

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 10 月 4 日 (04.10.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/177220 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/080315

(22) 国际申请日: 2018 年 3 月 23 日 (23.03.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710185400.8 2017 年 3 月 25 日 (25.03.2017) CN

(71) 申请人: 信达生物制药 (苏州) 有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 曾竣玮 (TSUN, Andy); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 巴鲁赫汗马塔 (BARUAH, Hemanta); 中

国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘晓林 (LIU, Xiaolin); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈乘 (CHEN, Cheng); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘军建 (LIU, Junjian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈炳良 (CHEN, Bingliang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。 黄威峰 (HUANG, Weifeng); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街 168 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街 26 号新时代大厦 7 层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: ANTI-OX40 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗 OX40 抗体及其用途

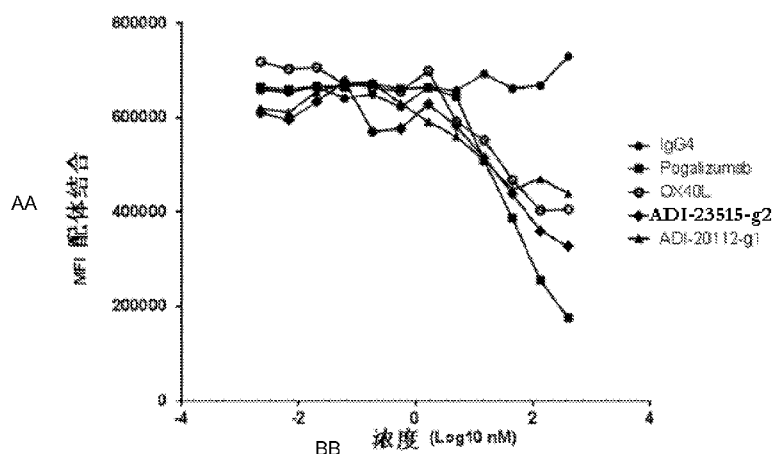


图 1

AA Ligand binding
BB Concentration

(57) Abstract: Provided are an antibody and an antibody fragment specifically binding to OX40 and a composition comprising the antibody or the antibody fragment. Also provided are a nucleic acid encoding the antibody or the antibody fragment and a host cell comprising the same. Further provided are therapeutic and diagnostic uses of the antibody and the antibody fragment.

(57) 摘要: 提供了特异性结合 OX40 的抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物, 并且提供了编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞, 还进一步提供了这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

抗 OX40 抗体及其用途

本发明涉及特异性结合 OX40 的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。此外，本发明涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明涉及这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

背景技术

OX40 (也称为 CD134、TNFRSF4 和 ACT35)最初被描述为大鼠 CD4 T 细胞上的 T 细胞激活标志物 (Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Cortes P, Puklavec M, Williams AF. Antigen of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol.* 1987; 24:1281–1290) 并且随后显示为在 TCR 招募中被上调 (Mallett S, Fossum S, Barclay AN. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.* 1990; 9:1063–1068)。OX40 在 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞和嗜中性粒细胞上被鉴定 (D. J. Paterson, W. A. Jefferies, J. R. Green et al., "Antigen of activated Rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 M(r) detected only on CD4 positive T blasts," *Molecular Immunology*, vol. 24, no. 12, pp. 1281–1290, 1987)。OX40 信号传导能够促进对 T 细胞的共刺激信号，导致增强的细胞增殖、存活、效应子功能和迁移 (Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol.* 1998; 161:6510–6517; Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N, Croft M. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol.* 2000; 165:3043–3050)。

OX40 的配体，OX40L 主要表达在抗原呈递细胞 (APC) 上并且其表达可以通过 CD40 和肥大细胞信号传导、toll 样受体 (TLR) 以及炎性细胞因子被诱导。除了 APC 之外，非造血细胞例如平滑肌和血管内皮细胞也可以表达 OX40L。在过量表达 OX40L 的转基因小鼠中，有增加的 T-细胞激活，并且当被免疫时，这些小鼠产生增强的 T 细胞应答 (Murata K, Nose M, Ndhlovu LC, Sato T, Sugamura K, Ishii N. Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J Immunol.* 2002; 169:4628–4636 和 Sato T, Ishii N, Murata K, Kikuchi K, Nakagawa S, Ndhlovu LC, Sugamura K. Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *Eur J Immunol.* 2002; 32:3326–3335)。这一数据表明 OX40L 表达是 T 细胞中 OX40 信号传导的限制性因子。

在携带肿瘤的小鼠中，小鼠 OX40 的体内连接(通过可溶性小鼠 OX40L-免疫球蛋白融合蛋白或小鼠 OX40L 模拟物，如抗小鼠 CD134 特异性抗体)增强抗肿瘤免疫，导致各种小鼠恶性肿瘤细胞系的小鼠模型例如淋巴瘤、黑素瘤、肉瘤、结肠癌、乳腺癌和神经胶质瘤中的无肿瘤存活 (Sugamura et al. *Nature Rev*

Imm2004; 4:420-431)。

有人建议通过使用 OX40 结合剂结合 OX40 而增强哺乳动物对抗原的免疫应答(WO99/42585; Weinberg,2000)。尽管该文献概括提及 OX40 结合剂,但是重点是使用 OX40L 或其部分;抗 OX40 抗体作为 OX40L 的等同物而公开。事实上,当 Weinberg 小组将该研究用于非人灵长类动物的研究时,他们再次有意选择了结合 OX40L 结合位点并大体模拟 OX40L 的抗体。

Al-Shamkhani 等人(Eur J Chem1996; 26:1695-1699)使用了称为 OX86 的抗 OX40 抗体,其不阻断 OX40L 结合,以探索 OX40 在激活的小鼠 T 细胞上的差异表达;Hirschhorn-Cymerman 等人(J Exp Med2009; 206:1103-1116)在小鼠模型中使用了 OX86 和环磷酸胺作为潜在化学免疫治疗。但是 OX86 预期不结合人 OX40,当选择在人中有效的抗体时,人们根据 Weinberg 的研究会选择结合在 OX40L 结合位点的抗体。

在严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠中,人 OX40 的体内连接(通过抗人 OX40 特异性抗体,其与人 OX40 上的 OX40L 结合结构域相互作用;US2009/0214560A1)增强抗肿瘤免疫,其导致各种人恶性肿瘤细胞系例如淋巴瘤、前列腺癌、结肠癌及乳腺癌的肿瘤生长抑制。

在人类中,人 OX40 连接介导的抗肿瘤免疫应答的精确机制尚未证实,但是据认为是经过 OX40 跨膜信号传导途径介导的,该途径受与 OX40L 的相互作用刺激。这种相互作用由三聚体 OX40L 与 OX40 的结合而介导。在目前抗癌治疗中,推荐使用三聚化 OX40 配体作为比抗 OX40 抗体更有效的药物(Morris et al.Mol Immunol2007; 44:3112-3121)。

此外,在免疫原性差的肿瘤中,单一的抗 OX40 治疗不能提供足够的抗肿瘤免疫原性,因此还希望开发 OX40 与其他策略的组合。人们发现调控 OX40 信号传导与在肿瘤细胞中失调的其他信号传导途径(例如血管发生途径,PD-1 途径)的组合可以进一步增强治疗功效。

因此,仍然需要开发新的抗 OX40 抗体,其与现有技术中已知的抗 OX40 抗体相比,较低的阻断 OX40 与 OX40L 的结合,从而更好地用来治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和 T 细胞功能障碍性疾病。

发明概述

申请人令人惊奇地发现,为了活化 T 细胞、诱导 T 细胞介导的抗肿瘤活性,使用结合人 OX40 的抗体或其片段(例如抗原结合片段),其中所述抗体或其片段能够更好地结合人 OX40,同时较低地阻断人 OX40 与 OX40 配体(OX40L)的结合,产生增强的免疫应答。

优选地,本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够活化 T 细胞,例如增强 T 效应细胞的免疫刺激/效应功能和/或使这些细胞增殖和/或下调 T 调节细胞的免疫

抑制功能。更优选地,所述抗体能够引起抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,本发明的 OX40 抗体能够用来治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和 T 细胞功能障碍性疾病。

本发明因此提供了结合人 OX40 或食蟹猴 OX40 的抗体或其片段(优选地抗原结合片段),其中所述抗体或其片段对人或食蟹猴 OX40 与其配体 OX40L 的结合的阻断比较低。在一些实施方案中,本发明所述的抗体或其片段能够结合人 OX40,同时较低地阻断人 OX40 与 OX40 配体(OX40L)的结合(例如与本领域已知的 OX40 抗体或 OX40L 相比),并产生增强的免疫应答。

优选地,本发明的所述抗体或其片段对人或食蟹猴 OX40 与其配体 OX40L 的结合的阻断低于 OX40L 配体或本领域已知的其它抗 OX40 抗体,例如 ponalizumab 的阻断。更优选地,本发明的抗 OX40 抗体或其片段保留对人或食蟹猴 OX40 的强的结合(例如与已知的抗 OX40 抗体,例如 ponalizumab 相当),同时较低的阻断(例如低于 OX40L 的阻断,或低于 ponalizumab 的阻断)人或食蟹猴 OX40 与其配体 OX40L 的结合。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段结合人 OX40 或食蟹猴 OX40。在一些优选的实施方案中,本发明的抗体或其片段不结合或相比与人或食蟹猴 OX40 的结合更低地结合鼠 OX40,例如大鼠 OX40 或小鼠 OX40。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体具有激动剂活性。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段结合人 OX40 或食蟹猴 OX40 的 K_D 小于大约 200nM,优选地,小于或等于大约 100nM、大约 50nM、大约 40nM、大约 30nM、大约 20nM、大约 10nM,更优选地小于或等于大约 9nM,更优选地小于或等于大约 8nM,更优选地小于或等于大约 7nM、6nM、5nM、4nM、3nM 或 2nM,最优选地,所述 K_D 小于或等于大约 1nM 或 0.8nM 或 0.4nM 或 0.3nM 或 0.2nM 或 0.1nM。在一些实施方案中,抗体结合亲和力是使用生物光干涉测定法(例如 Fortebio 亲和测量)或 MSD 测定法测定的。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段对人 OX40 或食蟹猴 OX40 的结合是使用流式细胞术(例如 FACS)测定法测定的。在一些实施方案中,对细胞中的人 OX40 或食蟹猴 OX40 的结合具有小于或等于大约 10nM、9nM 或 8nM 的 EC_{50} 。在一些实施方案中,对人 OX40 或食蟹猴 OX40 的结合具有小于或等于大约 7nM 或大约 6nM 或大约 5nM 或大约 4nM 或大约 3nM 的 EC_{50} 。在一些实施方案中,在用流式细胞术测定法进行的测定中,本发明的抗体或其片段结合细胞上表达的 OX40,与不表达 OX40 的相应对照细胞相比,MFI 值大于 1000 倍差异,优选地大于 1100 倍差异、1200 倍差异、1300 倍差异、1400 倍差异、1500 倍差异、1600 倍差异、1700 倍差异、1800 倍差异、1900 倍差异、2000 倍差异、2100 倍差异、2200 倍差异、2300 倍差异、2400 倍差异或 2500 倍差异。

另一方面,本发明提供能够活化 T 细胞(例如 CD4⁺T 细胞)的具有激动剂活性的抗 OX40 抗体或其片段。因此,在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗

体或其片段能够活化 T 细胞。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段增强 CD4+效应 T 细胞功能，例如通过提高 CD4+效应 T 细胞增殖和/或提高 CD4+效应 T 细胞的细胞因子生成(例如与本发明的抗 OX40 抗体或其片段处理之前的增殖和/或细胞因子生成相比，或者与对照抗体(例如 IgG 抗体)处理的 CD4+效应 T 细胞的增殖和/或细胞因子生成相比)。在一些实施方案中，该细胞因子是 γ -干扰素，例如 IFN γ 或白细胞介素，例如 IL-2。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段提高肿瘤内(浸润性)CD4+效应 T 细胞的数目(例如 CD4+效应 T 细胞的总数，或例如 CD45+细胞中 CD4+细胞的百分比)，例如与本发明的抗 OX40 抗体或其片段处理之前(或与对照抗体(例如 IgG 抗体)处理之后)肿瘤内(浸润性)CD4+效应 T 细胞的数目相比。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段提高表达 γ -干扰素的肿瘤内(浸润性)CD4+效应 T 细胞的数目(例如表达 γ -干扰素的 CD4+效应 T 细胞的总数，或例如总 CD4+细胞中表达 γ -干扰素的 CD4+细胞的百分比)，例如与本发明的抗 OX40 抗体或其片段处理之前(或与对照抗体(例如 IgG 抗体)处理之后)表达 γ -干扰素的肿瘤内(浸润性)CD4+效应 T 细胞的数目相比。

在一些实施方案中，抗 OX40 抗体的激动剂活性由 T 细胞活化后释放的细胞因子的水平来评估。因此，本发明提供了与用 IgG 对照处理的 CD4+T 细胞的细胞因子生成相比，能够提高 CD4+T 细胞的细胞因子生成的抗 OX40 抗体或其片段。在一些实施方案中，该细胞因子是炎性细胞因子，例如 γ -干扰素(例如 IFN γ)或白细胞介素(例如 IL-2)。

优选地，与相应的对照 IgG 抗体相比，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够将 CD4+T 细胞分泌的 IL-2 水平增加高达大约 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、110 倍、120 倍、130 倍、140 倍、150 倍、160 倍或更高。在一些实施方案中，与相应的对照 IgG 抗体相比，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够将 CD4+T 细胞分泌的 IL-2 水平增加高达大约 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、17 倍、18 倍、19 倍、20 倍、21 倍、22 倍、23 倍、24 倍、25 倍、26 倍、27 倍或更高。在一些实施方案中，与相应的对照 IgG 抗体相比，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够将 CD4+T 细胞分泌的 IFN γ 水平增加高达 1 倍、2 倍、3 倍或更高。在一些实施方案中，通过 ELISA 测定 T 细胞的细胞因子分泌水平。

在一些实施方案中，抗 OX40 抗体的激动剂活性由 OX40 信号传导(例如监测 NF κ B 下游信号传导)来评估。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段提高表达 OX40 的靶细胞中的 OX40 信号转导。在一些实施方案中，OX40 信号转导是通过监测 NF κ B 下游信号传导而检测的。

因此，本发明提供了与用对照 IgG 抗体相比，提高 NF κ B 介导的转录活性水平的抗 OX40 抗体或其片段。优选地，与相应的对照 IgG 抗体相比，本发明的抗

OX40 抗体或其片段能够将 NF κ B 介导的转录活性水平提高大约 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍或更多。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段提高肿瘤内(浸润性)CD8+效应 T 细胞的数目(例如 CD8+效应 T 细胞的总数，或例如 CD45+细胞中 CD8+的百分比)，例如与本发明的抗 OX40 抗体或其片段处理之前(或与对照抗体(例如 IgG 抗体)处理之后)肿瘤内(浸润性)CD8+效应 T 细胞的数目相比。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段提高表达 γ -干扰素的肿瘤内(浸润性)CD8+效应 T 细胞的数目(例如总 CD8+细胞中表达 γ -干扰素的 CD8+细胞的百分比)，例如与本发明的抗 OX40 抗体或其片段处理之前(或与对照抗体，例如 IgG 抗体处理之后)表达 γ -干扰素的肿瘤内(浸润性)CD8+效应 T 细胞的数目相比。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段增强记忆 T 细胞功能，例如通过提高记忆 T 细胞增殖和/或提高记忆细胞的细胞因子生成。在一些实施方案中，该细胞因子是 γ -干扰素(例如 IFN γ)或白细胞介素(例如 IL-2)。

在一些优选的实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够诱发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段结合人效应细胞，例如结合人效应细胞表达的 Fc γ R(例如活化性 Fc γ R)。在一些实施方案中，该人效应细胞实施(能够实施)ADCC 效应子功能。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段的功能需要抗体交联。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段的功能是下述一项或多项：提高 CD4+效应 T 细胞增殖和/或细胞因子生成，提高 CD4+记忆 T 细胞增殖和/或细胞因子生成，和/或通过 ADCC 来消减细胞。在一些实施方案中，抗体交联是通过提供粘附至固体表面(例如细胞培养板)的抗人 OX40 激动性抗体而测定的。在一些实施方案中，抗体交联是通过在该抗体的 IgG Fc 部分中引入突变(例如氨基酸序列突变)并测试突变体抗体的功能而测定的。在一些实施方案中，抗体交联是通过 Fc γ RIIb 来实现的。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段无需抗体交联就能实现其功能。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段在 Fc γ RIIb 不存在的情况下能够实现功能。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段具有更好的抗肿瘤活性。例如相比于对照 IgG 抗体或已知的抗 OX40 抗体，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够降低受试者中的肿瘤体积，优选地同时不影响受试者的体重。

本文所述的作为对照的 IgG 抗体包括 IgG1 抗体、或 IgG4 抗体或 IgG2 抗体，例如具有表 7 所示的轻链和重链的 IgG1、IgG2 或 IgG4 抗体。

在优选的实施方案中，本发明提供了抗 OX40 抗体或其片段，其具有上文所述的抗 OX40 抗体的一个或多个特性。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (HCVR)，其中所述 HCVR 包含

(i) 表 B 所列任一抗体的 HCVR 中所含的三个互补决定区域(CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(LCVR)，其中所述 LCVR 包含：

(i) 表 B 所列任一抗体的 LCVR 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；或

(ii) 相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 HCVR 和轻链可变区 LCVR，其中

(a) 所述 HCVR 包含

(i) 表 B 所列任一抗体的 HCVR 中所含的三个互补决定区域(CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii)相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列；和/或

(b)所述 LCVR 包含：

(i) 表 B 所列任一抗体的 LCVR 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；或

(ii) 相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在优选的实施方案中，HCVR 包含选自 SEQ ID NO:106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 或 120 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中，LCVR 包含选自 SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137 或 138 所示的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (HCVR) 和/或轻链可变区 (LCVR)，其中

(i) 所述 HCVR 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15 和 16 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR1 包含与选自 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 和 16 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 和 33 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 和 33 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39 和 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39 和 40 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；

和/或

(ii) 其中所述 LCVR 包含互补决定区域(CDR)LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:41、42、43、44、45 和 46 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR1 包含与选自 SEQ ID NO:41、42、43、44、45 和 46 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；LCDR2 包含选自 SEQ ID NO:47、48、49、50、51 和 52 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:47、48、49、50、51 和 52 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:53、54、55、56、57、58、59、60 和 61 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:53、54、55、56、57、58、59、60 和 61 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)，其中

(a) 所述 HCVR 包含

(i)表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的组合；或

(ii) (i)的 HCDR 组合的变体，所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)；

和/或

(ii) 所述 LCVR 包含

(i)表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合；或者

(ii) (i)的 LCDR 组合的变体，所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)。

在优选的实施方案中,本发明提供抗 OX40 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 (HCVR) 和轻链可变区 (LCVR), 其中所述 HCVR 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 并且所述 LCVR 包含 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合如下表 (表 A) 所示:

表 A: 本发明抗体或其抗原结合片段中 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的示例性组合

组合	HCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(2)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:54
(3)	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(4)	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(5)	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(6)	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(7)	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(8)	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:53
(9)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
(10)	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
(11)	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
(12)	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
(13)	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:55
(14)	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:56
(15)	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:57
(16)	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:58
(17)	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:59
(18)	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:60
(19)	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:61

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 HCVR 和/或轻链可变区 LCVR, 其中,

(a) 重链可变区 HCVR

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;

和/或

(b) 轻链可变区 LCVR

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区（HCVR）和轻链可变区（LCVR），其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链可变区 HCVR 和轻链可变区 LCVR 的组合如下表（表 B）所示：

表 B：本发明抗体或其抗原结合片段中重链可变区 HCVR 和轻链可变区 LCVR 的示例性组合

组合	HCVR，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCVR，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:130
(2)	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:131
(3)	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:130
(4)	SEQ ID NO:108	SEQ ID NO:130
(5)	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:130
(6)	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:130
(7)	SEQ ID NO:111	SEQ ID NO:130
(8)	SEQ ID NO:112	SEQ ID NO:132
(9)	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:132
(10)	SEQ ID NO:114	SEQ ID NO:132
(11)	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:132
(12)	SEQ ID NO:116	SEQ ID NO:133
(13)	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:134
(14)	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:135
(15)	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:136
(16)	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:137
(17)	SEQ ID NO:120	SEQ ID NO:138

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链和/或轻链，其中

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链和轻链的组合如下表（表 C）所示：

表 C：本发明抗体或其抗原结合片段中重链和轻链的示例性组合

组合	重链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	轻链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:168
(2)	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:168
(3)	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:168
(4)	SEQ ID NO:141	SEQ ID NO:168
(5)	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:168
(6)	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:168
(7)	SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:168
(8)	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:168
(9)	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:168
(10)	SEQ ID NO:147	SEQ ID NO:168

(11)	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:168
(12)	SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:168
(13)	SEQ ID NO:150	SEQ ID NO:169
(14)	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:169
(15)	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:169
(16)	SEQ ID NO:153	SEQ ID NO:169
(17)	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:169
(18)	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:169
(19)	SEQ ID NO:156	SEQ ID NO:169
(20)	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:169
(21)	SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:170
(22)	SEQ ID NO:159	SEQ ID NO:170
(23)	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:171
(24)	SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:171
(25)	SEQ ID NO:162	SEQ ID NO:172
(26)	SEQ ID NO:163	SEQ ID NO:172
(27)	SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:173
(28)	SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:173
(29)	SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:174
(30)	SEQ ID NO:165	SEQ ID NO:174
(31)	SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:175
(32)	SEQ ID NO:167	SEQ ID NO:175
(33)	SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:176
(34)	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:176

在一些实施方案中，本发明抗 OX40 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列，例如 METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:182)。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在一些实施方案中，本发明的抗体能够结合 OX40 且较低地阻断 OX40 与其配体 OX40L 的结合。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段具有功能性 Fc 区。在一些实施方案中，功能性 Fc 区的效应子功能是 ADCC。在一些实施方案中，该 Fc 区是人 IgG1 的 Fc 区或人 IgG2 的 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段具有以下一个或多个特性：

(i)显示与表 5 所列的任一抗体对 OX40 (特别是人 OX40) 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；

(ii)抑制(例如，竞争性抑制)表 5 所列的任一抗体与 OX40(特别是人 OX40) 的结合；

(iii)与表 5 所示的任一抗体结合相同或重叠的表位；

(iv)与表 5 所示的任一抗体竞争结合 OX40 (特别是人 OX40)；

(v)具有表 5 所列的任一抗体分子的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体。在一些实施方案中,抗 OX40 抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗 OX40 抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗 OX40 抗体是人抗体。在一些实施方案中,至少部分的抗 OX40 抗体的框架序列是人共有框架序列。在一个实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体还涵盖其抗体片段,优选地选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

在某些实施方案中,抗 OX40 抗体分子处于双特异性或多特异性抗体分子形式。在一个实施方案中,双特异性抗体分子具有针对 OX40 的第一结合特异性和针对 PD-1、TIM-3、CEACAM(例如,CEACAM-1 和/或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2 的第二结合特异性。在一个实施方案中,双特异性抗体分子与 OX40 和 PD-1 结合。在另一个实施方案中,双特异性抗体分子与 OX40 和 PD-L1 结合。在又一个实施方案中,双特异性抗体分子与 OX40 和 PD-L2 结合。多特异性抗体分子可以具有任何针对前述分子的结合特异性的组合。多特异性抗体分子例如可以是三特异性抗体分子,其包含针对 OX40 的第一结合特异性和针对以下一种或多种的分子的第二及第三结合特异性: PD-1、TIM-3、CEACAM(例如、CEACAM-1 或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2。

在一方面,本发明提供了编码以上任何抗 OX40 抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中,提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。在一个实施方案中,提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞是原核的。

在一个实施方案中,本发明提供制备抗 OX40 抗体或其片段(优选的抗原结合片段)的方法,其中所述方法包含在适于表达编码所述抗体或其片段(优选的抗原结合片段)的核酸的条件下培养所述宿主细胞,以及任选地分离所述抗体或其片段(优选地抗原结合片段)。在某个实施方案中,所述方法还包括从宿主细胞回收抗 OX40 抗体或其片段(优选地抗原结合片段)。

在一些实施方案中,本发明提供了免疫缀合物,其包含本文中提供的任何抗 OX40 抗体和其它物质,例如细胞毒性剂。在一些实施方案中,所述免疫缀合物用于治疗癌症,优选地肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌、结肠癌等。

在一些实施方案中,本发明提供包含本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段(优选地其抗原结合片段)或其免疫缀合物的组合物,优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中,组合物,例如,药物组合物,包含本发明的抗 OX40 抗体或其片段或其免疫缀合物,以及一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、抗血管发生剂、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体)的组合。在一些实施方案中,所述药物组合物用于治疗癌

症, 优选地肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌、结肠癌等。在一方面中, 本发明涉及在受试者中活化 T 细胞或诱导 T 细胞介导的抗肿瘤活性或增强机体的免疫应答的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段、免疫缀合物或药物组合物。本发明还涉及本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段制备用于在受试者中活化 T 细胞或诱导 T 细胞介导的抗肿瘤活性或增强机体的免疫应答的组合物或药物的用途。

在另一方面中, 本发明涉及治疗受试者癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段、免疫缀合物或药物组合物。在一个实施方案中, 癌症是肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌、结肠癌等。在另一方面, 本发明还涉及本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段制备用于在受试者中治疗癌症的药物的用途。在一个实施方案中, 癌症是肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌、结肠癌等。

在一些实施方案中, 本文所述的方法还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。在一些实施方案中, 治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法。在一些实施方案中, 其它治疗剂选自化疗剂、PD-1 轴结合拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体)或者抗血管发生剂(例如贝伐珠单抗)。

在另一方面, 本发明还涉及本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段与 PD-1 轴结合拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体)组合在制备用于在受试者中治疗癌症的药物中的用途。在一个实施方案中, 癌症是肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌、结肠癌等。

在一些实施方案中, 受试者或个体是哺乳动物, 优选地人。

在一方面中, 本发明涉及检测样品中 OX40 的方法, 所述方法包括(a)将样品与本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段接触; 和(b)检测抗 OX40 抗体或其片段和 OX40 间的复合物的形成。在一个实施方案中, 抗 OX40 抗体是被可检测地标记的。

