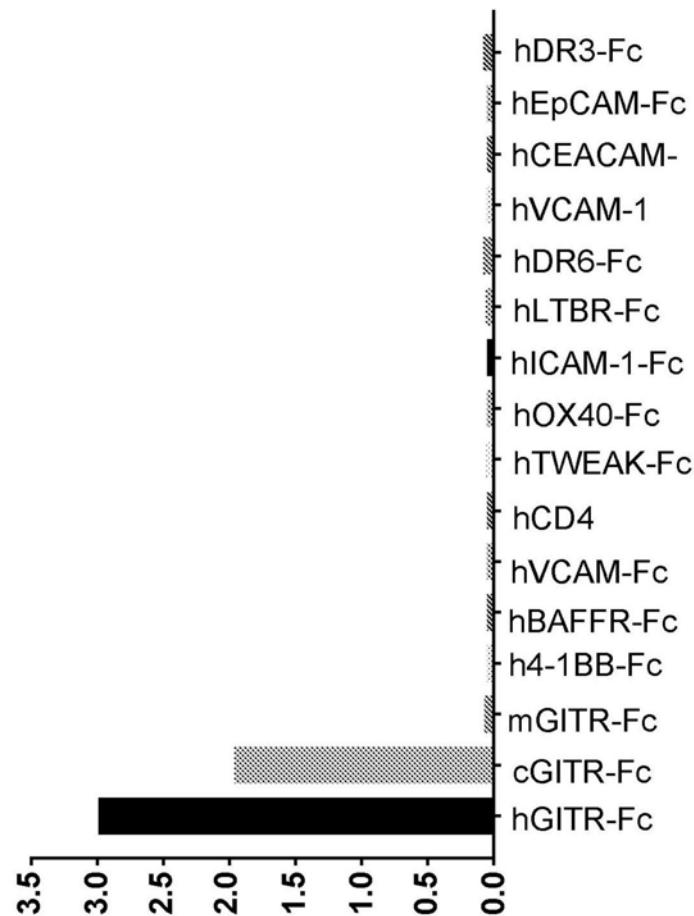


图8E

