



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114729051 A

(43) 申请公布日 2022.07.08

(21) 申请号 202080081256.3

(22) 申请日 2020.11.19

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2019/120021 2019.11.21 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2020/129965 2020.11.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/098749 EN 2021.05.27

(71) 申请人 百济神州(北京)生物科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区科学园路30院1
号楼1-2层

(72) 发明人 蒋蓓蓓 刘晔 宋晓敏

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页
序列表12页 附图16页

(54) 发明名称

使用抗OX40抗体与放射组合治疗癌症的方法

(57) 摘要

提供了使用与人OX40 (ACT35、CD134或
TNFRSF4) 结合的非竞争性抗OX40抗体及其抗原
结合片段与放射疗法的组合治疗癌症的方法。

1. 一种癌症治疗的方法,该方法包括向受试者施用有效量的非竞争性抗OX40抗体或其抗原结合片段与至少一剂放射疗法的组合。

2. 如权利要求1所述的方法,其中该抗OX40抗体与人OX40特异性结合,并且包含:

(i) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR(重链互补决定区)1、(b) SEQ ID NO:24的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含(d) SEQ ID NO:25的LCDR(轻链互补决定区)1、(e) SEQ ID NO:19的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;

(ii) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1、(b) SEQ ID NO:18的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:19的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;

(iii) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1, (b) SEQ ID NO:13的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:7的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;或

(iv) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1、(b) SEQ ID NO:4的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:7的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3。

3. 如权利要求2所述的方法,其中该OX40抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 含有SEQ ID NO:26的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:28的轻链可变区(VL);

(ii) 含有SEQ ID NO:20的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:22的轻链可变区(VL);

(iii) 含有SEQ ID NO:14的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:16的轻链可变区(VL);

或

(iv) 含有SEQ ID NO:9的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:11的轻链可变区(VL)。

4. 如权利要求1所述的方法,其中该至少一剂放射疗法包含2-80戈瑞(Gy)。

5. 如权利要求1所述的方法,其中该放射疗法是分次放射疗法。

6. 如权利要求5所述的方法,其中该分次放射疗法包含2-10个分次。

7. 如权利要求6所述的方法,其中该分次放射疗法包含5个分次,30Gy。

8. 如权利要求7所述的方法,其中该分次放射疗法包含3个分次,27Gy。

9. 如权利要求4-8中任一项所述的方法,其中紧接该放射疗法之前0.5-4周施用该抗OX40抗体。

10. 如权利要求4-8中任一项所述的方法,其中在该放射疗法之前、与其同时、或在其之后施用该抗OX40抗体。

11. 如权利要求10所述的方法,其中在该放射疗法之前施用该抗OX40抗体。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中与单独抗OX40抗体或放射的施用相比,该组合的施用产生增加的治疗功效。

13. 如权利要求12所述的方法,其中增加的治疗功效包含选自由以下组成的组的效应:癌症消退、远隔效应、转移的抑制、转移癌的减少、化学治疗剂或细胞毒性剂的停用、无进展生存期的增加、总生存期的增加、完全应答、部分应答和疾病稳定。

14. 如权利要求13所述的方法,其中该增加的治疗功效包含在经辐照的肿瘤远端的肿瘤中的肿瘤消退。

15. 如权利要求7所述的方法,其中该受试者对先前的疗法有抗性或在先前的疗法后复发。

16. 如权利要求1所述的方法,其中该癌症包含实体瘤。

17. 如权利要求16所述的方法,其中该实体瘤选自由以下组成的组:结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、子宫内膜癌、骨癌、睾丸癌、皮肤癌、肾癌、胃癌、食管癌、唾液腺癌、以及骨髓瘤。

18. 如权利要求16所述的方法,其中该实体瘤选自由以下组成的组:肝细胞癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、软骨肉瘤、血管肉瘤、胆管癌、软组织肉瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、以及多形性胶质母细胞瘤。

使用抗OX40抗体与放射组合治疗癌症的方法

技术领域

[0001] 本文披露了使用与人OX40结合的抗体或其抗原结合片段与放射疗法的组合治疗癌症的方法。

背景技术

[0002] OX40 (也称为ACT35、CD134或TNFRSF4) 是一种大约50KD的I型跨膜糖蛋白并且是肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF) 的成员 (Croft, 2010; Gough和Weinberg, 2009)。成熟人OX40由249个氨基酸 (AA) 残基组成, 具有37个AA胞质尾区和185个AA细胞外区域。OX40的细胞外结构域含有三个完整的富含半胱氨酸的结构域 (CRD) 和一个不完整的富含半胱氨酸的结构域。OX40的细胞内结构域含有一种保守的信号传导相关的QEE基序, 该基序介导与几种TNFR相关因子 (TRAF) (包括TRAF2、TRAF3以及TRAF5) 的结合, 允许OX40与细胞内激酶连接 (Arch和Thompson, 1998; Willoughby等人, 2017)。

[0003] OX40最初是在活化的大鼠CD4⁺T细胞发现的, 并且随后从T细胞克隆鼠和人同源物 (al-Shamkhani等人, 1996; Calderhead等人, 1993)。除了在活化的CD4⁺T细胞 (包括T辅助 (Th) 1细胞、Th2细胞、Th17细胞以及调节性T (Treg) 细胞) 上表达外, 还在活化的CD8⁺T细胞、自然杀伤 (NK) T细胞、嗜中性粒细胞以及NK细胞的表面上发现了OX40表达 (Croft, 2010)。相比之下, 在初始CD4⁺和CD8⁺T细胞以及在大多静息记忆T细胞上发现低的OX40表达 (Croft, 2010; Soroosh等人, 2007)。初始T细胞上的OX40的表面表达是瞬时的。在TCR活化后, T细胞上的OX40表达在24小时内大大增加, 并在2-3天内达到峰值, 持续5-6天 (Gramaglia等人, 1998)。

[0004] OX40配体 (OX40L, 也称为gp34、CD252或TNFSF4) 是OX40的唯一配体。与其他TNFSF (肿瘤坏死因子超家族) 成员相似, OX40L是II型糖蛋白, 含有183个AA (具有23个AA细胞内结构域和133个AA细胞外结构域) (Croft, 2010; Gough和Weinberg, 2009)。OX40L在细胞表面上天然形成同源三聚体复合物。配体三聚体在配体单体-单体界面上, 主要通过受体的CRD1、CRD2以及部分CRD3区域 (但不涉及CRD4) 与三个拷贝的OX40相互作用 (Compaan和Hymowitz, 2006)。OX40L主要在活化的抗原呈递细胞 (APC) (包括活化的B细胞 (Stuber等人, 1995)、成熟常规树突状细胞 (DC) (Ohshima等人, 1997)、浆细胞样DC (pDC) (Ito等人, 2004)、巨噬细胞 (Weinberg等人, 1999) 以及朗格汉斯细胞 (Sato等人, 2002)) 上表达。此外, 已发现OX40L在其他细胞类型上表达, 如NK细胞、肥大细胞、活化的T细胞的亚群以及血管内皮细胞和平滑肌细胞 (Croft, 2010; Croft等人, 2009)。

[0005] 通过由三聚体OX40L连接的OX40三聚化或通过激动性抗体的二聚化有助于衔接分子TRAF2、TRAF3和/或TRAF5向其细胞内QEE基序的募集和对接 (Arch和Thompson, 1998; Willoughby等人, 2017)。TRAF2和TRAF3的募集和对接可以进一步导致经典的NF- κ B1途径和非经典的NF- κ B2途径的活化, 其在调节T细胞的存活、分化、扩增、细胞因子产生以及效应子功能中起关键作用 (Croft, 2010; Gramaglia等人, 1998; Huddleston等人, 2006; Rogers等人, 2001; Ruby和Weinberg, 2009; Song等人, 2005a; Song等人, 2005b; Song等人, 2008)。

[0006] 在正常组织中,OX40表达量低并且主要在淋巴器官中的淋巴细胞上表达(Durkop等人,1995)。然而,在动物模型和具有病理病症(Redmond和Weinberg,2007)(如自身免疫性疾病(Carboni等人,2003;Jacquemin等人,2015;Szypowska等人,2014)和癌症(Kjaergaard等人,2000;Vetto等人,1997;Weinberg等人,2000))的人类患者中,均已频繁观察到OX40在免疫细胞上表达上调。值得注意的是,增加的OX40表达与患有结直肠癌和皮肤黑色素瘤的患者的更长存活期相关,并且与远端转移和更晚期的肿瘤特征的发生呈负相关(Ladanyi等人,2004;Petty等人,2002;Sarff等人,2008)。还已显示抗OX40抗体治疗可以在不同小鼠模型中引起抗肿瘤功效(Aspesslagh等人,2016),表明OX40作为免疫治疗靶标的潜力。在由Curti等人进行的癌症患者首次临床试验中,用激动性抗OX40单克隆抗体观察到抗肿瘤功效和肿瘤特异性T细胞的活化的证据,表明OX40抗体在增强抗肿瘤T细胞应答中具有效用(Curti等人,2013)。

[0007] 已主要在小鼠肿瘤模型中研究了激动性抗OX40抗体在介导抗肿瘤功效中的作用机理(Weinberg等人,2000)。直到最近,才将激动性抗OX40抗体在肿瘤中的作用机理归因于它们触发效应T细胞中共刺激信号传导途径的能力,以及对Treg细胞的分化和功能的抑制作用(Aspesslagh等人,2016;Ito等人,2006;St Rose等人,2013;Voo等人,2013)。最近的研究已显示在动物肿瘤模型和癌症患者两者中,肿瘤浸润Treg表达的OX40水平高于效应T细胞(CD4⁺和CD8⁺)和外周Treg(Lai等人,2016;Marabelle等人,2013b;Montler等人,2016;Soroosh等人,2007;Timperi等人,2016)。因此,抗OX40抗体触发抗肿瘤应答的继发效应依赖于它们通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)耗减肿瘤内OX40⁺Treg细胞的Fc介导的效应子功能(Aspesslagh等人,2016;Bulliard等人,2014;Marabelle等人,2013a;Marabelle等人,2013b;Smyth等人,2014)。这项工作证明具有Fc介导的效应子功能的激动性抗OX40抗体可以优先耗减肿瘤内Treg,并且改善在肿瘤微环境(TME)中CD8⁺效应T细胞与Treg的比率,导致改善的抗肿瘤免疫应答、增加的肿瘤消退以及改善的存活(Bulliard等人,2014;Carboni等人,2003;Jacquemin等人,2015;Marabelle等人,2013b)。基于这些发现,开发具有激动性活性和Fc介导的效应子功能的激动性抗OX40抗体的医疗需求尚未满足。

[0008] 迄今为止,临床上的激动性抗OX40抗体主要是阻断OX40-OX40L相互作用的配体竞争性抗体(例如WO 2016196228 A1)。由于OX40-OX40L相互作用对增强有效的抗肿瘤免疫力至关重要,因此OX40-OX40L的阻断限制了这些配体竞争性抗体的功效。因此,与OX40特异性结合而不干扰OX40与OX40L相互作用的OX40激动剂抗体在治疗癌症和自身免疫性障碍中具有效用。

发明内容

[0009] 本披露的发明人已经发现,抗OX40抗体与放射疗法的组合与单独使用单一疗法或放射疗法相比,对癌症中的肿瘤生长产生了显著的抑制。

[0010] 本披露涉及活化OX40并在免疫细胞中诱导信号传导,从而促进抗肿瘤免疫力的激动性抗OX40抗体及其抗原结合片段。

[0011] 在一个实施例中,提供了与人OX40结合的激动性单克隆抗体或其抗原结合片段。在一方面,本披露的抗体不与OX40L竞争或不干扰OX40与其配体OX40L的结合。

[0012] 本披露涵盖以下实施例。

[0013] 一种癌症治疗的方法,该方法包括向受试者施用有效量的非竞争性抗OX40抗体或其抗原结合片段与至少一剂放射疗法的组合。

[0014] 该方法,其中该抗OX40抗体与人OX40特异性结合,并且包含:

(i) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR(重链互补决定区)1、(b) SEQ ID NO:24的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含(d) SEQ ID NO:25的LCDR(轻链互补决定区)1、(e) SEQ ID NO:19的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;

(ii) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1、(b) SEQ ID NO:18的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:19的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;

(iii) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1、(b) SEQ ID NO:13的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:7的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3;或

(iv) 重链可变区,该重链可变区包含(a) SEQ ID NO:3的HCDR1、(b) SEQ ID NO:4的HCDR2、以及(c) SEQ ID NO:5的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:6的LCDR1、(e) SEQ ID NO:7的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:8的LCDR3。

[0015] 该方法,其中该OX40抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 含有SEQ ID NO:26的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:28的轻链可变区(VL);

(ii) 含有SEQ ID NO:20的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:22的轻链可变区(VL);

(iii) 含有SEQ ID NO:14的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:16的轻链可变区(VL);或

(iv) 含有SEQ ID NO:9的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:11的轻链可变区(VL)。

[0016] 该方法,其中该至少一剂放射疗法包含2-80戈瑞(Gy)。

[0017] 该方法,其中该放射疗法是分次放射疗法。

[0018] 该方法,其中该分次放射疗法包含2-10个分次。

[0019] 该方法,其中该分次放射疗法包含5个分次,30Gy。

[0020] 该方法,其中该分次放射疗法包含3个分次,27Gy。

[0021] 该方法,其中在紧接的前一放射疗法后0.5-4周施用该抗OX40抗体。

[0022] 该方法,其中在该放射疗法之前、与其同时、或在其之后施用该抗OX40抗体。

[0023] 该方法,其中在该放射疗法之前施用该抗OX40抗体。

[0024] 该方法,其中与单独抗OX40抗体或放射的施用相比,该组合的施用产生增加的治疗功效。

[0025] 该方法,其中增加的治疗功效包含选自由以下组成的组的效应:癌症消退、远隔效应、转移的抑制、转移癌的减少、化学治疗剂或细胞毒性剂的停用、无进展生存期的增加、总生存期的增加、完全应答、部分应答和疾病稳定。

[0026] 该方法,其中该增加的治疗功效包含在经辐照的肿瘤远端的肿瘤中的肿瘤消退。

[0027] 该方法,其中该受试者对先前的疗法有抗性或在先前的疗法后复发。

[0028] 该方法,其中该癌症包含实体瘤。

[0029] 该方法,其中该实体瘤选自由以下组成的组:结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、子宫内膜癌、骨癌、睾丸癌、皮肤癌、肾癌、胃癌、食管癌、唾液腺癌、以及骨髓瘤。

[0030] 该方法,其中该实体瘤选自由以下组成的组:肝细胞癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、软骨肉瘤、血管肉瘤、胆管癌、软组织肉瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、以及多形性胶质母细胞瘤。

[0031] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含一个或多个互补决定区(CDR),这些互补决定区具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24以及SEQ ID NO:25。

[0032] 在另一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:(a)含有一个或多个互补决定区(HCDR)的重链可变区,这些互补决定区具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24以及SEQ ID NO:5;和/或(b)含有一个或多个互补决定区(LCDR)的轻链可变区,这些互补决定区具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:19以及SEQ ID NO:8。

[0033] 在另一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:(a)含有三个互补决定区(HCDR)的重链可变区,这些互补决定区是具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1;具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2;以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和/或(b)包含三个互补决定区(LCDR)的轻链可变区,这些互补决定区是具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1;具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2;以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0034] 在另一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:(a)含有三个互补决定区(HCDR)的重链可变区,这些互补决定区是具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;或具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和/或(b)包含三个互补决定区(LCDR)的轻链可变区,这些互补决定区是具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3;或具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3;或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0035] 在另一个实施例中,本披露的抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,该重链可变

区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0036] 在一个实施例中,本披露的抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0037] 在另一个实施例中,本披露的抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0038] 在另一个实施例中,本披露的抗体或抗原结合片段包含:重链可变区,该重链可变区包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR2、以及具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包含具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的LCDR2、以及具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0039] 在一个实施例中,本披露的抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区,该重链可变区具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26中的任一个具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;和/或(b)轻链可变区,该轻链可变区具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28中的任一个具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0040] 在另一个实施例中,本披露的抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区,该重链可变区具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:26的氨基酸序列中具有一个、两个或三个氨基酸取代的氨基酸序列;和/或(b)轻链可变区,该轻链可变区具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或在SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的氨基酸序列中具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸取代的氨基酸序列。在另一个实施例中,这些氨基酸取代是保守氨基酸取代。

[0041] 在一个实施例中,本披露的抗体或其抗原结合片段包含:

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

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

(c)具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:22的氨基

酸序列的轻链可变区;或

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

[0042] 在一个实施例中,本披露的抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在更特定的实施例中,本披露的抗体包含野生型人IgG1(也称为人IgG1wt或huIgG1)或IgG2的Fc结构域。在另一个实施例中,本披露的抗体包含具有S228P和/或R409K取代(根据EU编号系统)的人IgG4的Fc结构域。

[0043] 在一个实施例中,本披露的抗体以 1×10^{-6} M至 1×10^{-10} M的结合亲和力(K_D)与OX40结合。在另一个实施例中,本披露的抗体以约 1×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M、约 1×10^{-8} M、约 1×10^{-9} M或约 1×10^{-10} M的结合亲和力(K_D)与OX40结合。

[0044] 在另一个实施例中,本披露的抗人OX40抗体显示对食蟹猴OX40的跨物种结合活性。

[0045] 在一个实施例中,本披露的抗OX40抗体在OX40-OX40L相互作用界面外与人OX40的表位结合。在另一个实施例中,本披露的抗OX40抗体不与OX40配体竞争结合OX40。在又一个实施例中,本披露的抗OX40抗体不阻断OX40和其配体OX40L之间的相互作用。

[0046] 本披露的抗体是激动性的,并且显著增强免疫应答。在实施例中,在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中,本披露的抗体可以显著刺激原代T细胞以产生IL-2。

[0047] 在一个实施例中,本披露的抗体具有强的Fc介导的效应子功能。抗体通过NK细胞介导针对OX40^{Hi}靶细胞(如调节性T细胞(Treg细胞))的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一方面,本披露提供了基于不同的OX40表达水平,评估抗OX40抗体介导的体外特异性T细胞亚群的耗减的方法。

[0048] 本披露的抗体或抗原结合片段不阻断OX40-OX40L相互作用。此外,如动物模型中所示,OX40抗体表现出体内剂量依赖性抗肿瘤活性。该剂量依赖性活性与阻断OX40-OX40L相互作用的抗OX40抗体的活性特征有区别。

[0049] 本披露涉及分离的核酸,这些分离的核酸包含编码该抗体或抗原结合片段的氨基酸序列的核苷酸序列。在一个实施例中,分离的核酸包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、或SEQ ID NO:27的VH核苷酸序列,或与SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:21、或SEQ ID NO:27具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列,并且编码本披露的抗体或抗原结合片段的VH区。可替代地或另外地,分离的核酸包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、或SEQ ID NO:29的VL核苷酸序列,或与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:23、或SEQ ID NO:29具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列,并且编码本披露的抗体或抗原结合片段的VL区。

[0050] 在另一方面,本披露涉及包含OX40抗体或其抗原结合片段和任选地药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

附图说明

[0051] 图1是OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His构建体的示意图。OX40 ECD:OX40细胞外结构域。N:N-末端。C:C-末端。

