



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292397 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201780097120.X

(22) 申请日 2017.11.24

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/112832 2017.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/100320 EN 2019.05.31

(71) 申请人 祐和医药科技(北京)有限公司
地址 100176 北京市大兴区北京经济技术
开发区荣华南路2号院5号楼1202室

(72) 发明人 杨毅 郭雅南 陈云云 谢婧书
董春艳 杨放 陆程远 程晓东
沈月雷 倪健

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 彭鲲鹏

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

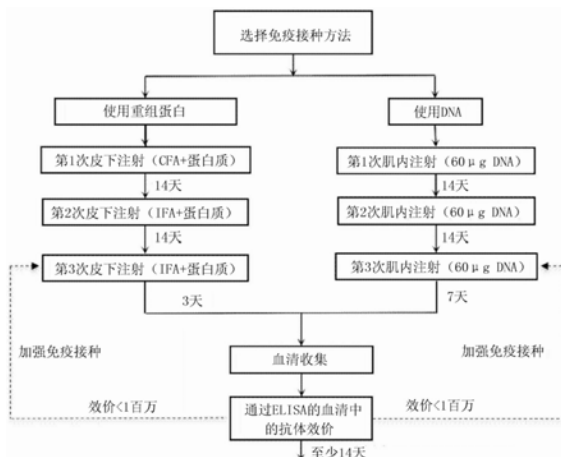
权利要求书4页 说明书104页
序列表31页 附图37页

(54) 发明名称

抗OX40抗体及其用途

(57) 摘要

本公开内容提供了抗OX40 (TNF受体超家族成员4或TNFRSF4) 抗体、抗原结合片段,及其用途。



1. 一种结合OX40 (TNF受体超家族成员4) 的抗体或其抗原结合片段,其包含:

重链可变区 (VH),所述重链可变区 (VH) 包含互补决定区 (CDRs) 1、2和3,其中VH CDR1区包含与所选VH CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,VH CDR2区包含与所选VH CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,并且VH CDR3区包含与所选VH CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列;以及

轻链可变区 (VL),所述轻链可变区 (VL) 包含CDRs 1、2和3,其中VL CDR1区包含与所选VL CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,VL CDR2区包含与所选VL CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,并且VL CDR3区包含与所选VL CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列;

其中所述所选VH CDRs 1、2和3氨基酸序列以及所述所选VL CDRs1、2和3氨基酸序列是以下之一:

(1) 所述所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:1、2、3中示出,并且所述所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:4、5、6中示出;

(2) 所述所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:7、8、9中示出,并且所述所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:10、11、12中示出;

(3) 所述所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:13、14、15中示出,并且所述所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:16、17、18中示出;

(4) 所述所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:19、20、21中示出,并且所述所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:22、23、24中示出。

2. 权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含分别具有SEQ ID NOs:1、2和3中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NOs:4、5和6中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3。

3. 权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含分别具有SEQ ID NOs:13、14和15中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NOs:16、17和18中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3。

4. 权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与人OX40特异性结合。

5. 权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化的抗体或其抗原结合片段。

6. 权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段 (scFV)。

7. 一种核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:

(1) 包含重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区 (VH) 包含分别包含SEQ ID NOs:1、2和3中所示氨基酸序列的互补决定区 (CDRs) 1、2和3,并且其中所述VH在与包含SEQ ID NOs:56、57、58或80中所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合OX40;

(2) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:4、5和6中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VL在与包含SEQ ID NOs:53、54、55或79中所示氨基酸序列的VH配对时结合OX40;

(3) 包含重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 所述重链可变区 (VH) 包含分别包含 SEQ ID NOs: 7、8 和 9 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VH 在与包含 SEQ ID NOs: 62、63、64、65 或 82 中所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合 OX40; 或者

(4) 包含 VL 的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述 VL 包含分别包含 SEQ ID NOs: 10、11 和 12 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VL 在与包含 SEQ ID NOs: 59、60、61 或 81 中所示氨基酸序列的 VH 配对时结合 OX40;

(5) 包含重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 所述重链可变区 (VH) 包含分别包含 SEQ ID NOs: 13、14 和 15 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VH 在与包含 SEQ ID NOs: 69、70、71、72 或 84 中所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合 OX40;

(6) 包含 VL 的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述 VL 包含分别包含 SEQ ID NOs: 16、17 和 18 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VL 在与包含 SEQ ID NOs: 66、67、68 或 83 中所示氨基酸序列的 VH 配对时结合 OX40;

(7) 包含重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链或其片段, 所述重链可变区 (VH) 包含分别包含 SEQ ID NOs: 19、20 和 21 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VH 在与包含 SEQ ID NOs: 76、77、78 或 86 中所示氨基酸序列的轻链可变区 (VL) 配对时结合 OX40;

(8) 包含 VL 的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述 VL 包含分别包含 SEQ ID NOs: 22、23 和 24 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3, 并且其中所述 VL 在与包含 SEQ ID NOs: 73、74、75 或 85 中所示氨基酸序列的 VH 配对时结合 OX40。

8. 权利要求 7 所述的核酸, 其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含含有 VH 的免疫球蛋白重链或其片段, 所述 VH 包含分别包含 SEQ ID NOs: 1、2 和 3 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。

9. 权利要求 7 所述的核酸, 其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含含有 VL 的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述 VL 包含分别包含 SEQ ID NOs: 4、5 和 6 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。

10. 权利要求 7 所述的核酸, 其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含含有 VH 的免疫球蛋白重链或其片段, 所述 VH 包含分别包含 SEQ ID NOs: 13、14 和 15 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。

11. 权利要求 7 所述的核酸, 其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含含有 VL 的免疫球蛋白轻链或其片段, 所述 VL 包含分别包含 SEQ ID NOs: 16、17 和 18 中所示氨基酸序列的 CDRs 1、2 和 3。

12. 权利要求 7 至 11 中任一项所述的核酸, 其中所述 VH 在与 VL 配对时与人 OX40 特异性结合, 或者所述 VL 在与 VH 配对时与人 OX40 特异性结合。

13. 权利要求 7 至 12 中任一项所述的核酸, 其中所述免疫球蛋白重链或其片段是人源化的免疫球蛋白重链或其片段, 并且所述免疫球蛋白轻链或其片段是人源化的免疫球蛋白轻链或其片段。

14. 权利要求 7 至 13 中任一项所述的核酸, 其中所述核酸编码单链可变片段 (scFv)。

15. 权利要求 7 至 14 中任一项所述的核酸, 其中所述核酸是 cDNA。

16. 一种载体, 其包含权利要求 7 至 15 中任一项所述的一种或更多种核酸。

17. 一种载体, 其包含权利要求 7 至 15 中任一项所述核酸的两种, 其中所述载体编码 VL

区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

18. 一种载体对,其中每个载体包含权利要求7至15中任一项所述的一种核酸,其中所述载体对一起编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

