



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103717263 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201280034688. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 07. 09

A61P 37/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/506, 491 2011. 07. 11 US

C07K 16/28 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/053502 2012. 07. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/008171 EN 2013. 01. 17

(71) 申请人 格兰马克药品股份有限公司

地址 瑞士拉绍德封

(72) 发明人 A·阿廷格 S·布莱恩 J·A·巴克

R·莉希拉 S·侯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

权利要求书5页 说明书49页

序列表72页 附图15页

(54) 发明名称

结合 OX40 的抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段。更具体而言,本发明涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1,和/或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2,和/或包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3;和/或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和/或包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和/或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

1. 结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

2. 权利要求 1 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1,包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2,包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1,包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

4. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段是人源化抗体。

5. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变区序列。

6. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括与 SEQ ID NO:7 的重链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同的重链可变区序列的非 CDR 区。

7. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含选自 SEQ ID NO:35、36、37 和 38 的氨基酸序列的重链序列。

8. 权利要求 7 的抗体或其片段,其中重链序列包括非 CDR 区,所述非 CDR 区与选自 SEQ ID NO:35、36、37 和 38 的重链序列的重链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同。

9. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包括包含选自 SEQ ID NO:58、59、79 和 80 的氨基酸序列的重链可变区序列。

10. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括重链可变区序列的非 CDR 区,所述重链可变区序列的非 CDR 区与选自 SEQ ID NO:58、59、79 和 80 的重链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同。

11. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括重链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19)、IGHV2-70\*01 (SEQ ID NO:20)、IGHV2-70\*13 (SEQ ID NO:21)、IGHV2-5\*09 (SEQ ID NO:22) 和 IGHV2-70\*11 (SEQ ID NO:23) 的人基因的产物或源自所述人基因。

12. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括重链可变框架区,所述重链可变框架区是 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19) 的人基因的产物或源自所述人基因,且其中重链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应重链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

13. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的重链序列,其中重链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应重链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

14. 权利要求 12 或 13 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 SEQ ID NO:23、35b、48、50、60 和 62 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

15. 权利要求 12 或 13 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 SEQ ID

NO:23S、35bG、48L、50H、60N 和 62A 的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

16. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变区序列。

17. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括轻链可变区序列的非 CDR 区,所述轻链可变区序列的非 CDR 区与 SEQ ID NO:8 的轻链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同。

18. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含选自 SEQ ID NO:45、46、47 和 49 的氨基酸序列的轻链序列。

19. 权利要求 18 的抗体或其片段,其中轻链序列包括非 CDR 区,所述非 CDR 区与选自 SEQ ID NO:45、46、47 和 49 的轻链序列的轻链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同。

20. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含选自 SEQ ID NO:60、86、87 和 89 的氨基酸序列的轻链可变区序列。

21. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括轻链可变区序列的非 CDR 区,其中所述轻链可变区序列的非 CDR 区与选自 SEQ ID NO:60、86、87 和 89 的重链可变区序列的非 CDR 区至少 80% 相同。

22. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是选自 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24)、IGKV1-39\*01 (SEQ ID NO:25)、IGKV1D-39\*01 (SEQ ID NO:26)、IGKV3-11\*02 (SEQ ID NO:27) 和 IGKV3-20\*01 (SEQ ID NO:28) 的人基因的产物或源自所述人基因。

23. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24) 的人基因的产物或源自所述人基因,其中所述轻链可变框架区包括来自相应鼠抗体的轻链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。

24. 权利要求 1 或 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列的轻链序列,其中轻链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应轻链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

25. 权利要求 23 或 24 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 SEQ ID NO:1、33、34、46、47、54、56 和 71 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

26. 权利要求 23 或 24 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括选自 1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56S 和 71Y 的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

27. 权利要求 23 或 24 的人源化抗体或其片段,其中氨基酸修饰包括在氨基酸位置 31 上的氨基酸缺失,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

28. 权利要求 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO:37 或 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的重链序列;和
- (b) 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列。

29. 权利要求 2 的抗体或其片段,其中抗体或其片段包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO:58 或 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的重链可变区序列;和

- (b) 包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的轻链可变区序列。
30. 权利要求 1 至 29 的任一项的抗体或其片段,其中至少一个重链 CDR 和 / 或至少一个轻链 CDR 包括至少一个氨基酸修饰。
31. 权利要求 1 至 30 的任一项的抗体或其片段,还包括重链和 / 或轻链恒定区。
32. 权利要求 31 的抗体或其片段,其中人重链恒定区是选自 IGHG1、无岩藻糖基化 IGHG1 和 IGHG4 的人免疫球蛋白。
33. 权利要求 1 至 31 的任一项的抗体或其片段,其中抗体是单价抗体。
34. 权利要求 1 至 31 的任一项的抗体或其片段,其中抗体是全长抗体。
35. 权利要求 1 至 31 的任一项的抗体或其片段,其中抗体是抗体片段,其选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体、三链抗体和与相同或不同抗体遗传融合的 scFv。
36. 权利要求 1 至 31 的任一项的抗体或其片段,其中抗体包括相对于亲本抗体的 Fc 区包含至少一个氨基酸修饰的变体 Fc 区,而包含变体 Fc 区的抗体表现出相比亲本抗体的改变的效应子功能。
37. 权利要求 1 至 36 的任一项的抗体或其片段,其中结合人 OX40 的抗体或其片段具有 110nM 或更少的亲和力 ( $K_D$ )。
38. 权利要求 1 至 36 的任一项的抗体或其片段,其中抗体或其片段保留了相应嵌合抗体的至少 75% 的 OX40 结合亲和力 ( $K_D$ )。
39. 权利要求 1 至 36 的任一项的抗体或其片段,其中抗体或其片段当与相应嵌合抗体比较时,具有等价的或更高的 OX40 结合亲和力 ( $K_D$ )。
40. 权利要求 1 至 36 的任一项的抗体或其片段,其中抗体具有大于 75°C 的 FAB 片段热稳定温度。
41. 结合人 OX40 的抗体或其片段,其结合与权利要求 1 至 36 的任一项的抗体所结合的表位相同的表位。
42. 被权利要求 1 至 36 的任一项的抗体结合的人 OX40 胞外结构域上的表位。
43. 权利要求 42 的表位,其中人 OX40 胞外结构域是结构域 2 (SEQ ID NO:76)。
44. 编码权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段的分离的核酸。
45. 权利要求 44 的分离的核酸,其包括包含 SEQ ID NO:61 或 62 的核苷酸序列的重链可变区编码 DNA,和 / 或包含 SEQ ID NO:63 的核苷酸序列的轻链可变区编码 DNA。
46. 包含权利要求 44 或 45 的分离的核酸的载体。
47. 宿主细胞,包含权利要求 44 或 45 的分离的核酸或权利要求 46 的载体。
48. 生产结合人 OX40 的抗体或其片段的方法,包括培养权利要求 47 的宿主细胞,使得核酸表达和生产抗体。
49. 由权利要求 44 或 45 的分离的核酸编码的结合人 OX40 的抗体或其片段。
50. 组合物,其包含权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段,和可药用的载体。
51. 免疫缀合物,其包含与治疗剂相连的权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段。
52. 组合物,其包含权利要求 51 的免疫缀合物和可药用的载体。
53. 权利要求 50 或 52 的组合物,还包括另一种药学活性剂。
54. 用于治疗对象的 OX40 介导的病症的方法,方法包括向对象施用治疗有效量的权利

要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段。

55. 权利要求 54 的方法,其中 OX40 介导的病症选自感染(病毒性、细菌性、真菌性和寄生虫性)、与感染相关的内毒性休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎性疾病、阿兹海默病、炎性肠病、克氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泄(coeliac disease)、胆囊疾病、潜毛窦、腹膜炎、牛皮癣、脉管炎、术后粘连、中风、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎性病症,如多发性硬化、狼疮(例如系统性红斑狼疮)和格-巴二氏综合征、异位性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、Grave 氏病、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、Meniere 氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿、其他自身免疫病、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病(GVHD)、移植物排斥、心血管疾病,包括缺血性疾病,如心肌梗塞和动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和视神经脊髓炎。

56. 权利要求 54 的方法,其中 OX40 介导的病症选自感染(病毒性、细菌性、真菌性和寄生虫性)、与感染相关的内毒性休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、支气管炎、流感、呼吸道合胞病毒、肺炎、COPD、特发性肺纤维化(IPF)、隐源性致纤维性肺泡炎(CFA)、原发性纤维性间质性肺炎、肺气肿、盆腔炎性疾病、阿兹海默病、炎性肠病、克氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泄、胆囊疾病、潜毛窦、腹膜炎、牛皮癣、脉管炎、术后粘连、中风、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎性病症,如多发性硬化、狼疮(例如系统性红斑狼疮)和格-巴二氏综合征、异位性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、Grave 氏病、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、Meniere 氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿、其他自身免疫病、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病(GVHD)、移植物排斥、心血管疾病,包括缺血性疾病,如心肌梗塞和动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和视神经脊髓炎。

57. 权利要求 54 至 56 的任一项的方法,其中对象具有低的 OX40 表达水平。

58. 权利要求 54 至 56 的任一项的方法,其中相比具有人重链恒定区 IGHG1 的抗体,所述抗体具有增强的细胞毒性。

59. 权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段作为药物的用途。

60. 权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段的用途,用于制备用于治疗 OX40 介导的病症的药物。

61. 根据权利要求 60 的抗体或其片段的用途,其中 OX40 介导的病症是 GVHD,且其中抗体或其片段比**Enbrel®**更有效的抑制 GVHD。

62. 权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段,用作药物。

63. 权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段,用于治疗 OX40 介导的病症的方法中。

64. 权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段,用于治疗 OX40 介导的病症的方法中,其中 OX40 介导的病症是 GVHD,且其中抗体或其片段比**Enbrel®**更有效的抑制 GVHD。

65. 用于治疗 OX40 介导的病症的制品,其包含权利要求 1 至 41 的任一项的抗体或其片段,权利要求 50、52 或 53 的组合物,或权利要求 51 的免疫缀合物。

66. 用于治疗 OX40 介导的病症的试剂盒,其包含权利要求 1 至 30 的任一项的抗体或其片段,权利要求 50、52 或 53 的组合物,或权利要求 51 的免疫缀合物。

67. 检测具有低 OX40 的表达水平的患者的体外筛选方法,包括步骤:
- (a) 从患者血样中纯化外周血单核细胞(PBMC);
  - (b) 将 PBMC 进行流式细胞仪分析;和
  - (c) 确定 CD4<sup>+</sup> 和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的 OX40 阳性细胞数,及将该细胞数与对照水平比较。

## 结合 OX40 的抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2011 年 7 月 11 日提交的美国临时申请号 61/506,491 的权利,其全部内容通过引用全文整合到本文中。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段。更具体而言,本发明涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0004] 发明背景

[0005] OX40 是 TNFR 受体超家族的成员,并在 1987 年首次鉴别为在大鼠的活化 CD4+T 细胞上表达的 50kDa 糖蛋白(Paterson DJ 等人,(1987)Mol. Immunol. 24:1281-90)。OX40 的胞外配体结合结构域由 3 个完整的富含半胱氨酸的结构域(CRD)和第 4 个部分的 C- 末端 CRD 组成(Bodmer JL 等人,(2002)Trends Biochem. Sci. 27:19-26)。OX40 的配体是 OX40L (CD252),3 拷贝的 OX40 结合 3 聚体的配体,形成 OX40-OX40L 复合物(Compaan DM&Hymowitz SG(2006)Structure, 14:1321-1330)。OX40 是膜结合型受体;然而也检测到了可溶性异构体(Taylor L&Schwarz H(2001)J. Immunol. Methods, 255:67-72)。与 CD28 不同,OX40 不是在新生 T 细胞上组成型表达的,而是在 T 细胞受体(TCR)结合(engagement)后诱导的。OX40 是次级共刺激分子,在激活后 24 至 72 小时表达;它的配体 OX40L 也不在静息的抗原呈递细胞上表达,而在所述细胞激活后激活。OX40 主要由激活的 CD4+T 细胞表达,以及由激活的 CD8+T 细胞有限程度的表达(Salek-Ardakani S 等人,(2006)Curr. Immunol. Rev. 2:37-53)。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明一般涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其制备和使用的方法,包括治疗 OX40 介导的病症的方法。本发明的结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段是拮抗型抗体,不表现出激动剂效应和 / 或在结合后不激活人 OX40。

[0008] 在一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ;和 / 或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1,和 / 或包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2,和 / 或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变区序列。在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19)、IGHV2-70\*01 (SEQ ID NO:20)、IGHV2-70\*13 (SEQ ID

NO:21)、IGHV2-5\*09 (SEQ ID NO:22) 和 IGHV2-70\*11 (SEQ ID NO:23) 的人基因的产物或源自所述人基因。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的重链序列,其中重链可变框架区包括相对于相应小鼠抗体的相应重链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变区序列。在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是选自 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24)、IGKV1-39\*01 (SEQ ID NO:25)、IGKV1D-39\*01 (SEQ ID NO:26)、IGKV3-11\*02 (SEQ ID NO:27) 和 IGKV3-20\*01 (SEQ ID NO:28) 的人基因的产物或源自所述人基因。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了拮抗剂抗体或其片段,其包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24) 的人基因的产物或源自所述人基因,其中轻链可变框架区包括相对于相应小鼠抗体的轻链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37 和 38 的重链序列。在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 和 49 的轻链序列。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括:

[0015] (a) 包含 SEQ ID NO:37 或 38 的氨基酸序列的重链序列;和

[0016] (b) 包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含选自 SEQ ID NO:58、59、79 和 80 的氨基酸序列的重链可变区。在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括包含选自 SEQ ID NO:60、86、87 和 89 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括:

[0019] (a) 包含 SEQ ID NO:58 或 59 的氨基酸序列的重链可变区;和

[0020] (b) 包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0021] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中抗体包含人 IgG4Fc 区,其中抗体不具有 Fc 介导的细胞毒活性。在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中抗体包含人 IGHG1Fc 区,其中抗体具有细胞毒机制,例如抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。在优选的方面,结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段具有无岩藻糖基化的 IGHG1Fc 区,并表现出增强的 Fc 介导的细胞毒机制,如 ADCC。

[0022] 在另一个方面,本发明还描述了以与相应嵌合抗体类似的亲和力结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体或其片段,例如保留了相应嵌合抗体的至少 75% 的 OX40 结合亲和力( $K_D$ ),或与相应嵌合抗体比较时,具有至少等价的或更高的 OX40 结合亲和力( $K_D$ )。在另一个方面,本发明提供了这样的拮抗剂抗体或其片段,其结合位于人 OX40 胞外区的第二结构域中的表位。



[0023] 本发明还提供了编码结合人 OX40 的抗体及其片段的分离的核酸、载体,和包含所述核酸或载体的宿主细胞。还提供了包含所述拮抗剂抗体或其片段以及可药用载体的组合物,和包括与治疗剂连接的所述拮抗剂抗体或其片段的免疫缀合物。

[0024] 本发明还提供了治疗 OX40 介导的病症的方法。在一个方面,在同种异体活化的 T 细胞激活和增殖的体外模型(混合型淋巴细胞反应 ;MLR)中,拮抗剂抗体或其片段有效的抑制了两个不同个体(应答者)的 MLR,EC<sub>50</sub> 值是约 100ng/mL。此外,在异种移植物抗宿主反应中,拮抗型抗体或其片段有力的抑制了 GVHD 反应,所述反应是在人类患者中移植骨髓后观察到的同种异体移植物抗宿主病(GVHD)的模型。

[0025] 本发明还提供了试剂盒和制品,其包括所述抗体或其片段、用于治疗 OX40 介导的病症的组合物或免疫缀合物。

### 附图简介

[0026] 图 1:(A)固定化重组人 OX40-his 的直接结合 ELISA。通过直接 ELISA 测量嵌合 2F8 和 1D4 抗体与人 OX40 的结合。在 96 孔板中,4°C 孵育各浓度(10 至 0.01mg/ml)的 1D4 (黑色直方图)和 2F8 (白色直方图)与 2mg/ml 包被的重组人 OX40-his 标记的蛋白质过夜。通过辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗人抗体,检测每种抗体与 OX40 的结合。(B)固定化重组人 OX40-Fc 的竞争性 ELISA。通过阻断 ELISA 评估嵌合 1D4 和 2F8 对 OX40/OX40L 相互作用的抑制效应。在 96 孔板中,4°C 孵育各浓度(10 至 0.01mg/ml)的 1D4 (黑色直方图)和 2F8 (白色直方图)与 2mg/ml 包被的重组人 OX40-Fc 标记的蛋白质过夜。5 分钟后,向每个孔添加固定浓度的生物素化重组人 OX40L (0.04mg/ml),并在室温孵育 30 分钟。使用链霉抗生物素-HRP 检测 OX40L 与 OX40 的结合。

[0027] 图 2:通过 <sup>3</sup>H 胸苷整合测量的单向混合淋巴细胞反应(MLR)。直条显示了至少 3 次重复的平均 <sup>3</sup>H 胸苷整合(计数)± 平均值的标准误。显示了同种型对照(曲妥珠单抗)和阳性对照(依法珠单抗)。效应子仅代表效应子细胞。效应子+靶代表了省略抗体时的测量值。

[0028] 图 3:嵌合 1D4 抗体的流式细胞仪分析。

[0029] (A)对人活化的外周血单核细胞(PBMC)和 HPB-ALL 细胞的染色。直方图曲线(Histogram plots)显示了荧光强度(X 轴)和相对细胞数(%最大事件——Y 轴)。标出了染色的细胞类型。在测量前,用 PHA 和 IL-2 激活人 PBMC 持续 48h。

[0030] (B)对活化的食蟹猴(cynomologus)PBMC 染色。通过流式细胞仪评估嵌合 1D4 抗体与食蟹猴 OX40 的结合。从收集自食蟹猴的全血中分离外周血单核细胞(PBMC),在存在 10mg/ml PHA 和 100U/ml rhuIL-2 的条件下,培养 3x10<sup>6</sup> 细胞 50 小时。用 25mg/ml 的对照抗体(上图(i))或生物素化的绵羊抗人 OX40 抗体(中图(ii))或生物素化嵌合 1D4 抗体(下图(iii))孵育活化的 PBMC。用链霉抗生物素-APC 检测每种抗体与食蟹猴 OX40 的结合。

[0031] 图 4:表面等离子共振测量抗 OX40 抗体。数据表示为应答数(缩写为 RU;Y 轴) vs 时间(X 轴)。

[0032] 图 4A-VH1/VL1 抗体 vs1D4 嵌合体。

[0033] 图 4B- 基于 VH1、VH2 和 VH3 的人源化抗体(如所示) vs1D4 嵌合体。

[0034] 图 4C- 低结合子的例子:VH4/VL4、VH5/VL4、VH5/VL5 和 VH5/VL6。

[0035] 图 4D- 弱结合子(VH5/VL9 和 VH4/VL9)和良好结合子(VH6/VL9 和 VH7/VL9)的例

子。

[0036] 图 4E- 基于 VH7 的人源化抗体。

[0037] 图 4F-VH6/VL9 具有超过 1D4 嵌合体和人源化变体 VH7/VL9 的最佳结合特性。

[0038] 图 5 :序列比对。1D4 的重链(图 5A) 或轻链(图 5B) 可变区与选定的 IMGT 种系框架(IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19) 和 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24)) 和回复突变的可变区变体的比对,所述回复突变的可变区变体是 VH1 (SEQ ID NO:29)、VH2 (SEQ ID NO:77)、VH3 (SEQ ID NO:78)、VH4 (SEQ ID NO:79)、VH5 (SEQ ID NO:80)、VH6 (SEQ ID NO:58)、VH7 (SEQ ID NO:59)、VL1 (SEQ ID NO:30)、VL2 (SEQ ID NO:81)、VL3 (SEQ ID NO:82)、VL4 (SEQ ID NO:83)、VL5 (SEQ ID NO:84)、VL6 (SEQ ID NO:85)、VL7 (SEQ ID NO:86)、VL8 (SEQ ID NO:87)、VL9 (SEQ ID NO:60)、VL10 (SEQ ID NO:88)、VL11 (SEQ ID NO:89)。

[0039] 图 6 :使用差异扫描量热法,测量人源化抗 OX40 抗 - 抗体 VH6/VL9FAB 片段的热稳定性。数据表示为过量摩尔热容(缩写为 Cp[kcal/mol/°C ] ;Y 轴) vs 温度(X 轴)。

[0040] 图 7 :表位表征。该图显示了人源化抗 OX40 抗 - 抗体 VH6/VL9 表位,其是基于实施例 7 所述的 ELISA 测定结果的。

[0041] 图 8 :通过 <sup>3</sup>H 胸苷整合测量的混合淋巴细胞反应(MLR)。图 8A 和 8B 显示了来自两个不相关供体的混合淋巴细胞反应的结果。通过 <sup>3</sup>H 胸苷整合测量增殖。图表显示了每种条件的绝对计数值 ±SEM。应答者细胞是未处理的 PBMC,刺激子细胞是丝裂霉素 - 处理的 PBMC。用混合有异源刺激子 PBMC 的应答者细胞进行含测试抗体的所有条件。阳性对照是依法珠单抗(抗 LFA-1 抗体)。

[0042] 图 9 :异种移植 vs 宿主反应模型。该图显示了每个提及条件的 8 只动物的组内百分比存活。载体 :仅 PBS。垂直虚线表示了最后一天治疗。在未接受 PBMC 的 2 只照射过的对照动物的组中没有观察到死亡率和症状(未显示)。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明涉及结合人 OX40 的拮抗剂抗体及其片段。

[0045] 本文中使用的术语“人 OX40”包括人 OX40 的变体、同种型和物种同源物。因此,在某些情况下,本发明的抗体可与人以外的物种的 OX40 交叉反应。在某些实施方案中,抗体可以完全对一种或多种人 OX40 蛋白特异并且可以不表现出物种或其它类型的非人交叉反应。示例性的人 OX40 的完整氨基酸序列具有 Swiss-Prot 登录号 P43489 (TNFR4\_HUMAN ; SEQ ID NO:12)。OX40 也被称为 CD134、TNFRSF4、ACT35 或 TXGP1L。人 OX40 被 Entrez Gene 称为 GeneID:7293,被 HGNC 称为 HGNC:11918。OX40 可以被称为 CD134(134 分化簇)。OX40 可以由被称为 TNFRSF4/OX40 的基因编码。

[0046] 本文中“人 OX40”的使用涵盖了人 OX40 的所有已知的或仍未被发现的等位基因和多态形式。如未另外具体指出,则术语“人 OX40”、“OX40”或“OX40 受体”在本文中是等价使用的,意指“人 OX40”。

[0047] 术语“OX40 配体”或“OX40L”在本文中是等价使用的,包括 OX40 配体,尤其是人 OX40 配体。OX40L 是 TNF 超家族的成员,也被称为 gp34 或 CD252。OX40L 也被称为 CD252 (252 分化簇),具有序列数据库登录号 P23510 (Swiss-Prot)或 Q6FGS4 (Uniprot)。OX40L 在活化的 B 细胞、T 细胞、树突状细胞和内皮细胞的表面表达。

[0048] 本文中使用的术语“结合人 OX40 的抗体或其片段”包括结合人 OX40 (例如分离

形式的人 OX40) 的抗体或其片段,其亲和力( $K_D$ )为 500nM 或更低,优选 200nM 或更低,更优选 150nM 或更低,更优选 120nM 或更低,甚至更优选 110nM 或更低。术语“结合人 OX40 的抗体或其片段”包括抗体或其抗原结合片段。

[0049] 术语“拮抗性抗体”或“拮抗剂抗体”在本文中是等价使用的,包括能够抑制和/或中和 OX40 的生物学信号传递活性的抗体,例如通过阻断 OX40 与 OX40 配体的结合或实质上降低 OX40 与 OX40 配体的结合,因此抑制或降低由 OX40 触发的信号传递通路,和/或抑制或降低 OX40 介导的细胞应答样淋巴细胞增殖、细胞因子表达或淋巴细胞存活。

[0050] 本文中使用的术语“抗体”包括完整的抗体和其任何抗原结合片段或单链。“抗体”指包括通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白,或其抗原结合片段。每条重链都包括重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 CH1、CH2 和 CH3。每条轻链都包括轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域 CL。VH 和 VL 区可以进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的超变区,其序列超变和/或参与抗原识别和/或通常形成结构性限定的环,分散在被称作框架区(FR 或 FW)的较保守的区域中。每个 VH 和 VL 都包括 3 个 CDR 和 4 个 FW,按下列顺序从氨基端向羧基端排列:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。FW1、FW2、FW3 和 FW4 的氨基酸序列都构成本文所述 VH 或 VL 的“非 CDR 区”或“未延伸的 CDR 区”。

[0051] 本文中使用的术语“重链可变框架区”可包括一个或多个(例如,1、2、3 和/或 4 个)重链框架区序列(例如,框架区 1 (FW1)、框架区 2 (FW2)、框架区 3 (FW3)和/或框架区 4 (FW4))。优选的,重链可变框架区包括 FW1、FW2 和/或 FW3,更优选 FW1、FW2 和 FW3。本文中使用的术语“轻链可变框架区”可包括一个或多个(例如,1、2、3 和/或 4 个)轻链框架区序列(例如,框架区 1 (FW1)、框架区 2 (FW2)、框架区 3 (FW3)和/或框架区 4 (FW4))。优选的,轻链可变框架区包括 FW1、FW2 和/或 FW3,更优选 FW1、FW2 和 FW3。

[0052] 重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应子细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0053] 根据恒定区遗传确定,将抗体分类,也被称为同种型。人的恒定轻链分为  $\kappa$  (C $\kappa$ ) 和  $\lambda$  (C $\lambda$ ) 轻链。重链分为  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  或  $\epsilon$ ,并将抗体同种型分别定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。因此,本文中使用的“同种型”意指通过其恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任何类别和/或亚类。已知的人免疫球蛋白同种型是 IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) 和 IgE (IGHE)。所谓的人免疫球蛋白假  $\gamma$  IGHGP 基因代表了额外的人免疫球蛋白重链恒定区基因,该额外的基因已被测序,由于改变的转换区而不编码蛋白质(Bensmana M 等人, (1988)Nucleic Acids Res. 16(7):3108)。尽管具有改变的转换区,人免疫球蛋白假  $\gamma$  IGHGP 基因具有所有的重链恒定结构域(CH1-CH3)的和铰链区开放阅读框。其重链恒定结构域的所有的开放阅读框编码与具有预测的结构特征的所有人免疫球蛋白恒定结构域良好比对的蛋白质结构域。该额外的假  $\gamma$  同种型在本文中被称为 IgGP 或 IGHGP。已报道了其他的假免疫球蛋白基因,例如人免疫球蛋白重链恒定结构域  $\epsilon$  P1 和 P2 假基因(IGHEP1 和 IGHEP2)。IgG 类是最常用于治疗目的的。在人中,该类别包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类。在小鼠中,该类别包括亚类 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c 和 IgG3。

[0054] 本文中使用的术语“嵌合抗体 || 包括这样的抗体,其中可变区序列源自一个物种,而恒定区序列源自另一个物种,例如可变区序列源自小鼠抗体,而恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0055] 本文中使用的术语“人源化抗体 || 或一人源化抗 OX40 抗体 || 包括这样的抗体,其中源自另一种哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的 CDR 序列被移植到人的框架序列上。在人的框架序列和源自另一种哺乳动物物种的种系的 CDR 序列中也可以进行额外的框架区修饰。

[0056] 本文中使用的术语“Fab”或“Fab 区 || 包括包含 VH、CH1、VL 和 CL 免疫球蛋白结构域的多肽。Fab 可以指分离的该区域,或者位于全长抗体或抗体片段环境中的该区域。

[0057] 本文中使用的术语“Fc”或“Fc 区 || 包括包含除第一恒定区免疫球蛋白结构域以外的抗体恒定区的多肽。因而,Fc 指 IgA、IgD 和 IgG 的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,和 IgE 和 IgM 的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,和这些结构域 N 端的柔性铰链。对于 IgA 和 IgM, Fc 可包括 J 链。对于 IgG, Fc 包括免疫球蛋白结构域 C<sub>γ</sub>2 和 C<sub>γ</sub>3 (C<sub>γ</sub>2 和 C<sub>γ</sub>3),和在 C<sub>γ</sub>1 (C<sub>γ</sub>1) 和 C<sub>γ</sub>2 (C<sub>γ</sub>2) 之间的铰链。虽然 Fc 区的边界可以改变,但人 IgG 重链 Fc 区通常定义为包含残基 C226 或 P230 至其羧基端,其中编号是根据 EU 编号系统。对于人 IgG1, Fc 区在本文定义为包含残基 P232 至其羧基端,其中编号是根据 EU 编号系统(Edelman GM 等人,(1969)Proc Natl Acad Sci USA, 63(1):78-85)。Fc 可以指分离的该区域,或者位于 Fc 多肽(例如抗体)环境中的该区域。