在一些实施方案中, 本发明涉及试剂盒或制品, 其包含本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段。在一些实施方案中, 所述试剂盒或制品包含本文所述的抗 OX40 抗体或其片段与任选的可药用辅料, 以及任选地一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、PD-1 轴结合拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体)或者抗血管发生剂(例如贝伐珠单抗))。在一些实施方案中, 该试剂盒或制品进一步包含关于施用药物来治疗癌症的说明书。

本发明还涵盖本文所述的任何实施方案的任意组合。本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有抗 OX40 抗体或其片段、方法和用途。

附图说明

图 1 显示了通过流式细胞术测定的在 CHO 细胞中产生的本发明的抗体随着浓度增加对 OX40L 与 CHO 细胞上表达的 OX40 的结合的阻断。

图 2 显示了用 PHA 加上在 CHO 细胞中产生的 IgG1 和 IgG2 形式的本发明的抗体活化的 PBMC 中 T 细胞活化时的 IL-2 分泌。

图 3 显示了通过抗-CD3 和抗-CD28 刺激加上在 CHO 细胞中产生的 IgG1 或 IgG2 形式的本发明的抗体，用人 OX40 和 NFkB 启动子-luc 稳定转染的 Jurkat 中的荧光素酶报告基因检测。

图 4 显示了通过抗-CD3 和抗-CD28 刺激加上在 CHO 细胞中产生的 IgG2 形式的本发明的抗体，用人 OX40 和 NFkB 启动子-luc 稳定转染的 Jurkat 中的荧光素酶报告基因检测。

图 5 显示了通过抗-CD3 和抗-CD28 刺激加上在 CHO 细胞中产生的 IgG1 或 IgG2 形式的本发明的抗体，用人 OX40 和 NFkB 启动子-luc 稳定转染的 Jurkat 中的荧光素酶报告基因检测,其中 Jurkat 与 Raji 细胞混合。

图 6 显示了通过抗-CD3 和抗-CD28 刺激加上在 CHO 细胞中产生的 IgG1 形式的本发明的抗体，用人 OX40 和 NFkB 启动子-luc 稳定转染的 Jurkat 中的荧光素酶报告基因检测,其中 Jurkat 与 Raji 细胞混合。

图 7 显示了用 SEE (1ng/ml) 和在 CHO 细胞中产生的 IgG1 或 IgG2 形式的本发明的 OX40 抗体的 DC 共培养测定法。

图 8 显示了通过抗-CD3 和抗-CD28 和重组 OX40L 刺激加上在 CHO 细胞中产生的本发明的 IgG1 或 IgG2 形式的抗体或对照(IgG4、Pogalizumab, OX40L), 混合 Raji 细胞后,在稳定转染了人 OX40 和 NFkB 启动子-luc 的 Jurkat 细胞中的荧光素酶报告基因检测。

图 9 显示了在 HEK293 细胞中产生的 IgG1 形式的本发明的抗体在基于荧光素酶报告基因中对表达人 OX40 的 CHO 细胞的 ADCC 活性。

图 10 显示了在 HEK293 细胞中产生的 IgG2 形式的本发明的抗体在基于荧光素酶报告基因中对表达人 OX40 的 CHO 细胞的 ADCC 活性。

图 11 显示了在 NOG 小鼠中给药在 CHO 细胞中产生的 IgG1 形式的本发明的 OX40 抗体 ADI-20112-g1 的 Hu-PBMC LoVo 肿瘤小鼠模型中个体小鼠的肿瘤生长曲线(其中每一条曲线代表一只小鼠的数据)。

图 12 显示了在 NOG 小鼠中给药在 CHO 细胞中产生的 IgG2 形式的本发明的 OX40 抗体 ADI-23515-g2 的 Hu-PBMC LoVo 肿瘤小鼠模型中个体小鼠的肿瘤生长曲线(其中每一条曲线代表一只小鼠的数据)。

图 13 显示了在 NOG 小鼠中给药在 CHO 细胞中产生的 IgG1 和 IgG2 形式的

本发明的 OX40 抗体 ADI-20112-g1 和 ADI-23515-g2 的 Hu-PBMC LoVo 肿瘤小鼠模型。显示了在肿瘤植入后第 28 天的最终肿瘤体积测量。

图 14 显示了在 NOG 小鼠中给药在 CHO 细胞中产生的 IgG1 和 IgG2 形式的本发明的 OX40 抗体 ADI-20112-g1 和 ADI-23515-g2 的 Hu-PBMC LoVo 肿瘤小鼠模型。显示了给药后小鼠体重变化。

图 15 显示了抗 OX40 抗体联合抗 PD-1 抗体在 MC38 荷瘤的 OX40 转基因小鼠中的药效研究。

发明详述

定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

“亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，在用于本文时，“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可用平衡解离常数(K_D)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量，包括现有技术已知以及本文中所描述的那些。

本文所用的术语“抗 OX40 抗体”、“抗 OX40”、“OX40 抗体”或“结合 OX40 的抗体”是指这样的抗体，所述抗体能够以足够的亲和力结合(人或食蟹猴)OX40 蛋白或其片段以致所述抗体可以用作靶向(人或食蟹猴)OX40 中的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，抗 OX40 抗体与非(人或食蟹猴)OX40 蛋白结合的程度低于所述抗体与(人或食蟹猴)OX40 结合的约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80% 或约 90% 或以上，如例如通过放射性免疫测定(RIA)或生物光干涉测定法或 MSD 测定法测量的。在一些实施方案中，抗 OX40 的抗体结合人或食蟹猴的 OX40 的平衡解离常数(K_D) $\leq 200\text{nM}$ ， $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 或 $\leq 1\text{nM}$ (例如 10^{-7}M 以下，例如 10^{-7}M 至 10^{-10}M ，例如 10^{-8}M 至 10^{-9}M)。

如本文所用，“单克隆抗体”或“mAb”指来源于例如真核生物的、原核生物的

或噬菌体克隆的单一拷贝或克隆的抗体，而不指其产生的方法。单克隆抗体或其抗原结合片段可以例如通过杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术例如 CDR 嫁接、或此类或其它本领域已知的技术的组合来产生。

“天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫化物键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端，每条重链具有一个可变区(VH)，又称作可变重域或重链可变域，接着是三个恒定域(CH1, CH2, 和 CH3)。类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个可变区(VL)，又称作可变轻域或轻链可变域，接着是一个恒定轻(CL)域。根据其恒定域氨基酸序列，抗体轻链可归入两种类型中的一种，称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。“天然序列 Fc 区”包含与在自然界中找到的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1 Fc 区(非 A 和 A 同种异型)；天然序列人 IgG2 Fc 区；天然序列人 IgG3 Fc 区；和天然序列人 IgG4 Fc 区；及其天然存在变体。

“抗体片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如 scFv)；单结构域抗体；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

如本文所用，术语“表位”指抗原(例如，OX40)中与抗体分子特异性相互作用的部分。这部分(本文中称作表位决定簇)一般包含元件如氨基酸侧链或糖侧链或是其组成部分。表位决定簇可以按照本领域已知的或本文公开的方法(例如，通过结晶学或通过氢-氘交换法)限定。抗体分子上与表位决定簇特异性相互作用的至少一个或某些部分一般位于 CDR 内。通常，表位具有特定的三维结构特征。通常，表位具有特定电荷特征。一些表位是线性表位，而另一些是构象表位。

与参照抗体“结合相同或重叠表位的抗体”是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50% 以上的所述参照抗体与其抗原的结合，反言之，参照抗体在竞争测定中阻断 50% 以上的该抗体与其抗原的结合。

与参照抗体竞争结合其抗原的抗体是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之，参照抗体在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253)。

抑制(例如竞争性抑制)参照抗体与其抗原的结合的抗体是指这样的抗体，其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之，参照抗体抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以亲和力(例如平衡解离常数)衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

与参照抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体是指这样的抗体，其能够具有参照抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

本领域已知五个主要类别的抗体：IgA，IgD，IgE，IgG 和 IgM，并且这些抗体中的数个可以进一步被划分为亚类(同种型)，例如，IgG₁，IgG₂，IgG₃，IgG₄，IgA₁ 和 IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α ， δ ， ϵ ， γ 和 μ 。本领域技术人员能够根据实际需要选择并获得合适类别的本发明的抗体。

“IgG 形式的抗体”是指抗体的重链恒定区所属于的 IgG 形式。所有同一型的抗体的重链恒定区都是相同的，不同型的抗体之间的重链恒定区不同。例如，IgG1 形式的抗体是指其重链恒定区 Ig 结构域为 IgG1 的 Ig 结构域。

术语“功能障碍”在免疫功能障碍的背景中指降低的对抗原性刺激的免疫响应性的状态。如本文中使用的，术语“功能障碍”还包括对抗原识别的不感受或不响应，特别地，将抗原识别转化成下游 T 细胞效应器功能，诸如增殖，细胞因子生成(例如 γ 干扰素)和/或靶细胞杀伤的能力受损。

本文所用的表述“较低地阻断人 OX40 与 OX40 配体/OX40L 的结合”意思是与已知的 OX40 抗体(例如 pogalizumab)或 OX40L 相比，本发明的抗体对 OX40 与 OX40L 的结合的阻断程度较低。在一些实施方案中，与存在已知的 OX40 抗体(例如 pogalizumab)或 OX40L 时 OX40 与 OX40L 的结合程度相比，存在本发明抗 OX40 抗体时 OX40 与 OX40L 的结合程度减少的较低。在一些实施方案中，与存在阴性对照(例如 IgG 抗体)时 OX40 与 OX40L 的结合程度相比，存在本发明抗 OX40 抗体时 OX40 与 OX40L 的结合程度的减少低于大约 50%、40%、30%、20%、10%或更少。在一些实施方案中，OX40 与 OX40L 的结合程度通过荧光素酶报告基因测定。在一些实施方案中，OX40 与 OX40L 的结合程度通过流式细胞术测定。

“活化 T 细胞”意指诱导，引起或刺激效应或记忆 T 细胞具有更新，持续或放大的生物学功能。增强 T 细胞功能的例子包括：相对于干预前的此类水平，升高的来自 CD8⁺效应 T 细胞的 γ -干扰素(例如 IFN γ)或白细胞介素(例如 IL-2)分泌，升高的来自 CD4⁺记忆和/或效应 T 细胞的 γ -干扰素(例如 IFN γ)或白细胞介素(例如 IL-2)分泌，升高的 CD4⁺效应和/或记忆 T 细胞增殖，升高的 CD8⁺效应 T 细胞增殖，升高的抗原响应性(例如清除)。在一个实施方案中，增强的水平是至少 50%，或者 60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、110 倍、120 倍、130 倍、140 倍、150 倍、160 倍或更高。测量此增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

“肿瘤免疫”指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。如此，作为治疗概念，肿瘤免疫在此类逃避减弱时得到“治疗”，并且肿瘤被免疫系统识别并攻击。肿瘤识别

的例子包括肿瘤结合，肿瘤收缩和肿瘤清除。

“免疫原性”指特定物质引发免疫应答的能力。肿瘤是免疫原性的，并且增强肿瘤免疫原性有助于通过免疫应答清除肿瘤细胞。

如本文中使用的，“抗体的激动剂活性”指抗体能活化它所结合的抗原的生物学活性。

“抗血管发生剂”指阻断或在某种程度上干扰血管发育的化合物。抗血管发生剂可以是例如结合涉及促进血管发生的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。在一个实施方案中，抗血管发生剂是结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体，诸如贝伐珠单抗(AVASTIN)。

术语“PD-1 轴结合拮抗剂”是指如下的分子，其抑制 PD-1 轴结合配偶与一种或多种它的结合配偶相互作用，从而去除源自 PD-1 信号传导轴上的信号传导的 T 细胞功能障碍-一项结果是恢复或增强 T 细胞功能(例如增殖，细胞因子生成，靶细胞杀伤)。如本文中使用的，PD-1 轴结合拮抗剂包括 PD-1 结合拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体)，PD-L1 结合拮抗剂(例如抗 PD-L1 抗体)和 PD-L2 结合拮抗剂(例如抗 PD-L2 抗体)。

术语“PD-1 结合拮抗剂”指如下的分子，其降低，阻断，抑制，消除或干扰源自 PD-1 与一种或多种它的结合配偶(诸如 PD-L1, PD-L2)相互作用的信号转导。在一些实施方案中，PD-1 结合拮抗剂是抑制 PD-1 结合一种或多种它的结合配偶的分子。在一个特定方面，PD-1 结合拮抗剂抑制 PD-1 结合 PD-L1 和/或 PD-L2。例如，PD-1 结合拮抗剂包括降低，阻断，抑制，消除或干扰源自 PD-1 与 PD-L1 和/或 PD-L2 相互作用的信号转导的抗 PD-1 抗体，其抗原结合片段，免疫粘附素，融合蛋白，寡肽和其它分子。在一个实施方案中，PD-1 结合拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-1 介导信号传导)，从而使得功能障碍性 T 细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中，PD-1 结合拮抗剂是抗 PD-1 抗体。在一个具体实施方案中，PD-1 结合拮抗剂是 WO2015/095423 中公开的 MDX-1106(nivolumab)、MK-3475(pembrolizumab)、CT-011(pidilizumab)或 AMP-224。

术语“PD-L1 结合拮抗剂”指如下的分子，其降低，阻断，抑制，消除或干扰源自 PD-L1 与一种或多种它的结合配偶(诸如 PD-1, B7-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中，PD-L1 结合拮抗剂是抑制 PD-L1 结合它的结合配偶的分子。在一个特定方面，PD-L1 结合拮抗剂抑制 PD-L1 结合 PD-1 和/或 B7-1。在一些实施方案中，PD-L1 结合拮抗剂包括降低，阻断，抑制，消除或干扰源自 PD-L1 与一种或多种它的结合配偶(诸如 PD-1, B7-1)相互作用的信号转导的抗 PD-L1 抗体，其抗原结合片段，免疫粘附素，融合蛋白，寡肽和其它分子。在一个实施方案中，PD-L1 结合拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-L1 介导信号传导)，从而使得功能障碍性 T 细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中，PD-L1

结合拮抗剂是抗 PD-L1 抗体。在一个具体方面,抗 PD-L1 抗体是 WO2015/095423 中公开的 YW243.55.S70、MDX-1105、MPDL3280A 或 MEDI4736。

术语“PD-L2 结合拮抗剂”指如下的分子,其降低,阻断,抑制,消除或干扰源自 PD-L2 与一种或多种它的结合配偶(诸如 PD-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中,PD-L2 结合拮抗剂是抑制 PD-L2 结合一种或多种它的结合配偶的分子。在一个特定方面,PD-L2 结合拮抗剂抑制 PD-L2 结合 PD-1。在一些实施方案中,PD-L2 拮抗剂包括降低,阻断,抑制,消除或干扰源自 PD-L2 与一种或多种它的结合配偶(诸如 PD-1)相互作用的信号转导的抗 PD-L2 抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白,寡肽和其它分子。在一个实施方案中,PD-L2 结合拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-L2 介导信号传导),从而使得功能障碍性 T 细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中,PD-L2 结合拮抗剂是免疫粘附素。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞(例如 NK 细胞,嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的 Fc 受体(FcR)上的分泌型免疫球蛋白使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞,只表达 FcγRIII, 而单核细胞表达 FcγRI, FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991)第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测定法,诸如美国专利 No.5,500,362 或 5,821,337 或美国专利 No.6,737,056(Presta)中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括 PBMC 和 NK 细胞。或者/另外,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes et al., *PNAS(USA)* 95:652-656(1998)中所披露的。本文实施例中提供了用于评估 ADCC 活性的一种例示性测定法。

如本文中使用的,术语“OX40”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物诸如灵长类(例如人、食蟹猴)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然 OX40,除非另有说明。该术语涵盖“全长”,未加工的 OX40 以及因细胞中的加工所致的任何形式的 OX40。该术语还涵盖 OX40 的天然发生变体,例如剪接变体或等位变体。

“OX40 活化”指 OX40 受体的活化。通常,OX40 活化导致信号转导。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂例子参见 WO2015/153513 中所公开的那些。

“化疗剂”包括在治疗癌症中有用的化学化合物。化疗剂的例子参见 WO2015/153513 中所公开的那些,包括厄洛替尼(erlotinib)(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), 硼替佐米(bortezomib)(VELCADE®, Millennium Pharm.), 双硫仑(disulfiram), 烷化剂类(alkylating agents), 诸如塞替派(thiotepa); 磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates); 氮丙啶类(aziridines)等; 及任何上述各项的药学可接受盐, 酸或衍生物。化疗剂还包括地塞米松(dexamethasone), 氢化可的松

(hydrocortisone)、干扰素, 贝伐珠单抗(bevacuzimab), 贝沙罗汀(bexarotene)等, 及其药学可接受盐。化疗剂还包括具有止痛, 退热和消炎效果的非类固醇消炎药。关于可以用于本发明的各种化疗剂的详细列举和介绍可以参见 PCT 国际申请 WO2015/153513 中公开的那些, 其以全文引入本文作为参考。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放, 作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子, 单核因子; 白介素(IL), 诸如 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; 肿瘤坏死因子, 诸如 TNF- α 或 TNF- β ; 及其它多肽因子, 包括 LIF 和 kit 配体(KL) 和 γ -干扰素。如本文中使用的, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物, 包括通过人工合成产生的小分子实体, 及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“双抗体(diabodies)”指具有两个抗原结合位点的抗体片段, 所述片段在相同的多肽链(VH-VL)中包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用因为太短而不能在相同链上的两个结构域之间配对的接头, 迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更充分地描述于例如 EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 等, Nat.Med.9: 129-134 (2003); 和 Hollinger 等, 美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90: 6444-6448(1993)中。三抗体和四抗体同样描述于 Hudson 等, Nat.Med. 9: 129-134(2003)中。

“功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的“效应器功能”。例示性的“效应器功能”包括 C1q 结合; CDC; Fc 受体结合; ADCC; 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体; BCR)下调等。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变域)联合, 而且可以使用多种测定法来评估, 例如本文所公开的那些。

“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的实例包括: C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC); Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调; 和 B 细胞活化。

“人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应器功能的白细胞。在某些实施方案中, 该细胞至少表达 Fc γ RIII 并行行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC), 天然杀伤(NK)细胞, 单核细胞, 细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞。效应细胞可以从其天然来源分离, 例如血液。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段这样的量或剂量, 其以单一或多次剂量施用患者后, 在治疗的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定: 诸如哺乳动物的物种; 它的大小、年龄和一般健康; 涉及的具体疾病; 疾病的程度或严重性; 个体患者的应答; 施用的具体抗体; 施用模式; 施用制剂的生物利用率特征; 选择的给药方案; 和任何伴随疗法的使用。

适用于本发明的“抗体及其抗原结合片段”包括但不限于多克隆、单克隆、单价、双特异性、异缀合性、多特异性、重组、异源、异源杂合、嵌合、人源化(特别是嫁接有 CDR 的)、去免疫的、或人的抗体、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、由 Fab 表达库产生的片段、Fd、Fv、二硫化物连接的 Fv(dsFv)、单链抗体(例如 scFv)、双抗体或四抗体(Holliger P. 等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90(14),6444-6448)、纳米抗体(nanobody)(也称为单结构域抗体)、抗独特型(抗 Id)抗体(包括例如针对本发明抗体的抗 Id 抗体)和上述任一种的表位结合片段。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域,所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在某些实施方案中,人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而,Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明,Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统,其也被称为 EU 索引,如在 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)。(参见,例如,Kindt 等 *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H.Freeman and Co.91 页(2007))。单个 VH 或 VL 结构域可以足以给予抗原结合特异性。此外,可以使用来自与特定抗原结合的抗体的 VH 或 VL 结构域来分离结合所述抗原的抗体,以分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库。参见,例如,Portolano 等, *J.Immunol.*150: 880-887(1993); Clarkson 等, *Nature* 352: 624-628(1991)。

“框架”或“FR”是指除高变区(HVR)(例如互补决定区)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的 FR 通常由四个 FR 结构域组成: FR1, FR2, FR3 和 FR4。因此,HVR 和 FR 序列通常出现在重链可变结构域(VH)(或轻链可变结构域(VL))的以下序列中: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中,各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定,所述指派系统包括例如:基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) *Nature* 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)) 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 4 版, U.S.

Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。本发明抗体的 CDR 可以由本领域的技术人员根据本领域的任何方案(例如不同的指派系统或组合)确定边界。

然而, 应该注意, 基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此, 在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时, 所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体, 其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列, 但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即, 针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。然而, 尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的, 但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种, 可以确定最小重叠区域, 从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了, 通过抗体的结构和蛋白折叠, 可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此, 本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如, 在一个 CDR 的变体中, 最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变, 而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

术语“宿主细胞”是指其中引入外源核酸的细胞, 包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”, 其包括初级转化的细胞和来源于其的后代, 而不考虑传代的数目。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同, 而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

“人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体, 所述氨基酸序列对应于这样抗体的氨基酸序列, 所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源, 其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“人共有框架”是指这样的框架, 即在选择人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列中, 其代表最常出现的氨基酸残基。一般而言, 对人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择是从可变结构域序列的亚型中选择。一般而言, 该序列的亚型是如 Kabat 等 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), 1-3 卷) 中公开的亚型。在一个实施方案中, 对于 VL, 该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 κI。在一个实施方案中, 对于 VH, 该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 III。

“人源化”抗体是指包含来自非人 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸

残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 HVR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，尿道癌，肝瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌，黑素瘤，浅表扩散性黑素瘤，恶性雀斑样痣黑素瘤，肢端黑素瘤，结节性黑素瘤，多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤，慢性淋巴细胞性白血病(CLL)，急性成淋巴细胞性白血病(ALL)，毛细胞性白血病，慢性成髓细胞性白血病，和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)，以及与癍痣病(phakomatoses)，水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖，脑瘤和脑癌，以及头颈癌，及相关转移。在某些实施方案中，适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌或结肠癌，包括那些癌症的转移性形式。

术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中，细胞增殖性病症指癌症。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”，“癌性”，“细胞增殖性病症”，“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

“免疫缀合物”是与一个或多个其它物质(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在本发明的一些实施方案中，个体或受试者是人。

“分离的”抗体是这样的抗体，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将抗体纯化至超过 95 % 或 99 % 纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述，参见，例如，Flatman 等，J.Chromatogr.B848: 79-87(2007)。

“分离的”核酸是指这样的核酸分子，其已经与其天然环境的组分分离。分离

的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

“分离的编码抗OX40抗体或其抗原结合片段的核酸”是指一个或多个核酸分子,其编码抗体重和轻链(或其片段),包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

相对于参比多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

当在本申请中提到序列同一性的百分比时,若未另外特别指出,这些百分比相对于较长序列的全长计算。相对于较长序列的全长计算适用于核酸序列和多肽序列两者。

术语“药物组合物”指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药用辅料”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂或媒介物。

用于本文时,“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称作“表达载体”。

“受试者/患者样品”指从癌症患者或癌症受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;血液或任何血液组分;体液,诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活检、细针吸出物、支气管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手术标本、循环中的肿瘤细胞、血清、血浆、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

本文所定义的试剂盒或制品中包含的“说明书”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书，其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症，用法，剂量，施用，联合疗法，禁忌症和/或警告的信息。

本发明的抗体

本发明因此提供了抗 OX40 抗体以及其片段。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。

在一些实施方案中，置换为保守性置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。示例性的置换如下表 D 所示：

表 D

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Glu; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段涵盖在轻链可变区、重链可变区、轻链或重链上具有翻译后修饰的抗体或其片段。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC) 功能(参见 Shield 等(2002)JBC277:26733)。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体，以便增强例如抗体治疗癌症或细胞增殖性疾病的有效性。Fc 区变体可包括在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明涵盖抗 OX40 抗体的片段。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如 scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有单一抗原结合位点，和残留的“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段，其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体是人源化抗体。用于使抗体人源化的不同方法是技术人员已知的，如由 Almagro&Fransson 综述的，其内容通过提述完整并入本文 (Almagro JC 和 Fransson J(2008)Frontiers inBioscience13:1619-1633)。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体是人抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于 van Dijk 和 van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol 5 : 368-74(2001) 以及 Lonberg, Curr.Opin.Immunol 20 : 450-459(2008)。

可通过在组合文库中筛选具有所需活性的抗体来分离本发明抗体。举例来说，本领域中已知多种用于产生噬菌体展示文库并且在这些文库中筛选具有所需结

合特征的抗体的方法。这些方法于例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178 : 1-37(O' Brien 等人编, 人 Press, Totowa, NJ, 2001) 中评述, 并且进一步于例如 McCafferty 等人, *Nature* 348 : 552-554 ; Clackson 等人, *Nature* 352 : 624-628(1991) ; Marks 等人, *J.Mol.Biol.* 222 : 581-597(1992) ; Marks 及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248 : 161-175(Lo 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003) ; Sidhu 等人, *J.Mol.Biol.* 338(2) : 299-310(2004) ; Lee 等人, *J.Mol.Biol.* 340(5) : 1073-1093(2004) ; Fellouse, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(34) : 12467-12472(2004) ; 以及 Lee 等人, *J.Immunol.Methods* 284(1-2) : 119-132(2004) 中描述。

在一些实施方案中, 本发明还涵盖与其它物质, 例如治疗性模块, 如细胞毒性剂或免疫抑制剂缀合的抗 OX40 单克隆抗体(“免疫缀合物”)。细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂。适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂(例如化疗剂)的例子是本领域中已知的, 参见例如 WO05/103081。例如, 细胞毒性剂包括但不限于: 放射性同位素(例如, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素); 化疗剂或药物(例如, 甲氨蝶呤(methotrexate), 阿霉素(adriamycin), 长春花生物碱(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine), 长春碱(vinblastine), 依托泊苷(etoposide)), 多柔比星(doxorubicin), 美法仑(melphalan), 丝裂霉素(mitomycin)C, 苯丁酸氮芥(chlorambucil), 柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂); 生长抑制剂; 酶及其片段如核酸水解酶; 抗生素; 毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素, 包括其片段和/或变体; 和已知的各种抗肿瘤或抗癌剂。在一个实施方案中, 细胞毒性剂是 PD-1 轴结合拮抗剂。在一个实施方案中, 细胞毒性剂是抗体, 例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。在一个实施方案中, 细胞毒性剂是抗血管发生剂, 例如贝伐珠单抗。