19. 一种细胞,其包含权利要求16或17所述的载体或权利要求18所述的载体对。

20. 权利要求19所述的细胞,其中所述细胞是CHO细胞。

21. 一种细胞,其包含权利要求7至15中任一项所述的一种或更多种核酸。

22. 一种细胞,其包含权利要求7至15中任一项所述核酸的两种。

23. 权利要求22所述的细胞,其中所述两种核酸一起编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

24. 产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:

(a) 在足以使权利要求19至23中任一项所述的细胞产生所述抗体或抗原结合片段的条件下培养所述细胞;以及

(b) 收集由所述细胞产生的所述抗体或抗原结合片段。

25. 一种结合OX40的抗体或其抗原结合片段,其包含:

重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含与所选VH序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含与所选VL序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述所选VH序列和所述所选VL序列是以下之一:

(1) 所述所选VH序列是SEQ ID NOs:53、54、55或79,并且所述所选VL序列是SEQ ID NOs:56、57、58或80;

(2) 所述所选VH序列是SEQ ID NOs:59、60、61或81,并且所述所选VL序列是SEQ ID NOs:62、63、64、65或82;

(3) 所述所选VH序列是SEQ ID NOs:66、67、68或83,并且所述所选VL序列是SEQ ID NOs:69、70、71、72或84;

(4) 所述所选VH序列是SEQ ID NOs:73、74、75或85,并且所述所选VL序列是SEQ ID NOs:76、77、78或86。

26. 权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:53的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:56的序列。

27. 权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:55的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:58的序列。

28. 权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:55的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:56的序列。

29. 权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:73的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:77的序列。

30. 权利要求25至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与人OX40特异性结合。

31. 权利要求25至30中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化的抗体或其抗原结合片段。

32. 权利要求25至31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

33. 一种抗体-药物缀合物,其包含与治疗剂共价结合的权利要求1至6和25至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

34. 权利要求33所述的抗体药物缀合物,其中所述治疗剂是细胞毒性剂或细胞抑制剂。

35. 一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含权利要求1至6和25至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或者权利要求33或34所述的抗体-药物缀合物。

36. 权利要求35所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。

37. 权利要求35所述的方法,其中所述癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤。

38. 权利要求35所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、黑色素瘤、膀胱癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。

39. 一种降低肿瘤生长速率的方法,所述方法包括:

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含权利要求1至6和25至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或者权利要求33或34所述的抗体-药物缀合物。

40. 一种杀伤肿瘤细胞的方法,所述方法包括:

使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含权利要求1至6和25至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或者权利要求33或34所述的抗体-药物缀合物。

41. 一种药物组合物,其包含权利要求1至6和25至32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及可药用载体。

42. 一种药物组合物,其包含权利要求33或34所述的抗体药物缀合物,以及可药用载体。

抗OX40抗体及其用途

技术领域

[0001] 本公开内容涉及抗OX40 (TNF受体超家族成员4 (TNF Receptor Superfamily Member 4) 或TNFRSF4) 抗体及其用途。

背景技术

[0002] 癌症是目前人类死亡率最高的疾病之一。根据世界卫生组织的统计数据,2012年全球癌症发病和死亡病例数分别达到1400万和820万。在中国,新诊断的癌症病例为307万,死亡人数为220万。

[0003] 抗癌抗体的最新临床和商业成功已引起对基于抗体的治疗剂的极大兴趣。需要开发抗癌抗体以用于各种基于抗体的疗法中治疗癌症。

发明内容

[0004] 本公开内容涉及抗OX40抗体、其抗原结合片段,及其用途。

[0005] 在一方面,本公开内容提供了可结合OX40 (TNF受体超家族成员4) 的抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区 (VH),所述重链可变区 (VH) 包含互补决定区 (CDRs) 1、2和3,其中VH CDR1区包含与所选VH CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,VH CDR2区包含与所选VH CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,并且VH CDR3区包含与所选VH CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列;以及轻链可变区 (VL),所述轻链可变区 (VL) 包含CDRs 1、2和3,其中VL CDR1区包含与所选VL CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,VL CDR2区包含与所选VL CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,并且VL CDR3区包含与所选VL CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,其中所选VH CDRs 1、2和3氨基酸序列以及所选VL CDRs 1、2和3氨基酸序列是以下之一:

(1) 所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:1、2、3中示出,并且所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:4、5、6中示出;

(2) 所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:7、8、9中示出,并且所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:10、11、12中示出;

(3) 所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:13、14、15中示出,并且所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:16、17、18中示出;

(4) 所选VH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:19、20、21中示出,并且所选VL CDRs 1、2、3氨基酸序列分别在SEQ ID NOs:22、23、24中示出。

[0006] 在一些实施方案中,VH包含分别具有SEQ ID NOs:1、2和3中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NOs:4、5和6中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3。在一些实施方案中,VH包含分别具有SEQ ID NOs:13、14和15中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3,并且VL包含分别具有SEQ ID NOs:16、17和18中所示氨基酸序列的CDRs 1、2、3。

[0007] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与人OX40特异性结合。

[0008] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

[0009] 在一方面,本公开内容还提供了核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:

(1) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别包含SEQ ID NOs:1、2和3中所示氨基酸序列的互补决定区(CDRs)1、2和3,并且其中所述VH在与包含SEQ ID NO:56、57、58或80中所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合OX40;

(2) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:4、5和6中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VL在与包含SEQ ID NO:53、54、55或79中所示氨基酸序列的VH配对时结合OX40;

(3) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别包含SEQ ID NOs:7、8和9中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VH在与包含SEQ ID NO:62、63、64、65或82中所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合OX40;或者

(4) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:10、11和12中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VL在与包含SEQ ID NO:59、60、61或81中所示氨基酸序列的VH配对时结合OX40;

(5) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别包含SEQ ID NOs:13、14和15中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VH在与包含SEQ ID NOs:69、70、71、72或84中所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合OX40;

(6) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:16、17和18中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VL在与包含SEQ ID NOs:66、67、68或83中所示氨基酸序列的VH配对时结合OX40;

(7) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别包含SEQ ID NOs:19、20和21中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VH在与包含SEQ ID NOs:76、77、78或86中所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合OX40;

(8) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:22、23和24中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3,并且其中所述VL在与包含SEQ ID NO:73、74、75或85中所示氨基酸序列的VH配对时结合OX40。

[0010] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,所述VH包含分别包含SEQ ID NOs:1、2和3中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3。

[0011] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:4、5和6中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3。

[0012] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,所述VH包含分别包含SEQ ID NOs:13、14和15中所示氨基酸序列的CDRs 1、2和3。