[0052] 图2显示通过表面等离子体共振(SPR)测定纯化嵌合(ch445)和人源化(445-1、

445-2、445-3和445-3IgG4) 抗OX40抗体的亲和力。

[0053] 图3证明了通过流式细胞术测定OX40结合。将OX40阳性HuT78/OX40细胞与不同抗OX40抗体(抗体ch445、445-1、445-2、445-3和445-3IgG4) 孵育,并进行FACS分析。通过平均荧光强度(MFI,Y轴) 示出结果。

[0054] 图4显示通过流式细胞术的OX40抗体的结合。将HuT78/OX40和HuT78/cynoOX40细胞用抗体445-3染色,并通过流式细胞术确定平均荧光强度(MFI,在Y轴上示出)。

[0055] 图5描绘了通过表面等离子体共振(SPR) 测定445-3Fab对OX40野生型和点突变体的亲和力。

[0056] 图6显示抗体445-3与其在OX40上的表位之间的详细相互作用。分别以浅灰色和黑色描绘抗体445-3和OX40。氢键或盐桥、 π - π 堆积和范德华力(VDW) 相互作用分别用虚线、双虚线以及实线表示。

[0057] 图7证明了抗体445-3不干扰OX40L结合。在HEK293/OX40L细胞染色之前,将OX40小鼠IgG2a(OX40-mIgG2a) 融合蛋白与人IgG(+HuIgG)、抗体445-3(+445-3) 或抗体1A7.gr1(+1A7.gr1,参见US 2015/0307617),以1:1的摩尔比预孵育。通过HEK293/OX40L细胞和OX40-mIgG2a/抗OX40抗体复合物共孵育,随后与抗小鼠IgG二级Ab反应,以及流式细胞术确定OX40L与OX40-mIgG2a/抗OX40抗体复合物的结合。结果以两次重复的平均值 \pm SD表示。统计学显著性: *:P<0.05; **:P<0.01。

[0058] 图8显示了OX40/445-3Fab与报道的OX40/OX40L复合物(PDB代码:2HEV) 的结构比对。OX40L显示为白色,445-3Fab显示为灰色,并且OX40显示为黑色。

[0059] 图9A-B显示抗OX40抗体445-3联合TCR刺激诱导IL-2产生。在抗OX40抗体存在下,将OX40阳性HuT78/OX40细胞(图9A) 与人工抗原呈递细胞(APC) 系(HEK293/OS8^低-Fc γ RI) 共培养过夜,并将IL-2产生用作T细胞刺激的读数(图9B)。通过ELISA检测培养上清液中的IL-2。结果以三次重复的平均值 \pm SD表示。

[0060] 图10表示抗OX40抗体增强了MLR应答。在抗OX40抗体(0.1-10 μ g/ml) 存在下,将体外分化的树突状细胞(DC) 与同种异体CD4⁺T细胞共培养2天。通过ELISA检测上清液中的IL-2。所有测试一式四份进行,并且结果显示为平均值 \pm SD。统计学显著性: *:P<0.05; **:P<0.01。

[0061] 图11证明了抗OX40抗体445-3诱导ADCC。在抗OX40抗体(0.004-3 μ g/ml) 或对照存在下,使用NK92MI/CD16V细胞(作为效应细胞) 和HuT78/OX40细胞(作为靶细胞) 进行ADCC测定。在检测乳酸脱氢酶(LDH) 释放之前,将相同数量的效应细胞和靶细胞共培养5小时。基于如实例12中所述的制造商的方案计算细胞毒性的百分比(Y轴)。结果以三次重复的平均值 \pm SD表示。

[0062] 图12A-12C显示抗OX40抗体445-3与NK细胞的组合增加了体外活化的PBMC中CD8⁺效应T细胞与Treg的比率。将人PBMC通过PHA-L(1 μ g/ml) 预活化,并且然后在抗OX40抗体或对照存在下与NK92MI/CD16V细胞共培养。通过流式细胞术确定不同T细胞亚群的百分比。进一步计算CD8⁺效应T细胞与Treg的比率。图12A显示CD8⁺/总T细胞的比率。图12B是Treg/总T细胞比率。图12C显示CD8⁺/Treg比率。数据以两次重复的平均值 \pm SD表示。显示指定浓度下445-3和1A7.gr1之间的统计学显著性: *:P<0.05; **:P<0.01。

[0063] 图13A-13B显示在OX40人源化小鼠的MC38结直肠癌同基因模型中,抗OX40抗体

445-3 (而不是1A7.gr1) 展示剂量依赖性抗肿瘤活性。将MC38鼠结肠癌细胞 (2×10^7) 皮下植入雌性人OX40转基因小鼠中。根据肿瘤体积随机化后, 如所示, 每周一次将抗OX40抗体或同种型对照腹腔内注射到动物中, 共三次。图13A比较了增加剂量的445-3抗体和增加剂量的1A7.gr1抗体, 以及肿瘤生长的降低。图13B展示所有用特定剂量治疗的小鼠的数据。数据表示为每组6只小鼠的平均肿瘤体积 \pm 平均值的标准差 (SEM)。统计学显著性: * : $P < 0.05$ 相对于同种型对照。

[0064] 图14A-14B是OX40抗体中进行的氨基酸改变的表。

[0065] 图15显示在小鼠胶质瘤 (GL261) 模型中使用OX40抗体与放射组合的治疗。

定义

[0066] 除非在本文件的其他地方具体定义, 否则本文所用的所有其他技术和科学术语具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0067] 如本文所用的, 包括所附权利要求, 除非上下文另外明确说明, 否则例如“一个”、“一种”和“该”的单数形式包括它们相应的复数指代。

[0068] 除非上下文另外明确说明, 否则术语“或”意指术语“和/或”并且可与术语“和/或”互换使用。

[0069] 如本文所用的, 术语“抗癌剂”是指可用于治疗细胞增殖性障碍 (如癌症) 的任何药剂, 包括但不限于细胞毒性剂、化学治疗剂、放射疗法和放射治疗剂、靶向性抗癌剂、和免疫治疗剂。

[0070] 术语“OX40”是指一种大约50KD的I型跨膜糖蛋白, 其是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。OX40也称为ACT35、CD134或TNFRSF4。人OX40的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 也可在登录号NP_003318中找到, 并且编码OX40蛋白的核苷酸序列的登录号为: X75962.1。术语“OX40配体”或“OX40L”是指OX40的唯一配体, 并且可以与gp34、CD252或TNFSF4互换。

[0071] 本文中的术语“施用 (administration, administering)”和“治疗 (treating, treatment)”, 当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时, 意指外源性药物的、治疗的、诊断的药剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体接触。细胞的处理涵盖试剂与细胞的接触以及试剂与流体的接触, 其中该流体与细胞接触。术语“施用”和“治疗”还意指通过试剂、诊断剂、结合化合物或另一种细胞进行的例如细胞的体外和离体处理。本文中的术语“受试者”包括任何生物, 优选动物, 更优选哺乳动物 (例如, 大鼠、小鼠、狗、猫、兔), 最优选人。在一方面, 治疗任何疾病或障碍是指改善该疾病或障碍 (即, 减缓或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一方面, “治疗 (treat/treating/treatment)”是指缓解或改善至少一个身体参数, 包括患者可能无法辨别的那些。在又另一方面, “治疗 (treat/treating/treatment)”是指在身体上 (例如, 可辨别症状的稳定化)、在生理上 (例如, 身体参数的稳定化) 或两者上调节疾病或障碍。在又另一方面, “治疗 (treat/treating/treatment)”是指预防或延迟疾病或障碍的发作或发展或进展。

[0072] 在本披露的上下文中, 术语“受试者”是哺乳动物, 例如, 灵长类动物, 优选高等灵长类动物, 例如人 (例如, 患有本文所述的障碍或处于患有本文所述的障碍的风险的患者)。

[0073] 如本文所用的, 术语“亲和力”是指抗体和抗原之间相互作用的强度。在抗原内, 抗体“臂 (arm)”的可变区通过非共价力与抗原在许多位点相互作用; 相互作用越多, 亲和力越强。

[0074] 如本文所用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白家族的多肽,其可以非共价地、可逆地和以特异性方式结合相应的抗原。例如,天然存在的IgG抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的四聚体。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间插有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0075] 术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和抗独特型(抗Id)抗体。抗体可以是任何同种型/类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0076] 在一些实施例中,这些抗OX40抗体包含至少一个抗原结合位点或至少一个可变区。在一些实施例中,这些抗OX40抗体包含来自本文所述的OX40抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,该抗OX40抗体是分离的或重组的。

[0077] 本文中的术语“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”是指基本上同质的抗体的群体,即,除了可能少量存在的可能天然发生的突变外,该群体中包含的抗体分子在氨基酸序列上是相同的。相比之下,常规(多克隆)抗体制剂典型地包括在其可变结构域中具有不同氨基酸序列的多种不同抗体,特别地其互补决定区(CDR),它们通常对不同的表位具有特异性。修饰语“单克隆”指示获得自基本上均质的抗体群体的抗体的特征并且不应理解为要求通过任何特定方法产生抗体。可以通过本领域技术人员已知的方法获得单克隆抗体(mAb)。参见,例如Kohler等人,Nature[自然]1975 256:495-497;美国专利号4,376,110;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY[分子生物学现代方法]1992;Harlow等人,ANTIBODIES:ALABORATORY MANUAL[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室]1988;以及Colligan等人,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY[当代免疫学方案]1993。本文披露的抗体可以是任何免疫球蛋白类别(包括IgG、IgM、IgD、IgE、IgA),及其任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。产生单克隆抗体的杂交瘤可以在体外或在体内培养。高效价的单克隆抗体可以在体内产生中获得,其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射到小鼠中,例如原始引发的Balb/c小鼠,以产生含有高浓度所需抗体的腹水。可以使用本领域技术人员熟知的柱层析方法从这样的腹水,或从培养上清液中纯化同种型IgM或IgG的单克隆抗体。

[0078] 通常,基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。重链的羧基末端部分可以定义为主要负责效应子功能的恒定区。典型地,人轻链被分类为 κ 和 λ 轻链。此外,人重链典型地分类为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约10个以上氨基酸的“D”区。

[0079] 每个轻链/重链 (VL/VH) 对的可变区形成抗体结合位点。因此,一般而言,完整抗体具有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体外,一般而言两个结合位点是相同的。

[0080] 典型地,重链和轻链的可变结构域包含三个高变区,也称为“互补决定区 (CDR)”,其位于相对保守的框架区 (FR) 之间。CDR通常由框架区对齐,使得能够结合特异性表位。一般而言,从N-末端到C-末端,轻链和重链可变结构域两者都包含FR-1 (或FR1)、CDR-1 (或CDR1)、FR-2 (FR2)、CDR-2 (CDR2)、FR-3 (或FR3)、CDR-3 (CDR3) 和FR-4 (或FR4)。CDR和框架区的位置可以使用本领域熟知的多种定义确定,例如卡巴特 (Kabat)、乔西亚 (Chothia) 和AbM (参见,例如Johnson等人,Nucleic Acids Res. [核酸研究],29:205-206 (2001);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol. [分子生物学杂志],196:901-917 (1987);Chothia等人,Nature [自然],342:877-883 (1989);Chothia等人,J.Mol.Biol. [分子生物学杂志],227:799-817 (1992);Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol. [分子生物学杂志],273:927-748 (1997))。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述:Ruiz等人,Nucleic Acids Res. [核酸研究],28:219-221 (2000);和Lefranc,M.P.,Nucleic Acids Res. [核酸研究],29:207-209 (2001);MacCallum等人,J.Mol.Biol. [分子生物学杂志],262:732-745 (1996);和Martin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA [美国国家科学院院刊],86:9268-9272 (1989);Martin等人,Methods Enzymol. [酶学方法],203:121-153 (1991);和Rees等人,在Sternberg M.J.E. (编),Protein Structure Prediction [蛋白质结构预测],Oxford University Press [牛津大学出版社],牛津,141-172 (1996) 中。在组合的卡巴特和乔西亚编号方案中,在一些实施例中,CDR对应于为Kabat CDR、Chothia CDR或两者的一部分的氨基酸残基。例如,CDR对应于VH (例如,哺乳动物VH,例如人VH) 中的氨基酸残基26-35 (HC CDR1)、50-65 (HC CDR2) 和95-102 (HC CDR3);和VL (例如,哺乳动物VL,例如人VL) 中的氨基酸残基24-34 (LC CDR1)、50-56 (LC CDR2) 和89-97 (LC CDR3)。

[0081] 术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“CDR” (即,轻链可变结构域中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3以及重链可变结构域中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3) 的氨基酸残基。参见,Kabat等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫学上感兴趣的蛋白质序列],第5版Public Health Service [公共卫生署],National Institutes of Health [国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州 (通过序列定义抗体的CDR区);还参见Chothia和Lesk (1987) J.Mol.Biol. [分子生物学杂志]196:901-917 (通过结构定义抗体的CDR区)。术语“框架”或“FR”残基意指除了本文定义为CDR残基的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

[0082] 除非另外说明,否则“抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段,即保留与全长抗体结合的抗原特异性结合的能力的抗体片段,例如保留一个或多个CDR区的片段。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子 (例如,单链Fv (ScFv));纳米抗体以及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0083] 抗体“特异性结合”靶蛋白,是指与其他蛋白相比,抗体表现出优先结合靶标,但这种特异性不需要绝对的特异性。如果抗体的结合决定了样品中靶蛋白的存在,例如,没有产生不希望的结果,如假阳性,则抗体被认为是对其预期靶标为“特异性的”。可用于本披露的抗体或其抗原结合片段会以比非靶蛋白的亲和力高至少2倍,优选高至少10倍,更优选高至少20倍,和最优选高至少100倍的亲和力结合至靶蛋白。将本文的抗体称作与包含给定

氨基酸序列(例如人OX40分子的氨基酸序列)的多肽特异性结合,如果其与包含该序列的多肽结合但不与缺乏该序列的蛋白质结合。

[0084] 本文中的术语“人抗体”意指仅包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果在小鼠、小鼠细胞或源自小鼠细胞的杂交瘤中产生,人抗体可以含有鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”意指分别仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。

[0085] 术语“人源化抗体”意指含有来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含基本上至少一个、并且典型地两个可变结构域的全部,其高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。当有必要区分人源化抗体与亲本啮齿动物抗体时,将前缀“hum”、“hu”、“Hu”或“h”添加到抗体克隆名称中。人源化形式的啮齿动物抗体会通常包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,但是可包括某些氨基酸取代以增加亲和力,增加人源化抗体的稳定性,除去翻译后修饰或出于其他原因。

[0086] 如本文所用的,术语“非竞争性”意指抗体可以与受体结合并且不干扰同源配体与受体的结合。

[0087] 术语“相应的人种系序列”是指编码人可变区氨基酸序列或亚序列的核酸序列,与由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的所有其他已知可变区氨基酸序列相比,其与参考可变区氨基酸序列或亚序列具有最高确定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列也可以指与所有其他评估的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或亚序列具有最高氨基酸序列同一性的人可变区氨基酸序列或亚序列。相应的人种系序列可以仅是框架区,仅互补决定区,框架和互补决定区,可变区段(如上定义),或包含可变区的序列或亚序列的其他组合。可以使用本文所述的方法确定序列同一性,例如使用BLAST、ALIGN或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0088] 术语“平衡解离常数(K_D, M)”是指解离速率常数($k_d, \text{时间}^{-1}$)除以缔合速率常数($k_a, \text{时间}^{-1}, M^{-1}$)。平衡解离常数可以使用本领域任何已知的方法测量。本披露的抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 $10^{-8}M$,例如小于约 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$,在一些方面,小于约 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 或 $10^{-13}M$ 的平衡解离常数。

[0089] 本文中的术语“癌症”或“肿瘤”具有如本领域理解的最广泛的含义,并且是指哺乳动物中典型地以不受调控的细胞生长为特征的生理病症。在本披露的上下文中,癌症不限于某个类型或位置。

[0090] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗本披露中所述的治疗病症或障碍。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂。这种施用也涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器(例如,胶囊、粉末和液体)中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所需剂量。此外,这种施用也涵盖在大致相同的时间或在不同的时间以顺序方式使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗本文所述的病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。如本文所用的,短语“与……组合”

意指将抗OX40抗体在施用另外的治疗剂(包括放射)的同时、就在该施用前或就在该施用后施用于受试者。在某些实施例中,将该另外的治疗剂作为与抗OX40抗体的共同配制品施用。

[0091] 在本发明的上下文中,当提及氨基酸序列时,术语“保守取代”意指用新氨基酸取代原始氨基酸,该新氨基酸基本上不改变抗体或片段的化学、物理和/或功能性质,例如其与OX40的结合亲和力。特别地,氨基酸的常见保守取代如下表所示并且是本领域熟知的。

示例性保守氨基酸取代

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

[0092] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的实例是BLAST算法,这些算法分别描述于Altschul等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402,1977;和Altschul等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410,1990中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)披露获得。此算法包括首先通过鉴定查询序列中短字长W鉴定高得分序列对(HSP),当与数据库序列中相同字长比对时,其匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域字得分阈值。这些初始邻域字命中作为开始搜索以找到包含它们的较长HSP的值。字命中沿着每个序列在两个方向上延伸,直到累积比对得分可以增加为止。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;始终>0)和N(错配残基的罚分;始终<0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用得分矩阵来计算累积得分。在以下情况下,将停止字命中在每个方向上的延伸:累积比对得分从其最大实现值下降了数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分趋于零或更低;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。

BLASTN程序(对于核苷酸序列)默认使用字长(W) 11,期望值(E) 10,M=5,N=-4并比较两条链。对于氨基酸序列,BLAST程序默认使用字长3,期望值(E) 10和BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院学报]89:10915)比对(B) 50,期望值(E) 10,M=5,N=-4并比较两条链。

[0093] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院学报]90:5873-5787,1993)。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.2,更优选小于约0.01,最优选小于约0.001,则认为该核酸与参考序列相似。

[0094] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比还可使用以下的算法来确定:E.Meyers和W.Miller,Comput.Appl.Biosci.[生物科学中的计算机应用]4:11-17,(1988),其已并入ALIGN程序(2.0版本),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,可以使用以下确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比:Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:444-453(1970)的算法,其已并入GCG软件包中的GAP程序中,使用BLOSUM62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,并且长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0095] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用,并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知的核苷酸类似物或经修饰的主链残基或连接的核酸,它们是合成的,天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸相似的结合特性,并且以与参考核苷酸相似的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0096] 在核酸的上下文中,术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如DNA)区段之间的功能关系。典型地,它是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如,启动子或增强子序列如果在合适的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则可操作地连接至编码序列。通常,可操作地连接至转录序列的启动子转录调节序列与转录序列在物理上邻接,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调节序列(如增强子)不需要在物理上邻接或紧邻它们增强其转录的编码序列。

[0097] 在一些方面,本披露提供了组合物,例如药学上可接受的组合物,其包含与至少一种药学上可接受的赋形剂一起配制的本文所述的抗OX40抗体。如本文所用的,术语“药学上可接受的赋形剂”包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。赋形剂可适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0098] 本文披露的组合物可以是多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如可注射和输注溶液)、分散液或悬浮液、脂质体和栓剂。合适的形式取决于预期的施用方式和治疗应用。典型的合适组合物是可注射或输注溶液的形式。一种合适的施用方式是肠胃外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一些实施例中,该抗体通过静脉内输注或注射来施用。在某些实施例中,该抗体通过肌内或皮下注射来施用。