[0058] 本文中的术语“铰链 || 或一铰链区 || 或一抗体铰链区 || 包括包含在抗体的第一和第二恒定结构域之间的氨基酸的柔性多肽。本文所述的一铰链区 || 是长度为 6-62 个氨基酸的序列区,仅存在于 IgA、IgD 和 IgG 中,涵盖了桥接两条重链的半胱氨酸。结构上,IgG CH1 结构域终止于 EU220 位,IgG CH2 结构域始于残基 EU237 位。因而,对于 IgG,本文中抗体铰链定义为包括 221 (IgG1 的 D221) 至 231 (IgG1 的 A231) 位,其中编号是根据 EU 编号系统(Edelman GM 等人,见上文)。

[0059] 本文中使用的术语“亲本抗体 || 或一亲本免疫球蛋白 || 包括未修饰的抗体,所述抗体之后经修饰产生变体。所述亲本抗体可以是天然存在的抗体,或者天然存在的抗体的变体或改造版本。亲本抗体可以指抗体本身,包含所述亲本抗体的组合物,或其编码氨基酸序列。本文中使用的“亲本抗 OX40 抗体 || 意指结合人 OX40 的抗体或免疫球蛋白,并经修饰产生变体。本文中使用的“相应小鼠抗体 || 意指结合人 OX40 的小鼠抗体或免疫球蛋白,可以经修饰生成变体,尤其是本文公开的小鼠抗体 1D4。

[0060] 本文中使用的术语“变体抗体 || 或一抗体变体 || 包括由于相比亲本的至少一个氨基酸修饰,而不同于亲本抗体序列的抗体序列。本文中的变体抗体序列优选的具有与亲本抗体序列至少约 80%,最优选至少约 90%,更优选至少约 95% 的氨基酸序列同一性。抗体变体可以指抗体本身,包含所述抗体变体的组合物,或编码其的氨基酸序列。

[0061] 本文中的术语“氨基酸修饰 || 包括在多肽序列中的氨基酸取代、插入和 / 或缺失。本文中的一氨基酸取代 || 或一取代 || 意指用另一种氨基酸替换亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如,取代 R94K 指这样的变体多肽,其中 94 位的精氨酸被赖氨酸替换,此情况为重链可变框架区变体。对于前例,94K 表示用赖氨酸取代 94 位。出于本文的目的,通常通过斜杠分隔多个取代。例如, R94K/L78V 指包含取代 R94K 和 L78V 的双变体。本文

中使用的“氨基酸插入 || 或—插入 ||”意指在亲本多肽序列中的特定位置添加氨基酸。例如,插入-94表示在94位的插入。本文中使用的“—氨基酸缺失 || 或—缺失 ||”意指去除亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸。例如 R94-表示缺失94位的精氨酸。

[0062] 本文中使用的术语“—保守修饰 || 或—保守序列修饰 ||”意指不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、插入和缺失。可通过本领域已知的标准技术将修饰导入本发明的抗体中,例如定点诱变和PCR介导的诱变。保守的氨基酸取代是用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括含碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 $\beta$ 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因而,可以用其他相同侧链家族的氨基酸残基替换本发明抗体的CDR区中或框架区中的一个或多个氨基酸残基,并可以测试所改变的抗体(变体抗体)保留的功能。

[0063] 对于所有的人免疫球蛋白重链恒定结构域,都是根据“EU编号系统 || 编号”(Edelman GM等人,(1969)Proc Natl Acad Sci USA, 63(1):78-85)。对于人 $\kappa$ 免疫球蛋白轻链恒定结构域(IGKC),根据“EU编号系统”编号(Edelman等人,见上文)。

[0064] 对于人 $\lambda$ 免疫球蛋白轻链恒定结构域(IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6和IGLC7),根据“Kabat编号系统 || 编号”(Kabat EA等人,(1991)Sequences of proteins of immunological interest.,第5版,USDepartment of Health and Human Services,NIH公开号91-3242),如Dariavach P等人,(1987)Proc Natl Acad Sci USA, 84(24):9074-8和Frangione B等人,(1985)Proc Natl Acad Sci USA, 82(10):3415-9所述。

[0065] 术语“—可变结构域 ||”指介导抗原结合和定义特定抗体与特定抗原特异性的结构域。在天然存在的抗体中,抗原结合位点由2个定义特异性的可变结构域组成:1个位于重链(VH),另一个位于轻链(VL)。在一些情况下,特异性可专门位于2个结构域中的1个结构域中,如可见于骆驼科的重链抗体中的单结构域抗体。V区长度通常是约110个氨基酸,由15-30个氨基酸的、被称为框架区(FR)的相对不变的氨基酸序列区段和长度9-12个氨基酸的、被称为“—超变区 ||”的非常易变的较短区域组成,所述框架区被“—超变区 ||”分割开。天然重链和轻链的可变结构域包括4个大部分采用 $\beta$ 片层构象的FR,通过3个形成环的超变区连接。由FR将每条链中的超变区与其他链的超变区紧密的保持在一起,有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat EA等人,见上文)。本文中使用的术语“—超变区 ||”指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。超变区一般包括来自“—互补决定区 || 或—CDR ||”的氨基酸残基,后者是最高序列可变性和/或参与抗原识别。根据Kabat(Kabat EA等人,见上文)对所有的可变结构域编号。

[0066] 本文使用和涵盖了多个CDR定义。Kabat定义是基于序列可变性的并是最常用的定义(Kabat EA等人,见上文)。Chothia相反指结构环的位置(Chothia C&Lesk AM(1987)J. Mol. Biol. 196:901-917)。AbM定义是Kabat和Chothia定义之间的妥协,由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用(Martin ACR等人,(1989)Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86:9268-72;Martin ACR等人,(1991)Methods Enzymol. 203:121-153;Pedersen JT

等人, (1992) *Immunomethods*, 1:126 - 136 ;Rees AR 等人, (1996) In Sternberg M. J. E. (编著), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141 - 172)。接触定义是最近引入的(MacCallum RM 等人, (1996) *J. Mol. Biol.* 262:732-745), 基于对 Protein Databank 中可利用的复杂结构的分析。IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®) 对 CDR 的定义 (<http://www.imgt.org>) 是基于对所有种类的所有免疫球蛋白和 T 细胞受体 V 区的 IMGT 编号的 (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP 等人, (1991) *Nucleic Acids Res.* 27(1):209-12; Ruiz M 等人, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1):207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1):307-10; Lefranc MP 等人, (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3):185-203; Kaas Q 等人, (2007) *Briefings in Functional Genomics&Proteomics*, 6(4):253-64)。

[0067] 本发明中讨论的所有互补决定区 (CDR) 优选是根据 IMGT® 定义的。上述 CDR 中每一个的可变结构域残基如下 (根据 Kabat EA 等人编号, 见上文): LCDR1 :27-32 ;LCDR2 :50-52 ;LCDR3 :89-97 ;HCDR1 :26-35 ;HCDR2 :51-57 和 HCDR3 :93-102。本文中使用的 VL 区的一非 CDR 区 || 包括氨基酸序列:1-26 (FR1)、33-49 (FR2)、53-88 (FR3) 和 98- 约 107 (FR4)。本文中使用的 VH 区的一非 CDR 区 || 包括氨基酸序列:1-25 (FR1)、36-50 (FR2)、58-92 (FR3) 和 103- 约 113 (FR4)。

[0068] 本发明的 CDR 可包括基于上述定义的一延伸的 CDR”, 并具有如下的可变结构域: LCDR1 :24-36、LCDR2 :46-56、LCDR3 :89-97、HCDR1 :26-36、HCDR2 :47-65、HCDR3 :93-102。这些延伸的 CDR 是根据 Kabat 等人, 见上文编号的。本文使用的 VL 区的一非延伸 CDR 区 || 包括氨基酸序列:1-23 (FR1)、37-45 (FR2)、57-88 (FR3) 和 98- 约 107 (FR4)。本文使用的 VH 区的一非延伸 CDR 区 || 包括氨基酸序列:1-25 (FR1)、37-46 (FR2)、66-92 (FR3) 和 103- 约 113 (FR4)。

[0069] 本文使用的术语一全长抗体 || 包括构建天然生物学形态的抗体的结构, 包括可变区和恒定区。例如, 在大部分哺乳动物中, 包括人和小鼠, IgG 类的全长抗体是四聚体, 并由 2 对相同的两条免疫球蛋白链组成, 每对具有一条轻链和一条重链, 每条轻链包含免疫球蛋白结构域 VL 和 CL, 每条重链包含免疫球蛋白结构域 VH、CH1 (C<sub>γ</sub>1)、CH2 (C<sub>γ</sub>2) 和 CH3 (C<sub>γ</sub>3)。在一些哺乳动物中, 例如骆驼和羊驼 (llama), IgG 抗体可以仅由两条重链组成, 每条重链包含与 Fc 区连接的可变结构域。

[0070] 抗体片段包括但不限于: (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段, 包括 Fab' 和 Fab' -SH, (ii) VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段, (iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (iv) 由单个可变区组成的 dAb 片段 (Ward 等人, 1989, *Nature*341:544-546); (v) F(ab')<sub>2</sub> 片段, 包含 2 个连接的 Fab 片段的二价片段; (vi) 单链 Fv 分子 (scFv), 其中 VH 结构域和 VL 结构域通过肽接头连接, 所述接头允许两个结构域关联形成抗原结合位点 (Bird 等人, 1988, *Science*242:423-426; Huston JS 等人, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:5879-5883); (vii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965); (viii) 一双抗体 || 或一三链抗体 ||, 通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (Tomlinson I & Hollinger P, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; W094/13804; Holliger 等人,

1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:6444-6448); 和(ix) 与相同或不同抗体遗传融合的 scFv (Coloma&Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15, 159-163)。

[0071] 本文中使用的术语—效应子功能 || 包括由抗体 Fc 区与 Fc 受体或配体相互作用导致的生物化学事件。效应子功能包括 Fc  $\gamma$  R- 介导的效应子功能, 例如 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用) 和 ADCP (抗体依赖性细胞介导的吞噬作用), 和补体介导的效应子功能, 例如 CDC(补体依赖性细胞毒作用)。可以通过改变(即, 增强或降低), 优选增强抗体与效应子分子(例如 Fc 受体或补体组分)的亲和力, 改变抗体的效应子功能。一般通过修饰效应子分子结合位点来改变结合亲和力, 在此情况下, 恰当的是以合适的方式定位目标位点和修饰至少一部分位点。还可以设想抗体与效应子分子的结合位点中的改变不必显著改变整体的结合亲和力, 可以改变相互作用的几何形状, 使效应子机制在非生产性结合中无效。还可以设想通过修饰不直接参与效应子分子结合而参与效应子功能实施的位点, 改变效应子功能。通过改变抗体的效应子功能, 可以控制免疫应答的多个方面, 例如增强或抑制免疫系统的多种反应, 对诊断和治疗具有潜在的有益效果。

[0072] 本文中使用的术语—OX40 介导的病症 || 包括例如变态反应、哮喘、COPD、类风湿关节炎、牛皮癣和与自身免疫和炎症相关的适应症。

[0073] 本文中使用的术语—对象 || 包括任何人或非人动物。术语“非人动物 || 包括所有的脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 例如非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类、爬行类等。优选的对象是人。

[0074] 抗 OX40 抗体

[0075] 在第一个方面, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1, 和 / 或包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2, 和 / 或包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ; 和 / 或包括包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1, 和 / 或包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2, 和 / 或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0076] 在一些实施方案中, 结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的延伸的重链 CDR1, 和 / 或包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的延伸的重链 CDR2, 和 / 或包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的延伸的重链 CDR3 ; 和 / 或包括包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的延伸的轻链 CDR1, 和 / 或包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的延伸的轻链 CDR2, 和 / 或包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的延伸的轻链 CDR3。

[0077] 优选的, 结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1, 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2, 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ; 和 / 或包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1, 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2, 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。更优选的, 结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的重链 CDR1, 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR2, 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3 ; 和包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的轻链 CDR1, 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的轻链 CDR2, 和包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0078] 本领域普遍已知 CDR3 结构域不依赖于 CDR1 和 / 或 CDR2 结构域, 单独就可以确定抗体对同族抗原的结合特异性, 基于共同的 CDR3 序列可以可预测的产生具有相同结合特

异性的多种抗体。参见例如 KlimkaA 等人, Br. J. Cancer83(2):252-260(2000) (描述了仅使用鼠抗 CD30 抗体 Ki-4 的重链可变结构域 CDR3 生产人源化抗 CD30 抗体);Beiboer SH 等人, J. Mol. Biol. 296:833-849(2000) (描述了仅使用亲本鼠 M0C-31 抗 EGP-2 抗体的重链 CDR3 序列生产重组的上皮糖蛋白 -2 (EGP-2) 抗体);Rader C 等人, Proc. Natl Acad. Sci U. S. A. 95:8910-8915(1998) (描述了使用鼠抗整联蛋白  $\alpha v \beta 3$  抗体 LM609 的重链和轻链可变 CDR3 结构域的一组人源化抗整联蛋白  $\alpha v \beta 3$  抗体, 其中每个抗体成员在 CDR3 结构域之外都包括不同的序列, 并能够以与亲本鼠抗体同样高或更高的亲和力结合与亲本鼠抗体相同的表位);Barbas 等人, J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162(1994) (公开了 CDR3 结构域为抗原结合提供了最重要的贡献)。

[0079] 因此, 本发明提供了结合人 OX40 的抗体及其片段, 其包括一个或多个重链和 / 或轻链 CDR3 结构域, 特别是包括包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR3, 和 / 或包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR3, 其中所述抗体能够结合人 OX40。在一些实施方案中, 本发明的抗体包括来自非人抗体的一个或多个重链和 / 或轻链 CDR3 结构域, 所述抗体(a)能够与相应的亲本非人(例如鼠)抗体竞争结合;(b)保留相应的亲本非人(例如鼠)抗体的功能特征;(c)结合与相应的亲本非人(例如鼠)抗体结合的表位相同的表位;和 / 或(d)具有与相应的亲本非人(例如鼠)抗体相似的结合亲和力。

[0080] 在另一个方面, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变区序列。在另一个方面, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段, 其包括包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变区序列, 和包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0081] 在另一个方面, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段的变体。因此, 本发明提供了抗体或其片段, 具有这样的重链和 / 或轻链可变区序列的非 CDR 区的氨基酸序列, 其与亲本拮抗剂抗体的重链或轻链之重链和 / 或轻链可变区序列(例如分别如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 的重链和轻链可变区序列)的非 CDR 区的氨基酸序列至少 80% 相同(具有至少 80% 氨基酸序列同一性)。本发明还提供了这样的抗体或其片段, 具有重链和 / 或轻链可变区序列的非延伸 CDR 区的氨基酸序列, 所述序列与亲本拮抗剂抗体的重链或轻链之重链和 / 或轻链可变区序列的非延伸 CDR 区的氨基酸序列至少 80% 相同。优选的, 重链和 / 或轻链可变区序列的非 CDR 区或非延伸 CDR 区的氨基酸序列同一性是至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95%, 特别是 96%, 更特别 97%, 甚至更特别 98%, 最特别 99%, 包括例如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和 100%。本文中关于氨基酸序列的同一性或同源性定义为在比对序列和为了实现最大百分比序列同一性, 在必要时导入空位后, 候选序列中与结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段相同的氨基酸残基的百分比。因而, 可以通过通常用于比较两条多肽的氨基酸位置相似性的标准方法, 来确定序列同一性。使用计算机程序例如 BLAST 或 FASTA, 比对两条多肽各自氨基酸的最佳匹配(沿一条或两条序列的全长或者沿一条或两条序列预定的部分)。程序提供了默认的开放罚分和默认的空位罚分, 评分矩阵例如 PAM250(标准评分矩阵; 参见 Dayhoff MO 等人, (1978), in Atlas of Protein Sequence and Structure, 第 5 卷, 第 3 期增补)可与计算机程序结合使用。例如, 百分比同一性可计算为: 相同匹配的总数乘以 100, 再除以匹



配跨度中较长序列的长度和为了比对两条序列向较长序列中导入的空位数之和。

[0082] 在一些实施方案中,本发明因而提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包括与 SEQ ID NO:19、20、21、22 或 23 的框架区序列至少 70% 相同的重链可变框架区序列,和 / 或与 SEQ ID NO:24、25、26、27 和 28 的框架区序列至少 60% 相同的轻链可变框架区序列。在一些实施方案中,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包括与 SEQ ID NO:19 的框架区序列至少 74% 相同的重链可变框架区序列,和 / 或与 SEQ ID NO:24 的框架区序列至少 65% 相同的轻链可变框架区序列。

[0083] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其包括如上文所述的重链和 / 或轻链 CDR, 还包括这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是选自 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19)、IGHV2-70\*01 (SEQ ID NO:20)、IGHV2-70\*13 (SEQ ID NO:21)、IGHV2-5\*09 (SEQ ID NO:22) 和 IGHV2-70\*11 (SEQ ID NO:23) 的人基因的产物或源自所述人基因;优选这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19) 的人基因的产物或源自所述人基因。重链可变框架区可包括一个或多个(例如, 1、2、3 和 / 或 4 个)重链框架区序列(例如,框架 1 (FW1)、框架 2 (FW2)、

[0084] 框架 3 (FW3) 和 / 或框架 4 (FW4)),其存在于这些人基因的产物中或源自这些人基因。优选的,重链可变区框架包括 FW1、FW2 和 / 或 FW3,更优选 FW1、FW2 和 / 或 FW3,其存在于选自 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19)、IGHV2-70\*01 (SEQ ID NO:20)、IGHV2-70\*13 (SEQ ID NO:21)、IGHV2-5\*09 (SEQ ID NO:22) 和 IGHV2-70\*11 (SEQ ID NO:23) 的人基因的产物中或源自所述人基因。本文使用的重链框架区序列包括 FW1 (位置 1 至位置 25)、FW2 (位置 36 至位置 49)、FW3 (位置 66 至位置 94) 和 FW4 (位置 103 至位置 113),其中利用 Kabat 中提出的编号系统表示所述氨基酸位置。

[0085] 在一些实施方案中,本发明提供了抗体或其片段,其中抗体或其片段包括这样的重链可变框架区,所述重链可变框架区是 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19) 的人基因的产物或源自所述人基因,其中所述重链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应重链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0086] 在一些实施方案中,本发明提供了抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的重链序列,其中重链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应重链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0087] 优选的,氨基酸修饰包括在选自 23、35b、48、50、60 和 62 的氨基酸位置上的氨基酸取代,更优选在选自 23、35b、50、60 和 62 的氨基酸位置上的氨基酸取代,最优选在氨基酸位置 35b 的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。具体而言,氨基酸修饰包括选自 23S、35bG、48L、50H、60N 和 62A 的氨基酸取代,优选选自 T23S、S35bG、I48L、R50H、S60N 和 S62A 的氨基酸取代,而 S35bG 是最优选的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。

[0088] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段的变体,其包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是选自 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24)、IGKV1-39\*01 (SEQ ID NO:25)、IGKV1D-39\*01 (SEQ ID NO:26)、IGKV3-11\*02 (SEQ ID NO:27) 和 IGKV3-20\*01 (SEQ ID NO:28) 的人基因的产物或源自所述人基因;优选是 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24) 的人基因的产物或源自所述人基因的轻链可变框架区。轻链可变框架区

可包括一个或多个(例如,1、2、3和/或4个)轻链框架区序列(例如,框架1(FW1)、框架2(FW2)、框架3(FW3)和/或框架4(FW4)),其存在于这些人基因的产物中或源自这些人基因。优选的,轻链可变区框架包括FW1、FW2和/或FW3,更优选FW1、FW2和/或FW3,其存在于选自IGKV3-11\*01(SEQ ID NO:24)、IGKV1-39\*01(SEQ ID NO:25)、IGKV1D-39\*01(SEQ ID NO:26)、IGKV3-11\*02(SEQ ID NO:27)和IGKV3-20\*01(SEQ ID NO:28)的人基因的产物中或源自所述人基因。本文使用的轻链框架区序列包括FW1(位置1至位置23)、FW2(位置35至位置49)、FW3(位置57至位置88)和FW4(位置98至位置108),其中利用Kabat中提出的编号系统表示所述氨基酸位置。

[0089] 在一些实施方案中,本发明提供了抗体或其片段,其中抗体或其片段包括这样的轻链可变框架区,所述轻链可变框架区是IGKV3-11\*01(SEQ ID NO:24)的人基因的产物或源自所述人基因,其中所述轻链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应轻链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0090] 在一些实施方案中,本发明提供了抗体或其片段,其中抗体或其片段包括包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的轻链序列,其中轻链序列的轻链可变框架区包括来自相应鼠抗体的相应轻链可变框架区的至少一个氨基酸修饰。

[0091] 优选的,氨基酸修饰包括在选自1、33、34、46、47、54、56和71的氨基酸位置上的氨基酸取代和/或氨基酸位置31上的缺失,更优选在选自33、34、46、47、54、56和71的氨基酸位置上的氨基酸取代和/或氨基酸位置31上的缺失,最优选氨基酸位置46和/或47的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中根据Kabat编号表示每组成员的氨基酸位置。具体而言,氨基酸修饰包括选自1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56S和71Y的氨基酸取代和/或T31的缺失,优选选自1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56S和71Y的氨基酸取代,更优选选自33M、34H、46P、47W和71Y的氨基酸取代,而46P、47W是特别优选的,其中根据Kabat编号表示每组成员的氨基酸位置。

[0092] 在一些实施方案中,结合人OX40的拮抗剂抗体或其片段包括这样的重链可变框架区和轻链可变框架区,所述重链可变框架区是选自V2-70\*10(SEQ ID NO:19)、V2-70\*01(SEQ ID NO:20)、V2-70\*13(SEQ ID NO:21)、V2-5\*09(SEQ ID NO:22)和V2-70\*11(SEQ ID NO:23)的人基因的产物或源自所述人基因,所述轻链可变框架区是选自V3-11\*01(SEQ ID NO:24)、IGKV1-39\*01(SEQ ID NO:25)、IGKV1D-39\*01(SEQ ID NO:26)、IGKV3-11\*02(SEQ ID NO:27)和IGKV3-20\*01(SEQ ID NO:28)的人基因的产物或源自所述人基因;优选的重链可变框架区是V2-70\*10(SEQ ID NO:19)的人基因的产物或源自所述人基因,轻链可变框架区是V3-11\*01(SEQ ID NO:24)的人基因的产物或源自所述人基因。本发明还涵盖了存在于上述不同的人基因的产物中或源自所述人基因的重链可变区框架区,和/或存在于上述不同的人基因的产物中或源自所述人基因的轻链可变区框架区的组合。

[0093] 人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人种系序列数据库中(可获得自因特网的[www.mrcce.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrcce.cam.ac.uk/vbase)),以及Kabat, EA等人,见上文;Tomlinson, IM等人,(1992)J. Mol. Biol. 227:776-798和Cox, JPL等人,(1994)Eur. J. Immunol. 24:827-836。如另一个实例,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于Genbank数据库。

[0094] 在另一个方面,本发明还提供了结合人OX40的拮抗剂抗体或其片段,其中至少一

个重链 CDR 和 / 或至少一个轻链 CDR 包括至少一个氨基酸修饰。可以实施定点诱变或 PCR 介导的诱变,来导入修饰,并可以在体外或体内测定中评估对抗体结合的影响或者其他的目标功能特性。优选的导入保守修饰。修饰可以是氨基酸取代、添加或缺失,但优选是取代。通常,在 CDR 区中实施不超过 5 个,优选不超过 4 个,更优选不超过 3 个,甚至更优选不超过 2 个,最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。

[0095] 在某些实施方案中,框架序列可用于改造可变区,产生变体抗体。本发明的变体抗体包括对 VH 和 / 或 VK 中的框架区残基进行了修饰的变体,例如改善抗体的特性。通常,进行此类框架区修饰来减少抗体的免疫原性。例如,一种方法是一回复突变 || 一个或多个框架区残基为相应的鼠序列,或者一回复突变 || 一个或多个框架区残基为相应的种系序列。

[0096] 因而在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中所述拮抗剂抗体或其片段的至少一个重链可变区的框架区包括来自相应鼠抗体的重链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。优选的,所述氨基酸修饰是氨基酸取代。通常,在框架区内实施不超过 6 个,优选不超过 5 个,优选不超过 4 个,更优选不超过 3 个,甚至更优选不超过 2 个,最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。在一些实施方案中,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中重链可变区的框架区的氨基酸修饰包括在选自 23、35b、48、50、60 和 62 的氨基酸位置上的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。重链可变区的框架区的优选的氨基酸取代位于选自 23、35b、50、60 和 62 的氨基酸位置上。重链可变区的框架区的更优选的氨基酸取代是选自 23S、35bG、48L、50H、60N 和 62A 的氨基酸取代,而 35bG 是重链可变区的框架区的最优选的氨基酸取代。

[0097] 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其中所述拮抗剂抗体或其片段的至少一个轻链可变区的框架区包括来自相应鼠抗体的轻链可变区的相应框架区的至少一个氨基酸修饰。优选的,所述氨基酸修饰是氨基酸取代和 / 或氨基酸缺失。通常,在框架区内实施不超过 6 个,优选不超过 5 个,优选不超过 4 个,更优选不超过 3 个,甚至更优选不超过 2 个,最优选不超过 1 个的氨基酸修饰。在一些实施方案中,本发明提供了人源化抗体或其片段,其中轻链可变区的框架区的氨基酸修饰包括在选自 1、33、34、46、47、54、56 和 71 的氨基酸位置上的氨基酸取代和 / 或氨基酸位置 31 上的缺失。更优选的,轻链可变区的框架区的氨基酸修饰包括在 Y31 的缺失和 / 或选自 1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56S 和 71Y 的氨基酸取代,其中根据 Kabat 编号表示每组成员的氨基酸位置。最优选的,轻链可变区的框架区的氨基酸修饰包括在 T31 的缺失和 / 或选自 33M、34H、46P、47W 和 71Y 的取代,而 46P,和 / 或 L47W 是特别优选的。在一些实施方案中,本发明的人源化抗体或其片段可包括上述重链可变区序列的框架区的氨基酸修饰,和上述轻链可变区序列的框架区的氨基酸修饰。

[0098] 本发明还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:29、58、59、77、78、79 和 80 的重链可变区,优选选自 SEQ ID NO:58、59、79 和 80,更优选选自 SEQ ID NO:58 和 59。本发明还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:30、60、81、82、83、84、85、86、87、88 和 89 的轻链可变区,优选选自 SEQ ID NO:60、86、87 和 89,更优选 SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO:29、58、59、77、78、79 和 80 的重链可变区,和选自 SEQ ID NO:30、60、81、82、83、84、85、86、87、88 和 89 的轻链可变区。考虑到每种上述重链和轻链可变区序列都可以结合人 OX40,可以一混合和匹配 || 重链和轻链可变区序列,来产生本发明的抗 OX40 结合分

子。可以使用例如实施例中描述的结合测定,来测试此类一混合和匹配 II 的抗体的 OX40 结合。

[0099] 在一些实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO:58 和 59 的重链可变区,和选自 SEQ ID NO:60 和 89 的轻链可变区。在更优选的实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的轻链可变区;包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列的轻链可变区;包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的轻链可变区;包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的重链可变区,和包含 SEQ ID NO:89 的氨基酸序列的轻链可变区。最优选的是这样的结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:58 和 59 的重链可变区,和包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的轻链可变区

[0100] 本申请还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37 和 38 的重链序列,优选选自 SEQ ID NO:35、36、37 和 38,更优选选自 SEQ ID NO:37 和 38。本申请还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 和 49 的轻链序列,优选选自 SEQ ID NO:45、46、47 和 49,更优选 SEQ ID NO:47。在一些实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37 和 38 的重链序列,和选自 SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 和 49 的轻链序列。考虑到每种上述重链和轻链可变区序列都可以结合人 OX40,可以一混合和匹配 II 重链和轻链可变区序列,来产生本发明的抗 OX40 结合分子。可以使用例如实施例中描述的结合测定,来测试此类一混合和匹配 II 的抗体的 OX40 结合。

[0101] 在一些实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括选自 SEQ ID NO:37 和 38 的重链序列,和选自 SEQ ID NO:47 和 49 的轻链序列。在更优选的实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列;包含 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的轻链序列;包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列;包含 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的重链序列,和包含 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的轻链序列。最优选的是这样的结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括选自 SEQ ID NO:37 和 38 的重链序列,和包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,拮抗剂抗体或其片段是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体,优选人源化抗体,更优选单克隆鼠抗体、单克隆嵌合抗体或单克隆人源化抗体。

