

(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
2017年4月20日 (20.04.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/063162 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)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/091958
- (22) 国际申请日: 2015年10月15日 (15.10.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 苏州丁孚靶点生物技术有限公司 (DINGFU BIOTARGET, CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402 栾彦, Jiangsu 215125 (CN)。
- (72) 发明人: 徐霆 (XU, Ting); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 栾彦 (LUAN, Yan); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 汪晶晶 (WANG, Xiaoxiao); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 彭建建 (PENG, Jianjian); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 马树立 (MA, Shuli); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 马慧 (MA, Hui); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 潘晓龙 (PAN, Xiaolong); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 傅士龙 (FU, Shilong); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 宁姗姗 (NING, Shanshan); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 费焯琼 (FEI, Yeqiong); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。 赵猛 (ZHAO, Meng); 中国江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园A6-402, Jiangsu 215125 (CN)。
- (74) 代理人: 北京同辉知识产权代理事务所(普通合伙) (SHNGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区青云里满庭芳园小区9号楼青云当代大厦9层909号刘洪勋, Beijing 201203 (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

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

(54) 发明名称: 抗OX40抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention provides an anti-OX40 human antibody. Specifically, a specifically-bound OX40 human antibody is obtained by means of screening with a yeast display technology, and the affinity of the antibody is improved by means of affinity maturation. The present invention also provides application of the antibody to prevention or curing of tumors.

(57) 摘要: 本发明提供了抗OX40全人抗体。具体地, 通过酵母展示技术筛选得到特异性结合OX40的全人抗体, 并通过亲和力成熟改善了抗体的亲和力。本发明还提供了所述抗体用于预防或治疗肿瘤的用途。



WO 2017/063162 A1

抗OX40抗体及其应用

技术领域

本发明涉及医药生物领域，尤其涉及一种抗OX40抗体及其应用。

背景技术

T细胞活化需要两种信号协同作用：第一信号由T细胞抗原受体（TCR）识别抗原产生，经CD3分子将信号转导至细胞内，第一信号决定T细胞在适应性免疫应答中的特异性；第二信号是由抗原提呈细胞（APC）或者靶细胞表面的共刺激分子与T细胞表面的相应的协同刺激分子受体相互作用而产生。共刺激信号刺激抗原特异性T细胞增殖，并分化为效应T细胞。如果缺乏共刺激信号，T细胞则会进入无反应或自身免疫耐受状态，甚至进入程序性死亡。

OX40（又称TNFRSF4、ACT35、CD134、IMD16或TXGP1L）是TNFR受体超家族成员，是I型跨膜糖蛋白，OX40主要表达于活化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上（Paterson等（1987）*Mol Immunol*24:1281-1290）。其胞外段由3个半胱氨酸富集域和一个C端不完全CRD组成（DeanneM等（2006）*Structure*14:1321-1330）。OX40是次级共刺激分子。与CD28不同，OX40不表达于静止的T细胞表面，而在T细胞活化24-72小时有较高的表达。其配体OX40L（TNFSF4，TXGP1，OX-40L，gp34或CD252）是II型跨膜糖蛋白，表达于活化的抗原提呈细胞，如树突状细胞、B细胞等（Godfrey,W.R等（1994）*JExpMed*180:757-762）。OX40/OX40L信号在T细胞的活化、增值以及抑制凋亡过程中发挥着非常重要的作用。研究表明激活型的OX40抗体能够有效地促进T细胞增殖和活化，并产生较好的抗肿瘤作用（BrendanD.Curti等（2013）*CancerRes*73:7189-7198）。

StefanieN.Linch等人对OX40激活性抗体和其他治疗肿瘤的方法的联和使用做了详细的整理与描述（StefanieN.Linch等（2015）*frontiers in oncology* 5:1-14）。已有的报道也显示当放疗和OX40激活性抗体联用时可以明显延长小鼠的生存期（Gough MJ等（2010）*J Immunother* 33（8）:798-809；Kjaergaard J等（2005）103（1）: 156-164）。

本领域仍需要能够与OX40高亲和性结合、并且具有OX40激动剂活性的抗

OX40抗体。

发明内容

为解决上述技术问题，本发明的目的是提供一种良好特异性、较高的亲和性和稳定性的抗 OX40 抗体及其应用。

本发明第一方面涉及抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其包括选自如下一组的 CDR 区：

1) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 5-7 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%；

2) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 23-25 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 32-34 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%；

3) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 41-43 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 50-52 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其还包括选自于如下一组的重链可变区框架区：

1) 其重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 8-11 所示；

2) 其重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 26-29 所示；

3) 其重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 44-47 所示。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其还包括选自于如下一组的轻链可变区框架区：

1) 其轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 17-20 所示;

2) 其轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 35-38 所示;

3) 其轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别如 SEQ ID NO: 53-56 所示。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分, 包括选自于如下一组的重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示, 或者其重链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列: a) 结合相同抗原表位、b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的, 包括选自于如下一组的重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示, 或者其重链可变区 CDR 区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列: a) 结合相同抗原表位; b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

进一步的, 包括选自于如下一组的重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 4、22、40、62、66、69、72 和 79 所示。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分, 包括选自于如下一组的轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示, 或者其轻链可变区 CDR 区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列: a) 结合相同抗原表位、b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的, 包括选自于如下一组的轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示, 或者其轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列: a) 结合相同抗原表位; b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

进一步的, 包括选自于如下一组的轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 13、31、49 和 74 所示。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分, 其为全抗体、双特异性抗体、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv。

在本发明的一个实施方案中, 当其为 scFv 时, 其重链和轻链可变区之间可含有连接肽, 所述连接肽的序列如 SEQ ID NO 1 所示。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分, 其重链恒

定区选自 IgG、IgM、IgE、IgD 和 IgA。

在本发明的实施方案中，其重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在本发明的具体实施方案中，其重链恒定区为 IgG1 或 IgG4。

根据本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其轻链恒定区为 κ 或 λ 。

本发明第二方面涉及核酸分子，其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列，所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 5-7;

(2) SEQ ID NO: 23-25;

(3) SEQ ID NO: 41-43;

(4)与前述(1)~(3)序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的，所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

SEQ ID NO: 4、22 和 40，或与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位、b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的，包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示，或者其重链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

进一步的，包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22、40、62、66、69、72 和 79 所示。

在本发明的实施方案中，所述核酸分子还包含能够编码抗体重链恒定区的核酸序列；所述重链恒定区选自 IgG、IgM、IgE、IgD 和 IgA。

在本发明的实施方案中，其重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在本发明的具体实施方案中，其重链恒定区为 IgG1 或 IgG4。

本发明第二方面涉及核酸分子，其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列，所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 14-16;

(2) SEQ ID NO: 32-34;

(3) SEQ ID NO: 50-52;

(4)与前述(1)~(3)序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的，所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

SEQ ID NO: 13、31 和 49，或与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

进一步的，包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示，或者其轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

进一步的，包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31、49 和 74 所示。

在本发明的实施方案中，所述核酸分子还包含能够编码抗体轻链恒定区的核酸序列；所述轻链恒定区为 κ 型或 λ 型。

本发明第四方面涉及载体，其含有本发明第二或第三方面任一项的核酸分子。

根据本发明第四方面任一项的载体，其含有本发明第二方面任一项的核酸分子和第三方面任一项的核酸分子。

本发明第五方面涉及宿主细胞，其含有本发明第二或第三方面任一项的核酸分子或本发明第四方面任一项的载体。

本发明第六方面涉及偶联物，其含有本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，以及其它生物活性物质，所述抗 OX40 抗体或其抗原结合部分直接或通过连接片段与其它生物活性物质偶联。

在本发明的实施方案中，所述其它生物活性物质选自可间接抑制肿瘤细胞生长、或通过激活机体免疫反应从而抑制或杀灭细胞，从而达到治疗肿瘤的化学物质、多肽、酶、细胞因子或其他具有生物活性的单一物质或混合物质，例

如白介素类、肿瘤坏死因子、趋化因子、纳米颗粒等。

本发明第七方面涉及组合物(例如药物组合物),其含有本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分、第二方面或第三方面任一项的核酸分子、第四方面任一项的载体、第五方面任一项的宿主细胞、或者本发明第六方面任一项的偶联物,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它生物活性物质。根据本发明第七方面任一项的组合物(例如药物组合物),所述其它生物活性物质包括但不限于其它抗体、融合蛋白或药物(例如抗肿瘤药物,如放、化疗药物)。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分、第二方面或第三方面任一项的核酸分子、第四方面任一项的载体、第五方面任一项的宿主细胞、第六方面任一项的偶联物或第七方面任一项组合物用于制备预防或治疗肿瘤的用途。

借由上述方案,本发明至少具有以下优点:

本发明利用酵母展示技术,通过筛选和进一步亲和力成熟得到了具有良好特异性、较高的亲和性和稳定性的抗OX40抗体,该抗体能够特异性地与人OX40结合,其可以通过和活化的T细胞结合进而增强T细胞的活化作用,对肿瘤生长具有显著的抑制作用。另外,本发明的抗OX40抗体为全人源抗体,与传统的鼠源、嵌合抗体和人源化抗体相比,具有更低的免疫原性,减少病人的排异反应,具有更好的成药能力。

上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

图 1 是纯化的 anti-hOX40scFv 对 hOX40 的结合的结果图,

其中, x 轴表示 EGFP 的荧光强度, Y 轴表示 anti-hlg-PE 的荧光强度;

图 2 是 anti-OX40 抗体的特异性检测,

其中，x 轴表示 EGFP 的荧光强度，Y 轴表示 anti-hlg-PE 的荧光强度；

图 3 是亲和力提高的酵母单克隆染色结果图；

图 4 是 ELISA 法检测三种抗体与 hOX40 的结合能力图；

图 5 是 ELISA 法检测亲和力成熟后的不同重链突变体与 hOX40 的结合能力图；

图 6 是 ELISA 法检测亲和力成熟后的 H96 位重链突变体和不同轻链突变体与 hOX40 的结合能力图；

图 7 是 anti-hOX40 抗体体外激动剂活性的检测结果图；

图 8 是 H96-L80 的 3 种 IgG 亚型的体外 agonist 活性对比图；

图 9 是 anti-OX40 抗体与人和恒河猴的 CD4+T 和 CD8+T 细胞结合能力检测图；

图 10 是 O21 scFv 抗体激动剂活性检测结果图；

图 11 是 O21 scFv 和 IgG 两种形式的激动剂活性检测结果；

图 12 是 H96-L80 的 IgG1 和 IgG4 两种亚型的体外对 T 细胞亚型的影响；

图 13 是 O21 mAb 在体内对肿瘤(PC-3)生长抑制作用的结果图；

图 14 是 O21 mAb 在体内对肿瘤(A375)生长抑制作用的结果图；

图 15 是 45°C 加速稳定实验评价 anti-OX40 抗体稳定性的结果图，

其中 A 为浓度检测，B 为单体含量检测，C 为 NF- κ b 系统对体外活性的检测；

图 16 是 H96-L80 抗体的药物代谢动力学检测结果。

具体实施方式

下面结合附图和实施例，对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

以下对本发明做进一步描述：在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中使用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可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)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。本发明中所述的氨基酸的位置根据 abysis 在线工具比对得到 (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/index.html>)，并不代表氨基酸的序列中的实际排位。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

在本发明中，术语抗体的“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分，所述部分保持结合抗体所结合的共同抗原(例如，OX40)的能力，与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下，抗原结合部分包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如，scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)

和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

在本发明中，术语“载体”指的是，可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

在本发明中，术语“宿主细胞”指的是导入载体的细胞，包括如下许多细胞类型，如大肠杆菌或枯草菌等原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞的动物细胞。

在本发明中，“特异性结合”指的是，指两分子间的非随机结合反应，如抗体和产生该抗体的抗原间的反应。此处，结合第一种抗原的抗体对第二种抗原的结合亲和力是检测不到或很弱。在某些实施方式中，一个某抗原特异性抗体是指以亲和力 (KD) $\leq 10^{-5}$ M（如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M 等）结合该抗原，其中 KD 指解离率与结合率的比值 (koff/kon)，其可以采用本领域技术人员熟悉的方法进行测定。

实施例 1：重组人 OX40 的表达和相关 EGFP 细胞制备

S1.1、根据蛋白数据库 Uniprot 上人 OX40 的氨基酸序列 (P43489)，得到人 OX40 胞外结构域的氨基酸序列 (hOX40)（即 P43489 中第 1 位残基至 216 位残基）；

S1.2、根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 gamma1 (IgG1) 的恒定区氨基酸序列 (P01857)，得到人 IgG1-Fc (hFc) 的结构域氨基酸序列（即 P01857

中第 104 位残基至 330 位残基);

S1.3、根据蛋白数据库 Uniprot 上小鼠免疫球蛋白 gamma1 (IgG1) 的恒定区氨基酸序列 (P01868), 得到小鼠 IgG1-Fc (muFc) 的结构域氨基酸序列 (即 P01868 中第 98 位残基至 324 位残基);

S1.4、通过人工合成的方式得到步骤 S1.1~ S1.3 中的 DNA 片段, 合成好的基因序列分别经 Fermentas 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切亚克隆到商业化载体 pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) 中, 测序验证构建质粒的准确性, 获得重组质粒 DNA 即: pcDNA4-hOX40-hFc、pcDNA4-hOX40-muFc;

S1.5、根据蛋白数据库 Uniprot 上信息得到增强型绿色荧光蛋白 EGFP 氨基酸序列 (C5MKY7)、人 OX40 的氨基酸序列 (P43489)、鼠 OX40 的氨基酸序列 (P47741)、人 CD137 的氨基酸序列 (Q07011)、人 CD27 氨基酸序列 (P26842);

S1.6、通过人工合成的方式得到步骤 S1.5 中的 DNA 片段, 合成好的基因序列分别经 Fermentas 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切亚克隆到商业化载体 pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) 中, 测序验证构建质粒的准确性, 获得重组质粒 DNA 即: pcDNA4-hOX40-EGFP、pcDNA4-hCD137-EGFP、pcDNA4-mOX40-EGFP 和 pcDNA4-hCD27-EGFP。