在一些实施方案中, 本发明的抗体可以是单特异性的、双特异性或多特异性的。多特异性单抗可以对一种靶多肽的不同表位是特异性的或可以含有对超过一种靶多肽具有特异性的抗原结合域。参见例如, Tutt 等(1991)*J.Immunol.* 147:60-69。抗 OX40 单抗可以与另一种功能性分子(例如另一种肽或蛋白质)连接或共表达。例如抗体或其片段可以功能性与一或多种其它分子, 如另一种抗体或抗体片段(例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体或所述抗体的片段)连接(例如通过化学偶联、遗传融合、非共价联合或以其它方式)以产生具有第二或更多结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面, 本发明提供了编码以上任何抗 OX40 抗体或其片段的核酸。所述核酸可以包含编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列的核酸, 或包含编码抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列的核酸。示例性的编码抗体重链可变区的核酸序列包括与选自 SEQ ID NO:91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104 或 105 的核酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列, 或者包括选自 SEQ ID

NO: 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104 或 105 的核酸序列。示例性的编码抗体轻链可变区的核酸序列包括与选自 SEQ ID NO:121、122、123、124、125、126、127、128 或 129 的核酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列，或者包括选自 SEQ ID NO:121、122、123、124、125、126、127、128、或 129 的核酸序列。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pTT5 表达载体。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，见，例如，美国专利号 5,648,237, 5,789,199 和 5,840,523，还见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248(B.K.C.Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页，其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见 Gerngross, *Nat.Biotech.*22: 1409-1414(2004)，和 Li 等, *Nat.Biotech.*24: 210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(293HEK 或 293 细胞，如例如 Graham 等, *J.Gen Virol.* 36 : 59(1977) 中所描述的) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞，包括 DHFR-CHO 细胞(Urlaub 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77 : 216(1980))；以及骨髓瘤细胞系如 Y0, NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

在一个实施方案中，提供了制备抗 OX40 抗体的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。为了重组产生抗 OX40 抗体，分离编码抗体(例如上文所描述的抗体)的核酸，并将其插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。

测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 OX40 抗体鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。一方面, 对本发明的抗体测试其抗原结合活性, 例如通过已知的方法诸如 ELISA, Western 印迹, 等来进行。可使用本领域已知方法来测定对 OX40 的结合, 本文中公开了例示性方法。在一些实施方案中, 使用生物光干涉测定法(例如 Fortebio 亲和测量)或 MSD 测定法。

另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与本文中公开的任何抗 OX40 抗体竞争对 OX40 的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与本文中公开的任何抗 OX40 抗体所结合表位相同或重叠的表位(例如线性或构象表位)。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法见 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press, Totowa, NJ)。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 OX40 抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合 OX40(例如结合人和/或食蟹猴 OX40), 提高 OX40 介导的信号转导(例如提高 NFkB 介导的转录), 通过 ADCC 消减表达人 OX40 的细胞, 增强 T 效应细胞功能(例如 CD4+效应 T 细胞)(例如通过提高效率 T 细胞增殖和/或提高效率 T 细胞的细胞因子生成(例如 γ 干扰素或白细胞介素)), 增强记忆 T 细胞功能(例如 CD4+记忆 T 细胞)(例如通过提高记忆 T 细胞增殖和/或提高记忆 T 细胞的细胞因子生成(例如 γ 干扰素或白细胞介素)), 结合人效应细胞。还提供在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

在某些实施方案中, 对本发明的抗体测试此类生物学活性。

可以使用本领域已知的方法来测定 T 细胞活化。例如, 通过 T 细胞活化后释放的细胞因子, 例如 γ 干扰素或白细胞介素的水平来测定。还可以使用本领域公知的方法来测定 OX40 信号传导, 从而测定 T 细胞的活化。在一个实施方案中, 生成表达人 OX40 和报告基因(包含融合至报告基因(例如 β 萤光素酶)的 NFkB 启动子)的转基因细胞。对细胞添加抗 OX40 抗体导致 NFkB 转录升高, 这使用针对报告基因的测定法(例如萤光素酶报告基因测定法)来检测。

供任何上述体外测定法使用的细胞包括天然表达 OX40 或经改造而表达 OX40 的细胞或细胞系。此类细胞包括天然表达 OX40 的活化后的 T 细胞, Treg 细胞和活化后的记忆 T 细胞。此类细胞还包括表达 OX40 的细胞系和并非正常情况下表达 OX40 但已经用编码 OX40 的核酸转染的细胞系。

可以理解的是, 能够使用本发明的免疫缀合物替换或补充抗 OX40 抗体来进行任何上述测定法。

可以理解的是, 能够使用抗 OX40 抗体和别的活性剂来进行任何上述测定法。

药物组合物和药物制剂

本发明还包括包含抗 OX40 抗体或其免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码抗 OX40 抗体的多核苷酸的组合物。在某些实施方案中,

组合物包含一种或多种结合 OX40 的抗体或其片段或一种或多种编码一种或多种结合 OX40 的抗体或其片段的多核苷酸。这些组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括那些具有石油、动物、植物或合成起源的，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体，特别是用于可注射溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C.Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。若期望的话，所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末、持续释放配制剂等形式。口服配制剂可以包含标准载体，如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 OX40 抗体与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编(1980)) 混合来制备包含本文所述的抗 OX40 抗体的药物制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号 6,267,958。水性抗体制剂包括美国专利号 6,171,586 和 WO2006/044908 中所述的那些，后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含一种或多种其它活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它抗癌活性成分，例如化疗剂、PD-1 轴结合拮抗剂（例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体）或者抗血管发生剂（例如贝伐珠单抗）。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

关于包含本发明抗体的药物制剂的其它组分，还可以参见 WO2015/153513 中公开的那些。

抗体的治疗方法和用途

在一方面中，本发明涉及在受试者中活化 T 细胞或诱导 T 细胞介导的抗肿瘤活性或增强机体的免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物，或药物组合物。

在另一方面中，本发明涉及治疗受试者肿瘤，例如癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物，或药物组合物。在一个实施方案中，癌症是肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌、结肠癌等。

在另一方面，本发明涉及在受试者中引起抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物，或药物组合物。

在另一方面，本发明涉及在受试者中治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和 T 细胞功能障碍性疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 OX40 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物，或药物组合物。

一些实施方案中，本文所述的方法还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法（例如治疗方式和/或其它治疗剂）。在一些实施方案中，治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法。在一些实施方案中，其它治疗剂选自化疗剂、PD-1 轴结合拮抗剂（例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体）或者抗血管发生剂（例如贝伐珠单抗）。

在一些实施方案中，受试者或个体是哺乳动物，优选是人。

在其他方面，本发明提供抗 OX40 抗体或其片段在生产或制备药物中的用途，所述药物用于治疗上文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体片段会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

在一些实施方案中，适用于本发明的癌症选自肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌、结肠癌等。

在一些实施方案中，癌症的例子进一步包括但不限于 B 细胞增殖性病症，其进一步包括但不限于淋巴瘤（例如 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)）和淋巴细胞性白血病。

在本发明的任何方法的一些实施方案中，本文所述的癌症展示人效应细胞（例如受到人效应细胞浸润）。用于检测人效应细胞的是方法本领域公知的，包括例如通过 IHC。在一些实施方案中，该癌症展示高水平的人效应细胞。在一些实施方案中，人效应细胞是 NK 细胞，巨噬细胞，单核细胞中的一项或多项。在本发明的任何方法的一些实施方案中，本文所述的癌症展示表达 FcR 的细胞（例如受到表达 FcR 的细胞浸润）。用于检测 FcR 的方法是本领域公知的，包括例如通过 IHC。在一些实施方案中，该癌症展示高水平的表达 FcR 的细胞。在一些实施方案中，FcR 是 FcγR。在一些实施方案中，FcR 是活化性 FcγR。在一些实施方案中，该癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)，成胶质细胞瘤，成神经细胞瘤，黑色素瘤，乳腺癌（例如三重阴性乳腺癌），胃癌，结直肠癌(CRC)，或肝细胞癌。

在本发明的任何方法的一些实施方案中，本发明的具有激动剂活性的抗 OX40 抗体或其片段的施用与肿瘤抗原的施用组合。在一些实施方案中，该肿瘤抗原包含蛋白质。在一些实施方案中，该肿瘤抗原包含核酸。在一些实施方案中，该肿瘤抗原是肿瘤细胞。

在某些实施方案中，本文所述的方法和用途还包括向所述个体施用一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。可以单独或与疗法中的其它治疗剂组合使用本发明的抗体。例如，可以与至少一种另外的治疗剂共施用本发明的抗体。

此类组合疗法涵盖组合施用(例如两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中)，和分开施用，在该情况中，可以在施用别的治疗剂和/或药剂之前，同时，和/或之后发生本发明的抗体的施用。在一个实施方案中，抗 OX40 抗体的施用和别的治疗剂的施用彼此在约一个月内，或约一，两或三周内，或约 1，2，3，4，5，或 6 天内发生。也可以与外科手术或放射疗法组合使用本发明的抗体。

在一些实施方案中，治疗方式包括外科手术(例如肿瘤切除术)；放射疗法(例如，外粒子束疗法，它涉及其中设计照射区域的三维适形放射疗法)、局部照射(例如，指向预选靶或器官的照射)或聚焦照射)等。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与化疗或化疗剂联合施用。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与放疗或放疗剂联合施用。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与靶向疗法或靶向治疗剂联合施用。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与免疫疗法或免疫治疗剂，例如单克隆抗体联合施用。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 PARP 抑制剂(例如 Olaparib, Rucaparib, Niraparib, Cediranib, BMN673, Veliparib)等联合施用。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 PD-1 轴结合拮抗剂联合施用。PD-1 轴结合拮抗剂包括但不限于 PD-1 结合拮抗剂，PD-L1 结合拮抗剂和 PD-L2 结合拮抗剂。"PD-1"的备选名称包括 CD279 和 SLEB2。"PD-L1"的备选名称包括 B7-H1, B7-4, CD274, 和 B7-H。"PD-L2"的备选名称包括 B7-DC, Btde, 和 CD273。在一些实施方案中，PD-1, PD-L1, 和 PD-L2 是人 PD-1, PD-L1 和 PD-L2。在一些实施方案中，PD-1 结合拮抗剂是抑制 PD-1 结合其配体或结合配偶的分子。在一个具体方面，PD-1 配体是 PD-L1 和/或 PD-L2。在另一个实施方案中，PD-L1 结合拮抗剂是抑制 PD-L1 结合其结合配偶的分子。在一个具体方面，PD-L1 结合配偶是 PD-1 和/或 B7-1。在另一个实施方案中，PD-L2 结合拮抗剂是抑制 PD-L2 结合其结合配偶的分子。在一个具体方面，PD-L2 结合配偶是 PD-1。拮抗剂可以是抗体，其抗原结合片段，免疫粘附素，融合蛋白，或寡肽。在一些实施方案中，PD-1 结合拮抗剂是抗 PD-1 抗体(例如人抗体，人源化抗体，或嵌合抗体)。在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体选自下组：MDX-1106(nivolumab, OPDIVO)，Merck 3475(MK-3475, pembrolizumab, 32

KEYTRUDA)和 CT-011(Pidilizumab)。在一些实施方案中, PD-1 结合拮抗剂是免疫粘附素(例如包含融合至恒定区(例如免疫球蛋白序列的 Fc 区)的, PD-L1 或 PD-L2 的胞外或 PD-1 结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中, PD-1 结合拮抗剂是 AMP-224。在一些实施方案中, PD-L1 结合拮抗剂是抗 PD-L1 抗体。在一些实施方案中, 抗 PD-L1 结合拮抗剂选自下组: YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI4736 和 MDX-1105。MDX-1105, 也称作 BMS-936559, 是 WO2007/005874 中记载的抗 PD-L1 抗体。抗体 YW243.55.S70(重和轻链可变区序列分别显示于 SEQ ID No.20 和 21)是 WO 2010/077634 A1 中记载的抗 PD-L1。MDX-1106, 也称作 MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 或 nivolumab, 是 WO2006/121168 中记载的抗 PD-1 抗体。Merck 3475, 也称作 MK-3475, SCH-900475 或 pembrolizumab, 是 WO2009/114335 中记载的抗 PD-1 抗体。CT-011, 也称作 hBAT, hBAT-1 或 pidilizumab, 是 WO2009/101611 中记载的抗 PD-1 抗体。AMP-224, 也称作 B7-DCIg, 是 WO2010/027827 和 WO2011/066342 中记载的 PD-L2-Fc 融合可溶性受体。在一些实施方案中, 抗 PD-1 抗体是 MDX-1106。"MDX-1106" 的备选名称包括 MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 或 nivolumab。在一些实施方案中, 抗 PD-1 抗体是 nivolumab(CAS 注册号: 946414-94-4)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与针对活化性共刺激分子的激动剂联合施用。在一些实施方案中, 活化性共刺激分子可包括 CD40, CD226, CD28, GITR, CD137, CD27, HVEM, 或 CD127。在一些实施方案中, 针对活化性共刺激分子的激动剂是结合 CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, 或 CD127 的激动性抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与针对抑制性共刺激分子的拮抗剂联合施用。在一些实施方案中, 抑制性共刺激分子可包括 CTLA-4(也称作 CD152), PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B, 或精氨酸酶。在一些实施方案中, 针对抑制性共刺激分子的拮抗剂是结合 CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3(例如 LAG-3-IgG 融合蛋白(IMP321)), B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B, 或精氨酸酶的拮抗性抗体。

在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与包含过继转移表达嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞(例如细胞毒性 T 细胞或 CTL)的治疗联合施用。

在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与血管发生抑制剂联合施用。在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗(也称作 AVASTIN®, Genentech)联合施用。

在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与血管发生抑制剂联合和与 PD-1 轴结合拮抗剂(例如 PD-1 结合拮抗剂诸如抗 PD-1 抗体, PD-L1 结合拮抗剂诸如抗 PD-L1 抗体, 和 PD-L2 结合拮抗剂诸如抗 PD-L2 抗体)联合施用。在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 PD-1 轴结合拮抗剂(例如 PD-1 结合拮抗剂诸如抗 PD-1 抗体, PD-L1 结合拮抗剂诸如抗 PD-L1 抗体, 和 PD-L2 结合拮抗剂诸如抗 PD-L2 抗体)联合施用。在一些实施方案中, 本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和

MDX-1106(nivolumab, OPDIVO)联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 Merck 3475(MK-3475, pembrolizumab, KEYTRUDA)联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 CT-011(Pidilizumab)联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 YW243.55.S70 联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 MPDL3280A 联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 MEDI4736 联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与贝伐珠单抗和 MDX-1105 联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与抗肿瘤剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 Bruton 氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制剂联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与奥奴珠单抗和 PD-1 轴结合拮抗剂(例如 PD-1 结合拮抗剂诸如抗 PD-1 抗体, PD-L1 结合拮抗剂诸如抗 PD-L1 抗体, 和 PD-L2 结合拮抗剂诸如抗 PD-L2 抗体)联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与癌症疫苗联合施用。在一些实施方案中,该癌症疫苗是肽癌症疫苗,其在一些实施方案中是个性化肽疫苗。在一些实施方案中,该肽癌症疫苗是多价长肽,多重肽,肽混合物,杂合肽,或经肽脉冲的树突细胞疫苗(参见例如 Yamada et al., Cancer Sci,104:14-21,2013)。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与佐剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与包含 TLR 激动剂,例如 Poly-ICLC(也称作 Hiltonol®), LPS, MPL, 或 CpG ODN 的治疗联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与肿瘤坏死因子(TNF) α 联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与白细胞介素(例如 IL-1、IL-10、IL-4、IL-13、IL-17 等)联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与靶向 CXCL10 的治疗联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与靶向 CCL5 的治疗联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 LFA-1 或 ICAM1 激动剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与选择蛋白激动剂联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 B-Raf 的抑制剂联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 B-Raf 的抑制剂(例如维罗非尼或 dabrafenib)和 MEK(例如 MEK1 和/或 MEK2)的抑制剂(例如 cobimetinib 或 trametinib)联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与 c-Met 的抑制剂

联合施用。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与选择性降解雌激素受体的药剂联合施用。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与放射疗法联合施用。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段可以与溶瘤病毒联合施用。

更多的可以与本发明的抗 OX40 抗体或其片段组合的疗法或治疗剂或药物或活性成分参见 WO2015/153513 中公开的那些。

上文记录的此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中)，和分开施用，在该情况中，可以在施用别的治疗剂和/或佐剂之前，同时，和/或之后发生本发明抗体的施用。也可以与放射疗法组合使用本发明抗体。

本发明的抗体(以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。

用于诊断和检测的方法和组合物

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗 OX40 抗体或其抗原结合片段可以用于检测 OX40 在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。

在一个实施方案中，提供用于诊断或检测方法的抗 OX40 抗体。在另一个方面中，提供检测 OX40 在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中，方法包含检测 OX40 蛋白在生物样品中的存在。在某些实施方案中，OX40 是人 OX40。在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 OX40 抗体在允许抗 OX40 抗体与 OX40 结合的条件下接触，并检测在抗 OX40 抗体和 OX40 之间是否形成复合物。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗 OX40 抗体被用于选择适合利用抗 OX40 抗体的治疗的受试者，例如其中 OX40 是用于

选择患者的生物标记物。

在一个实施方案中，可以使用本发明的抗体诊断癌症或肿瘤。

在某些实施方案中，提供标记的抗 OX40 抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于，放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ，荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰(dansyl)，伞形酮(umbelliferone)，荧光素酶(luciferase)，例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号 4,737,456)，荧光素，2, 3-二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶(HR)，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶解酶，糖类氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶(microperoxidase)，生物素/亲和素，自旋标记，噬菌体标记，稳定的自由基，等等。

在一个方面，本发明提供诊断方法，例如用于鉴定有可能响应抗 OX40 抗体治疗的癌症患者。

在一些实施方案中，提供用于鉴定有可能响应抗 OX40 抗体治疗的患者的方法或用于诊断癌症的方法，该方法包括(i)测定来自该患者的癌症样品中表达 FcR 的细胞的存在或缺失或量(例如每个给定样品尺寸中的数目)，(ii)若该样品包含表达 FcR 的细胞(例如高数目的表达 FcR 的细胞)，则将该患者鉴定为有可能响应，或将患者诊断为具有包含 FcR (例如高 FcR) 的癌症。用于检测表达 FcR 的细胞的方法是本领域公知的，包括例如 IHC。在一些实施方案中，FcR 是 Fc γ R。在一些实施方案中，FcR 是活化性 Fc γ R。在一些实施方案中，该癌症是本文中描述的任何癌症。在一些实施方案中，该癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)，成胶质细胞瘤，成神经细胞瘤，黑素瘤，乳腺癌(例如三重阴性乳腺癌)，胃癌，结直肠癌(CRC)，或肝细胞癌。在一些实施方案中，该方法是体外方法。

在一些实施方案中，提供用于鉴定有可能响应抗 OX40 抗体治疗的患者的方法或用于诊断癌症的方法，该方法包括(i)测定来自该患者的癌症样品中人效应细胞(例如浸润性效应细胞)的存在或缺失或量(例如每个给定样品尺寸中的数目)，并(ii)若该样品包含效应细胞(例如高数目的效应细胞)，则将该患者鉴定为有可能响应或将患者诊断为具有包含人效应细胞的癌症。用于检测浸润性人效应细胞的方法是本领域公知的，包括例如 IHC。在一些实施方案中，人效应细胞是 NK 细胞，巨噬细胞，单核细胞中的一项或多项。在一些实施方案中，该效应细胞表达活化性 Fc γ R。在一些实施方案中，该方法是体外方法。在一些实施方案中，该癌症是本文中描述的任何癌症。在一些实施方案中，该癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)，成胶质细胞瘤，成神经细胞瘤，黑素瘤，乳腺癌(例如三重阴性乳腺癌)，胃癌，结直肠癌(CRC)，或肝细胞癌。

在一些实施方案中，提供对癌症患者推荐治疗的方法，其包括上述用于鉴定

有可能响应抗 OX40 抗体治疗的患者的方法或用于诊断癌症的方法的步骤, 以及 (iii) 当样品具有表达 FcR 的细胞或具有人效应细胞, 推荐抗 OX40 抗体 (例如本发明的抗 OX40 抗体或其片段) 的治疗。

在一些实施方案中, 提供治疗癌症患者的方法, 其包括上述用于鉴定有可能响应抗 OX40 抗体治疗的患者的方法或用于诊断癌症的方法的步骤, 以及 (iii) 当样品具有表达 FcR 的细胞或具有人效应细胞, 用抗 OX40 抗体 (例如本发明的抗 OX40 抗体或其片段) 治疗该患者。

在本文中提供的任何发明的一些实施方案中, 样品是在用抗 OX40 抗体治疗之前获得的。在一些实施方案中, 样品是在用癌症药物治疗之前获得的。在一些实施方案中, 样品是在癌症已经转移之后获得的。在一些实施方案中, 样品是福尔马林固定、石蜡包膜 (FFPE) 的。在一些实施方案中, 样品是活检 (例如芯活检), 手术标本 (例如来自手术切除的标本), 或细针吸出物。

本发明示例性抗 OX40 抗体的序列

表 1 本发明示例性抗体重链可变结构域(VH) (或重链可变区(HCVR)) 的 FR 和 CDR 的序列

抗体编号	优化谱系	VH FR1	VH CDR1/HCDR1	VH FR2	VH CDR2/HCDR2	VH FR3	VH CDR3/HCDR3	VH FR4
ADI-2 0112	母本 抗体	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFSYGMH(S EQ ID NO:1)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VISYDGSNKYYA DSVKG(SEQ ID NO:17)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 0113	母本 抗体	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFSYGMH(S EQ ID NO:1)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VISYDGSNKYYA DSVKG(SEQ ID NO:17)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 5650	ADI- 20112	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFSVYNMH(SEQ ID NO:2)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VIA YDGS AKYYA DSVKG(SEQ ID NO:18)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 5651	ADI- 20112	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFSRNMH(S EQ ID NO:3)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VIA YDGS LKYYA DSVKG(SEQ ID NO:19)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 5652	ADI- 20112	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFVSYNMH(SEQ ID NO:4)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VIA YDGS VKYYA DSVKG(SEQ ID NO:20)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 5653	ADI- 20112	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFVSYNMH(SEQ ID NO:4)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	VIMYDGS AKYYA DSVKG(SEQ ID NO:21)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
ADI-2 5654	ADI- 20112	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG(SEQ ID NO:62)	FTFRSYDMH(SEQ ID NO:5)	WVRQAPGKGLE WVA(SEQ ID NO:183)	YIA YDGS NKYYA DSVKG(SEQ ID NO:22)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:68)	ARGRPWYSETG TSAFDI(SEQ ID NO:34)	WGQGTMTVSS(SEQ ID NO:86)
共有序列			FTFX1X2X3X4 MH(其中 X1 选 自 S, V, R; X2 选 自 V, S; X3 选自 Y, R; X4 选自		X1IX2YDGSX3KY YADSVKG(其中 X1 选自 V, Y; X2 选 自 S, A, M; X3 选自 N, A, L, V)(SEQ ID			

ADI-2 0078	母 本 抗体	QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSG(SEQ ID NO:63)	GSISGSYYW S(SEQ ID NO:7)	WIRQHPGKGLE WIG(SEQ ID NO:184)	YIYSGSTYYNPS LKS(SEQ ID NO:24)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDVGYPHY GMDV(SEQ ID NO:35)	WGQGTTLTVSS(S EQ ID NO:87)
ADI-2 3515	ADI- 20078	QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSG(SEQ ID NO:63)	GSIRSGAYYW S(SEQ ID NO:8)	WIRQHPGKGLE WIG(SEQ ID NO:184)	YIYYDGQTYNPNP SLKS(SEQ ID NO:25)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDVGYPHY GMDV(SEQ ID NO:35)	WGQGTTLTVSS(S EQ ID NO:87)
ADI-2 3518	ADI- 20078	QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSG(SEQ ID NO:63)	GSISGASYYW S(SEQ ID NO:9)	WIRQHPGKGLE WIG(SEQ ID NO:184)	YIYSGSTYYNPNP SLKS(SEQ ID NO:26)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDVGYPHY GMDV(SEQ ID NO:35)	WGQGTTLTVSS(S EQ ID NO:87)
ADI-2 3519	ADI- 20078	QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSG(SEQ ID NO:63)	GSISGSSYYWS (SEQ ID NO:10)	WIRQHPGKGLE WIG(SEQ ID NO:184)	YIYMSGSTYYNPNP SLKS(SEQ ID NO:27)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDVGYPHY GMDV(SEQ ID NO:35)	WGQGTTLTVSS(S EQ ID NO:87)
共有序 列			GSIXISGX2X3 YWS(X1 选 自 S,R;X2 选 自 S,A;X3 选 自 Y,S)(SEQ ID NO:11)		YIYX1X2GX3TYY NP SLKS(其中 X1 选 自 Y,M;X2 选 自 D,S;X3 选 自 S,Q,E)(SEQ ID NO:28)			
ADI-2 0048	母 本 抗体	QVQLQESGPGLVKPS TSLTCTVSG(SEQ ID NO:64)	GSISYYWS(S EQ ID NO:12)	WIRQPPGKGLEW IG(SEQ ID NO:185)	YIYSGSTNYNPS LKS(SEQ ID NO:29)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDAPGSSYQ DYMDV(SEQ ID NO:36)	WGKGTTLTVSS(S EQ ID NO:88)
ADI-2 0096	母 本 抗体	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASG(SEQ ID NO:65)	FTFSSYSMN(S EQ ID NO:13)	WVRQAPGKGLE WVS(SEQ ID NO:186)	SISSSNYIYADSD VKG(SEQ ID NO:30)	RFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYY C(SEQ ID NO:70)	ARGAPLGYSW EYFDL(SEQ ID NO:37)	WGRGTLTVSS(S EQ ID NO:89)
ADI-2 0051	母 本 抗体	QVQLQQWAGALLKP SETLSLTCAVYG(SEQ ID NO:66)	GSFSGYYWS(SEQ ID NO:14)	WIRQPPGKGLEW IG(SEQ ID NO:185)	EIDHSGSTNYNPS LKS(SEQ ID NO:31)	RVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDGGGYASP FDY(SEQ ID NO:38)	WGQGTTLTVSS(S EQ ID NO:90)
ADI-2	母 本	QLQLQESGPGLVKPS	GSISSSYYW	WIRQPPGKGLEW	SIYSGSTYYNPS	RVTISVDTSKNQFSL	ARDPGYASPN	WGQGTTLTVSS(S