[0099] 如本文所用的,术语“治疗有效量”是指当施用于受试者以治疗疾病、或疾病或障

碍的至少一种临床症状时,足以实现该疾病、障碍或症状的这种治疗的抗体或抗体与另一种治疗剂(包括放射)的组合的量。“治疗有效量”可以随抗体,抗体与另一种治疗剂(包括放射)的组合,疾病,障碍,和/或疾病或障碍的症状,疾病、障碍、和/或疾病或障碍的症状的严重程度,待治疗的受试者的年龄,和/或待治疗的受试者的体重而变化。在任何给定情况下的合适量对于本领域技术人员而言是显而易见的,或者可以通过常规实验确定。在组合法的情况下,“治疗有效量”是指用于有效治疗疾病、障碍或病症的组合对象的总量。

[0100] 术语“放射疗法”也称为“XRT”或“全脑放射疗法(WBRT)”,意指使用电离辐射以杀死癌细胞,通常作为抗癌疗法的一部分。X射线、 γ 射线或带电粒子(例如,质子或电子)用于产生电离辐射。放射疗法可以通过放置在患者身体外的机器(外照射放射疗法),或通过放置在患者身体内的来源(内照射放射疗法或近距离放射疗法),或通过静脉内或口服递送的全身放射性同位素(全身放射性同位素疗法)来递送。放射疗法可以与基于成像的技术(如计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI))结合来计划并且施用,以准确地确定待施用的放射的剂量和位置。在各种实施例中,放射疗法选自由以下组成的组:总全身放射疗法、常规外照射放射疗法、立体定向放射外科、立体定向体部放射疗法、3-D适形放射疗法、强度调控放射疗法、图像引导放射疗法、螺旋断层放射疗法系统、近距离放射疗法以及全身放射疗法。根据意图,在某些实施例中,放射疗法是治愈性的、辅助性的或姑息性的。在具体实施例中,术语“放射疗法”是指低分次放射疗法。低分次放射疗法是指其中放射剂量包含在2个或更多个分次中的放射疗法。在各种实施例中,每个分次包含2-20戈瑞(Gy)。例如,50Gy的放射剂量可分成10个分次,每个分次包含5Gy。在某些实施例中,2个或更多个分次在连续或依序的数天施用。在某些其他实施例中,将2个或更多个分次在2天内施用一次、在3天内施用一次、在4天内施用一次、在5天内施用一次、在6天内施用一次、在7天内施用一次、或以其组合施用。

具体实施方式

[0101] 本披露提供了特异性结合人OX40的抗体、抗原结合片段。此外,本披露提供了具有所需的药代动力学特征和其他期望的属性的抗体,并且因此可用于降低癌症的可能性或治疗癌症。本披露进一步提供了包含抗体的药物组合物以及制备和使用此类药物组合物用于预防和治疗癌症和相关障碍的方法。

抗OX40抗体

[0102] 本披露提供了特异性结合OX40的抗体或其抗原结合片段。本披露的抗体或抗原结合片段包括但不限于如下所述产生的抗体或其抗原结合片段。

[0103] 本披露提供了特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有SEQ ID NO:14、20或26的氨基酸序列(表3)的VH结构域。本披露还提供了特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表3中列出的VH CDR中的任一个的氨基酸序列的VH CDR。在一方面,本披露提供了特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包含(或可替代地,由以下组成:)具有表3中列出的VH CDR中的任一个的氨基酸序列的一个、两个、三个或更多个VH CDR。

[0104] 本披露提供了特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:16、22或28的氨基酸序列(表3)的VL结构域。本披露还提供了特异

性结合OX40的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表3中列出的VL CDR中的任一个的氨基酸序列的VL CDR。特别地,本披露提供了特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含(或可替代地,由以下组成:)具有表3中列出的VL CDR中的任一个的氨基酸序列的一个、两个、三个或更多个VL CDR。

[0105] 本披露的其他抗体或其抗原结合片段包括已经突变,但在CDR区中与表3中所述的序列中描绘的CDR区具有至少60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性百分比的氨基酸。在一些方面,其包括突变体氨基酸序列,其中当与表3中所述的序列中描绘的CDR区相比时,在CDR区中突变不超过1、2、3、4或5个氨基酸。

[0106] 本披露的其他抗体包括其中氨基酸或编码这些氨基酸的核酸已经突变;但与表3中所述的序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性百分比的那些。在一些方面,其包括突变体氨基酸序列,其中与表3中所述的序列中描绘的可变区相比,在可变区中突变不超过1、2、3、4或5个氨基酸,同时保持基本上相同的治疗活性。

[0107] 本披露还提供了编码与OX40特异性结合的抗体的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。可以优化此类核酸序列以在哺乳动物细胞中表达。

表位和结合相同表位的抗体的鉴定

[0108] 本披露提供了与人OX40的表位结合的抗体及其抗原结合片段。在某些方面,该抗体和抗原结合片段可以与OX40的相同表位结合。

[0109] 本披露还提供了结合与表3中所述的抗OX40抗体相同的表位的抗体及其抗原结合片段。因此,其他抗体及其抗原结合片段可以基于它们在结合测定中与其他抗体交叉竞争(例如,以统计学显著的方式竞争性抑制其结合)的能力来鉴定。测试抗体抑制本披露的抗体及其抗原结合片段与OX40结合的能力证明测试抗体可与该抗体或其抗原结合片段竞争结合OX40。不受任一种理论的束缚,这种抗体可以与其竞争的抗体或其抗原结合片段结合OX40上的相同或相关(例如,在结构上相似或在空间上邻近)表位。在某些方面,与本披露的抗体或其抗原结合片段结合OX40上的相同表位的抗体是人或人源化单克隆抗体。这种人或人源化单克隆抗体可以如本文所述制备和分离。

对Fc区框架的进一步改变

[0110] 在其他方面,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。此方法描述于例如Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0111] 在另一方面,可以用一个或多个不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法描述于例如Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0112] 在又另一方面,改变一个或多个氨基酸残基从而改变抗体固定补体的能力。该方法描述于例如Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中。在特定的方面,本披露的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸被IgG1亚类和κ同种型的一个或多个同种异型氨基酸残基替代。同种异型氨基酸残基还包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链恒定区以及κ同种型的轻链恒定区,如Jefferis等人,MAbs[单克隆抗体].1:332-338(2009)所述。

[0113] 在另一方面,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力。此方法描述于例如Presta的PCT公开WO 00/42072中。此外,已经绘制了在人IgG1上与Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604,2001)。

[0114] 在仍另一方面,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备无糖基化抗体(即,抗体缺乏或具有降低的糖基化)。例如,可以改变糖基化以增加抗体对“抗原”的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。这种方法描述于例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0115] 另外地或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明此类改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。可以通过例如在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体完成此类糖类修饰。在本领域中已经说明了具有改变的糖基化机构的细胞,并且这些细胞可以用作宿主细胞,在这些宿主细胞中表达重组抗体从而由此产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,该基因编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系、Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖连接至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等人,(2002)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740)。Umaña等人的PCT公开WO 99/54342描述了被工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如, β (1,4)-N乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得在工程化的细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umaña等人,Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-180,1999)。

[0116] 在另一方面,如果所需的ADCC降低,许多先前的报道显示人抗体亚类IgG4仅具有适度的ADCC并且几乎没有CDC效应子功能(Moore G L等人,2010MAbs[单克隆抗体],2:181-189)。另一方面,发现天然IgG4在应激条件下(如在酸性缓冲剂中或在升高的温度下)较不稳定(Angal,S.1993Mol Immunol[分子免疫学],30:105-108;Dall'Acqua,W.等人,1998Biochemistry[生物化学],37:9266-9273;Aalberse等人,2002Immunol[免疫学],105:9-19)。降低的ADCC可以通过将抗体可操作地连接至用具有降低或无效的Fc γ R结合或C1q结合活性的改变的组合工程化的IgG4,从而降低或消除ADCC和CDC效应子功能来实现。考虑到抗体作为生物药物的物理化学性质,IgG4的较不需要的固有特性之一是其两条重链在溶液中动态分离以形成半抗体,这导致通过称为“Fab臂交换”的过程在体内产生双特异性抗体(Van der Neut Kolfshoten M等人,2007Science[科学],317:1554-157)。228位(EU编号系统)丝氨酸突变为脯氨酸表现出对IgG4重链分离的抑制作用(Angal,S.1993Mol Immunol[分子免疫学],30:105-108;Aalberse等人,2002Immunol[免疫学],105:9-19)。据报道,铰链区和 γ Fc区中的一些氨基酸残基对抗体与Fc γ 受体的相互作用具有影响(Chappel S M等人,1991Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院学报],88:9036-9040;

Mukherjee, J. 等人, 1995 FASEB J [美国实验生物学学会联合会杂志], 9:115-119; Armour, K.L. 等人, 1999 Eur J Immunol [欧洲免疫学杂志], 29:2613-2624; Clynes, R.A. 等人, 2000 Nature Medicine [自然医学], 6:443-446; Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol [免疫学年鉴], 25:21-50)。此外, 在人群中一些罕见的IgG4同种型也可引起不同的物理化学特性 (Brusco, A. 等人, 1998 Eur J Immunogenet [欧洲免疫遗传学杂志], 25:349-55; Aalberse 等人, 2002 Immunol [免疫学], 105:9-19)。为了产生具有低ADCC、CDC和不稳定性的OX40抗体, 可以修饰人IgG4的铰链区和Fc区并引入许多改变。这些经修饰的IgG4 Fc分子可在SEQ ID NO:83-88, Li等人的美国专利号8,735,553中找到。

OX40抗体生产

[0117] 抗OX40抗体和其抗原结合片段可通过本领域已知的任何方法产生, 包括但不限于抗体四聚体的重组表达、化学合成和酶消化, 而全长单克隆抗体可通过例如杂交瘤或重组产生获得。重组表达可以来自本领域已知的任何合适的宿主细胞, 例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[0118] 本披露还提供了编码本文所述抗体的多核苷酸, 例如编码包含本文所述的互补决定区的重链或轻链可变区或区段的多核苷酸。在一些方面, 编码重链可变区的多核苷酸与选自由SEQ ID NO:15、21或27组成的组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些方面, 编码轻链可变区的多核苷酸与选自由SEQ ID NO:17、23或29组成的组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[0119] 本披露的多核苷酸可以编码抗OX40抗体的可变区序列。它们还可以编码抗体的可变区和恒定区。一些多核苷酸序列编码包含示例性抗OX40抗体之一的重链和轻链的可变区的多肽。一些其他多核苷酸编码分别与一种鼠抗体的重链和轻链的可变区基本上相同的两个多肽区段。

[0120] 本披露还提供了用于产生抗OX40抗体的表达载体和宿主细胞。表达载体的选择取决于表达载体的预期宿主细胞。典型地, 表达载体含有可操作地连接至编码抗OX40抗体链或抗原结合片段的多核苷酸的启动子和其他调节序列(例如增强子)。在一些方面, 除了在诱导条件的控制下, 使用诱导型启动子来防止插入序列的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可以在非诱导条件下、而不在偏向宿主细胞更好耐受其表达产物的编码序列的群体的情况下扩大经转化的生物体的培养。除启动子外, 其他调节元件也可以是有效表达抗OX40抗体或抗原结合片段所需要或期望的。这些元件典型地包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外, 通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子, 可以提高表达效率(参见, 例如, Scharf等人, Results Probl. Cell Differ. [细胞分化中的结果和问题] 20:125, 1994; 和Bittner等人, Meth. Enzymol. [酶学方法], 153:516, 1987)。例如, SV40增强子或CMV增强子可以用来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0121] 用于携带并表达抗OX40抗体链的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆和表达本披露多核苷酸的原核宿主。其他适用的微生物宿主包括杆菌, 如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 和其他肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*), 如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。在这些原核

宿主中,还可以制备表达载体,其典型地含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。此外,将存在任何数量的多种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子典型地任选地用操纵子序列控制表达,并具有核糖体结合位点序列等,用于启动和完成转录和翻译。其他微生物如酵母也可用于表达抗OX40多肽。也可以使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

[0122] 在其他方面,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本披露的抗OX40多肽。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系或携带外源性表达载体的哺乳动物细胞系。这些包括任何正常的必死或正常或异常的永生的动物或人细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HEK293细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。使用哺乳动物组织细胞培养物来表达多肽一般在例如Winnacker, *From Genes to Clones* [从基因到克隆], VCH出版社, NY, N.Y., 1987中讨论。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子(参见例如Queen等人, *Immunol. Rev.* [免疫学综述] 89: 49-68, 1986)和必要的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的、和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

检测和诊断方法

[0123] 本披露的抗体或抗原结合片段可用于多种应用,包括但不限于检测OX40的方法。在一方面,抗体或抗原结合片段可用于检测生物样品中OX40的存在。如本文所用的,术语“检测”包括定量或定性检测。在某些方面,生物样品包括细胞或组织。在其他方面,这些组织包括相对于其他组织以更高水平表达OX40的正常和/或癌性组织。

[0124] 在一方面,本披露提供了检测生物样品中OX40的存在的方法。在某些方面,该方法包括在允许抗体与抗原结合的条件下,将生物样品与抗OX40抗体接触,并且检测抗体和抗原之间是否形成复合物。生物样品可以包括但不限于尿液或血液样品。

[0125] 还包括诊断与OX40表达相关的障碍的方法。在某些方面,该方法包括使测试细胞与抗OX40抗体接触;通过检测抗OX40抗体与OX40多肽的结合来测定测试细胞中OX40的表达水平(定量或定性);并且将测试细胞中的表达水平与对照细胞(例如,与测试细胞相同组织来源的正常细胞或非OX40表达细胞)中的OX40表达水平进行比较,其中与对照细胞相比,测试细胞中较高水平的OX40表达表明存在与OX40表达相关的障碍。

治疗方法

[0126] 本披露的抗体或抗原结合片段可用于多种应用,包括但不限于治疗OX40相关障碍或疾病的方法。在一方面,OX40相关障碍或疾病是癌症。

[0127] 在一方面,本披露提供了治疗癌症的方法。在某些方面,该方法包括向有需要的患者施用有效量的抗OX40抗体或抗原结合片段。癌症可包括但不限于乳腺癌、结肠癌、头颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、皮肤癌、间皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤。

[0128] 本披露的抗体或抗原结合片段可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了多种给药方案,包括但不限于单次施用或在不同时间点的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0129] 本披露的抗体或抗原结合片段可以以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。关于这点要考虑的因素包括治疗的特定障碍、治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、障碍的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用方案、和医疗从业者已知的其他因素。抗体不需要但任选地与目前用于预防或治疗所研究的障碍的一种或多种药剂一起配制。此类其他药剂的有效量取决于配制品中存在的抗体的量、障碍或治疗的类型、以及上文讨论的其他因素。这些通常以与如本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述剂量的约1%-99%使用,或以经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0130] 为预防或治疗疾病,本披露的抗体或抗原结合片段的合适的剂量将取决于待治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防还是治疗目的、先前疗法、患者的临床病史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。抗体适当地以一次或经一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重性,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 的抗体可以是用于向患者施用的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次分开施用,还是通过连续输注。取决于上述因素,一个典型的日剂量可以为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多。对于几天或更长时间内的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直到出现疾病症状的期望抑制。此类剂量可以间歇地施用,例如每周或每三周(例如使得患者接受约两个至约二十个,或例如约六个剂量的抗体)。可以施用初始高负载剂量,随后施用一个或多个较低剂量。但是,其他给药方案可以是有用的。通过常规技术和测定可以容易地监测此疗法的进展。

组合疗法

[0131] 根据某些实施例,本披露包括用于治疗或延迟或抑制癌症生长的方法。在某些实施例中,本披露包括减少肿瘤细胞负荷或减少肿瘤负担的方法。这些方法包括向有需要的受试者依序施用治疗有效量的抗OX40抗体与放射疗法的组合,其中该抗体以多个剂量(例如作为特定治疗性给药方案的一部分)施用于该受试者。例如,治疗性给药方案可以包括以约每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次的频率或更低的频率向受试者施用一剂或多剂抗OX40抗体。在某些实施例中,将一剂或多剂抗OX40抗体与一剂或多剂放射疗法组合施用,其中该一剂或多剂放射以约每天一次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每四个月一次的频率或更低的频率施用于受试者。

[0132] 在某些实施例中,该一剂或多剂包含在治疗周期中。根据这一方面,这些方法包括向有需要的受试者施用至少一个治疗周期,其中该至少一个治疗周期包含1-10剂抗OX40抗体和任选地一剂或多剂放射疗法。在某些实施例中,向有需要的受试者施用2-12个治疗周期。

[0133] 在具体实施例中,本披露提供了用于增加抗肿瘤功效的方法。这些方法包括在施

用放射剂量之前,向患有癌症的受试者施用治疗有效量的抗OX40抗体,其中抗OX40抗体可以在放射疗法之前约1天、多于1天、多于2天、多于3天、多于4天、多于5天、多于6天、多于7天或多于8天施用。在某些实施例中,与在施用抗OX40抗体之前施用了放射疗法的受试者相比,这些方法可将癌症或肿瘤负担减少,例如减少约20%、超过20%、超过30%、超过40%、超过50%、超过60%、超过70%或超过80%。

[0134] 在某些实施例中,放射疗法包括低分次放射疗法。在某些实施例中,本披露的方法包括施用放射疗法,其中该放射疗法是低分次放射疗法。在某些实施例中,低分次放射疗法包含2-12个分次。在某些实施例中,2-12个分次在连续数天施用。在某些实施例中,放射疗法在施用一剂或多剂抗OX40抗体之后施用。在某些实施例中,抗OX40抗体在施用一个或多个分次的放射疗法前0.5-2周施用。

[0135] 在某些实施例中,向有需要的受试者施用的放射疗法包含2-100戈瑞(Gy)。在某些实施例中,放射疗法包含5、7、8、9、10、11、12、15、20、23、25、27、30、35、40或45Gy。在某些其他实施例中,放射疗法包含50-100、60-90或70-80Gy。在某些实施例中,放射疗法以2-12个分次(低分次放射疗法)施用,其中每个分次包含2-10Gy。例如,将30Gy的放射包含在5个分次中来施用,每个分次包含6Gy。

[0136] 在一些实施例中,每一剂抗OX40抗体在紧接的前一剂后2周施用。在一个实施例中,在放射疗法之前、与其同时、或在其之后施用抗OX40抗体。在另一个实施例中,在放射疗法之前施用抗OX40抗体。在其他实施例中,在放射疗法之前1周施用抗OX40抗体。

[0137] 根据一方面,本发明披露了治疗或抑制癌症生长的方法,这些方法包括:(a)选择患有癌症的患者,其中该患者基于选自由以下组成的组的属性来选择:(i)该患者患有局部癌症;(ii)该患者患有转移癌;(iii)该癌症不可切除;(iv)该患者患有被认为不能手术的癌症;(v)禁忌手术和/或放射;(vi)该患者早期已经接受放射治疗,并且癌症对放射有抗性或无应答;以及(b)向有需要的患者施用治疗有效量的抗OX40抗体。在某些实施例中,一剂或多剂抗OX40抗体在紧接的前一剂后0.5-12周(例如,紧接的前一剂后0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周)施用。在某些实施例中,每一剂抗OX40抗体包含0.1、1、0.3、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg患者体重。在某些实施例中,每一剂包含50-500mg的抗OX40抗体,例如200mg、250mg或350mg的抗OX40抗体,其中每一剂在紧接的前一剂后0.5、1、2、3或4周施用。