S1.7、将步骤 S1.6 中的 EGFP 重组质粒转染到 HEK293(ATCC, CRL-1573™) 细胞中, 转染 48h 后通过荧光激活信号分选 (FACS) 确认 hOX40、hCD137、mOX40、hCD27 的表达。

S1.8、将 pcDNA4-hOX40-Fc、pcDNA4-hOX40-muFc 瞬时转染至 HEK293 细胞用于蛋白生产。将重组表达质粒用 Freestyle293 培养基稀释并加入转化所需 PEI (Polyethylenimine) 溶液, 将每组质粒/PEI 混合物分别加入细胞悬液中, 放置在 37°C, 10%CO₂, 90rpm 中培养; 培养 5~6 天后, 收集瞬时表达培养上清液, 通过 ProteinA 亲和层析法, 初步纯化得到 hOX40-Fc、hOX40-muFc 蛋白样品, 用于以下各实施例。得到的蛋白样品利用 SDS-PAGE 进行初步的检测, 可以清晰的看到目的条带。

实施例 2: 从酵母展示文库中筛选 anti-hOX40 抗体, 克隆表达和鉴定

2.1 方法

采用酵母展示技术筛选针对人 OX40 的全人抗体。通过克隆来自 150 个健康人的 PBMC 的 IgM 和 IgG cDNA 中的 VH 和 VL 基因到特定载体, 构建 scFV 酵母展示文库(VH 和 VL 中间的连接序列是 GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 1) 连接肽), 库容为 5×10^8 。将 10 倍库容的酵母库复苏, 诱导酵母表面表达抗体, 用 100nM 生物素化的 hOX40 抗原利用磁珠分选的方式富集二次, 然后用生物素化的 hOX40 做流式分选再富集两次。得到的酵母涂板, 挑取单克隆。单克隆酵母经扩增和诱导表达后用 anti-myc 抗体和生物素化的 hOX40 或对照抗原 hCD137 染色分析, 抗原阳性/对照酵母阴性的酵母为阳性酵母。

将经过 FACS 确认的酵母克隆进行酵母菌落 PCR 和测序, PCR 引物为: sequence-F: CGTAGAATCGAGACCGAGGAGA (SEQ ID NO: 2); sequence-R: CTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC (SEQ ID NO: 3); 测序的引物为 sequence-R。得到测序结果后用 BioEdit 软件对序列进行比对分析。

将上述得到的单链抗体 scFv 基因及前述的人 IgG1-Fc 基因融合后经 Fermentas 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切克隆到商业化载体 pcDNA4/myc-HisA 中, 按照分子克隆的标准操作进行克隆和质粒小提。提取后的质粒在 HEK293 细胞中瞬时表达, 并通过 protein A 柱纯化。

取 hOX40-EGFP 细胞, 重悬于 0.5%PBS-BSA Buffer 中, 加入上述纯化后 2 μ g 的 anti-hOX40scFv 抗体, 同时设置相关对照, 阴性对照为 2 μ g 的 hIgG1 蛋白。二抗为 eBioscience 的 anti-hIg-PE。染色完毕后流式细胞仪进行检测。以此方法鉴定能结合细胞表面 hOX40 抗原的抗体。

经过筛选和鉴定后得到 3 株特性较好的抗体分别是 O3scFv、O19scFv、O21scFv。如图 1 所示, 3 株抗 hOX40 的抗体均能够与细胞表面 hOX40 相结合, 而阴性对照不能够与细胞表面 hOX40 相结合。上述抗体重链和轻链可变区之间含有连接肽序列 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1)。

2.2 序列

2.2.1 O3 scFv 重链可变区氨基酸序列:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCGFNGEYFT**DYFWT**WVRQPPGEALEWLAL**LIYWDDDER**YSPSLK
NRLIITKDISKNQVLTMTHEPADTGTYYCAR**WGGSLMNAFDV**WGPMTMTVSS (SEQ ID NO: 4)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3, 其序列编号分别为 SEQ ID NO: 5-7;

未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 8-11；
其对应的 DNA 序列为：

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT
GCGGTTTCAATGGAGAATACTTCACTGATTACTTCTGGACCTGGGTCCGGCAGCCCCCGGAGAGGCC
CTGGAGTGGCTTGCACCTCATTTATTGGGATGATGATGAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAACAGACT
CATCATCACCAAGGACATTTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCCACATGGAGCCTGCGGACA
CAGGCACCTATTACTGTGCGAGATGGGGTGGTTCTTTAATGAACGCTTTTGATGTCTGGGGCCCAGGG
ACAATGGTCACCGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 12)

其轻链可变区氨基酸序列：

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTTGTSSDVGGYNYVSWYQRHPGKAPRLMIYDVTKRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSIAVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO: 13)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO:
14-16；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID
NO: 17-20；

其对应的 DNA 序列为：

CAGTCTGCCCTGATTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCT
GCACTGGAACCAGTAGTGACGTTGGTGGTTATAATTATGTCTCCTGGTACCAACGACACCCAGGCAAA
GCCCCAGACTCATGATTTATGATGTCACTAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC
CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACT
GCAGCTCATATAACAAGCAGCAGCATTGCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCTC (SEQ ID
NO: 21)

2.2.2 O19 scFv 重链可变区氨基酸序列：

QVQLVESEGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYMDSV
KGRFTISRDNKNSLFLQMNTLRAEDTAMYYCTRVSFGVPTYDDFWRSYATPAWYFDFWGRGTLTVS
S (SEQ ID NO: 22)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 23-25；
未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 26-29；
其对应的 DNA 序列为：

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGAGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT

GCGCAGCCTCTAGATTCACGTTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGG
 CTGGAGTGGGTGGCCAATATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATATGGACTCTGTGAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTGCAGATGAACACCCTAAGAGCCGAGG
 ACACGGCTATGTATTACTGTACGAGGGTTAGTTTCGGAGTGCCGACGTATGACGATTTTTGGAGGAGT
 TACGCGACGCCCGCTTGGTACTTCGATTTTTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ
 ID NO: 30)

其轻链可变区氨基酸序列:

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTGISSDDGYKYVSWYQQYPGKAPKLMYDVSKRPSGISFRF
 SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSNMTPYVFGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 31)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO:
 32-34；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID
 NO: 35-38；

其对应的 DNA 序列为:

CAGTCTGCTCTGATTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCT
 GCACTGGAATTAGTAGTGACGATGGTTATTATAAGTATGTCTCCTGGTACCAACAATATCCAGGCAAA
 GCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGATTTCTTTTCGTTCTCTGGCTC
 CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACT
 GCAGCTCATATAACAAGTAACATGACCCCCTATGTCTTCGGCACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA
 (SEQ ID NO: 39)

2.2.3 O21scFv 重链可变区氨基酸序列:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSVSNSVSWDWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNEYA
VSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNNYFFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:
 40)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 41-43；
 未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 44-47；

其对应的 DNA 序列为:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCT
 GTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTCTTGGGACTGGATCAGGCAGTCCCCCTCG
 AGGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCAAGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGT

GGAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGA
CTCCCGAGGACACGGCTATATATTTCTGTGTAAGAAATAACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGT
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 48)

其轻链可变区氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASDRATGIPARFSG
SGSGTDFLTLSLEPEDFAVYYCQLRSNWPPGYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 49)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 50-52；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 53-56；

其对应的 DNA 序列为:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGC
TGCGTAGCAACTGGCCTCCGGGGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID
NO: 57)

实施例 3: 3 株抗体的 scFv 型抗体格式化为 IgG 型抗体

根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 gamma4 (IgG4) 的恒定区氨基酸序列 (P01861)，得到人 IgG4 恒定区氨基酸序列。将筛选得到的 O3、O19、O21 的重链可变区 VH 序列与人 IgG4 恒定区基因序列拼接在一起，将拼接好的基因合成，经 Fermentas 公司 HindIII 和 EcoRI 双酶切亚克隆至载体 pcDNA4/myc-HisA 中得到 pcDNA4-O21HC、pcDNA4-O3HC、pcDNA4-O19HC。

根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 Kappa 的恒定区氨基酸序列 (P01834)，得到人 Kappa 轻链恒定区氨基酸序列。将筛选得到的 O21 的轻链可变区 VL 序列与人 Kappa 轻链恒定区基因序列拼接在一起；根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 lambda 的恒定区氨基酸序列 (A0M8Q6)，得到人 lambda 轻链恒定区氨基酸序列，将筛选得到的 O3、O19 的轻链可变区 VL 序列与人 lambda 轻链恒定区基因序列拼接在一起，将拼接好的基因合成，经 Fermentas

公司 HindIII 和 EcoRI 双酶切亚克隆至载体 pcDNA4/myc-HisA 中得到 pcDNA4-O21LC; pcDNA4-O3LC; pcDNA4-O19LC。

利用 AidLab 公司提供的质粒大提试剂盒 (PL14) 对上述得到的重链和轻链质粒进行质粒大提。将重组构建的轻链和重链质粒共转染 HEK293 细胞进行抗体表达。将重组表达质粒用 Freestyle293 培养基稀释并加入转化所需 PEI (Polyethylenimine) 溶液, 将每组质粒/PEI 混合物分别加入细胞悬液中, 放置在 37°C, 10%CO₂, 120rpm 中培养, 培养 5~6 天后, 收集瞬时表达培养上清液, 通过 ProteinA 亲和层析法, 纯化得到 anti-hOX40 抗体: O3mAb、O19mAb 和 O21mAb。

实施例 4: anti-hOX40 Abs 特性鉴定

抗体是否特异性识别 hOX40 的鉴定:

纯化的 anti-hOX40 抗体与 hOX40、hCD137 和 hCD27 蛋白的结合

取实施例 1 构建的表达 hOX40-EGFP、hCD137-EGFP 和 hCD27-EGFP 的 HEK293 细胞, 重悬于 0.5%PBS-BSA Buffer 中, 加入 anti-hOX40 mAb 蛋白, 冰上孵育 20min。洗涤后加入 eBioscience 二抗 anti-hIg-PE, 冰上 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 0.5%PBS-BSA Buffer 中, 流式细胞仪进行检测。结果如图 2 所示, 三株抗体 (O3mAb、O19mAb 和 O21mAb) 均能与 hOX40-EGFP 细胞结合, 而不能与其他几种 EGFP 细胞 (hCD137-RGFP-293F、hCD27-RGFP-293F) 结合, 展示出很好的特异性。

实施例 5: anti-OX40 抗体的体外亲和力提高

由于三株抗体 (O3mAb、O19mAb 和 O21mAb) 均能特异性与 hOX40-EGFP 细胞结合, 且试验发现 O21 scFv 与 hOX40 有更高的亲和力, 同时瞬时转染有稳定的较高表达量, 因而选择 O21 scFv 抗体做进一步的体外亲和力提高试验; 然而应当说明的是, 体外亲和力提高试验的目的在于研究突变率对于抗体亲和力的影响, 试验结果应当不局限于 O21 scFv 的判定, 而应理解为包括 O3scFv、O19 scFv 和 O21 scFv 在内的抗体, 其突变率对于抗体亲和力的影响。

5.1 anti-OX4021#ScFv 亲和力改善的酵母文库构建

以实施例 1 构建的 pcDNA4-OX40-21-Fc 质粒为模板，pcDNA4-F:TCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC (SEQ ID NO: 58) 和 cMyc-BBXhoI:GCCAGATCTCGAGCTATTACAAGTCTTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCTAGAATTCCG (SEQ ID NO: 59) 为引物进行标准 PCR 反应。得到的 PCR 产物经 Fermentas 公司的 NheI 和 BglII 酶切后构建重组质粒。接下来参考文献 Ginger 等 (2006) NatProtoc1 (2):755-68 的方法，利用 error prone PCR 的方法获得 scFv 随机突变的 PCR 产物。所用的引物为 ep-F: TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO: 60) 和 ep-R:GGCAGCCCCATAAACACACAGTAT (SEQ ID NO: 61)。得到的 PCR 产物经 Fermentas 公司 GeneJET DNA purification Kit 纯化后再乙醇沉淀浓缩至浓度大于 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。剩下的操作方法参考文献 Ginger 等 (2006) Nat Protoc 1 (2):755-68 的方法，利用酵母电转化和体内重组的方法获得亲和力成熟的酵母库。

5.2 产生亲和力改善的酵母 anti-OX40 21#scFv 筛选

将上述得到的亲和力成熟后的酵母库用 10nM 和 1nM 的 hOX40-Fc 蛋白经过两轮流式分选，分选得到的酵母产物涂板，挑取单克隆鉴定。利用低浓度抗原染色的方法，以之前得到的野生型酵母作为对照，流式染色确定亲和力提高的酵母单克隆，将经过 FACS 确认的酵母克隆进行酵母菌落 PCR 和测序，方法同上。将测序得到的序列利用 BioEdit 软件进行突变位点的分析。

整理对抗体亲和力没有影响甚至是提高亲和力的 O21 scFv 突变位点，结果如表 1 所示，该表结果应当理解为，O21 scFv 上发生如表中所示的其中之一或多个突变，对于亲和力没有影响甚至会有所提高；与之相对应的筛选出的酵母单克隆序列分析结果，如表 2 所示，该表应当理解为，表 1 中列出的突变位点，当具有如表 2 所示的几种突变组合时，可以提高抗体的亲和力；表 2 中所示的酵母染色结果如图 3 所示，可见与 O21 scFv 相比，抗体的亲和力均得到不同程度的提高。

表 1 对抗体亲和力没有影响的 O21 scFv 突变位点

重链	轻链
H7 位: S 突变成 L	L30 位: S 突变成 G
H13 位: K 突变成 M	L90 位: L 突变成 Q

H28 位: S 突变成 N	
H33 位: S 突变成 G	
H43 位: R 突变成 G	
H65 位: S 突变成 N	
H67 位: I 突变成 M	
H96 位: N 突变成 D	