[0013] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别包含SEQ ID NOs:16、17和18中所示氨基酸序列

的CDRs 1、2和3。

[0014] 在一些实施方案中,所述VH在与VL配对时与人OX40特异性结合,或者所述VL在与VH配对时与人OX40特异性结合。

[0015] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链或其片段是人源化的免疫球蛋白重链或其片段,并且所述免疫球蛋白轻链或其片段是人源化的免疫球蛋白轻链或其片段。

[0016] 在一些实施方案中,所述核酸编码单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,所述核酸是cDNA。

[0017] 在一方面,本公开内容还提供了载体,其包含一种或更多种如本文所述的核酸。在一些实施方案中,所述载体编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

[0018] 在一方面,本公开内容涉及载体对,其中每个载体包含一种如本文所述的核酸,其中所述载体对一起编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

[0019] 在另一方面,本公开内容还提供了细胞,其包含如本文所述的载体或载体对。在一些实施方案中,所述细胞是CHO细胞。

[0020] 在一方面,本公开内容还涉及包含一种或更多种如本文所述的核酸的细胞或包含两种如本文所述的核酸的细胞。在一些实施方案中,所述两种核酸一起编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合OX40。

[0021] 在另一方面,本公开内容涉及产生抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括:在足以使如本文所述的细胞产生抗体或抗原结合片段的条件下培养细胞;以及收集由细胞产生的抗体或抗原结合片段。

[0022] 在一方面,本公开内容涉及结合OX40的抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含与所选VH序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区(VL)包含与所选VL序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所选VH序列和所选VL序列是以下之一:

(1) 所选VH序列是SEQ ID NO:53、54、55或79,并且所选VL序列是SEQ ID NO:56、57、58或80;

(2) 所选VH序列是SEQ ID NO:59、60、61或81,并且所选VL序列是SEQ ID NO:62、63、64、65或82;

(3) 所选VH序列是SEQ ID NO:66、67、68或83,并且所选VL序列是SEQ ID NO:69、70、71、72或84;

(4) 所选VH序列是SEQ ID NO:73、74、75或85,并且所选VL序列是SEQ ID NO:76、77、78或86。

[0023] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:53的序列,并且VL包含SEQ ID NO:56的序列。

[0024] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55的序列,并且VL包含SEQ ID NO:58的序列。

[0025] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:55的序列,并且VL包含SEQ ID NO:56的序列。

[0026] 在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:73的序列,并且VL包含SEQ ID NO:77的序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与人OX40特异性结合。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

[0029] 在一方面,本公开内容还提供了抗体-药物缀合物,其包含与治疗剂共价或非共价结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素、美登素类(例如DM-1和DM-4)、二酮类(dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-双氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺,及类似物)。

[0030] 在一方面,本公开内容还提供了治疗患有癌症的对象的方法。所述方法包括:向对象施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物。

[0031] 在一些实施方案中,所述对象患有实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤。

[0032] 在一些实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN)、肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)、黑色素瘤、膀胱癌、三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)或结直肠癌。

[0033] 在一方面,本公开内容涉及降低肿瘤生长速率的方法。所述方法包括:使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物。

[0034] 在另一方面,本公开内容涉及杀伤肿瘤细胞的方法。所述方法包括:使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物。

[0035] 在一方面,本公开内容涉及药物组合物,其包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及可药用载体。

[0036] 在另一方面,本公开内容涉及药物组合物,其包含如本文所述的抗体药物缀合物,以及可药用载体。

[0037] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞。这样的细胞的一些实例包括具有以迅速增殖的细胞生长为特征的异常状态或状况的细胞。该术语旨在包括癌性生长物,例如肿瘤;致癌过程、转移性组织以及恶性转化的细胞、组织或器官,无论组织病理类型或浸润程度如何。还包括多种器官系统的恶性病,所述器官系统例如呼吸系统、心血管系统、肾系统、生殖系统、血液系统、神经系统、肝系统、胃肠系统和内分泌系统;以及腺癌,其包括恶性病,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺部非小细胞癌、和小肠癌。“天然发生的”癌症包括任何不是通过将癌细胞植入对象体内而在实验上诱导的癌症,并且包括例如自发产生的癌症、由患者暴露于致癌物引起的癌症、由癌基因的插入或肿瘤抑制基因的敲除引起的癌症,以及由感染(例如病毒感染)引起的癌症。术语“癌

(carcinoma)”是本领域公认的,并且是指上皮或内分泌组织的恶性病。该术语还包括癌肉瘤,其包括由癌性组织和肉瘤性组织构成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源自腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的,并且是指间充质来源的恶性肿瘤。术语“造血性肿瘤性疾病(hematopoietic neoplastic disorder)”包括涉及造血起源的增生性细胞/肿瘤细胞的疾病。造血性肿瘤性疾病可由骨髓、淋巴或红系谱系、或其前体细胞引起。

[0038] 如本文所用,术语“抗体”是指包含至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDRs)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDRs中的任何或者来自免疫球蛋白重链的三个CDRs中的任何)并且能够与表位特异性结合的任何抗原结合分子。抗体的非限制性实例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体可包含人抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如由抗体片段形成的双特异性抗体、单链抗体、双抗体(diabody)、线性抗体和多特异性抗体。

[0039] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中抗体的该部分能够与抗原特异性结合。在一些实施方案中,抗原结合片段包含至少一个可变结构域(例如,重链的可变结构域或轻链的可变结构域)。抗体片段的非限制性实例包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0040] 如本文所用,术语“人抗体”是指由人中存在的内源核酸(例如,重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施方案中,人抗体是从人收集或在人细胞培养物(例如,人杂交瘤细胞)中产生的。在一些实施方案中,人抗体是在非人细胞(例如,小鼠或仓鼠细胞系)中产生的。在一些实施方案中,人抗体是在细菌或酵母细胞中产生的。在一些实施方案中,人抗体是在含有未重排或重排的人免疫球蛋白基因座(例如,重链或轻链人免疫球蛋白基因座)的转基因非人动物(例如牛)中产生的。

[0041] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指包含存在于至少两种不同抗体(例如,来自两种不同哺乳动物物种的抗体,例如人抗体和小鼠抗体)中的序列的抗体。嵌合抗体的非限制性实例是包含非人(例如小鼠)抗体的可变结构域序列(例如,轻链和/或重链可变结构域序列的全部或一部分)和人抗体的恒定结构域的抗体。嵌合抗体的另外实例在本文中进行了描述并且是本领域已知的。