0065	抗体	TLSLTCTVSG(SEQ ID NO:188)	G(SEQ ID NO:15)	IG(SEQ ID NO:185)	ID	LKS(SEQ ID NO:32)	ID	KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	WFDLP(SEQ ID NO:39)	EQ ID NO:90)
ADI-2 0066	母本抗体	QLQLQESGPGLVKPSL TLSLTCTVSG(SEQ ID NO:188)	GSISSSYYW G(SEQ ID NO:15)	WIRQPPGKGLEW IG(SEQ ID NO:185)	ID	SIYYSGSTYYNPS LKS(SEQ ID NO:32)	ID	RVTSVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYY C(SEQ ID NO:69)	ARDPGYASPN WFDLP(SEQ ID NO:39)	WGQGTLVTVSS(S EQ ID NO:90)
ADI-2 0118	母本抗体	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASG(SEQ ID NO:67)	YTFTSYAIS(S EQ ID NO:16)	WVRQAPGQGLE WMG(SEQ ID NO:187)	ID	WISAYNGNTNYA QKLQG(SEQ ID NO:33)	ID	RVMTMTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVY YC(SEQ ID NO:71)	ARSGGSGPN WFDLP(SEQ ID NO:40)	WGQGTLVTVSS(S EQ ID NO:90)

表 2 本发明示例性抗体轻链可变结构域(VL) (或轻链可变区(LCVR)) 的 FR 和 CDR 的序列

抗体 编号	优化 谱系	VL FR1	VL CDR1/LCDR1	VL FR2	VL CDR2/LCDR 2	VL FR3	VL CDR3/LCDR3	VL FR4
ADI-2011 2	母本 抗体	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTTTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-2011 3	母本 抗体	EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSC(SEQ ID NO:73)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:42)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	SASTRAT(SE Q ID NO:48)	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQ SEDFAVYYC(SEQ ID NO:81)	QQHNVYPPYT (SEQ ID NO:54)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-2565 0	ADI-2011 2	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTTTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-2565 1	ADI-2011 2	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTTTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-2565 2	ADI-2011 2	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTTTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-2565	ADI-2011	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTTTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)

3	ADI-25654	2	ADI-2011	DIQMTQSPSSLASVGD RVITTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFGSGSGTDFTLTISL QPEDIATYYC(SEQ ID NO:80)	QQSDHYPT(SE Q ID NO:53)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
4	ADI-20078	母本 抗体	ADI-2007	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSSYL A(SEQ ID NO:43)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQSERSPFT(S EQ ID NO:55)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
5	ADI-2351	ADI-20078	ADI-2007	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSSYL A(SEQ ID NO:43)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQSERSPFT(S EQ ID NO:55)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
6	ADI-23518	ADI-20078	ADI-2007	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSSYL A(SEQ ID NO:43)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQSERSPFT(S EQ ID NO:55)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
7	ADI-23519	ADI-20078	ADI-2007	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSSYL A(SEQ ID NO:43)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQSERSPFT(S EQ ID NO:55)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
8	ADI-20048	母本 抗体	ADI-2004	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:75)	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:44)	WFQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:79)	DASNRAT(S EQ ID NO:50)	GIPARFGSGSGTDFTLTISLLE PEDFAVYYC(SEQ ID NO:83)	QQAFSMPPT(S EQ ID NO:56)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
9	ADI-20096	母本 抗体	ADI-2009	DIQMTQSPSTLSASVGD RVITTC(SEQ ID NO:76)	RASQSISSWLA(SEQ ID NO:45)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASLES(SE Q ID NO:51)	GVPSRFGSGSGTEFTLTISL QPDDFAVYYC(SEQ ID NO:84)	QQFQSYST(S EQ ID NO:57)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
10	ADI-20051	母本 抗体	ADI-2005	EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSC(SEQ ID NO:73)	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:42)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASTRAT(S EQ ID NO:52)	GIPARFGSGSGTEFTLTISLQ SEDFAVYYC(SEQ ID NO:81)	QQYHAWPPT(SEQ ID NO:58)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
11	ADI-20065	母本 抗体	ADI-2006	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSSYL A(SEQ ID NO:43)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPDRFGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQFDSSTP(SE Q ID NO:59)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)

ADI-20066	母本抗体	EIVLTQSPGTLSPGER ATLSC(SEQ ID NO:74)	RASQSVSSFL A(SEQ ID NO:46)	WYQQKPGQAPRL LIY(SEQ ID NO:78)	GASSRAT(S EQ ID NO:49)	GIPIRFSGSGSDFTLTISRL EPEDFAVYYC(SEQ ID NO:82)	QQYDVFPIT(S EQ ID NO:60)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)
ADI-20118	母本抗体	DIQMTQSPSSLSASVGD RVITTC(SEQ ID NO:72)	QASQDISNYLN (SEQ ID NO:41)	WYQQKPGKAPKL LIY(SEQ ID NO:77)	DASNLET(S EQ ID NO:47)	GVPSRFSGSGSDFTFTISSL QPEDIAVYYC(SEQ ID NO:80)	QQPATLPWT(S EQ ID NO:61)	FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:85)

表3 本发明示例性抗体重链可变结构域 (VH) (或重链可变区(HCVR)) 的 DNA 和氨基酸序列

抗体编号	优化谱系	VH DNA 序列	VH 氨基酸序列
A DI-2011	母本抗体	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCGTATGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCGCTCTTGGTACAGCGAAACTGGTACCTCAGCTTTCGACATA TGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:91)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:106)
A DI-2011	母本抗体	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCGTATGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCGCTCTTGGTACAGCGAAACTGGTACCTCAGCTTTCGACATA TGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:91)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:106)
A DI-25650	DI-2011	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGTGTATATATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATAGCGTATGATGGAAGTGCAGAACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCGCTCTTGGTACAGCGAAACTGGTACCTCAGCTTTCGACAT ATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO:92)	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCAASGFTFSY NMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGSAKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:107)

A	DI	-25	65	1	2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGCCGGAATATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATAGCGTATGATGGAAGTCTTAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCCGTCTTGGTACAGCGAACTGGTACCTCAGCTTTCGACATA TGGGGTCAGGGTACAATGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:93)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSR NMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGSCLKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:108)
A	DI	-25	65	2	2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCGTGAGCTATAATATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATAGCGTATGATGGAAGTGTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCCGTCTTGGTACAGCGAACTGGTACCTCAGCTTTCGACAT ATGGGGTCAGGGTACAATGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:94)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSY NMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGSVKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:109)
A	DI	-25	65	3	2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCGTGAGCTATAATATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATAATGATGATGGAAGTGTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCCGTCTTGGTACAGCGAACTGGTACCTCAGCTTTCGACATA TGGGGTCAGGGTACAATGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:95)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSY NMHWVRQAPGKGLEWVAVIMYDGS AKYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(S EQ ID NO:110)
A	DI	-25	65	4	2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACTTCAGGAGCTATGATAIGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATAGCGTATGATGGAAGTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATCCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGCCGTCTTGGTACAGCGAACTGGTACCTCAGCTTTCGACATA TGGGGTCAGGGTACAATGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:96)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSY DMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGSNKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSS(SE Q ID NO:111)
A	母本抗体	-20	07	8		CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTAGCTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAAACCCGTCCCTCAAGAGTCG AGTTACCATATCAGTACACAGCTTAAGAACCAAGTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGTAGGATACCCACACTACTACGGAATGGACGTATGGGC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGSY YWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYSGSTYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DVGYPHYGYGMDVWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO:112)

		CAGGGAACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:97)			QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIRSGA YYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYDGGQTYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCA RDVGYPHYYGMDVWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:113)
A	DI	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCCGTAGTGGTGCTTACTAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACGATGGCAGACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAGTCG AGTTACCATATCAGTAGACACGTCCTAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGATAGGATACCCACACTACTACGGAATGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:98)	-20	51	
A	DI	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGCTAGTTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAGTCG AGTTACCATATCAGTAGACACGTCCTAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGATAGGATACCCACACTACTACGGAATGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:99)	-23	51	
A	DI	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGCTAGTTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAGTCG AGTTACCATATCAGTAGACACGTCCTAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGATAGGATACCCACACTACTACGGAATGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:100)	-20	8	
A	DI	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGTA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGCTAGTTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAG GGCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAGTCG AGTTACCATATCAGTAGACACGTCCTAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGATAGGATACCCACACTACTACGGAATGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:101)	-23	9	
A	母本抗	CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCAGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTACTAGTGGAGTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTG GAGTGGATTGGGTATATCTATAGTGGGAGCACCACCTACAAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAC CATATCAGTAGACACGTCACAGAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCCGAGACACG GCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATGCTCTGCGCGATCCTCTACCAGGACTACTACATGGACGTATG GGCAAGGGTACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:102)	-20	04	
A	母本抗	GAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACTCAGTAGCTATAGCATGAATGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAATTACATATACTACGACACTCAGTGAAAGGGCCGATTTC ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACA GGCAAGGGTACAACTGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:103)	-20	09	

6		CGGCGGTGTACTGCGCCAGAGGGGCCCTCTGGGATACAGCTGGGAGTACTTCGACCTATGGGGG AGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:102)	NO:117)
A	母	CAAGTACAATTACAACAGTGGGAGCTGGTTTATTAAAGCCTTCAGAACTTTAAGTTTGACCTGTGC TGTTTACGGTGGATCATTTCTGGTTATTAAGTGGATTCGTCACCAACCAAGGCAAAAGGATTGGA GTGGATCGGTGAGATAGACCATTCAGGCTCCACTAACTCAATCCAAGTTTAAATCCAGGGTTACTAT CTCCGTAGACACGTCCAAAGAACAGTTCTCCCTGAAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCGACACACGGCG GTGTAATACTGCGCCAGAGATGTTGGCGGAGGATACGCTTCCCCCTTCGACTATTGGGGACAGGGTAC ATTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:103)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY YWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGSTNYPNLSK RVTTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARD GGGGYASPFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:118)
A	母	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAG GGGCTGGAAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGAGACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCTCAAGAACAGTTCTCCCTGAAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATCCAGGATACAGGCTTCCCCCAATTGGTTGATCCATGG GGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:104)	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSGGSISSSY YWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYPNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCAR DPGYASPNWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:119)
A	母	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAG GGGCTGGAAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGAGACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCTCAAGAACAGTTCTCCCTGAAAGCTGAGTTCTGTGACCCGCGCAG ACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGATCCAGGATACAGGCTTCCCCCAATTGGTTGATCCATGG GGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:104)	QLQLQESGPGLVKLPSETLSLTCTVSGGSISSSY YWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYPNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCAR DPGYASPNWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:119)
A	母	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGCCTGGGGCTCAGTGAAAGTCTCCTGCA AGGCTTCTGGTTACACCTTTTACAGCTATGCCATCAGCTGGTGGCAGACAGGCCCTGGACAAAGGCTT GAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACATGGTAAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAG TCACCATGACACAGACACATCCACGACACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCTGAGATCTGACGA CACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGATCAGGAGGCGGACGCGGACCCCAATTGGTTTGTATCCATGGGA CAGGGTACATTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:105)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSY AISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNVAQK LQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CARSGGGSGPNWFDWPGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:120)

表4 本发明示例性抗体轻链可变结构域 (VL) (或轻链可变区(LCVR)) 的DNA序列和氨基酸序列

抗体编号	优化谱系	VL DNA 序列	VL 氨基酸序列
A DI-20 11 2	母本抗体	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG GCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGACACAGATTTTACT TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGTCAGCAGTCCCGATCACTACCCCTACTT TTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 121)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITY YCQQSDHYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)
A DI-20 11 3	母本抗体	GAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACACGACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCA TCTATAGCGCATCCACAGGGCCACTGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGACACAGATTCA CTCTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAAGTTTACTGTGTCAGCAGCACAATGTCTACCCCTCC TTACACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 122)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGI PARFSGSGSTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQHNVPYPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 131)
A DI-25 65 0	A DI-20 11 2	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG GCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGACACAGATTTTACT TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGTCAGCAGTCCCGATCACTACCCCTACTT TTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 121)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITY YCQQSDHYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)
A DI-25 65 1	A DI-20 11 2	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG GCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGACACAGATTTTACT TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGTCAGCAGTCCCGATCACTACCCCTACTT TTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 121)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITY YCQQSDHYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)
A DI-25 65 2	A DI-20 11 2	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG GCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGACACAGATTTTACT TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTGTCAGCAGTCCCGATCACTACCCCTACTT TTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 121)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITY YCQQSDHYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)
A	A	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAG	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDI

[illegible]

A	母本抗体	20048	GAAATGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTGACAGTACTTAGCCTGGTTCCAAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGGCAATCTCCATGCCTCCTA CTTTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA(SEQ ID NO:124)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWFQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYQC QAFSMPPTFGGGTKVEIK(SEQ NO:133)
A	母本抗体	20096	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTTGCCGG GCCAGTCAGAGTATTAGTACTGGTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TATGATGCCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGGCAACTTATTACTGCCAGCAGTTCCAAAAGTTACTCTTACA CTTTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA(SEQ ID NO:125)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG VPSRFSGSGTEFTLTITSSLPQDDFAITY CQQFQSYSYTFGGGTKEIK(SEQ NO:134)
A	母本抗体	20051	GAAATAGTATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCACAGGGCCACTGTGTATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGTACCACGCCTGGCCTCC TACTTTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA(SEQ ID NO:126)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATG IPARFSGSGGTFTLTITSSLSQSEDFAVYY CQQYHAWPPTFGGGTKVEIK(SEQ NO:135)
A	母本抗体	20065	GAAATGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCC TCAITCTAIGTGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGICTGGGACAGACT TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTTCGACAGCAGTC CTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA(SEQ ID NO:127)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG IPDRFSGSGGTDFLTITSLRLEPEDFAVYY CQQFDSSPTFGGGTKVEIK(SEQ NO:136)
A	母本抗体	20066	GAAATGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCC TCAITCTAIGTGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGICTGGGACAGACT TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTACGACGCTCTTCC CTATCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA(SEQ ID NO:128)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGGTDFLTITSLRLEPEDFAVYYC QQYDVFPITFGGGTKVEIK(SEQ NO:137)
A	母本抗体	2011	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGTCTGCACTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTTGCCAG GCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACCAAGGAAAGCCCTAAAGCTCCTGATC TACGATGCATCCAAATTTGGAACAACAGGGGTCCCATCAAGTTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACT TTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAAGCAGCCGCCACCTACCTTGGAA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFSGSGGTDFLTITSSLPQEDIATY YCQQPATLPWTFGGGTKEIK(SEQ ID

8	CTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAAA(SEQ ID NO:129)	NO:138)
---	---	---------

表5 本发明示例性抗体的重链和轻链序列

抗体编号	IgG形式	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
A	IgG1形式	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKKYYADSVKGRFTIS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQ ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYDASNLETGVPSPRFGSGSGTDF TFTISLQPEDIATYYCQQSDHYPT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:168)
D	IgG1形式	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST	
I-20	IgG1形式	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNT	
I-11	IgG1形式	KVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
I-2	IgG1形式	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP	
I-2011	IgG1形式	SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS	
I-2	IgG1形式	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:189)	
A	IgG2形式	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKKYYADSVKGRFTIS	
D	IgG2形式	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS	
I-20	IgG2形式	ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDDHKPSNT	
I-11	IgG2形式	KVDKTVRKKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	
I-2	IgG2形式	NAKTKPREEQFNSTFRVVSGLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	
I-2011	IgG2形式	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM	
I-2	IgG2形式	HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:139)	
A	IgG1形式	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYNNMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKKYYADSVKGRFTIS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCQ ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYDASNLETGVPSPRFGSGSGTDF TFTISLQPEDIATYYCQQSDHYPT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:168)
D	IgG1形式	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST	
I-20	IgG1形式	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNT	
I-11	IgG1形式	KVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
I-25	IgG1形式	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP	
I-65	IgG1形式	SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS	
I-0	IgG1形式	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:140)	
A	IgG2形式	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYNNMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKKYYADSVKGRFTIS	
D	IgG2形式	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST	
I-25	IgG2形式	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNT	
I-65	IgG2形式	KVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
I-0	IgG2形式	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP	
I-2565	IgG2形式	SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS	
I-0	IgG2形式	VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:140)	
IgG2	IgG2形式	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYNNMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKKYYADSVKGRFTIS	

形式 的 ADI- 2565 0	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTVVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:141)
A D I- 25 65 1	IgG1 形式 的 ADI- 2565 1 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRRNMHWVRQAPGKGLEWVAIAVDGSLKYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:142)
IgG2 形式 的 ADI- 2565 1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRRNMHWVRQAPGKGLEWVAIAVDGSLKYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTVVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:143)
A D I- 25 65 2	IgG1 形式 的 ADI- 2565 2 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVSNMHWVRQAPGKGLEWVAIAVDGSVKYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:144)
IgG2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVSNMHWVRQAPGKGLEWVAIAVDGSVKYADSVKGRFTIS

形式 的 ADI- 2565 2	RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTVVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMQLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:145)
A D I- 25 65 3	IgG1 形式 的 ADI- 2565 3 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFVSYNMHWVRQAPGKGLEWVAVIMYDGS AKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:146)
IgG2 形式 的 ADI- 2565 3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFVSYNMHWVRQAPGKGLEWVAVIMYDGS AKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTVVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMQLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:147)
A D I- 25 65 4	IgG1 形式 的 ADI- 2565 4 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGS NKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:148)
IgG2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGS NKYYADSVKGRFTIS

形式 的 ADI- 2565 4	RDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTVKCCVCEPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDVLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:149)	
A D I- 20 07 8	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDK KAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:150)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPKGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTI SRLEPEDFAVYYCQQSERSPFT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSITLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:169)
IgG2 形式 的 ADI- 2007 8	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKT VERKCCVCEPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:151)	
A D I- 23 51 5	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYDGQTYYNPDLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVD KKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:152)	
IgG2 形式	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYDGQTYYNPDLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA	

	的 ADI- 2351 5	ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDK TVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:153)
A D I- 23 51 8	IgG1 形式 的	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGASYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYSGETYYPNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK KAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:154)
	IgG2 形式 的 ADI- 2351 8	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGASYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYSGETYYPNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKT PREEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:155)
A D I- 23 51 9	IgG1 形式 的	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSSYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYMSGETYYNPISLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK KAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:156)
	IgG2 形式	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSSYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYMSGETYYNPISLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARDVGYPHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA

	的 ADI- 2351 9	LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNATK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:157)	
A D I- 20 04 8	IgG1 形式 的 ADI- 2004 8	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAAYYCARDAPGGSSYQDYIMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK AEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:158)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWFQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQAFAFMPPTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:170)
	IgG2 形式 的 ADI- 2004 8	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSK NQFSLKLSVTAADTAAYYCARDAPGGSSYQDYIMDVWGKGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPAPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNATK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:159)	
A D I- 20 09 6	IgG1 形式 的 ADI- 2009 6	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSNYYIYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPLGYSWEYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK KAEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:160)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCR ASQISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYDASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFTATYYCQQFQSY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:171)
	IgG2 形式	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSNYYIYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPLGYSWEYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA	

的 ADI- 2009 6	ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDK TVERKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKKVSNNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:161)	
A D I- 20 05 1	IgG1 形式 的 ADI- 2005 1	QVQLQQWGAAGLLKPSETLSLTCAVYGGSGSYYSWIRQPPGKGLWGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTVITISVDI SKNQFSLKLSVTAADTAAYYCARDGGGYSAPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKA EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:162)
	IgG2 形式 的 ADI- 2005 1	QVQLQQWGAAGLLKPSETLSLTCAVYGGSGSYYSWIRQPPGKGLWGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTVITISVDI SKNQFSLKLSVTAADTAAYYCARDGGGYSAPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV RKCCVECPAPPAVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKT EEQFNSTFRVVSIVLVHQQDWLNGKEYCKKVSNNKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPG(SEQ ID NO:163)
A D I- 20 06 5	IgG1 形式 的 ADI- 2006 5	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYSWIRQPPGKGLWIGSIYSGSTYYNPSLKSRTVITISVDI SKNQFSLKLSVTAADTAAYYCARDPGYSASPWFDPWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKA EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:164)
	IgG2 形式 的	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYSWIRQPPGKGLWIGSIYSGSTYYNPSLKSRTVITISVDI SKNQFSLKLSVTAADTAAYYCARDPGYSASPWFDPWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQYHAWPP TFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C(SEQ ID NO:172)
		EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQQEDSSPTF GGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KSTYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(S EQ ID NO:173)

ADI- 2006 5	ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:165)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLPEDEFAVYYCQQYDVFPI FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:174)
A D I- 20 06 6	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNPSSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDPGYSASPWNWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKA EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:164)	
IgG2 形式 的 ADI- 2006 6	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNPSSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDPGYSASPWNWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHDKPSNTKVDKTV ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:165)	
A D I- 20 11 8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYAISWVRQAPGQGLEWMGMWISAYNGNTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGGGGSGPNWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVD KKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:166)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQ ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TFTISLQPEDIAIYYCQQPATLPW TFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C(SEQ ID NO:175)
IgG2 形式 的 ADI- 2011 8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYAISWVRQAPGQGLEWMGMWISAYNGNTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSGGGGSGPNWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHDKPSNTKVD KTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVVDGVEVHNAK	

	2011 8	TKPRREEQNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKKVSNGKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKLSLSLSPG(SEQ ID NO:167)	
A D I- 20 11 3	IgG1 形式 的 ADI- 2011 3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKEYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNT KVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNGKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(SEQ ID NO:189)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLL IYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCQQHNVYPP YTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC(SEQ ID NO:176)
	IgG2 形式 的 ADI- 2011 3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVSYDGSNKEYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPWYSETGTSAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNT KVDKTKVERKCCVECPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKKVSNGKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKLSLSLSPGK(SEQ ID NO:139)	

表 6 本发明示例性信号肽序列

METDTLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO:182)

表 7 本发明实施例中所用的部分抗体对照的轻链和重链序列

IgG1 重链	MGWSLILFLVAVATRVLSEVRLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVAISGGSGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNGKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK(SEQ ID NO:177)
IgG4	MGWSLILFLVAVATRVLSEVRLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPGKGLEWVAISGGSGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMN

重链	SLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK(SEQ ID NO:178)
IgG1&IgG4 轻链	MDFQVQIISFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQADLPFAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:179)
IgG2 重链	MGWSLILFLVAATRVLSQLQLQKSGPGLVKPSETLSLTCTVSGFTFSNYAMGWIRQPPGKGLEWIGAISGSGGSTYYADSVKGRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:180)
IgG2 轻链	MDFQVQIISFLLISASVIMSRGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLNWYQQKPGQAPRLLIYAASSLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQADLPFAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:181)

本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图(附图简述紧随其后)和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明,然而,应理解实施例以说明而非限定的方式来描述,并且本领域技术人员可以进行多种修改。

实施例

实施例 1. 抗 OX40 抗体以及对照抗体的生产和纯化

通过 Adimab 抗体平台鉴定了抗 OX40 抗体。文库和它们在筛选过程中的使用参见,例如 Xu 等人, 2013; WO2009036379; WO 2010105256; W02012009568。

在酵母或 CHO-S 细胞或 293HEK 细胞中表达并且纯化本发明的如下抗 OX40 抗体:

抗体名称
ADI-20112
ADI-25650 (ADI-20112 后代)
ADI-25651 (ADI-20112 后代)
ADI-25652 (ADI-20112 后代)
ADI-25653 (ADI-20112 后代)
ADI-25654 (ADI-20112 后代)
ADI-20078
ADI-23515 (ADI-20078 后代)
ADI-23518 (ADI-20078 后代)
ADI-23519 (ADI-20078 后代)
ADI-20048
ADI-20096
ADI-20051
ADI-20065
ADI-20066
ADI-20118
ADI-20113

在 293HEK 细胞中表达并且纯化实施例中使用的下述对照抗体：

对照抗体
pogalizumab
Hu106-222
11D4
tavolixizumab

如本文所用，pogalizumab 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人 IgG1 OX40 抗体，其利用来自建议的 INN：列表 114（参见 <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/PL114.pdf>）的重链和轻链序列。如本文所用，Hu106-222 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人源化 IgG1 OX40 抗体，其利用来自美国专利 US9006399 的重链和轻链序列。如本文所用，11D4 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人源化 IgG1 OX40 抗体，其利用来自美国专利 US8236930 的重链和轻链序列。如本文所用，tavolixizumab 是在 293 HEK 细胞中瞬时表达的人源化 IgG1 OX40 抗体，其利用来自建议的 INN：列表 115（参见 <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/PL115.pdf>）的重链和轻链序列。

对于酵母材料的处理：

使酵母克隆生长至饱和，然后在 30℃ 下振荡诱导 48 小时。诱导后，将酵母细胞沉淀并收获上清液用于纯化。使用蛋白 A 柱纯化 IgG 并用乙酸（PH 2.0）洗脱。通过木瓜蛋白酶消化产生 Fab 片段并通过 KappaSelect（GE Healthcare LifeSciences）纯化。

对于 CHO-S 细胞的处理：

根据制造商的说明书使用 Freedom® CHO-S®试剂盒（Invitrogen）产生表达 CHO-S 细胞系。对于 mAb 表达，将重链和轻链的 DNA 序列插入到 pCHO1.0 质粒中，其中重链在轻链的上游。将全长人 OX40 CDS 序列（购自 Sino Biological）插入到 pCHO1.0 载体中用于产生稳定的过表达细胞系。

对于 293HEK 细胞的处理

对于 293HEK 细胞中蛋白的瞬时表达，使用载体 pTT5，其中抗体的重链和轻链克隆到单独的载体中。使用标准步骤用 PEI 进行到 293HEK 细胞的转染；在培养 7 天后收集上清液，并在 AKTA 系统（GE）上纯化。

实施例 2：抗 OX40 抗体的结合动力学和亲和力测定

采用 MSD-SET 和生物光干涉测量（ForteBio）测定法测定本发明抗体结合人 OX40 的动力学和平衡解离常数（KD）。

1. ForteBio KD 测定 (生物光干涉法)

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): p. 270-8) 进行。简言之, 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30 分钟, 然后线上检测 60 秒建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 AHQ 传感器 (ForteBio) 上进行 ForteBio 亲和测量。再将具有加载的抗体的传感器暴露于 100 nM 的 OX40 抗原中作用 5 分钟, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离 5 分钟用于解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

在如以上测定法所述进行的实验中, ADI-20051、ADI-20065、ADI-20066、ADI-20078、ADI-20112、ADI-20113 和 ADI-20118 (由酵母中表达的 IgG1 形式的抗 OX40 抗体的 Fab 形式) 在亚微摩尔范围内以单价 K_D 结合人 OX40_Fc (结合了抗体 Fc 部分的人 OX40, 购自 R&D Systems)。当抗体在传感器尖端上时, ADI-20048、ADI-20051、ADI-20065、ADI-20066、ADI-20078、ADI-20096、ADI-20112、ADI-20113 和 ADI-20118 (以 IgG1 形式且在酵母中表达的抗 OX40 抗体) 在个位数的纳摩尔至更低的范围以双价结合的 K_D 值结合人 OX40_Fc (购自 R&D Systems), 以两位数的纳摩尔或更低的范围结合食蟹猴 OX40_Fc (购自 Acro Biosystems)。当抗体在传感器尖端上时, ADI-20048、ADI-20078 和 ADI-20096 (以 IgG1 形式且在酵母中表达的抗 OX40 抗体) 以个位数的纳摩尔值结合小鼠 OX40_Fc (购自 Acro Biosystems) (表 8)。

表 8: 通过生物光干涉测量 IgG1 形式的本发明抗体的结合

抗体	ForteBio 影像: 人 OX40-Fc 在 AHQ 尖端上, Fab 形式的抗体 在溶液中 (200 nM) [单价的]	ForteBio 影像: IgG1 形式 的抗体在 AHQ 尖端上, 人 OX40-Fc 溶液中 (50 nM) [双价的]	ForteBio 影像: IgG1 形式 的抗体在 AHQ 尖端 上, 食蟹猴 OX40-Fc 在溶 液中 (100 nM) [双价的]	ForteBio 影像: IgG1 形式 的抗体在 AHQ 尖端 上, 小鼠 OX40-Fc 在溶 液中 (100 nM) [双价的]
Hu106-222	1.53E-08	2.50E-10	4.96E-09	N.B.
ADI-20048	N.B.	3.68E-09	9.86E-09	3.76E-09
ADI-20051	2.58E-08	7.40E-10	1.18E-08	N.B.
ADI-20065	1.08E-08	3.52E-10	5.77E-09	N.B.
ADI-20066	2.18E-08	9.10E-10	1.43E-08	N.B.
ADI-20078	1.99E-07	1.08E-09	3.35E-09	9.17E-09
ADI-20096	N.B.	3.36E-09	N.B.	5.41E-09
ADI-20112	7.06E-08	7.35E-10	5.98E-09	N.B.
ADI-20113	1.82E-07	1.22E-09	5.52E-09	N.B.
ADI-20118	1.37E-07	5.10E-10	1.14E-08	N.B.