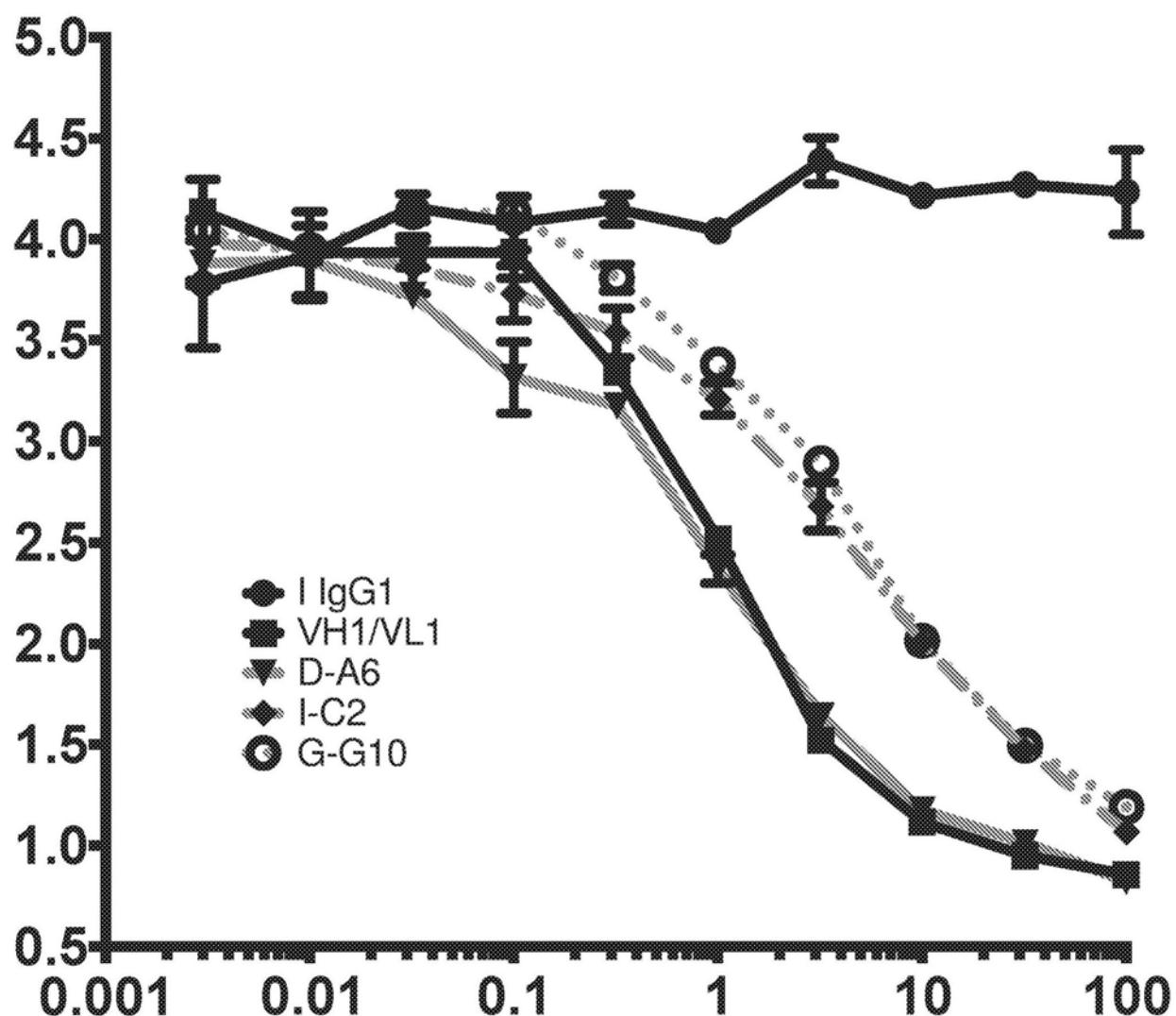


图9

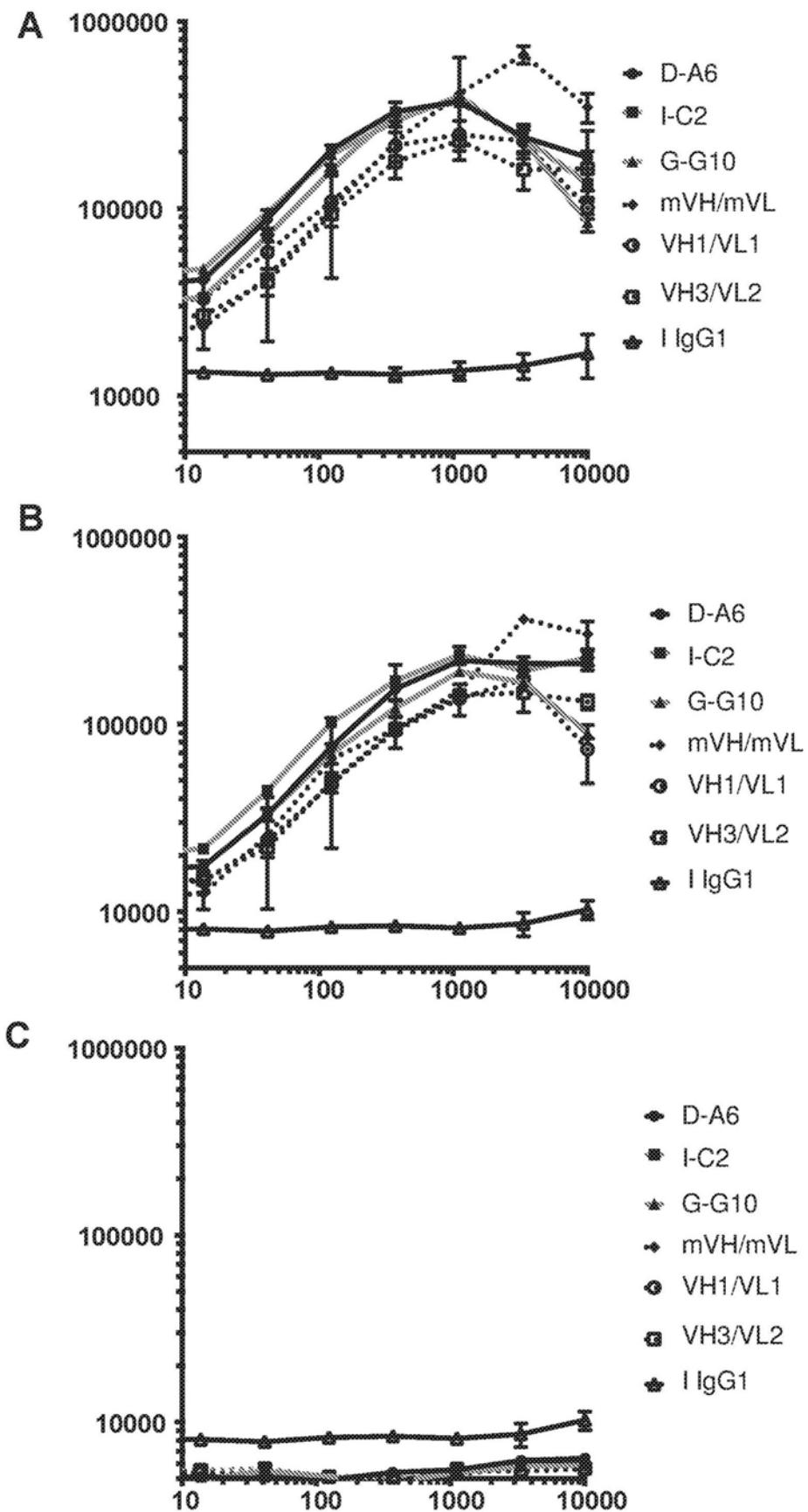