表 2 亲和力提高的酵母单克隆序列分析结果

名称	突变位点 (重链)	突变位点 (轻链)
anti-OX40-21-1		L90 位: L 突变成 Q
anti-OX40-21-2	H43 位: R 突变成 G H96 位: N 突变成 D	
anti-OX40-21-7		L30 位: S 突变成 G L90 位: L 突变成 Q
anti-OX40-21-11	H7 位: S 突变成 L H96 位: N 突变成 D	L30 位: S 突变成 G
anti-OX40-21-13	H28 位: S 突变成 N H33 位: S 突变成 G H96 位: N 突变成 D	
anti-OX40-21-14	H96 位: N 突变成 D	L30 位: S 突变成 G
anti-OX40-21-16	H67 位: I 突变成 M	L90 位: L 突变成 Q
anti-OX40-21-17	H13 位: K 突变成 M H65 位: S 突变成 N H96 位: N 突变成 D	

由表 2 可知, 对于 O21 scFv 重链 CDR 区和轻链 CDR 区而言, 已有实验指出可分别突变 3 个和 2 个氨基酸 (实施例 6 中的 anti-OX40 21#H96-L80 mAb, 其轻链突变可至 3 个氨基酸), 仍可以维持甚至提高抗体的亲和力, 而现在已知 O21 scFv 重链可变区和轻链可变区分别包括 119 个氨基酸 (其中 CDR 区 32 个

氨基酸，FR 区 87 个氨基酸）和 109 个氨基酸（其中 CDR 区 29 个氨基酸，FR 区 80 个氨基酸），那么可以认为与重链 CDR 区或轻链 CDR 区的同源性在 90% 以上的，仍具有维持甚至提高抗体亲和力的能力。实际情况下，抗体的亲和力与序列同源性的百分比例之间并没有决定性的联系，而是更多地受到可决定抗体表位（或称抗原决定部位）的关键氨基酸残基的影响，在这些关键氨基酸残基未发生突变或突变不具决定性改变作用的前提下，序列同源性可低至 70%。

实施例 6：scFv 型抗体格式化为 IgG 型抗体

按照实施例 3 中的方法对亲和力成熟后的 scFv 型抗体格式化为 IgG 型抗体型抗体，得到一系列的 anti-OX40 21#mAb 的变体，具体序列信息如下：

6.1 anti-OX40 21#H28H33 mAb

其重链可变区氨基酸序列：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGD^NVSSN^GVSWDWIRQSPSRGLEWLGRTYY
RSKWYNEYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNNYFFDLWGRGTL
 VTVSS (SEQ ID NO: 62)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 63、42 和 43；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 64、45、46 和 47；

其对应的 DNA 序列为：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
 CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGAC^{AAT}GTCTCTAGCAAC^{GGT}GTCTCTTGGGACTG
 GATCAGGCAGTCCCCCTCGAGGGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCC
 AAGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGTGGAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACAC
 ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATAT
 ATTTCTGTGTAAGAAATAACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCACC
 GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 65)

其轻链可变区氨基酸序列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASDRATG
 IPARFSGSGGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQLRSNWPPGYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:

49)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 50-52；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 53-56；

其对应的 DNA 序列为：

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGGGCCACTGGCAT
CCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCTGCGTAGCAACTGGCCTCCGG
GGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 57)

6.2、anti-OX40 21#H65 mAb

其重链可变区氨基酸序列：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSVSWDWIRQSPSRGLEWLGRTYY
RSKWYNEYAVSVENIRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNNYFFDLWGRGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 66)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 41、67 和 43；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 44-47；

其对应的 DNA 序列为：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTCTTGGGACTGG
ATCAGGCAGTCCCCCTCGAGGGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCA
AGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGTGGAAAAATCGAATAACCATCAACCCAGACACA
TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATA
TTTCTGTGTAAGAAATAACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA (SEQ ID NO: 68)

其轻链可变区氨基酸序列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASDRATG

IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQLRSNWPPGYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 49)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 50-52；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 53-56；

其对应的 DNA 序列为：

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGGGCCACTGGCAT
CCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCTGCGTAGCAACTGGCCTCCGG
GGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 57)

6.3、anti-OX40 21#H96mAb

其重链可变区氨基酸序列：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSVSWDWIRQSPSRGLEWLGRTYY
RSKWYNEYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNDYFFDLWGRGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 69)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 41、42 和 70；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 44-47；

其对应的 DNA 序列为：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTCTTGGGACTGG
ATCAGGCAGTCCCCCTCGAGGGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCA
AGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGTGGAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACA
TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATA
TTTCTGTGTAAGAAATGACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 71)

其轻链可变区氨基酸序列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASDRATG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQLRSNWPPGYTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:
49)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，其序列编号分别为 SEQ ID NO:
50-52；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO:
53-56；

其对应的 DNA 序列为：

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCGACAGGGCCACTGGCAT
CCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCTGCGTAGCAACTGGCCTCCGG
GGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 57)

6.4、anti-OX40 21#VHnew-L80

其重链可变区氨基酸序列：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNGVSWDWIRQSPSRGLEWLGRTYY
RSKWYNEYAVSVENRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNDYFFDLWGRGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 72)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分
别为 SEQ ID NO: 63、67 和 70；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其
序列编号分别为 SEQ ID NO: 44-47；

其对应的 DNA 序列为：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACGGTGTCTCTTGGGACTG
GATCAGGCAGTCCCCCTCGAGGGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCC
AAGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGTGGAAAATCGAATAACCATCAACCCAGACA
CATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATA
TATTTCTGTGTAAGAAATGACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 73)

其轻链可变区氨基酸序列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPGYTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 74)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 75-77；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 53-56；

其对应的 DNA 序列为：

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACA
GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA
TCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG
CCTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCG
GGGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 78)

6.5、anti-OX40 21#H96-L80 mAb

其重链可变区氨基酸序列：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSNSVSWDWIRQSPSRGLEWLGRTYY
RSKWYNEYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAIYFCVRNDYFFDLWGRGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 79)

横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 41、42 和 70；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 44-47；

其对应的 DNA 序列为：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTCTTGGGACTGG
ATCAGGCAGTCCCCCTCGAGGGGCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCA
AGTGGTATAATGAGTATGCAGTATCTGTGGAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACA
TCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATA
TTTCTGTGTAAGAAATGACTACTTCTTCGATCTCTGGGGCCGTGGTACCCTGGTCACC

GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 80)

其轻链可变区氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQRSNWPPGYTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 74)

其中横线部分分别为 CDR1、CDR2、CDR3，框内所示为突变部分，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 75-77；未划横线部分分别为 FR1、FR2、FR3、FR4，其序列编号分别为 SEQ ID NO: 53-56；

其对应的 DNA 序列为:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACA
GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCA
TCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG
CCTTGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCGTAGCAACTGGCCTCCG
GGGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 78)

实施例 7: anti-hOX40 Abs 特性鉴定

7.1 纯化的 anti-hOX40 抗体与 hOX40 结合能力检测 (ELISA 法)

以包被缓冲液 (50mM Na₂CO₃, NaHCO₃, pH9.6) 稀释 hOX40-muFc 至 2μg/ml, 100μL/well, 4℃过夜。洗板后, 3%BSA-PBS37℃封闭 1h。将 anti-hOX40 抗体分别从 2000ng/ml 开始, 进行 2 倍梯度稀释, 共 11 个浓度, 稀释液 (1%BSA-PBS) 作对照, 37℃孵育 2h。加入羊抗人 IgG-HRP (Goat anti-human IgG-HRP conjugated), 37℃孵育 1h。加可溶性单组分 TMB 底物显色液, 室温避光显色 5-10min。2N H₂SO₄ 50μL/well, 终止显色反应。置 MD SpectraMax Plus384 酶标仪上读 OD 450nm-650nm 值, 应用软件 SoftMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析, 结果如图 4-6 所示。由图 4 可知, 由 ScFv 转变为 IgG 型抗体后, O19 mAb 亲和力依然比较低; O21 mAb 亲和力变化不大, 亲和力比较好; O3 mAb 亲和力显著提高。由图 5 和图 6 可知, 上述的 anti-OX40 21# mAb 的变体均能和 OX40 结合, 且经过体外亲和力成熟后的 anti-OX40 21#VHnew-L80 mAb, anti-OX40

21#H96-L80 mAb 与 anti-OX40 21#mAb 相比, 亲和力大约提高两倍。

7.2 通过表面等离子共振 (SPR) 分析 a-hOX40 mAbs 与 hOX40 的动力学亲和力和常数

anti-hOX40 抗体针对重组的人 OX40 的结合动力学通过表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SRP) 方法, 使用 BIAcore X100 仪器测量。CM5 芯片偶联 anti-humanFc 抗体(不交叉识别 mouse Fc), 将待测抗体用 running buffer 稀释至 5nM 并被芯片上抗体捕获作为配体。OX40 -muFc 用 running buffer 稀释至 1000-1.37nM 二倍稀释。进样时间为 180S, 解离时间为 1800s, 再生时间为 60S。running buffer 为 HBS-EP+, 再生 buffer 为 10mM glycine-HCl (pH2.0)。使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (BIAcore 评价软件 3.2 版 (BIAcore Evaluation Software version3.2)) 计算结合速率 (kon) 和解离速率 (koff)。平衡解离常数 (KD) 以比率 koff/kon 计算。由表 3 可知, 亲和力成熟后的 anti-OX40 21#H96-L80 mAb 的亲和力约提高两倍。

表 3 anti-hOX40 抗体与 hOX40 结合动力学检测

名称	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
O3 mAb	2.84E+05	3.91E-04	1.378E-09
O21 mAb	4.181E+4	6.077E-04	1.454E-08
VHnew-L80	3.329E+04	3.415E-04	1.026E-08
H96-L80	2.999E+04	2.368E-04	7.898E-09

7.3 NF- κ b 系统检测 anti-hOX40 抗体体外 agonist 活性

构建 OX40-CD40 质粒: 根据蛋白数据库 Uniprot 上人 OX40 的氨基酸序列 (P43489), 得到人 OX40 胞外结构域的和跨膜区氨基酸序列 (即 P43489 中第 1 位残基至 235 位残基); 根据蛋白数据库 Uniprot 上人 CD40 氨基酸序列 (P25942), 得到人 CD40 的胞内段氨基酸序列 (即 P25942 中第 216 位残基至 277 位残基); 通过基因合成的方法将两者拼接到一起, 再经 Fermentas 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切亚克隆到商业化载体 pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) 中, 测序验证构建质粒的准确性, 获得重组质粒 DNA 即: pcDNA4-OX40-CD40 (即下文中提到的 OX40-CD40)。

293T-NF- κ B 稳定细胞系: 293T 细胞接种 24 孔板, 1×10^5 /well, 每孔 200 μ l DMEM 完全培养基, 同时加入 20 μ l NF- κ B-luciferase-lentivirus (Qiagen, cat:

CLS-013L), MOI=2。感染 24h 之后, 弃去上清, 加入 1ml DMEM 完全培养基继续培养, 24h 后, 换用含 0.3 μ g/ml promycin 的 DMEM 完全培养基继续培养, 培养扩大细胞并冻存。用 promycin 筛选的 293T-NF- κ B 细胞接种 24 孔板, 1×10^5 /well, 10ng/ml TNF- α 刺激 6h 后, 裂解细胞检测 luciferase, 结果显示, TNF- α 刺激过的细胞 luciferase 值明显高于未刺激的细胞, 证明 NF- κ B-luciferase 已经稳转进 293T 细胞。

用不含双抗的培养基重悬 5×10^5 293T-NF- κ B 细胞, 接种于 6 孔板中。24h 后, 弃上清, 并用 PBS 清洗一遍, 加入 1.8ml 的无双抗无血清的培养液。以质粒: 脂质体=1:3 的比例, 转染 0.2 μ g OX40-CD40 质粒。转染 4h 后, 弃上清, 换成新鲜完全培养液, 继续培养。转染次日, 将细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板, 加入一系列浓度梯度的抗体 (初浓度 10 μ g/ml, 10 倍稀释 7 个梯度), 同时加入同浓度的 cross-link (Jackson ImmunoResearch Laboratories:109-006-008) 继续培养 6h, 裂解细胞检测 luciferase。如图 7 所示, 图中 A、C、E、G 分别代表 O3 mAb、O21 mAb、anti-OX40 21#VHnew-L80 mAb 和 anti-OX40 21#H96-L80 mAb 在不同浓度下, 体外激动剂活性检测结果, 图中 B、D、F、H 分别为取 log 之后的体外激动剂活性检测结果图, 结果显示 O3 mAb 和 O21 mAb 在体外均有较好的 agonist 活性, 并且呈现较好的剂量依赖性。亲和力提高后的 anti-OX40 21#VHnew-L80 mAb, anti-OX40 21#H96-L80 mAb 在 Agonist 活性上大约提高两倍。

实施例 8 不同亚型对抗体 agonist 活性的影响

由于 anti-OX40 21#mAb 的各种变体, 均对 hOX40 具有特异的高亲和力, 与 hOX40 结合动力学结果均较好, 而其中之一的 anti-OX40 21#H96-L80 mAb 在 Agonist 活性上大约提高两倍, 因此本申请以 anti-OX40 21#H96-L80 mAb (以下简称 H96-L80) 为例做进一步的说明, 其余各变体不再赘述。然而应当说明的是, 后续各实施例中虽然仅对 H96-L80 做出说明, 但不应当理解为 anti-OX40 21#mAb 的各种变体不具有相应的特性, 或是其它两种抗体 (O3mAb、O19mAb) 不具有相应的特性。后续各实施例中对于 H96-L80 的进一步实验数据, 仅用于证明根据本发明方法获得的各种 anti-OX40 抗体, 具有较高的活性、亲和力、功