[0138] 在一方面,本披露包括方法,这些方法包括向受试者施用治疗有效量的抗OX40抗体与放射的组合,该受试者正在接受背景抗癌治疗性方案(background anti-cancer therapeutic regimen)。背景抗癌治疗性方案可以包括施用例如化学治疗剂的过程。可以在背景抗癌治疗性方案基础上添加抗OX40抗体与放射疗法的组合。在一些实施例中,抗OX40抗体和放射疗法的组合作为“背景治疗停用”程序的一部分施用,其中该背景抗癌疗法随时间在受试者中逐渐停用(例如,以逐步方式或逐渐减少剂量),同时将该抗OX40抗体以恒定剂量或以随时间增加的剂量施用于受试者。例如,背景抗癌治疗剂可以包含能以低剂量或以亚治疗剂量施用的化学治疗剂。在某些实施例中,本披露包括用于治疗癌症的方法,这些方法包括施用一剂或多剂抗OX40抗体与放射疗法和一剂或多剂化学治疗剂的组合,其中该化学治疗剂以亚治疗剂量施用。

[0139] 在某些实施例中,向第一癌症,而不向第二癌症施用放射疗法,其中施用放射与抗OX40抗体的组合促使第一和第二癌症两者中的癌症消退(远隔效应)。在某些实施例中,本

披露的方法包括施用抗OX40抗体与放射疗法的组合,以产生持久的远隔效应。

[0140] 在某些实施例中,本披露的方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的抗OX40抗体与放射疗法的组合,其中施用该组合促使癌症减轻。在某些实施例中,与未经治疗的受试者或接受了抗OX40抗体或放射作为单一疗法施用的受试者相比,癌症生长减少了至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%。在某些实施例中,施用抗OX40抗体和/或放射疗法促使癌症减轻和/或消失。在某些实施例中,与未经治疗的受试者或用抗OX40抗体或放射作为单一疗法治疗的受试者相比,施用抗OX40抗体和/或放射疗法促使癌症生长和发展延迟,例如,癌症生长可以延迟超过7天、超过15天、超过1个月、超过3个月、超过6个月、超过1年、超过2年或超过3年。在某些实施例中,与未经治疗的受试者或接受了抗OX40抗体或放射作为单一疗法施用的受试者相比,施用抗OX40抗体与放射疗法的组合减少了癌症复发和/或增加了癌症缓解的持续时间,例如使缓解增加了超过15天、超过1个月、超过3个月、超过6个月、超过12个月、超过18个月、超过24个月、超过36个月或超过48个月。在某些实施例中,施用抗OX40抗体与放射疗法的组合增加了无进展生存期或总生存期。在某些实施例中,与未经治疗的受试者或已经接受抗OX40抗体或放射作为单一疗法的受试者相比,施用抗OX40抗体与放射疗法的组合增加了受试者的应答和应答持续时间,例如增加超过2%、超过3%、超过4%、超过5%、超过6%、超过7%、超过8%、超过9%、超过10%、超过20%、超过30%、超过40%或超过50%。在某些实施例中,向患有癌症的受试者施用抗OX40抗体和放射疗法促使肿瘤细胞的所有证据完全消失(“完全应答”)。在某些实施例中,向患有癌症的受试者施用抗OX40抗体和放射疗法促使肿瘤细胞或肿瘤大小减少至少30%或更多(“部分应答”)。在某些实施例中,向患有癌症的受试者施用抗OX40抗体和放射疗法促使癌细胞完全或部分消失,包括新癌细胞的增殖的完全或部分消失。可以通过本领域已知的方法中的任一种来测量癌症减少,这些方法例如有X射线、正电子发射断层扫描(PET)、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、细胞学、组织学或分子遗传分析。

药物组合物和配制品

[0141] 还提供了包含抗OX40抗体或抗原结合片段或包含编码抗OX40抗体或抗原结合片段的序列的多核苷酸的组合物,包括药物配制品。在某些实施例中,组合物包含与OX40结合的一种或多种抗体或抗原结合片段,或包含编码与OX40结合的一种或多种抗体或抗原结合片段的序列的一种或多种多核苷酸。这些组合物还可包含合适的载体,如本领域熟知的药学上可接受的赋形剂,包括缓冲剂。

[0142] 通过将具有所需纯度程度的这种抗体或抗原结合片段与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合来制备本文所述的OX40抗体或抗原结合片段的药物配制品(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition[雷明顿药物科学第16版], Osol, A. 编辑(1980)), 呈冻干配制品或水溶液的形式。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对于接受者通常是无毒性的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖

和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(HYLENEX[®],百特国际有限公司(Baxter International, Inc.))。在美国专利号US 7,871,607和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在一方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0143] 示例性冻干抗体配制品描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体配制品包括美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中所述的那些,后者包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0144] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有该抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品的形式,例如膜或微胶囊。

[0145] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。无菌性可以例如通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

实例

实例1:抗OX40单克隆抗体的产生

[0146] 基于常规杂交瘤融合技术(略作修改)产生抗OX40单克隆抗体(de St Groth和Sheidegger,1980J Immunol Methods[免疫学方法杂志]35:1;Mechetner,2007Methods Mol Biol[分子生物学方法]378:1)。选择在酶联免疫吸附测定(ELISA)和荧光激活细胞分选(FACS)测定中具有高结合活性的抗体用于进一步表征。

用于免疫和结合测定的OX40重组蛋白

[0147] 编码全长人OX40(SEQ ID NO:1)的cDNA由义翘神州公司(Sino Biological)(中国北京)基于GenBank序列(登录号:X75962.1)合成。将由OX-40的氨基酸(AA)1-216(SEQ ID NO:2)组成的信号肽和细胞外结构域(ECD)的编码区进行PCR扩增,并克隆至内部开发的表达载体,其中将C-末端融合到小鼠IgG2a的Fc结构域、人IgG1野生型重链的Fc结构域或His-tag,以分别产生三种重组融合蛋白表达质粒OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His。OX40融合蛋白的示意图如图1所示。为了产生重组融合蛋白,将OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1和OX40-His表达质粒瞬时转染至293G细胞中,并在装备有旋转振荡器的CO₂培养箱中培养7天。收集含有重组蛋白的上清液并离心澄清。使用蛋白A柱(目录号:17-5438-02,通用生命科学公司(GE Life Sciences))纯化OX40-mIgG2a和OX40-huIgG1。使用Ni琼脂糖柱(目录号:17-5318-02,通用生命科学公司)纯化OX40-His。将OX40-mIgG2a、OX40-huIgG和OX40-His蛋白用磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析,并以小等分试样保存在-80℃冰箱中。

稳定表达细胞系

[0148] 为了产生表达全长人OX40(OX40)或食蟹猴OX40(cynoOX40)的稳定细胞系,将这些基因克隆到逆转录病毒载体pFB-Neo(目录号:217561,美国安捷伦公司(Agilent, USA))。基于先前描述的方案进行逆转录病毒转导(Zhang等人,2005)。分别用含有人OX40或cynoOX40的病毒逆转录病毒转导HuT78和HEK293细胞,以产生HuT78/OX40、HEK293/OX40和HuT78/cynoOX40细胞系。

免疫、杂交瘤融合和克隆

[0149] 用200μL含有10μg OX40-mIgG2a和快速抗体免疫佐剂(目录号KX0210041,康必泉

公司(KangBiQuan),中国北京)的混合物抗原腹膜内免疫8-12周龄Balb/c小鼠(来自北京华阜康生物科技有限公司(HFK BIOSCIENCE CO.,LTD),中国北京)。在三周内重复进行该程序。第二次免疫后两周,通过ELISA和FACS评价小鼠血清的OX40结合。血清筛选后十天,通过i.p.注射10 μ g的OX40-mIgG2a加强具有最高抗OX40抗体血清滴度的小鼠。加强后三天,使用标准技术(Somat Cell Genet[体细胞遗传学],1977 3:231),分离脾细胞并将其与鼠骨髓瘤细胞系SP2/0细胞(ATCC,马纳萨斯,弗吉尼亚州)融合。

通过ELISA和FACS评估抗体的OX40结合活性

[0150] 杂交瘤克隆的上清液最初通过(Methods in Molecular Biology[分子生物学方法](2007) 378:33-52)中所述的ELISA(略作修改)进行筛选。简言之,将OX40-His蛋白在4 $^{\circ}$ C下、在96孔板中包被过夜。在用PBS/0.05%吐温-20洗涤后,在室温下将板用PBS/3%BSA封闭2小时。随后,将板用PBS/0.05%吐温-20洗涤,并在室温下与细胞上清液孵育1小时。使用HRP连接的抗小鼠IgG抗体(目录号:115035-008,杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch Inc),过氧化物酶亲和纯化的山羊抗小鼠IgG,Fc γ 片段特异性)和底物(目录号:00-4201-56,伊生物技术公司(eBioscience),美国)来产生波长为450nm的颜色吸收信号,通过使用读板器(SpectraMax Paradigm,分子设备公司(Molecular Devices)/PHERAstar,BMG LABTECH公司)测量。用间接ELISA从融合筛选中挑选阳性亲本克隆。使用上述HuT78/OX40和HuT78/cynoOX40细胞通过FACS进一步验证ELISA阳性克隆。将表达OX40的细胞(10^5 个细胞/孔)与ELISA阳性杂交瘤上清液一起孵育,随后与抗小鼠IgG eFluor $^{\circ}$ 660抗体(目录号:50-4010-82,伊生物技术公司,美国)结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyte 8HT,默克密理博公司(Merck-Millipore),美国)定量细胞荧光。

[0151] 对来自杂交瘤的在ELISA和FACS筛选中显示阳性信号的条件培养基进行功能测定,以鉴定在基于人免疫细胞的测定中具有良好功能活性的抗体(参见以下部分)。对具有所需功能活性的抗体进一步亚克隆和表征。

杂交瘤亚克隆和对无血清或低血清培养基的适应

[0152] 通过如上所述的ELISA、FACS和功能测定进行初步筛选后,通过限制性稀释对阳性杂交瘤克隆进行亚克隆以确保克隆性。通过功能测定验证靠前的抗体亚克隆,并且其适于在含3%FBS的CDM4MAb培养基(目录号:SH30801.02,Hyclone公司,美国)中生长。

单克隆抗体的表达和纯化

[0153] 将表达靠前抗体克隆的杂交瘤细胞在CDM4MAb培养基(目录号:SH30801.02,Hyclone公司)中培养,并在37 $^{\circ}$ C下、在CO $_2$ 培养箱中孵育5至7天。通过离心收集条件培养基并在纯化前通过0.22 μ m膜过滤。按照制造商的指导,应用上清液中的鼠抗体,并结合到蛋白A柱(目录号:17-5438-02,通用生命科学公司)上。该程序通常产生纯度高于90%的抗体。将蛋白A亲和纯化的抗体用PBS透析,或如果需要的话,使用HiLoad 16/60Superdex 200柱(目录号:28-9893-35,通用生命科学公司)进一步纯化以除去聚集体。通过测量280nm处的吸光度来确定蛋白质浓度。将最终的抗体制剂以等分试样储存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

实例2:抗OX40抗体的克隆和序列分析

[0154] 根据制造商的方案,使用Ultrapure RNA试剂盒(目录号:74104,凯杰公司(QIAGEN),德国)收获鼠杂交瘤克隆以制备总细胞RNA。使用来自英杰公司的cDNA合成试剂盒(目录号:18080-051)合成第一条链cDNA,并使用PCR试剂盒(目录号:CW0686,康为世纪公

司(CWBio),中国北京)进行杂交瘤抗体的VH和VL的PCR扩增。基于先前报道的序列(Brocks等人,2001Mol Med[分子医学]7:461)通过英杰公司(中国北京)合成用于重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗体cDNA克隆的寡核苷酸引物。将PCR产物直接用于测序,或亚克隆至pEASY-Blunt克隆载体(目录号:CB101,全式金公司(TransGen),中国)中,然后通过金唯智公司(Genewiz)(中国北京)测序。从DNA测序结果推导出VH和VL区的氨基酸序列。

[0155] 基于卡巴特(Wu和Kabat 1970J.Exp.Med.[实验医学杂志]132:211-250)系统,通过序列注释和通过计算机程序序列分析定义鼠抗体的互补决定区(CDR)。代表性靠前克隆Mu445的氨基酸序列(VH和VL)在表1中列出(SEQ ID NO:9和11)。Mu445的CDR序列在表2中列出(SEQ ID NO:3-8)。

表1.Mu445 VH和VL区的氨基酸序列

Mu445 VH	SEQ ID NO: 9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYII HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCARG YYGSSYAMDYWGQGTSVTVSS
Mu445 VL	SEQ ID NO: 11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLN WYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSG TDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGT KLEKK

表2.小鼠单克隆抗体Mu445 VH和VL区的CDR序列(氨基酸)

抗体	SEQ ID NO	CDR	序列
Mu445	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (卡巴特)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 4	HCDR2 (卡巴特)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (卡巴特)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (卡巴特)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (卡巴特)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (卡巴特)	QQYSKLPYT

实例3:鼠抗人OX40抗体445的人源化

抗体人源化和工程化

[0156] 对于Mu445的人源化,通过针对IMGT中的人免疫球蛋白基因数据库进行序列比对,搜索人种系IgG基因中与Mu445可变区的cDNA序列具有高度同源性的序列。选择以高频率存在于人抗体库(Glanville等人,2009PNAS[美国国家科学院院刊]106:20216-20221)中并且与Mu445高度同源的人IGHV和IGKV基因作为人源化的模板。

[0157] 通过CDR移植进行人源化(Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],Antibody Engineering[抗体工程],Methods and Protocols[方法和方案],第248卷:Humana出版社),并通过使用内部开发的表达载体将人源化抗体工程化为人IgG1野生型形式。在第一轮的人源化中,通过模拟的3D结构分析指导框架区中从鼠到人氨基酸残基的突变,并且在第一版的人源化抗体445中保留了对维持CDR的规范结构具有结构重要性的鼠框架残基(参见445-1,表3)。445-1的六个CDR具有HCDR1(SEQ ID NO:3)、HCDR2(SEQ ID NO:13)、HCDR3(SEQ ID NO:5)和LCDR1(SEQ ID NO:6)、LCDR2(SEQ ID NO:7)以及LCDR3(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。445-1的重链可变区具有由SEQ ID NO:15的核苷酸序列编码的(VH)SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且轻链可变区具有由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码的

(VL) SEQ ID NO:16的氨基酸序列。特别地,将Mu445的LCDR (SEQ ID NO:6-8) 移植到保留了两个鼠框架残基(I_{44} 和 Y_{71})的人种系可变基因IGVK1-39的框架(SEQ ID NO:16)中。将HCDR1 (SEQ ID NO:3)、HCDR2 (SEQ ID NO:13)和HCDR3 (SEQ ID NO:5) 移植到保留了两个鼠框架残基(L_{70} 和 S_{72})的人种系可变基因IGHV1-69的框架(SEQ ID NO:14)中。在445人源化变体(445-1)中,仅移植了卡巴特HCDR2的N-末端的一半,因为根据模拟的3D结构,仅预测该N末端的一半对抗原结合重要。

[0158] 使用内部开发的表达载体将445-1构建为人源化全长抗体,这些表达载体含有分别称为人野生型IgG1 (IgG1wt) 和 κ 链的恒定区,具有容易适应的亚克隆位点。通过将上述两种构建体共转染到293G细胞中来表达445-1抗体,并使用蛋白A柱(目录号:17-5438-02,通用生命科学公司)来纯化该抗体。将纯化的抗体在PBS中浓缩至0.5-10mg/mL并以等分试样储存在-80°C冰箱中。

[0159] 使用445-1抗体,进行几个单氨基酸改变,将VH和VL框架区中的保留的鼠残基转化为对应的人种系残基,如VL中的I44P和Y71F以及VH中的L70I和S72A。此外,在CDR中进行了几个单氨基酸改变,以降低潜在的异构化风险并提高人源化水平。例如,在LCDR2中进行T51A和D50E改变,并在HCDR2中进行D56E、G57A和N61A改变。使用在特定位置含有突变的引物和定点诱变试剂盒(目录号:AP231-11,全式金公司,中国北京)进行所有人源化改变。通过测序验证这些所需的变化。

[0160] 评估445-1抗体中的氨基酸改变(针对其与OX40的结合和热稳定性)。由上述特异性改变的组合来构建抗体445-2(包含SEQ ID NO:3的HCDR1、SEQ ID NO:18的HCDR2、SEQ ID NO:5的HCDR3、SEQ ID NO:6的LCDR1、SEQ ID NO:19的LCDR2以及SEQ ID NO:8的LCDR3)(参见表3)。在比较两个抗体时,结果显示抗体445-2和445-1均表现出可比的结合亲和力(参见下表4和下表5)。

[0161] 从445-2抗体开始,进行了VL框架区中几个另外的氨基酸改变以进一步改善结合亲和力/动力学(例如,氨基酸G41D和K42G的改变)。此外,为了降低免疫原性风险并提高热稳定性,进行VH和VL两者的CDR中几个单氨基酸改变(例如,LCDR1中的S24R和HCDR2中的A61N)。与445-2相比,所得的改变显示出改善的结合活性或热稳定性。

[0162] 通过在CDR和框架区中引入特异性氨基酸改变以改善用于人类治疗用途的分子和生物物理特性来进一步工程化人源化445抗体。考虑因素包括除去有害的翻译后修饰、改善的热稳定性(T_m)、表面疏水性和等电点(pI),同时保持结合活性。

[0163] 由上述成熟化过程构建人源化单克隆抗体445-3(包含SEQ ID NO:3的HCDR1、SEQ ID NO:24的HCDR2、SEQ ID NO:5的HCDR3、SEQ ID NO:25的LCDR1、SEQ ID NO:19的LCDR2和SEQ ID NO:8的LCDR3)(参见表3),并对其进行详细表征。还将抗体445-3制成包含人IgG2野生型重链的Fc结构域的IgG2形式(445-3IgG2),和包含具有S228P和R409K突变的人IgG4的Fc结构域的IgG4形式(445-3IgG4)。结果表明445-3和445-2表现出可比的结合亲和力(参见表4和表5)。

表3. 445抗体序列

抗体	SEQ ID NO		序列
445-1	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (卡巴特)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (卡巴特)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (卡巴特)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (卡巴特)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (卡巴特)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (卡巴特)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRY NQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTITVTVSS
	SEQ ID NO: 16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK
445-2	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (卡巴特)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 18	HCDR2 (卡巴特)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (卡巴特)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (卡巴特)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (卡巴特)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (卡巴特)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY AQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTITVTVSS
	SEQ ID NO: 22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK
445-3	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (卡巴特)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 24	HCDR2 (卡巴特)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (卡巴特)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 25	LCDR1 (卡巴特)	RASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (卡巴特)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (卡巴特)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY NQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTITVTVSS
	SEQ ID NO: 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNY LNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