图10

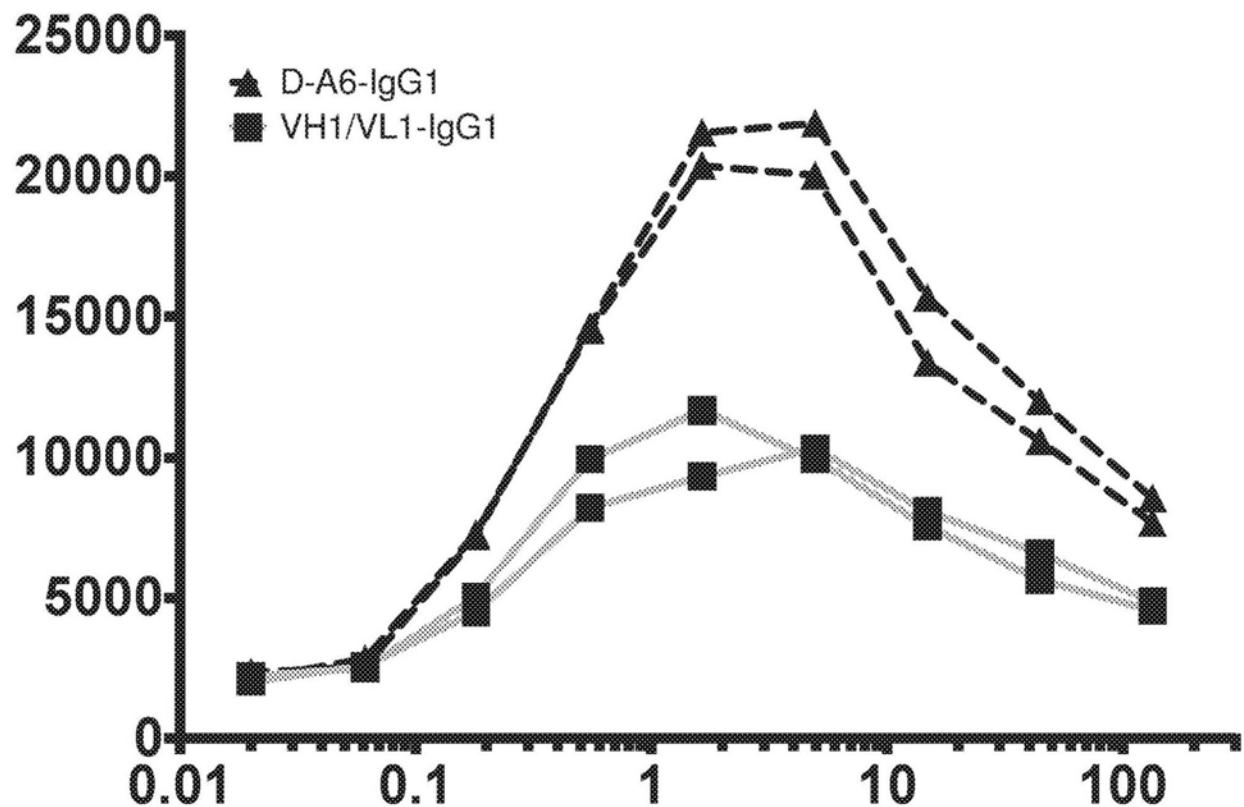


图11