能性或稳定性。

根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 gamma1 (IgG1) 和人免疫球蛋白 gamma2 (IgG2) 的恒定区氨基酸序列 (分别是 P01857 和 P01859), 得到人 IgG1 和 IgG2 恒定区氨基酸序列。剩余按照上述的方法操作, 得到 anti-OX40 21#H96-L80 IgG1 mAb 和 anti-OX40 21#H96-L80 IgG2 mAb。按照实施例 7 的方法进行实验, 结果如图 8 所示, 其中图 8A 和图 8B 分别为 IgG1 和 IgG2 两种亚型, 在不同浓度下, 体外激动剂活性检测结果, 图 8C 为 IgG1 和 IgG2 两种亚型取 log 之后的对比结果图, 图 8D 为 0.1ug/ml 浓度下, 可见 H96-L80 的三种亚型的抗体 agonist 活性相当。

实施例 9: 纯化的 H96-L80 抗体与人和恒河猴活化后 CD4+T 和 CD8+T 细胞结合能力检测

利用人淋巴细胞分离液 (天津灏洋) 密度梯度离心从健康捐献者外周血浓缩白细胞中分离外周血单个核细胞 PBMC, 接种到 RPMI 完全培养基中。用终浓度为 5ug/ml 的 PHA 活化 PBMC 48 小时。将细胞重悬于 0.5% PBS-BSA Buffer 中, 加入 H96-L80 蛋白, 冰上孵育 20min。洗涤后加入 biolegend 二抗 FITC anti-hIgG (Cat#409310) 或 Biolegend 抗体 PE anti-hOX40 (Cat#350003), 以及 biolegend 抗体 APC anti-human CD4 (Cat#317416), 冰上孵育 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 0.5% PBS-BSA Buffer 中, 流式细胞仪进行检测。结果如图 9A 所示, H96-L80 可以很好的结合活化的 CD4+T 细胞。

为检测 H96-L80 与 CD4+细胞中 Treg 与 Teff 的结合能力, 用上述活化后的人 PBMC 染色。将细胞重悬于 0.5% PBS-BSA Buffer 中, 加入 H96-L80 蛋白, 冰上孵育 20min。洗涤后加入 biolegend 二抗 FITC anti-hIgG, 以及 biolegend 抗体 APC anti-human CD4, 冰上孵育 20min, 洗涤后穿膜固定液 (BD, 51-2090KZ) 作用 1h, 穿膜液 (eBioscience, 00-8333-56) 洗涤后再用穿膜液从悬, 加入 PE anti-human Foxp3 (Cat#320208), 4 $^{\circ}$ C 染色过夜, 洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 0.5% PBS-BSA Buffer 中, 流式细胞仪进行检测。结果如图 9B 所示, H96-L80 可以很好的结合活化的 CD4+Foxp3+Treg 和 CD4+Foxp3-Teff 细胞。

为检测 H96-L80 与恒河猴 OX40 的结合能力, 利用上述步骤获得活化的恒

河猴外周血单核细胞 PBMC。将细胞重悬于 0.5% PBS-BSA Buffer 中，加入 H96-L80 蛋白，冰上孵育 20min。洗涤后加入 biolegend 二抗 FITC anti-hIgG，以及 biolegend 抗体 APC anti-human CD4 和 PE anti-human CD8a (Cat#301008)，冰上孵育 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 0.5% PBS-BSA Buffer 中，流式细胞仪进行检测。结果如图 9C 所示，H96-L80 可以很好的结合活化的恒河猴 CD4+T 和 CD8+T 细胞，提示 H96-L80 可以结合恒河猴 OX40。

实施例 10：anti-OX40 抗体促进 T 细胞的活化和增殖

10.1 用 T 细胞活化和增殖来研究 anti-OX40scFv 抗体的体外活性和评价其激动剂 (agonist) 功能。

利用人淋巴细胞分离液 (天津灏洋) 密度梯度离心从健康捐献者外周血浓缩白细胞中分离外周血单个核细胞 PBMC，接种到 RPMI 完全培养基中。预先用 50 μ l 1 μ g/ml 的 anti-CD3 包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。实验组用 50 μ l 2 μ g/ml 的 O21 scFv，37 $^{\circ}$ C 包被 2h，和同时加上 soluble 形式终浓度 2 μ g/ml O21 scFv+终浓度 4 μ g/ml cross-link (Jackson ImmunoResearch Laboratories:109-006-008)，阴性对照为 RPMI 完全培养基。PBMC 量为 2 \times 10⁵/孔，培养五天后取上清。如图 10 所示，利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒 (ebioscience) 检测上清中 IFN- γ 的水平 (图 10A)，以及用 BrdU 染色试剂盒 (罗氏: 11647229001) 检测 T 细胞增殖 (图 10B)，可见 O21 scFv 在 coating 和 cross-link 两种用药方式下均有较好的活化 PBMC 和促进 T 细胞增殖的活性。

10.2 用体外 PBMC 和 CD4+T 细胞活化评价 O21 scFv 和 IgG 两种形式的 agonist 活性

利用人淋巴细胞分离液 (天津灏洋) 密度梯度离心从健康捐献者外周血浓缩白细胞中分离外周血单个核细胞 PBMC，接种到 RPMI 完全培养基中。用 CD4+T 细胞分离试剂盒 (美天旎, cat#no.130-096-533) 从 PBMC 中分离 CD4+T 细胞。预先用 50 μ l 1 μ g/ml 的 anti-CD3 包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。实验组用 50 μ l 2 μ g/ml 的 O21 scFv 或 O21 mAb，37 $^{\circ}$ C 包被 2h，阴性对照为同等剂量的 hIgG-Fc。PBMC 和 CD4+T 细胞量为 2 \times 10⁵/孔，培养五天后取上清，利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒 (ebioscience) 检测上清中 IFN- γ 的水平。

如图 11 所示, 对于 PBMC (图 11A) 和 CD4+T 细胞 (图 11B), 可以看出在体外 O21 抗体的全抗体 mab 型比 scFv 型有更好的 agonist 活性。

实施例 11: IgG1 和 IgG4 亚型的 anti-OX40 抗体 H96-L80 对 T 细胞亚群的影响

按照实施例 10 操作, 获得人外周血单核细胞(PBMC), 将 PBMC 用溶解的抗 CD28(0.5 μ g/ml) 和结合板的抗 CD3(3 μ g/ml) 和抗人 OX40mAb H96-L80 IgG1 或 IgG4(10 μ g/ml) 刺激。48 小时后, 收获细胞。用 biolegend 抗体 APC anti-human CD4 和 PE anti-human CD8a (Cat#301008)染色, 或用 biolegend 抗体 APC anti-human CD4 和 PE anti-human Foxp3 (Cat#320208)染色, 流式细胞仪进行检测。结果如下图所示, O21 mAb H96-L80 IgG1 和 IgG4 两种亚型可以降低 CD4+Foxp3+Treg 在 CD4+ T 细胞中的比例 (图 12A), 但对 CD4+T 与 CD8+T 细胞的比例没有影响 (图 12B)。

实施例 12: anti-OX40 抗体在小鼠体内对肿瘤生长的抑制作用

12.1 使用植入肿瘤细胞 PC-3 和人 PBMC 的 NOD-SCID 小鼠肿瘤模型, 来评价 anti-OX40 抗体在体内的药效

在第 0 天用 PC-3 (ATCC CRL-1435TM) 和人的外周血单个核细胞 (PBMC) 一起进行皮下 (SC) 注射小鼠, 并在第 0、7 天用 10mg/kg 的 O21mAb 或 PBS 腹腔注射给药, PBS 作为阴性对照, 每组 5 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线图, 结果如图 13 所示, 可以看出抗体 O21 mAb 可以显著抑制肿瘤生长。

12.2 使用植入肿瘤细胞 A375 和人 PBMC 的 NOD-SCID 小鼠肿瘤模型, 来评价 anti-OX40 抗体在体内的药效

在第 0 天用 7×10^6 的 A375(ATCC CRL-1619TM)和 1×10^6 人的外周血单个核细胞(PBMC) 一起进行皮下(SC)注射小鼠, 并在第 0、7 天用 1mg/kg 的 O21 mAb 或 PBS 腹腔注射给药, PBS 作为阴性对照, 每组 5 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线图, 如图 14 所示, 可以看出抗体 O21 mAb 可以显著抑制肿瘤生长。

实施例 13: anti-OX40 Abs 稳定性检测

对 anti-hOX40 抗体 O21 mAb 的稳定性用 45℃加速稳定性实验进行检测。具体实验方法为：将抗 O21 mAb 抗体浓缩至约 10mg/ml，置于 45℃水浴，在第 0 天、第 10 天、第 20 天、第 30 天收样进行浓度、SEC-HPLC、NF- κ b 分析实验。SEC-HPLC 采用岛津 LC20AT HPLC 液相色谱仪进行分析实验，将样品浓缩至 1mg/ml，流速为 0.5ml/min 上样，总上样量为 50ug，上样后进行等度洗脱 30min；NF- κ b 按实施例 7 进行操作，结果如图 15 所示，可以看到 anti-hOX40 抗体 O21 mAb 在体外有较好的稳定性。

实施例 14 anti-hOX40 抗体 O21 mAb 的药物代谢动力学评价

用 10mg/kg 和 1mg/kg 的剂量来评价 H96-L80 IgG1 抗体的药物代谢动力学。使用 Balb/C、雌性、8 周龄小鼠，取 16 只小鼠，每个剂量分为 A/B 两组，每组四只。向所有的小鼠静脉注射 H96-L80 IgG1 抗体 200 μ g (10mg/kg) 或 20ug(1mg/kg)，给药后分 14 个时间点分别取血 100 μ l，每个时间点取一组小鼠，两组轮换。分离血清。用 ELISA 方法检测血清中受试蛋白的浓度：hOX40-muFc 包板，加入适当稀释度的血清样品，然后加入 Goat anti-Human IgG HRP (Sigma CatNO:A0170)，用 TMB 显色。使用 H96-L80 IgG1 抗体作为标准蛋白做标准曲线。利用 WinNolin 软件计算药代动力学参数。平均 C-T 曲线如图 16 所示，经检测，本发明的 H96-L80 IgG1 抗体比较稳定，1mg/kg 的剂量其体内半衰期平均为 205 小时；10mg/kg 的剂量其体内半衰期平均为 371 小时。经检测，没有 anti-H96-L80 的抗抗体产生。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，并不用于限制本发明，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明技术原理的前提下，还可以做出若干改进和变型，这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

权 利³⁰ 要 求 书

1、一种抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：其包括选自如下一组的 CDR 区：

1) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 5-7 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%；

2) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 23-25 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 32-34 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%；

3) 其重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 41-43 所示，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 的序列分别如 SEQ ID NO: 50-52 所示，或者其重链可变区和轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

2、根据权利要求 1 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示，或者其重链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

3、根据权利要求 2 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示，或者其重链可变区 CDR 区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

4、根据权利要求 3 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22、40、62、66、69、72 和 79 所示。

5、根据权利要求 1 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示，或者其轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

6、根据权利要求 5 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示，或者其轻链可变区 CDR 区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

7、根据权利要求 6 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31、49 和 74 所示。

8、根据权利要求 1 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：其为全抗体、双特异性抗体、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv。

9、根据权利要求 8 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：当其为 scFv 时，其重链和轻链可变区之间可含有连接肽。

10、根据权利要求 1 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：其重链恒定区选自 IgG、IgM、IgE、IgD 和 IgA。

12、根据权利要求 1 所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，其特征在于：其轻链恒定区为 κ 或 λ 。

13、一种核酸分子，其特征在于：其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列，所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 5-7;

(2) SEQ ID NO: 23-25;

(3) SEQ ID NO: 41-43;

(4) 与前述(1)~(3)序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

14、根据权利要求 13 所述的核酸分子，其特征在于：所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

SEQ ID NO: 4、22 和 40，或与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

15、根据权利要求 14 所述的核酸分子，其特征在于：包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22 和 40 所示，或者其重链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突

变氨基酸的个数不超过 3 个。

16、根据权利要求 15 所述的核酸分子，其特征在于：包括选自于如下一组的重链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 4、22、40、62、66、69、72 和 79 所示。

17、一种核酸分子，其特征在于：其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列，所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO: 14-16;

(2) SEQ ID NO: 32-34;

(3) SEQ ID NO: 50-52;

(4)与前述(1)~ (3)序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

18、根据权利要求 17 所述的核酸分子，其特征在于：所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列：

SEQ ID NO: 13、31 和 49，或与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 同一性大于 70%、80%、85%、90%或 97%。

19、根据权利要求 18 所述的核酸分子，其特征在于：包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31 和 49 所示，或者其轻链可变区与前述序列相比满足以下二者中至少一个的序列：a) 结合相同抗原表位；b) 突变氨基酸的个数不超过 3 个。

20、根据权利要求 19 所述的核酸分子，其特征在于：包括选自于如下一组的轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 13、31、49 和 74 所示。

21、一种载体，其特征在于：其含有权利要求 13-20 任一项的核酸分子。

22、一种宿主细胞，其特征在于：其含有权利要求 13-20 任一项的核酸分子或权利要求 21 的载体。

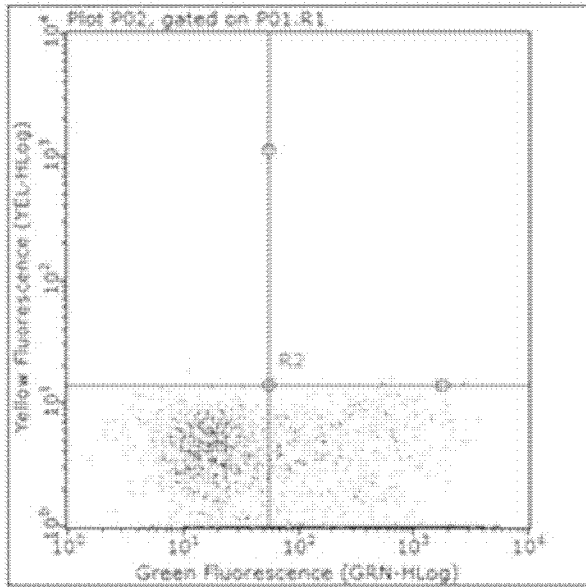
23、一种偶联物，其特征在于：其含有权利要求 1-12 任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分，以及其它生物活性物质，所述抗 OX40 抗体或其抗原结合部分直接或通过连接片段与其它生物活性物质偶联。