[0103] 本发明还提供了结合人 OX40 的单价抗体或其片段,即,由单抗原结合臂组成的抗体。本发明还提供了结合人 OX40 的抗体的片段,所述片段选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体、三链抗体和与相同或不同抗体遗传融合的 scFv。优选的片段是 scFv、双特异性单链 Fv 二聚体和双抗体。本发明还提供了结合人 OX40 的全长抗体。

[0104] 本发明还提供了结合人 OX40 的抗体或其片段,其还包括重链和 / 或轻链恒定区,特别是人重链和 / 或人轻链恒定区。人重链恒定区可选自 IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) 或

IgE (IGHE)构成的人免疫球蛋白的组,而人重链恒定区 IgG,特别是 IgG1 (IGHG1)是优选的。人轻链恒定区可选自  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区构成的人免疫球蛋白的组,而人  $\kappa$  恒定区是优选的。在一些优选的实施方案中,所述结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段包括人 IgG1 (IGHG1)重链恒定结构域和人轻链  $\kappa$  恒定结构域。

[0105] 除了在框架区或 CDR 区进行修饰外,或作为其备选,还可以改造本发明的抗体以包括 Fc 区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc 受体结合,和 / 或抗原依赖性细胞的细胞毒作用。此外,可以化学修饰(例如,可以在抗体上连接一个或多个化学部分)或修饰本发明的抗体,改变它的糖基化。这些方案中的每一种如下详细描述。如下概述的 Fc 区内的修饰是根据 Fc 区内的残基的 EU 编号。在一个实施方案中,修饰 CH1 的铰链区,使得改变铰链区内的半胱氨酸残基数,例如增加或减少。该方法进一步描述在 Bodmer 等人的美国专利号 5,677,425 中。改变 CH1 的铰链区内的半胱氨酸残基数,以例如促进轻链和重链装配,或增加或减少抗体的稳定性。在另一个实施方案中,突变抗体的 Fc 铰链区,以减少抗体的生物学半衰期。更具体而言,在 Fc 铰链片段的 CH2-CH3 结构域交界区中导入一个或多个氨基酸突变,使得抗体相比天然的 Fc 铰链结构域 SpA 结合具有受损的葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 结合。该方法进一步描述在 Ward 等人的美国专利号 6,165,745 中。在另一个实施方案中,修饰抗体以增加其生物学半衰期。多种方法都是可以的。例如,可以导入一种或多种下列突变: T252L、T254S、T256F,如 Ward 等人的美国专利号 6,277,375 所述。可选的,为了增加生物学半衰期,可以在 CH1 或 CL 区中改变抗体,以含有取自 IgG 的 Fc 区的 CH2 结构域的 2 个环中的补救受体 (salvage receptor) 结合表位,如 Presta 等人的美国专利号 5,869,046 和 6,121,022 所述。在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换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换选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一个或多个氨基酸,使得抗体对效应子配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应子配体可以是例如 Fc 受体或补体的 C1 组分。该方法进一步描述在 Winter 等人的美国专利号 5,624,821 和 5,648,260 中。在另一个实例中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸,使得抗体具有改变的 C1q 结合和 / 或降低或消除的补体依赖性细胞毒作用 (CDC)。该方法进一步描述在 Idusogie 等人的美国专利号 6,194,551 中。在另一个实例中,改变 CH2 结构域的 N 端区域中氨基酸位置 231 至 238 中的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法进一步描述在 Bodmer 等人的 PCT 公开 W094/29351 中。在另一个实例中,修饰 Fc 区以增加抗体介导的抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 的能力,和 / 或增加抗体对 Fc  $\gamma$  受体的亲和力,通过修饰下列位置上的一个或多个氨基酸: 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。该方法进一步描述在 Presta 的 PCT 公开 W000/42072 中。

[0106] 本发明还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括人重链和 / 或轻链恒定区,其中人重链恒定区包括包含来自人 IgG4 (IGHG4) 的 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区的同种型变体,其中铰链区包括第 228 位丝氨酸取代之脯氨酸。优选的,包含同种型变体的

人源化抗体是全长抗体。特别优选的结合人 OX40 的人源化抗体或其片段包括包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列的重链序列和包含 SEQ ID NO:47 的氨基酸序列的轻链序列,所述抗体或其片段包括包含人 IgG4 (IGHG4)的 CH1、具有 S228P 取代的人 IgG4 (IGHG4)的铰链区和人 IgG4 (IGHG4)的 CH2 和 CH3 的同种型变体。已发现相比包含来自人 IgG1 (IGHG1,通常是天然的人 IgG1)的人重链恒定区的结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段(即,相比仅在修饰的重链恒定区不同于同种型变体的结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段),同种型变体没有表现出 Fc 介导的细胞毒作用机制,如 ADCC。

[0107] 本发明还提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,其包括人 IgG Fc 区,其中与人 IgG Fc 区连接的成熟核心碳水化合物结构缺少岩藻糖(在本文中可被可选的称为一无岩藻糖基化<sup>II</sup>)。优选的,抗体包括人 IgG1 (IGHG1)Fc 区,其中与人 IgG1 (IGHG1)Fc 区连接的成熟核心碳水化合物结构缺少岩藻糖。更优选是包括人 IgG1 (IGHG1)Fc 区的全长抗体,其中与人 IgG1(IGHG1)Fc 区连接的成熟核心碳水化合物结构缺少岩藻糖。从 W003/035835 已知,与人 IgG Fc 区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖可增强 ADCC。因而,在其它实施方案中,本发明的拮抗型抗体或其片段包括这样的人 IgG1 (IGHG1)Fc 区,其中与所述人 IgG1 (IGHG1)Fc 区连接的成熟核心糖类结构缺乏岩藻糖,而所述缺乏岩藻糖的抗体相比不缺乏岩藻糖的亲本人源化抗体或其片段表现出增强的 ADCC。产生缺乏岩藻糖的抗体的方法是例如(a)使用改造或突变的宿主细胞,所述宿主细胞是岩藻糖代谢缺陷的,使得其对其中表达的蛋白质岩藻糖基化能力降低(或不能岩藻糖基化);(b)在阻止或降低岩藻糖基化的条件下培养细胞;(c)翻译后去除岩藻糖(例如,使用岩藻糖苷酶);(d)翻译后添加理想的糖类,例如,在重组表达未糖基化的糖蛋白之后;或者(e)纯化糖蛋白,选择没有岩藻糖基化的产物。优选使用的是 W010/095031 的实施例 14 描述的方法,例如 Longmore 等人(1982) Carbohydr. Res. 365-92 或 Imai-Nishiya 等人,(2007),BMC Biotechnol. 7, 84 中描述的方法。

[0108] 本发明还提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其结合与包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变序列和 / 或包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变序列的抗体所识别的表位相同的表位。本发明还提供了人 OX40 的特定区域或表位,特别是人 OX40 受体胞外结构域的区域或表位,其被本发明提供的抗体结合,特别是被包括包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的重链可变序列和 / 或包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链可变序列的抗体结合。可以通过本领域已知的任何合适的表位定位方法,与本发明提供的任一种抗体结合,来鉴别人 OX40 多肽的这一特定区域或表位。这类方法的例子包括在源自 OX40 的具有不同长度的肽中筛选结合本发明抗体的最小片段,所述片段可以特异性结合含有被抗体识别的表位序列的抗体。可以合成或通过蛋白质水解消化 OX40 多肽,来生产 OX40 肽。可以通过例如质谱分析鉴别结合抗体的肽。在另一个实例中,可以使用 NMR 光谱或 X 射线晶体衍射鉴别被本发明的抗体结合的表位。在需要时,一经鉴别,可以使用结合本发明抗体的表位片段作为免疫原,获得结合相同表位的其他拮抗剂抗体。

[0109] 抗 OX40 抗体特性

[0110] 评估抗体针对例如人 OX40 的结合能力的标准测定是本领域已知的,包括例如 ELISA、**BIAcore®**、Western 印迹、RIA 和流式细胞仪分析。合适的测定详细描述在实施例中。也可以通过本领域已知的标准测定来评估抗体的结合动力学(例如,结合亲和力如  $K_D$ ),

例如 Scatchard 或 **Biacore®** 系统分析。可以通过本领域已知的标准竞争性测定来评估相对结合亲和力  $K_i$ 。

[0111] 在另一方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,以剂量依赖性的方式,比重组人源化抗体依法利珠单抗更高的程度阻断人混合型淋巴细胞反应 (MLR)。重组人源化抗体依法利珠单抗结合淋巴细胞功能相关抗原 1 的 CD11a 亚基。可以根据实施例 3 进行和测量 MLR。

[0112] 在另一方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段,其还能够识别食蟹猴 OX40。根据实施例 4,使拮抗型抗 OX40 抗体与人和食蟹猴外周血单核细胞 (PBMC) 结合并进行测量,且在图 3 中示出。发现抗体识别在人和食蟹猴的活化的淋巴细胞表面表达的 OX40,表示该抗体具有交叉反应特性。

[0113] 在另一方面,本发明提供了结合人 OX40,特别是分离形式的人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,如实施例 5 和 6 中详述的以及图 4 中示意的,其与被用作分析物的重组单价人 OX40 受体胞外结构域 (SEQ ID NO:11) 的亲和力 ( $K_D$ ) 为 500nM 或更低,优选 200nM 或更低,更优选 150nM 或更低,更优选 120nM 或更低,甚至更优选 110nM 或更低,例如通过 **BIAcore®** 仪器 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 对偶联蛋白 A 的 CM5 研究级传感芯片 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland ;BR-1000-14) 上捕获的抗体进行表面等离子共振 (SPR) 测量。本文使用的一单价  $\parallel$  涉及使用 OX40 受体的亲和力测量时,指人 OX40 受体结构域 (如胞外结构域),没有人为二聚化或如其原本应该的那样多聚化的,例如当结构域与免疫球蛋白 Fc 区氨基端融合时。在优选的方面,本发明提供了保留相应嵌合抗体的至少 75% 的 OX40 结合亲和力 (KD) 的人源化抗体或其片段。优选的,结合人 OX40 的人源化抗体或其片段与相应的嵌合抗体具有等价的亲和力。“等价的亲和力  $\parallel$  意指在相应嵌合抗体的 OX40 结合亲和力的  $\pm 10\%$  范围内的亲和力值。更优选的,本发明提供了具有比相应嵌合抗体更高的亲和力的结合人 OX40 的人源化抗体或其片段。在本发明的优选的方面,提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段,如实施例 5 和 6 中详述的以及图 4 中示意的,其与被用作分析物的重组单价人 OX40 受体胞外结构域 (SEQ ID NO:11) 的结合亲和力 ( $K_D$ ) 为 110nM 或更低,优选 100nM 或更低,更优选 90nM 或更低,更优选 80nM 或更低,甚至更优选 70nM 或更低,例如通过 **BIAcore®** 仪器 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 对偶联蛋白 A 的 CM5 研究级传感芯片 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland ;BR-1000-14) 上捕获的抗体进行表面等离子共振 (SPR) 测量。

[0114] 本发明的另一方面提供了具有良好热稳定性的结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段。在优选的实施方案中,结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体或其片段,具有热稳定温度大于 70°C,优选大于 75°C,更优选大于 80°C,甚至更优选大于 85°C 的 FAB 片段。为了分析 FAB 片段热稳定性,使用差异扫描量热法,在全长 IgG 中鉴别 FAB 片段的中点融解温度。这类量热测量法是本领域技术人员已知的,并可根据例如 Garber&Demarest (2007), BBRC, 355:751-7 进行,如实施例 6 中进一步描述的和图 6 所示。

[0115] 在另一方面,本发明描述了结合人 OX40 胞外区上的表位的拮抗型抗体或其片段。如实施例 7 所述和图 7 所示,在人和大鼠序列之间交换 OX40 胞外区的四个结构域中的一个或多个,并生成 Fc 融合蛋白。然后,实施结合 ELISA,测试拮抗型人源化抗体对人 OX40 胞外

区、大鼠 OX40 胞外区和四种人-大鼠嵌合蛋白的反应性。因而本发明提供了定位在人 OX40 胞外区的第二结构域中的拮抗型抗体或其片段。

[0116] 本发明还提供了可用于抑制免疫反应的拮抗型抗体或其片段。在用作自体反应性 T 细胞活化和增殖的体外模型(O' Flaherty E 等人, (2000) *Immunology*, 100 (3):289-99; DuPont B&Hansen JA(1976) *Adv. Immunol.* 23:107-202) 的 MLR (参见实施例 8) 中测试拮抗型人源化抗 OX40 抗体的效果。混合来自两个不相关供体的 PBMC, 导致激活 T 细胞和 T 淋巴细胞增殖。此外, 在该测定中测试 3 种不同的拮抗型人源化抗 OX40 抗体模式: IgG1 (IGHG1) 模式、无岩藻糖基化 IgG1 (IGHG1) 模式和 IgG4 (IGHG4) 模式, 进一步确定细胞毒作用机制(如 ADCC) 对 MLR 抑制的贡献。拮抗型人源化抗 OX40 抗体在 2 个不同的个体(应答者) 中都有效抑制了 MLR,  $EC_{50}$  值是约 100ng/mL。然而, 结果表现出依赖使用的抗体模式的差异。在第一个个体(应答者 1) 中, IgG1 (IGHG1) 和 IgG4 (IGHG4) 抗体模式有效的抑制了 T 细胞反应性, 表示对于这一个体, 细胞毒作用机制不是关键性的。对于第二个个体(应答者 2), IgG1 (IGHG1) 模式实现了超过 60% 的抑制, 而 IgG4 (IGHG4) 模式仅微弱的阻断了 MLR。在两个个体中, 无岩藻糖基化 IgG1 (IGHG1) 模式都非常有效的抑制 MLR。上述结果表明, 在一些个体中, 阻断 OX40 激活可以有效抑制 MLR, 且额外的细胞毒作用机制可以极大的增强该效果。因此, 对于治疗患 OX40 介导的病症的患者, 施用结合人 OX40 且具有增强的细胞毒作用机制的拮抗型抗体或其片段是特别有效的, 其中所述病症表现为不依赖于患者的 OX40 共刺激状态, 例如具有低 OX40 表达水平的患者。本发明的优选的实施方案提供了结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体, 用于治疗患 OX40 介导的病症的患者。此外, 患者可具有低的 OX40 表达水平。优选的, 结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体包括 IgG1 (IGHG1) 区。更优选的, 结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体包括无岩藻糖基化的 IgG1 区。

[0117] 在本发明的另一方面, 在异种移植物抗宿主反应中证实拮抗型抗体或其片段的效果, 其中用人 PBMC 重建 SCID 小鼠。该反应提供了用于在人类患者骨髓移植后观察到的同种异体移植物抗宿主病(GVHD) 的模型。在该模型中, 人 PBMC, 特别是 T 淋巴细胞, 对小鼠宿主细胞发动强烈的应答, 产生严重的炎症症状。如实施例 9 所述和图 9 及表 10 所示, 结合人 OX40 的拮抗型人源化抗体在 1mg/kg 剂量时强烈抑制 GVHD 反应。令人惊讶的是, 该抗体表现出比 **Enbrel®** 更好的效果, **Enbrel®** 是被认可的 GVHD 疗法(Xhaard A 等人, (2011) *Bull. Cancer*, 98 (8):889-99; Simpson D(2001) *Expert Opin. Pharmacother.* 2(7):1109-17)。因此, 在优选的实施方案中, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段, 其在治疗 GVHD 中是有效的。优选的, 向对象施用抗体导致存活中位数(天) 比施用载体时改善 4 倍。更优选的, 向对象施用抗体导致存活中位数(天) 比施用 **Enbrel®** 改善 2 倍。因此, 本发明提供了结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段, 其在治疗 GVHD 的患者和 / 或抑制 GVHD 时比 **Enbrel®** 更有效。此外, 已报道了激动型抗 OX40 结合抗体在同种异体小鼠 GVHD 模型(Valzasina B 等人, (2005) *Blood*, 105 (7):2845-51; Blazar BR 等人, (2003) *Blood*, 101 (9):3741-8) 中使 GVHD 恶化, 因此, 从实施例 9 可以概括: 本发明的拮抗型抗体及其片段在结合人 OX40 后不表现出激动效果, 因为在模型中没有观察到 GVHD 恶化。因此, 本发明提供了结合后不表现出激动活性的结合人 OX40 的人源化抗体或其片段。

[0118] 核酸、载体和宿主细胞



[0119] 本发明还提供了编码结合人 OX40 的抗体及其片段的分离的核酸、载体以及包含所述核酸或载体的宿主细胞。核酸可位于完整细胞中、细胞裂解液中或者以部分纯化的或基本纯化的形式。当通过标准技术,包括碱 /SDS 处理、CsCl 分带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域普遍已知的技术,与其他细胞组分或其他污染物(例如,其他的细胞核酸或蛋白质)纯化分离时,核酸是一分离的 || 或一使得基本纯的 ||,参见例如 F. Ausubel, 等人编著, (1987)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA,可以含有或不含有内含子序列。在优选的实施方案中,核酸是 cDNA 分子。

[0120] 可以使用标准的分子生物学技术获得本发明的核酸,例如可以通过标准的 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术,获得编码抗体的轻链和重链或者编码 VH 和 VL 区段的 cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),可以从文库回收编码抗体的一种或多种核酸。向宿主细胞中导入外源核酸的方法是本领域普遍已知的,并可随所使用的宿主细胞而变化。技术包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、聚乙烯亚胺介导的转染、聚凝胺(polybrene)介导的转染、原生质体融合、电穿孔、病毒或噬菌体感染、在脂质体中封装多核苷酸和直接显微注射 DNA 到核中。在哺乳动物细胞的情况下,转染可以是瞬时或稳定的。

[0121] 本发明的优选的核酸分子是编码选自 SEQ ID NO:32、33、34、35、36、37 和 38 的重链序列,和 / 或选自 SEQ ID NO:39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 和 49 的轻链序列的那些核酸分子。本发明的优选的核酸分子是编码选自 SEQ ID NO:29、58、59、77、78、79 和 80 的重链可变区,和 / 或选自 SEQ ID NO:30、60、81、82、83、84、85、86、87、88 和 89 的轻链可变区的那些核酸分子。

[0122] 本发明的优选的核酸分子是编码 SEQ ID NO:8 的轻链可变区,和 / 或 SEQ ID NO:7 的重链可变区的那些核酸分子;例如,包含 SEQ ID NO:9 的核酸序列的重链可变区编码 DNA,和 / 或包含 SEQ ID NO:10 的核酸序列的轻链可变区编码 DNA。本发明的更优选的核酸分子是编码 SEQ ID NO:58 或 59 的重链可变区,和 / 或 SEQ ID NO:60 的轻链可变区的那些核酸分子;例如,包含 SEQ ID NO:61 或 62 的核酸序列的重链可变区编码 DNA,和 / 或包含 SEQ ID NO:63 的核酸序列的轻链可变区编码 DNA 是最优选的。

[0123] 一旦获得编码 VH 和 VL 区段的 DNA 片段,则可以通过标准的重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因,或转化为对应于上文所述片段的片段基因,如 Fab 片段基因或转化为 scFv 基因。在这些操作中,将 VL 或 VH 编码 DNA 片段有效的连接至编码另一种蛋白质(例如抗体恒定区或柔性接头)的另一种 DNA 片段上。该上下文中使用的术语—有效连接 || 意指连接两个 DNA 片段,使得所述两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持读码框连续。通过将 VH 编码 DNA 与另一种编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的 DNA 分子有效连接,可以将编码 VH 区的分离的 DNA 转化为全长重链基因。这些人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如, Kabat, E. A. 等人,见上文),可以通过标准 PCR 扩增获得涵盖了这些区域的 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) 或 IgE (IGHE) 恒定区,但最优选是 IgG1 (IGHG1) 恒定区。对于 Fab 片段重链基因,可以将 VH 编码 DNA 与另一种只编码重链 CH1 恒定区的 DNA 分子有效连接。通过将

VL 编码 DNA 与另一种编码轻链恒定区 CL 的 DNA 分子有效连接,可以将编码 VL 区的分离的 DNA 转化为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。这些人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat, E. A. 等人,见上文),可以通过标准 PCR 扩增获得涵盖了这些区域的 DNA 片段。在优选的实施方案中,轻链恒定区可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区,优选  $\kappa$  恒定区。为了产生 scFv 基因,可以将 VH 和 VL 编码 DNA 片段与另一种编码柔性接头的片段有效连接,例如,编码氨基酸序列 (GIy4-Ser)<sub>3</sub> 的片段,使得 VH 和 VL 序列可以作为连续的单链蛋白质表达,其中 VL 和 VH 区通过柔性接头连接(参见例如,Bird 等人,(1988)Science242:423-426; Huston 等人,(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883;McCafferty 等人,(1990)Nature348:552-554)。已开发了各种技术生产抗体的抗体片段。传统上,这些片段源自完整抗体的蛋白质水解消化(参见例如,Morimoto K 等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117(1992);和 Brennan 等人,Science, 229:81-3(1985))。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接生产这些片段。例如,可以从上文讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可选的,可以从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段,并将其化学偶联形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段(Carter P 等人,Bio/Technology, 10:163-167(1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物中直接分离 F(ab')<sub>2</sub> 片段。生产抗体片段的其他技术对熟练的技术人员而言是显而易见的。在其他实施方案中,选定的抗体是单链 Fv 片段(scFv),参见例如 W01993/16185;美国专利号 5,571,894 和美国专利号 5,587,458。抗体片段还可以是一线性抗体 ||,例如美国专利号 5,641,870 所述。

[0124] 为了表达蛋白质,可以将编码本发明抗体的核酸整合到载体中,优选表达载体中。多种表达载体可用于蛋白质表达。表达载体可包括自我复制的染色体外载体,或整合到宿主基因组中的载体。构建的表达载体与宿主细胞类型是可相容的。因而,可用于本发明的载体(优选表达载体)包括但不限于使蛋白质能够在哺乳动物细胞、细菌、昆虫细胞、酵母和体外系统中表达的那些载体。如本领域已知的,多种表达载体是可商业或以其他方式获得的,可用于本发明中来表达抗体。

[0125] 表达载体通常包括与控制或调控序列、可选择的标志物、任何融合配偶体和 / 或其他元件有效连接的蛋白质。本文中,一有效连接 || 意指核酸置于与另一种核酸序列的功能性关联中。术语一调控序列 || 意在包括启动子、增强子和控制抗体链基因转录或翻译的其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述在例如 Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology185, Academic Press, San Diego, CA(1990)) 中。一般而言,这些表达载体包括与编码抗体的核酸有效连接的转录和翻译调控核酸,且通常对用于表达所述蛋白质的宿主细胞是恰当的。一般而言,转录和翻译调控序列可包括启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列,和增强子或激活子序列。还如本领域已知的,表达载体通常含有选择基因或标志物,允许选择含有表达载体的转化的宿主细胞。选择基因是本领域普遍已知的,可随使用的宿主细胞而变化。例如,通常可选择的标志物基因赋予已导入载体的宿主细胞对药物的抗性,例如 G418、潮霉素或氨甲喋呤。优选的可选择的标志物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于用氨甲喋呤选择 / 扩增的 dhfr- 宿主细胞中)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0126] 用于在克隆或表达本文载体中的 DNA 的合适的宿主细胞是原核细胞、酵母或更高等的真核细胞。用于该目的的合适的原核细胞包括真细菌,包括革兰氏阴性生物或革兰

氏阳性生物,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae)如埃希氏菌属(*Escherichia*)例如大肠杆菌、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷菌属(*Serratia*)例如粘质沙雷菌(*Serratia marcescans*),和志贺菌属(*Shigella*),以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)例如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)例如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。合适的大肠杆菌克隆宿主包括大肠杆菌 294 (ATCC31, 446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27, 325)。除原核细胞外,真核微生物例如丝状真菌或酵母是合适的克隆或表达宿主。在低等真核宿主微生物中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通的贝克酵母是最常用的。然而,多种其他属、种和菌株通常是可获得且有效的,例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,包括乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC12, 424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC16, 045)、威克克鲁维酵母(*K. wickerhamii*) (ATCC24, 178)、*K. Walth* (AJCC56, 500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosopmarum*) (ATCC36, 906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)或 *K. marxianus* yarrowia (EP402226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP183, 070);念珠菌属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesia* (EP244234));粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*)例如许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,包括链孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、*Tolyocladium* 或曲霉属(*Aspergillus*) 宿主例如构巢曲霉(*A. nidulans*) 或黑曲霉(*A. niger*)。

[0127] 用于表达本发明的人源化抗体的合适的宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括 *plaril* 和昆虫细胞。已鉴别了多种杆状病毒菌株和变体,与相应的许可昆虫宿主细胞,所述细胞来自宿主例如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。用于转染的多种病毒菌株是公众可获得的,例如苜蓿尺蛾(*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 菌株,此类病毒可特别用于转染草地贪夜蛾细胞。还可以利用棉花、谷物、土豆、大豆、碧冬茄属、西红柿和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0128] 用于表达本发明的重组抗体的宿主细胞优选的是哺乳动物宿主细胞,包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)(包括 dhfr-CHO 细胞,描述在 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中,与 DHFR 可选择标志物一起使用,例如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621 所述)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别的,为了与 NS0 骨髓瘤细胞一起使用,另一种优选的表达系统是 GS 基因表达系统,公开在 W087/04462 (Wilson)、W089/01036 (Bebbington) 和 EP338841 (Bebbington) 中。当将重组的抗体基因导入哺乳动物宿主细胞中时,通过培养宿主细胞一定时间来生产抗体,所述时间足以允许抗体在所述宿主细胞中的表达,或更优选的,允许抗体分泌到所述宿主细胞生长的培养基中。可以在多种培养基中培养用于生产结合人 OX40 的抗体的宿主细胞。可商购的培养基例如 Ham's F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、最低必需培养基(MEM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Basel, Switzerland)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM;Sigma-Aldrich Chemie GmbH)适合培养宿主细胞。可以使用标准的蛋白质纯化方法,从培养基中回收抗体。

[0129] 抗体可与融合配偶体有效连接,使得能够进行表达的蛋白质的靶向、纯化、筛选、展示等。融合配偶体可通过接头序列与抗体序列连接。接头序列一般包括少量氨基酸,通常少于10个,但也可以使用更长的接头。通常,选择柔性且抗降解的接头序列。对本领域技术人员显而易见的是,多种序列的任一种都可用作接头。例如,普通的接头序列包括氨基酸序列GGGGS。融合配偶体可以是靶向序列或信号序列,指导抗体和任何相关的融合配偶体到达所需要的细胞位置或胞外基质中。如本领域已知的,某些信号序列可以将蛋白质靶向分泌到生长基质中,或位于细胞的内膜和外膜之间的周质空间中。融合配偶体还可以是编码使得能够纯化和/或筛选的肽或蛋白质的序列。此类融合配偶体包括但不限于多聚组氨酸标签(His-tag)(例如H6和H10或其它与固定化金属亲和层析(IMAC)系统一起使用的标签(例如,Ni<sup>2+</sup>亲和柱)、GST融合物、MBP融合物、Strep-标签、细菌酶BirA的BSP生物素化靶序列,和由抗体靶向的表位标签(例如c-myc标签、flag标签等)。对本领域技术人员显而易见的是,此类标签可用于纯化、筛选或两者。

[0130] 构建和生产抗体

[0131] 通过使用普遍已知的和常规的操作规程免疫动物,获得针对OX40多肽生成的抗体,即,向动物,优选非人动物施用多肽,参见例如实验免疫学手册(Weir DM(编著),第4卷,Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)。可以免疫多种暖血动物,如兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪。然而,小鼠、兔、猪和大鼠通常是最合适的,特别是小鼠。可以通过技术人员已知的重组DNA技术生产抗体。此外,可以通过酶促或化学切割天然存在的抗体,来生产抗体。可以通过将来自非人动物(例如小鼠)的VH和/或VL区的一个或多个CDR或其部分转移至人VH和/或VL区的一个或多个框架区上,来构建本发明的人源化抗体。任选的,当减少抗体的免疫原性和/或维持结合亲和力需要或理想时,可以用相应的非人(例如小鼠)残基替换位于VH和/或VL区中的人框架残基。任选的,可以用人残基替换位于CDR中的非人氨基酸残基。可以基于如上所述制备的非人单克隆抗体的序列,来制备本发明的嵌合或人源化抗体。可以从目的非人杂交瘤中获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA,并使用标准的分子生物学技术将其改造为含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(参见例如,Cabilly等人的美国专利号4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入到人框架中(参见例如,Winter的美国专利号5,225,539,和Queen等人的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0132] 可以构建本发明的人源化抗体,其中基于在潜在的受体分子可变区和鼠抗体重链可变区之间的同源性的考虑,来选择重链可变区的人受体分子。种系候选人受体分子优选是降低潜在的免疫原性的。种系数据库由读取时穿过重链FW3区的末端且部分至CDR3序列的抗体序列构成。为了选择FW4区,可以搜索源自选定的种系分子的成熟抗体序列数据库,或使用源自人类供体的选定的种系分子的抗体序列。人受体分子优选选自与鼠供体分子相同的重链类型,而且是与鼠供体分子的可变区相同的规范结构类型。针对重链可变区选择人受体分子的次要考虑是规避鼠供体分子和人受体分子之间在CDR长度上的同源性。优选通过搜索V-BASE数据库的同源性,来选择人受体抗体分子,但也可以使用其他数据库