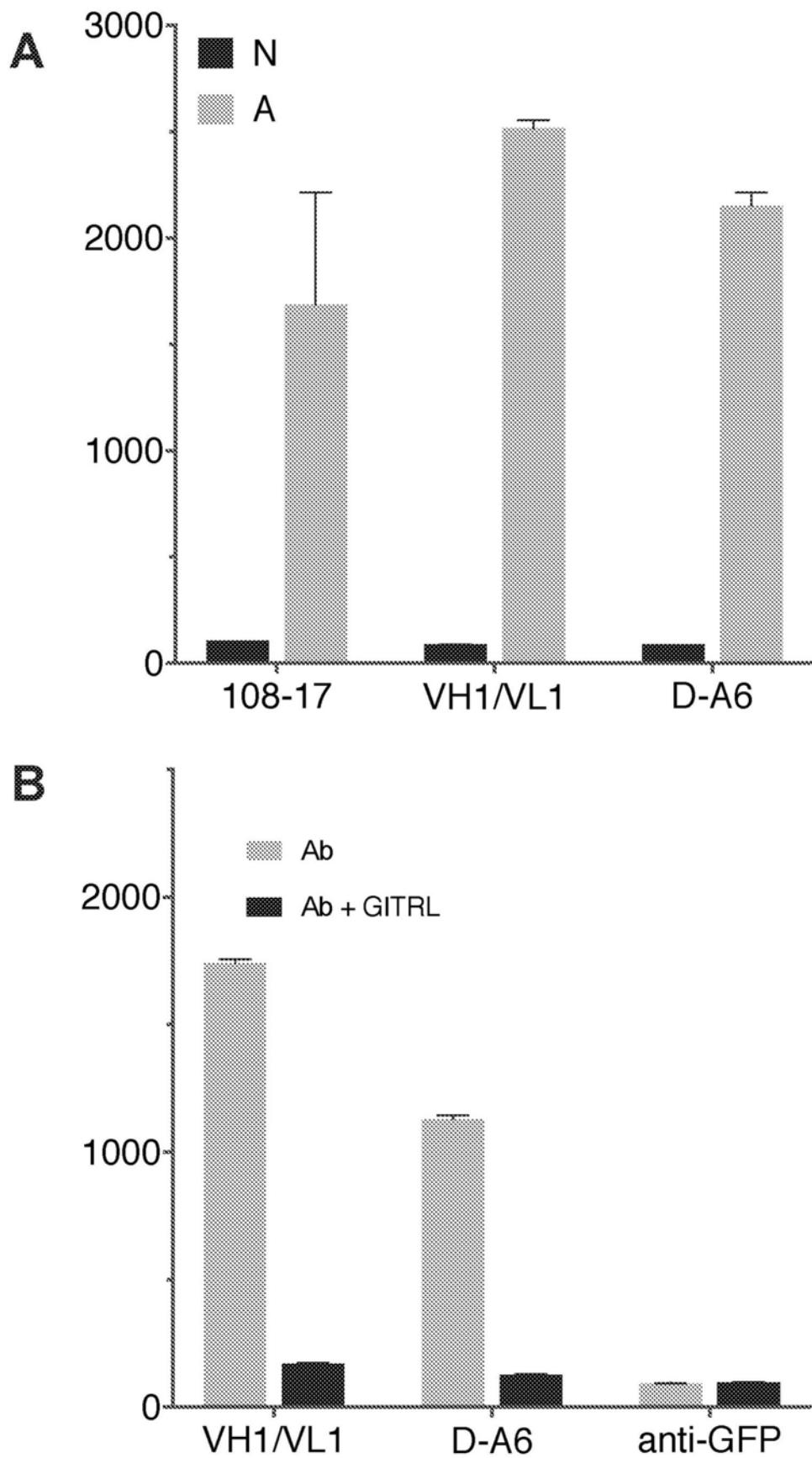


图12

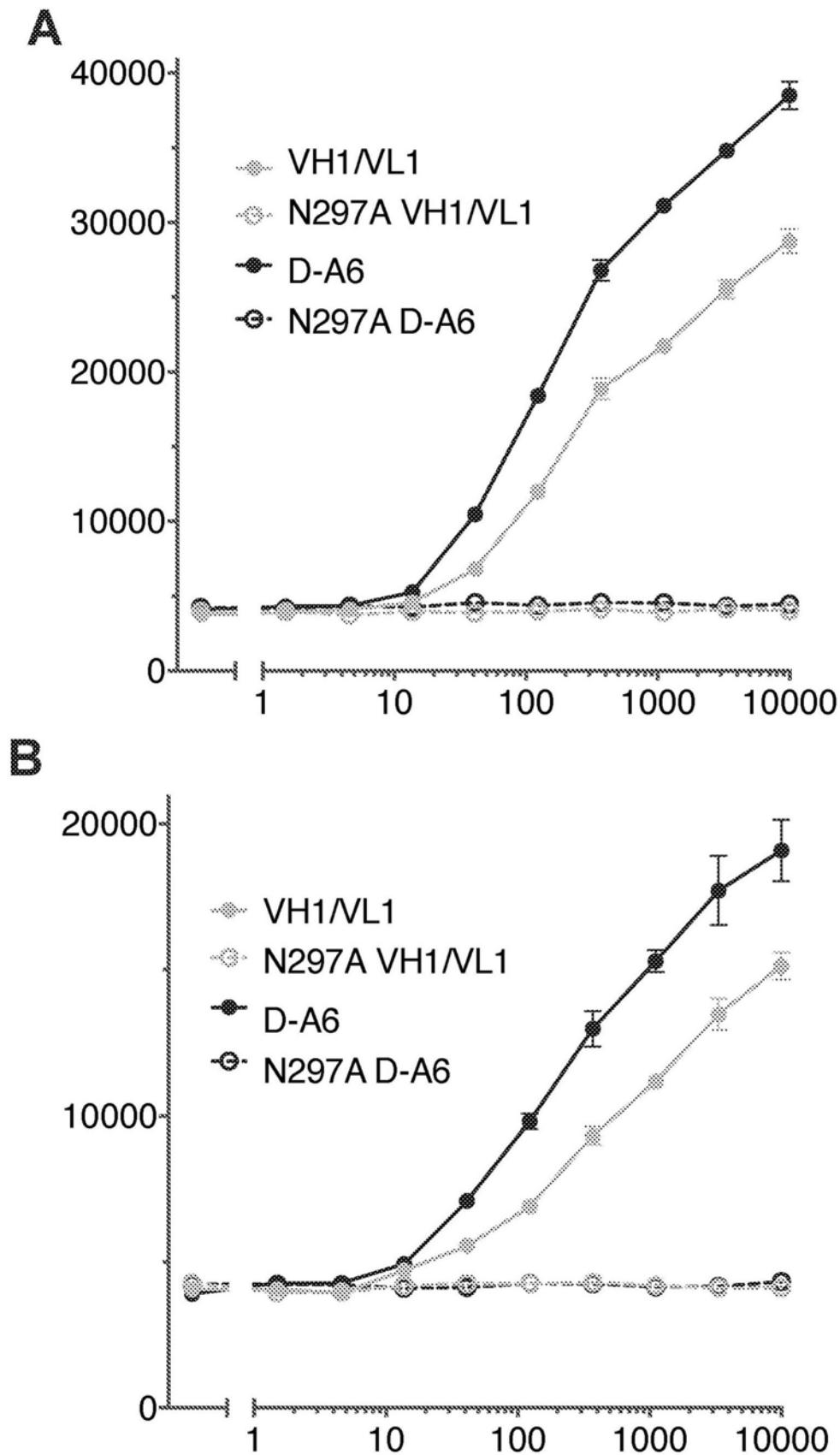