[0042] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指非人抗体,其包含源自非人(例如,小鼠)免疫球蛋白的最小序列并且包含源自人免疫球蛋白的序列。在一些非限制性实例中,人源化抗体是人抗体(接受体抗体),其中接受体抗体的高变(例如,CDR)区残基被具有期望特异性、亲和力和能力的来自非人抗体(例如,供体抗体)(例如小鼠、大鼠或兔抗体)的高变(例如,CDR)区残基替换。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人(例如,小鼠)免疫球蛋白残基替换。在一些实施方案中,人源化抗体可包含不存在于接受体抗体或供体抗体中的残基。可进行这些修饰以进一步改善抗体性能。在一些实施方案中,人源化抗体包含至少一个并且通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环(CDR)对应于非人(例如小鼠)免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白的那些。人源化抗体还可包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区(Fc)。可以使用本领域已知的分子生物学方法产生人源化抗体。本文描述

了用于产生人源化抗体的方法的非限制性实例。

[0043] 如本文所用,术语“单链抗体”是指能够与抗原特异性结合的包含至少两个免疫球蛋白可变结构域(例如,哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域)的单个多肽。单链抗体的非限制性实例在本文中进行了描述。

[0044] 如本文所用,术语“多聚体抗体”是指包含四个或更多个(例如六个、八个或十个)免疫球蛋白可变结构域的抗体。在一些实施方案中,多聚体抗体能够使一个靶分子(例如OX40)与哺乳动物细胞(例如人T细胞)表面上的至少一个第二靶分子(例如PD1)交联。

[0045] 如本文所用,术语“对象”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述了根据本发明的方法提供治疗的人或非人动物。本发明考虑了兽医和非兽医应用。人患者可以是成人或未成年人(例如小于18岁的人)。除人外,患者还包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、雪貂、猫、狗和灵长类。包括例如非人灵长类(例如猴、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔)、兔类动物(lagomorph)、猪类(例如猪、微型猪(miniature pig))、马、犬、猫、牛和其他家养、农场和动物园动物。

[0046] 如本文所用,当提及抗体时,短语“与...特异性结合”和“特异性结合...”是指由于相互作用取决于靶分子上特定结构(即抗原决定簇或表位)的存在而相对于其他分子抗体优先与其靶分子(例如,OX40)相互作用;换句话说,该试剂识别并结合包含特定结构的分子,而不是一般的所有分子。与靶分子特异性结合的抗体可以称为靶标特异性抗体。例如,可将与OX40分子特异性结合的抗体称为OX40特异性抗体或抗OX40抗体。

[0047] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指至少两个氨基酸的任意长度的氨基酸聚合物。

[0048] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文可互换使用,是指至少两个核苷酸的任意长度的核苷酸聚合物,并且包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂交体,及其修饰物。

[0049] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;但也可以使用本领域已知的其他合适方法和材料。材料、方法和实例仅是举例说明性的,并且不旨在限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均通过引用整体并入。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0050] 根据以下具体实施方式和附图以及权利要求书,本发明的其他特征和优点将变得明显。

附图说明

[0051] 图1是显示制备抗OX40抗体的示例性方案的第一部分的流程图。

[0052] 图2是显示制备抗OX40抗体的示例性方案的第二部分的流程图。

[0053] 图3是一组流式细胞术图,显示了抗OX40抗体阻断OX40与OX40L之间的结合。

[0054] 图4是一组流式细胞术图,显示了抗OX40抗体可结合人OX40。

[0055] 图5是一组图,显示了抗OX40抗体针对猴OX40(rmOX40)、小鼠OX40(mOX40)和人-小鼠嵌合OX40(chiOX40)的交叉反应性的流式细胞术结果。

[0056] 图6是显示了嵌合抗hOX40抗体(9H3-mHvKv-IgG1)与人OX40之间的结合速率和解

离速率的图。

[0057] 图7是显示了用小鼠抗hOX40抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1、17-5D10、08-6A11和14-7F11处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0058] 图8是显示了用小鼠抗hOX40抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1、17-5D10、08-6A11和14-7F11处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0059] 图9是显示了用小鼠抗hOX40抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1、17-5D10、08-6A11和14-7F11处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0060] 图10是显示了用嵌合抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0061] 图11是显示了用嵌合抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0062] 图12是显示了用嵌合抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0063] 图13是显示了用人源化抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0064] 图14是显示了用人源化抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0065] 图15是显示了用人源化抗hOX40抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0066] 图16是一组肝组织病理学H&E染色图像(400×)。

[0067] 图17是一组肾组织病理学H&E染色图像(400×)。

[0068] 图18是一组肠组织病理学H&E染色图像(400×)。

[0069] 图19是显示了用9H3和可瑞达(Keytruda)处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0070] 图20是显示了用9H3和可瑞达处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0071] 图21是显示了用9H3和可瑞达处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0072] 图22是显示了用9H3和可瑞达处理的具有EL4癌细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0073] 图23是显示了用9H3和可瑞达处理的具有EL4癌细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0074] 图24是显示了用9H3和可瑞达处理的具有EL4癌细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0075] 图25是显示了用9H3、抗PD1抗体和/或抗PD-L1抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0076] 图26是显示了用9H3、抗PD1抗体和/或抗PD-L1抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0077] 图27是显示了用9H3、抗PD1抗体和抗PD-L1抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0078] 图28是显示了用9H3、抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4和/或抗GITR抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重的图。

[0079] 图29是显示了用9H3、抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4和/或抗GITR抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 随时间的体重百分比变化的图。

[0080] 图30是显示了用9H3、抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4和/或抗GITR抗体处理的具有MC-38肿瘤细胞的OX40人源化小鼠 (B-hOX40) 中随时间的肿瘤体积的图。

[0081] 图31列出了通过Kabat编号定义的抗OX40抗体9H3、9A4、5C1、5D10、及其人源化抗体的CDR序列。

[0082] 图32列出了通过Chothia编号定义的抗OX40抗体9H3、9A4、5C1、5D10、及其人源化抗体的CDR序列。

[0083] 图33列出了人OX40、小鼠OX40、猴OX40和嵌合OX40的氨基酸序列。

[0084] 图34列出了人源化抗OX40抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0085] 图35列出了小鼠抗hOX40抗体9H3、9A4、5C1和5D10的重链和轻链可变区的氨基酸序列。

具体实施方式

[0086] 本公开内容提供了结合OX40 (TNF受体超家族成员4或TNFRSF4, 也称为CD134) 的抗体、其抗原结合片段的一些实例。

[0087] T细胞活化过程需要TCR识别MHC-肽复合物作为第一信号。其还需要共刺激信号。OX40是一类用于T细胞的共刺激因子, 其是肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族的成员, 并且是I型跨膜蛋白。OX40可激活细胞内PI3K-AKT信号以及NFAT信号。这些信号对T细胞的增殖和存活具有积极作用。另外, OX40还可调节T细胞的功能和分化方向。