如 Kabat 和公开的 NCBI 数据库。

[0133] 可以构建本发明的人源化抗体,其中基于在潜在的受体分子可变区和鼠抗体轻链可变区之间的同源性的考虑,来选择轻链可变区的人受体分子。种系候选人受体分子优选是降低潜在的免疫原性的。种系数据库由读取时穿过重链 FW3 区的末端且部分至 CDR3 序列的抗体序列构成。为了选择 FW4 区,可以搜索源自选定的种系分子的成熟抗体数据库,或使用源自人类供体的选定的种系分子的抗体序列。人受体分子优选选自与鼠供体分子相同的轻链类型,且是与小鼠供体分子的可变区相同的规范结构类型。针对轻链可变区选择人受体分子的次要考虑包括鼠供体分子和人受体分子之间在 CDR 长度上的同源性。优选通过 V-BASE 数据库的同源性搜索,来选择人受体抗体分子,但也可以使用其他数据库如 Kabat 和公开的 NCBI 数据库。人源化非人抗体的方法如本文所述,包括下文实施例 6。

[0134] 本发明提供了生产结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段的方法,包括培养包含分离的核酸(编码结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段)或包含含有分离的核酸(编码结合人 OX40 的拮抗型抗体或其片段)的载体的宿主细胞,使得核酸表达并生产抗体。优选分离所述抗体。可以使用上文所述的宿主细胞、核酸和载体。可以通过例如本领域普遍已知的(例如, Morrison, S. (1985) Science 229:1202)和上文进一步概述的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合,获得核酸表达。例如,为了表达抗体或其抗体片段,可以通过标准的分子生物学技术(例如使用表达目标抗体的杂交瘤的 PCR 扩增或 cDNA 克隆)获得编码部分或全长的轻链和重链 DNA,并可将所述 DNA 插入到载体中,例如表达载体。选择的表达载体和表达控制序列与所使用的表达宿主细胞是可相容的。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到分离的载体中,或更通常的,两种基因都插入到同一表达载体中。通过标准方法(例如,连接抗体基因片段和载体上互补的限制性位点,或者如果不存在限制性位点时平端连接)将抗体基因插入到表达载体中。通过将本文所述的抗体轻链和重链可变区插入到已编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得 VH 区段与载体内的 CH1 区段有效连接, VK 区段与载体内的 CL 区段有效连接,将其用来产生任何抗体同种型的全长抗体基因。

[0135] 抗 OX40 抗体的表征和纯化

[0136] 可以使用测量与人 OX40 的结合的测定,和 / 或测量阻断 OX40 与其配体 OX40L 结合的能力的测定,实施抗体筛选。结合测定的实例是 ELISA,特别是使用固定在平板上的人 OX40 和人 Fc 的融合蛋白,和应用缀合的二抗检测与融合蛋白结合的抗 OX40 抗体。阻断测定的例子是基于流式细胞的测定,测量对 OX40 配体融合蛋白与人 CD4 细胞上的 OX40 的结合的阻断。使用荧光标记的二抗,检测与细胞结合的 OX40 配体融合蛋白的量。该测定搜索由于上清液中的抗体阻断配体融合蛋白与 OX40 结合的信号降低。阻断测定的另一例子是通过测量胸苷整合,测量由包被在平板上的 OX40 配体融合蛋白介导的新生人 T 细胞共刺激的阻断。作为评估抗 OX40 抗体的功能活性(例如 T 细胞活化的降低)的测定,可以使用如实施例 3 和 8 所述的人混合淋巴细胞反应(MLR)。可以以本领域技术人员已知的多种方式分离或纯化本发明的抗体。标准的纯化方法包括层析技术,包括在大气压下进行离子交换层析、疏水相互作用层析、亲和层析、大小排阻层析或凝胶过滤层析,和反相层析,或使用系统例如 FPLC 和 HPLC 在高压下进行。纯化方法还包括电泳的、免疫学的、沉淀、透析和层析聚焦技术。超滤和透析过滤技术也可与蛋白质浓缩结合使用。为了纯化 OX40 抗体,可以在例如用于单克隆抗体纯化的转瓶中生长选定的宿主细胞。在用蛋白 A 琼脂糖

(Pharmacia, Piscataway, NJ)的亲亲和层析之前,可以过滤和浓缩上清液。可以通过凝胶电泳和高效液相层析检测洗脱的 IgG,以保证纯度。因而本发明的优选的抗体是结合人 OX40 的分离的和 / 或纯化的抗体。

#### [0137] 免疫缀合物

[0138] 在另一个方面,本发明提供了与治疗剂连接的结合人 OX40 的拮抗剂 OX40 抗体或其片段,所述治疗剂例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素。此类缀合物在本文中称为一免疫缀合物 II。包括一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为一免疫毒素 II。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞致命(例如杀死细胞)的任何试剂。实例包括紫杉醇(taxol)、细胞松弛素 B (cytochalasin B)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素 D (actinomycin D)、1-脱氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol),和嘌呤霉素(puromycin)及其类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢剂(例如,氨甲蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺(5-fluorouracil decarbazine))、烷化剂(例如,氮芥(mechlorethamine)、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BSNU) 和洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素 C (mitomycin C) 和顺式-二氯二胺铂(II) (cis-dichlorodiamine platinum(II) (DDP) 顺铂(cisplatin)、蒽环类(anthracyclines) (例如,柔红霉素(daunorubicin) (原道诺霉素(daunomycin) 和多柔比星(doxorubicin)、抗生素(例如,更生霉素(dactinomycin) (原放线菌素(actinomycin))、博来霉素(bleomycin)、光神霉素(mithramycin) 和安曲霉素(anthracycline) (AMC)) 和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱(vincristine) 和长春碱(vinblastine))。可以与本发明抗体连接的治疗性细胞毒素的其他实例包括多卡米星(duocarmycins)、加利车霉素(calicheamicins)、美坦辛(maytansines) 和 auristatins, 及其衍生物。加利车霉素抗体缀合物的实例是可商购的(**Mylotarg®**; American Home Products)。可以使用本领域可获得的接头技术连接本发明的抗体与细胞毒素。用于缀合细胞毒素与抗体的接头类型的实例包括但不限于胺类、硫醚、酯、二硫化物和含肽接头。可以选择例如对溶酶体区室内的低 pH 切割敏感的或对蛋白酶切割敏感的接头,所述蛋白酶例如在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶,如组织蛋白酶(例如,组织蛋白酶 B、C、D)。关于细胞毒素类型、接头类型和将治疗剂与抗体缀合的方法的进一步讨论,还参见 Saito, G 等人, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A 等人, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. 和 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P. D. 和 Springer, C. J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。本发明的抗体还可与放射性

同位素连接,产生细胞毒性的放射药物,也被称为放射性免疫缀合物。可与用于诊断或治疗性抗体缀合的放射性同位素的实例包括但不限于:

[0139] 碘 131、铟 111、钇 90 和镱 177。本领域已建立了制备放射性免疫缀合物的方法。放射性免疫缀合物的实例是可商购的,包括 **Zevalin®** (EDEC Pharmaceuticals) 和 **Bexxar®** (Corixa Pharmaceuticals), 相似的方法可用于制备使用本发明抗体的放射性免疫缀合物。本发明的抗体免疫缀合物可用于修饰给定的生物学应答,而药物部分不被视为限制于经典化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有理想生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括例如酶促活性毒素,或其活性片段,例如相思豆毒蛋白 (abrin)、蓖麻毒蛋白 A (ricin A)、假单胞菌外毒素 (pseudomonas exotoxin) 或白喉毒素 (diphtheria toxin); 蛋白质例如肿瘤坏死因子或干扰素- $\gamma$ ; 或生物学应答修饰剂,例如淋巴因子、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、白介素-6 (IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 或其它生长因子。

[0140] 连接此类治疗剂与抗体的技术是普遍已知的,参见例如 Arnon 等人, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld 等人(编著),第 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (第 2 版), Robinson 等人(编著),第 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 等人(编著),第 475-506 页 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等人(编著),第 303-16 页 (Academic Press 1985) 和 Thorpe 等人, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

[0141] 在另一个方面,本发明提供了结合人 OX40 的拮抗剂 OX40 抗体或其片段,与治疗剂共同施用,例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素。

[0142] 药物组合物

[0143] 在另一个方面,本发明提供了组合物,例如药物组合物,其包括本发明的拮抗剂抗体或其片段和可药用载体。此类组合物可包括一种本发明的抗体和 / 或免疫缀合物或其组合(例如,两种或多种不同的抗体或免疫缀合物),和 / 或治疗剂,例如上述细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素。例如,本发明的药物组合物包括结合靶抗原的不同表位,或具有互补活性的抗体(或免疫缀合物)的组合。本发明的药物组合物还可以在组合疗法中施用,即与其它试剂组合。例如,组合疗法可包括与至少一种其它的抗炎剂或免疫抑制剂组合的本发明的拮抗剂 OX40 抗体。

[0144] 本文中使用的可药用载体包括任意的和所有的溶剂、分散基质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗的和延迟吸附的介质,以及诸如此类生理学相容的。优选的,载体是适合静脉内、肌内、皮下、不经肠道的、脊柱的或表皮施用的(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,活性化合物(即,抗体或免疫缀合物)可包被在材料中,保护所述化合物免受可能灭活所述化合物的酸和其它天然条件的作用。可药用载体包括无菌的含水溶液或分散液,和用于即时制备的无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。此类基质和介质用于药学活性物

质的用途是本领域已知的。除非是与所述活性化合物不相容的任何常规基质或介质,否则可考虑其在本发明的药物组合物中的用途。补充的活性化合物也可被掺入到所述组合物中。

[0145] 在另一个方面,本发明提供了包含免疫缀合物和可药用载体的组合物,所述免疫缀合物包括与治疗剂连接的结合人 OX40 的拮抗剂抗体或其片段。可如上文所述使用免疫缀合物和治疗剂。

[0146] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的拮抗剂抗体或其片段的组合物,所述拮抗剂抗体或其片段还包括另一种药学活性剂。优选的,另一种药学活性剂是:a)人 OX40 的另一种拮抗剂,b)镇痛剂和 c)免疫抑制剂中的一种或多种,例如糖皮质激素,如泼尼松。

[0147] 本发明的药物组合物还可包括可药用抗氧化剂。可药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如棕榈酰抗坏血酸酯(ascorbyl palmitate)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、棊酸丙酯、 $\alpha$ 生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。可用于本发明的药物组合物中的合适的含水和不含水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油例如橄榄油,和可注射的有机酯例如油酸乙酯。例如通过使用包被材料(如卵磷脂),通过维持所需的颗粒大小(分散体的情形下)和通过使用表面活性剂,可以维持恰当的流动性。这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过上文的灭菌程序和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂来确保防止存在微生物,所述抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、山梨酸苯酚(phenol sorbic acid)等。组合物中包括等渗剂也是理想的,例如糖、氯化钠等。此外,通过包括延迟吸附的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以产生可注射的药物形式的延长吸附。

[0148] 治疗和其他用途

[0149] 本发明的拮抗剂抗体具有多种体外和体内的诊断和治疗性用途,涉及 OX40 介导的病症的诊断和治疗。例如,可以在体外或离体条件下,将这些分子施用给培养的细胞,或例如在体内条件下,施用给人类对象,来治疗、预防和诊断多种 OX40 介导的病症。优选的对象是人,包括患 OX40 活性介导的病症(OX40 介导的病症)的患者。本发明的拮抗剂抗体可有效用于治疗不依赖于其 OX40 共刺激状态的患者。更优选的对象是人类,包括表达低 OX40 水平的患者。

[0150] 出于本发明的目的,一患者 || 包括人和其他动物,优选哺乳动物和最优选人。因而,本发明的抗体同时具有人类治疗和兽医应用。本发明中的术语一治疗 || 意在包括对疾病或病症的治疗性治疗,以及预防性或抑制性的手段。因而,例如,在疾病发动前成功的施用抗体,导致疾病的治疗。作为另一个实例,在疾病的临床表征后成功的施用抗体,来抗争疾病的症状,包括疾病的治疗。一治疗 || 还涵盖了在疾病出现后,为了消除所述疾病而施用抗体。在发动后或出现临床症状后成功的施用抗体,伴随临床症状的可能的减轻以及也许疾病的缓解,包括了疾病的治疗。上述一需要治疗的 || 包括已患所述疾病或病症的,以及倾向于患所述疾病或病症的哺乳动物,包括要被预防疾病或病症的那些。

[0151] 在特定的实施方案中,拮抗剂抗体在体内用于治疗、预防或诊断多种 OX40 介导的疾病。因而,本发明提供了在对象中治疗 OX40 介导的病症的方法,所述方法包括向对象



施用治疗有效量的拮抗型抗体或其片段。示例性的 OX40 介导的病症包括感染(病毒性、细菌性、真菌性和寄生虫性)、与感染相关的内毒性休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、盆腔炎症性疾病、阿兹海默病、炎性肠病、克氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泄(coeliac disease)、胆囊疾病、潜毛窦、腹膜炎、牛皮癣、脉管炎、术后粘连、中风、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎症病症,如多发性硬化、狼疮(例如系统性红斑狼疮)和格-巴二氏综合征(Guillain-Barré syndrome)、异位性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、Grave 氏病、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、Meniere 氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病(GVHD)、移植物排斥、心血管疾病,包括缺血性疾病,如心肌梗塞和动脉粥样硬化、血管内凝血(intravascular coagulation)、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少(hypochlorhydria)和视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)。

[0152] 其他示例性的 OX40 介导的病症包括感染(病毒性、细菌性、真菌性和寄生虫性)、与感染相关的内毒性休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、支气管炎、流感、呼吸道合胞病毒、肺炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF)、隐源性致纤维性肺泡炎(CFA)、原发性纤维性间质性肺炎(idiopathic fibrosing interstitial pneumonia)、肺气肿、盆腔炎症性疾病、阿兹海默病、炎性肠病、克氏病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泄、胆囊疾病、潜毛窦(Pilonidal disease)、腹膜炎、牛皮癣、脉管炎、术后粘连、中风、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢和外周神经系统的免疫介导的炎症病症,如多发性硬化、狼疮(例如系统性红斑狼疮)和格-巴二氏综合征(Guillain-Barré syndrome)、异位性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、Grave 氏病、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、Meniere 氏病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳氏肉芽肿(Wegener's granulomatosis)、胰腺炎、创伤(手术)、移植物抗宿主病(GVHD)、移植物排斥、心血管疾病,包括缺血性疾病,如心肌梗塞和动脉粥样硬化、血管内凝血(intravascular coagulation)、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)。

[0153] 用本发明的抗体治疗的优选的 OX40 介导的病症选自多发性硬化、类风湿性关节炎、结肠炎、牛皮癣、哮喘、COPD、IPF、移植物抗宿主病(GVHD)、动脉粥样硬化和糖尿病。用本发明的抗体治疗的特别优选的 OX40 介导的病症是移植物抗宿主病(GVHD)。

[0154] 本发明还提供了用于治疗疼痛、特别是与炎症相关的疼痛的抗体。

[0155] 在一个实施方案中,本发明的抗体可用于检测 OX40 的水平,或在其膜表面含有 OX40 的细胞的水平,所述水平之后可与某些疾病症状关联。可选的,抗体可用于抑制或阻断 OX40 功能,其反过来可与某些疾病症状的预防或缓解相关,从而提示 OX40 作为疾病的介质。这可以通过在允许抗体和 OX40 之间形成复合体的条件下,将样品和对照样品与 OX40 抗体接触来实现。在样品和对照中检测在抗体和 OX40 之间形成的任何复合体并比较。根据本发明抗体与 OX40 的特异性结合,本发明抗体可用于特异性检测细胞表面表达的 OX40 表达,例如可用于检测具有低 OX40 表达水平的患者。本发明的抗体还可用于通过免疫亲和纯化来纯化 OX40。

[0156] 因而本发明还提供了用于检测具有低 OX40 表达水平的患者的体外筛选方法,包

括步骤：

[0157] (a) 从患者血样中纯化外周血单核细胞(PBMC)；

[0158] (b) 将 PBMC 进行流式细胞仪分析；和

[0159] (c) 确定 CD4<sup>+</sup> 和 / 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞中的 OX40 阳性细胞数, 并将其与对照水平比较。

[0160] 在优选的实施方案中, 通过与对照水平相比时, OX40 阳性细胞中的表达水平增加至多 10%, 更优选至多 20%, 甚至更优选至多 30%, 表示低的 OX40 表达水平。Kotani A 等人, (2001)Blood, 98:3162-4 和 Xiaoyan Z 等人, (2005)Clin. Exp. Immunol. 143:110-6. 中进一步详细描述了确定 OX40 表达的方法。

[0161] 在另一个实施方案中, 可以初步测试本发明抗体与治疗或体外诊断用途相关的结合活性。例如, 可以使用流式细胞仪测定, 来测试本发明的组合物。

[0162] 本发明还提供了使用拮抗剂抗体或其片段作为药物的用途, 和拮抗剂抗体或其片段在制备用于治疗 OX40 介导的病症的药物中的用途。在其他实施方案中, 本发明提供了拮抗剂抗体或其片段, 其用作为药物。本发明还提供了拮抗剂抗体或其片段, 用在治疗 OX40 介导的病症的方法中。OX40 介导的病症如上文所述。本发明的拮抗剂抗体特别可用于治疗不依赖于患者的 OX40 共刺激状态的 OX40 介导的病症。在优选的实施方案中, 拮抗剂抗体或其片段可用于在表达低水平 OX40 的患者中治疗 OX40 介导的病症。

[0163] 如前所述, 本发明的拮抗剂 OX40 抗体可以和一种或其它多种治疗剂共同施用, 例如细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂。抗体可以与药剂连接(作为如上所述免疫复合物)或者可以与药剂分别施用。在后一种情况下(分别施用), 可以在药剂之前、之后或同时施用抗体, 或者可以与其它已知的疗法共同施用抗体, 所述疗法例如抗癌疗法, 例如放射。

[0164] 对于施用抗体, 剂量范围为宿主体重的从约 0.0001 至 100mg/kg, 更常见从 0.01 至 10mg/kg。示例性的治疗方案需要每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 月一次或每 3 至 6 个月一次施用。通常在多种情况施用所述抗体。单次剂量之间的间隔可以是例如每周、每月、每三月或每年。间隔还可以是不规律的, 通过测量血液的抗体水平与患者中的靶抗原提示。在一些方法中, 调节剂量获得约 1-1000  $\mu$ g/ml 的血浆抗体浓度, 而在一些方法中, 约 25-300  $\mu$ g/ml。可选的, 可以以持续释放的制剂施用抗体, 在此情况下需要较低的施用频率。剂量和频率根据患者中的抗体的半衰期而变化。施用的剂量和频率可以根据所述治疗是预防性还是治疗性而改变。在预防性应用中, 在较长时间段中, 以相对较不频繁的间隔, 施用相对较低的剂量。一些患者在其余生中持续接受治疗。在治疗性应用中, 有时需要以相对较短的间隔施用相对较高的剂量, 直到降低或终止疾病的进展。

[0165] 活性成分的实际剂量(即, 本发明的药物组合物中的抗体)是可以改变的, 从而获得活性成分的这样的量, 对于特定的患者、组合物和施用模式, 所述量有效的实现理想的治疗响应, 而对患者没有毒性。选定的剂量水平取决于多种药物动力学因子, 包括所使用的本发明特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定抗体的排泄速率、治疗的持续时间、与所使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和 / 或材料、年龄、性别、体重、病况、健康状态和受治患者之前的药物史等本领域普遍已知的因素。

[0166] “治疗有效量 II 的本发明的抗 OX40 抗体优选导致疾病症状严重程度的减少、疾病无症状期的频率和持续期的增加, 和 / 或预防由于病痛导致的损伤或残疾。可以在预测人类功效的动物模型系统中评估化合物治疗 OX40 介导的病症的能力。可选的, 可以通过检验

化合物抑制细胞生长的能力,来评估组合物的该特性,可以通过熟练的技术人员已知的测定在体外测量此类抑制作用。本领域的普通技术人员将能够基于如下因素确定所述量,例如对象的尺寸、对象症状的严重程度,和所选定的特定组合物或施用途径。

[0167] 可以利用本领域已知的各种方法中的一种或多种,通过一种或多种施用途径,来施用本发明的抗体或组合物。如熟练的技术人员所理解的,施用的途径和/或方式将根据所需的结果而改变。优选的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱的或其它不经肠道的施用途径,例如通过注射或输注。更优选的施用途径是静脉内或皮下的。本文中使用的词组—不经肠道的施用||意指除肠和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、硬膜内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管的、皮下、表皮下、关节内(intraarticular)、囊下(subcapsular)、蛛网膜下(subarachnoid)、脊柱内(intraspinal)、硬膜外(epidural)和胸骨内的注射和输注。可选的,可以通过非不经肠道的途径施用本发明的抗体,例如局部的、表皮的或粘膜的施用途径,例如鼻内、口服、阴道的、经直肠的、舌下的或局部的。

[0168] 制品和试剂盒

[0169] 在本发明的另一个实施方案中,提供了用于治疗 OX40 介导的病症的、包括本发明的拮抗剂抗体或其片段、组合物或免疫缀合物的制品。制品可包括容器,和与容器相关联或在其上的标签或包装内置物。合适的容器包括例如瓶、管状瓶或注射器。可以用多种材料形成容器,例如玻璃或塑料。容器保留对治疗疾病有效的组合物,可具有无菌的入口(例如,容器可以是静脉内用溶液包或管状瓶,具有可被皮下注射针头穿刺的瓶塞)。组合物中的至少一种活性剂是本文所述的拮抗剂抗体。标签或包装内置物可指示所述组合物可用于治疗的选择的疾病,例如癌症。在一个实施方案中,标签或包装内置物可指示包括拮抗剂抗体的所述组合物可用于治疗 OX40 介导的病症。

[0170] 此外,制品可包括(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包括本文的拮抗剂抗体,和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包括拮抗剂抗体以外的治疗剂。本发明的这一实施方案中的制品可进一步包括包装内置物,其指示第一和第二组合物可组合的用于治疗 OX40 介导的疾病或病症。此类治疗剂可以是上述章节中描述的任何附属疗法(例如,血栓溶解剂、抗血小板剂、化疗剂、抗血管发生剂、抗激素化合物、保心药和/或哺乳动物免疫功能的调节剂,包括细胞因子)。可选的或额外的,制品可还包括包含可药用缓冲液的第二(或第三)容器,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸缓冲盐溶液、林格液(Ringer's solution)和葡萄糖溶液。还可包括其他对商业和用户观点而言理想的材料,包括其他的缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0171] 还落入本发明范围内的包括包含本发明的抗体、组合物或免疫缀合物和使用说明的试剂盒。试剂盒可进一步含有一种或多种其他试剂,例如免疫抑制剂、细胞毒性剂或放射毒性剂,或一种或多种其他的本发明的拮抗剂抗体(例如,结合 OX40 抗原中不同于第一拮抗剂抗体的表位的拮抗剂抗体,其具有补充活性)。

[0172] 不需进一步描述,可以相信本领域的普通技术人员可以利用上述说明和下列示例性实施例,制造和利用本发明的物质和实施要求保护的方法。下列工作实施例供促进本发明的实践所用,并非被视为对本发明其余内容的任何方式的限制。

## 实施例

[0173] 实施例 1:生成和筛选小鼠抗人 OX40 抗体

[0174] 为了生产重组人 OX40-Fc 蛋白,从 imaGenes 购买了人 TNFRSF4 的 cDNA (克隆编号:RZPDB737H0329D;Berlin,Germany)。使用该 cDNA 作为模板,PCR 扩增人 TNFRSF4 胞外结构域的 DNA 编码区(SEQID NO:11)。在分离的 PCR 反应中,通过 PCR 扩增人 IgG1 的 Fc 区(EU 位置 223-451),添加 5' GSGGG 接头和 3' SA-6xHis 接头和限制性位点用于克隆。然后,使用重叠延伸 PCR,用侧翼引物融合所得到的两种产物,添加限制性位点用于后续克隆入基于 Invitrogen 的质粒 pcDNA3.1(-) (Invitrogen AG,Basel,Switzerland,货号 V795-20) 的经修饰哺乳动物表达载体中,所述质粒含有人 CMV 启动子和美国专利 5924939 所述的 Ig 供体受体片段(第一内含子)、OriP 序列(Koons MD 等人,(2001)J Virol. 75(22):10582-92)、SV40 增强子和与胃泌素终止子融合的 SV40polyA,如 Kim D, 等人,(2003)Biotechnol. Prog. 19(5):1620-2 所述。该重组质粒允许在哺乳动物细胞中表达人 TNFRSF4 胞外结构域-Fc 融合蛋白,并通过人 TNFRSF4 蛋白的天然信号肽驱动分泌到细胞培养基中。为了生产重组蛋白质,使用 jetPEITM 转染试剂(Polyplus-transfection S. A.,Strasbourg,France;distributor:Brunschwig,Basel,Switzerland),将上述重组载体转染到适应悬浮的 HEK293 细胞(ATCC 编号 CRL1573)中。在 5 天后收集细胞培养上清液,并使用在 ÄKTA FPLC 系统(GE Healthcare Europe GmbH,Glattbrugg,Switzerland) 上操作的蛋白 A 亲和纯化柱(HiTrap Protein A 琼脂糖柱;GE Healthcare Europe GmbH,Glattbrugg,Switzerland) 进一步纯化。

[0175] 为了生产重组人 OX40-his 蛋白,通过 PCR 扩增人 TNFRSF4 的胞外区(SEQ ID NO:11),添加 3' GSG-6xHis 接头和限制性位点用于克隆。之后,将 PCR 产物克隆到上述修饰型 pcDNA3.1(-) 质粒中。该重组质粒允许在哺乳动物细胞中表达人 OX40-his 蛋白,通过人 TNFRSF4 的天然信号肽驱动分泌到细胞培养基中。为了生产蛋白质,使用 jetPEITM 转染试剂(Polyplus-transfection S. A.,Strasbourg,France;distributor:Brunschwig,Basel,Switzerland),将上述重组载体转染到适应悬浮的 HEK293 细胞(ATCC 编号 CRL1573)中。在转染 5 天后收集细胞培养上清液,并使用在 ÄKTA FPLC 系统(GE Healthcare Europe GmbH,Glattbrugg,Switzerland) 上操作的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和纯化柱(HiTrap Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖柱;GE Healthcare Europe GmbH,Glattbrugg,Switzerland) 纯化。通过 SDS-PAGE 判断,重组人 OX40-Fc 和 OX40-his 蛋白是 95% 纯的,并在使用前进一步交换缓冲液为磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0176] 将溶解在 PBS 中的重组人 OX40-Fc 蛋白与等体积的 Stimune 佐剂(Prionics,Switzerland,ref:7925000)混合,并制备乳状液。将乳状液转移到 0.5mL 胰岛素注射器(BD Pharmingen,Allschwil,Switzerland)中,并用 50 μg 乳化蛋白在后足垫、尾基部和颈部皮下免疫 BALB/c 动物(Harlan,Netherlands)。2 周后,用相同的抗原量和相同的注射途径重复免疫。

[0177] 使用包被了重组人 OX40-his 蛋白的平板,通过直接 ELISA 评估在免疫的小鼠血清中存在的循环型抗人 OX40 抗体。将一系列稀释度(1:10<sup>0</sup> 至 1:10<sup>9</sup>)的不同小鼠血清添加到平板中,并使用山羊抗小鼠 H+L 完整分子-HRP (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Buchs, Switzerland) 检测结合的抗体。在处死前 3 天,在表现出最佳抗人 OX40-IgG 血清滴度的动物中,用 50  $\mu$ g 不含佐剂的抗原进行最后一次皮下加强。