实例4:通过SPR测定抗OX40抗体的结合动力学和亲和力

[0164] 通过使用BIAcore™T-200 (通用生命科学公司) 的SPR测定来表征抗OX40抗体的结合动力学和结合亲和力。简言之,将抗人IgG抗体固定在活化的CM5生物传感器芯片(目录

号:BR100530,通用生命科学公司)上。将具有人IgG Fc区域的抗体流过芯片表面,并被抗人IgG抗体捕获。然后将具有His标签的重组OX40蛋白(目录号:10481-H08H,义翘神州公司)的连续稀释液流过芯片表面,并通过使用一对一Langmuir结合模型(BIA评估软件,通用生命科学公司)分析表面等离子体共振信号的变化以计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。将平衡解离常数(K_D)计算为 k_d/k_a 的比率。抗OX40抗体的SPR测定的结合谱的结果总结于图2和表4中。抗体445-3的平均 K_D 结合谱(9.47nM)略优于抗体445-2(13.5nM)和445-1(17.1nM),并且与ch445的相似。445-3IgG4的结合谱与445-3(具有IgG1 Fc)相似,表明IgG4和IgG1之间Fc的变化不改变445-3抗体的特异性结合。

表4. 通过SPR的抗OX40抗体的结合亲和力

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

*ch445由与人IgG1wt/ κ 恒定区融合的Mu445可变结构域构成

实例5:测定抗OX40抗体对在HuT78细胞上表达的OX40的结合亲和力

[0165] 为了评估抗OX40抗体与在活细胞的表面上表达的OX40的结合活性,用如实例1中所述的人OX40转染HuT78细胞以创建OX40表达系。将HuT78/OX40活细胞接种在96孔板中,并与连续稀释的不同抗OX40抗体一起孵育。将山羊抗人IgG-FITC(目录号:A0556,碧云天公司(Beyotime))用作二抗来检测抗体与细胞表面的结合。通过用GraphPad Prism将剂量应答数据与四参数逻辑模型拟合来确定与人OX40的剂量依赖性结合的 EC_{50} 值。如图3和表5所示,OX40抗体对OX40具有高亲和力。还发现本披露的OX40抗体具有通过流式细胞术测量的相对较高的荧光强度的最大水平(参见表5的最后一列),表明抗体从OX40解离较慢,这是更理想的结合谱。

表5. 人源化445变体与OX40的剂量依赖性结合的 EC_{50}

抗体	EC_{50} ($\mu g/mL$)			最大 (Top) (MFI)
	测试 1	测试 2	平均值	平均值
ch445	0.321	0.277	0.299	725
445-1	0.293	0.278	0.285	525
445-2	0.323	0.363	0.343	620
445-3	0.337	0.319	0.328	910
445-3 IgG4	0.263	N/A	0.263	892

实例6:测定抗OX40抗体的交叉反应性

[0166] 为了评估抗体445-3对人和食蟹猴(cyno)OX40的交叉反应性,将表达人OX40

(HuT78/OX40) 和 cyno OX40 (HuT78/cynoOX40) 的细胞接种在96孔板上, 并与一系列稀释的 OX40 抗体一起孵育。将山羊抗人 IgG-FITC (目录号: A0556, 碧云天公司) 用作检测的二抗。通过用 GraphPad Prism 将剂量应答数据与四参数逻辑模型拟合来确定与人和食蟹猴天然 OX40 的剂量依赖性结合的 EC_{50} 值。结果示于图4和下表6中。抗体445-3与人和食蟹猴 OX40 两者交叉反应, 具有如下所示相似的 EC_{50} 值。

表6. 与人和食蟹猴 OX40 结合的抗体445-3的 EC_{50}

细胞系	445-3的 EC_{50} (ug/mL)	最大 (Top) (MFI)
HuT78/OX40	0.174	575
HuT78/cynoOX40	0.171	594

实例7: 具有445-3Fab的OX40的共结晶和结构测定

[0167] 为理解 OX40 与本披露的抗体的结合机理, 解析了 OX40 和 445-3 的 Fab 的共晶体结构。引入位于残基 T148 和 N160 的突变以阻断 OX40 的糖基化并改善蛋白质的均匀性。将编码突变人 OX40 (具有两个突变位点 T148A 和 N160A 的残基 M1-D170) 的 DNA 克隆至含有 hexa-His 标签的表达载体中, 并且在 37°C 下将该构建体瞬时转染至用于蛋白表达的 293G 细胞, 持续 7 天。收获细胞, 并且将上清液收集并与 His 标签亲和树脂在 4°C 下孵育 1 小时。将树脂用含有 20mM Tris (pH 8.0)、300mM NaCl 和 30mM 咪唑的缓冲液漂洗三次。然后将 OX40 蛋白用含有 20mM Tris (pH 8.0)、300mM NaCl 和 250mM 咪唑的缓冲液洗脱, 随后用 Superdex 200 (通用医疗公司 (GE Healthcare)) 在含有 20mM Tris (pH 8.0)、100mM NaCl 的缓冲液中进一步纯化。

[0168] 将 445-3Fab 的重链和轻链的编码序列克隆至含有位于重链的 C-末端的 hexa-His 标签的表达载体中, 并在 37°C 下将这些瞬时共转染至 293G 细胞 (用于蛋白表达), 持续 7 天。445-3Fab 的纯化步骤与用于以上突变 OX40 蛋白的相同。

[0169] 将纯化的 OX40 和 445-3Fab 以 1:1 的摩尔比混合, 并在冰上孵育 30 分钟, 随后用 Superdex 200 (通用医疗公司) 在含有 20mM Tris (pH 8.0)、100mM NaCl 的缓冲液中进一步纯化。收集复合物峰, 并浓缩至大约 30mg/ml。

[0170] 通过将该蛋白复合物与储液以 1:1 的体积比混合来进行共晶体筛选。通过蒸汽扩散由在 20°C 下培养的悬滴与含有 0.1M HEPES (pH 7.0)、1% PEG 2,000MME 和 0.95M 琥珀酸钠的储液获得共晶体。

[0171] 将尼龙环用于收获共晶体, 并将晶体浸入补充有 20% 甘油的储液中 10 秒。在 BL17U1, 上海同步辐射光源 (Shanghai Synchrotron Radiation Facility) 上收集衍射数据, 并用 XDS 程序处理。使用 IgG Fab 的结构 (PDB: 5CZX 的链 C 和 D) 和 OX40 (PDB: 2HEV 的链 R) 的结构作为分子置换搜索模型, 用程序 PHASER 解析该相。将 Phenix.refine 图形界面用于进行 X 射线数据刚体、TLS 和限制性精修, 随后用 COOT 程序调整并在 Phenix.refine 程序中进一步精修。将 X 射线的的数据收集和精修统计结果总结于表 7 中。

表7. 数据收集和精修统计结果

数据收集	
光束线	BL17U1, SSRF
空间群	P 3 1 2 1
细胞维度 (Å)	a = 183.96 b = 183.96 c = 79.09
角度 (°)	$\alpha = 90.00 \beta = 90.00 \gamma = 120.00$
分辨率 (Å)	159.3-2.55 (2.63-2.55)
反射总数	988771 (81305)
独特反射的数量 (Number of unique reflections)	50306 (4625)
完整度 (%)	99.9 (99.9)
平均冗余	19.7 (17.6)
Rmerge ^a	0.059 (0.962)
I/sigma (I)	29.4 (3.5)
Wilson B 因子 (Å)	73.9
精修	
分辨率 (Å)	60.22-2.55
反射的数量	50008
rmsd 键长 (Å)	0.010
rmsd 键角 (°)	0.856
R _{工作} ^b (%)	19.27
R _{游离} ^c (%)	21.60
蛋白质的平均 B-因子	97.10
拉氏图 (Ramachandran plot) (%)	
推荐的	96.34
允许的	3.48
异常 (Outlier)	0.17

括号中的值是指最高分辨率壳层。

^aRmerge = $\frac{\sum \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum_i |I(h)_i|}$, 其中 $\langle I(h) \rangle$ 是等效平均强度。

^bR_{工作} = $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, 其中 F_o 和 F_c 分别是观察到和计算出的结构因子振幅。

^cR_{游离} = $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, 使用测试数据集, 观察到的反射中随机抽取总数据的 5% 计算。

实例8: 通过SPR鉴定抗体445-3的表位

[0172] 由OX40和抗体445-3Fab的共结晶体结构指导, 我们选择并产生了人OX40蛋白的一系列单突变, 以进一步鉴定本披露的抗OX40抗体的关键表位。用定点诱变试剂盒(目录号: AP231-11, 全式金公司) 对人OX40/IgG1融合构建体进行单点突变。通过测序验证所需的突变。通过转染至293G细胞来实现OX40突变体的表达和制备并使用蛋白A柱(目录号: 17-5438-02, 通用生命科学公司) 纯化这些突变体。

[0173] 通过使用BIAcore 8K(通用生命科学公司) 的SPR测定来表征OX40点突变体对445-3Fab的结合亲和力。简言之, 使用EDC和NHS, 将OX40突变体和野生型OX40固定在CM5生物传感器芯片(目录号: BR100530, 通用生命科学公司) 上。然后将在HBS-EP+缓冲液(目录号: BR-1008-26, 通用生命科学公司) 中的连续稀释的445-3Fab以30 μ l/min流过芯片表面, 接触时

间为180s并且解离时间为600s。通过使用一对一Langmuir结合模型(BIA评估软件,通用生命科学公司)分析表面等离子体共振信号的改变以计算缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)。将平衡解离常数(K_D)计算为 k_d/k_a 的比率。将突变体的 K_D 位移倍数计算为突变体 $K_D/WT K_D$ 的比率。通过SPR确定的表位鉴定谱总结于图5和表8中。这些结果表明OX40中残基H153、I165和E167突变为丙氨酸显著降低了抗体445-3与OX40结合,并且残基T154和D170突变为丙氨酸适度降低了抗体445-3与OX40结合。

[0174] 抗体445-3和OX40的残基H153、T154、I165、E167和D170的详细相互作用示于图6中。OX40上H153的侧链被相互作用界面上的445-3的小口袋包围,与_重S31和_重G102形成氢键并且与_重Y101形成 π - π 堆积。E167侧链与_重Y50和_重N52形成氢键,同时D170分别与_重S31和_重K28形成氢键和盐桥,这可以进一步稳定复合物。T154和_重Y105、I165和_重R59之间的范德华力(VDW)相互作用有助于抗体445-3对OX40的高亲和力。

[0175] 总之,将OX40的残基H153、I165和E167鉴定为与抗体445-3相互作用的重要残基。此外,OX40的氨基酸T154和D170也是对抗体445-3的重要接触残基。此数据表明抗体445-3的表位是OX40的残基H153、T154、I165、E167和D170。这些表位残基在序列HTLQPASNSSDAICEDRD (SEQ ID NO:30)中,其中重要的接触残基以粗体加下划线表示。

表8. 通过SPR确定抗体445-3的表位鉴定

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

显著影响:未检测到结合,或突变体 $K_D/WT K_D$ 的值大于10。适当影响:突变体 $K_D/WT K_D$ 的值在5和10之间。无显著影响:突变体 $K_D/WT K_D$ 的值小于5。

实例9:抗OX40抗体445-3不阻断OX40-OX40L相互作用。

[0176] 为确定抗体445-3是否干扰OX40-OX40L相互作用,建立了基于细胞的流式细胞术测定。在此测定中,将抗体445-3、参考抗体1A7.gr1、对照huIgG或单独的培养基与人OX40融合蛋白和鼠IgG2a Fc (OX40-mIgG2a) 预孵育。然后将抗体和融合蛋白复合物添加至表达OX40L的HEK293细胞中。如果OX40抗体不干扰OX40-OX40L相互作用,则OX40抗体-OX40 mIgG2a复合物仍将与表面OX40L结合,并且使用抗小鼠Fc二抗可检测到此相互作用。

[0177] 如图7所示,抗体445-3(甚至在高浓度下)也不会降低OX40与OX40L的结合,表明445-3不干扰OX40-OX40L相互作用。这表明445-3不在OX40L结合位点结合,或不会结合地足够近以在空间上阻碍OX40L结合。相比之下,如图7所示,阳性对照抗体1A7.gr1完全阻断OX40与OX40L结合。

[0178] 此外,如图8所示,解析OX40与445-3Fab复合物的共结晶体结构,并与OX40/OX40L复合物(PDB代码:2HEV)对齐。OX40配体三聚体主要通过OX40的CRD1(富含半胱氨酸的结构

域)、CRD2和部分CRD3区域与OX40相互作用(Compaan和Hymowitz,2006),而抗体445-3仅通过CRD4区域与OX40相互作用。总之,445-3抗体和OX40L三聚体在OX40的不同的对应区域结合,并且抗体445-3不干扰OX40/OX40L相互作用。此结果与以上实例中所述的表位作图数据相关。OX40的CRD4位于氨基酸127-167,并且抗体445-3的表位与此区域部分重叠。OX40 CRD4(氨基酸127-167)的序列如下所示,并且445-3表位的部分重叠以粗体加下划线表示:PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE₁₂₇₋₁₆₇(SEQ ID NO:31)。

实例10:抗OX40抗体445-3的激动性活性

[0179] 为了研究抗体445-3的激动性功能,将OX40阳性T细胞系,HuT78/OX40与人工抗原呈递细胞(APC)系(HEK293/OS8^低-Fc γ RI)在445-3或1A7.gr1存在或不存在下共培养过夜,并将IL-2产量用作T-细胞刺激的读数。在HEK293/OS8^低-Fc γ RI细胞中,将编码膜结合抗CD3抗体OKT3(OS8)(如美国专利号8,735,553中披露的)和人Fc γ RI(CD64)的基因稳定共转染至HEK293细胞中。由于抗OX40抗体诱导的免疫活化取决于抗体交联(Voo等人,2013),因此在抗OX40抗体与OX40和Fc γ RI两者的双重接合下,HEK293/OS8^低-Fc γ RI上的Fc γ RI为抗OX40抗体介导的OX40的交联提供基础。如图9所示,抗OX40抗体445-3在以剂量依赖性方式高效增强TCR信号传导,其中EC₅₀为0.06ng/ml。还观察到参考Ab1A7.gr1的活性略弱。相比之下,对照IgG(10 μ g/ml)或空白显示对IL-2产生没有影响。

实例11:抗OX40抗体445-3促进混合淋巴细胞反应(MLR)测定中的免疫应答

[0180] 为了确定抗体445-3是否可以刺激T细胞活化,如前所述建立了混合淋巴细胞反应(MLR)测定(Tourkova等人,2001)。简言之,通过用GM-CSF和IL-4培养,来从人PBMC衍生的CD14⁺骨髓细胞中诱导成熟DC,随后进行LPS刺激。接下来,在抗OX40 445-3抗体(0.1-10 μ g/ml)存在下,将丝裂霉素C处理的DC与同种异体CD4⁺T细胞共培养2天。通过ELISA检测共培养物中的IL-2产量,将其作为MLR应答的读数。

[0181] 如图10所示,抗体445-3显著促进IL-2产生,表明445-3活化CD4⁺T细胞的能力。相比之下,参考抗体1A7.gr1在MLR测定中显示显著(P<0.05)较弱的活性。

实例12:抗OX40抗体445-3显示ADCC活性

[0182] 建立了基于乳酸脱氢酶(LDH)释放的ADCC测定,以研究抗体445-3是否可以杀伤表达OX40^{Hi}的靶细胞。通过将CD16v158(V158等位基因)和Fc γ 基因共转导至NK细胞系NK92MI(ATCC,马纳萨斯,弗吉尼亚州)中,产生了作为效应细胞的NK92MI/CD16V细胞系。将表达OX40的T细胞系HuT78/OX40用作靶细胞。在抗OX40抗体(0.004-3 μ g/ml)或对照Ab存在下,将相同数量(3x10⁴)的靶细胞和效应细胞共培养5小时。使用CytoTox 96非放射性细胞毒性测定试剂盒(普洛麦格公司(Promega),威斯康星州麦迪逊),通过LDH释放评估细胞毒性。通过如下所示的公式计算特异性裂解。

$$\text{特异性裂解}\% = \frac{\text{实验} - \text{效应子自发} - \text{靶标自发}}{\text{靶标最大} - \text{靶标自发}} \times 100$$

[0183] 如图11所示,抗体445-3在通过ADCC以剂量依赖性方式杀伤OX40^{Hi}靶标中显示高效力(EC₅₀:0.027 μ g/ml)。抗体445-3的ADCC效应与1A7.gr1对照抗体的相似。相比之下,与对照IgG或空白相比,具有S228P和R409K突变的IgG4Fc形式的445-3(445-3-IgG4)未显示出任何显著的ADCC效应。结果与先前发现一致,即IgG4 Fc对ADCC较弱或沉默(An Z等人mAbs[单克隆抗体]2009)。

实例13:抗OX40抗体445-3优先耗减CD4⁺Treg,并增加体外CD8⁺Teff/Treg比率

[0184] 几种动物肿瘤模型中已显示,抗OX40抗体可以耗减肿瘤浸润OX40^{Hi} Treg,并增加CD8⁺T细胞与Treg的比率(Bulliard等人,2014;Carboni等人,2003;Jacquemin等人,2015;Marabelle等人,2013b)。因此,增强免疫应答,导致肿瘤消退和改善的存活。

[0185] 鉴于体外活化的或肿瘤内CD4⁺Foxp3⁺Treg比其他T细胞亚群优先表达OX40(Lai等人,2016;Marabelle等人,2013b;Montler等人,2016;Soroosh等人,2007;Timperi等人,2016),建立了基于人PBMC的测定以研究抗体445-3杀伤OX40^{Hi}细胞(特别地Treg)的能力。简言之,将PBMC通过PHA-L(1μg/mL)预活化1天以诱导OX40表达,并用作靶细胞。然后在抗OX40抗体(0.001-10μg/mL)或安慰剂存在下,将效应NK92MI/CD16V细胞(如实例12中所述,5x10⁴)与相同数目靶细胞共培养过夜。通过流式细胞术确定每个T细胞亚群的百分比。如图12A和12B所示,用抗体445-3的处理以剂量依赖性方式诱导了CD8⁺T细胞的百分比增加和CD4⁺Foxp3⁺Treg的百分比降低。因此,CD8⁺T细胞与Treg的比率大大提高(图12C)。用1A7.gr1处理得到较弱结果。此结果证明445-3通过增强CD8⁺T细胞功能但限制Treg介导的免疫耐受,在诱导抗肿瘤免疫力中的治疗应用。

实例14:抗OX40抗体445-3在小鼠肿瘤模型中发挥剂量依赖性抗肿瘤活性

[0186] 在小鼠肿瘤模型中显示了抗OX40抗体445-3的功效。将鼠MC38结肠肿瘤细胞皮下植入人OX40转基因的C57小鼠中(百奥赛图公司(BiocytoGen),中国北京)。植入肿瘤细胞后,每周测量两次肿瘤体积,并使用以下公式计算这些肿瘤体积(mm³): $V=0.5(a \times b^2)$,其中a和b分别为肿瘤的长径和短径。当肿瘤达到大小为大约190mm³的平均体积时,将小鼠随机分配到7个组,并每周腹膜内注射445-3或1A7.gr1抗体一次,持续三周。将人IgG作为同种型对照施用。将部分消退(PR)定义为在三次连续测量中,肿瘤体积小于第一天给药的起始肿瘤体积的50%。使用以下公式计算肿瘤生长抑制(TGI):

$$\text{生长抑制}\% = 100 \times \left(1 - \frac{(\text{治疗的 } t) - (\text{治疗的 } t_0)}{(\text{安慰剂 } t) - (\text{安慰剂 } t_0)} \right)$$