图13

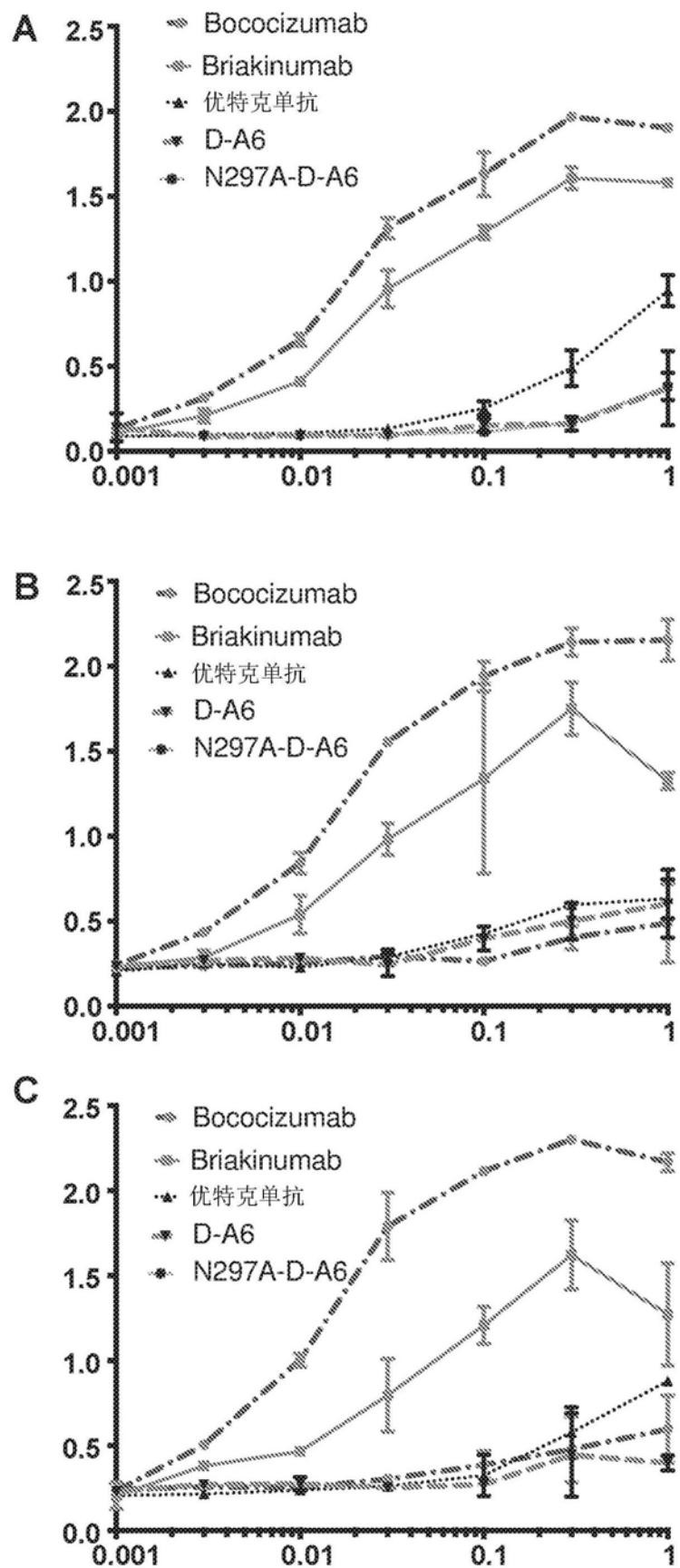