[0178] 使动物安乐死,收集腹股沟、腋下、手臂、腠和髁部的淋巴结,用 2 个 25G 针头,在 DNA 酶(Roche Diagnostics(Schweiz)AG, Rotkreuz, Switzerland) 和 胶原酶(Roche Diagnostics(Schweiz)AG, Rotkreuz, Switzerland) 溶液中分散淋巴结结构,制备单细胞悬浮液。用聚乙二醇 1500 (Roche Diagnostics(Schweiz)AG, Rotkreuz, Switzerland), 以比例 7:1 (融合配偶体与收获的淋巴结细胞) 融合单细胞悬浮液与骨髓瘤细胞系 X63AG8.653 (小鼠 BALB/c 骨髓瘤细胞系;ATCC 登录号:CRL1580;Kearney JF 等人,(1979) J. Immunol. 123(4):1548-1550)。将融合的细胞种植到含有小鼠巨噬细胞的 96 孔平底平板中,所述平板含有补充了 10% 胎牛血清(FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM- 谷氨酰胺、100U/ml (Biochrom AG, Germany) 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素(Biochrom AG, Germany)、10mM HEPES (Invitrogen AG, Basel, Switzerland)、50  $\mu$ M  $\beta$ - 巯基乙醇(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 和 1% 生长因子(Hybridokine, Interchim/Uptima, **Montluçon**, France)的 DMEM-10 培养基(Invitrogen AG, Basel, Switzerland)。

[0179] 通过 ELISA 从融合物中筛选约 800 个孔,寻找所存在的识别人 OX40 和阻断人 OX40L 与其受体结合的小鼠 IgG。扩展阳性细胞,并进行 2 轮亚克隆。收集细胞,克隆和测序重链和轻链。

[0180] 实施例 2:从杂交瘤细胞中克隆和测序抗 OX40 抗体的 VH 和 VL 链

[0181] 对于每个阳性的选定杂交瘤,制备总 RNA,逆转录成 cDNA,通过 PCR 分别扩增 VH 和 VL 基因。将这些 PCR 产物连接到拯救载体(pDrive 载体;QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland;货号 231124)中,允许对单个 PCR 产物 DNA 测序,确定选定杂交瘤的单克隆性或多克隆性。该载体允许在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 琼脂平板上进行蓝白选择(由于 LacZ  $\alpha$  - 肽对 X-gal 的降解,没有插入物的克隆是蓝色的)。从阳性(白色)细菌克隆制备重组质粒,并使用载体骨架特异性的标准 DNA 测序引物(M13rev、M13fwd、T7 或 SP6)测序。最终将 DNA 序列亚克隆到用于在哺乳动物细胞中重组表达目标抗体的表达载体中。

[0182] 分离 RNA

[0183] 根据生产商的操作规程,使用 QIAGEN 的 RNeasy Mini Kit (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland;货号 74106),从 2-10 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞中分离总 RNA;使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计(WITEC AG, Littau, Switzerland)定量样品。

[0184] 一步 RT-PCR

[0185] 将上述总 RNA 制品进一步逆转录成 cDNA,使用 2 个不同的简并引物的混合物,通过 PCR 扩增 VH 和 VL 片段,每种简并引物的混合物都允许回收小鼠免疫球蛋白重链可变片段和可变重链连接区的所有不同亚类,或回收所有的小鼠免疫球蛋白轻链  $\kappa$  可变片段和可变轻链  $\kappa$  连接区。用于逆转录和扩增的引物通过 Microsynth (Balgach, Switzerland) 合成,并 HPLC 纯化(表 1-4)。使用 QIAGEN 一步 RT-PCR 试剂盒(QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland;货号 210212)同时实施逆转录和 PCR 扩增。由于技术使用特定的引物,将每种 mRNA 样品重复处理 2 份,允许分别逆转录和扩增 VH 或

VL 片段。将 2  $\mu$ g 总 RNA 溶解在不含 RNA 酶的水中,至终体积 30  $\mu$ l,与 10  $\mu$ l 的 QIAGEN OneStep RT-PCR 缓冲液的 5x 储液、2  $\mu$ l 浓度为 10mM 的 dNTP 混合物,3  $\mu$ l 浓度为 10  $\mu$ M 的引物混合物和 2  $\mu$ l 的 QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 混合。然后将最终混合物放在 PCR 管中,并在 PCR 热循环仪(BioRad iCycler version4.006,Bio-Rad Laboratories AG,Reinach,Switzerland)中循环,循环使用下列设置:

[0186] 50°C,30min

[0187] 95°C,15min

[0188] 40 个循环:

[0189] 94°C,30sec

[0190] 55°C,30sec

[0191] 72°C,1min

[0192] 然后

[0193] 72°C,10min

[0194] 保持在 4°C

[0195] pDrive 克隆

[0196] 在 2% 琼脂糖凝胶上运行 PCR 产物。在 DNA 电泳后,从琼脂糖凝胶上切下目标片段 (~450bp),并使用 Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II 试剂盒 250(Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland;货号 740609.250)进一步抽提。为了 DNA 测序,将抽提的 PCR 产物克隆到上述拯救载体(pDrive 载体, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland;货号 231124)中,并转化到 E. coli TOP10 菌株(Invitrogen AG, Basel, Switzerland;货号 C404006)中。

[0197] Miniprep 抽提

[0198] 在 1.5ml 补充了 100  $\mu$ g/ml 青霉素的 Luria Bertani (LB) 培养基中,37°C (振荡 250RPM) 培养阳性克隆过夜,接种在 Macherey-Nagel Square-well Block 平板(Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland;货号 740488.24)上。第二天,使用 NucleoSpin Multi-8Plasmid 试剂盒(Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland;货号 740620.5),实施 DNA miniprep 抽提。

[0199] 测序和序列分析

[0200] 将样品送去 DNA 测序服务公司 Fasteris (Plan-les-Ouates, Switzerland),进行 DNA 测序。使用标准引物:M13rev、M13fwd、T7、SP6 (表 5)。为了分析 DNA 序列,使用 Clone Manager9 专业版(Scientific&Educational Software, NC, USA)和 BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, TA(1999)Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98)。

[0201] 克隆表达载体用于重组嵌合抗体表达

[0202] 为了在哺乳动物细胞中重组表达,使用基于装配的 PCR 方法,将分离的鼠 VH 和 VL 片段装配成嵌合免疫球蛋白。这些嵌合抗体由重链和轻链组成,在所述重链中,鼠重链可变结构域与人 IgG1 重链恒定结构域( $\gamma$ 1、铰链区、 $\gamma$ 2 和  $\gamma$ 3 区)融合,在所述轻链中,鼠轻链可变结构域与人  $\kappa$  恒定结构域(C $\kappa$ )融合。将 PCR 装配的鼠可变部分和人恒定部分克隆到修饰型哺乳动物表达载体中,所述载体是基于实施例 1 提及的 Invitrogen 的修饰型 pcDNA3.1(-) 载体,差别在于使用人免疫球蛋白轻链  $\kappa$  前导肽驱动蛋白质分泌。为了免疫球蛋白候选物的蛋白质生产,将等量的重链和轻链载体 DNA 共转染到适应悬浮的 HEK293 细

胞(ATCC 编号 CRL1573)中。在转染 5 天后收集细胞培养上清液,并使用在ÄKTA FPLC 系统上操作的蛋白 A 亲和纯化柱(HiTrap 蛋白 A 琼脂糖柱)(都来自 GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland)纯化。

[0203] 表 1:引物 Mix VH - 反向

[0204]

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC  
GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

[0205] 表 2:引物 Mix VH - 正向

[0206]

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT  
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT  
CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT  
CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

[0207] 表 3 :引物 Mix VL - 反向

[0208]

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC  
GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT  
GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC  
GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC  
GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

[0209] 表 4 :引物 Mix VL - 正向

[0210]



ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

[0211] 表 5 :测序引物

[0212]

M13-Fwd GTAAAACGACGGCCAGT

M13-Rev AACAGCTATGACCATG

T7 TAATACGACTCACTATAGG

SP6 GATTAGGTGACACTATAG

[0213] 实施例 3 :抗人 OX40 抗体的生物学表征

[0214] OX40- 特异性抗体检测 ELISA :

[0215] 通过直接 ELISA 确定杂交瘤和重组抗体候选者的抗体滴度、特异性和生产。简而言之,用 100  $\mu$  l 在 PBS 中 2  $\mu$  g/ml 的重组人 OX40-his 包被 96 孔微滴度板(Costar USA, distributor VWR AG, Nyon, Switzerland),OX40-his 蛋白的产生参见实施例 1。在 4 $^{\circ}$ C 孵育平板过夜,然后用 PBS2%BSA (牛血清白蛋白, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 在室温(RT)封闭 1 小时。去除封闭溶液,加入杂交瘤上清液或纯化的抗体。在 RT 孵育平板 30 分钟,然后用 PBS0.01%Tween-20(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 洗涤 9 次,加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗小鼠 H+L- 检测抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)。为了检测具有人 Fc 的重组嵌合抗体(参见实施例 2),使用 1:1000 稀释的 HRP 标记的兔抗人 IgG 抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 作为检测抗体。在室温(RT) 孵育平板 30 分钟,用 PBS0.01%Tween-20 洗涤 9 次,向平板加入 TMB 底物(Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland),通过 6 分钟后添加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。然后通过显微平板读板器读取 450nm 吸光值(Biotek, USA ;distributor:WITTEC AG, Littau, Switzerland)。图 1A 显示了嵌合 1D4 抗体和嵌合 2F8 抗体识别 OX40-his 包被的蛋白。

[0216] OX40L 阻断 ELISA :

[0217] 如下生成重组人 OX40 配体蛋白(OX40L):从 imaGenes (Berlin, Germany) 购买人 TNFSF4 的 cDNA (克隆名称 :IOH46203),用侧翼的限制性位点扩增人 TNFSF4 配体的胞外部分(氨基酸 51-183) (根据 Uniprot Q6FGS4 序列编号)。之后,将得到的在其 5' 涵盖 ASA 接头和 8-His tag 序列的 PCR 产物克隆到 Invitrogen 的修饰型 pREP4 载体版本(Invitrogen AG, Basel, Switzerland) 中,该载体携带了 CMV 启动子、牛生长激素多聚腺苷酸化,和驱动重组蛋白分泌的鼠 VJ2C 前导肽。为了生产重组蛋白质,使用 jetPEITM 转染试剂(Polyplus-transfection S. A., Strasbourg, France ;distributor:Brunschwig, Basel, Switzerland),将重组载体转染到适应悬浮的 HEK293 细胞(ATCC 编号 CRL1573)

中。在 5 天后收集细胞培养上清液,并使用在ÄKTA FPLC 系统(GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland)上操作的蛋白 A 亲和纯化柱(HiTrap 蛋白 A 琼脂糖柱 ;GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland)纯化。

[0218] 为了确定生成的抗 OX40 抗体是否可以阻断 OX40L 与 OX40 受体的结合,研发了阻断 ELISA。用 100  $\mu$  l 在 PBS 中 2  $\mu$  g/ml 的重组人 OX40-Fc(参见实施例 1),包被 96 孔微滴度板(Costar, USA ;distributor VWR AG, Nyon, Switzerland)。在 4 $^{\circ}$ C 孵育平板过夜,然后用 PBS2%BSA 在 RT 封闭 1 小时。去除封闭溶液,向平板加入杂交瘤上清液或纯化的抗体。5 分钟后,向每个孔加入 50  $\mu$  l 的 0.04mg/ml 生物素化的重组人 OX40L。在 RT 孵育平板 60 分钟,然后用 PBS0.01%Tween-20 洗涤 9 次,加入 1:2000 稀释的 HRP-链霉抗生物素(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)。在 RT 孵育平板 30 分钟,用 PBS0.01%Tween-20 洗涤 9 次,向平板加入 TMB 底物(Bio-rad LaboratoriesAG, Reinach, Switzerland),6 分钟后添加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。然后通过显微平板读板器读取 450nm 吸光值(Biotek, USA ;distributor: WITTECAG, Littau, Switzerland)。图 1B 显示了嵌合 1D4 抗体能够以剂量依赖性的方式阻断 OX40 和 OX40L 之间的相互作用,而嵌合 2F8 抗体不能阻断 OX40 和 OX40L 之间的相互作用。

[0219] 人混合淋巴细胞反应(MLR)

[0220] 将 2 个不同供体的血液收集到 3 个 10mL 以柠檬酸作为抗凝剂的 S-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) 中。使用 1 号供体的细胞作为效应子细胞,使用 2 号供体的细胞作为靶细胞。按生产商的说明,使用 50mL Blood-Sep-Filter 管(供应商: Brunschwig, Basel, Switzerland),纯化 2 个供体的 PBMC(外周血单核细胞)。用不含 FBS 的 Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria)培养基洗涤细胞 2 次。用 50  $\mu$  g/ml 丝裂霉素 C(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育靶细胞 30 分钟。用不含 FBS 的 RPMI 洗涤细胞 3 次,并按 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞 / mL 重悬在 RPMI, 其含 10%FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM L-谷氨酰胺(Lonza, Leuven, Belgium)、100U/ml 青霉素、100  $\mu$  g/ml 链霉素(Biochrom AG, Berlin, Germany) 中。在 96 孔 U 型底显微平板(TPP, Trasadingen, Switzerland) 中,按每个孔 100  $\mu$  l 的终体积分配 50' 000 个靶细胞和 80' 000 个效应子细胞。向孔内加入 100  $\mu$  l 抗体稀释液。平板在 5%CO<sub>2</sub> 温箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 7 天。在开始 MLR7 天后,用 0.5  $\mu$  Ci 的 <sup>3</sup>H 胸苷(Perkin Elmer)脉冲细胞。脉冲 18 小时后,收获细胞,并在 Wallac  $\beta$  计数器上定量整合的放射性。图 2 显示了嵌合 1D4 抗体能够以剂量依赖性的方式,比阳性对照更高层次的阻断 MLR。

[0221] 实施例 4 :流式细胞仪对抗人 OX40 抗体与人和其他动物的活化外周血单核细胞(PBMC)的结合

[0222] 人细胞

[0223] 从 La Chaux-de-Fonds, Switzerland 的血液收集中心(Centre deTransfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet29, CH-2300), 收集含有人白细胞的过滤器。通过用 60mL 含有 10U/mL liquemin (Drossapharm AG, Lucern, Switzerland) 的 PBS 反冲洗,从过滤器移出细胞。然后,按生产商的说明,用 50mL Blood-Sep-Filter 管(供应商: Brunschwig, Basel, Switzerland) 纯化 PBMC。用含 FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria) 的 Roswell Park Memorial

Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 培养基洗涤细胞 3 次。按  $3 \times 10^6$  细胞/mL 将细胞重悬在含 RPMI, 10%FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM Ultraglutarine (Lonza, Leuven, Belgium)、100U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素 (Biochrom AG, Berlin, Germany)、10  $\mu$ g/ml 植物凝聚素 (PHA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) + 100U/mL rHu IL-2 (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland) 的 24 孔板 (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中。48 小时后, 收集细胞, 并如下所述通过流式细胞仪分析。

[0224] 在 RPMI, 10%FBS 中培养 HPB-ALL 细胞 (T 急性淋巴细胞性白血病细胞系, 来自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)。将  $2 \times 10^5$  细胞分散在 96 孔 V 型底板 (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中, 在 1300rpm 离心 3 分钟; 丢弃上清液, 收集细胞, 并如下所述通过流式细胞仪分析。

[0225] 将如上制备的 PBMC 和 HPB-ALL 细胞重悬在 50  $\mu$ l 含有 5  $\mu$ g/mL 嵌合 1D4 抗体, 或 5  $\mu$ g/mL 恰当的同种型对照, 或 20  $\mu$ l PE 标记的商业抗人 OX40 抗体 (克隆 L106, BD Biosciences, Allschwil, Switzerland 的 FACS 缓冲液 (PBS, 2%FBS, 10%Versene (Invitrogen, USA)) 中。在冰上孵育细胞 30 分钟, 洗涤 2 次, 并重悬在 50  $\mu$ l FACS 缓冲液中。使用 1/200 稀释的抗人 IgG-藻红蛋白-PE (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) 检测嵌合 1D4 抗体和同种型对照抗体。在冰上孵育细胞 15 分钟, 洗涤 1 次, 重悬在 400  $\mu$ l FACS 缓冲液中, 并在 FACS 仪器上分析 (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Switzerland)。

[0226] 食蟹猴原代细胞

[0227] 将食蟹猴的全血 (获得自 Professor Eric Rouiller, Laboratory of Neurophysiology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland) 收集到柠檬酸试管 (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) 中。将 2mL PBS 与 3mL 血液混合, 并将混合物置于 10ml 的 85:15Ficoll:PBS 混合物 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland) 的顶层。在室温下不间断的离心样品 20 分钟。收集 PBMC 层, 用 PBS 洗涤 3 次。将细胞按  $3 \times 10^6$  细胞/mL 重悬在 Dulbecco's Modified Eagle 培养基 (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 中, 其含 10%FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、非必需氨基酸 (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、1mM 丙酮酸钠 (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM Ultraglutarine (Lonza, Belgium)、100U/ml 青霉素 (Biochrom AG, Germany)、100  $\mu$ g/ml 氯霉素 (Biochrom AG, Germany)。在 24 孔平板 (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中分配 1mL 细胞悬浮液, 并加入 10 $\mu$ g/ml PHA (PHA/M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、100U/mL rHu IL-2 (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland)。在 5%CO<sub>2</sub> 温箱中 37°C 孵育细胞 50 小时。收集活化的 PBMC, 并重悬在 PBS/2.5%FBS (FACS 缓冲液) 中。在 96 孔 V 型底平板中, 按 50  $\mu$ l FACS 缓冲液分配五万个细胞, 并向孔中加入 25  $\mu$ g/ml 的生物素化抗人 OX40 嵌合 1D4 抗体、或生物素化同种型对照抗体、或在绵羊中产生的生物素化商业抗人 OX40 (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland)。在冰上孵育样品 20 分钟, 然后用冰冷的 FACS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 然后在冰上用 1:20 稀释的链霉抗生物素-PE (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) 孵育细胞 15 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤细胞 1 次, 然后重悬

在 300  $\mu$ l 的 FACS 缓冲液中。向每个样品添加体积 2  $\mu$ l 的碘化丙啶(PI ;Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), 排除死细胞。通过流式细胞仪分析细胞(Cyan, Beckman Coulter International S. A., Nyon, Switzerland)。

[0228] 图 3A 和 3B 显示了嵌合 1D4 抗体能够识别分别在人和食蟹猴的活化淋巴细胞表面上表达的 OX40, 因而提供了对药物研发高度需要的交叉反应特性。

[0229] 实施例 5 :通过表面等离子共振(SPR)分析嵌合 1D4 抗体与人 OX40 受体胞外结构域的动力学结合亲和力和常数

[0230] 使用实施例 1 所述的重组氨基酸标记的人 OX40 受体胞外结构域作为分析物, 在蛋白 A 捕获的抗体上测量动力学结合亲和力和常数( $K_D$ )。在 BIAcore2000 (GE Healthcare-BIAcore, Uppsala, Sweden)上室温进行测量, 并用 BiaEvaluation 软件(BIAcore ;v4.1)分析。

[0231] 通过注射 35  $\mu$ l 的 1:1N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)/1- 乙基 -3-[3- 二甲基氨基丙基] 碳化二亚胺盐酸盐(EDC)溶液(v/v ;5  $\mu$ l/min 流速 ;流路 1 和 2), 激活 CM5 研究级传感芯片(GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland ;BR-1000-14)。将蛋白 A (ref. P7837 ;Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)在醋酸缓冲液 pH4.5 (GE, BR-1003-50 ;低于 pI 一个 pH 单位)中稀释为 50  $\mu$ g/ml 的终浓度, 之后通过在流路 1 和 2 注射 35  $\mu$ l (5  $\mu$ l/min), 将蛋白 A 固定在前述激活的 CM5 传感芯片上 ;这对应于约 1500 应答单位(RU)。然后, 通过注射 35  $\mu$ l 乙醇胺溶液(5  $\mu$ l/min), 将蛋白 A-CM5 传感芯片去活化。最后, 注射 2 次 10  $\mu$ l 甘氨酸溶液(GE, ref. BR-1003-54 ;10mM ;pH1.5), 释放未交联的蛋白 A 分子。

[0232] 在亲和力测量前, 通过用不同的流速向定量的蛋白 A 捕获的抗体上注射固定浓度的分析物(5、15、30、50、75  $\mu$ l/min ;2min), 实施质量传递限制试验。对不同流速的结合速率(on-rate)斜率分析表示了质量传递。

[0233] 为了测量亲和力, 在 HBS-EP 缓冲液(GE, ref. BR-1001-88 ;0.01MHepes, 0.15M NaCl, EDTA3mM, 0.005%Surfactant P20, pH7.4)中, 将储藏在 1x PBS 缓冲液中的嵌合 1D4 抗体稀释至 15nM 的终浓度。之后, 将 10  $\mu$ l 该稀释液注射在蛋白 A CM5 芯片的流路 2 (30  $\mu$ l/min)上, 达到 200-250RU。在这一捕获步骤后, 以 30  $\mu$ l/min 的流速, 在流路 1 和 2 (流路 1 用作参照)注射不同浓度(50nM 至 0.4  $\mu$ M)的重组氨基酸标记的人 OX40 受体胞外结构域。在每种结合事件后, 用甘氨酸缓冲液 pH1.5 注射 1min (10  $\mu$ l/min), 再生表面。

[0234] 测量值(传感图(sensorgram):fc2-fc1)与具有质量传递的 2:1 二价分析物模型最佳拟合。为了说明在每次开始测量时蛋白 A 捕获抗体的实验误差的原因, 在所有拟合中将  $R_{max}$  值设为局部。解离时间是至少 300-600 秒。实施重复测量 2 次, 包括 0 浓度样品作为参照。 $\chi^2$  值表示每个点的实验数据和参照数据之间的方差总和 ;而剩余的点表示在拟合的每个点的实验数据和参照数据之间的差异。 $\chi^2$  值和剩余值都用于评估实验数据和每个结合模型之间的拟合质量。

[0235] 用固定在蛋白 A 传感芯片上的捕获的嵌合 1D4 抗人 OX40 抗体重复测量 2 次, 以重组氨基酸标记的人 OX40 受体胞外结构域作为分析物。 $K_D$  值在 91 至 116nM 之间,  $\chi^2$  值 <1.25。

[0236] 实施例 6 :小鼠单克隆抗体 1D4 的人源化

[0237] 本文描述了人源化抗人 OX40 小鼠抗体 1D4, 包括人受体框架的选择、回复突变和

基本保留和 / 或改善人 CDR 移植受体框架结合特性的突变。

[0238] 设计改造的可变区

[0239] 使用同源性匹配来选择移植 1D4CDR 的人受体框架。可使用数据库(例如,人和小鼠免疫球蛋白基因座的种系可变基因的数据库(IMGT 数据库(the international ImMunoGeneTics information **system**®; Lefranc MP 等人, (1999)Nucleic Acids Res. 27(1):209-12;Ruiz M 等人, (2000)Nucleic Acids Res. 28(1):219-21;Lefranc MP (2001)Nucleic Acids Res. 29(1):207-9;Lefranc MP (2003)Nucleic Acids Res. 31(1):307-10;Lefranc MP 等人, (2005)Dev. Comp. Immunol. 29(3):185-203;Kaas Q 等人, (2007)Briefings in Functional Genomics&Proteomics, 6(4):253-64)或 VBASE2 (Retter I. 等人, 2005, Nucleic Acids Res., 33, Database issue D671-D674)或 Kabat 数据库(Johnson G. 等人, 2000, Nucleic Acids Res., 28, 第 214-218 页)或出版物(例如, Kabat 等人, 见上文))鉴别鼠重链和轻链 V 区所属的人亚族, 并确定用作受体分子的最适人种系框架。在这些用作受体的亚族中选择重链和轻链可变序列 (VH 和 VL) 可基于序列同源性和 / 或 CDR1 和 CDR2 区的结构匹配, 来帮助在移植后保留六个 CDR 的恰当的相对呈现。

[0240] 例如, IMGT 数据库的使用提示在 1D4 重链可变结构域框架和人重链可变结构域亚类 2 的成员之间的良好的同源性。对种系序列观察到了 CDR 和框架序列的最高同源性和同一性:IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19)、IGHV2-70\*01 (SEQ ID NO:20)、IGHV2-70\*13 (SEQ ID NO:21)、IGHV2-5\*09 (SEQ ID NO:22) 和 IGHV2-70\*11 (SEQ ID NO:23);其在达到 CDR3 的整个序列都具有高于 73% 的序列同一性, IGHV2-70\*10、IGHV2-70\*01 和 IGHV2-70\*13 具有 74% 序列同一性;而 IGHV2-5\*09 和 IGHV2-70\*11 分别具有 73.5% 和 73% 的序列同一性。

[0241] 使用同一方法, 1D4 轻链可变结构域序列表现出与人轻链可变结构域  $\kappa$  亚类 3 的成员的良好同源性。对种系序列观察到了 CDR 和框架序列的最高同源性和同一性:IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24) (65.3% 同一性)、IGKV1-39\*01 (SEQ ID NO:25) (64.9% 同一性)、IGKV1D-39\*01 (SEQ ID NO:26) (64.9% 同一性)、IGKV3-11\*02 (SEQ ID NO:27) (64.2% 同一性) 和 IGKV3-20\*01 (SEQ ID NO:28) (62.5% 同一性)。

[0242] 作为人源化过程的起点, 选择人 IGHV2-70\*10 (SEQ ID NO:19) 和 IGKV3-11\*01 (SEQ ID NO:24) 可变结构域作为 1D4CDR 的受体。由于在其框架一区中与 1D4 的优良同源性, 因此超过其他人重链可变结构域, 选择 IGHV2-70\*10。

[0243] 制备第一个人  $\gamma$  1 同种型的人源化抗体(见下文)。抗体涵盖了人-小鼠杂交重链可变结构域和人-小鼠杂交轻链可变结构域。杂交重链可变结构域是基于人重链可变结构域 IGHV2-70\*10 的, 其中种系 CDR1 和 2 分别被 1D4 重链 CDR1 和 2 替换。从上述 IMGT 检索中鉴别出与人受体框架最匹配的 JH 片段序列。得到的人-小鼠杂交重链可变序列(具有人 IGHV2-70\*10 框架区、1D4 小鼠 CDR 和与人受体最佳匹配的 JH)在本文中被称为重链可变结构域 VH1, 具有 SEQ ID NO:29。类似的, 用于该第一个人源化抗体候选物的人-小鼠杂交轻链可变结构域具有人 IGKV3-11\*01 框架区、1D4 小鼠 CDR 和与人受体最佳匹配的 JK, 在本文中被称为轻链可变结构域 VL1, 具有 SEQ ID NO:30。所述涵盖 VH1 和 VL1 的第一个人源化抗体在本文中被缩写为 VH1/VL1 抗体。

[0244] 生产第一个人源化抗体原型

[0245] 由 GENEART AG (Regensburg, Germany) 以 scFv 模式合成 VH1 和 VL1 的编码 DNA

序列(cDNA),从而允许单个 DNA 序列涵盖两个可变结构域(SEQ ID NO:31)。通过 PCR 从该 scFv 构建体重新得到单个可变结构域 cDNA,并使用 PCR 装配技术进一步在上游装配其相应的恒定结构域 cDNA 序列。最后,将完整的重链和轻链 cDNA 连接到独立的载体中,所述载体基于携带 CMV 启动子和牛生长激素多聚腺苷酸化信号的修饰型 pcDNA3.1 载体(Invitrogen, CA, USA)。轻链特异性载体通过使用 BamHI 和 BsiWI 限制性酶位点,将目标轻链可变结构域 cDNA 连接到  $\kappa$  轻链恒定结构域 cDNA 之前,允许表达人  $\kappa$  同种型轻链;同时使用 BamHI 和 SalI 限制性酶位点改造重链特异性载体,允许将目标重链可变结构域 cDNA 连接到编码人 IGHG1CH1、IGHG1 铰链区、IGHG1CH2 和 IGHG1CH3 恒定结构域的 cDNA 序列之前。在两个重链和轻链表达载体中,分泌是由含有 BamHI 位点的小鼠 VJ2C 前导肽驱动的。BsiWI 限制性酶位点位于  $\kappa$  恒定结构域中;而 SalI 限制性酶位点则可见于 IGHG1CH1 结构域中。