24、一种组合物，其特征在于：其含有权利要求 1-12 任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分、权利要求 13-20 的核酸分子、权利要求 21 的载体、权利要求 22 的宿主细胞、或者权利要求 23 的偶联物，以及任选的药学上可接受的

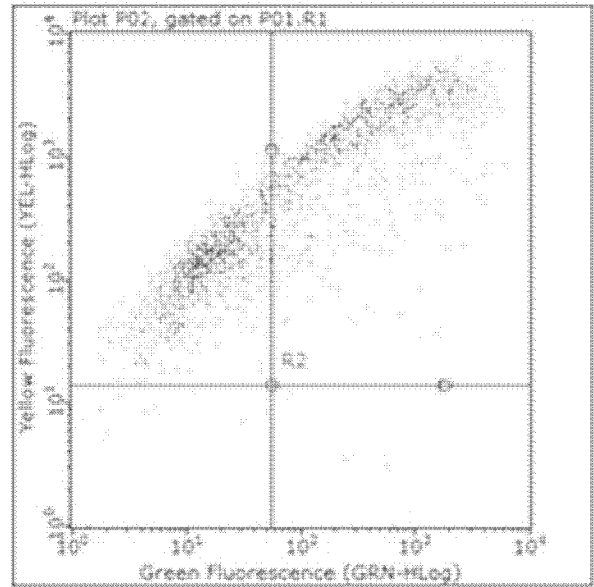
载体或赋形剂，以及任选的其它生物活性物质。

25、权利要求 1-12 任一项的抗 OX40 抗体或其抗原结合部分、权利要求 13-20 的核酸分子、权利要求 21 的载体、权利要求 22 的宿主细胞、权利要求 23 的偶联物、或者权利要求 24 的组合用于制备预防或治疗肿瘤用途。

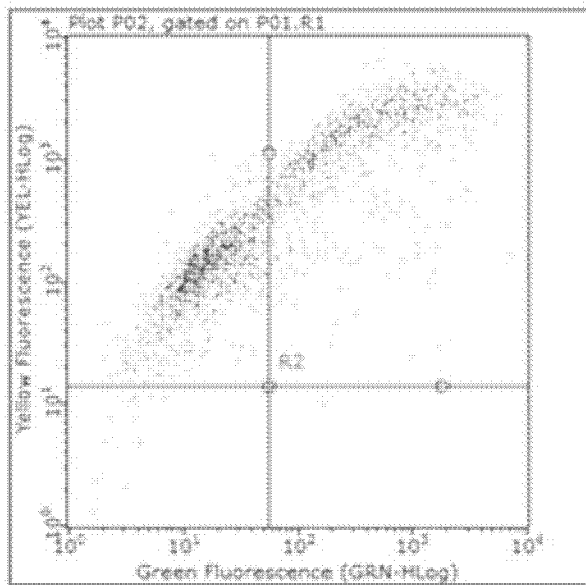
阴性对照



O21 scFv



O3 scFv



O19 scFv

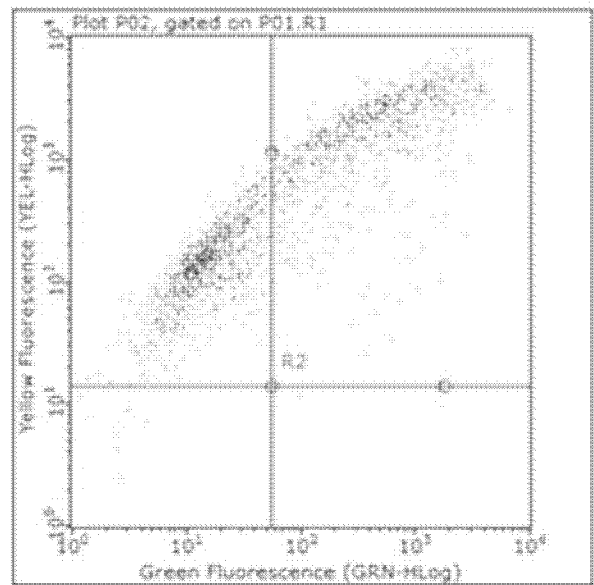


图 1

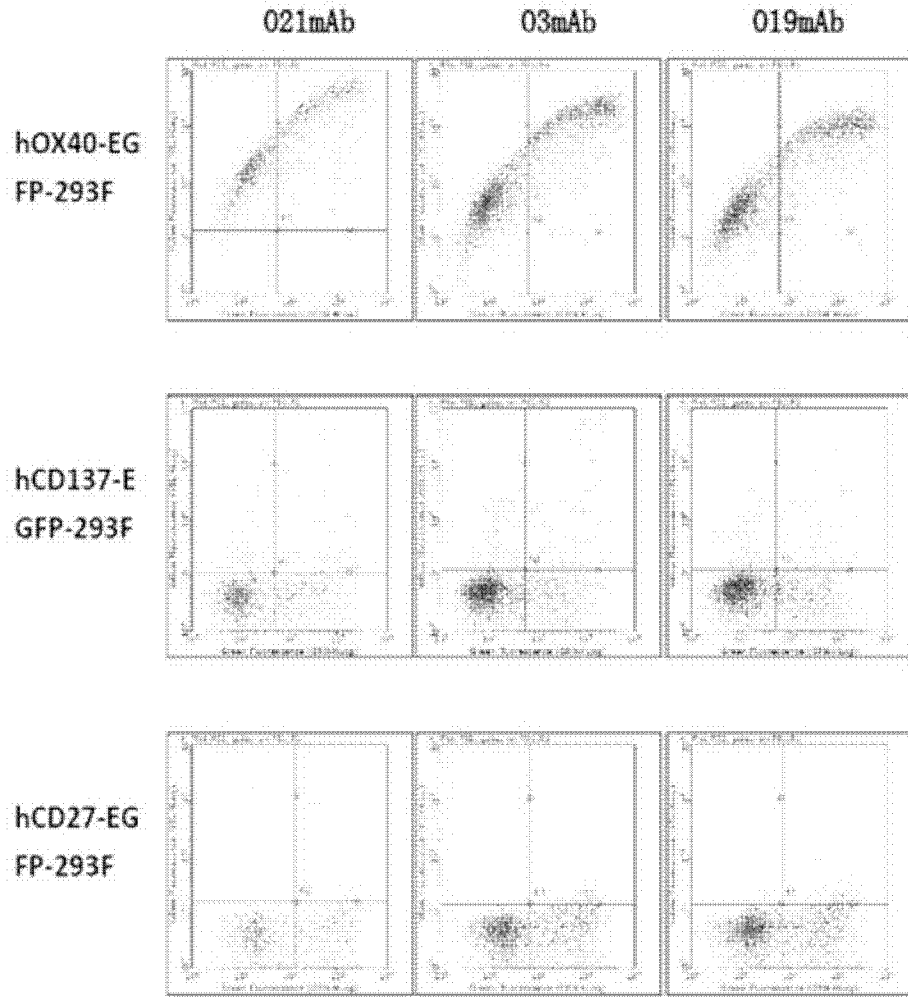
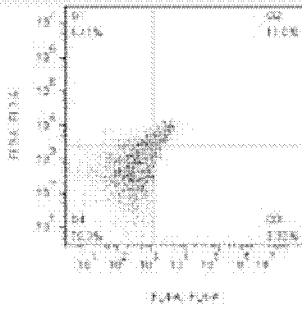
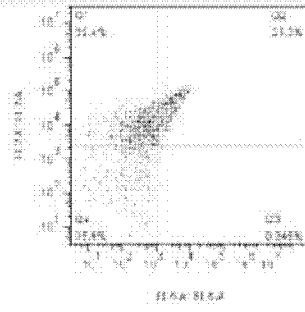


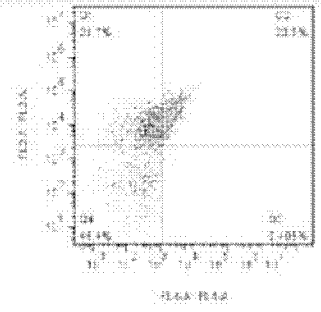
图 2



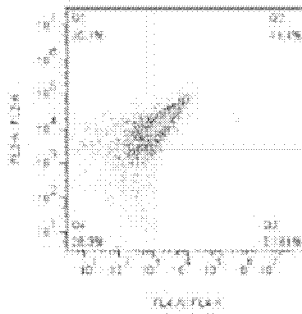
OX40-21



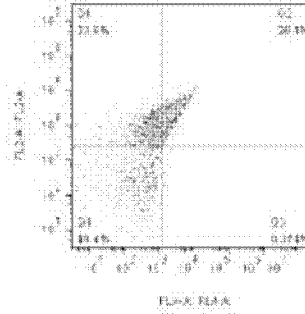
OX40-21-1



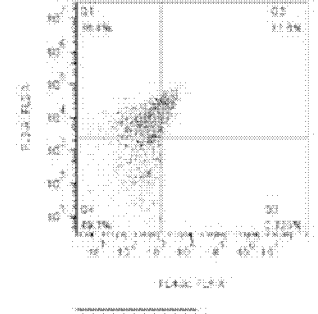
OX40-21-2



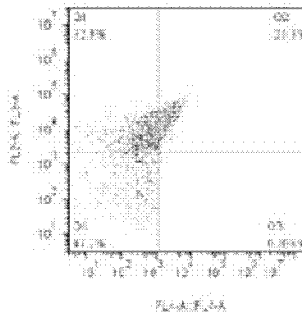
OX40-21-7



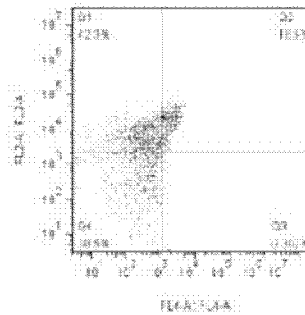
OX40-21-11



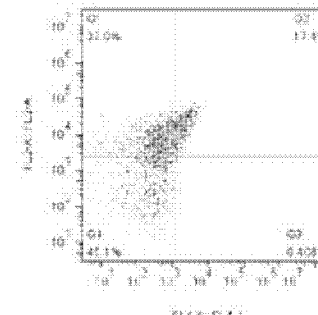
OX40-21-13



OX40-21-14



OX40-21-16



OX40-21-17

图 3

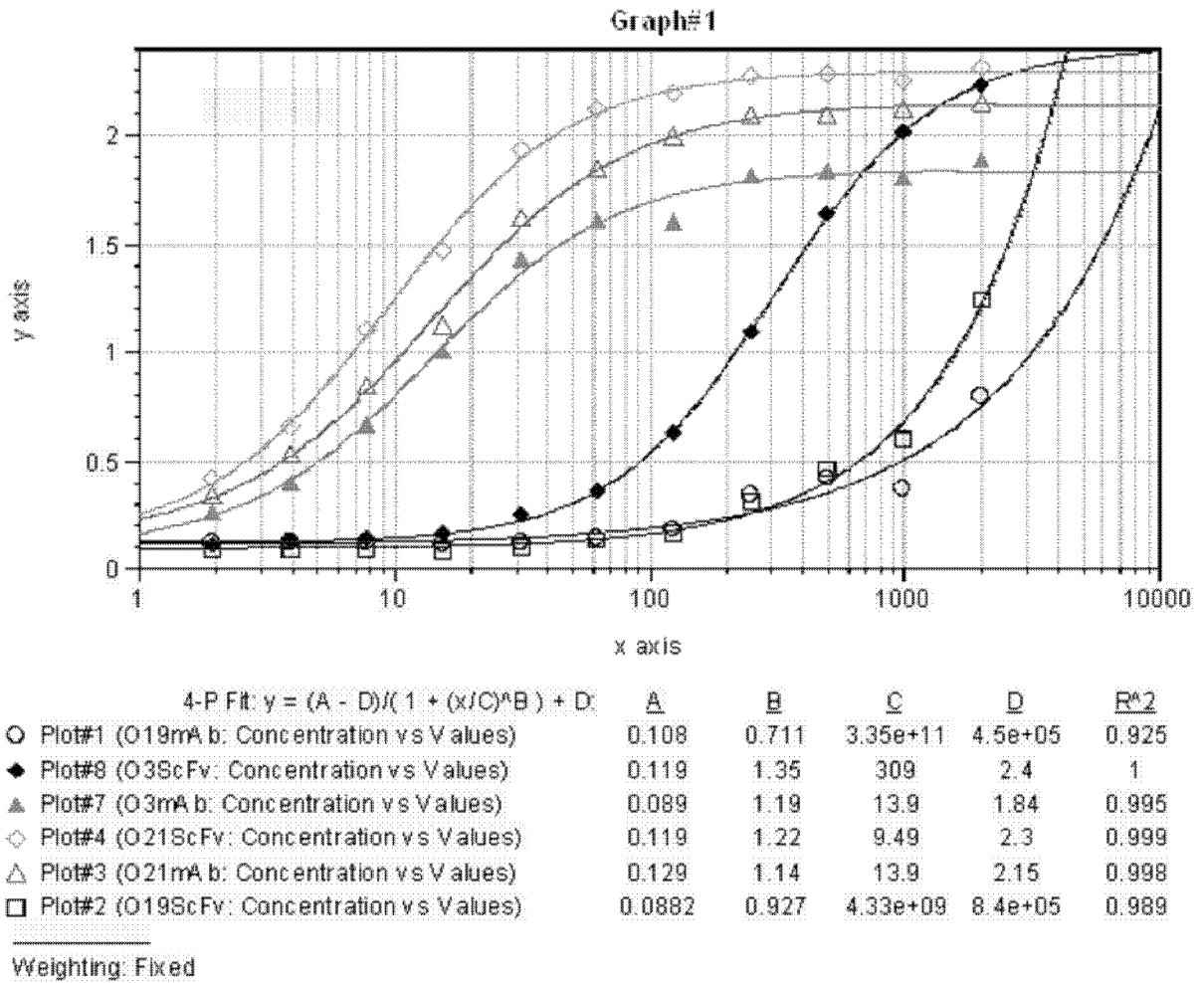
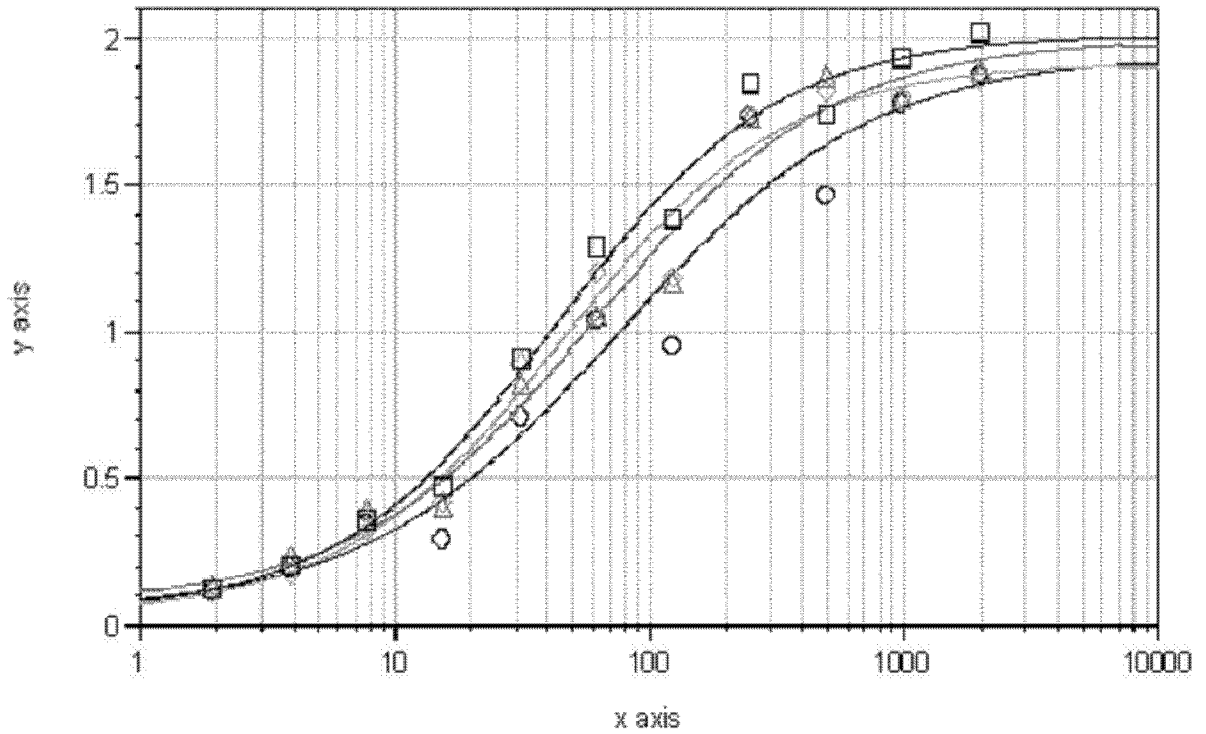