在 ADI-20112 和 ADI-20078 的亲合力成熟后,其后代 ADI-25650、ADI-25651、ADI-25652、ADI-25653、ADI-25654、ADI-23515、ADI-23518 和 ADI-23519 显示改善的单价结合,这由当结合传感器芯片上的人 OX40_Fc 时,由酵母中表达的 IgG1 产生的 Fab 形式的抗体的 K_D 值显示;当以 IgG1 形式且在酵母中表达的抗体在传感器尖端上时,结合溶液中的人 OX40_Fc 的二价结合的结合亲和力改善;当以 IgG1 形式且在酵母中表达的抗体在传感器尖端上时,结合溶液中的食蟹猴 OX40_Fc 的结合亲和力改善(表 9)。

表 9: 通过生物光干涉测量 IgG1 形式的本发明亲和力成熟的抗体的结合

抗体	ForteBio 影像: 人 OX40-Fc 在 AHQ 尖端上, Fab 形式的抗体 在溶液中 (200 nM) [单价的]	ForteBio 影像: IgG1 形 式的抗体在 AHQ 尖端上, 人 OX40-Fc 溶 液 中 (50 nM) [双价的]	ForteBio 影 像: IgG1 形 式的抗体在 AHQ 尖 端 上, 食蟹猴 OX40-Fc 在溶 液 中 (100 nM) [双价 的]	ForteBio 影像: IgG1 形式的抗 体在 AHQ 尖端 上, 小鼠 OX40-Fc 在溶 液 中 (100 nM) [双价的]
11D4	2.80E-08	6.13E-10	5.95E-09	N.B.
Hu106-222	1.30E-08	4.75E-10	5.17E-09	N.B.
ADI-20112	6.39E-08	7.75E-10	6.82E-09	N.B.
ADI-25650	1.04E-09	2.30E-10	1.60E-09	N.B.
ADI-25651	2.32E-09	2.68E-10	1.37E-09	N.B.
ADI-25652	1.31E-09	2.61E-10	2.11E-09	N.B.
ADI-25653	1.63E-09	2.23E-10	1.15E-09	N.B.
ADI-25654	1.80E-09	2.83E-10	1.53E-09	N.B.
ADI-20078	9.80E-08	1.49E-09	2.85E-09	8.06E-09
ADI-23515	3.79E-09	2.73E-10	1.09E-09	8.98E-09
ADI-23518	7.16E-09	2.97E-10	1.08E-09	P.F.
ADI-23519	5.36E-09	2.55E-10	1.10E-09	P.F.

2. MSD-SET 动力学检测

平衡亲和力的检测参见 Estep, P.等人, MAbs, 2013. 5(2): p. 270-8。在 PBS + 0.1% 不含 IgG 的 BSA (PBSF) 中进行溶液平衡滴定 (SET), 其中抗原 (biotin-OX-40 单体(生物素化的 OX-40,

购自 Acro Biosystems) 保持恒定在 10-100pM, 并与以 5-100 nM 起始以 3 至 5 倍连续稀释的 Fab 或 mAb 孵育 (实验条件是样品依赖性的)。将在 PBS 中以 20nM 稀释的抗体在 4°C 或在室温下过夜包被在标准结合 MSD-ECL 板 (Multi-array 96-孔平板, 货号 #:L15XA-3, <https://www.mesoscale.com/en/products/l15xa-3/>) 上, 持续 30 分钟。将板用 BSA 封闭 30 分钟, 同时以 700rpm 振荡。然后将板用洗涤缓冲液 (PBSF + 0.05 % Tween 20) 洗涤 3 次。施加 SET 样品并在 700rpm 振荡、在板上孵育 150s, 然后洗涤一次。通过用 PBSF 中 250ng/mL 磺基标记的链霉亲和素在板上孵育 3 分钟检测板上捕获的抗原。将板用洗涤缓冲液洗涤三次, 然后使用具有表面活性剂的 1x Read Buffer T (货号 #:R92TC-1 <https://www.mesoscale.com/en/products/r92tc-1/>) 在 MSD Sector Imager 2400 仪器上读数。将游离抗原的百分比作为滴定抗体的函数在 Prism 中作图, 并拟合二次方程式以提取 K_D 。为了提高处理量, 液体处理机器人被用于整个 MSD-SET 实验, 包括 SET 样品制备。

在如以上测定法所述进行的实验中, IgG1 形式且在酵母中表达的 ADI-25650, ADI-25651, ADI-25652, ADI-25653, ADI-25654, ADI-23515 和 ADI-23519 的 Fab 形式以可检测的亚纳摩尔单价 K_D 值结合人 OX40 (表 10)。

表 10: IgG1 形式的本发明抗体的 MSD 结合

抗体	MSD KD (M) 与抗体 Fab 孵育的人生物素化的 OX40-His 单体
11D4	N.D.
Hu106-222	N.D.
ADI-20112	N.D.
ADI-25650	1.40E-10
ADI-25651	1.70E-10
ADI-25652	1.50E-10
ADI-25653	8.60E-11
ADI-25654	1.80E-10
ADI-20078	N.D.
ADI-23515	1.60E-10
ADI-23518	N.D.

实施例 3: 本发明抗 OX40 抗体与人 OX40 的结合

可以在基于流式细胞术的测定法中测量本发明的抗体与人 OX40 的结合。

1. 与 CHO 细胞上的人 OX40 的结合

通过转染带有克隆到 MCS 的人 OX40 cDNA (Sino Biological, HG10481-G) 的 pCHO1.0

载体 (Invitrogen) 产生过表达人 OX40 的 CHO 细胞 (CHO-hOX40 细胞)。将 CHO-hOX40 细胞 (0.2×10^6 个细胞) 与 100nM 的实验抗体在 PBS 0.1% BSA 中在冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次, 并与二抗 (PE 标记的, SouthernBiotech, 终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$) 在 PBS 0.1% BSA 中在冰上 (避光) 孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。在 Canto II 系统 (BD Biosciences) 上进行流式细胞术, 并相应地计算 MFI。

在如以上测定法所述进行的实验中, ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118 (IgG1 形式, 在酵母中表达) 结合 CHO 细胞上过表达的 OX40, 与染色的野生型 CHO 细胞相比, MFI 值 > 1000 倍差异 (表 11)。

表 11: 流式细胞术测定的酵母中产生的 IgG1 形式本发明的抗体与表达人 OX40 的 CHO 细胞的结合

抗体	CHO 结合强度 (MFI)	CHO-OX40 结合强度 (MFI)	差异倍数
Hu106-222	62.48	164239.15	2628.66757362356
ADI-20048	97.8	143461.23	1466.88374233129
ADI-20051	96.17	151191.75	1572.1300821462
ADI-20065	70.1	157294.81	2243.86319543509
ADI-20066	58.39	160635.77	2751.08357595479
ADI-20078	122.4	141543.26	1156.39918300654
ADI-20096	67.67	133399.72	1971.32732377715
ADI-20112	63.68	153432.17	2409.42478015075
ADI-20113	61.79	151897.05	2458.27884770999
ADI-20118	77.18	143967.03	1865.34115055714

在如以上测试法所述进行的实验中, ADI-20112 和 ADI-20078 亲和力成熟后, 其后代 ADI-25650、ADI-25651、ADI-25652、ADI-25653、ADI-25654、ADI-23515、ADI-23518 和 ADI-23519 保留对过表达人 OX40 的 CHO 细胞的结合强度 (表 12)。

表 12: 流式细胞术测定的酵母中产生的本发明 IgG1 形式的亲和力成熟的抗体与表达人 OX40 的 CHO 细胞的结合

抗体	CHO 结合强度 (MFI)	CHO-OX40 结合强度 (MFI)	差异倍数
11D4	103.8	169078.52	1628.88747591522
Hu106-222	107.91	183487.48	1700.375127421
ADI-20112	117.48	244141.56	2078.15423901941

ADI-25650	123.52	251531.8	2036.3649611399
ADI-25651	108.09	252745.63	2338.28874086409
ADI-25652	105.37	252663.66	2397.87093100503
ADI-25653	108.47	251842.51	2321.77108878031
ADI-25654	111.57	251911.27	2257.87640046608
ADI-20078	103.2	140889.45	1365.20784883721
ADI-23515	117.12	181008.63	1545.49718237705
ADI-23518	117.02	173107.61	1479.29935053837
ADI-23519	113.95	177986.07	1561.966388767

在如以上测试法所述进行的实验中,在 293 HEK 细胞中表达的 IgG1 形式的 ADI-20051、ADI-20078、ADI-20112 和 ADI-20118 结合 CHO 细胞上过表达的 OX40,EC50 值分别为 2.734 、2.874、2.799 和 6.71nM (表 13)。

表 13: 通过流式细胞术测定的 293 HEK 细胞中产生的 IgG1 形式的本发明抗体与表达人 OX40 的 CHO 细胞的结合 (MFI)

mAb 浓度 (nM)	ADI-20051	ADI-20078	ADI-20112	ADI-20118	IgG1*	Hu106-222	OX40L
200	3,892,625	4,331,942.5	3,968,422.5	3,887,261	2,823	2,641,566.5	2,676,466
100	4,353,622	3,749,820	3,821,556	3,829,764.5	1,724.5	2,501,123	2,566,729.5
50	3,797,245.5	4,177,968	4,041,423	3,347,599.5	1,697	2,337,112	2,718,729.5
25	3,888,215.5	4,044,853.5	3,863,618	3,402,198	1,564	2,243,315	2,800,686.5
12.5	3,519,989.5	3,086,415	3,642,910	2,426,690	1,629	2,177,780	1,990,551.5
6.25	3,058,740	2,909,226	2,635,481.5	1,905,832	1,599.5	2,020,453.5	1,475,888.5
3.125	2,820,887	2,260,563.5	1,984,982	1,424,275	1,745.5	1,769,950	932,206
1.5625	976,540.5	1,278,333	1,535,375	834,045	1,930	1,253,256	553,849
0.78125	603,919	684,834	655,291	529,956	1,681	600,191.5	316,826
0.390625	493,981	432,702	302,819	191,627	1,710	474,061	118,773.5
0.1953125	293,798	267,094.5	225,752.5	131,627.5	1,505.5	181,238.5	83,150
0.09765625	124,618	101,394.5	80,628.5	75,465	2,383.5	77,551	35,188.5
0.048828125	63,925	54,087.5	56,293.5	42,682.5	2,016	49,775.5	33,965
0.024414063	43,228.5	35,991.5	36,783.5	18,963.5	2,072	26,693	12,831
EC50	2.734	2.874	2.799	6.71	N/A	1.939	5.325

*IgG1 包含 SEQ ID NO:177 所示的重链和 SEQ ID NO:179 所示的轻链，对于以下内容中的 IgG1 对照同样如此。

在如以上测试法所述进行的实验中，在 293 HEK 细胞中表达的 IgG2 形式的 ADI-20051、ADI-20078、ADI-20112 和 ADI-20118 结合在 CHO 细胞上过表达的 OX40，EC50 值分别为 5.49、4.022、2.777 和 5.838nM（表 14）。

表 14：流式细胞术测定的 293 HEK 细胞中产生的 IgG2 形式的本发明抗体与表达人 OX40 的 CHO 细胞的结合（MFI）

mAb 浓度(nM)	ADI-20051	ADI-20078	ADI-20112	ADI-20118	IgG2*	Hu106-222 (IgG2)	OX40L
200	2,505,571.5	2,340,461.5	1,794,440.5	1,721,947.5	216,463	2,547,473.5	2,079,671.5
100	2,352,269.5	2,302,557.5	1,781,267	1,530,379	93,016.5	2,390,473.5	2,509,891
50	2,097,152	1,845,269.5	1,552,003	1,376,523.5	44,135	1,586,637	1,075,813
25	2,328,715	2,331,766	1,825,143.5	1,500,387	22,093.5	2,158,051.5	1,842,256
12.5	1,620,692	1,504,606	1,342,114	1,128,280.5	11,883	1,524,125.5	1,107,920.5
6.25	1,331,847.5	1,510,032.5	1,427,757.5	889,093	6,395	1,058,626	599,830.5
3.125	912,960	1,155,515.5	985,181	600,036.5	4,151.5	660,113	341,966
1.5625	610,550.5	679,365.5	602,131.5	351,749	2,898	333,812	172,319
0.78125	315,041	344,013	313,831	207,156	2,249	188,470	86,024.5
0.390625	155,997.5	191,290	188,741	119,907	1,892	100,782	49,659.5
0.1953125	80,545.5	91,837.5	94,230	60,444.5	1,685	49,458.5	24,816
0.09765625	40,673.5	44,953.5	48,522	36,842	1,590.5	28,207.5	14,492
0.048828125	19,401.00	26,640.00	25,653.00	18,428.00	1,562.00	15,366	8,354.50
0.024414063	20,873.50	25,589.00	24,560.50	16,484.00	1,511.50	14,635.5	7,974.00
EC50	5.49	4.022	2.777	5.838	N/A	8.367	12.4

*IgG2 包含 SEQ ID NO:180 所示的重链和 SEQ ID NO:181 所示的轻链，对于以下内容中的 IgG2 对照同样如此。

2. 与 293 HEK 细胞上的人 OX40 的结合

可以在流式细胞术测定法中测量本发明的抗体与人 OX40 的结合。将过表达人 OX40 的 293 HEK 细胞（ 0.2×10^6 个，与上文所述针对 CHO 细胞类似的方法制备）与 100nM 的实验抗体在 PBS 0.1% BSA 中在冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次，并与二抗（PE 标记的，SouthernBiotech，终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）在 PBS 0.1% BSA 中在冰上（避光）孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。在 Accuri C6 系统（BD Biosciences）上进行流式细胞术，并相应地计算 MFI。

在如上测定法所述进行的实验中，ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118 (IgG1 形式，在酵母中表达) 与阴性对照 IgG1 对照相比，以剂量依赖性方式结合 OX40 (表 15)。

表 15: 通过流式细胞术的酵母细胞中产生的本发明 IgG1 形式的抗体结合表达人 OX40 的 293 HEK 细胞 (MFI)

抗体	浓度			
	200 nM	40 nM	8 nM	1.6 nM
IgG1 对照	11,089.00	25,186.50	5,311.00	5,625.50
11D4	2,405,701.00	2,755,335.00	2,060,113.00	613,085.00
Hu106-222	1,787,941.00	1,798,292.50	1,737,822.00	650,133.50
ADI-20048	1,703,707.00	1,851,598.50	1,726,793.50	976,743.50
ADI-20051	2,465,528.00	2,394,265.00	2,328,569.50	788,317.00
ADI-20065	3,031,816.50	2,424,762.50	2,458,475.00	807,629.00
ADI-20066	2,552,042.00	2,388,745.00	2,823,986.00	625,539.50
ADI-20078	1,943,603.50	1,565,973.00	1,575,529.00	541,760.00
ADI-20096	1,842,613.00	1,816,164.50	1,100,745.50	416,902.00
ADI-20112	2,305,931.00	1,923,515.00	1,975,220.00	894,984.00
ADI-20113	2,409,755.50	2,181,506.00	1,997,251.00	734,281.00
ADI-20118	1,730,309.00	1,979,720.00	1,962,026.00	848,675.50

3. 与活化的原代 CD4⁺T 细胞上的人 OX40 的结合

可以在流式细胞术测定法中测量本发明的抗体与原代 T 细胞上的人 OX40 的结合。

用抗-CD3/CD28 DynaBeads (Invitrogen) 活化来自健康供体的原代 CD4⁺T 细胞 48 小时，并将 0.2×10^6 个细胞与 100nM 的实验抗体在 PBS 0.1% BSA 中在冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤至少两次，并与二抗 (PE 标记的，SouthernBiotech，终浓度为 5 μ g/ml) 在 PBS 0.1% BSA 中在冰上 (避光) 孵育 30 分钟。将细胞洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。在 Accuri C6 系统 (BD Biosciences) 上进行流式细胞术，并相应地计算 MFI。

在如上测定法所述进行的实验中，ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118 (IgG1 形式，在酵母中表达) 与阴性对照 IgG1 对照相比以高的 MFI 信号结合 OX40 (表 16)。

表 16: 流式细胞术测定的酵母细胞中产生的 IgG1 形式的本发明抗体与活化的 CD4⁺T 细胞的结合 (MFI)

抗体	来自健康供体 1 的原代 CD4 ⁺ T 细胞	来自健康供体 2 的原代 CD4 ⁺ T 细胞
----	--	--

	上的人 OX40	上的人 OX40
IgG1 对照	6,309.00	1,707.00
Hu106-222	114,899.50	136,049.50
11D4	196,478.50	242,033.50
ADI-20048	43,129.00	62,592.00
ADI-20051	140,903.50	172,241.50
ADI-20065	152,901.00	208,500.50
ADI-20066	134,167.00	193,030.00
ADI-20078	60,318.50	80,891.00
ADI-20096	54,618.00	75,446.00
ADI-20112	100,101.50	125,179.00
ADI-20113	84,378.50	114,677.00
ADI-20118	78,556.50	107,498.50

实施例 4. 本发明抗体对人 OX40L 与 OX40 相互作用的阻断

可以通过流式细胞术测量本发明的抗体阻断人 OX40 与 OX40L 结合的能力。

方法 1: 将如前文实施例 3 所述制备的表达人 OX40 的 CHO 细胞 0.2×10^6 个与实验抗体 (100nM) 在 PBS 0.1% BSA 中在冰上孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤 3 次, 并与连接 NHS-荧光素 (Promega) 的 OX40L-hFc (自 AcroBiosystems 获得) ($\sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 在 PBS 0.1% BSA 中在冰上 (避光) 孵育 30 分钟。将细胞洗涤 3 次。在 Accuri C6 系统 (BD Biosciences) 上进行流式细胞术, 并且在 C6 软件上计算 MFI。

在如上测定法所述进行的实验中, ADI-20048、ADI-20051、ADI-20065、ADI-20066、ADI-20078、ADI-20096、ADI-20112、ADI-20113 和 ADI-20118 (在酵母中表达的 IgG1 形式) 阻断人 OX40L-FITC 结合至不同水平, 但是仅有 ADI-20051 的阻断 FITC 信号略强于 OX40L, MFI 值为 17,225, 与 19,344 相比。ADI-20048、ADI-20065、ADI-20066、ADI-20078、ADI-20096、ADI-20112、ADI-20113 和 ADI-20118 显示比 OX40L 更高的 MFI 值, 分别为 34,342、33,687、32,813、28,112、31,917、22,525、24,020.5 和 26,580.5 (表 17)。

表 17: 流式细胞术测定的在酵母细胞中产生的 IgG1 形式的本发明的抗体对 OX40L 与 CHO 细胞上表达的 OX40 的结合的阻断

抗体	CHO-OX40 细胞上 OX40L 信号的 MFI
空白	5,006
IgG1 对照	35090
Hu106-222	25,807

11D4	35,963
OX40L	19,344
ADI-20048	34,342
ADI-20051	17,225
ADI-20065	33,687
ADI-20066	32,813
ADI-20078	28,112
ADI-20096	31,917
ADI-20112	22,525
ADI-20113	24,020.5
ADI-20118	26,580.5

方法 2: 还使用与鼠 Fc 融合的 OX40L(OX40L-mFc 自 AcroBiosystems 获得), 随后使用抗鼠 FC-FITC 二抗 (Biolegend), 使用染色方法, 如方法 1 所述。在 Accuri C6 系统 (BD Biosciences) 上进行流式细胞术, 并且在 C6 软件上计算 MFI。

在如上测定法所述进行的实验中, ADI-23515-g2 和 ADI-20112-g1 (分别为 IgG2 和 IgG1 形式的抗体, 且在 CHO 细胞中表达) 尽管阻断与小鼠 Fc 融合的人 OX40L (60 μ g / ml) 与 CHO 细胞上的 OX40 的结合, 但是显示与 Pogalizumab 相比更低的阻断活性, 与 OX40L 具有相似的水平 (图 1)。其中对照 IgG4 包含 SEQ ID NO:178 所示的重链和 SEQ ID NO:179 所示的轻链, 对于以下内容中的 IgG4 对照同样如此。

实施例 5. 本发明的抗 OX40 抗体的激动剂活性

1. 板结合抗体 T 细胞活化测定法

根据 Untouched CD4+T 细胞分离试剂盒 (Invitrogen) 中制造商的说明书进行 T 细胞分离。装有 1.5ml 试管架的磁体用于去除不需要的磁珠 (QIAGEN)。

可以通过测量 T 细胞活化后由 T 细胞释放的炎性细胞因子评估本发明的抗 OX40 抗体的激动剂活性。用次优抗-CD3 (0.25 μ g/ ml) 抗体 (Biolegend) 和抗-OX40 (6 μ g/ ml) 测试抗体包被 96 孔平底板 (Corning), 在 37 摄氏度持续 2 小时或 4 摄氏度过夜。洗涤后, 将 100,000 个 CD4+ 原代 T 细胞加入到溶液中含有 2 μ g/ml 抗-CD28 抗体 (Biolegend) 的总共 200 μ l 培养基的每孔中。5 天后, 通过 ELISA (Ready-SET-Go! ; eBioscience) 测试 IL-2 分泌水平。

在如上测定法所述进行的实验中, 在酵母细胞中产生的 IgG1 形式的 ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118, 比 IgG4 对照增加 IL-2 和 IFN γ 分泌, 来自两种不同健康供体的 T 细胞中的 IL-2 水平高达 100 倍增加, IFN γ 水平高达 3 倍不同 (表 18)。

表 18: 用次优抗 CD3 活化加上在酵母细胞中产生的 IgG1 形式的本发明抗体的 T 细胞活

化的 IL-2 和 IFN γ 分泌

抗体	与对照比较的 IL-2 或 IFN γ 分泌变化的倍数			
	供体 1 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 1 的 T 细胞中的 IFN γ 的分泌	供体 2 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 2 的 T 细胞中的 IFN γ 的分泌
IgG4 对照	1	1	1	1
Hu106-222	98.799087	3.372629843	27.14136126	2.238952537
11D4	143.68493	3.570898599	150.6753927	2.481314785
OX40L	130.30594	2.25329761	97.4869	1.67649
ADI-20048	143.34703	2.91117065	160.581	2.03546
ADI-20051	157.44292	2.87448475	165.681	1.47095
ADI-20065	142.56621	2.83099753	159.277	1.58129
ADI-20066	142.39269	2.47650453	163.351	1.52032
ADI-20078	152.08219	3.4641385	148.649	2.34984
ADI-20096	143.35616	3.49443528	147.89	2.3868
ADI-20112	150.83562	3.1417972	159.66	2.98882
ADI-20113	141.73059	3.32914262	143.806	1.71399
ADI-20118	147.88128	2.69579555	147.529	1.80742

2. 可溶性抗体 T 细胞活化测定法

测试 1:

可以通过测量 T 细胞活化后由 T 细胞释放的炎性细胞因子评估本发明的抗 OX40 抗体的激动剂活性。用 PHA (10 μ g/ml, Sigma) 和 200nM 候选抗-OX40 抗体刺激 100,000 个 CD4 + T 细胞 5 天, 通过 ELISA (Ready-SET-Go! ; eBioscience) 测试 IL-2 分泌。

在如上测定法所述进行的实验中, 在酵母细胞中产生的 IgG1 形式的 ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118, 比 IgG4 对照增加 IL-2 的分泌, 来自六种不同健康供体 T 细胞中的 IL-2 水平增加高达 10 倍 (表 19)。