治疗t=在时间t经治疗的肿瘤体积

治疗t₀=在时间0经治疗的肿瘤体积

安慰剂t=在时间t安慰剂肿瘤体积

安慰剂t₀=在时间0安慰剂肿瘤体积

[0187] 结果证明,445-3在0.4mg/kg、2mg/kg和10mg/kg的剂量下腹膜内注射时具有剂量依赖性抗肿瘤功效。445-3的施用导致53%(0.4mg/kg)、69%(2mg/kg)和94%(10mg/kg)的肿瘤生长抑制,并导致从基线的0%(0.4mg/kg)、17%(2mg/kg)和33%(10mg/kg)的部分消退。相比之下,未观察到抗体1A7.gr1的部分消退。体内数据表明,配体非阻断抗体445-3比OX40-OX40L阻断抗体1A7.gr1更适用于抗肿瘤疗法(图13A和13B,表9)。

表9. 445-3和1A7.gr1在鼠MC38结肠肿瘤小鼠模型中的功效

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

实例15:抗OX40抗体的氨基酸改变

[0188] 选择几个氨基酸进行改变,以改善OX40抗体。进行氨基酸改变以改善亲和力或以增加人源化。针对合适的氨基酸改变设计PCR引物集,合成并用于修饰抗OX40抗体。例如,重链中的K28T和轻链中的S24R的改变导致通过FACS确定的EC₅₀比原始445-2抗体增加1.7倍。重链中的Y27G和轻链中的S24R的改变导致通过Biacore确定的K_D比原始445-2抗体增加1.7倍。这些改变总结于图14A-14B中。

实例16:抗OX40抗体与放射治疗的组合在胶质瘤hOX40敲入型小鼠模型中的研究

[0189] 从中国江苏百奥赛图公司(Jiangsu Biocytogen Co.,China)获得雌性人源化OX40敲入型小鼠(命名为hOX40),并且向小鼠右半侧脑原位植入2μL PBS中的6×10⁴个GL261-Luc细胞。GL261是鼠胶质母细胞瘤细胞系,含有荧光素酶报告基因,该基因允许经由生物发光成像对脑内肿瘤的生长和对治疗的应答进行体内可视化。肿瘤的大小可以在几个时间点确定,因为生物发光成像对小鼠无害,并且不需要处死小鼠。4天后,根据体重将动物随机分配到4个组中,每组12只动物。然后用媒介物(PBS)或抗OX40抗体作为单一药剂(以1mg/kg,每周一次腹膜内给药445-3)治疗小鼠。还用2Gy的全脑放射治疗(WBRT)作为单一疗法每天一次持续5天来治疗小鼠。最后,向小鼠施用445-3抗体与WBRT的组合。检查所有小鼠,并且每天至少记录一次任何临床观察。将动物每周称重两次,并且将那些与初始体重相比,体重减轻超过20%的小鼠处死。使用PrismTM软件绘制生存曲线。

[0190] 下图15和表10显示在hOX40小鼠中GL261-Luc原位模型对445-3与放射治疗组合施用的应答。单独使用WBRT疗法的小鼠的生存率为58%。施用445-3抗体得到67%的较高的生存率。445-3抗体与WBRT的组合大幅延长了生存率,实现了92%的生存率。该研究显示445-3抗体与WBRT组合的治疗功效优于每种疗法单独施用时的功效。

表10. 445-3和WBRT在GL261-Luc原位hOX40小鼠模型中的组合功效

测试品	剂量 (mg/kg)	N	中值生存天数	第 89 天的生存率 (%)
媒介物	0	12	25	17
445-3	1	12	> 89 (未达到)	67
WBRT	2Gy	12	> 89 (未达到)	58
445-3 + WBRT	1 + 2Gy	12	> 89 (未达到)	92

参考文献

1. al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, M., Brown, M.H., James, W., and Barclay, A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and

mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European journal of immunology* 26,1695-1699.

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

3. Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB and OX40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and cellular biology* 18,558-565.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. Gough, M.J., and Weinberg, A.D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Advances*

in experimental medicine and biology 647,94-107.

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

15.Guo,Z.,Cheng,D.,Xia,Z.,Luan,M.,Wu,L.,Wang,G.,and Zhang,S. (2013) .Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer.Journal of translational medicine 11,215.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

26. Montler, R., Bell, R.B., Thalhoffer, C., Leidner, R., Feng, Z., Fox, B.A., Cheng, A.C., Bui, T.G., Tucker, C., Hoen, H., and Weinberg, A. (2016). OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clinical & translational immunology* 5, e70.

27. Morris, N.P., Peters, C., Montler, R., Hu, H.M., Curti, B.D., Urba, W.J., and Weinberg, A.D. (2007). Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.

28. Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-3848.

29. Petty, J.K., He, K., Corless, C.L., Vetto, J.T., and Weinberg, A.D. (2002). Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *American journal of surgery* 183, 512-518.

30. Redmond, W.L., and Weinberg, A.D. (2007). Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Critical reviews in immunology* 27, 415-436.

31. Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.

32. Ruby, C.E., and Weinberg, A.D. (2009). OX40-enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age. *J Immunol* 182, 1481-1489.

33. Sarff, M., Edwards, D., Dhungel, B., Wegmann, K.W., Corless, C., Weinberg, A.D., and Vetto, J.T. (2008). OX40 (CD134) expression in sentinel lymph nodes correlates with prognostic features of primary melanomas. *American journal of surgery* 195, 621-625; discussion 625.

34. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L.C., and Sugamura, K. (2002). Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *European journal of immunology* 32, 3326-3335.

35.Smyth,M.J.,Ngiow,S.F.,and Teng,M.W. (2014) .Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy.Immunology and cell biology 92,473-474.

36.Song,A.,Tang,X.,Harms,K.M.,and Croft,M. (2005a) .OX40 and Bcl-xL promote the persistence of CD8 T cells to recall tumor-associated antigen.J Immunol 175,3534-3541.

37.Song,J.,So,T.,Cheng,M.,Tang,X.,and Croft,M. (2005b) .Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion.Immunity 22,621-631.

38.Song,J.,So,T.,and Croft,M. (2008) .Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival.J Immunol 180, 7240-7248.

39.Soroosh,P.,Ine,S.,Sugamura,K.,and Ishii,N. (2007) .Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+T cells.J Immunol179,5014-5023.

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

41.Stuber,E.,Neurath,M.,Calderhead,D.,Fell,H.P.,and Strober,W. (1995) .Cross-linking of OX40 ligand,a member of the TNF/NGF cytokine family,induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells.Immunity 2,507-521.

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

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

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

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

46.Voo,K.S.,Bover,L.,Harline,M.L.,Vien,L.T.,Facchinetti,V.,Arima,K., Kwak,L.W.,and Liu,Y.J. (2013) .Antibodies targeting human OX40 expand effector

T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *J Immunol* 191,3641-3650.

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

48. Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C., and Whitham, R.H. (1999). Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 162,1818-1826.

49. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M.S. (2017). OX40: Structure and function-What questions remain? *Molecular immunology* 83,13-22.

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

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

52. Zhang, P., e.H.G.e.J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., Yik Andy Yeung Y.A. (2019) Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. *Cell Reports* 27,3117-3123.

序列表

<110> 百济神州(北京)生物科技有限公司

<120> 使用抗OX40抗体与放射组合治疗癌症的方法

<130> BGB22308-00PCT

<160> 31

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
           20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
           35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
           50           55           60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65           70           75           80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
           85           90           95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
           100          105          110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
           115          120          125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
           130          135          140
Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145          150          155          160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
           165          170          175
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
           180          185          190
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
           195          200          205
Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val

```

210	215	220
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu		
225	230	235
Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly		
	245	250
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser		
	260	265
Thr Leu Ala Lys Ile		270
275		
<210> 2		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu		
1	5	10
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val		
	20	25
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro		
	35	40
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys		
	50	55
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro		
65	70	75
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys		
	85	90
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly		
	100	105
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys		
	115	120
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp		
	130	135
Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn		
145	150	155
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro		
	165	170
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr		
	180	185
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu		

195	200	205
Val Pro Gly Gly Arg Ala	Val Ala	
210	215	
<210> 3		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 3		
Ser Tyr Ile Ile His		
1	5	
<210> 4		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 4		
Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
1	5	10
15		
Gly		
<210> 5		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 5		
Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
1	5	10
<210> 6		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 6		
Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn		
1	5	10
<210> 7		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 7		
Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser		
1	5	

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 9

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 360

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 10

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcttgcaagg cttctggata taaattcaact agctatatta tacactgggt gaagcagaag 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatecctt acaatgatgg tactaggtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atggagtaca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggggttac 300
tacggtagta gctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

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

<210> 12

<211> 321

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 12

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgctt ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaacta ttaaactcct gatctatgac acatcaacct tatactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagat tattttctca ccatcagcaa cctggaacct 240
 gaagatattg ccaactacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaaaaaaa a 321

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-1 HCDR2

<400> 13

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-1 VH pro

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-1 VH DNA

<400> 15

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tectatata tccactgggt gcggcaggca 120

ccaggacagg gactggagtg gatgggetac atcaaccctt ataatgacgg cacacggtac 180

aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acaagcgata agtctaccag cacagcctat 240

atggagctgt ctagecctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300

tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc 360

<210> 16

<211> 107

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 445-1 VK pro
 <400> 16
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-1 VK DNA

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgct ctgtgggcca tagggtgacc 60
 atcacatgca ggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120
 ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac acctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc 180
 agattctctg gcagcggctc cggaaccgac tacacctga caatctctag cctgcagccc 240
 gaggatttctg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300
 ggcacaaaagg tggagatcaa g 321

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-2 HCDR2

<400> 18

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 445-2 LCDR2
 <400> 19
 Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 445-2 VH pro
 <400> 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 21
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 445-2 VH DNA

<400> 21

caggtgcagc tgggtcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
 ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac 180
 gccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat 240
 atggagctgt ctacgctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300
 tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc 360

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-2 VK pro

<400> 22

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

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-2 VK DNA

<400> 23

gacatccaga tgaccacagtc tcccagctcc ctgtccgct ctgtgggcga tagggtgacc 60
 atcacatgca gcgcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120

ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc 180
 agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttaccctga caatctctag cctgcagccc 240
 gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300
 ggcacaaaagg tggagatcaa g 321

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 HCDR2

<400> 24

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 LCDR1

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 VH pro

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65		70		75		80									
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						95
Ala	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105						110
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				115											120

<210> 27

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 VH DNA

<400> 27

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac 180
aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat 240
atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300
tatggctcct cttacgcat ggattattgg ggccaggga ccacagtgc agtgagctcc 360

```

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 VK pro

<400> 28

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 29

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 445-3 VK DNA

<400> 29

gacatccaga tgaccagtc tccagctec ctgtcgcct ctgtgggcca tagggtgacc 60
 atcacatgcc gggcctccca gggcatctec aactacctga attggtatca gcagaagcca 120
 gacggcgcca tcaagetget gatctacgac gectctacac tgtatagcgg cgtgcctctcc 180
 agattctctg gcagcggetc cggaaccgac ttcacctga caatctctag cctgcagccc 240
 gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttgcggcg 300
 ggcacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp

1

5

10

15

Arg Asp

<210> 31

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys

1

5

10

15

Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala

20

25

30

Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu

35

40

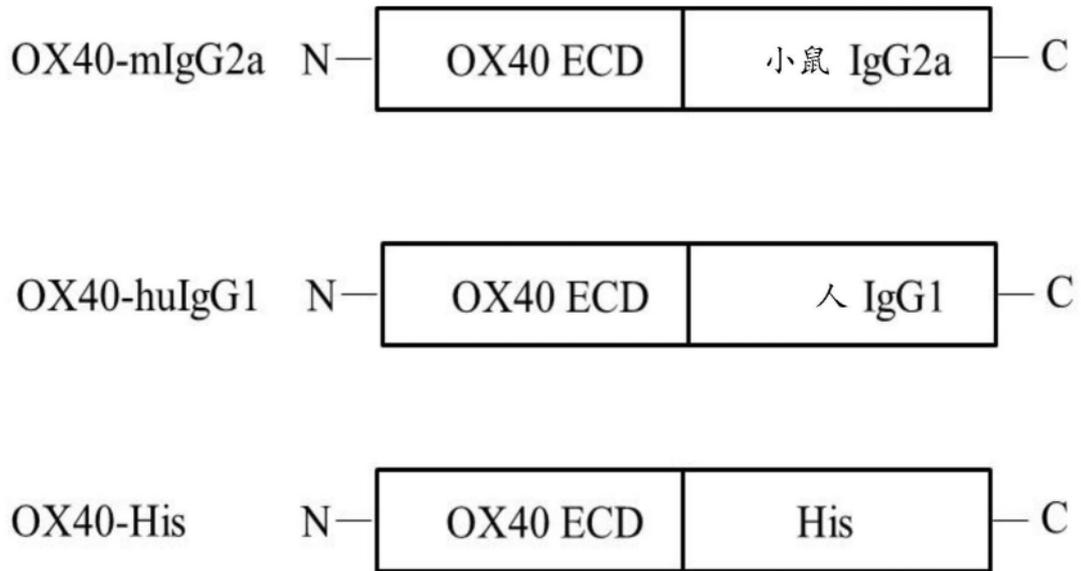


图1

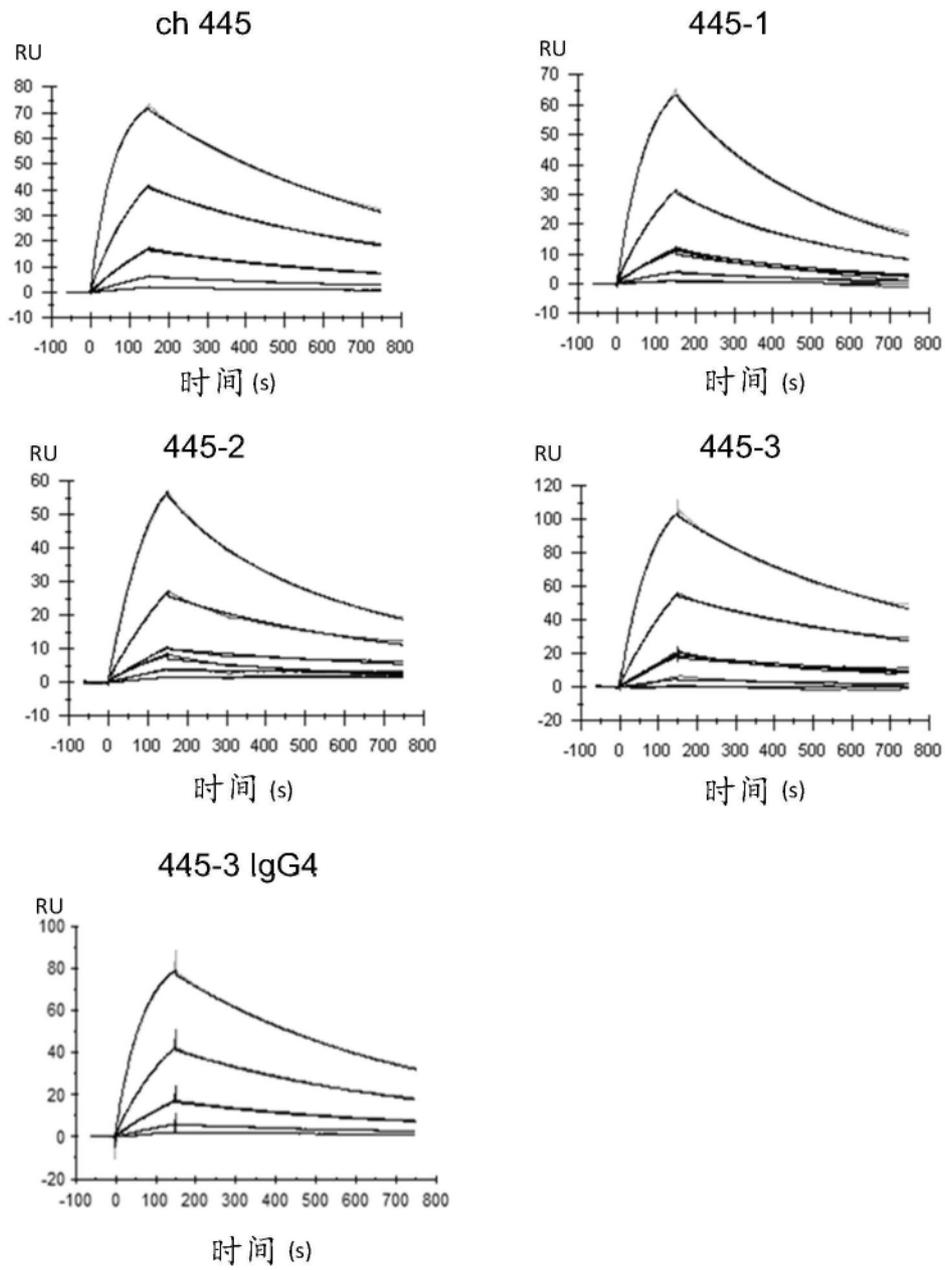


图2

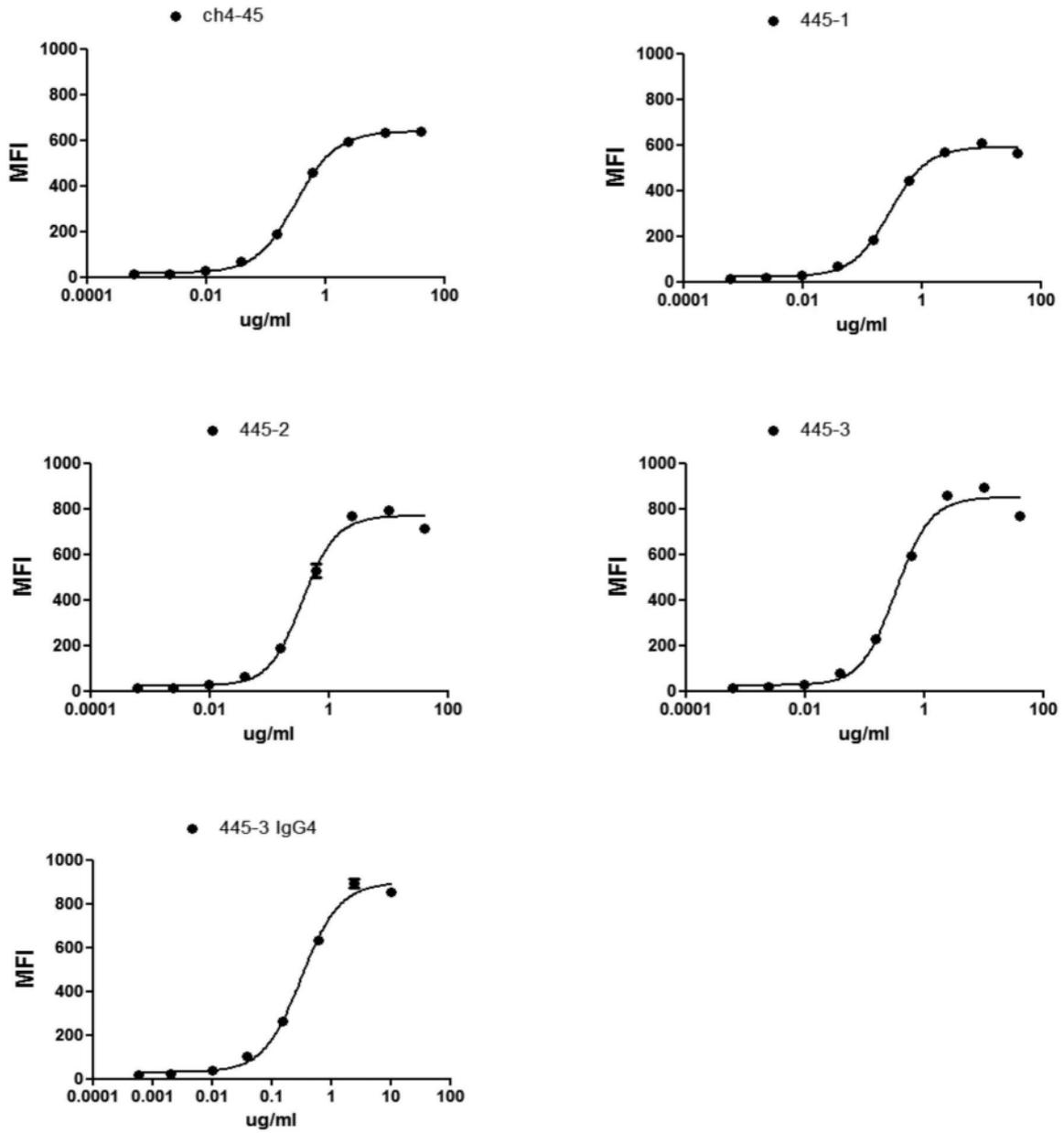


图3

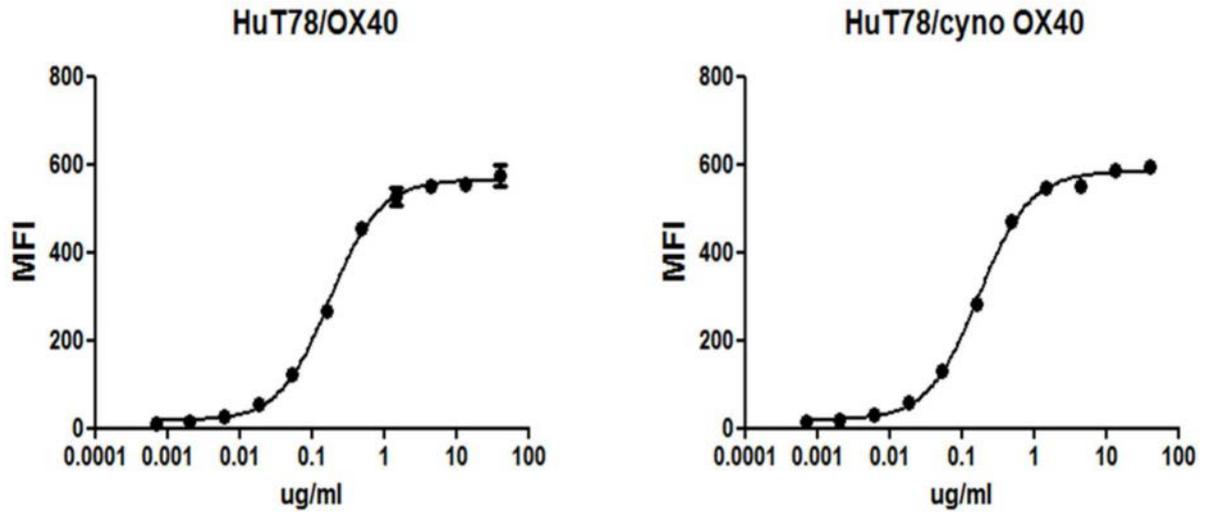


图4

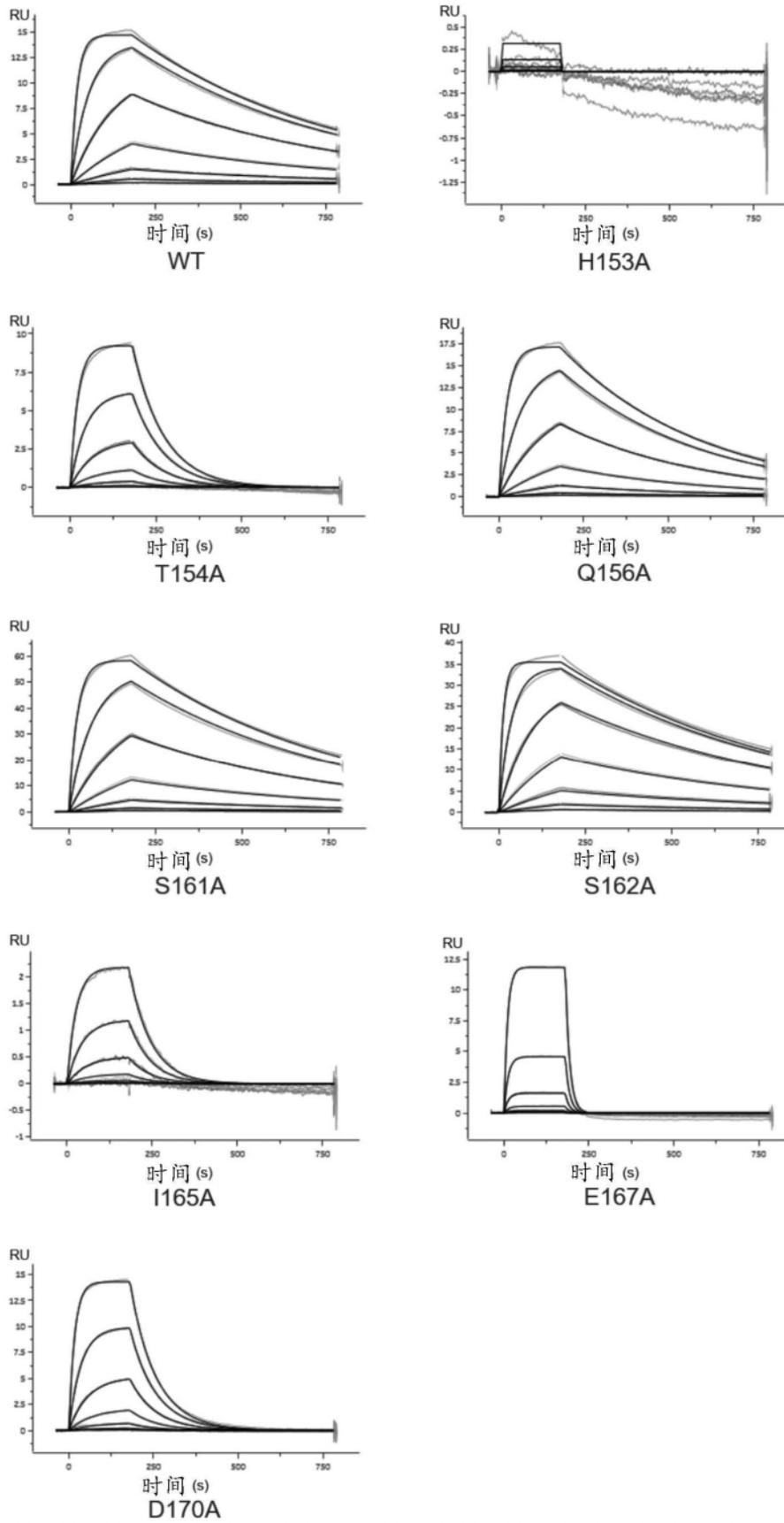


图5

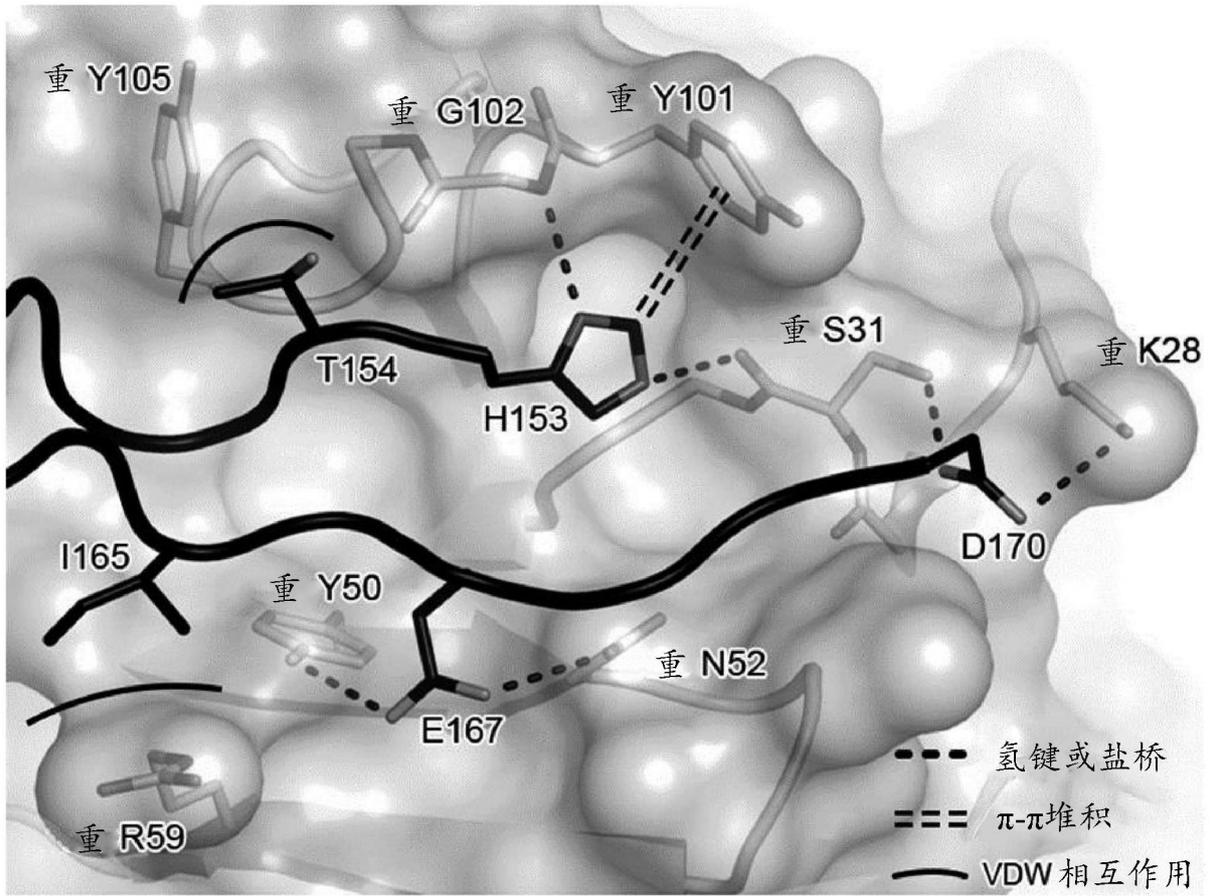


图6

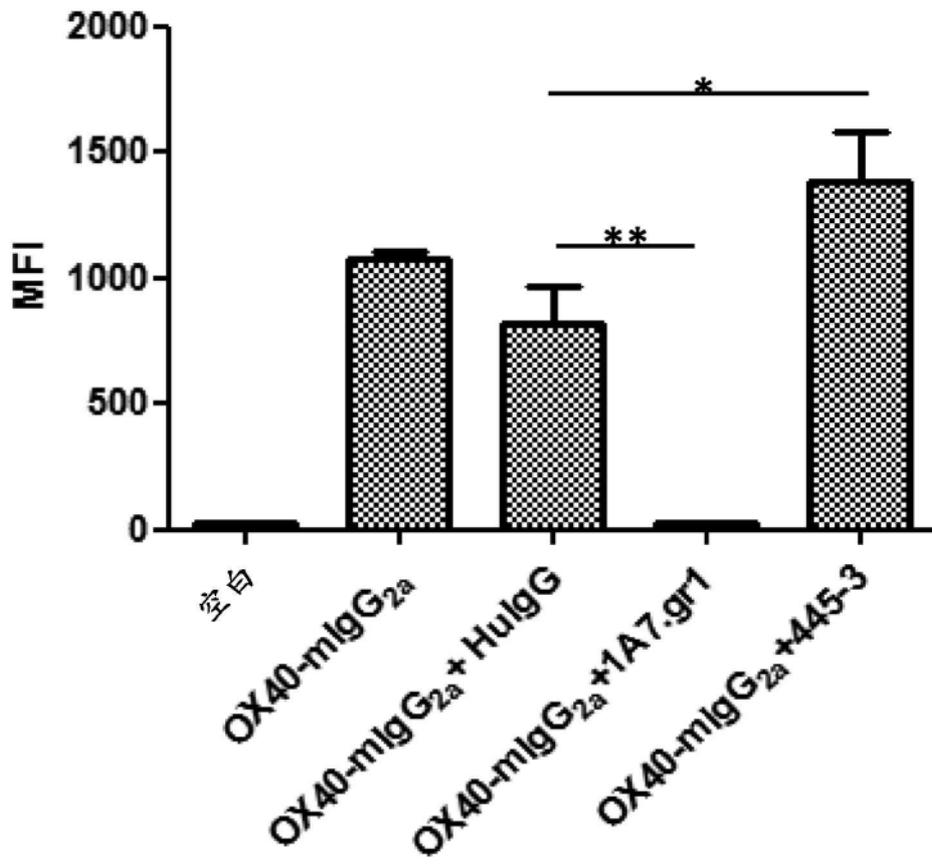


图7

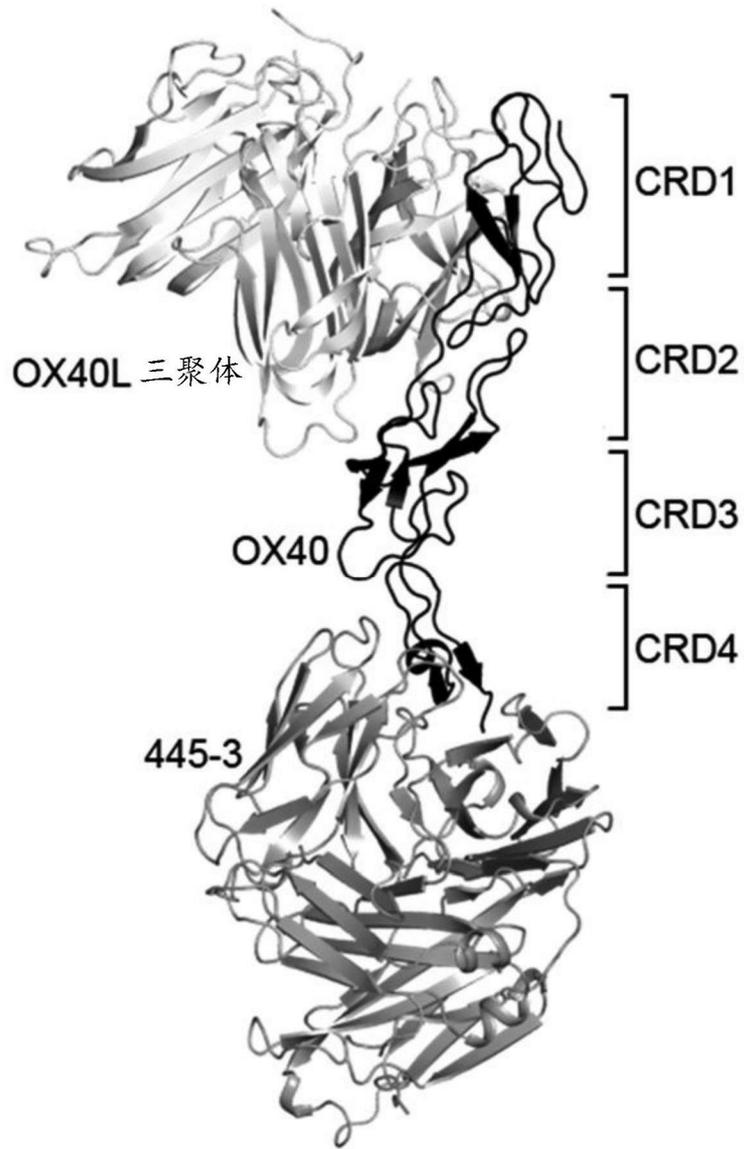


图8

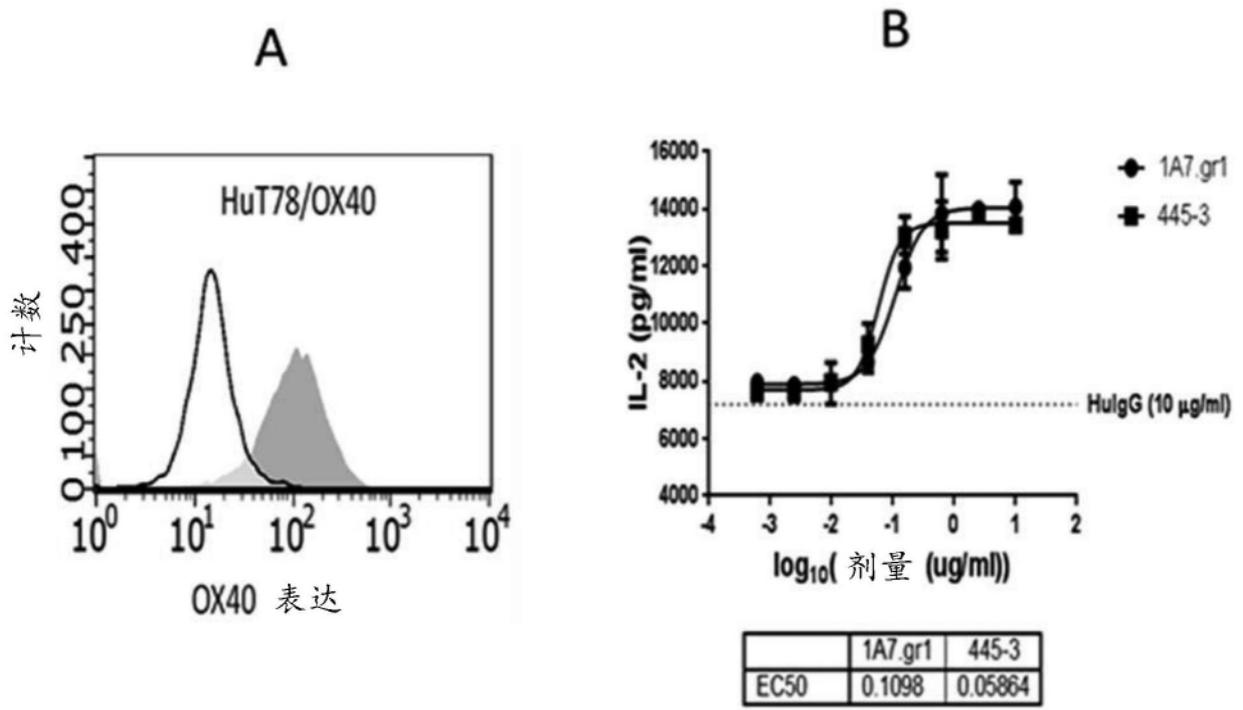


图9A-B

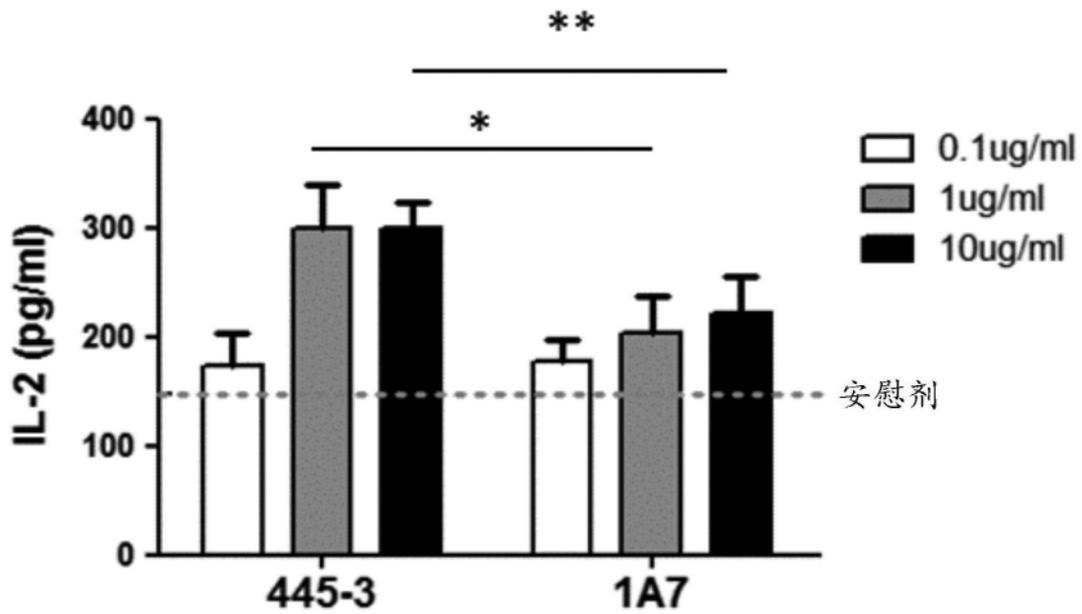


图10

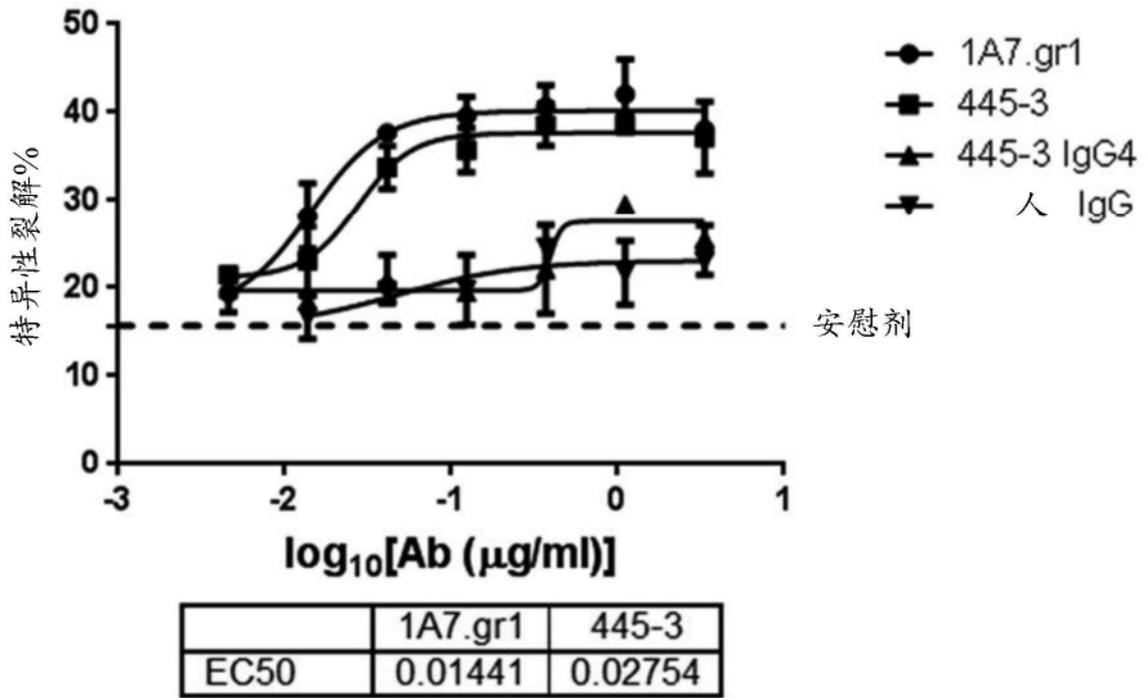


图11

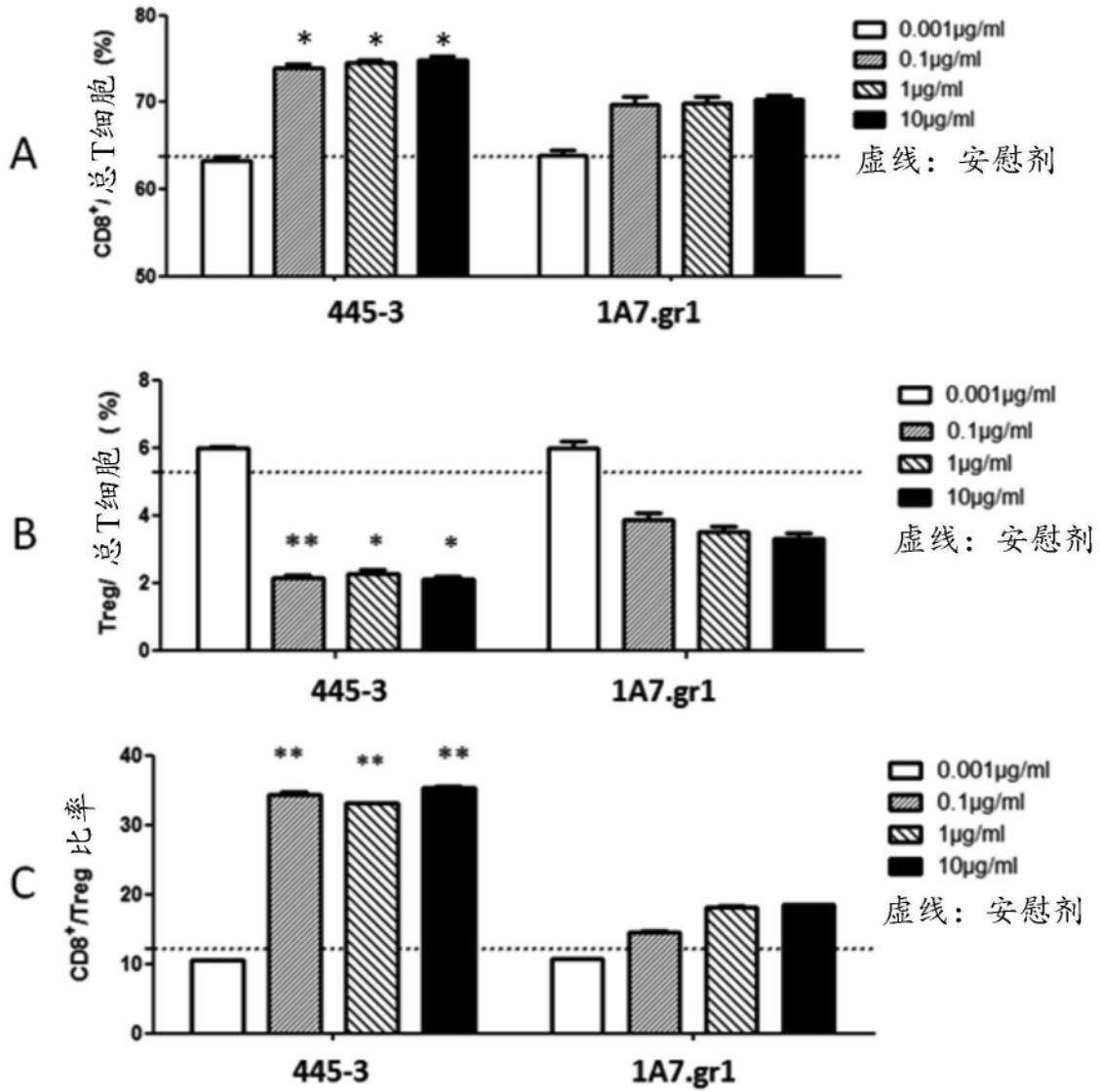