图 4

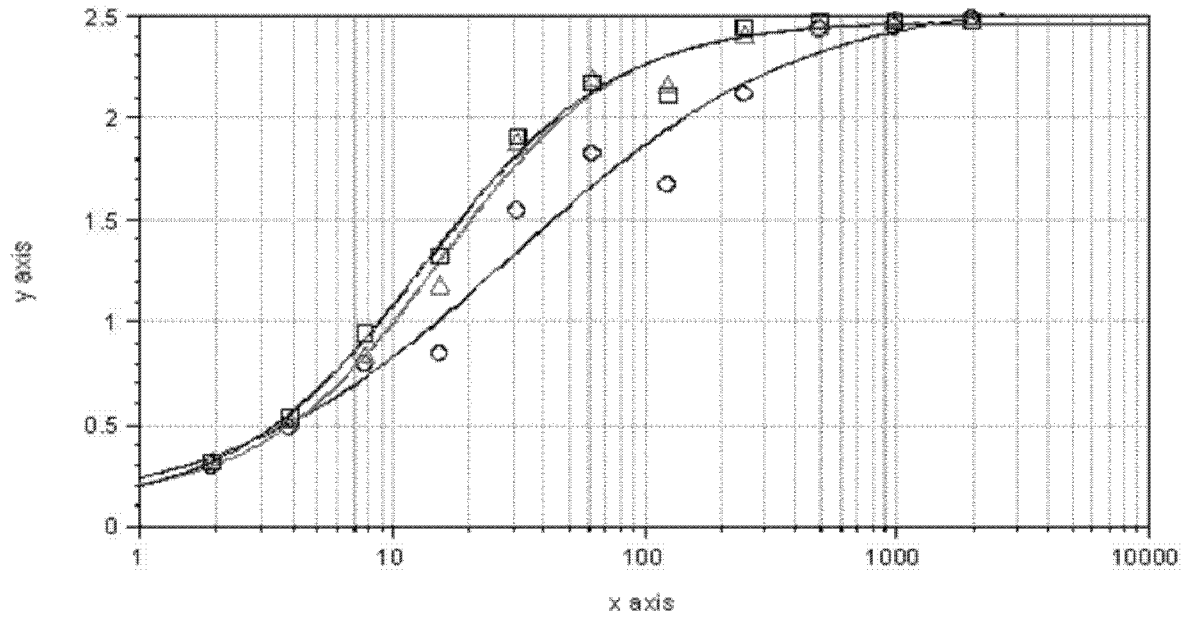


4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ Flot#1 (OX40-21 mAb: Concentration vs Values)	0.0437	0.87	75.8	1.94	0.969
◇ Flot#4 (OX40-21 mAb H96: Concentration vs Val...)	0.0319	1	46	1.91	0.984
△ Flot#3 (OX40-21 mAb H65: Concentration vs Val...)	0.0722	0.932	60.9	1.99	0.984
□ Flot#2 (OX40-21 mAb H28H3: Concentration vs ...)	0.036	1.01	43.2	2.01	0.991

Weighting: Fixed

图 5



4-P Fit: $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$:

	A	B	C	D	R ²
○ Plot#1 (O21mAb: Concentration vs Values)	0.057	0.762	29.8	2.58	0.976
△ Plot#3 (H96-L80: Concentration vs Values)	0.12	1.23	15.4	2.47	0.994
□ Plot#2 (O21new L80: Concentration vs Values)	0.0792	1.15	13.4	2.47	0.994