[0246] 通过使用聚乙稀亚胺(PEI, Sigma, Buchs, Switzerland),共转染等量的重链和轻链载体到适应悬浮的 HEK293-EBNA1 细胞(ATCC® 目录编号:CRL-10852)中,瞬时生产 VH1/VL1 抗体。通常,用含有 50  $\mu$ g 编码重链的表达载体和 50  $\mu$ g 编码轻链的表达载体的 DNA-PEI 混合物,转染 100ml 密度为 0.8-1.2 百万细胞/ml 的细胞悬浮液。当编码抗体基因的重组表达载体被导入宿主细胞中时,进一步培养细胞为期 4 至 5 天来生产抗体,以允许分泌到培养基(EX-CELL293, HEK293- 无血清培养基, Sigma, Buchs, Switzerland)中,所述培养基补充了 0.1% 普流罗尼酸(pluronic acid)、4mM 谷氨酰胺和 0.25  $\mu$ g/ml 遗传霉素。

[0247] 使用重组的蛋白 A 层流基质(GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland),从无细胞上清液中纯化 VH1/VL1 抗体,并在测定前缓冲液交换为磷酸缓冲盐溶液。如实施例 5 所述,通过 SPR 测量与人 OX40 的结合。

[0248] 经移植的人框架的回复突变

[0249] 由于从 1D4 小鼠抗体直接移植的 CDR 导致不与人 OX40 结合的候选物(表 6 和图 4),所以开始其中用鼠残基替换人残基的诱变。被称为回复突变的该过程是单克隆抗体人源化中最不可预测的程序。必需鉴别和选择小鼠抗体中需要保留的关键框架残基,从而在保留亲和力的同时使人源化抗体的潜在免疫原性最小化。表 7、表 8 和图 5 显示了在小鼠和人抗体框架间不同的残基(Kabat 编号)。可影响 CDR 构象或可变结构域间包装的残基是特别令人感兴趣的,因其可能对抗体亲和力具有最大影响。

[0250] 为了鉴别可影响大部分 CDR 构象和/或可变结构域间包装的残基,使用设为自动模式的结构同源性-建模服务器 SWISS-MODEL (Arnold K 等人, (2006) Bioinformatics, 22(2):195-201;http://swissmodel.expasy.org),计算可变结构域的 VH1-VL1 对的 3D 模型。模型分析允许基于位置对 CDR 区和/或重链-轻链可变结构域包装的推定影响,选择一小组位置。该小组位置由以下可变重链位置和下列可变轻链位置组成,可变重链位置:23、35b、48、50、60 和 62;下列可变轻链位置:1、33、34、46、47、54、56 和 71 (Kabat 编号)。除上述回复突变外,在一些候选物中缺失可见于 VH1/VL1 抗体中的轻链位置 Y31。

[0251] 使用标准诱变和上述方法,在 VH1/VL1 抗体序列中,制备基于重链和轻链取代的各种组合的其他人源化候选物。如实施例 5 所述,通过 SPR 测定人源化抗体候选物的结合亲和力。

[0252] 表 6 显示了基于上述单取代或取代组合的一些人源化抗体的产量和结合特性。在所显示的 28 个抗体中,9 个候选物没有表现出与人 OX40 的结合,另外的 9 个一组则具有弱至差的结合。根据 SPR,基于 VL9 的人源化抗体表现出与人 OX40 最一致至弱的结合。仅 2 个抗体——VH6/VL9 和 VH7/VL9 表现出与人 OX40 良好的结合。两种人源化抗体都在可变重链位置 23、35b、50、60 和 62,以及可变轻链位置 33、34、46、47 和 71 (Kabat 编号)上具有回复突变。除上述回复突变外,VH6/VL9 和 VH7/VL9 都受益于去除轻链位置 31。令人惊讶的是,H7/VL9 具有比 1D4 嵌合抗体和 VH6/VL9 变体更好的针对人 OX40 的亲合力。表 9 中概括了这些人源化抗体的结合亲合力。

[0253] 通过差异扫描量热法分析选定的人源化抗 OX40 抗体的热稳定性

[0254] 使用差异扫描量热法(DSC)测量人源化抗体的热稳定性。单克隆抗体融解曲线是其同种型的特征(Garber E&Demarest SJ(2007)Biochem. Biophys. Res. Commun. 355:751-7),然而,即使在全长 IgG 中,也可以轻易的鉴别 FAB 片段的中点融解温度。使用这类 FAB 部分的中点融解监控人源化候选物的单克隆稳定性。

[0255] 在 VP-DSC 差异扫描量热仪(MicroCal, Northampton, UK)上进行量热法测量。细胞体积是 0.128ml,加热速率是 200°C /h,过压保持在 65p. s. i.。所有抗体都使用 PBS(pH7.4)中 1mg/ml 的浓度。通过与含有相同缓冲液但省略了抗体的重复 2 次的样品比较,估计抗体的摩尔热容。使用标准的方法分析部分摩尔热容和融解曲线。在使用软件 Origin v7.0 中的 Non-Two State 模型进一步分析前,将热图进行基线校正和浓度归一化。

[0256] 人源化变体 VH6/VL9FAB 片段 76.3°C 表现出单相变(single transition),形状和幅度与协作解折叠一致,这一般是在紧密折叠的 FAB 片段中观察到的,表示改造过程对于保留 FAB 稳定性是成功的。总而言之,人源化变体表现出良好的热稳定性。

[0257] 表 6: 人源化抗人 OX40 抗体

[0258]

人源化 抗体变体 (IGHG1)	SEQ ID NOs	突变 VH/VL	瞬时 表达 (mg/l)	与人 OX40 结合
VH1/VL1	32, 39	N.A./N.A.	40	否
VH1/VL2	32, 40	N.A./L33M	21	否
VH1/VL3	32, 41	N.A./F71Y	17	否
VH2/VL1	33, 39	T23S/N.A.	13	否
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	否
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	否
VH3/VL1	34, 39	R50H/N.A.	23	否
VH3/VL2	34, 40	R50H/L33M	22	否
VH3/VL3	34, 41	R50H/F71Y	18	否
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	差
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/ Y31 缺失 -L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	弱
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	差
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	2	差
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	差
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	弱
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	0	N.D.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0.5	N.D.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-F71Y	14	N.D.

[0259] 表 6(续): 人源化抗人 OX40 抗体



[0260]

人源化抗体 变体 (IGHG1)	SEQ ID NOs	突变 VH/VL	瞬时 表达 (mg/l)	与人 OX40 结合
VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-F71Y	7	N.D.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3.5	良好
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M -R54L-T56S-F71Y	0.5	N.D.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5.5	N.D.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-F71Y	1.5	弱
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-F71Y	10	弱
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	良好
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 缺失 -L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11.5	弱 / 良好

[0261] 表 7: 比较 1D4 和人受体重链可变 IGHV2-70, 10 框架

Kabat 位置	1D4	移植 CDR 的 IGHV 2-70*10
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

[0262]

[0263] 表 8: 比较 1D4 和人受体轻链可变 IGKV3-11\*01 框架

[0264]

Kabat 位置	ID4	移植 CDR 的 IGKV 3-11*01
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

[0265] 表 9: 选定的人源化和嵌合抗 OX40 抗体的结合特征

[0266]

人源化变体	SEQ ID NOs	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (nM)
1D4 嵌合体	50, 51	$3.4 \times 10^4$	$3.08 \times 10^{-3}$	91
VH6/VL9	37, 47	$3.54 \times 10^4$	$3.56 \times 10^{-3}$	101
VH7/VL9	38, 47	$4.45 \times 10^4$	$3.12 \times 10^{-3}$	70

[0267] 实施例 7 :人源化抗 OX40 抗体的表位表征

[0268] 为了表征人源化抗 OX40 抗体的表位,使用多个人-大鼠 OX40 嵌合蛋白,绘制 VH6/VL9 抗体的人 OX40 胞外区的定义结构域。

[0269] 制备人-大鼠 OX40 嵌合蛋白和 ELISA

[0270] 根据实施例 1 所述方法,将大鼠和人-大鼠 OX40 蛋白配制成 Fc 融合蛋白。为了 ELISA,在高结合性 96 孔板(Coastar)上包被  $2 \mu\text{g/mL}$  在 PBS 中的 OX40 蛋白,4℃ 过夜。在用 VH6/VL9 抗体或同种型对照抗体孵育前,用 PBS2% 牛血清白蛋白(BSA)封闭平板。然后洗涤平板,并用山羊抗人 Ig F(ab')<sub>2</sub> 片段特异性-HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd,Newmarket,UK) 孵育。在洗涤后,用 TMB 底物(Bio-Rad Laboratories AG,Reinach,Switzerland) 孵育平板,揭示抗体结合。通过加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,在 Synergy HT2 分光光度计(Biotek,USA ;供应商 :WITTEC AG,Littau,Switzerland) 上读取 450nm 处的光密度(OD450nm)。

[0271] 结果

[0272] 不论其来源,OX40 胞外区分为 4 种结构模块,称为结构域 1、2、3 和 4 (Compaan DM&Hymowitz SG(2006)Structure, 14(8):1321-30)。通过交换人和大鼠序列之间的 4 个结构域的一个或多个,构建对应于人 OX40 的胞外区的嵌合 OX40 蛋白(人 TNFRSF4 的氨基酸 29-214,根据 Uniprot P43489 序列编号)。例如,嵌合 RHRR OX40 蛋白对应于大鼠 OX40 胞外区,其中第二结构域被相应的人结构域序列替换。

[0273] 实施结合 ELISA,测试 VH6/VL9 抗体对人 OX40 胞外区(缩写为 HHHH,SEQ ID NO:11)、大鼠 OX40 胞外区(缩写为 RRRR,SEQ ID NO:52)和四种人-大鼠嵌合蛋白:RHRR (SEQ ID NO:53)、HRRR (SEQ ID NO:54)、HHRR (SEQ ID NO:55)和 RRHH (SEQ ID NO:56) 的反应性。图 7 显示了该 ELISA 的结果。作为该表位定位实验的先决条件,VH6/VL9 抗体显示出与人 OX40 蛋白而不与大鼠 OX40 蛋白结合,表示与大鼠 OX40 没有交叉反应。发现 VH6/VL9 抗体结合 RHRR 和 HHRR,而不结合 HRRR 或 RRHH,表示 VH6/VL9 表位定位在人 OX40 胞外区的第二结构域中。

[0274] 实施例 8 :VH6/VL9 抗体通过杀死和阻断机制阻断人混合淋巴细胞反应

[0275] 在单边同种异体混合淋巴细胞反应(MLR)中,测试 VH6/VL9 抗体抑制体外免疫反应的效力。MLR 是同种反应性 T 细胞活化和增殖的体外模型(O'Flaherty E 等人,(2000) Immunology, 100(3):289-99 ;DuPont B&Hansen JA(1976)Adv. Immunol. 23:107-202)。当混合来自 2 个不相关供体的外周血单核细胞(PBMC)时,T 细胞通过识别同种异体主要组织相容性(MHC)分子而激活。该活化导致 T 淋巴细胞增殖。MLR 反应广泛用于证实 T 细胞靶向的免疫抑制药物的效果(Bromelow KV 等人,(2001)J. Immunol. Methods, 247(1-2):1-8)。

免疫抑制药物(如环孢霉素)主要通过抑制 T 细胞激活而发挥作用。除了测试 VH6/VL9 抗体的阻断效应外,还研究了细胞毒作用机制(如抗体依赖性细胞毒作用(ADCC))对 MLR 抑制的作用。该测定中试验了 VH6/VL9 抗体的 3 种不同的抗体模式:IGHG1 模式(在本文中被称为 VH6/VL9)、无岩藻糖基化的 IGHG1 (IgG1) 模式(在本文中被称为无岩藻糖基化的 VH6/VL9)和 IGHG4 (IgG4)模式(在本文中被称为 VH6/VL9IGHG4S228P)。已知 IGHG1 (IgG1)抗体胜任细胞毒作用机制,如 ADCC。已知由于对细胞毒性细胞(如天然杀伤细胞(NK 细胞))上表达的 Fc  $\gamma$  RIIIa 更高的亲和力,无岩藻糖基化的 IGHG1 抗体表现出增强的 ADCC 活性(Mizushima T 等人,(2011)Genes Cells, 16(11):1071-80)。相反,已知 IGHG4 (IgG4) 抗体不具有这类 Fc-介导的细胞毒作用机制,如 ADCC。

#### [0276] VH6/VL9 抗体的配制

[0277] 在实施例 6 中描述的重链特异性载体中,用编码 IGHG4CH1、具有 S228P 取代的 IGHG4 铰链区、IGHG4CH2 和 IGHG4CH3 恒定结构域的 cDNA 序列,替换编码 IGHG1CH1、IGHG1 铰链区、IGHG1CH2 和 IGHG1CH3 恒定结构域的 cDNA 序列,实现具有取代 S228P 的 IGHG4 免疫球蛋白配制。通过标准的 PCR 诱变技术,向人 IGHG4 重链 cDNA 模板中导入取代 S228P。得到的重链具有 SEQ ID NO:57。按 WO2010/095031 公开的实施例 14 描述的操作规程,生产无岩藻糖基化的 VH6/VL9IGHG1 抗体。

#### [0278] 混合淋巴细胞反应

[0279] 将 2 个不同的人类供体的血液收集到 3 个 10mL 以柠檬酸作为抗凝剂的 S-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) 中。按生产商的说明,使用 50mL Blood-Sep-Filter 管(供应商:Brunschwig, Basel, Switzerland),纯化 2 个人类供体的外周血单核细胞(PBMC)。用不含 FBS 的 Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 培养基洗涤细胞 2 次。用 50  $\mu$ g/ml 丝裂霉素 C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) 在 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟制备 2 个供体的刺激子细胞。然后,用不含 FBS 的 RPMI 洗涤细胞 3 次,并按  $1 \times 10^6$  细胞/mL 重悬在 RPMI 中,其含 10%FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM L-谷氨酰胺(Lonza, Leuven, Belgium)、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素(Biochrom AG, Berlin, Germany)。在 96 孔 U 型底显微平板(TPP, Trasadingen, Switzerland)中,将应答者细胞重悬在 RPMI, 10%FBS、L-谷氨酰胺、100U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素中。按每个孔 100  $\mu$ l 的终体积分配 50'000 个刺激子细胞和 80'000 个应答者细胞。向孔内加入 100  $\mu$ l 抗体稀释液(或仅培养基)。平板在 5%CO<sub>2</sub> 温箱中 37  $^{\circ}$ C 孵育 7 天。在最后 18 个小时中,用 0.5  $\mu$ Ci 的 3H 胸苷(Perkin Elmer, Basel Switzerland)脉冲细胞。在滤网式(filtermat)过滤器(Perkin Elmer)上收获细胞,并在 Wallac  $\beta$  计数器(Perkin Elmer)上定量整合的放射性。

#### [0280] 结果

[0281] 图 8 显示的结果证实了 VH6/VL9 抗体能够有效抑制 2 个不同个体(应答者)的 MLR, EC<sub>50</sub> 值约 100ng/mL。结果还显示了依赖于所使用的抗体模式的不同的应答,在不同个体的 MLR 中观察到了阻断和细胞毒作用机制贡献的差异。

[0282] IGHG1 和 IGHG4 模式有效抑制了应答者 1 (图 8A)的 T 细胞反应性,表示细胞毒作用机制对应答者 1 不是关键的。相反,IGHG4 模式仅能够在高浓度时不良阻断应答者 2 的

MLR(图 8B),而在较低浓度时非常快的丢失了其效力,而 IGHG1 模式能够实现大于 60% 的抑制,暗示对于应答者 2,杀伤机制对大部分的抑制效果负责。

[0283] 该作用模式的差异可能源自这样的事实,即,MLR 反应中的 T 细胞激活、增殖和存活是依赖于个体之间的 OX40 共刺激信号而改变的,取决于同种异体反应性的程度和其他可能的共刺激信号。对于较弱依赖于 OX40 来源的共刺激信号的个体,通过 ADCC 机制消除活化型 T 细胞是 VH6/VL9 的主要作用机制。

[0284] 令人惊讶的是,无岩藻糖基化的 IGHG1 模式在两个应答者中都表现出非常强的抑制 MLR 的能力。这一观察结果强调了这样的事实:即使阻断机制足以实现抑制 MLR,增加或增强杀伤机制也可以改善抗 OX40 抗体的抑制作用。当不论患者的 OX40 共刺激状态而治疗 OX40 介导的病症时,这类增强作用是特别有效的,例如当患者具有低的 OX40 表达水平时。

[0285] 实施例 9:VH6/VL9 抗体阻断异种移植物抗宿主病

[0286] 异种移植物抗宿主反应(GVH)是用于在人类患者在骨髓移植后观察到的同种异体移植物抗宿主病(GVHD)的模型。GVH 反应是由移植物免疫细胞介导的急性免疫应答,是同种异体或异种 MHC 识别导致的对宿主环境的攻击(Murphy WJ 等人,(1996)Semin. Immunol. 8(4):233-41)。T 淋巴细胞是 GVH 反应的主要效应子细胞。在基于用人 PBMC 重建的 SCID 小鼠的异种 GVHD 模型中试验 VH6/VL9 抗体的免疫抑制能力。在该模型中,人 PBMC,主要是 T 淋巴细胞对小鼠宿主细胞发动了强烈的应答。反应显著导致了严重的皮肤和肠道炎症,伴有减重。该模型的最相关的读出是动物的存活。

[0287] 方法

[0288] 在腹腔内用三千万个人 PBMC 重建前,亚致死的辐射动物(SCID 小鼠)。还通过每周 2 次注射 TM $\beta$ 1 抗体,耗尽小鼠的鼠 NK 细胞。自 PBMC 注射 2 天前开始,每周 5 次以连续剂量静脉内给予 VH6/VL9 抗体、**Enbrel®**或载体的治疗。用 10mg/kg 或 1mg/kg 的载体(PBS)或 VH6/VL9 抗体,或 8mg/kg 的**Enbrel®**(人 IgG1 的 Fc 组分与人可溶性 TNF 受体 2 融合的融合蛋白,Amgen-Pfizer)治疗动物。每周 3 次检查动物,并对 GVHD 症状评分,包括减重、腹泻、毛皮问题和一般行为。如果认为症状太严重,则基于伦理学方法处死动物。

[0289] 结果

[0290] 图 9 显示,即使在 1mg/kg 的较低剂量下,VH6/VL9 抗体也非常有效的抑制 GVHD 反应。令人惊讶的是,VH6/VL9 抗体展现出比**Enbrel®**改良的效果,**Enbrel®**是公认的人类 GVHD 疗法(Xhaard A 等人,(2011)Bull. Cancer, 98(8):889-99;Simpson D(2001)Expert Opin. Pharmacother. 2(7):1109-17)。用 1 或 10mg/kg 的 VH6/VL9 抗体治疗的动物的中位存活时间比载体治疗组长四倍(表 10),比**Enbrel®**长 2 倍。此外,这一结果强调 VH6/VL9 抗体不具有激动剂活性,因为已报道过在同种异体小鼠 GVHD 模型中,激动型抗 OX40 抗体使 GVHD 恶化(Valzasina B 等人,(2005)Blood, 105(7):2845-51;Blazar BR 等人,(2003)Blood, 101(9):3741-8),而本研究中没有观察到该事件。

[0291] 表 10:标注的治疗组的中位存活时间(天)

[0292]

治疗	载体	Enbrel®	1D4 (1mg/kg)	1D4 (10mg/kg)
存活中位数(天)	11.5	20.5	42	47.5

[0293] 载体 : 仅 PBS。1D4 : GBR830-1D4 抗体 ; **Enbrel®** 是临床产品

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 格兰马克药品股份有限公司

&lt;120&gt; 结合 OX40 的抗体及其用途

&lt;130&gt; 17741/US

&lt;150&gt; US 61/506, 491

&lt;151&gt; 2011-07-11

&lt;160&gt; 89

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠 (Mus musculus )

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ID4 的重链 CDR 1

&lt;400&gt; 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ID4 的重链 CDR 2

&lt;400&gt; 2

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys

1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;220&gt;

[0002]



<223> 1D4 的重链 CDR 3

<400> 3

Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 1D4 的轻链 CDR 1

<400> 4

Ser	Ser	Val	Ser	Tyr
1				5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 1D4 的轻链 CDR 2

<400> 5

Ala	Thr	Ser
1		

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 1D4 的轻链 CDR 3

<400> 6

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 7

[0003]

<211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> ID4 的重链可变区序列

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
           35                   40                   45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
       50                   55                   60

Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                   90                   95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
           100                   105                   110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
       115

<210> 8  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> ID4 的轻链可变区序列

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15

[0004]

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 9  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> 1D4 的重链可变区序列的 DNA 序列

<400> 9  
 caggtgacgc tgaaggagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60  
 acctgttctt tctctgggtt ttcactgagc acctctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120  
 cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180  
 tataacacag cctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggtc 240  
 ttctcaaga tgcceagtg ggacactaca gatactgcca catactactg tgctegaata 300  
 gactgggacg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 10  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> 1D4 的轻链可变区序列的 DNA 序列

[0005]

<400> 10  
 cagattgtac tgactcagtc tccagcaatc cigtctgeat ctcagggga gaaggtcaca 60  
 atgaettgca gggccagetc aagtgtaagt tacatgcaet ggtaccagca gaagccagga 120  
 tctccccca aacctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt cectgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tetctcacia teaacagagt ggaggetgaa 240  
 gatgetgcca ctattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacgtt oggtggaggc 300  
 accaagctgg agataaaa 318

<210> 11

<211> 186

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens )

<220>

<223> 人 OX40 胞外结构域(P43489 的氨基酸 29-214)

<400> 11

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

[0006]

	115	120	125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro			
130	135	140	
Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr			
145	150	155	160
Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr			
	165	170	175
Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala			
	180	185	
<210>	12		
<211>	277		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			
<223>	人 OX40 受体(P43489)		
<400>	12		
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			

[0007]

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	235 240
Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly		
245	250	255
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser		
260	265	270
Thr Leu Ala Lys Ile		
275		
<210> 13		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 小鼠		
<220>		
<223> ID4 的延伸的重链 CDR 1		
<400> 13		
Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp		
1	5	10
<210> 14		

[0008]

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> ID4 的延伸的重链 CDR 2  
 <400> 14

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 1                   5                   10                   15

Leu Lys Ser

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> ID4 的延伸的重链 CDR 3

<400> 15

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
 1                   5                   10

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> ID4 的延伸的轻链 CDR 1

<400> 16

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
 1                   5                   10

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>

[0009]

<223> ID4 的延伸的轻链 CDR 2  
<400> 17

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1                   5                   10

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<220>  
<223> ID4 的延伸的轻链 CDR 3  
  
<400> 18

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
1                   5

<210> 19  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 人

<220>  
<223> 人 IGHV2-70\*10

<400> 19

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                  20                   25                   30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
                  50                   55                   60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65                   70                   75                   80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                  85                   90                   95

[0010]



Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 20

<211> 115

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> 人 IGHV2-70\*01

<400> 20

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> 人

[0011]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人 IGHV2-70\*13

&lt;400&gt; 21

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人 IGHV2-5\*09

&lt;400&gt; 22

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

[0012]

35                                      40                                      45  
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Gly Pro Ser  
 50                                      55                                      60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                                      90                                      95  
 Cys Ala His Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100                                      105                                      110  
 Val Ser Ser  
 115  
 <210> 23  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <220>  
 <223> 人 IGHV2-70\*11  
 <400> 23  
 Arg Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                                      25                                      30  
 Gly Met Cys Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35                                      40                                      45  
 Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                                      55                                      60  
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                                      90                                      95  
 Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

[0013]

	100	105	110
Val Ser Ser			
	115		
<210>	24		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			
<223>	人 IGKV3-11*01		
<400>	24		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
I	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	25		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人		
<220>			
<223>	人 IGKV1-39*01		
<400>	25		

[0014]

### 序 列 表

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	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
		20						25						30	

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55						60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100						105		

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> 人 IGKVID-39\*01

<400> 26

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	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
		20						25						30	

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55						60			

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

[0015]

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

- <210> 27
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 人

- <220>
- <223> IGKV3-11\*02

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

- <210> 28
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> 人

- <220>
- <223> 人 IGKV3-20\*01

<400> 28

[0016]

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                   20                   25                   30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
           35                   40                   45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
           50                   55                   60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65                   70                   75                   80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
                   85                   90                   95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
           100                   105

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH1 重链可变结构域

<400> 29

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
           20                   25                   30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
           50                   55                   60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80

[0017]

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL1 轻链可变结构域

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 31

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工的

[0018]



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH1-VL1 scFv cDNA

&lt;400&gt; 31

caggtcacac tgaagagtc tggaccgcc ctggtaage ccaccagac actgaccctg 60  
 acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acaagegga tggcgtgtc ctggatcaga 120  
 cagcctcctg gcaaggcctt ggaatggatc gcccgattt gttgggacga cgacaagtac 180  
 tacagcacca gcctgaaaac ccggctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagggtg 240  
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccctgtg gacaccgcca ctactactg cgccagaate 300  
 gaetgggacg gcttcgcta ttggggccag ggaacctgg tcaccgtgtc tagcggagge 360  
 ggaggatctg gcggcggagg aagtggcgga ggggatctg agatcgtgct gacacagage 420  
 ccgccaccg tgtctctgag ccctggcga agagccacc tgagctgtag agccagcagc 480  
 agcgtgtcct actacctggc ctggatcag cagaagccg gccaggctcc ccgctgtctg 540  
 atctacgcca ccagcaatcg ggccacagge atccctgcca gattttctgg cagcggctcc 600  
 ggcaccgact tcacctgac catctccagc ctggaaccg aggacttgc cgtgtactac 660  
 tgcacagcgt ggtccageaa cccctggaca ttggccagg gcaccaagg ggaaatcaag 720

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH1 重链IGH1

&lt;400&gt; 32

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30  
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
                   35                   40                   45

[0019]

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

[0020]

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 33  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> VH2 重链 IGHG1  
 <400> 33  
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

[0021]

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[0022]

275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 34		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> VH3 重链 IGHG1		
<400> 34		
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln		
1	5	10
15		
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser		

[0023]

20	25	30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu 35	40	45
Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser 50	55	60
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val 65	70	75
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr 85	90	95
Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro 115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly 130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser 195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr 210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser 225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg 245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro 260	265	270

[0024]

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 35  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VH4 重链 IGHG1

<400> 35

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

[0025]

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

[0026]



Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 36  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VH5 重链 IGHC1

<400> 36

[0027]

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                    25                    30  
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
                   35                    40                    45  
 Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
                   50                    55                    60  
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                    70                    75                    80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                    90                    95  
 Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
                   115                    120                    125  
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
                   130                    135                    140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                   165                    170                    175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                   180                    185                    190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
                   195                    200                    205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                   210                    215                    220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                    230                    235                    240

[0028]

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 37  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VH6 重链 IGHG1

[0029]

&lt;400&gt; 37

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                    25                    30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
                   50                    55                    60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                    70                    75                    80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                    90                    95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
                   115                    120                    125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
                   130                    135                    140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                    150                    155                    160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                   165                    170                    175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                   180                    185                    190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
                   195                    200                    205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                   210                    215                    220

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

[0030]

225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435	440	445
<210>	38		
<211>	448		
<212>	PRT		
<213>	人工的		

[0031]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH7 重链 IGHG1

&lt;400&gt; 38

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
       50                   55                   60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                   90                   95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
           100                   105                   110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
           115                   120                   125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
       130                   135                   140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                   150                   155                   160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
           165                   170                   175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
           180                   185                   190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
       195                   200                   205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

[0032]

210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	260	265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	275	280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	290	295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	325	330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	355	360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	370	375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	405	410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	420	425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440 445

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 214

[0033]

<212> PRT  
 <213> 人工的  
  
 <220>  
 <223> VL1 轻链域  
  
 <400> 39  
  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
 20 25 30  
  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

[0034]



	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 40			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> VL2 轻链域			
<400> 40			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr			
	20	25	30
Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160

[0035]

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 4I

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL3 轻链域

<400> 4I

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

[0036]

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 42

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL4 轻链域

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
85 90 95

[0037]

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 43

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL5 轻链域

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

[0038]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL6 轻链域

<400> 44

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
20 25 30

[0039]

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 45  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> VL7 轻链域  
 <400> 45

[0040]

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                     20                      25                      30  
  
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
                     35                      40                      45  
  
 Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
                     50                      55                      60  
  
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65                      70                      75                      80  
  
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
                     85                      90                      95  
  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
                     100                      105                      110  
  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
                     115                      120                      125  
  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
                     130                      135                      140  
  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145                      150                      155                      160  
  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
                     165                      170                      175  
  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
                     180                      185                      190  
  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
                     195                      200                      205  
  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
                     210  
  
 <210> 46  
 <211> 213  
 <212> PRT

[0041]

<213> 人工的

<220>

<223> VL8 轻链域

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                  20                   25                   30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
                  35                   40                   45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
                  50                   55                   60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65                   70                   75                   80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
                  85                   90                   95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
                  100                   105                   110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
                  115                   120                   125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
                  130                   135                   140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145                   150                   155                   160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
                  165                   170                   175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
                  180                   185                   190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
                  195                   200                   205