[0088] 迄今为止, OX40是唯一能够建立外周耐受的共刺激分子。其可破坏肿瘤的免疫耐受并且恢复免疫监视。使用OX40作为用于肿瘤免疫治疗的新靶标已经显示出某些积极作用。但是, 由于活化抗体需要其结合表位和其状态与相应的配体完全对齐以激活下游信号传导途径, 这类似于与锁特异性相匹配的钥匙, 因此这种类型的抗体的开发具有挑战性。本公开内容提供了数种可有效地抑制肿瘤生长并且可用于治疗癌症的抗OX40抗体和人源化抗OX40抗体。

OX40和癌症

[0089] 免疫系统可以区分体内的正常细胞与其视为“外来”的那些细胞, 这使免疫系统能够攻击外来细胞, 而正常细胞不受影响。这种机制有时涉及被称为免疫检查点的蛋白质。免疫检查点是免疫系统中调高信号 (共刺激分子) 或调低信号的分子。

[0090] 检查点抑制剂可防止免疫系统攻击正常组织, 从而防止自身免疫病。许多肿瘤细胞也表达检查点抑制剂。这些肿瘤细胞通过选择某些免疫检查点途径来逃避免疫监视, 特别是在对肿瘤抗原具有特异性的T细胞中 (Creelan, Benjamin C. “Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer.” *Cancer Control* 21.1 (2014): 80-89)。由于许

多免疫检查点是由配体-受体相互作用引发的,因此它们容易可被针对配体和/或其受体的抗体所阻断。

[0091] 肿瘤坏死因子受体超家族成员4(tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, TNFRSF4),也称为CD134和OX40,是受体的TNFR超家族的成员,其不是在静息的初始T细胞上组成型表达的。OX40是在激活之后24至72小时之后表达的次级共刺激免疫检查点分子;其配体OX40L也不是在静息的抗原呈递细胞上表达的,而是在其激活之后表达。

[0092] 小鼠T细胞表面上OX40的表达通常发生在同源抗原识别之后24小时至96小时。使用抗OX40激动剂抗体(在体外)结合T细胞上的OX40受体直接促进了不同效应T细胞亚群的生存率提高。此外,CD4⁺ T细胞的被称为调节性T细胞(Treg)的免疫抑制亚群也表达高水平的OX40。值得注意的是,鼠Treg显示组成型表达OX40,而人Treg在激活之后上调OX40。Treg可通过分泌免疫抑制细胞因子(例如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF β)和白介素-10(IL-10))来抑制效应T细胞。这些负调节因子可通过效应T细胞上OX40和其他TNFRSF共刺激受体例如41BB(CD137)和糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)(CD357)的刺激来抵消。

[0093] OX40信号传导影响Treg功能并且削弱其抑制能力,这可能是通过直接抑制FoxP3表达来进行。OX40信号传导也作用于Treg的产生:其强烈拮抗TGF β 和抗原介导的初始T细胞转化为FoxP3⁺ Treg。

[0094] 由于OX40信号传导强烈促进CD4⁺和CD8⁺ T细胞的生物活性并且抵消Treg功能,因此OX40是用于癌症免疫治疗的免疫调节靶标,例如,OX40信号传导可以被OX40特异性激动剂抗体诱导。关于OX40及其作为癌症免疫治疗的免疫调节靶标的作用的详细描述可见于例如以下中:Aspeslagh, et al. "Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy." *European Journal of Cancer* 52(2016):50-66; Curti, et al. "OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients." *Cancer research* 73.24(2013):7189-7198,其通过引用整体并入本文。

[0095] 本公开内容提供了数种抗OX40抗体、其抗原结合片段以及使用这些抗OX40抗体和抗原结合片段来抑制肿瘤生长和治疗癌症的方法。

抗体和抗原结合片段

[0096] 本公开内容提供了抗OX40抗体及其抗原结合片段。通常,抗体(也称为免疫球蛋白)由轻链和重链两类多肽链构成。本公开内容的非限制性抗体可以是包含两条重链和两条轻链的完整的四免疫球蛋白链抗体。抗体的重链可以是任何同种型,包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD;或者亚同种型,包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等。轻链可以是 κ 轻链或 λ 轻链。抗体可包含轻链的两个相同拷贝和重链的两个相同拷贝。各自包含一个可变结构域(或可变区, V_H)和多个恒定结构域(或恒定区)的重链通过其恒定结构域内的二硫键相互结合以形成抗体的“柄”。各自包含一个可变结构域(或可变区, V_L)和一个恒定结构域(或恒定区)的轻链各自通过二硫键结合与一条重链结合。每个轻链的可变区与其所结合的重链的可变区配对。轻链和重链二者的可变区都包含位于更保守的框架区(FR)之间的三个高变区。

[0097] 这些高变区,称为互补决定区(CDR),形成包含抗体的主要抗原结合表面的环。四

个框架区主要采用 β -折叠构象,并且CDR形成环,所述环连接 β -折叠结构并且在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过框架区保持紧密靠近,并且与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗原结合区。

[0098] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定抗体的CDR区的方法是公知的,并且CDR的许多定义是常用的。Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置。这些方法和定义在以下中描述:例如Martin,“Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains,”*Antibody engineering*,Springer Berlin Heidelberg, 2001.422-439;Abhinandan,et al.“Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains,”*Molecular immunology* 45.14 (2008) :3832-3839;Wu,T.T.and Kabat,E.A. (1970) *J.Exp.Med.*132: 211-250;Martin et al.,*Methods Enzymol.*203:121-53 (1991);Morea et al.,*Biophys Chem.*68 (1-3) :9-16 (Oct.1997);Morea et al.,*J Mol Biol.*275 (2) :269-94 (Jan.1998);Chothia et al.,*Nature* 342 (6252) :877-83 (Dec.1989);Ponomarenko and Bourne,*BMC Structural Biology* 7:64 (2007);其各自通过引用整体并入本文。除非在本公开内容中特别指出,否则在本公开内容中默认使用Kabat编号。

[0099] CDR对于识别抗原表位是重要的。如本文所用,“表位”是靶分子的能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的最小部分。表位的最小尺寸可以为约3、4、5、6或7个氨基酸,但这些氨基酸不必位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可依赖于基于抗原的二级和三级结构的抗原的三维构象。

[0100] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,不同之处在于其恒定区,尤其是其铰链和上CH2结构域。IgG亚类的序列和差异是本领域已知的,并且描述在例如以下中:Vidarsson,et al,“IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions.”*Frontiers in immunology* 5 (2014);Irani,et al.“Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases.”*Molecular immunology* 67.2 (2015) :171-182;Shakib,Farouk,ed.*The human IgG subclasses: molecular analysis of structure,function and regulation*.Elsevier,2016;其各自通过引用整体并入本文。