图14

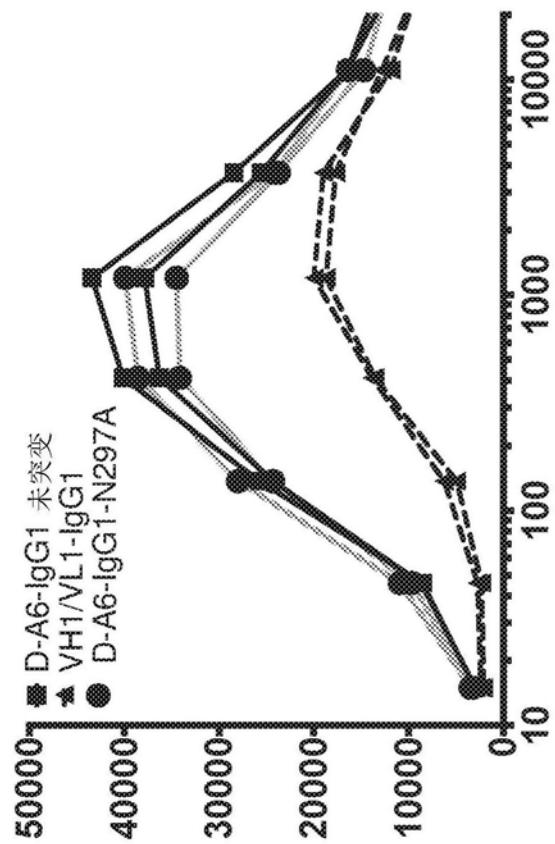


图15A