Weighting: Fixed

图 6

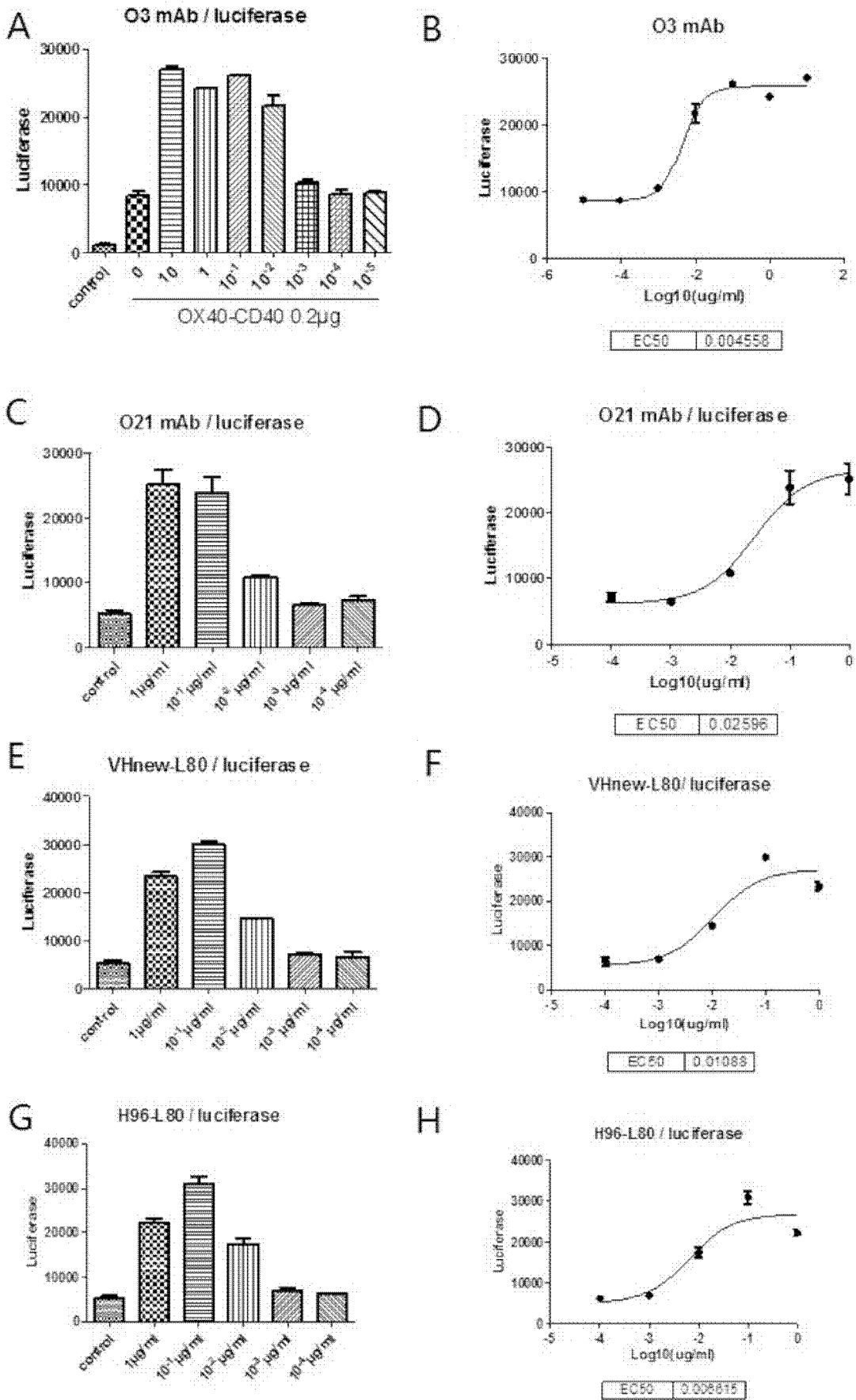


图 7

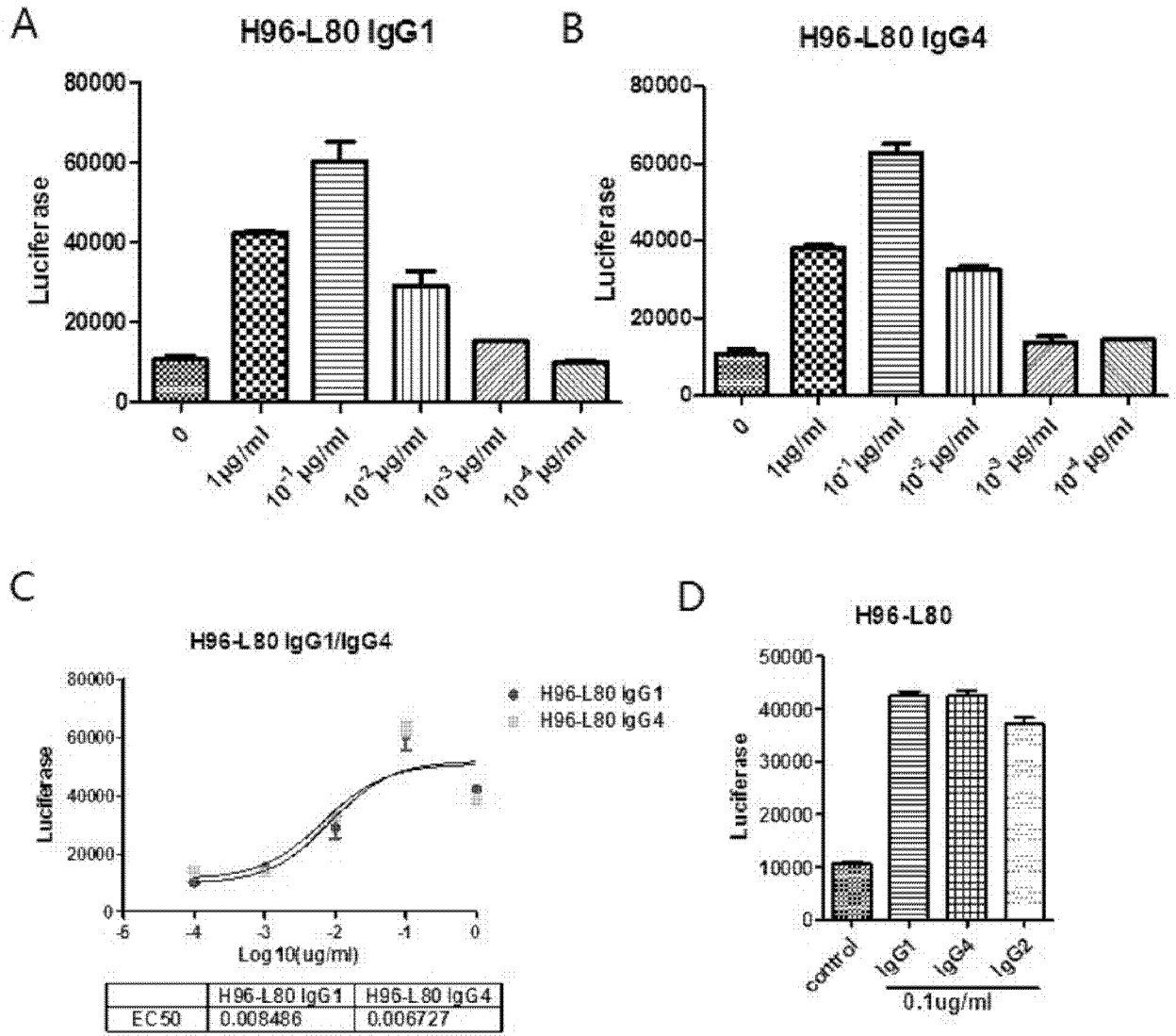


图 8

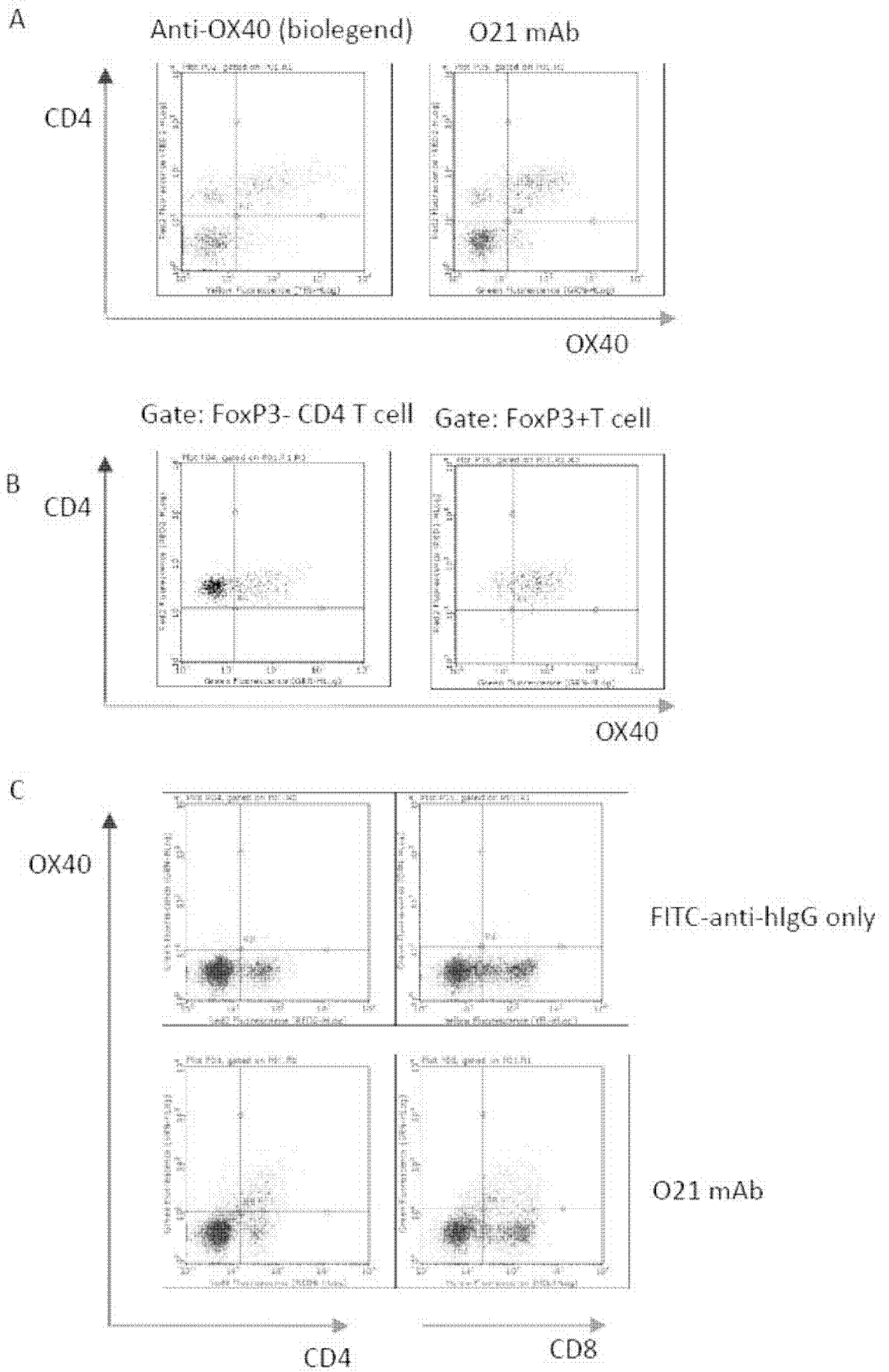


图 9

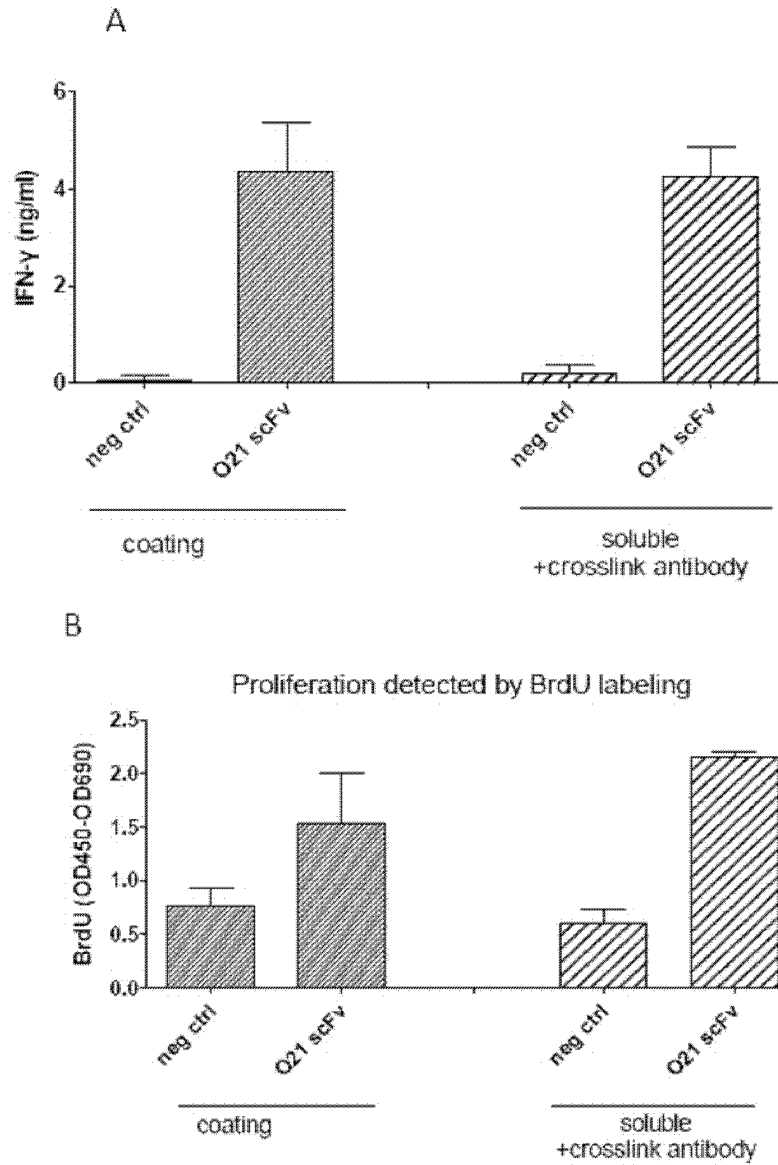


图 10

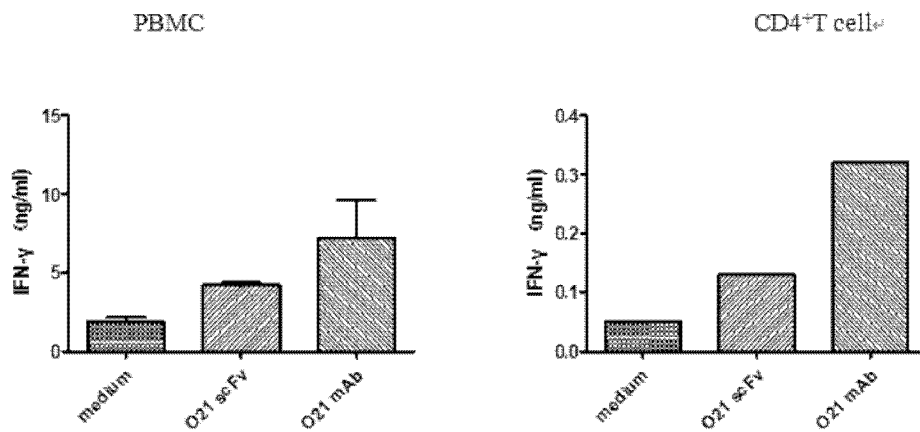


图 11

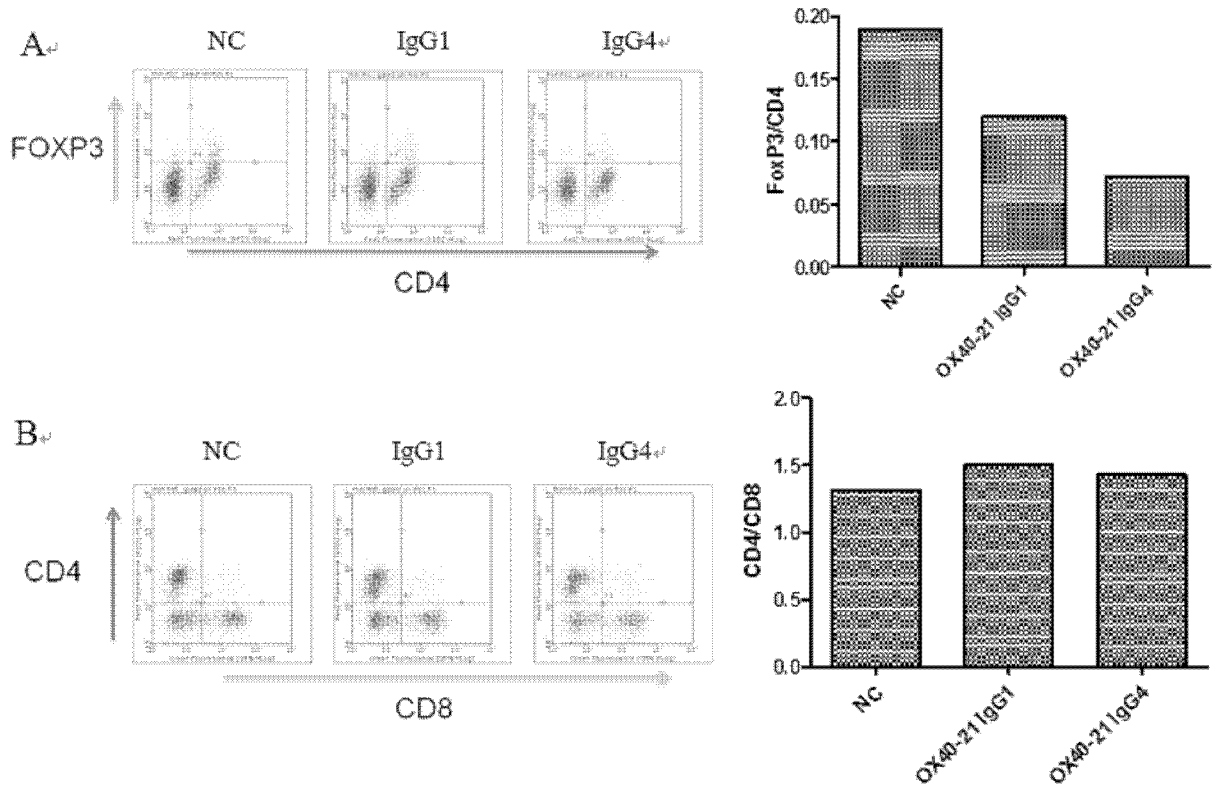


图 12

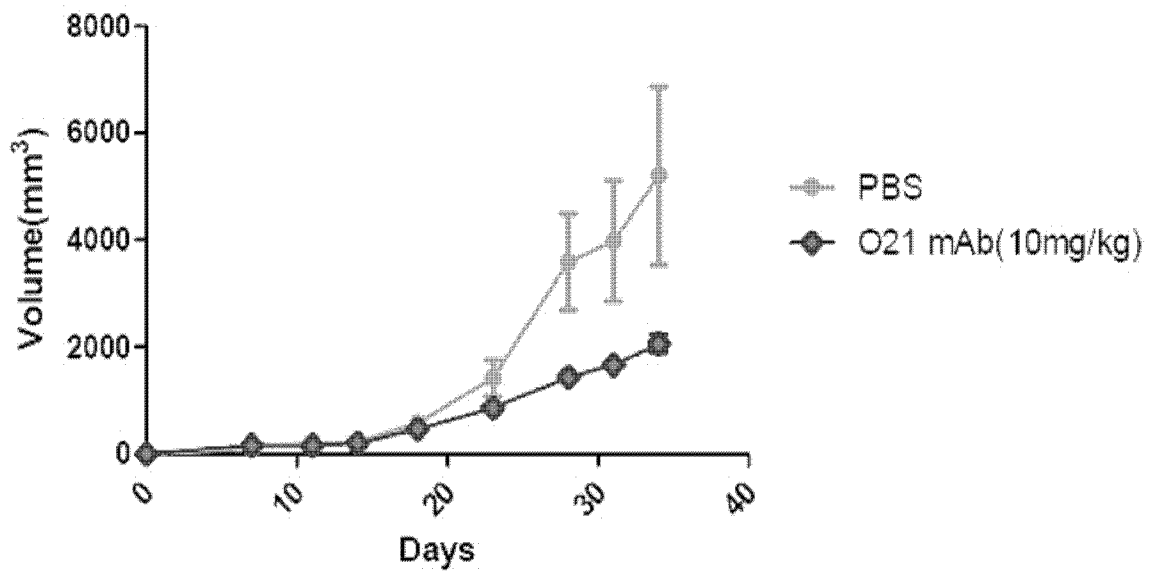


图 13

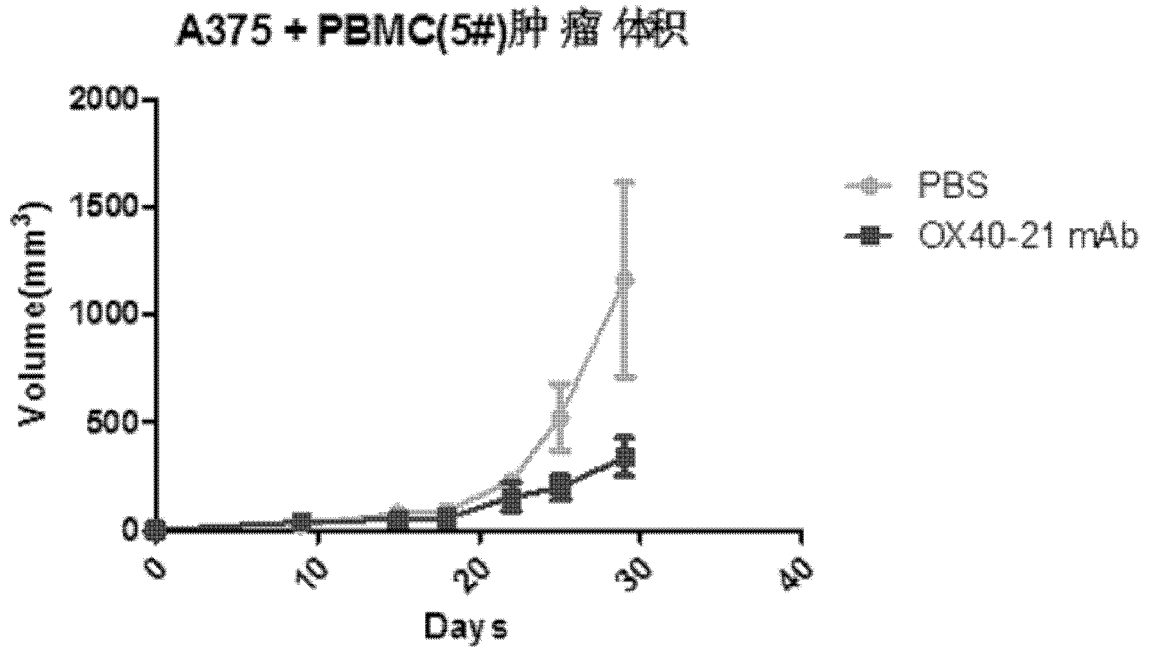


图 14

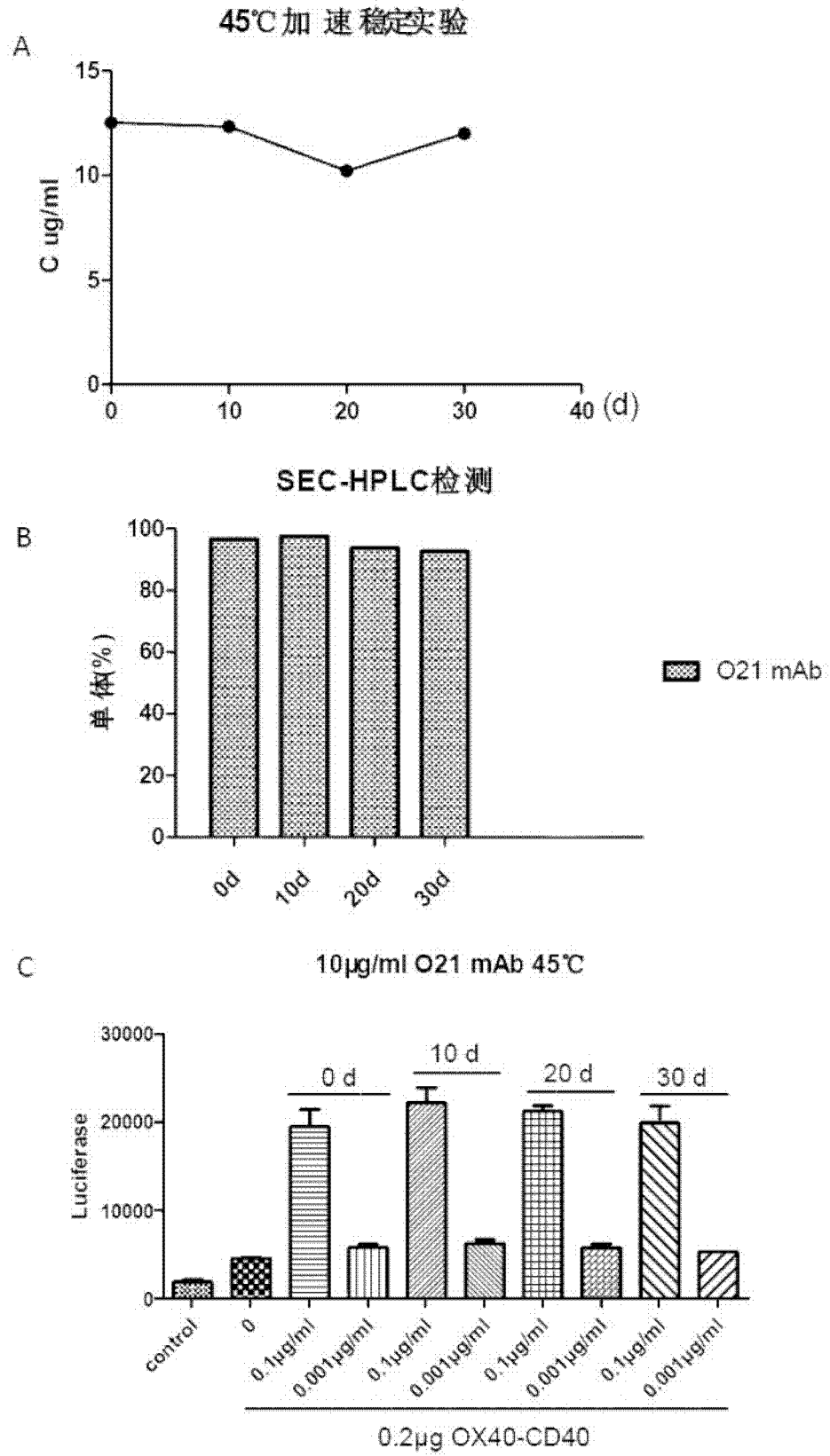


图 15

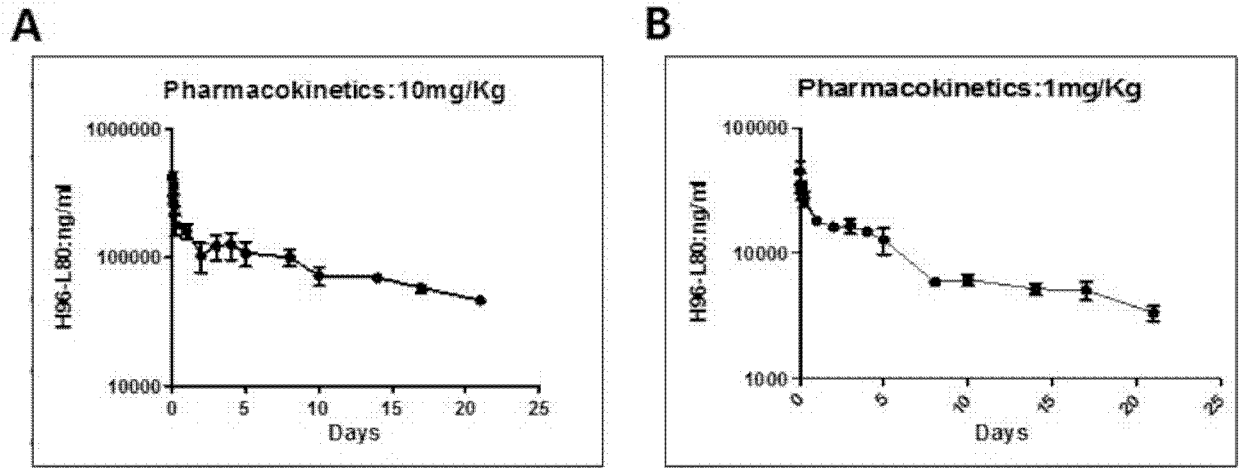


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/091958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (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, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and search words: OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, IMD16, antibod+, extracellular domain etc.: GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and searched sequence: SEQ ID NO:1-80

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104080809 A (BIOCEROS B.V.), 01 October 2014 (01.10.2014), claims 1-48	1-3, 5-6, 8-10, 12-15, 17-19, 21-25
A	CN 104080809 A (BIOCEROS B.V.), 01 October 2014 (01.10.2014), the whole document	4, 7, 16, 20
X	CN 103717263 A (GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.), 09 April 2014 (09.04.2014), claims 1-54	1-3, 5-6, 8-10, 12-15, 17-19, 21-24
A	CN 103717263 A (GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.), 09 April 2014 (09.04.2014), the whole document	4, 7, 16, 20, 25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
08 July 2016 (08.07.2016)

Date of mailing of the international search report
14 July 2016 (14.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
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
LI, Chen
Telephone No.: (86-10) **62411100**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/091958

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104080809 A	01 October 2014	HK 1201852 A1	11 September 2015
		PE 15462014 A1	13 November 2014
		KR 20140069172 A	09 June 2014
		JP 2014527814 A	23 October 2014
		ECSP 14013259 A	31 May 2014
		US 2015132288 A1	14 May 2015
		C0 7020859 A2	11 August 2014
		CR 20140146 A	02 July 2014
		CL 2014000631 A1	26 September 2014
		MD 20140039 A2	30 September 2014
		AU 2012308155 A1	03 April 2014
		NZ 623840 A	29 April 2016
		IN 2535 CHN 2014 A	07 August 2015
		CA 2848847 A1	21 March 2013
		GT 201400051 A	28 January 2016
		IL 231540 D0	30 April 2014
		EA 201490484 A1	30 September 2014
		EP 2756001 A2	23 July 2014
		WO 2013038191 A2	21 March 2013
		GB 201116092 D0	02 November 2011
		SG 11201400706 SA	30 October 2014
		WO 2013038191 A3	18 July 2013
		MX 2014003156 A	22 August 2014
CN 103717263 A	09 April 2014	PE 22432014 A1	11 January 2015
		AU 2012282116 A2	10 April 2014
		US 8748585 B2	10 June 2014
		AU 2012282116 A1	13 February 2014
		AP 201407415 D0	28 February 2014
		EP 2731677 A1	21 May 2014
		US 2014294824 A1	02 October 2014
		MX 2014000479 A	17 February 2014
		NZ 619849 A	29 January 2016
		C0 7020848 A2	11 August 2014
		US 2013183315 A1	18 July 2013
		KR 20140043811 A	10 April 2014
		WO 2013008171 A1	17 January 2013
		JP 2014523248 A	11 September 2014
		EA 201490053 A1	29 August 2014
		CA 2840460 A1	17 January 2013