[0042]



Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 47

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL9 轻链域

<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

[0043]

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 48

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL10 轻链域

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

[0044]

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 49

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL11 轻链域

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

[0045]

	100		105		110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr					
	115		120		125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys					
	130		135		140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu					
	145		150		155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser					
	165		170		175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala					
	180		185		190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe					
	195		200		205
Asn Arg Gly Glu Cys					
	210				
<210> 50					
<211> 448					
<212> PRT					
<213> 人工的					
<220>					
<223> ID4 嵌合体的重链					
<400> 50					
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser					
	20		25		30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu					
	35		40		45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala					
	50		55		60
Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val					

[0046]

65	70	75	80
Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr	85	90	95
Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	305	310	315
			320

[0047]

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 51  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 1D4 的嵌合体的轻链  
 <400> 51  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

[0048]

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 52  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus )  
 <220>  
 <223> 大鼠 OX40 胞外结构域  
 <400> 52  
 Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
 1 5 10 15  
 Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
 20 25 30

[0049]

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr  
35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn  
50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp  
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser  
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser  
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser  
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys  
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr  
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr  
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
180 185 190

<210> 53

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人-大鼠 OX40 胞外结构域嵌合 RHRR

<400> 53

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
20 25 30

[0050]



Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr  
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn  
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp  
65 70 75 80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser  
85 90 95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser  
100 105 110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser  
115 120 125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys  
130 135 140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr  
145 150 155 160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr  
165 170 175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
180 185 190

<210> 54

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人-大鼠 OX40 胞外结构域嵌合 RHHH

<400> 54

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
20 25 30

[0051]

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr  
35 40 45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn  
50 55 60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp  
65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys  
85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly  
100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys  
115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp  
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala  
145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln  
165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala  
180 185 190

<210> 55

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人-大鼠 OX40 胞外结构域嵌合 HHRR

<400> 55

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

[0052]

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly  
 85 90 95  
 Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn  
 100 105 110  
 Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile  
 115 120 125  
 Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser  
 130 135 140  
 Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro  
 165 170 175  
 Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
 180 185  
 <210> 56  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工的  
 <220>  
 <223> 人-大鼠 OX40 胞外结构域嵌合 RRHH  
 <400> 56  
 Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
 1 5 10 15  
 Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
 20 25 30

[0053]

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr  
 35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn  
 50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp  
 65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys  
 85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly  
 100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys  
 115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp  
 130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala  
 145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln  
 165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg  
 180 185

<210> 57

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH6 重链 IGHG4 S228P

<400> 57

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

[0054]

	20		25		30														
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu																			
	35		40		45														
Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala																			
	50		55		60														
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val																			
	65		70		75														80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr																			
			85		90														95
Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr																			
			100		105														110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro																			
	115		120		125														
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly																			
	130		135		140														
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn																			
	145		150		155														160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln																			
			165		170														175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser																			
	180		185		190														
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser																			
	195		200		205														
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys																			
	210		215		220														
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu																			
	225		230		235														240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu																			
			245		250														255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln																			
	260		265		270														

[0055]

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 58  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VH6 重链可变结构域

<400> 58

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

[0056]

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 59  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VH7 重链可变结构域

<400> 59

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

[0057]

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 60

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL9 轻链可变结构域

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 61

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工的

[0058]



<220>		
<223>	VH6 重链可变结构域 DNA 编码序列	
<400>	61	
	caggtcacac tgaagagtc tggaccgcc ctggtcaage ccaccagac actgaccctg	60
	acctgcagct tcagcggett cagcctgagc acaagcgga tggcggtggg ctggatcaga	120
	cagcctctg gcaagccct ggaatggatc gccatattt ggtgggatga tgataaatat	180
	tataacaccg cctgaaaac ccgctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg	240
	gtgtgacca tgaccaacat ggaccctg gacaccgcca ctactactg cgccagaate	300
	gaetgggacg gcttcgcta ttggggccag ggaacctgg tgacctgag cagc	354
<210>	62	
<211>	354	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	VH7 重链可变结构域 DNA 编码序列	
<400>	62	
	caggtcacac tgaagagtc tggaccgcc ctggtcaage ccaccagac actgaccctg	60
	acctgcagct tcagcggett cagcctgagc acaagcgga tggcggtggg ctggatcaga	120
	cagcctctg gcaagccct ggaatggctc gccacattt ggtgggatga tgataaatat	180
	tataacaccg cctgaaaac ccgctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccaggtg	240
	gtgtgacca tgaccaacat ggaccctg gacaccgcca ctactactg cgccagaate	300
	gaetgggacg gcttcgcta ttggggccag ggcacctgg tgacctgag cagc	354
<210>	63	
<211>	318	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	VL9 轻链可变结构域 DNA 编码序列	
<400>	63	

[0059]

gagatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc 60  
 ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120  
 caggcgccgc gcccggtggat ttatgcgacc agcaatcggg ccacaggeat ccctgccaga 180  
 ttttctggca ggggtccgg caccgactac accctgacca tctccagcct ggaaccgag 240  
 gacttcgccg tgtactactg ccagcagtgg tccagcaacc cctggacatt tggccagggc 300  
 accaaagtgg aaattaaa 318

<210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> VH6 的重链 CDR 1

<400> 64

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly  
 1                    5                    10

<210> 65  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> VH6 的重链 CDR 2

<400> 65

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys  
 1                    5

<210> 66  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> VH6 的重链 CDR 3

[0060]

<400> 66

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
1                          5                          10

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VL9 的轻链 CDR 1

<400> 67

Ser Ser Val Ser Tyr  
1                          5

<210> 68

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VL9 的轻链 CDR 2

<400> 68

Ala Thr Ser  
1

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VL9 的轻链 CDR 3

<400> 69

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
1                          5

<210> 70

<211> 13

[0061]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VH6 的延伸的重链 CDR 1

<400> 70

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp  
1                   5                   10

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH6 的延伸的重链 CDR 2

<400> 71

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
1                   5                   10                   15

Leu Lys Thr

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VH6 的延伸的重链 CDR 3

<400> 72

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
1                   5                   10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

[0062]

<223> VL9 的延伸的轻链 CDR 1

<400> 73

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
1                   5                   10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL9 的延伸的轻链 CDR 2

<400> 74

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr  
1                   5                   10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> VL9 的延伸的轻链 CDR 3

<400> 75

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
1                   5

<210> 76

<211> 44

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> 人 OX40 胞外结构域模块 2

<400> 76

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
1                   5                   10                   15

[0063]

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys  
 20 25 30

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
 35 40

<210> 77

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH2 重链可变结构域

<400> 77

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0064]

<223> VH3 重链可变结构域

<400> 78

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 79

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH4 重链可变结构域

<400> 79

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

[0065]

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 80

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VH5 重链可变结构域

<400> 80

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

[0066]



Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL2 轻链可变结构域

<400> 81

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
                  20                   25                   30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
          35                   40                   45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
          50                   55                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65                   70                   75                   80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
                  85                   90                   95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                  100                   105

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL3 轻链可变结构域

<400> 82

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0067]

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

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL4 轻链可变结构域

<400> 83

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

[0068]

	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
<210>	84		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	VL5 轻链可变结构域		
<400>	84		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	5	10	15
1			
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr	20	25	30
Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile	35	40	45
Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	65	70	75
			80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
<210>	85		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工的		
<220>			
<223>	VL6 轻链可变结构域		
<400>	85		

[0069]

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                           5                           10                           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Tyr  
                          20                           25                           30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
                   35                           40                           45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
           50                           55                           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                           70                           75                           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
                           85                           90                           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                  100                           105

<210> 86  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> VL7 轻链可变结构域

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                          20                           25                           30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
                   35                           40                           45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                           55                           60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65                           70                           75                           80

[0070]

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 87

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL8 轻链可变结构域

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL10 轻链可变结构域

<400> 88

[0071]

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 89

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> VL11 轻链可变结构域

<400> 89

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65 70 75 80

[0072]