表 19: PHA 活化加上在酵母细胞中产生的本发明的 IgG1 形式的抗体的 T 细胞活化时的 IL-2 分泌

抗体	与对照相比的 IL-2 分泌中的改变倍数					
	供体 1 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 2 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 3 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 4 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 5 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌	供体 6 的 T 细胞中的 IL-2 的分泌

	泌					
IgG4 对照	1	1	1	1	1	1
Hu106-222	0.6542	0.602241	0.745803	0.669903	0.541237	0.569652
11D4	1.1542	1.980392	1.551559	0.932039	2.025773	1.514925
OX40L	2.2757	9.509804	2.59952	2.558252	9.384021	3.159204
ADI-20048	11.173	7.358543	4.678657	11.73301	8.515464	3.80597
ADI-20051	2.229	2.515406	1.223022	1.757282	2.646907	1.41791
ADI-20065	2.9626	3.2493	1.484412	2.684466	2.984536	1.679104
ADI-20066	2.2617	2.495798	1.371703	2.495146	2.07732	1.350746
ADI-20078	10.565	4.719888	6.429257	13.14078	5.10567	7.365672
ADI-20096	1.8879	2.857143	2.64988	4.728155	2.430412	3.218905
ADI-20112	4.2664	2.753501	2.472422	4.218447	2.780928	2.81592
ADI-20113	4.0654	5.848739	2.285372	4.063107	5.742268	2.365672
ADI-20118	7.0841	10.36975	7.105516	6.65534	10.15722	8.477612

测试 2:

可以通过测量 T 细胞活化后由 T 细胞释放的炎性细胞因子来评估本发明的抗-OX40 抗体的激动剂活性。用抗-CD3 抗体 (Biolegend) (浓度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、抗-CD28 抗体 (Biolegend) (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗-OX40 抗体刺激 100,000 个 CD4 + T 细胞 5 天, 通过 ELISA (Ready-SET-Go!; eBioscience) 测试 IL-2 分泌。

在如上测试法所述进行的实验中, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或以上浓度的 HEK293 细胞表达的 IgG1 形式的抗 IL-OX40 抗体 ADI-20051, ADI-20078, ADI-20112 和 ADI-20118, 比 IgG1 对照增加 IL-2 的分泌 (表 20), 以及所有浓度的 HEK293 细胞表达的 IgG2 形式的抗-OX40 抗体也一样 (表 21)。

表 20: 用溶液中的抗-CD3、抗-CD28 抗体加上 HEK293 细胞产生的 IgG1 形式的本发明的抗体活化 T 细胞时的 IL-2 分泌

mAb 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ADI-20051	ADI-20078	ADI-200112	ADI-200118	IgG1 对照	OX40L
40	1.274526678	2.724612737	2.984509466	1.939759036	1	1.972461274
20	1.450503356	1.979026846	2.785234899	1.431208054	1	1.687919463
10	0.867399267	1.546520147	1.820512821	0.914285714	1	4.174358974

表 21: 用溶液中的抗-CD3、抗-CD28 抗体加上 HEK293 细胞产生的 IgG2

形式的本发明的抗体活化 T 细胞时的 IL-2 分泌

mAb 浓度 (μg/ml)	ADI-20051	ADI-20078	ADI-200112	ADI-200118	IgG1 对照	OX40L
40	3.375075988	4.989361702	8.699088146	6.962006079	1	8.215805471
20	1.162091765	3.188539371	4.674013224	3.815267481	1	6.658585454
10	14.44130127	15.82602546	26.78925035	22.0466761	1	3.490806223

测试 3:

可以通过测量 T 细胞活化后由 T 细胞释放的炎性细胞因子来评价本发明的抗-OX40 抗体的激动剂活性。在通过 ELISA (Ready-SET-Go!; eBioscience) 测试 IL-2 分泌之前, 用 PHA (5 μg/ml; Sigma) 和 5 μg/ml、10 μg/ml 或 20 μg/ml 抗-OX40 抗体刺激 100,000 个 PBMC 5 天。

在如上测试法所述进行的实验中, 在 CHO 细胞中表达的 ADI-20078-g1 (IgG1 形式), ADI-20078-g2 (IgG2 形式), ADI-20112-g1 (IgG1 形式), 和 ADI-20112-g2 (IgG2 形式), 在 5 μg/ml、10 μg/ml 和 20 μg/ml 时比 IgG1 对照和 IgG2 对照增加了 IL-2 分泌, 高于对照抗体 11D4、Hu106-222 和 pogalizumab 基准 (图 2)。

3. 荧光素酶报告基因 T 细胞活化测定法

可以通过在荧光素酶报告基因测定法中测量 NFκB 介导的转录活化的促进来评估本发明的抗-OX40 抗体的激动剂活性。用 PHA5 (5 μg/ml; Sigma) 或抗-CD3 (2 μg/ml; Biolegend) 加上抗-CD28 (2 μg/ml; Biolegend) 和溶液中的抗-OX40 抗体 (100 nM) 活化过表达人 OX40 (购自 Sino) 和 NFκB-荧光素酶构建体 (NFκB 启动子-luc, Promega) 的 Jurkat 细胞 (美国 ATCC), 持续 18 小时, 然后在细胞裂解和添加底物和生物发光测量之后在检测装置 (Molecular Devices) 上测试, 其指示相对荧光素酶表达诱导。

在如上测定法所述进行的实验中, 在酵母细胞中产生的 IgG1 形式的 ADI-20048, ADI-20051, ADI-20065, ADI-20066, ADI-20078, ADI-20096, ADI-20112, ADI-20113 和 ADI-20118 增加荧光素酶表达大于 IgG4 对照, 在使用 PHA (Sigma) 或抗-CD3 (Biolegend) 活化中信号分别高达 4 倍的增加和 7 倍的增加 (表 22)。

表 22: 用人 OX40 和 NFκB 启动子-luc 稳定转染的 Jurkat 中的荧光素酶报告基因检测, 其通过 PHA 或抗-CD3 加上抗-CD28 刺激加上酵母细胞中产生的本发明的 IgG1 形式的抗体的刺激

抗体	PHA+抗 CD28 刺激的 Jurkat 细胞中 NFκB-Luc 变化倍数	抗-CD3+抗 CD28 刺激的 Jurkat 细胞中 NFκB-Luc 变化倍数
IgG4 对照	1	1
Hu106-222	1.929795	1.774336
11D4	1.955867	1.480546
OX40L	4.823335	4.049893

ADI-20048	3.626118	5.76953
ADI-20051	1.832293	1.289518
ADI-20065	2.112869	1.19408
ADI-20066	2.085514	1.959262
ADI-20078	4.623152	7.455066
ADI-20096	4.567301	5.122978
ADI-20112	4.193475	3.972688
ADI-20113	3.794002	3.97635
ADI-20118	3.990324	5.265868

在如上测定法所述进行的实验中, 使用抗-CD3 和抗-CD28 dynabeads 磁珠 (Invitrogen) 作为活化剂, ADI-20078-g2 是在 CHO 细胞中瞬时表达的人 IgG2 OX40 抗体, 其增加荧光素酶表达大于 IgG 对照 (IgG1 和 IgG2 对照)、ADI-20078-g1 (CHO 细胞中表达的人 IgG1 OX40 抗体)、ADI-20112-g1 (CHO 细胞中表达的人 IgG1 OX40 抗体)、ADI-20112-g2 (CHO 细胞中表达的人 IgG2 OX40 抗体)、pogalizumab 和 Hu106-222 (图 3)。

在如上测定法所述进行的实验中, ADI-20078-g2 是在 CHO 细胞中表达的人 IgG2 OX40 抗体, 其增加荧光素酶表达大于 IgG 对照 (IgG1 对照), 以及 ADI-23515-g2 是在 CHO 细胞中表达的亲和力成熟的人 IgG2 OX40 抗体, 相比于 ADI-20078-g2 的 EC50 值 5.739 nM, 其具有较低的 EC50 值, 为 0.3904 nM (图 4)。

在如上测定法所述进行的实验中, 进一步添加 Raji 细胞 (ATCC) 以提供共刺激信号和 FcγRIIb 用于 IgG 交联, ADI-20112-g1 是人 IgG1 OX40 抗体, ADI-20112-g2 是人 IgG2 OX40 抗体, ADI-20078-g1 是人 IgG1 OX40 抗体, ADI-20078-g2 是人 IgG2 OX40 抗体, 它们都在 CHO 细胞中表达, 它们通过 OX40 活化增加的荧光素酶表达大于 IgG 对照 (IgG1 对照和 IgG2 对照), EC50 值分别为 0.06051 nM, 0.2463 nM, 0.09644 nM 和 1.398 nM。ADI-20112-g1 相比 pogalizumab、Hu106-222 和 11D4 是相当或更好的激动剂 (图 5)。

在如上测定法所述进行的实验中, ADI-25654-g1 是在 CHO 细胞中产生的人 IgG1 OX40 抗体, 其是在 CHO 中产生的人 IgG1 OX40 抗体 ADI-20112-g1 的亲和力成熟形式; 以及 ADI-23515-g1 是在 CHO 细胞中产生的人 IgG1 OX40 抗体, 其是在 CHO 细胞中产生的人 IgG1 OX40 抗体 ADI-20078-g1 的亲和力成熟形式。与 EC50 为 0.2576nM 的 ADI-20112-g1 相比, ADI-25654-g1 和 ADI-23515-g1 显示更好的激动剂活性, EC50 值分别为 0.02817nM 和 0.1743nM (图 6)。

4. 混合的淋巴细胞反应(MLR)/ DC T 细胞共培养测定法

可以通过在混合淋巴细胞反应期间或 DC-T 细胞共培养测定法测量 IL-2 的释放评估本发明的抗体对 OX40 信号的激动剂活性。将 2×10^6 个 PBMC 铺板在 6 孔组织培养板的每个孔中

或 T25 组织培养瓶中。将细胞孵育 2-3 小时,以允许单核细胞的附着。通过在含有 1% AB 血清、10mM HEPES、50 μ M β -Me、IL-4 (1000U/ml) 和 GM-CSF (1000U/ml),或上述成分各 25-50ng/ml 的 X-VIVO 15 培养基中培养来自 PBMC 的单核细胞 (1×10^6 个细胞/ml) 产生未成熟骨髓 moDC。2 天后,加入补充有 IL-4 和 GM-CSF 的新鲜培养基。在第 5 天,将细胞冷冻或通过加入含有 rTNF α (1000U/ml)、IL-1 β (5ng/ml)、IL-6 (10ng/ml) 和 1 μ M PGE $_2$ 的刺激混合物、以 3×10^5 个细胞/ml 的细胞密度持续 2 天诱导成熟。根据在 Untouched CD4+T 细胞分离试剂盒 (Invitrogen) 中制造商的说明书进行 T 细胞分离。装有 1.5ml 试管架的磁体用于去除不需要的磁珠 (QIAGEN)。

将 100,000-200,000 个分离的 T 细胞 (来自供体) 与 10,000-20,000 个同种异体 moDC (如上) 以总体积 200 μ l 在 96-圆底组织培养板中混合,在 37 $^{\circ}$ C 下持续 4-5 天。加入 SEE (1ng/ml) 以增加 T 细胞活化。在 MLR 的开始加入测试抗体,并在整个培养期间孵育。根据制造商的说明书 (eBioscience) 进行 IL-2 的检测。在 Multiskan FC 系统 (Thermo) 上测定 OD 测量值。

在如上测定法所述进行的实验中,CHO 细胞中表达的 IgG2 形式的人抗体 ADI-23515-g2 和 CHO 细胞中表达的人 IgG1 抗体 ADI-20112-g1,在 $\sim 13.3 \mu$ g/ml, $\sim 4.4 \mu$ g/ml 和 $\sim 1.48 \mu$ g/ml 浓度下使用时,增加 IL-2 分泌,比 pogalizumab、11D4、Hu106-222 和 tavolixizumab 相当或更好。Pogalizumab 在所有浓度下具有差的激动剂活性,且 40 μ g/ml of 11D4, Hu106-222, tavolixizumab, ADI-23515-g1 和 ADI-20112-g1 在 40 μ g/ml 的 OX40 抗体的最高浓度时显示较低的激动剂活性 (图 7, 其中 IgG 对照为 IgG1 对照)。

实施例 6 基于荧光素酶报告基因检测本发明抗体对 OX40L 介导的 OX40 的 T 细胞活化

可以通过测量抗体阻断 OX40L 介导的 OX40 对 T 细胞活化的性能来评估本发明的抗-OX40 抗体的阻断活性,T 细胞的活化性能利用 NF κ B 介导的转录活性评估 (参见实施例 5)。使用抗-CD3 (2 μ g/ml; Biolegend)、抗-CD28 (2 μ g/ml; Biolegend) 和重组 OX40L (60 μ g/ml; Acro Biosystems),再加上增加浓度的抗-OX40 抗体 (本发明的 IgG1 形式的 CHO 细胞中表达的 ADI-20112-g1, 本发明的 IgG2 形式的 CHO 细胞中表达的 ADI-23515-g2) 和 IgG4 对照、Pogalizumab, OX40L (自 AcroBiosystems 获得),在溶液中持续 18 小时,活化过表达人 OX40 和 NF κ B-荧光素酶构建体 (NF κ B 启动子-luc, 美国 Promega) 的 Jurkat 细胞 (美国 ATCC),然后在细胞裂解和加入底物后进行检测和吸光度测量。

Pogalizumab 在大于约 0.08nM 或更高的浓度下容易阻断基于 OX40L 的 T 细胞活化,而在 CHO 细胞中产生的 IgG1 形式的人 OX40 抗体 ADI-20112-g1 和在 CHO 中产生的 IgG2 形式的人 OX40 抗体 ADI-23515-g2 在 20nM 和其上才阻断基于 OX40L 的活化 (图 8)。

实施例 7. 本发明抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

基于荧光素酶报告基因抗体依赖性细胞介导的细胞毒性测定法

可以使用荧光素酶报告基因测定法 (Promega) 来测量 OX40 抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 活性。将靶细胞 (表达人 OX40 的 CHO 细胞 (如上所述制备)) 以 1.2×10^6 个细胞/ml 接种在含有 10% Ultra-Low IgG FBS (Sigma) 的 25 μ l RPMI 培养基 (Gibco) 中。制备 1 μ g/ml 抗体的 1: 3 连续稀释液,加入 25 μ l/孔。接种 25 μ l 的 6×10^6 细胞/ml ADCC 效应

细胞(Promega),并在37℃下用5% CO₂孵育6小时。加入75μl 荧光素酶测定法试剂(Promega),并将混合物至室温持续20分钟。将板以300g/min离心2分钟。小心转移120μl的细胞上清至Optiplates。在光度计中读板。拟合曲线并使用GraphPad Prism 6.0确定抗体反应的EC₅₀。

在如以上测定法所述进行的实验中,在HEK293细胞中表达的IgG1形式的ADI-20051, ADI-20078, ADI-20112和ADI-20118增加荧光素酶表达,EC₅₀值分别为0.3653, 0.9109, 0.7304和0.8867 nM, (图9)。在HEK293细胞中表达的IgG2同种型的ADI-20051, ADI-20078, ADI-20112, 和ADI-20118不引起ADCC活性(图10)。

实施例 8. 本发明抗体的抗肿瘤活性

可以在人源化小鼠模型(NOG hu-PBMC LoVo 肿瘤模型)中研究本发明的OX40抗体的抗肿瘤功效。

根据ATCC说明书(F-12K)培养LoVo人结肠癌细胞(ATCC # CCL-229)。将悬浮在0.2ml PBS(其中含有66万个人PBMC)中的200万个LoVo细胞植入雌性NOG(北京维通利华实验动物技术有限公司)的右肋腹中。

在整个研究期间每周测量两次肿瘤和体重,当肿瘤达到端点时或当小鼠具有>20%体重减轻时使小鼠安乐死。在植入后3天,将小鼠随机分为6-7组,每组用数字卡尺估计平均肿瘤体积,并且通过下式计算肿瘤体积(mm³):每组的(宽度)²×长度/2约为50mm³。

在植入后第3、7、11和14(或15)天,用PBS、10mg/kg相关IgG同种型对照(equitech-Bio)或抗-OX40抗体(在CHO细胞中表达的IgG1形式的人OX40抗体ADI-20112-g1或在CHO细胞中表达的IgG2形式的人OX40抗体ADI-23515-g2)腹膜内(IP)给药小鼠。

在如上测定法所述进行的实验中,在CHO细胞中表达的IgG1形式的人OX40抗体ADI-20112-g1中与IgG对照(equitech-Bio)(图11)相比、和与pogalizumab和11D4(图13)相比,降低肿瘤体积生长。在如上测定法所述进行的实验中,在CHO细胞中表达的IgG2形式的人OX40抗体ADI-23515-g2与IgG对照(equitech-Bio)(图12)、pogalizumab和11D4(图13)相比,降低肿瘤体积生长。ADI-20112-g1和ADI-23515-g2与IgG对照、pogalizumab和11D4(图14)相比,不显著影响小鼠体重。

实施例 9: 药物动力学测定

在ADI-20078-IgG1(IgG1形式,在CHO细胞中表达)、ADI-20078-IgG2(IgG2形式,在CHO细胞中表达)、ADI-20112-IgG1(IgG1形式,在CHO细胞中表达)、ADI-20112-IgG2(IgG2形式,在CHO细胞中表达)静脉内以10mg/kg抗体剂量给药给雌性Balb/C小鼠后,评估药物动力学数据。基于体重将剂量体积注射到小鼠中。

在开始给药时开始计时血液采集的时间。对于静脉内施用,时间点包括0.083小时(5分钟)直到第21天。在每个时间点从三只小鼠采集血液。将约100μl血液收集到微量离心管中。将血液样品在冰上在3000RPM的速度设置下储存至少10分钟,以获得约40-50ul的血清。

通过使用基于板的夹心 ELISA 方法的免疫测定法来测定给药小鼠的抗体的血清浓度。简言之, 在 0.2M CBS (PH9.4) 中在 4℃ 下用 1 μ g/mL 的 OX40 (ACRO, 货号 1044-5CIS1-AF) 包被微量滴定板 (Nunc, 货号 442404) 过夜。洗涤后, 然后将板在环境温度下用 5% 脱脂乳封闭 1.5 小时, 将小鼠血清样品施加到包被的板上, 在室温下持续 1.5 小时。使用抗-OX40 抗体在合并的正常小鼠血清中制备范围为 0.315-80ng/mL 的标准曲线, 并且 QC 样品。

使用在 0.05% PBST (0.05% Tween 的 PBS 溶液)、5% BSA 中以 1:100,000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 Fc 抗体 (Bethyl, 货号 A80-104P-84) 检测结合的抗-OX40 抗体。在洗涤步骤后, 将板用 TMB 在室温下显色 10-15 分钟, 在 5 分钟后通过加入 2N 硫酸终止。使用 Thermo ELISA 板读数器 (Multiskan FC), 在 450nm 下测量光密度, 减去 620nm 参考波长。定量基于使用 Skanit Software3.1 (Thermo) 制备的标准曲线的四参数逻辑 (1/Y2) 回归。

通过基于具有各组浓度平均值的非房室模型 (non-compartmental model) 的 PKSolver 软件分析 PK 参数 (C_{max} , AUC, $t_{1/2}$, CL 和 V_{ss}) (表 23)。

表 23: 单次 10mg/kg IV 推注施用后雌性 Balb/C 小鼠中 OX40 比较的 PK 总结

		参数					
研究	化合物	C_{max} (μ g/mL)	AUC _{0-t} (μ g $\times$ hr/mL)	AUC _{0-inf_obs} (μ g/mL $\times$ hr)	CL (mL/hr/kg)	$t_{1/2}$ (hr)	V_{ss} (mg/kg)/(μ g/mL)
OX40 的 PK	ADI-20078-IgG1	135	24123	39579	0.00025	386	0.13
	ADI-20078-IgG2	168	29502	47639	0.00021	365	0.11
	ADI-20112-IgG1	184	27409	37486	0.00026	264	0.10
	ADI-20112-IgG2	204	39175	55246	0.00018	310	0.07

实施例 10. 抗-OX40 抗体 联合抗-PD-1 抗体在 MC38 荷瘤的 OX40 转基因小鼠的药效研究

本研究采用 MC38 (小鼠肠癌细胞) 荷瘤的 OX40 转基因小鼠, 研究抗-OX40 抗体 ADI-20112-IgG1 (本实施例以及图 15 中简称为 ADI-20112) 的不同剂量和抗-PD1 抗体 antibody C 联合给药的协同抗肿瘤效应。antibody C 是抗程序性死亡受体 1 (PD-1) 单克隆抗体 (专利申请号: PCT/CN2017/072190)。

人 OX40 转基因小鼠

雌性 C57Bl/6 背景的人 OX40 转基因小鼠 (约 8 周大) 购自上海南方模式生物科技股份有限公司。小鼠在到达后驯化 7 天, 随后开始研究。

细胞

MC38 鼠结肠癌细胞购自和元生物技术（上海）有限公司，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种(1×10^6 个/鼠)至人 OX40 转基因小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38-hOX40 荷瘤小鼠模型。

给药

肿瘤细胞接种 6 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在 $87.4 \text{ mm}^3 \sim 228.4 \text{ mm}^3$ 范围内的小鼠按瘤体积平均分组，使得各组肿瘤平均初始体积约 110 mm^3 。

将小鼠分为 7 组(每组 7 只小鼠)，每组分别腹腔注射如下剂量的抗体：

组 1 (对照组): h-IgG(equitech-Bio), 10 mg/kg;

组 2: 抗 OX40 抗体(ADI-20112), 0.1 mg/kg;

组 3: 抗 OX40 抗体(ADI-20112), 1 mg/kg;

组 4: 抗 OX40 抗体(ADI-20112), 10 mg/kg;

组 5: PD-1 抗体(Antibody C), 0.5 mg/kg;

组 6: 抗 OX40 抗体(ADI-20112) 1 mg/kg +PD-1 抗体(Antibody C)0.5 mg/kg;

组 7: 抗 OX40 抗体(ADI-20112)10 mg/kg +PD-1 抗体(Antibody C)0.5 mg/kg。

试剂注射

接种后第 6 天，分别用如上 7 组试剂对每组小鼠给药，给药方式为腹腔注射，给药频率为 2 次/周，连续给药 2 周。

分析:

在整个研究期间从第 6 天（给药前）开始每周测量两次肿瘤和体重，连续监测 4 周。采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴(L)和最大宽轴(W)，肿瘤体积(V)按如下公式计算: $V=L \times W^2/2$ 。将来自每组的小鼠的肿瘤尺寸与时间作图。使用方差分析 (ANOVA) 来确定统计显著性。 < 0.05 的 P 值被视为在所有分析中具有统计显著性。

29 天实验结束时，使小鼠安乐死。分离瘤组织拍照并称重测量，测量各组小鼠瘤重和体积（肿瘤终末体积），并且计算相对肿瘤生长抑制率（TGI(%)）。

结果

试验结果显示，给药 1 周后，相对于组 1(h-IgG-10 mg/kg)给药组，组 2-4(ADI-20112-0.1 mg/kg、ADI-20112-1 mg/kg、ADI-20112-10 mg/kg)给药组对 MC38-hOX40 荷瘤小鼠中肿瘤增长有抑制作用，瘤体积和瘤重均减小，肿瘤生长也放缓，且具有剂量依赖性。试验结果也显示，本发明的抗 OX40 抗体 ADI-20112 与抗 PD-1 单抗 antibody C 联合用药表现出良好的协同抗肿瘤效应。具体结果如下。

如图 15 所示，给药 1 周后，相对于组 1(h-IgG-10 mg/kg 组)，组 2(ADI-20112-0.1 mg/kg

组)肿瘤生长放缓, 而组 3-7(ADI-20112-1 mg/kg 组、ADI-20112-10 mg/kg 组、antibody C-0.5 mg/kg 组、ADI-20112-1 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg、ADI-20112-10 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg)都表现出显著的抗肿瘤效应。组 1(h-IgG-10 mg/kg 给药组)的小鼠中的肿瘤生长到 500 mm³需 14 天, 相对的, 组 2 (ADI-20112-0.1 mg/kg 组)需要 19 天, 组 3(ADI-20112-1 mg/kg 组)需要 22 天, 组 4(ADI-20112-10 mg/kg 组)需要 26 天, 组 5(antibody C-0.5 mg/kg 组)、组 6(ADI-20112-1 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg 组)、组 7(ADI-20112-10 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg 组)在 29 天内平均肿瘤体积均未达到 500 mm³。

29 天后结束实验时, 在一些实验组中, 小鼠肿瘤完全消失。下表 24 统计了各组中肿瘤完全消失的小鼠数量。

表 24: 各组中肿瘤完全消失小鼠数量。

组别	给药(抗体, 剂量)	肿瘤完全消失只数
组1	h-IgG, 10 mg/kg	0/7
组2	ADI-20112, 0.1 mg/kg	0/7
组3	ADI-20112, 1 mg/kg	0/7
组4	ADI-20112, 10 mg/kg	0/7
组5	Antibody C, 0.5 mg/kg	3/7
组6	ADI-20112+antibody C, 1+0.5 mg/kg	6/7
组7	ADI-20112+antibody C, 10+0.5 mg/kg	7/7

如上表所示, 组 5(antibody C-0.5 mg/kg 组)中, 有 3 只小鼠肿瘤完全消退; 组 6(20112-1 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg 组)中有 6 只小鼠肿瘤完全消退; 组 7(20112-10 mg/kg +antibody C-0.5 mg/kg 组)中的 7 只小鼠肿瘤全部都消退。

此外, 本发明还计算了在第 29 天实验结束时各组小鼠中的相对肿瘤生长抑制率。相对肿瘤生长抑制率的计算公式如下:

$$\text{相对肿瘤生长抑制率 TGI(\%)} = 100\% \times (\text{Tvol}_{\text{control}} - \text{Tvol}_{\text{treated}}) / (\text{Tvol}_{\text{control}} - \text{Tvol}_{\text{predose}})$$

其中, $\text{Tvol}_{\text{control}} - \text{Tvol}_{\text{treated}}$ = 对照组给药后肿瘤终末体积 - 给药组给药后肿瘤终末体积; $\text{Tvol}_{\text{control}} - \text{Tvol}_{\text{predose}}$ = 对照组给药后肿瘤终末体积 - 对照组给药前肿瘤体积(第 6 天给药前肿瘤体积)。