[0101] 抗体也可以是来源于任何物种(例如人、啮齿动物、小鼠、骆驼科)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体以及包含与另一多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语“抗原结合结构域”或“抗原结合片段”是保留了完整抗体的特异性结合活性的抗体部分,即抗体的能够与完整抗体的靶分子上的表位特异性结合的任何部分。其包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂以及这些片段的变体。因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以是例如由抗体片段形成的scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、多特异性抗体,以及包含为抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括,例如,完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链,或来自完整抗体的重链或轻链的单个

CDR。

[0102] 在一些实施方案中,抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的一部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是与CD3- ζ 跨膜和胞内结构域融合的本文所述的单链可变片段(scFv)的融合体。在一些实施方案中,嵌合抗原受体还包含来自多种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含多个信号传导结构域,例如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-0X40,以提高效力。因此,在一方面,本公开内容还提供了表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如,T细胞)。

[0103] 在一些实施方案中,scFV具有一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域。

抗OX40抗体和抗原结合片段

[0104] 本公开内容提供了特异性结合OX40的抗体及其抗原结合片段。本文所述的抗体和抗原结合片段能够结合OX40并且可以促进OX40信号传导途径,从而提高免疫应答。本公开内容提供了例如小鼠抗OX40抗体07-9H3(“9H3”)、07-9A4(“9A4”)、11-5C1(“5C1”)和17-5D10(“5D10”),以及嵌合抗体,其人源化抗体(例如,表3中所示的抗体)。

[0105] 如通过Kabat编码定义的,9H3和9H3衍生抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包含重链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:1-3,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:4-6。CDR也可以由Chothia系统定义。在Chothia编码下,重链可变结构域的CDR序列在SEQ ID NOs:25-27中示出,并且轻链可变结构域的CDR序列在SEQ ID NOs:28-30中示出。

[0106] 类似地,如通过Kabat编码定义的,9A4和9A4衍生抗体的CDR序列包含重链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:7-9,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:10-12。在Chothia编号下,重链可变结构域的CDR序列在SEQ ID NOs:31-33中示出,并且轻链可变结构域的CDR在SEQ ID NOs:34-36中示出。

[0107] 如通过Kabat编码定义的,5C1和5C1衍生抗体的CDR序列包含重链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:13-15,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:16-18。在Chothia编码下,重链可变结构域的CDR序列在SEQ ID NOs:37-39中示出,并且轻链可变结构域的CDR在SEQ ID NOs:40-42中示出。

[0108] 如通过Kabat编码定义的,5D10和5D10衍生抗体的CDR序列包含重链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:19-21,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NOs:22-24。在Chothia编码下,重链可变结构域的CDR序列在SEQ ID NOs:43-45中示出,并且轻链可变结构域的CDR在SEQ ID NOs:46-48中示出。

[0109] 还提供了人源化抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。由于存在不同的使小鼠抗体人源化的方法(例如,序列可以被不同的氨基酸替换),因此抗体的重链和轻链可以具有多于一种形式的人源化序列。人源化9H3抗体的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:53-55中示出。人源化9H3抗体的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:56-58中示出。这些重链可变区序列(SEQ ID NO:53-55)中的任一个可与这些轻链可变区序列(SEQ ID NO:56-58)中的任一个配对。

[0110] 类似地,人源化9A4抗体的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:59-61中示出。人源化9A4抗体的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:62-65中示出。这些重链可变区序列(SEQ ID NO:59-61)中的任一个可与这些轻链可变区序列(SEQ ID NO:62-65)中的任

一个配对。

[0111] 人源化5C1抗体的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:66-68中示出。人源化5C1抗体的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:69-72中示出。这些重链可变区序列(SEQ ID NOs:66-68)中的任一个可以与这些轻链可变区序列(SEQ ID NOs:69-72)中的任一个配对。

[0112] 人源化5D10抗体的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:73-75中示出。人源化5D10抗体的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NOs:76-78中示出。这些重链可变区序列(SEQ ID NOs:73-75)中的任一个可以与这些轻链可变区序列(SEQ ID NOs:76-78)中的任一个配对。

[0113] 如图34所示,人源化百分比是指与国际免疫遗传学信息系统

(International Immunogenetics Information System,IMGT)数据库中的人抗体序列相比的重链或轻链可变区序列的百分比同一性。最高命中(top hit)是指相对于其他物种,重链或轻链可变区序列更接近特定物种。例如,最高命中于人是指相对于其他物种,序列更接近人。最高命中于人和食蟹猴(*Macaca fascicularis*)意味着序列与人序列和食蟹猴序列具有相同的百分比同一性,并且与其他物种的序列相比,这些百分比同一性最高。在一些实施方案中,人源化百分比为大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。关于如何确定人源化百分比以及如何确定最高命中的详细描述在本领域中是已知的,并且描述在例如以下中:Jones, Tim D., et al. "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs. Vol. 8. No. 1. Taylor&Francis, 2016, 其通过引用整体并入本文。高的人源化百分比通常具有多个优点,例如,在人中更安全和更有效,更容易被人对象耐受和/或不太可能具有副作用。

[0114] 此外,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可包含一个、两个或三个重链可变区CDR,其选自SEQ ID NOs:1-3、SEQ ID NOs:7-9、SEQ ID NOs:13-15、SEQ ID NOs:19-21、SEQ ID NOs:25-27、SEQ ID NOs:31-33、SEQ ID NOs:37-39和SEQ ID NOs:43-45;和/或一个、两个或三个轻链可变区CDR,其选自SEQ ID NOs:4-6、SEQ ID NOs 10-12、SEQ ID NOs:16-18、SEQ ID NOs 22-24、SEQ ID NOs 28-30、SEQ ID NOs34-36、SEQ ID NOs 40-42和SEQ ID NOs 46-48。

[0115] 在一些实施方案中,抗体可具有:包含互补决定区(CDRs)1、2、3的重链可变区(VH),其中CDR1区包含与所选VH CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,CDR2区包含与所选VH CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,并且CDR3区包含与所选VH CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成;以及包含CDR 1、2、3的轻链可变区(VL),其中CDR1区包含与所选VL CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,CDR2区包含与所选VL CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,并且CDR3区包含与所选VL CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。所选VH CDR 1、2、3氨基酸序列和所选VL CDR1、2、3氨基酸序列在图31(Kabat CDR)和图32(Chothia CDR)中示出。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:1;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:2;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:3。

[0117] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:7;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:8;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:9。

[0118] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:13;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:14;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:15。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:19;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:20;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:21。

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:25;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:26;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:27。

[0121] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:31;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:32;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:33。

[0122] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:37;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:38;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:39。

[0123] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:43;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:44;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:45。

[0124] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:4;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:5;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:6。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:10;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:11;具有0、1或2

个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:12。

[0126] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:16;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:17;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:18。