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词:OX40, CD134, TNFRSF4, ACT35, IMD16, 抗体, 胞外区, antibod+, extracellular domain等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO:1-80</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <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>X</td> <td>CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 权利要求1-48</td> <td>1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 全文</td> <td>4, 7, 16, 20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 权利要求1-54</td> <td>1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-24</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 全文</td> <td>4, 7, 16, 20, 25</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	X	CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 权利要求1-48	1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-25	A	CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 全文	4, 7, 16, 20	X	CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 权利要求1-54	1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-24	A	CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 全文	4, 7, 16, 20, 25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 权利要求1-48	1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-25															
A	CN 104080809 A (比奥塞罗克斯产品公司) 2014年 10月 1日 (2014 - 10 - 01) 全文	4, 7, 16, 20															
X	CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 权利要求1-54	1-3、5-6、8-10、12-15、17-19、21-24															
A	CN 103717263 A (格兰马克药品股份有限公司) 2014年 4月 9日 (2014 - 04 - 09) 全文	4, 7, 16, 20, 25															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“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	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“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						
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																
“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)	“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																
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																
“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																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 7月 8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 7月 14日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李晨</p> <p>电话号码 (86-10)62411100</p>															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/091958

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	104080809	A	2014年 10月 1日	HK	1201852	A1	2015年 9月 11日
				PE	15462014	A1	2014年 11月 13日
				KR	20140069172	A	2014年 6月 9日
				JP	2014527814	A	2014年 10月 23日
				EC	SP14013259	A	2014年 5月 31日
				US	2015132288	A1	2015年 5月 14日
				CO	7020859	A2	2014年 8月 11日
				CR	20140146	A	2014年 7月 2日
				CL	2014000631	A1	2014年 9月 26日
				MD	20140039	A2	2014年 9月 30日
				AU	2012308155	A1	2014年 4月 3日
				NZ	623840	A	2016年 4月 29日
				IN	2535CHN2014	A	2015年 8月 7日
				CA	2848847	A1	2013年 3月 21日
				GT	201400051	A	2016年 1月 28日
				IL	231540	D0	2014年 4月 30日
				EA	201490484	A1	2014年 9月 30日
				EP	2756001	A2	2014年 7月 23日
				WO	2013038191	A2	2013年 3月 21日
				GB	201116092	D0	2011年 11月 2日
SG	11201400706S	A	2014年 10月 30日				
WO	2013038191	A3	2013年 7月 18日				
MX	2014003156	A	2014年 8月 22日				
CN	103717263	A	2014年 4月 9日	PE	22432014	A1	2015年 1月 11日
				AU	2012282116	A2	2014年 4月 10日
				US	8748585	B2	2014年 6月 10日
				AU	2012282116	A1	2014年 2月 13日
				AP	201407415	D0	2014年 2月 28日
				EP	2731677	A1	2014年 5月 21日
				US	2014294824	A1	2014年 10月 2日
				MX	2014000479	A	2014年 2月 17日
				NZ	619849	A	2016年 1月 29日
				CO	7020848	A2	2014年 8月 11日
				US	2013183315	A1	2013年 7月 18日
				KR	20140043811	A	2014年 4月 10日
				WO	2013008171	A1	2013年 1月 17日
				JP	2014523248	A	2014年 9月 11日
				EA	201490053	A1	2014年 8月 29日
				CA	2840460	A1	2013年 1月 17日