计算结果如下表 25 所示:

表 25: 抗 OX40 抗体、抗 PD1 抗体、抗 OX40 抗体+ 抗 PD1 抗体对荷瘤小鼠肿瘤组织生长的影响 (mm³, Mean±SD, n=7;)

组别	给药(抗体, 剂量)	实验结束后肿瘤体积 (肿瘤终末体积)	TGI(%)
----	------------	--------------------	--------

组 1	h-IgG, 10 mg/kg	2531.83±1037.94	N/A
组 2	ADI-20112, 0.1 mg/kg	1859.82±508.64 [#]	28%
组 3	ADI-20112, 1 mg/kg	1176.17±897.65	56%
组 4	ADI-20112, 10 mg/kg	579.38±439.83	81%
组 5	Antibody C, 0.5 mg/kg	435.07±498.04	86%
组 6	ADI-20112+antibody C, 1+0.5 mg/kg	66.25±175.27	102%
组 7	ADI-20112+antibody C, 10+0.5 mg/kg	0.00±0.00	104%

[#]表示该次统计分析 n=6 (20112-0.1 组 3 号小鼠肿瘤破溃死亡)

实验结果显示, 组 6(ADI-20112-1 mg/kg + antibody C-0.5 mg/kg 组)、组 7(ADI-20112-10 mg/kg + antibody C-0.5 mg/kg 组)的肿瘤生长抑制率分别为 102%和 104%, 抗-OX40 抗体与抗-PD1 抗体联合表现出协同抗肿瘤效应。

权 利 要 求

1、抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 HCVR 和轻链可变区 LCVR，其中，

(a) 所述 HCVR 包含

(i) 表 B 所列任一抗体的 HCVR 中所含的三个互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii) 表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的组合；

并且

(b) 所述 LCVR 包含：

(i) 表 B 所列任一抗体的 LCVR 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，或

(ii) 表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合。

2、抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 HCVR 和/或轻链可变区 LCVR，其中

(a) 所述 HCVR 包含

(i) 表 B 所列任一抗体的 HCVR 中所含的三个互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii) 相对于(i)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列，或

(iii) 互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 和 16 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR1 包含与选自 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 和 16 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 和 33 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 和 33 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列；HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39 和 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:34、35、36、37、38、39 和 40 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列，或

(iv) 表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的组合，或

(v) (iv)的 HCDR 组合的变体, 所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换);

和/或

(b)所述 LCVR 包含:

(i) 表 B 所列任一抗体的 LCVR 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列, 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列, 或

(iii) 包含互补决定区域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中 LCDR1 包含选自 SEQ ID NO:41、42、43、44、45 和 46 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR1 包含与选自 SEQ ID NO:41、42、43、44、45 和 46 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列; LCDR2 包含选自 SEQ ID NO:47、48、49、50、51 和 52 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:47、48、49、50、51 和 52 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列; LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:53、54、55、56、57、58、59、60 和 61 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:53、54、55、56、57、58、59、60 和 61 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列, 或

(iv) 表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合, 或

(v) (iv)的 LCDR 组合的变体, 所述变体在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

3、权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 HCVR 和/或轻链可变区 LCVR, 其中,

(a) 重链可变区 HCVR

(i)包含与选自 SEQ ID NO:106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成;或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119 和 120 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;

和/或

(b)轻链可变区 LCVR

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 130、131、132、133、134、135、136、137 和 138 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

4、权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链和/或轻链, 其中

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:189、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166 或 167 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中, 更优选地, 所述氨基酸改变不发生在重链可变区中;

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:168、169、170、171、172、173、174、175 或 176 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中, 更优选地, 所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

5、抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其具有以下一个或多个特性：

- (i) 显示与表 5 所列的任一抗体对 OX40（特别是人 OX40）相同或相似的结合亲和力和/或特异性；
- (ii) 抑制(例如，竞争性抑制)表 5 所列的任一抗体与 OX40（特别是人 OX40）的结合；
- (iii) 与表 5 所示的任一抗体结合相同或重叠的表位；
- (iv) 与表 5 所示的任一抗体竞争结合 OX40（特别是人 OX40）；
- (v) 具有表 5 所列的任一抗体分子的一个或多个生物学特性。

6、权利要求 1 至 5 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其具有以下一个或多个特性：

- (i). 能够更好地结合人 OX40，同时较低地阻断人 OX40 与 OX40 配体(OX40L)的结合，并产生增强的免疫应答；
- (ii). 结合人 OX40 或食蟹猴 OX40,并且优选地同时不结合或相比与人或食蟹猴 OX40 的结合更低地结合鼠 OX40，例如大鼠 OX40 或小鼠 OX40；
- (iii). 结合人 OX40 或食蟹猴 OX40 的 K_D 小于大约 200nM, 优选地, 小于或等于大约 20nM、大约 10nM, 更优选地小于或等于大约 5nM, 最优选地, 所述 K_D 小于或等于大约 1nM；
- (iv). 对细胞中表达的人 OX40 或食蟹猴 OX40 的结合具有小于或等于大约 10nM、5nM 或 3nM 的 EC_{50} ；
- (v). 能够活化 T 细胞，例如增强 CD4+效应 T 细胞功能，例如通过提高 CD4+效应 T 细胞增殖和/或提高 CD4+效应 T 细胞的 γ -干扰素（例如 IFN γ 或白细胞介素，例如 IL-2）生成；
- (vi). 提高表达 OX40 的靶细胞中的 OX40 信号转导，优选地，提高 NF κ B 介导的转录活性水平；
- (vii). 具有更好的抗肿瘤活性，例如能够降低受试者中的肿瘤体积，同时不影响受试者的体重。

7、权利要求 1 至 6 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是 IgG1 形式或 IgG2 形式或 IgG4 形式的抗体或抗原结合片段。

8、权利要求 1 至 7 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆抗体。

9、权利要求 1 至 8 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化的抗体或人抗体。

10、权利要求 1 至 9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

11、权利要求 1 至 10 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为双特异性或多特异性抗体分子，优选地，双特异性抗体分子与 OX40 和 PD-1、PD-L1 或 PD-L2 结合。

12、分离的核酸，其编码权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段。

13、包含权利要求 12 的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

14、包含权利要求 13 的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

15、制备抗 OX40 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 14 的宿主细胞，任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗 OX40 抗体或其抗原结合片段。

16、免疫缀合物，其包含权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段和细胞毒性剂。

17、药物组合物，其包含权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段或权利要求 16 的免疫缀合物，以及任选地药用辅料，以及任选地还包含一种或多种其它治疗剂，例如化疗剂、抗血管发生剂(例如贝伐珠单抗)、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

18、在受试者中活化 T 细胞或诱导 T 细胞介导的抗肿瘤活性或增强机体的免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 16 的免疫缀合物、或权利要求 17 的药物组合物。

19、治疗受试者癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 11 中任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 16 的免疫缀合物、或权利要求 17 的药物组合物，优选地，所述癌症是肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌，或结肠癌。

20、权利要求 20 所述的方法，其还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂，优选地，治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法，和/或其它治疗剂选自化疗剂、PD-1 轴结合拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体)或者抗血管发生剂(例如贝伐珠单抗)。