[0127] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:22;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:23;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:24。

[0128] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:28;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:29;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:30。

[0129] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:34;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:35;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:36。

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:40;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:41;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:42。

[0131] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含以下CDR中的一个、两个或三个:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:46;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:47;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:48。

[0132] 插入、缺失和替换可在CDR序列内,或在CDR序列的一个或两个末端。

[0133] 本公开内容还提供了结合OX40的抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段包含:重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含与所选VH序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成;以及轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含与所选VL序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,所选VH序列是SEQ ID NOs:53、54、55或79,并且所选VL序列是SEQ ID NOs:56、57、58或80。在一些实施方案中,所选VH序列是SEQ ID NOs:59、60、61或81,并且所选VL序列是SEQ ID NOs:62、63、64、65或82。在一些实施方案中,所选VH序列是SEQ ID NOs:66、67、68或83,并且所选VL序列是SEQ ID NOs:69、70、71、72或84。在一些实施方案中,所选VH序列是SEQ ID NOs:73、74、75或85,并且所选VL序列是SEQ ID NOs:76、77、78或86。

[0134] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,将序列出于最佳比较目的而对齐(例如,可在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个中引入缺口以用于最佳对齐,并且出于比较目的可忽略非同源序列)。出于比较目的而对齐的参考序列的长度为参考序列的长度的至少80%,并且在一些实施方案中为至少90%、95%或100%。然后比

较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置与第二序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置处相同。两个序列之间的百分比同一性是在考虑为了两个序列的最佳对齐而需要引入的缺口数目和每个缺口的长度的情况下,序列共有的相同位置的数目的函数。为了本公开内容的目的,序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用Blossum 62评分矩阵来完成,其中空位罚分为12,空位延伸罚分为4并且移码空位罚分为5。

[0135] 本公开内容还提供了核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含免疫球蛋白重链或免疫球蛋白重链。免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链包含如图31或图32中所示的CDR,或者具有如图34或图35中所示的序列。当多肽与相应的多肽(例如,相应的重链可变区或相应的轻链可变区)配对时,配对的多肽与OX40(例如人OX40)结合。

[0136] 抗OX40抗体和抗原结合片段也可以是抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物),和多特异性(例如双特异性)抗体或抗体片段。本文提供的另外的抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体(多聚体抗体,例如双特异性抗体)、人抗体、嵌合抗体(例如人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内产生的抗体(即胞内抗体(intrabody)),及其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是IgG抗体或其抗原结合片段。

[0137] 抗体的片段适合用于所提供的方法,只要其保留了全长抗体的期望亲和力和特异性即可。因此,结合OX40的抗体的片段将保留结合OX40的能力。Fv片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,所述缔合在性质上可以是共价的,例如在scFv中。以此配置,每个可变结构域的三个CDR相互作用以定义在VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。六个CDR或其子集共同为抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或Fv的仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的一半)也可具有识别和结合抗原的能力,但是通常亲和力低于整个结合位点。

[0138] 单链Fv或(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域(或区域),其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽在VH和VL结构域之间还包含多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的期望结构。

[0139] Fab片段包含轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂抗体片段包含一对Fab片段,它们通常在其羧基末端附近通过其之间的铰链半胱氨酸共价连接。抗体片段的其他化学偶联在本领域中也是已知的。

[0140] 双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一条多肽链中的与VL连接的VH(VH和VL)。通过使用太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0141] 线性抗体包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0142] 本公开内容的抗体和抗体片段可在Fc区中进行修饰以提供期望的效应子功能或血清半衰期。

[0143] 抗体的多聚化可通过抗体的天然聚集或通过本领域已知的化学或重组连接技术

来实现。例如，一定百分比的纯化的抗体制备物(例如，纯化的IgG1分子)自发形成包含抗体同二聚体和其他更高阶抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0144] 或者，可通过本领域已知的化学连接技术形成抗体同型二聚体。例如，可使用异型双功能交联剂来形成抗体多聚体，所述交联剂包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)和SATA(N-琥珀酰亚胺基S-乙酰基硫代-乙酰胺)。Ghetie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:7509-7514, 1997) 描述了用于形成抗体同型二聚体的示例性方案。可通过用胃蛋白酶消化将抗体同型二聚体转化为Fab' ₂同型二聚体。形成抗体同型二聚体的另一种方法是通过使用Zhao et al. (J. Immunol. 25:396-404, 2002) 中所述的自亲性 (autophilic) T15肽。

[0145] 在一些实施方案中，多特异性抗体是双特异性抗体。双特异性抗体可通过改造一对抗体分子之间的界面以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化来制备。例如，界面可包含抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在该方法中，将来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链替换为较大的侧链(例如，酪氨酸或色氨酸)。针对大侧链的相同或相似尺寸的补偿性“腔”在第二抗体分子的界面上通过将较大的氨基酸侧链替换为较小的侧链(例如，丙氨酸或苏氨酸)产生。这提供了一种提高异二聚体相对于其他不需要的最终产物(例如同二聚体)的产量的机制。例如在W0 96/27011中描述了该方法，其通过引用整体并入。

[0146] 双特异性抗体包括交联抗体或“异缀合物”抗体。例如，异缀合物中的一种抗体可与抗生物素蛋白偶联，并且另一种与生物素偶联。异缀合物抗体也可使用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂和交联技术在本领域中是公知的，并且在美国专利No. 4,676,980中公开，该专利通过引用整体并入本文。

[0147] 由抗体片段产生双特异性抗体的方法也是本领域已知的。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al. (Science 229:81, 1985) 描述了将完整抗体经蛋白水解切割以产生F(ab')₂片段的方法。在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下使这些片段还原，以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫化物的形成。然后将产生的Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺将一种Fab' TNB衍生物还原重新转化为Fab' 硫醇，并与等摩尔量的另一种Fab' TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。

[0148] 本文所述的任何抗体或抗原结合片段可与稳定化分子(例如，提高抗体或其抗原结合片段在对象体内或溶液中的半衰期的分子)缀合。稳定化分子的非限制性实例包括：聚合物(例如，聚乙二醇)或蛋白质(例如，血清白蛋白，例如人血清白蛋白)。稳定化分子的缀合可延长抗体或抗原结合片段在体外(例如，在组织培养物中或当以药物组合物形式储存时)或在体内(例如，在人中)的半衰期或提高其生物活性。

[0149] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以与治疗剂缀合。包含抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物可以与治疗剂共价或非共价结合。在一些实施方案中，治疗剂是细胞毒性剂或细胞抑制剂(例如，细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羧基炭疽菌素、美登素类(例如DM-1和DM-4)、二酮类、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酸胺，及类似物)。