---

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

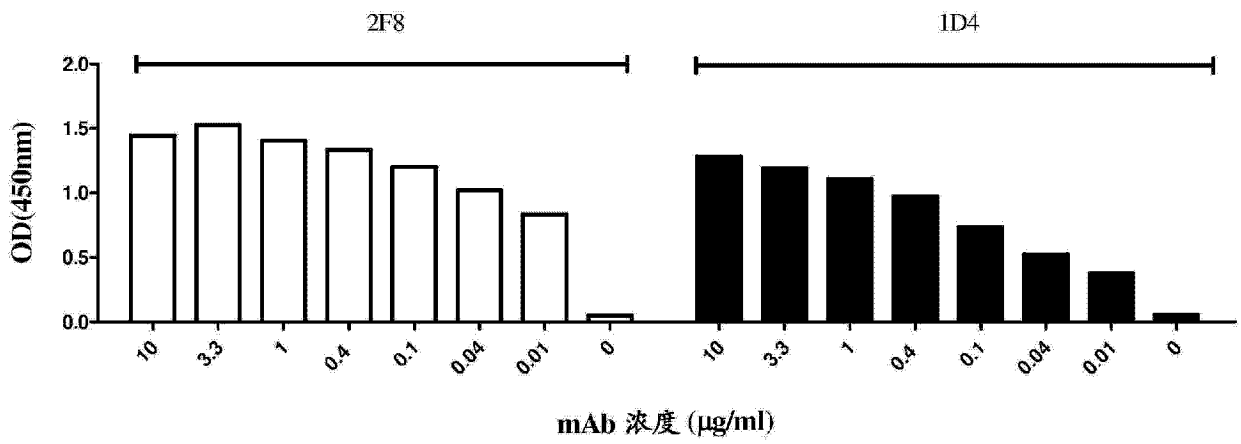


图 1A

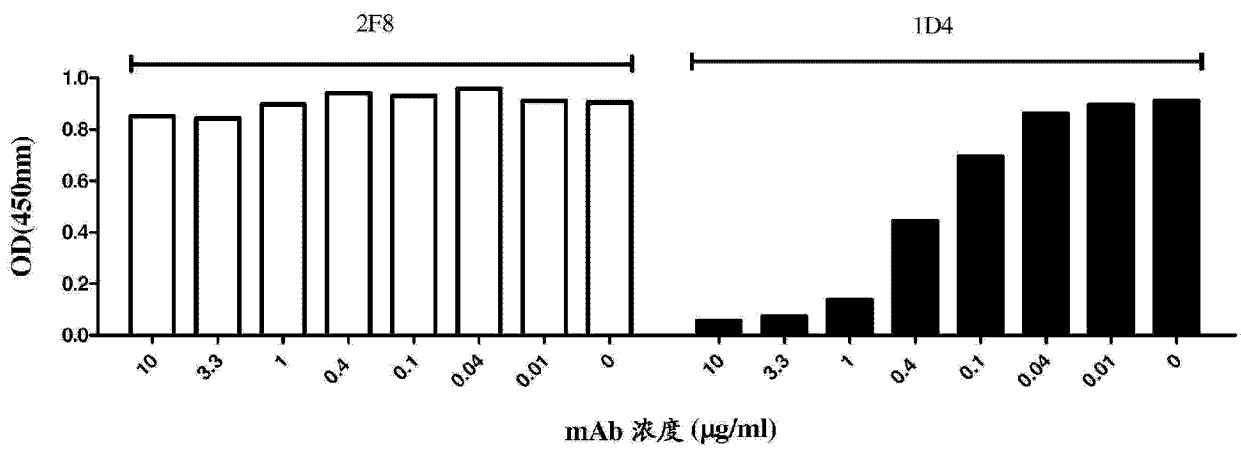


图 1B



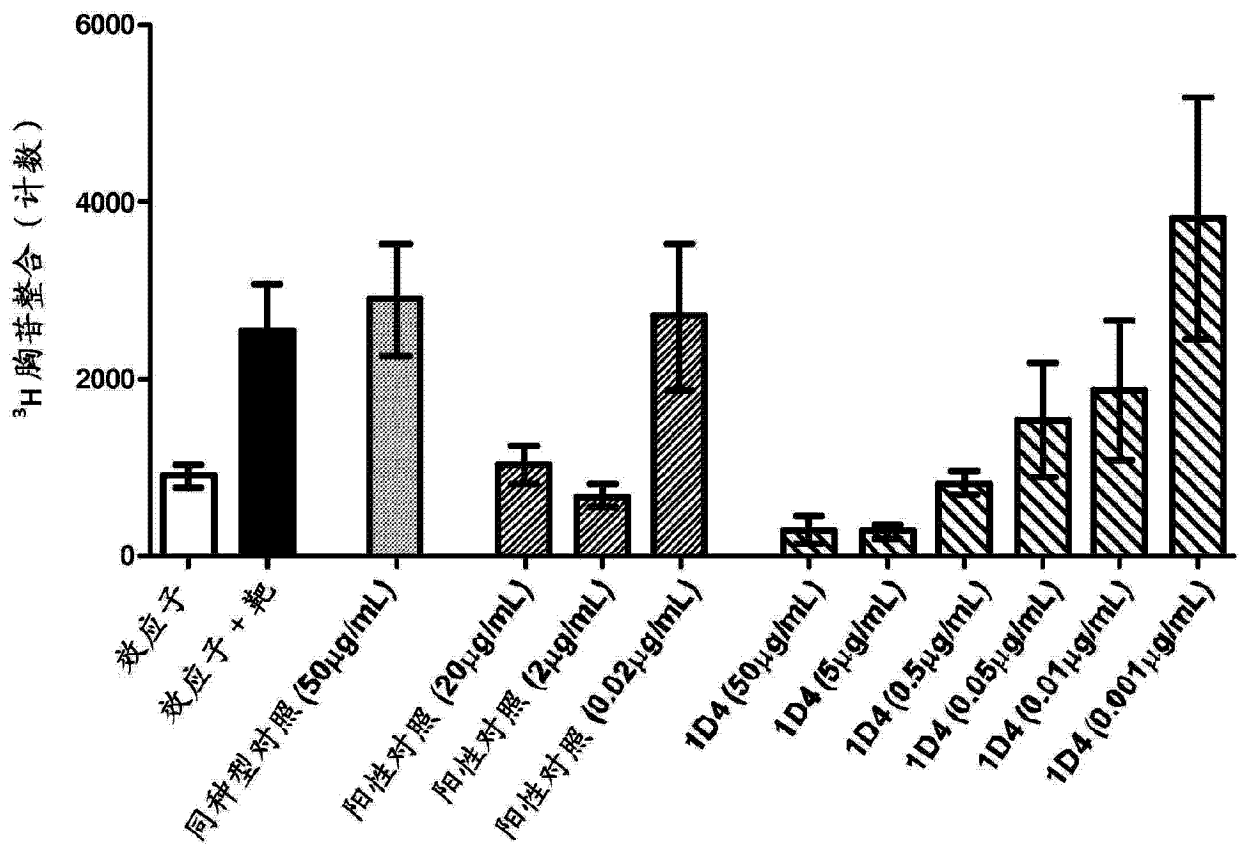


图 2

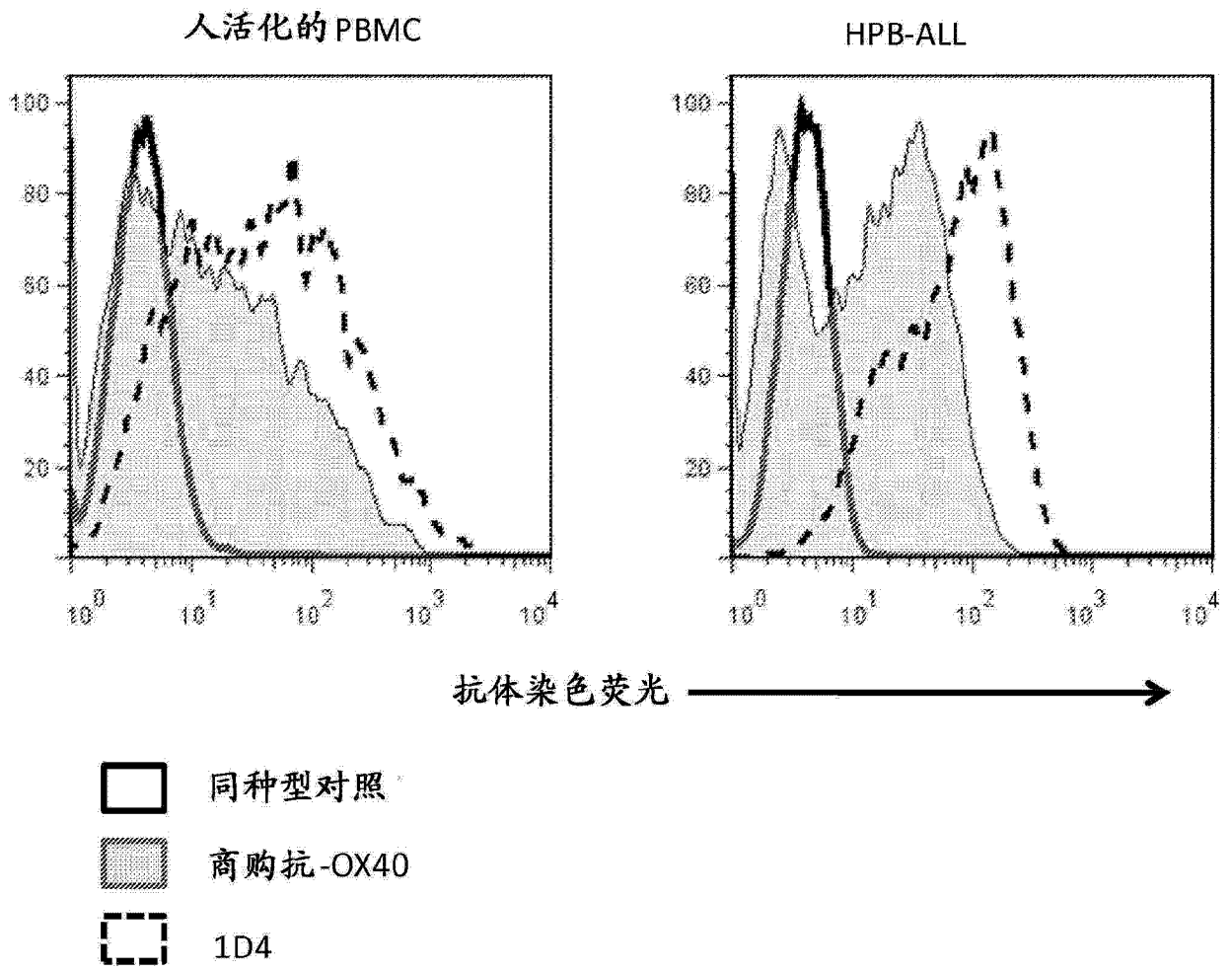


图 3A

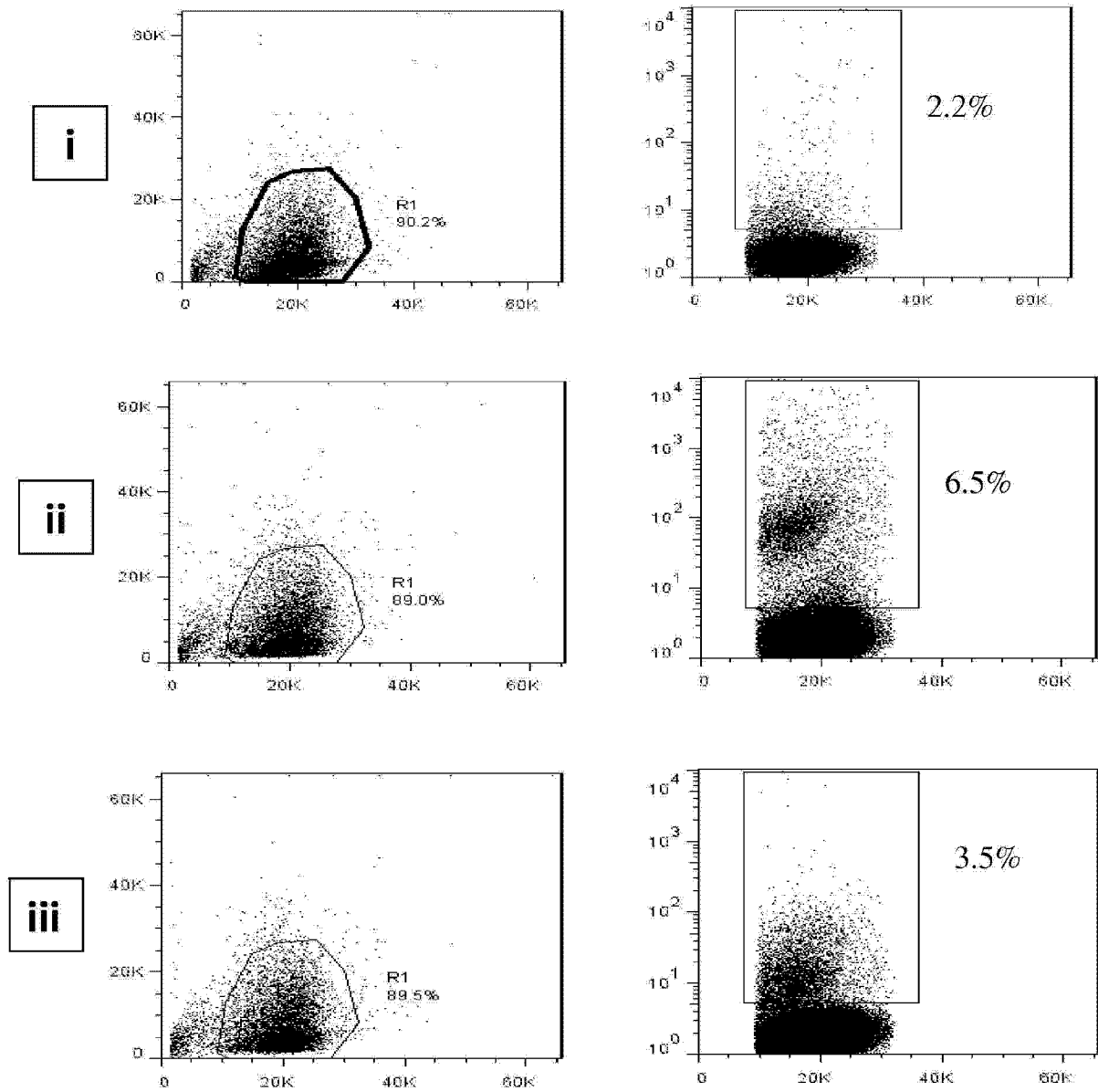


图 3B

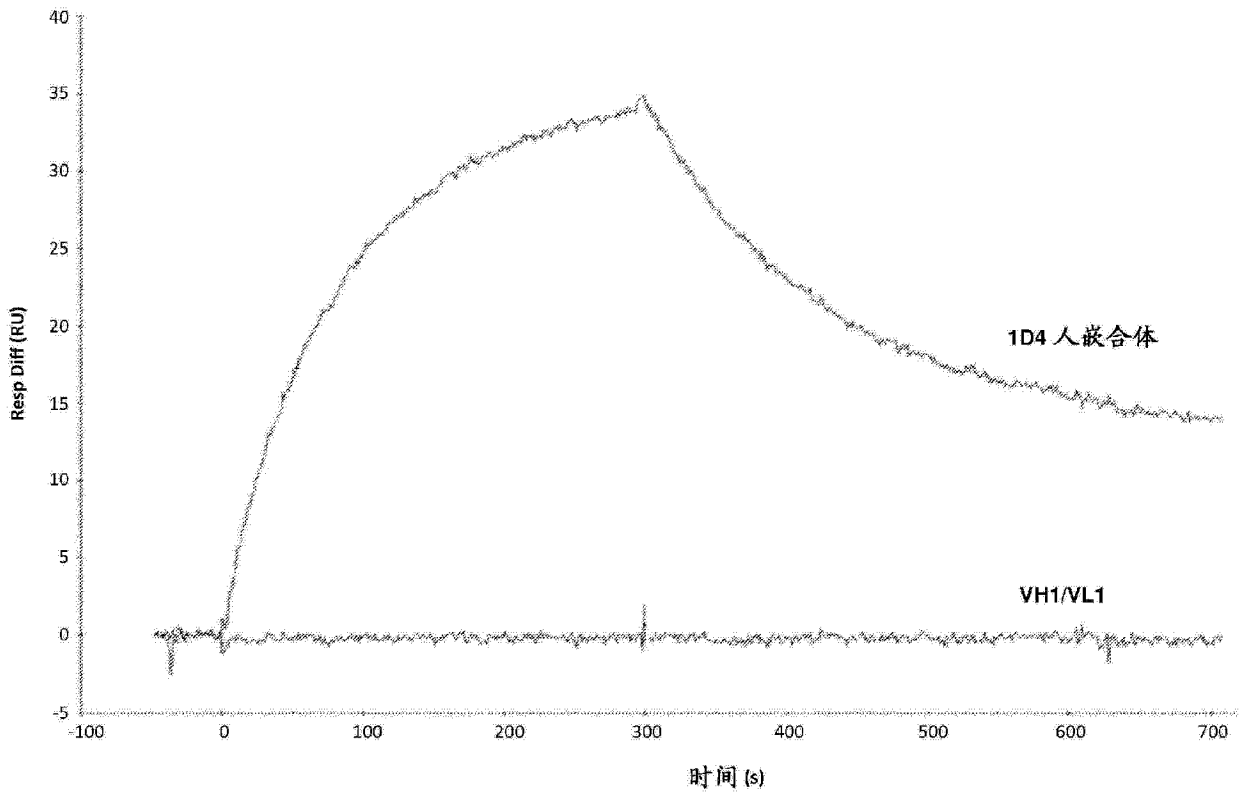


图 4A

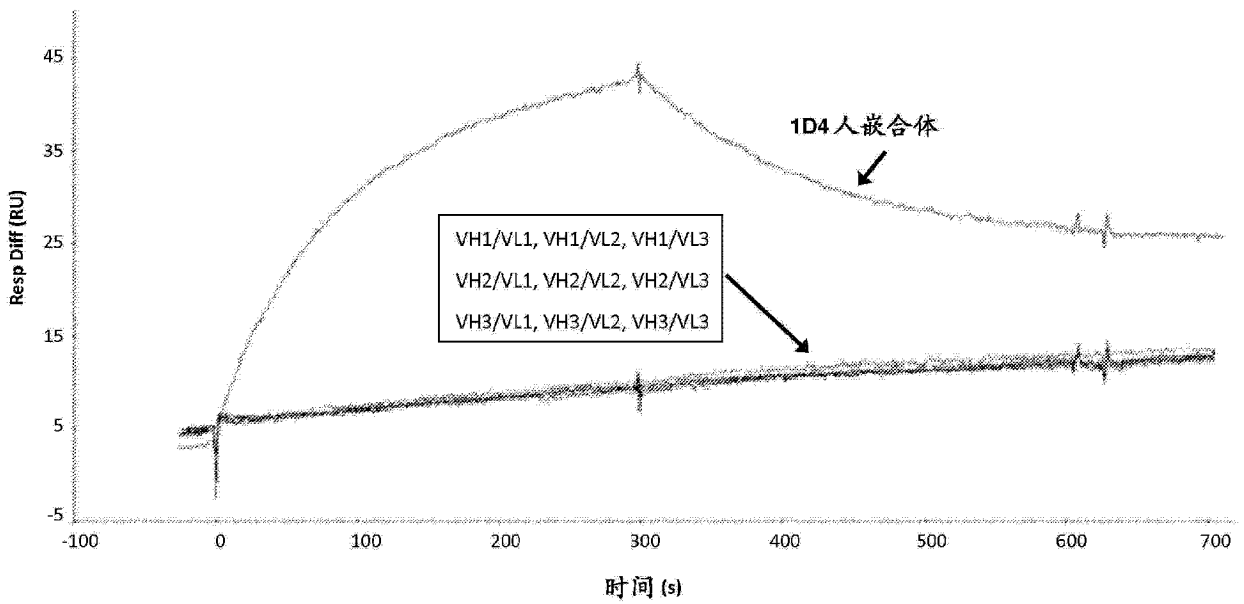


图 4B

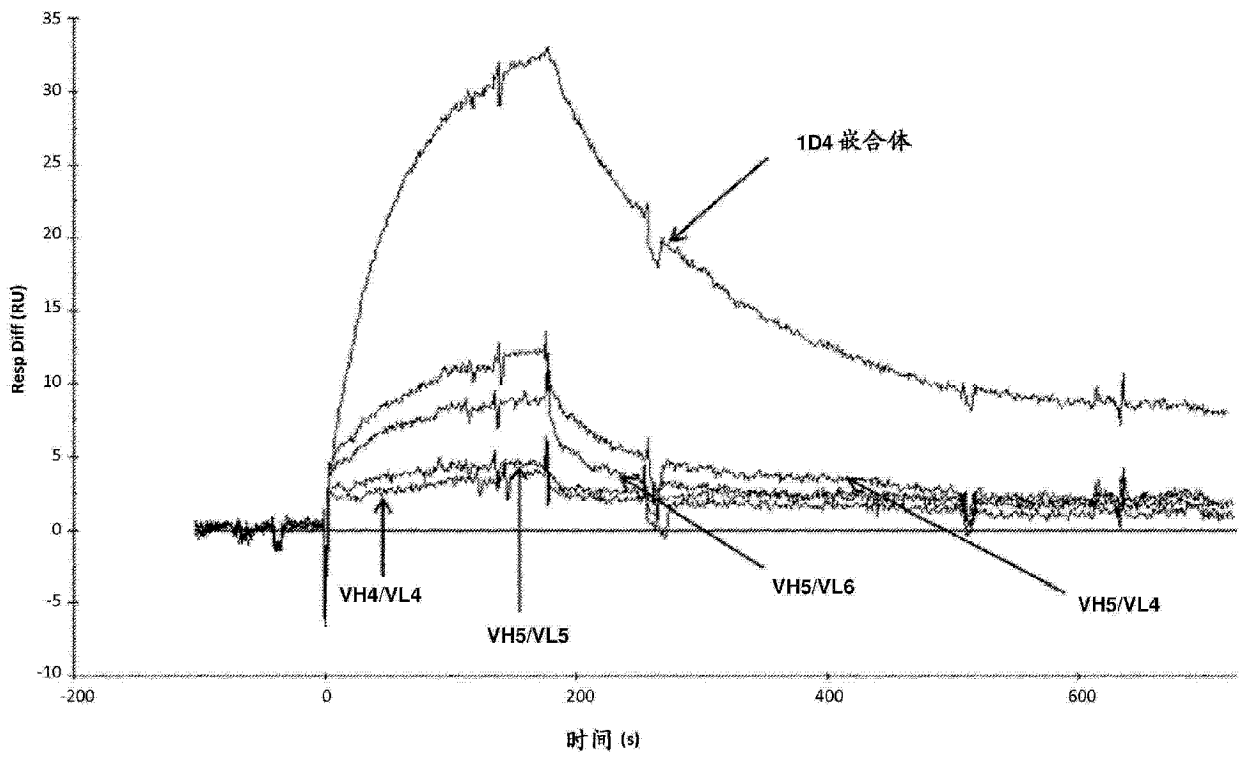


图 4C

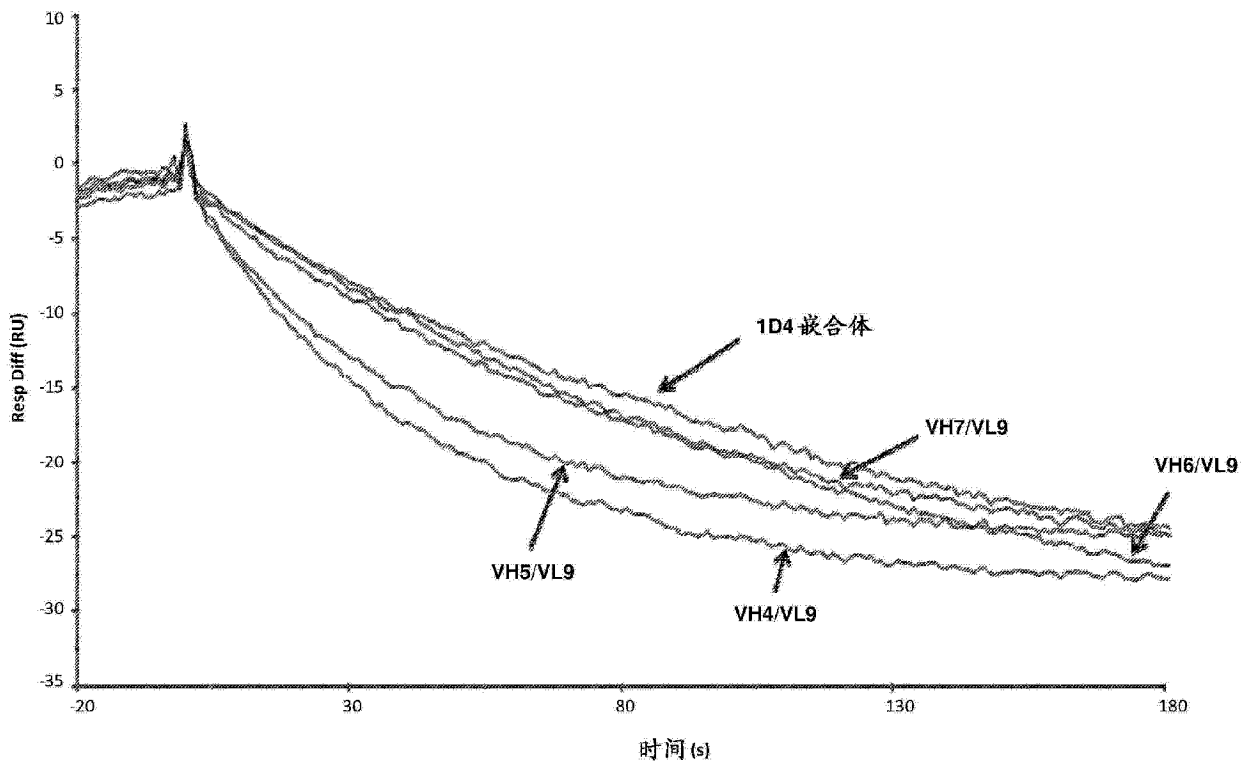


图 4D

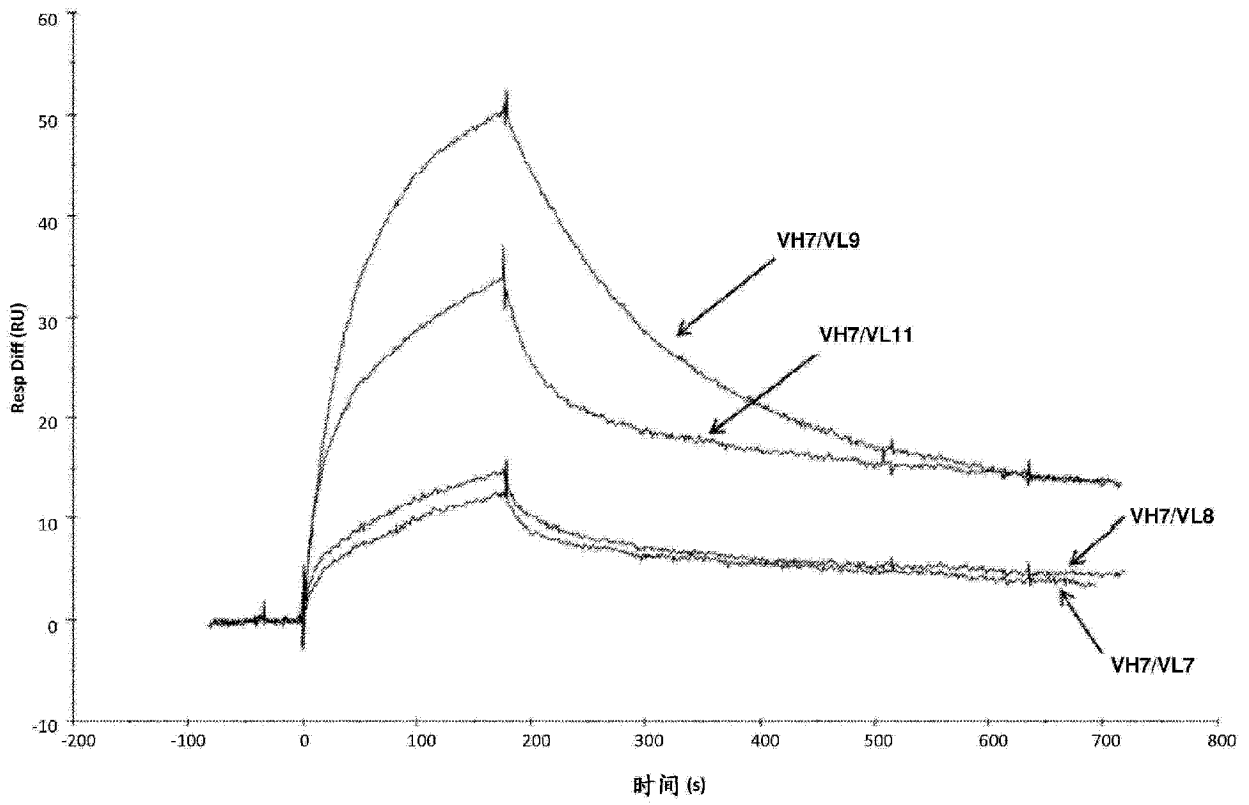


图 4E

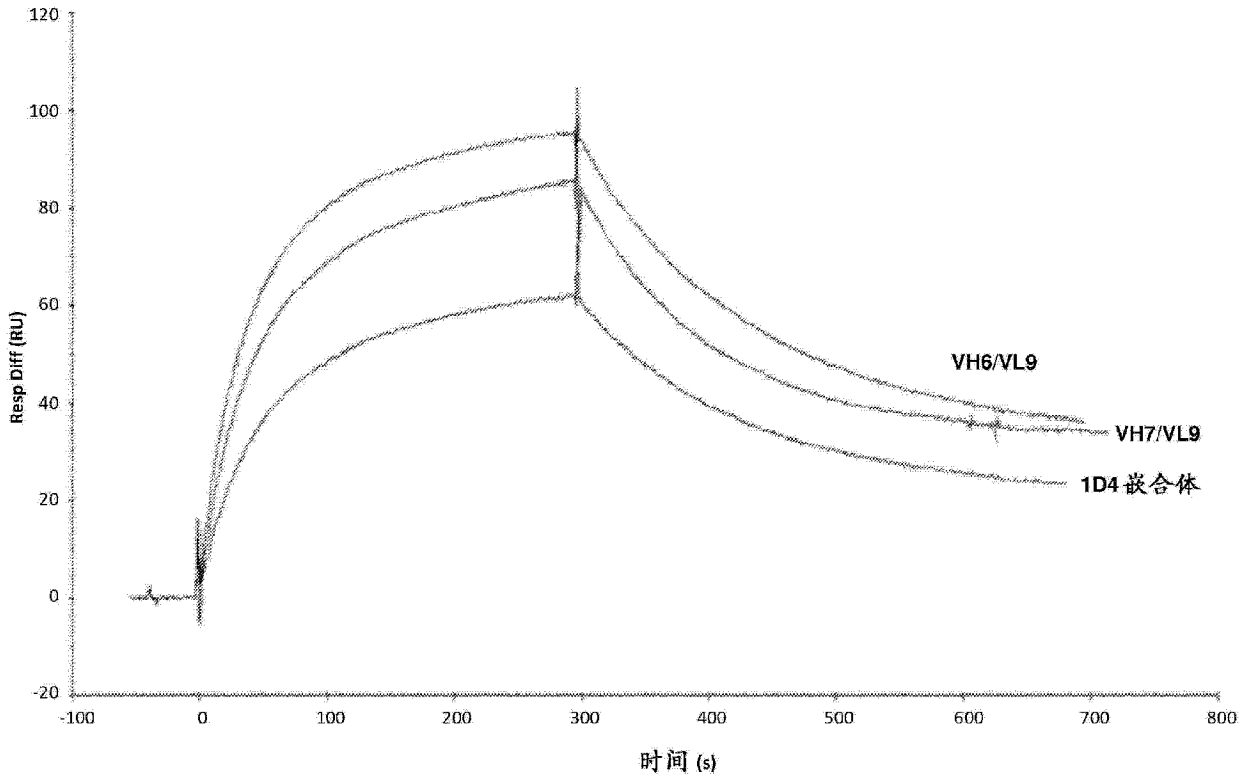


图 4F

```

          10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Kabat VH#    12345678901234567890123456789012345ab678901234567890123456789012345
1D4 VH      QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW~~~WDDDKYYNTALKSGLTISKDTSK
人 IGHV2-70*10  QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMVRVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSK
VH1        QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSK
VH2 [T23S]  QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSK
VH3 [R50H]  QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSK
VH4 [T23S/R50H] QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSK
VH5 [T23S/R50H/S60N/S62A] QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWIARIW~~~WDDDKYYNTALKTRLTISKDTSK
VH6 [T23S/S35bG/R50H/S60N/S62A] QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW~~~WDDDKYYNTALKTRLTISKDTSK
VH7 [T23S/S35bG/I48L/R50H/S60N] QVTLKESGPALVKRPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW~~~WDDDKYYNTALKTRLTISKDTSK

          80      90      100      110
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Kabat VH#    6789012abc345678901234567890abcdefg h i j k l 1234567890123
1D4 VH      NQVFLKIASVDTTDTATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
人 IGHV2-70*10 NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIYF~~~~~DYWQGGTLVTVSS
VH1        NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH2 [T23S]  NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH3 [R50H]  NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH4 [T23S/R50H] NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH5 [T23S/R50H/S60N/S62A] NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH6 [T23S/S35bG/R50H/S60N/S62A] NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
VH7 [T23S/S35bG/I48L/R50H/S60N] NQVVLMTNMDPVDATATYYCARIDWDGF~~~~~AYWQGGTLVTVSS
    
```

图 5A





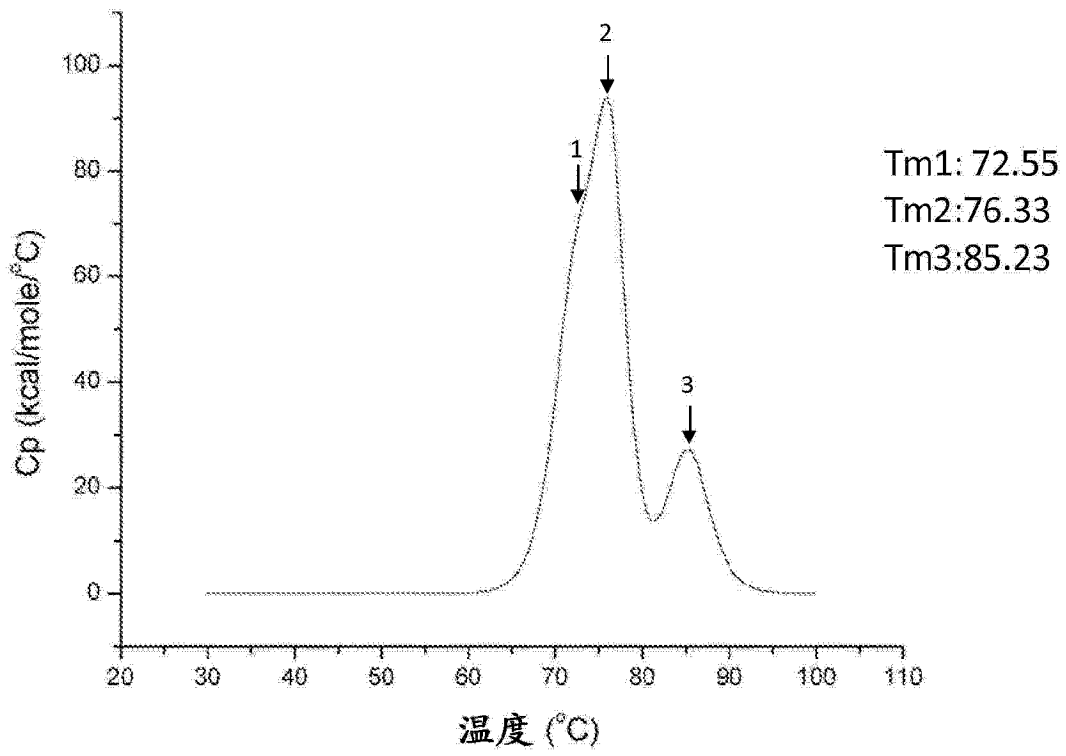


图 6

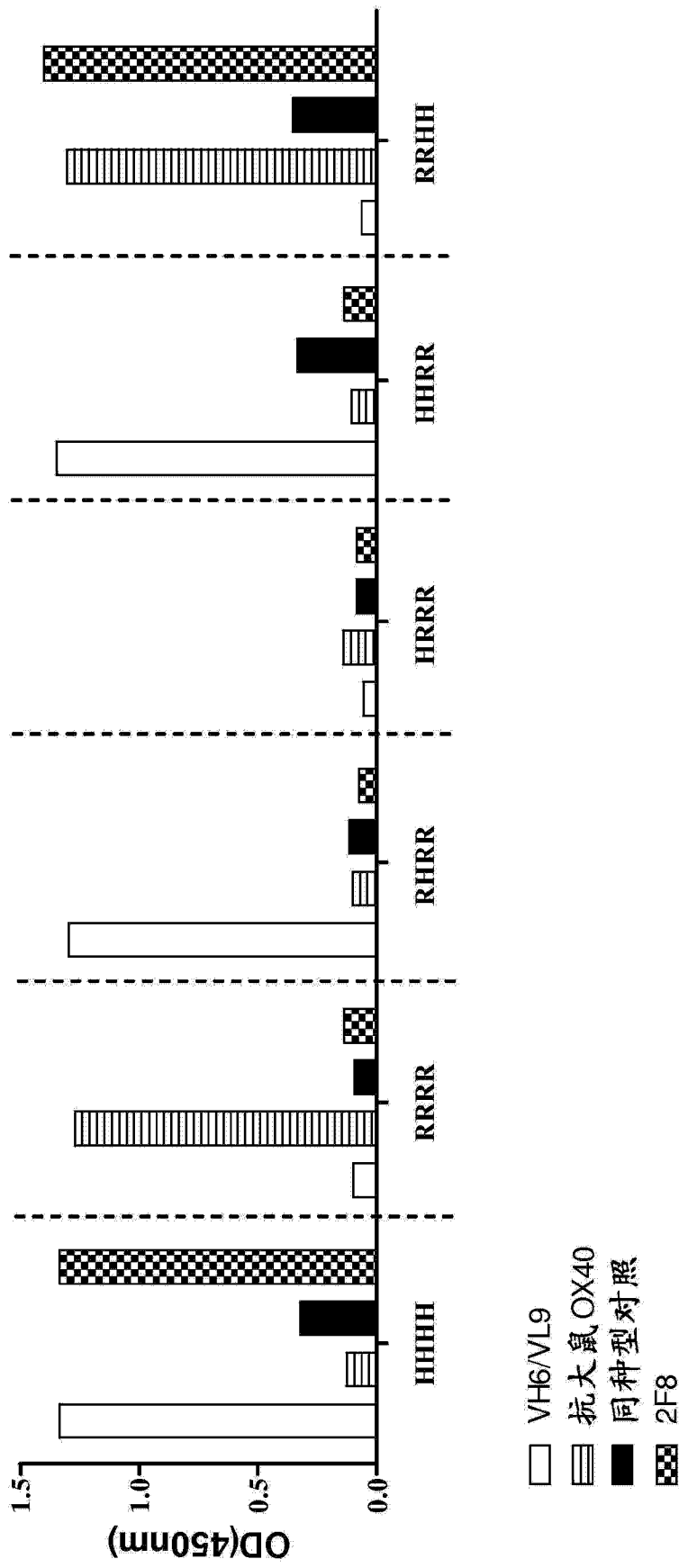


图 7

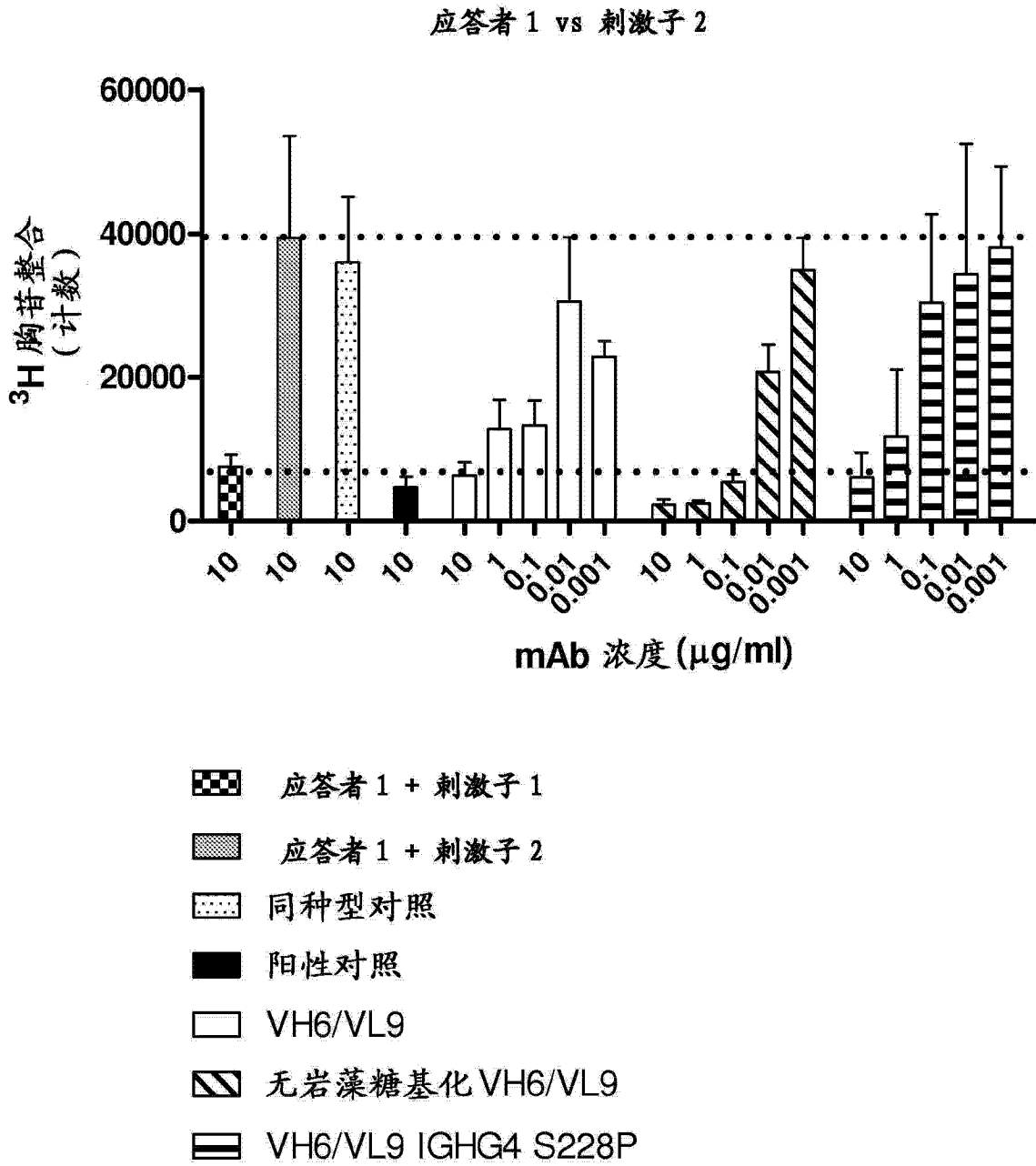
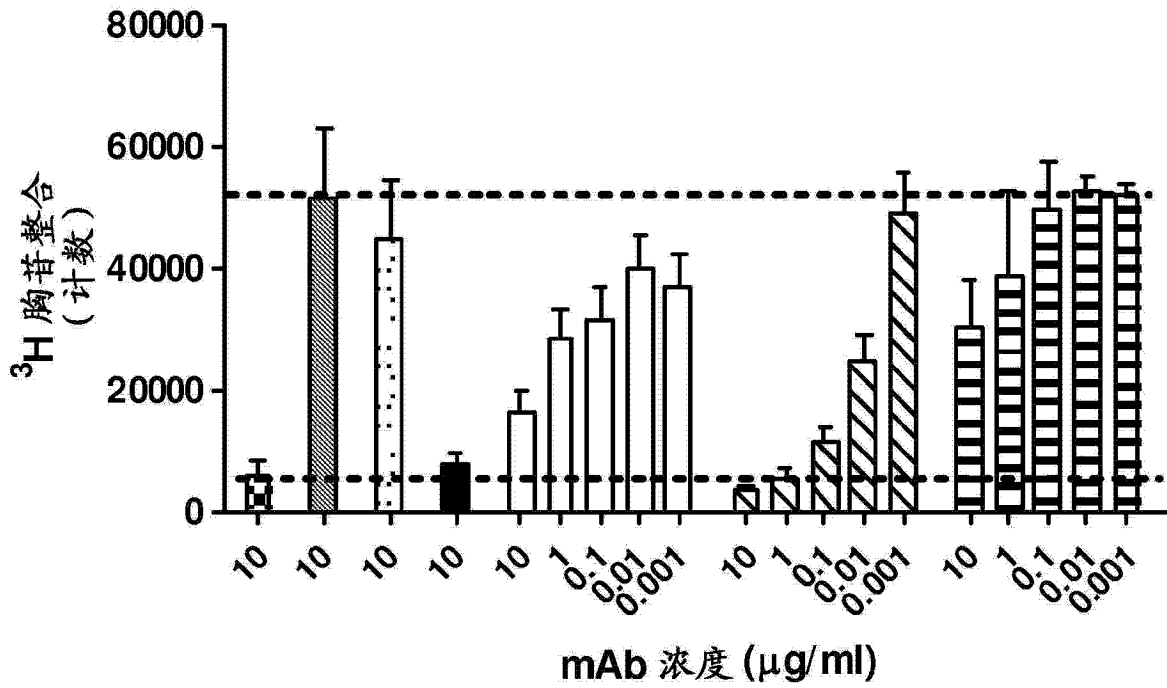


图 8A

应答者 2 vs 刺激子 1



- ▣ 应答者 2 + 刺激子 2
- ▤ 应答者 2 + 刺激子 1
- ▥ 同种型对照
- 阳性对照
- VH6/VL9
- ▧ 无岩藻糖基化 VH6/VL9
- ▨ VH6/VL9 IGHG4 S228P

图 8B

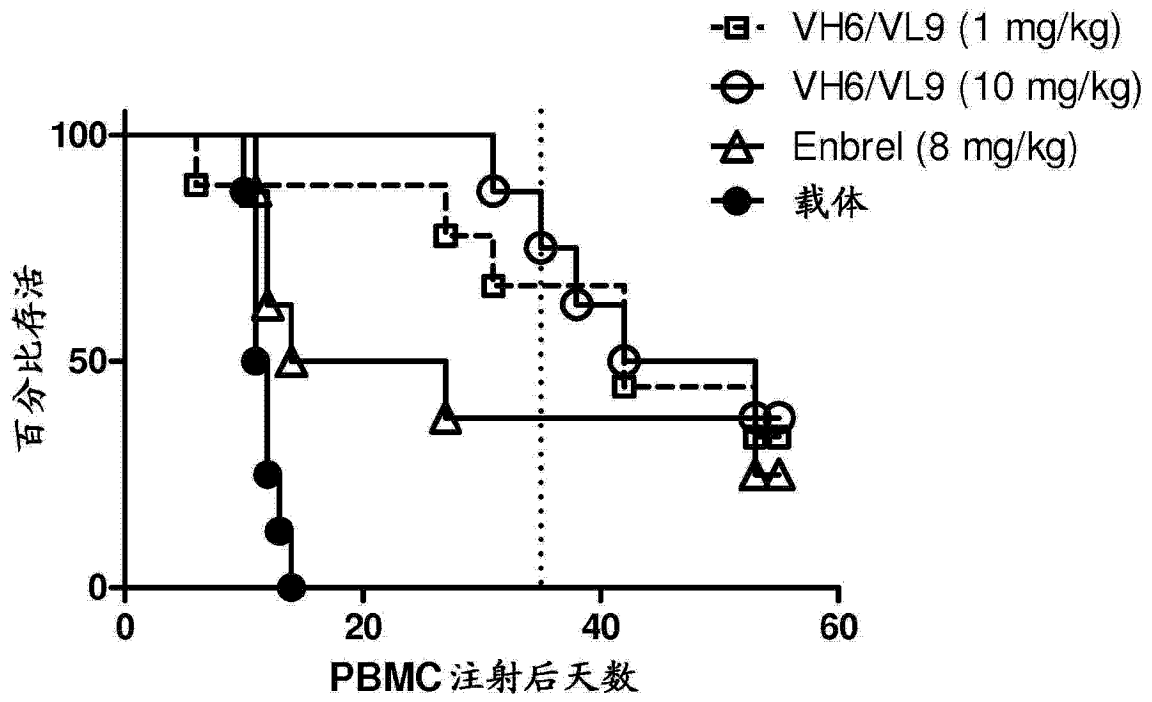


图 9