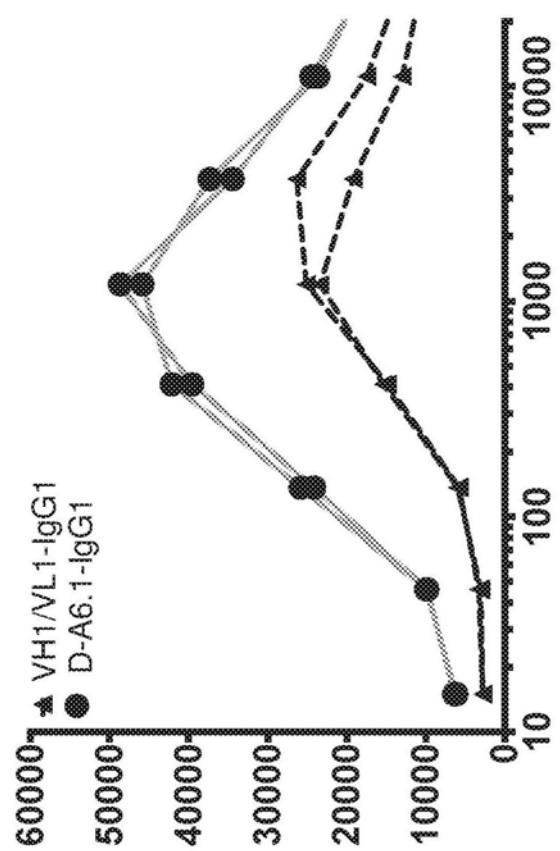


图15B

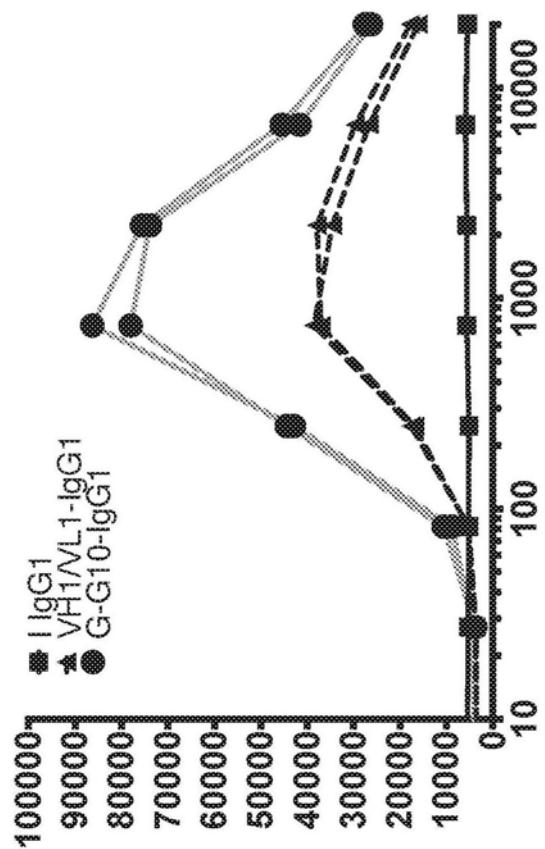