21、检测样品中 OX40 的方法，所述方法包括

(a)将样品与权利要求 1 至 11 中任一项的任何抗 OX40 抗体或其抗原结合片段接触；和

(b)检测抗 OX40 抗体或其抗原结合片段与 OX40 间的复合物的形成；任选地，抗 OX40 抗体是被可检测地标记的。

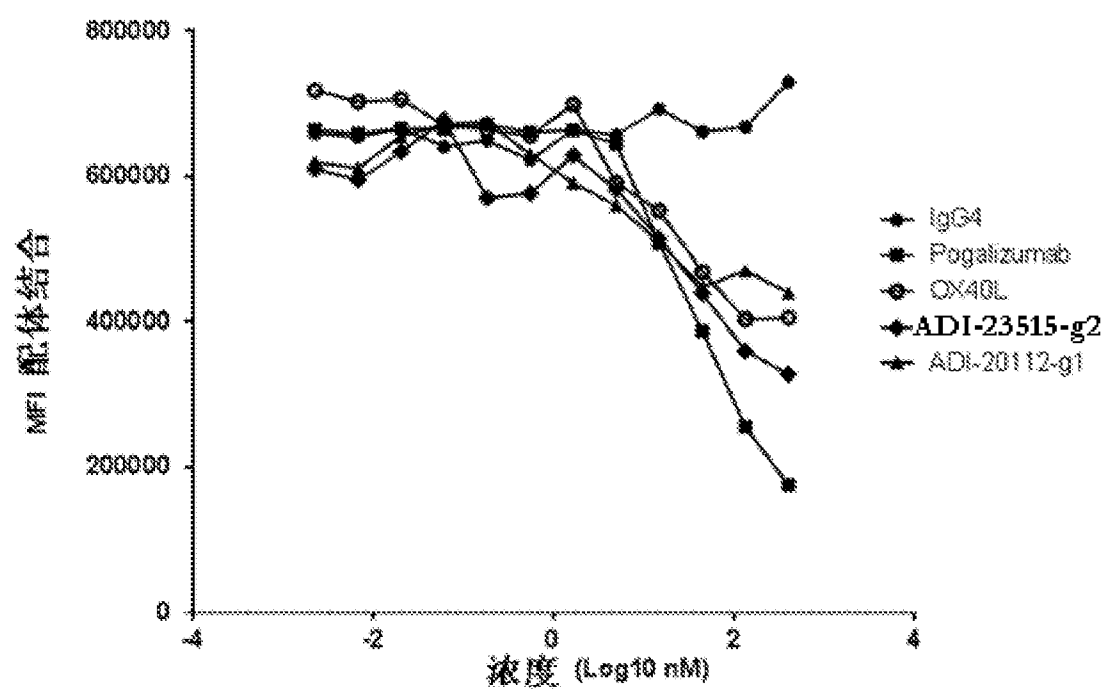


图 1

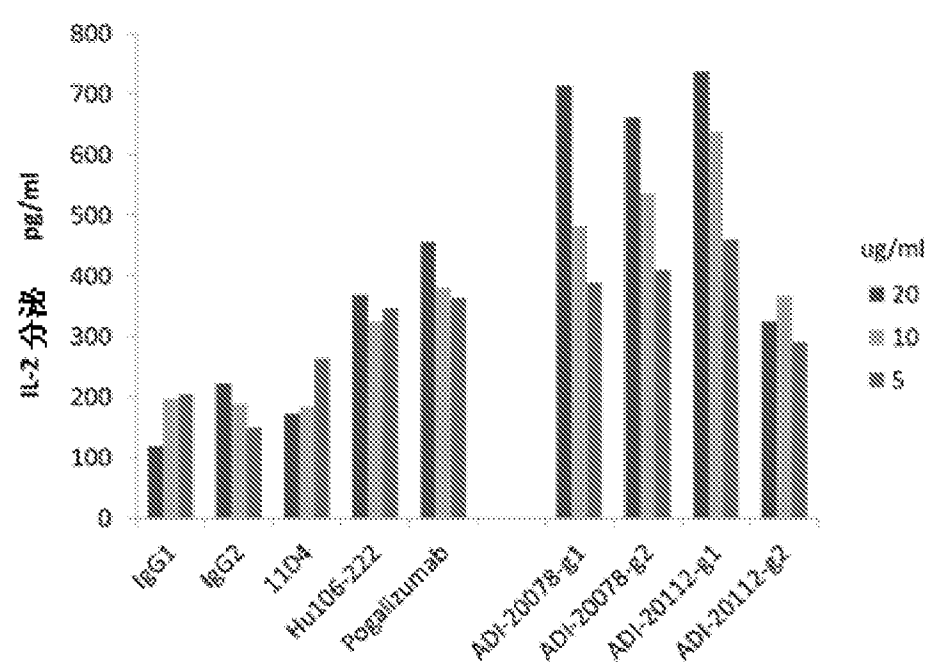


图 2

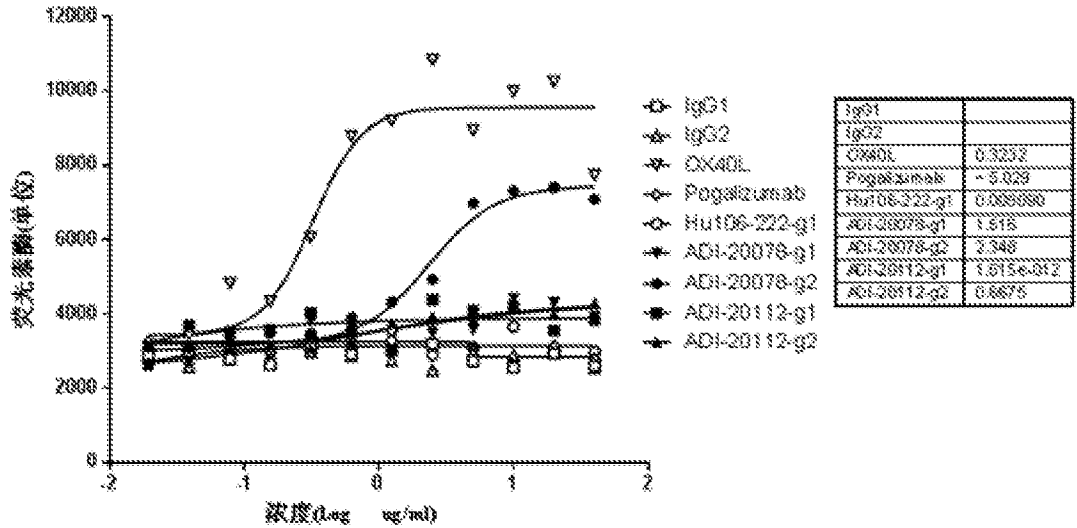


图 3

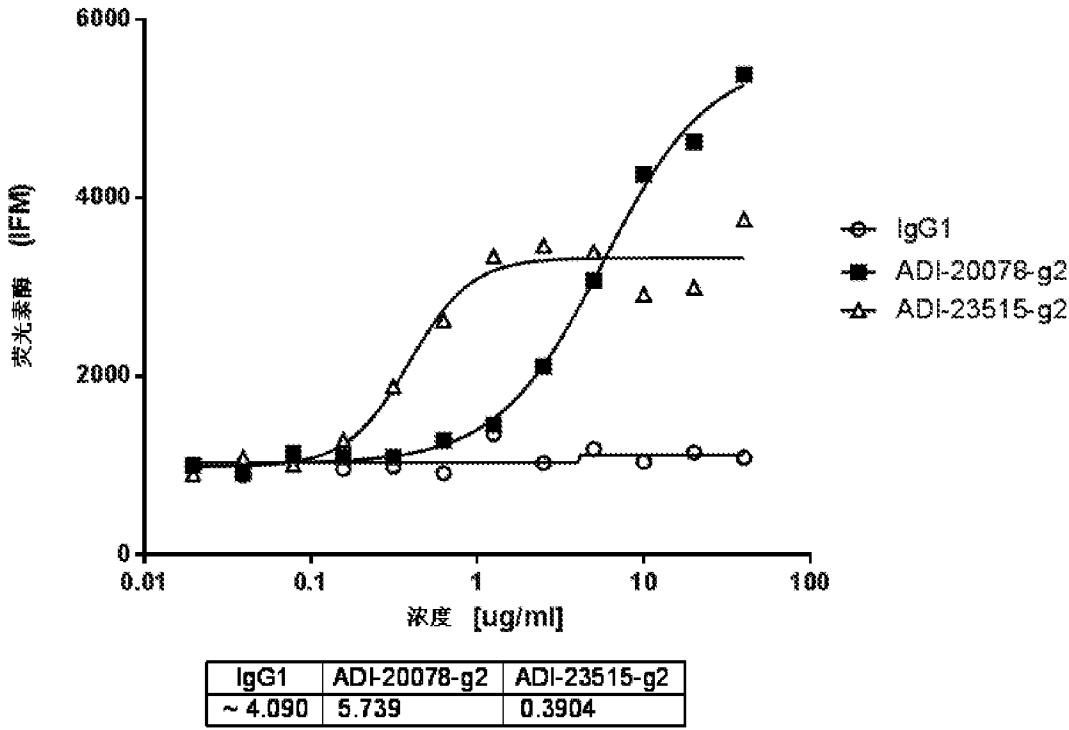


图 4

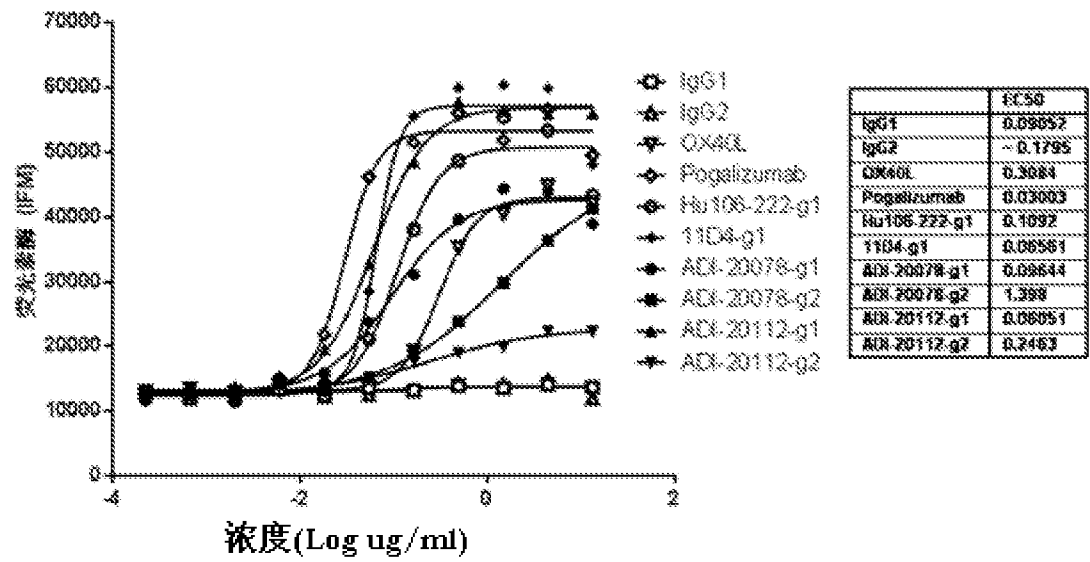


图 5

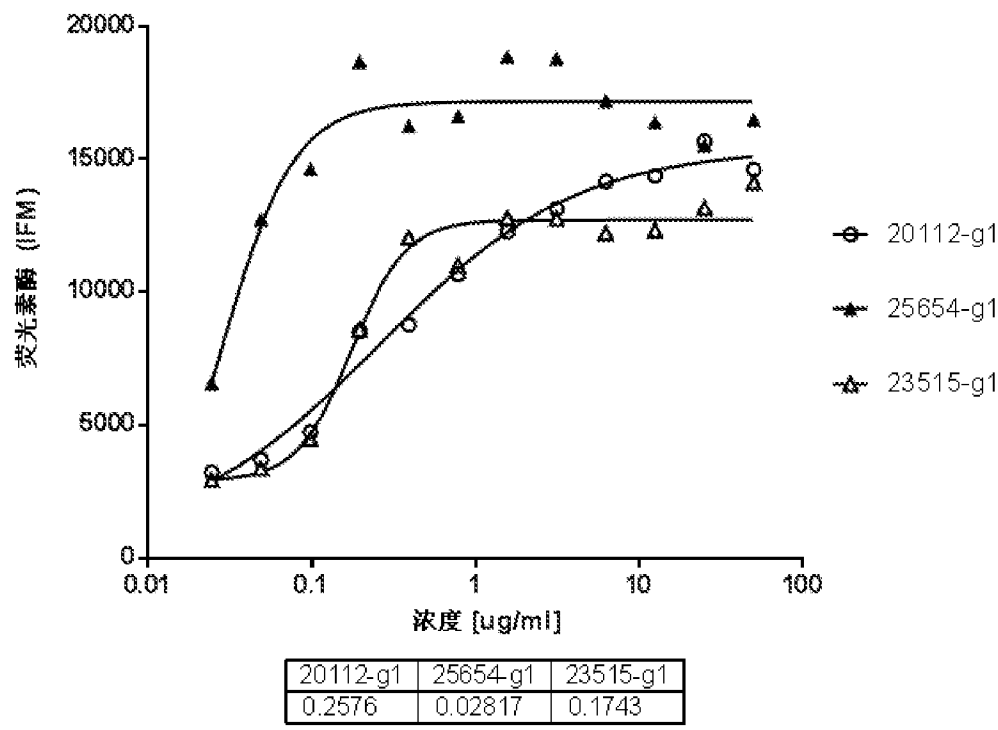


图 6

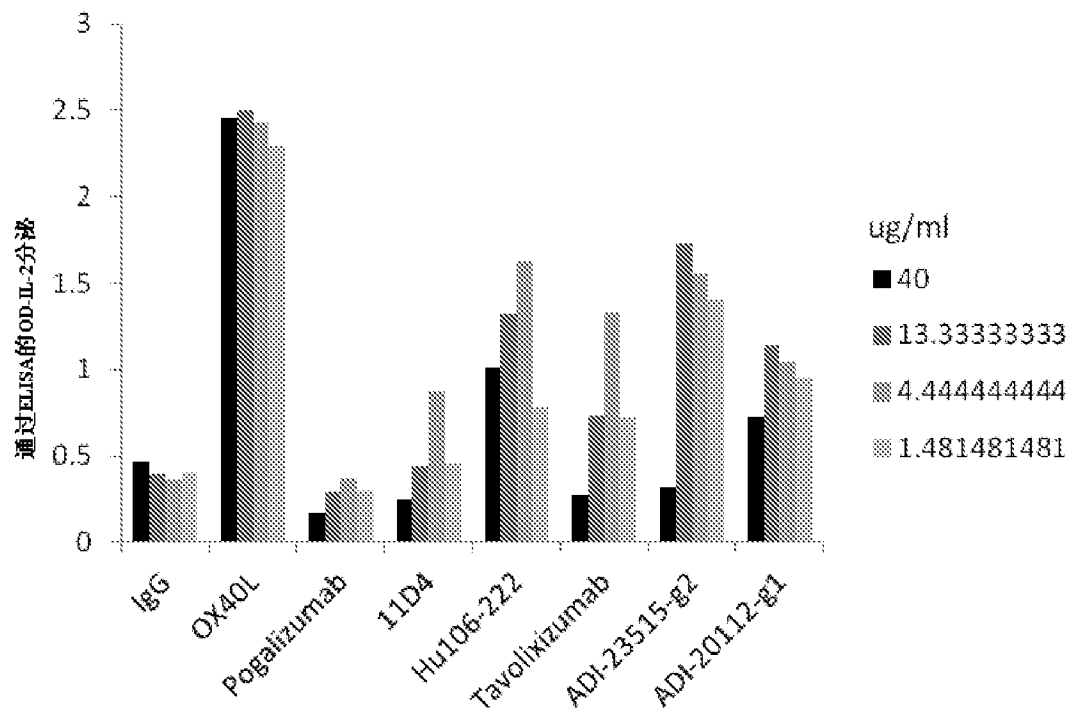


图 7

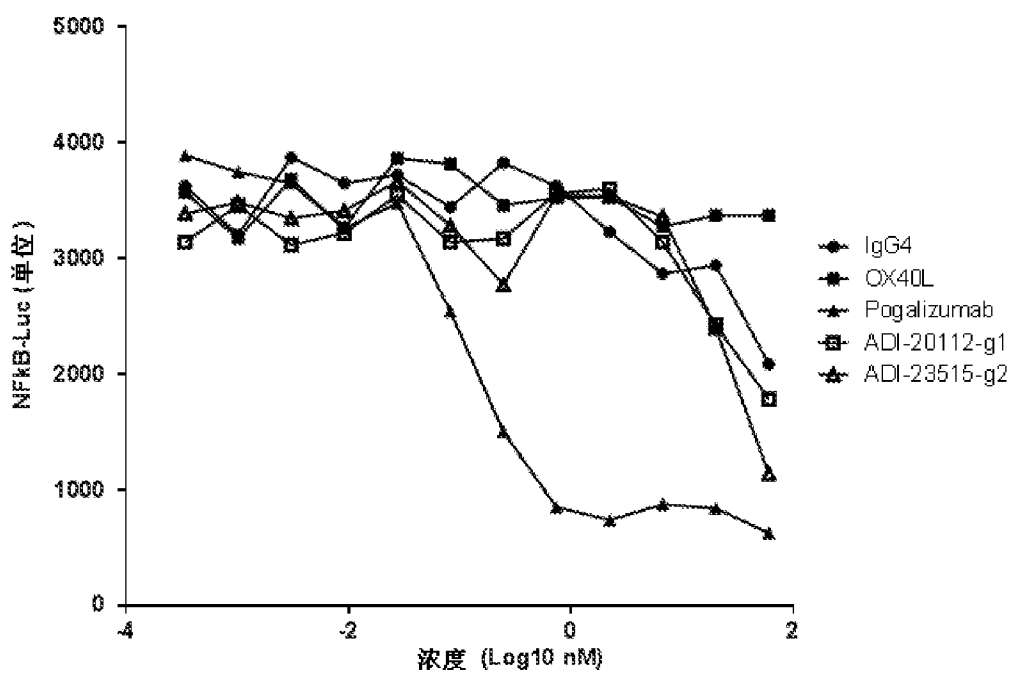


图 8

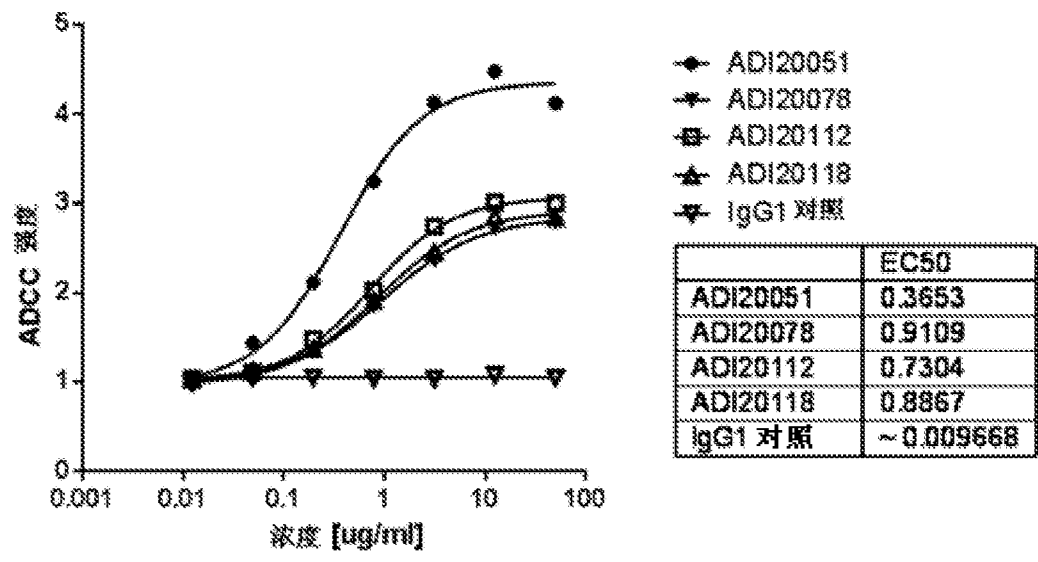


图 9

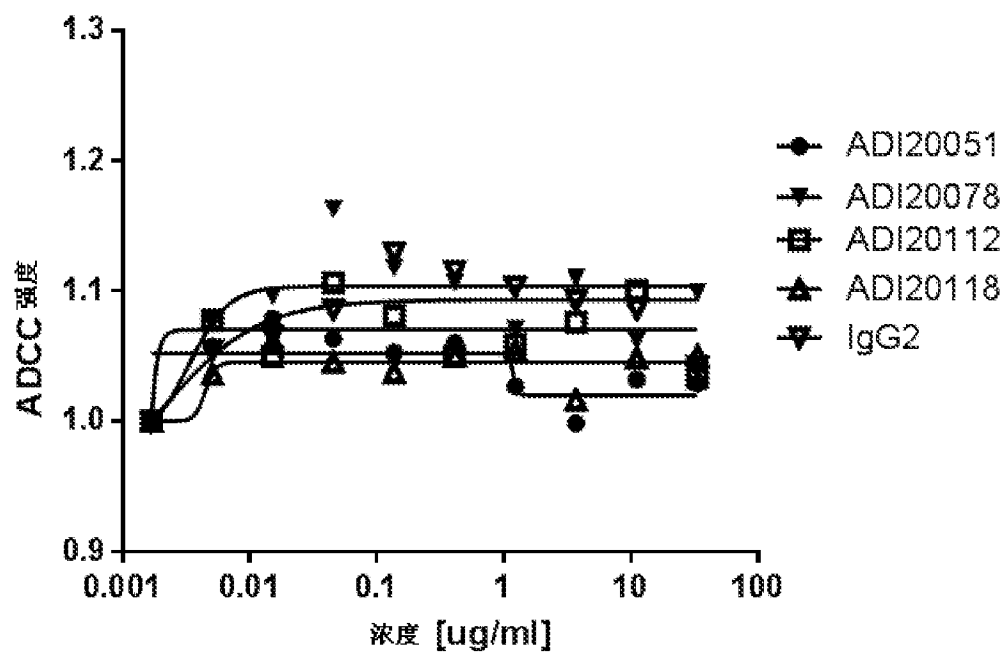


图 10

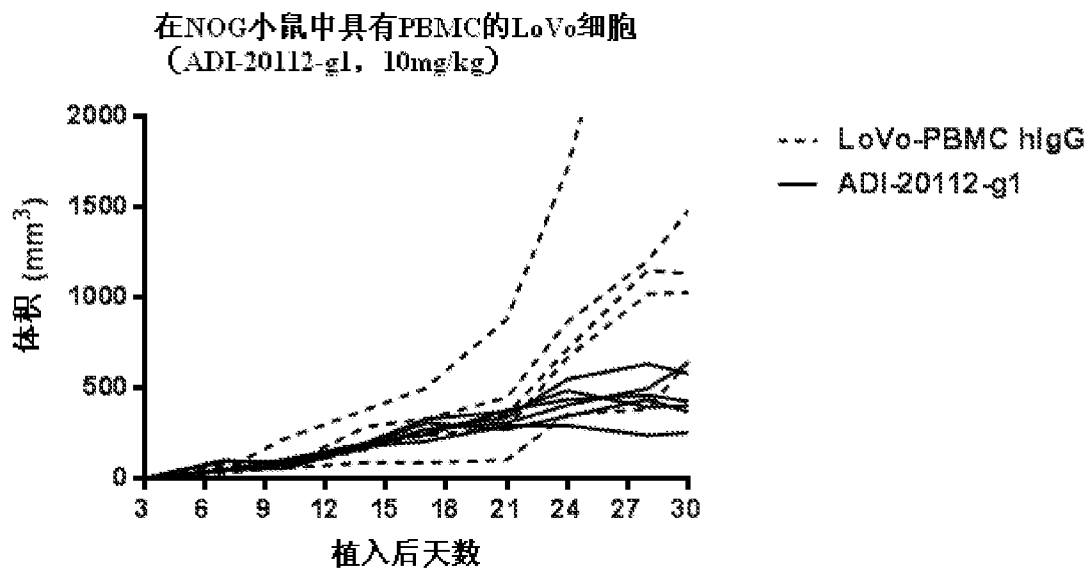


图 11

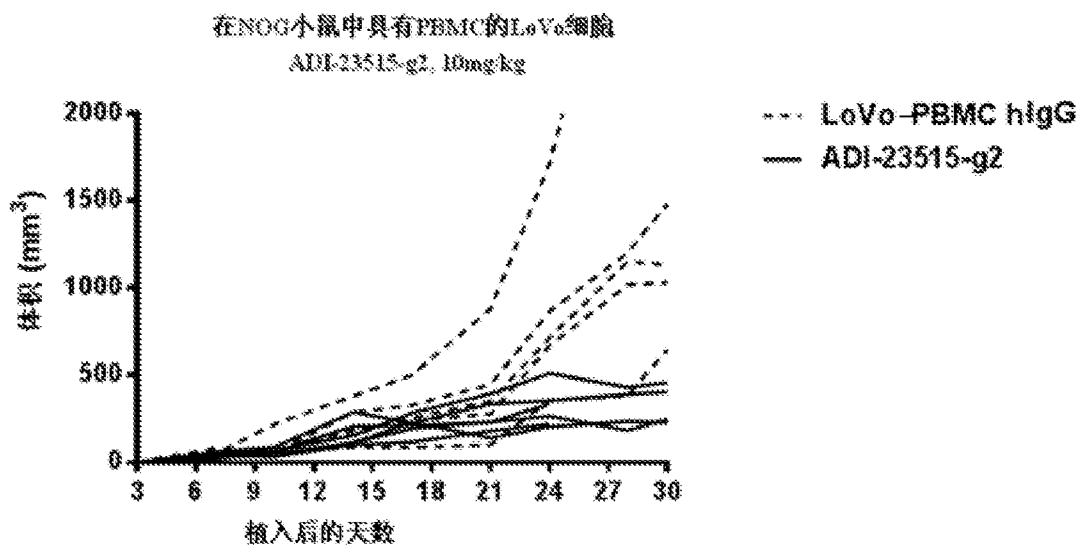


图 12

在NOG中的LoVo中的OX40单一疗法的效力
(平均, 肿瘤植入后第 28 天)

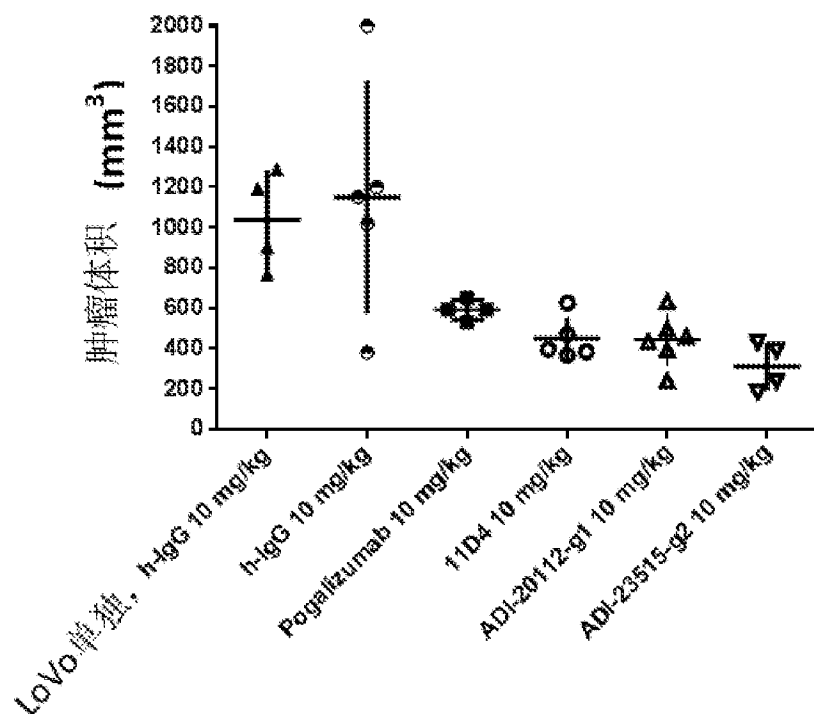


图 13

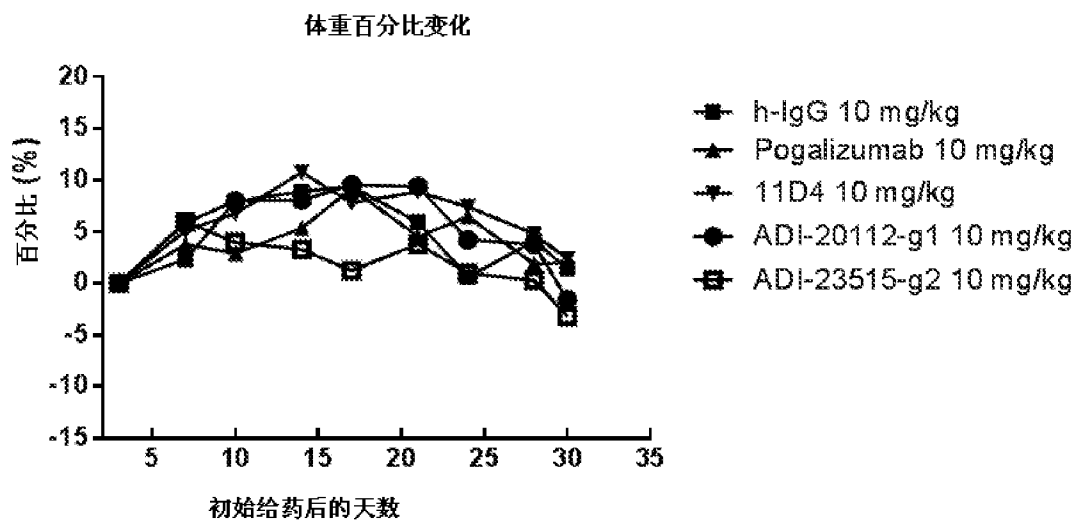


图 14

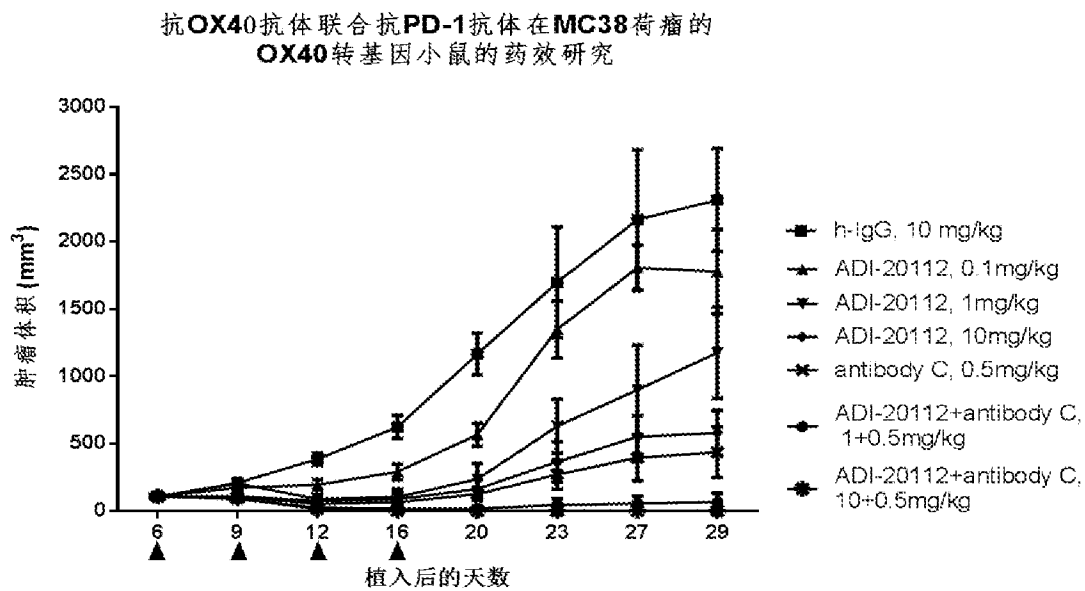


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/080315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CNPAT and search terms: OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, 抗体;

DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; PUBMED; ISI of webscience; EMBASE and search terms: OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, antibod+;

GENBANK; EMBL; NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: SEQ ID NO: 1-6, 17-23, 41, 47, 53

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105229032 A (BIOCEROS B.V.; JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC.), 06 January 2016 (06.01.2016), entire document	1-4, 6-21 (partial)
A	WO 2016196228 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY), 08 December 2016 (08.12.2016), entire document	1-4, 6-21 (partial)
A	WO 2016179517 A1 (AGENUS INC. et al.), 10 November 2016 (10.11.2016), entire document	1-4, 6-21 (partial)
A	CHEN, Mingshui et al., "PLGA-Nanoparticle Mediated Delivery of Anti-OX40 Monoclonal Antibody Enhances Anti-Tumor Cytotoxic T Cell Responses", Cellular Immunology, 287(2), 01 February 2014 (01.02.2014), pages 91-99	1-4, 6-21 (partial)

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 June 2018	Date of mailing of the international search report 27 June 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YUE, Lixi Telephone No. 86-(010)-62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/080315

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4 and 6-21 (partial)

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/080315

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] PCT Rule 39.1(iv) - methods for the treatment of the human or an animal body by surgery or therapy.
 - [2] This international search is specific to the following subject matter after reasonably predicted amendments: an anti-OX40 antibody or an antigen-binding fragment thereof of any one of claims 1-11, and a use of an immune conjugate of claim 16 or a pharmaceutical composition of claim 17 in preparing a related medicine.
 - [3] The statement and explanations with regard to novelty, inventive step and industrial applicability are provided based on the subject matter after reasonably predicted amendments.
2. ☒ Claims Nos.: 5
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
 - [1] claim 5 relates to an antibody which shows a same or similar binding affinity and/or specificity with an antibody listed in table 5 to OX40 (particularly human OX40), inhibits (for example, competitively inhibits) a combination of any one of antibody listed in table 5 with OX40 (particularly human OX40), combines with any one of antibody shown in table 5 to a same or overlapping epitope, competes to any one of antibody shown in table 5 to combine with OX40 (particularly human OX40), and has one or more biological characteristics of any antibody molecule shown in table 5. However, the description does not provide any epitope respectively combining to an antibody shown in table 5, and the other specific antibody except for antibodies listed in table 5 satisfying the defined requirement of claim 5. Therefore, claim 5 is not supported by the description, and does not comply with PCT Article 6.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

[1] invention 1: claims 1-4 and 6-21 (partial) relate to an antibody or an antigen binding fragment thereof of sequence of LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 41, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 47 and LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 53, an encoding nucleic acid thereof, a vector comprising said nucleic acid, a host cell, a method for preparing said antibody or an antigen-binding fragment thereof, and a related use of an immune conjugate comprising said antibody, a pharmaceutical composition and said antibody or said antigen-binding fragment thereof.

[2] Inventions 2-9: claims 1-4 and 6-21 (partial), respectively relate to an antibody or an antigen binding fragment thereof of sequence of LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 42, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 48, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 54, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 43, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 49, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 55, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 44, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 50, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 56, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 45, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 51, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 57, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 42, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 52, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 58, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 43, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 49, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 59, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 46, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 49, LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 60, LCDR1 as shown in SEQ ID NO: 41, LCDR2 as shown in SEQ ID NO: 47 and LCDR3 as shown in SEQ ID NO: 61, and an encoding nucleic acid thereof, a vector comprising said nucleic acid, a host cell, a method for preparing said antibody or an antigen-binding fragment thereof, and a related use of an immune conjugate comprising said antibody, a pharmaceutical composition and said antibody or said antigen-binding fragment thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/080315

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105229032 A	06 January 2016	CA 2907436 A1	25 September 2014
		US 9790281 B2	17 October 2017
		PE 06902016 A1	14 August 2016
		PH 12015502185 A1	25 January 2016
		ZA 201507021 B	30 November 2016
		CR 20150498 A	30 March 2016
		AU 2014238546 A1	01 October 2015
		SG 10201708048X A	30 October 2017
		EA 201591495 A1	31 May 2016
		SG 11201507781V A	29 October 2015
		MD 20150102 A2	29 February 2016
		JP 2016515544 A	30 May 2016
		WO 2014148895 A1	25 September 2014
		MX 2015013288 A	07 April 2016
		IL 241701 D0	30 November 2015
		US 2017369586 A1	28 December 2017
		EP 2976361 A1	27 January 2016
		KR 20160006168 A	18 January 2016
		HK 1215035 A1	12 August 2016
		CL 2015002793 A1	23 September 2016
WO 2016196228 A1	08 December 2016	US 2014377284 A1	25 December 2014
		EP 3303396 A1	11 April 2018
		UY 36687 A	30 November 2016
		KR 20180010264 A	30 January 2018
		US 2016347849 A1	01 December 2016
		TW 201708255 A	01 March 2017
		US 2017306035 A1	26 October 2017
		AU 2016271111 A1	07 December 2017
		US 9644032 B2	09 May 2017
		MX 2017015041 A	26 February 2018
		PH 12017502129 A1	02 April 2018
		IL 255949 D0	31 January 2018
		CA 2987410 A1	08 December 2016
		IL 255278 D0	31 December 2017
WO 2016179517 A1	10 November 2016	KR 20180015650 A	13 February 2018
		AU 2016256911 A1	16 November 2017
		EP 3292152 A1	14 March 2018
		CA 2984794 A1	10 November 2016
		US 2016347847 A1	01 December 2016
		SG 11201708804W A	29 November 2017
		PH 12017502013 A1	02 April 2018
		TW 201713694 A	16 April 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/080315

A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI; CNPAT和检索词: OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, 抗体; DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; PUBMED; ISI of webscience; EMBASE和检索词: OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, antibod+; GENBANK; EMBL; 中国专利生物序列检索系统: SEQ ID NO: 1-6, 17-23, 41, 47, 53																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 105229032 A (比奥塞罗克斯产品公司 杨森制药公司) 2016年 1月 6日 (2016 - 01 - 06) 全文</td> <td>1-4, 6-21(部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016196228 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2016年 12月 8日 (2016 - 12 - 08) 全文</td> <td>1-4, 6-21(部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016179517 A1 (AGENUS INC等) 2016年 11月 10日 (2016 - 11 - 10) 全文</td> <td>1-4, 6-21 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CHEN, Mingshui et al. "PLGA-nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxic T cell responses" Cellular Immunology, 第287卷, 第2期, 2014年 2月 1日 (2014 - 02 - 01), 第91-99页</td> <td>1-4, 6-21 (部分)</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 105229032 A (比奥塞罗克斯产品公司 杨森制药公司) 2016年 1月 6日 (2016 - 01 - 06) 全文	1-4, 6-21(部分)	A	WO 2016196228 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2016年 12月 8日 (2016 - 12 - 08) 全文	1-4, 6-21(部分)	A	WO 2016179517 A1 (AGENUS INC等) 2016年 11月 10日 (2016 - 11 - 10) 全文	1-4, 6-21 (部分)	A	CHEN, Mingshui et al. "PLGA-nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxic T cell responses" Cellular Immunology, 第287卷, 第2期, 2014年 2月 1日 (2014 - 02 - 01), 第91-99页	1-4, 6-21 (部分)
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 105229032 A (比奥塞罗克斯产品公司 杨森制药公司) 2016年 1月 6日 (2016 - 01 - 06) 全文	1-4, 6-21(部分)															
A	WO 2016196228 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2016年 12月 8日 (2016 - 12 - 08) 全文	1-4, 6-21(部分)															
A	WO 2016179517 A1 (AGENUS INC等) 2016年 11月 10日 (2016 - 11 - 10) 全文	1-4, 6-21 (部分)															
A	CHEN, Mingshui et al. "PLGA-nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxic T cell responses" Cellular Immunology, 第287卷, 第2期, 2014年 2月 1日 (2014 - 02 - 01), 第91-99页	1-4, 6-21 (部分)															
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2018年 6月 4日		国际检索报告邮寄日期 2018年 6月 27日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 岳礼溪 电话号码 86-(010)-62411096															

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☒ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 18-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
 - [1] PCT实施细则39.1(iv)——治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。
 - [2] 国际检索将针对以下合理预期修改的主题：权利要求1至11中任一项的抗OX40抗体或其抗原结合片段、权利要求16的免疫缀合物或权利要求17的药物组合物在制备相关药物中的用途。
 - [3] 关于新颖性、创造性和工业实用性的声明和解释是基于该合理预期修改的主题作出的。
2. ☒ 权利要求： 5
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
 - [1] 权利要求5涉及显示与表5所列的抗体对OX40(特别是人OX40)相同或相似的结合亲和力和/或特异性、抑制(例如，竞争性抑制)表5所列的任一抗体与OX40(特别是人OX40)的结合、与表5所示的任一抗体结合相同或重叠的表位、与表5所示的任一抗体竞争结合OX40(特别是人OX40)、具有表5所列的任一抗体分子的一个或多个生物学特性的抗体。而说明书中并未给出表5所列的抗体分别结合的表位以及满足权利要求5限定要求的除表5所列抗体外的其他任何具体的抗体，因此，权利要求5得不到说明书的支持，不符合PCT条约第6条的规定。
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 第1项：权利要求1- 4, 6-21(部分)，涉及包含序列如SEQ ID NO: 41所示的LCDR1、SEQ ID NO: 47所示的LCDR2、SEQ ID NO: 53所示的LCDR3的抗体或其抗原结合片段，其编码核酸、包含所述核酸的载体、宿主细胞，制备所述抗体或其抗原结合片段的方法，包含所述抗体的免疫缀合物、药物组合物以及所述抗体或其抗原结合片段的相关用途。
- [2] 第2-9项：权利要求1- 4, 6-21(部分)，分别涉及包含序列如SEQ ID NO: 42所示的LCDR1、SEQ ID NO: 48所示的LCDR2、SEQ ID NO: 54所示的LCDR3，SEQ ID NO: 43所示的LCDR1、SEQ ID NO: 49所示的LCDR2、SEQ ID NO: 55所示的LCDR3，SEQ ID NO: 44所示的LCDR1、SEQ ID NO: 50所示的LCDR2、SEQ ID NO: 56所示的LCDR3，SEQ ID NO: 45所示的LCDR1、SEQ ID NO: 51所示的LCDR2、SEQ ID NO: 57所示的LCDR3，SEQ ID NO: 42所示的LCDR1、SEQ ID NO: 52所示的LCDR2、SEQ ID NO: 58所示的LCDR3，SEQ ID NO: 43所示的LCDR1、SEQ ID NO: 49所示的LCDR2、SEQ ID NO: 59所示的LCDR3，SEQ ID NO: 46所示的LCDR1、SEQ ID NO: 49所示的LCDR2、SEQ ID NO: 60所示的LCDR3，或SEQ ID NO: 41所示的LCDR1、SEQ ID NO: 47所示的LCDR2、SEQ ID NO: 61所示的LCDR3的抗体或其抗原结合片段，其编码核酸、包含所述核酸的载体、宿主细胞，制备所述抗体或其抗原结合片段的方法，包含所述抗体的免疫缀合物、药物组合物以及所述抗体或其抗原结合片段的相关用途。

第III栏

缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 1-4， 6-21（部分）

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/080315

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	105229032	A	2016年 1月 6日	CA	2907436	A1	2014年 9月 25日
				US	9790281	B2	2017年 10月 17日
				PE	06902016	A1	2016年 8月 14日
				PH	12015502185	A1	2016年 1月 25日
				ZA	201507021	B	2016年 11月 30日
				CR	20150498	A	2016年 3月 30日
				AU	2014238546	A1	2015年 10月 1日
				SG	10201708048X	A	2017年 10月 30日
				EA	201591495	A1	2016年 5月 31日
				SG	11201507781V	A	2015年 10月 29日
				MD	20150102	A2	2016年 2月 29日
				JP	2016515544	A	2016年 5月 30日
				WO	2014148895	A1	2014年 9月 25日
				MX	2015013288	A	2016年 4月 7日
				IL	241701	D0	2015年 11月 30日
				US	2017369586	A1	2017年 12月 28日
				EP	2976361	A1	2016年 1月 27日
				KR	20160006168	A	2016年 1月 18日
				HK	1215035	A1	2016年 8月 12日
				CL	2015002793	A1	2016年 9月 23日
				US	2014377284	A1	2014年 12月 25日
WO	2016196228	A1	2016年 12月 8日	EP	3303396	A1	2018年 4月 11日
				UY	36687	A	2016年 11月 30日
				KR	20180010264	A	2018年 1月 30日
				US	2016347849	A1	2016年 12月 1日
				TW	201708255	A	2017年 3月 1日
				US	2017306035	A1	2017年 10月 26日
				AU	2016271111	A1	2017年 12月 7日
				US	9644032	B2	2017年 5月 9日
				MX	2017015041	A	2018年 2月 26日
				PH	12017502129	A1	2018年 4月 2日
				IL	255949	D0	2018年 1月 31日
				CA	2987410	A1	2016年 12月 8日
				WO	2016179517	A1	2016年 11月 10日
KR	20180015650	A	2018年 2月 13日				
AU	2016256911	A1	2017年 11月 16日				
EP	3292152	A1	2018年 3月 14日				
CA	2984794	A1	2016年 11月 10日				
US	2016347847	A1	2016年 12月 1日				
SG	11201708804W	A	2017年 11月 29日				
PH	12017502013	A1	2018年 4月 2日				
TW	201713694	A	2017年 4月 16日				

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)