图12A-12C

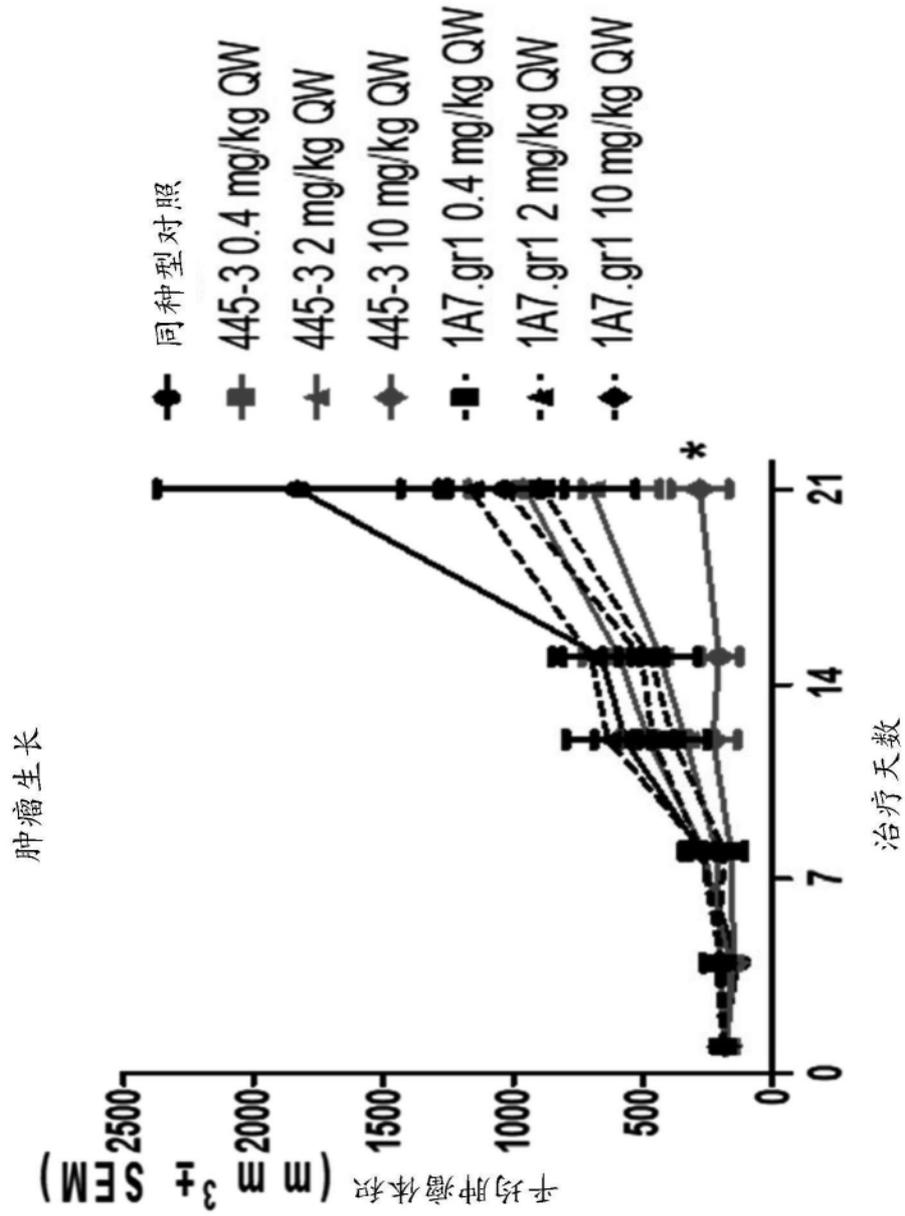


图13A

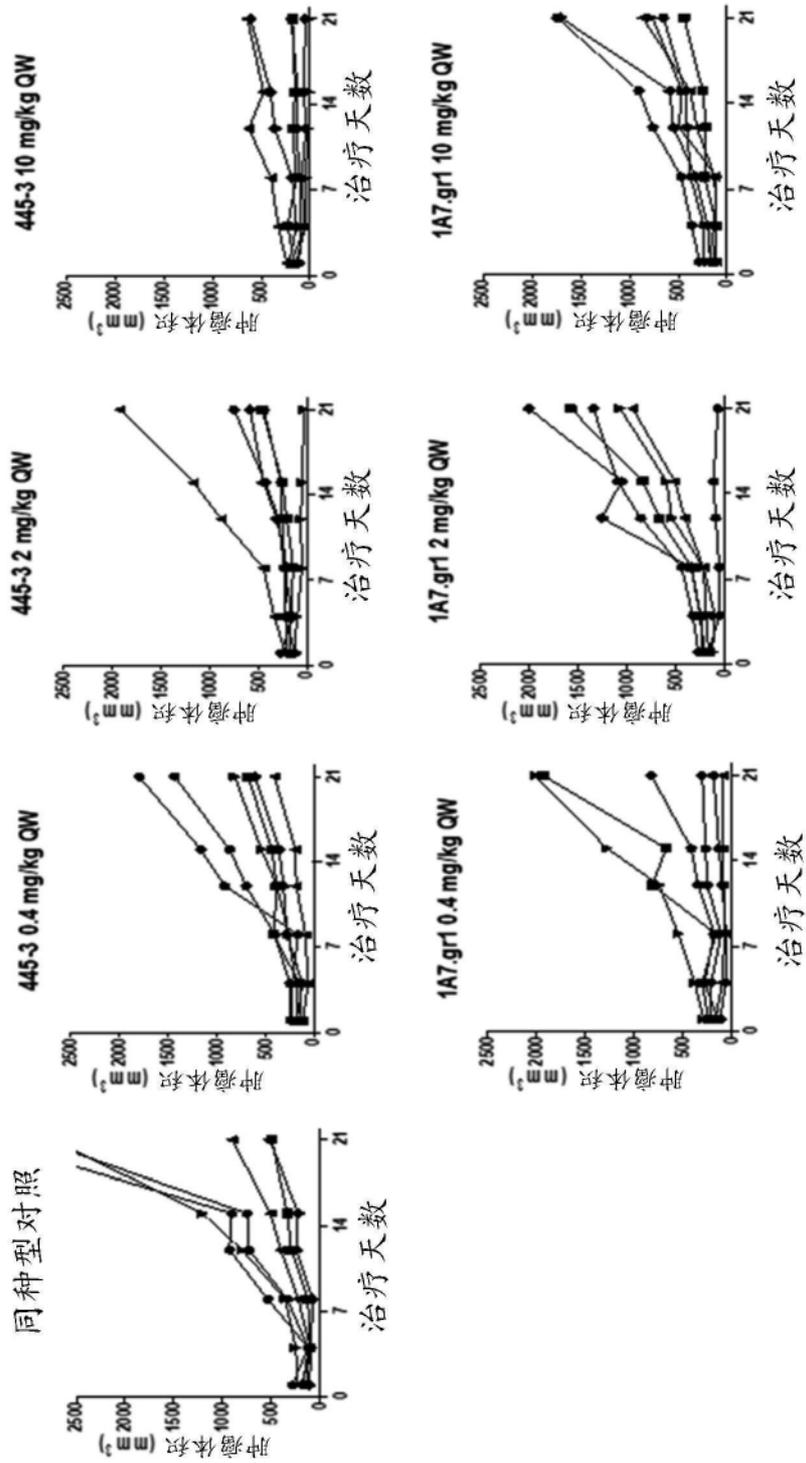


图13B

重链		轻链		用重链和轻链共转染		FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC ₅₀ (ng/ml)	最大(MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	
445-1VH	-	445-1VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.89E-03	1.64E-08	
445-1VH-M48I	FR2	445-1VL	-	445-2(M48I)-1 (VH上具有M48I突变的445-1)	353	480	2.30E+05	3.56E-03	1.55E-08	
445-1VH	-	445-1VL-S24G	CDR1	445-1-2(S24G) (VL上具有S24G突变的445-1)	307	470	2.22E+05	3.60E-03	1.62E-08	
445-1VH	-	445-1VL-S10T/E81D/D70E	FR1/FR3	445-1-2(S10T/E81D/D70E) (VL上具有S10T、E81D和D70E突变的445-1)	280	510	2.28E+05	3.40E-03	1.49E-08	

图14A

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

图14B

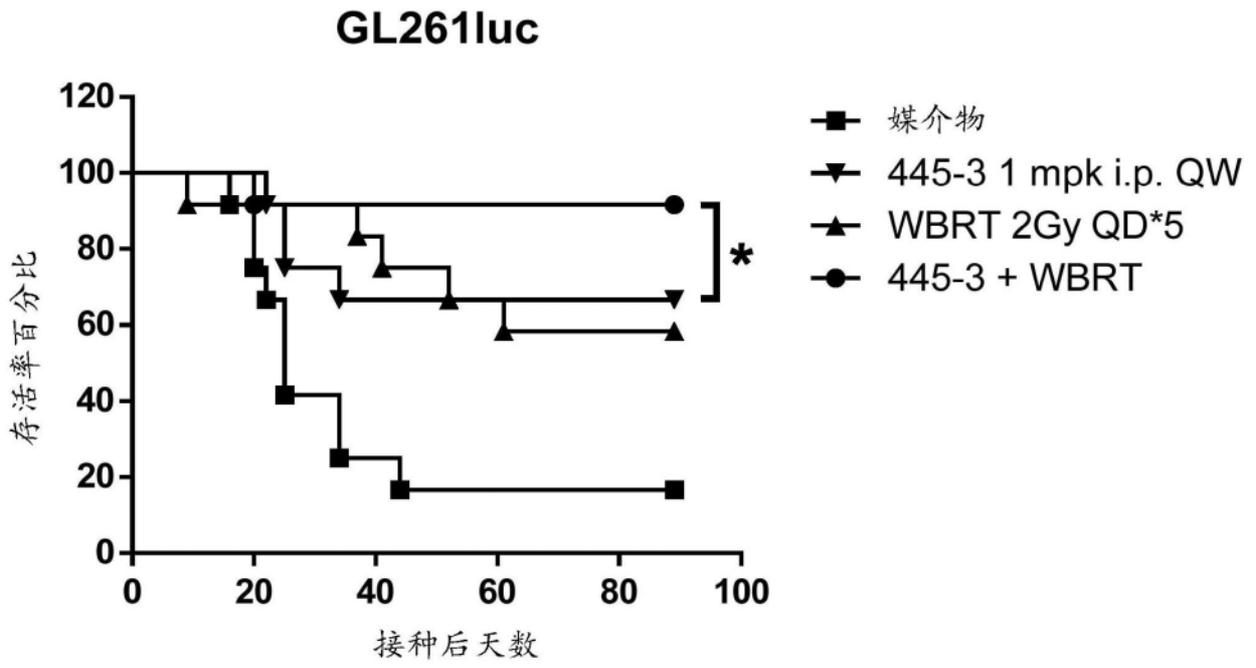


图15