图15C

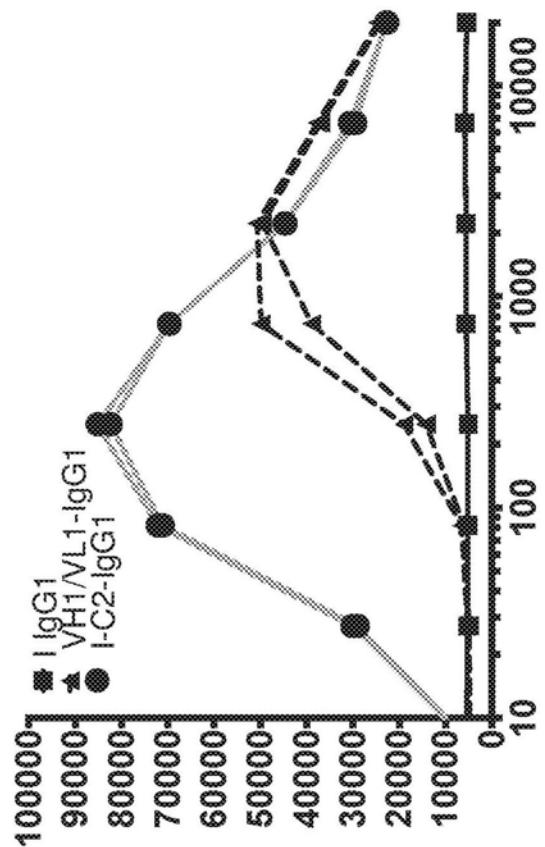


图15D