抗体特性

[0150] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可阻断OX40与OX40L之间的结合。

[0151] 在一些实施方案中,通过结合OX40,抗体可以促进OX40信号传导途径并上调免疫应答。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段是OX40激动剂。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是OX40拮抗剂。

[0152] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以使免疫应答、OX40的活性、T细胞(例如,CD8⁺和/或CD4⁺细胞)的活性或数目提高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可使Treg的活性或数目降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。

[0153] 在一些实施方式中,抗体(或其抗原结合片段)以以下解离速率(koff)特异性结合OX40(例如人OX40、猴OX40、小鼠OX40和/或嵌合OX40):小于 $0.1s^{-1}$ 、小于 $0.01s^{-1}$ 、小于 $0.001s^{-1}$ 、小于 $0.0001s^{-1}$ 或小于 $0.0001s^{-1}$ 。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于 $0.01s^{-1}$ 、大于 $0.001s^{-1}$ 、大于 $0.0001s^{-1}$ 、大于 $0.0001s^{-1}$ 或大于 $0.00001s^{-1}$ 。

[0154] 在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)大于 $1 \times 10^2/Ms$ 、大于 $1 \times 10^3/Ms$ 、大于 $1 \times 10^4/Ms$ 、大于 $1 \times 10^5/Ms$ 或大于 $1 \times 10^6/Ms$ 。在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)小于 $1 \times 10^5/Ms$ 、小于 $1 \times 10^6/Ms$ 或小于 $1 \times 10^7/Ms$ 。

[0155] 可以由动力学速率常数的商($KD=koff/kon$)推导亲和力。在一些实施方案中,KD小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。在一些实施方案中,KD为小于30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,KD大于 $1 \times 10^{-7}M$ 、大于 $1 \times 10^{-8}M$ 、大于 $1 \times 10^{-9}M$ 、大于 $1 \times 10^{-10}M$ 、大于 $1 \times 10^{-11}M$ 或大于 $1 \times 10^{-12}M$ 。在一些实施方案中,抗体以小于或等于约1.5nM的KD与人OX40结合。

[0156] 用于测量抗体对抗原的亲和力的一般技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)。在一些实施方案中,抗体结合人OX40(SEQ ID NO: 49)、猴OX40(例如恒河猴OX40, SEQ ID NO: 51)、嵌合OX40(SEQ ID NO: 52)和/或小鼠OX40(SEQ ID NO: 50)。在一些实施方案中,抗体不结合人OX40(SEQ ID NO: 49)、猴OX40

(例如恒河猴OX40, SEQ ID NO: 51; 食蟹猴OX40)、嵌合OX40(SEQ ID NO: 52)和/或小鼠OX40(SEQ ID NO: 50)。

[0157] 在一些实施方案中,确定热稳定性。本文所述的抗体或抗原结合片段的 T_m 可以为大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95°C。由于IgG可以描述为多结构域蛋白,因此熔解曲线有时会显示两次转变,即第一变性温度 T_m D1和第二变性温度 T_m D2。这两个峰的存在通常分别指示Fc结构域(T_m D1)和Fab结构域(T_m D2)的变性。当存在两个峰时, T_m 通常是指 T_m D2。

[0158] 因此,在一些实施方案中,如本文所述的抗体或抗原结合片段的 T_m D1为大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95°C。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的 T_m D2为大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95°C。

[0159] 在一些实施方案中, T_m 、 T_m D1、 T_m D2为小于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95°C。

[0160] 在一些实施方案中, 抗体的肿瘤生长抑制百分比 (TGI%) 为大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。在一些实施方案中, 抗体的肿瘤生长抑制百分比为小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。TGI%可例如在治疗开始之后3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天时或者在治疗开始之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月时确定。如本文所用, 使用下式计算肿瘤生长抑制百分比 (TGI%) :

$$TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

T_i 是第*i*天治疗组的平均肿瘤体积。 T_0 是第0天治疗组的平均肿瘤体积。 V_i 是第*i*天对照组的平均肿瘤体积。 V_0 是第0天对照组的平均肿瘤体积。

[0161] 在一些实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合片段是OX40激动剂。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段在表达OX40的靶细胞中提高OX40信号转导。在一些实施方案中, 通过监测NF κ B下游信号传导来检测OX40信号转导。

[0162] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段例如通过提高CD4+效应T细胞增殖和/或提高CD4+效应T细胞的 γ 干扰素产生(例如, 与用抗体或抗原结合片段治疗之前的增殖和/或细胞因子产生相比)来增强CD4+效应T细胞功能。在一些实施方案中, 细胞因子是 γ 干扰素。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段提高肿瘤内(浸润)CD4+效应T细胞的数目(例如, CD4+效应T细胞的总数, 或例如CD45+细胞中CD4+细胞的百分比), 例如与用抗体或抗原结合片段治疗之前的肿瘤内(浸润)CD4+ T细胞的数目相比。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段提高表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD4+效应T细胞的数目(例如, 总的表达 γ 干扰素的CD4+细胞, 或例如总CD4+细胞中表达 γ 干扰素的CD4+细胞的百分比), 例如与治疗之前的表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD4+ T细胞的数目相比。

[0163] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段提高肿瘤内(浸润)CD8+效应T细胞的数目(例如, CD8+效应T细胞的总数, 或例如CD45+细胞中CD8+细胞的百分比), 例如与治疗之前的肿瘤内(浸润)CD8+ T效应细胞的数目相比。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段提高表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD8+效应T细胞的数目(例如总CD8+细胞中表达 γ 干扰素的CD8+细胞的百分比), 例如与用抗人OX40抗体治疗之前的表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD8+ T细胞的数目相比。

[0164] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段例如通过提高记忆T细胞增殖和/或提高记忆细胞的细胞因子(例如, γ 干扰素)产生来增强记忆T细胞功能。

[0165] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段例如通过降低对效应T细胞功能(例如, 效应T细胞增殖和/或效应T细胞细胞因子分泌)的Treg抑制来抑制Treg功能。在一些实施方案中, 效应T细胞是CD4+效应T细胞。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段降低肿瘤内(浸润)Treg的数目(例如Treg的总数, 或例如CD4+细胞中Foxp3+细胞的百分比)。

[0166] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段是消耗性抗hOX40抗体(例如, 消耗表达人OX40的细胞)。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段在体外消耗表达人OX40的细胞。

在一些实施方案中,人OX40表达细胞是CD4+效应T细胞或Treg细胞。在一些实施方案中,消耗是通过ADCC和/或吞噬作用来进行。

[0167] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是吞噬作用。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是ADCC和吞噬作用。在一些实施方案中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0168] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段在表达OX40的细胞(例如,Treg)中不诱导凋亡。

[0169] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,抗体或抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

制备抗OX40抗体的方法

[0170] 可使用用于多克隆抗体和单克隆抗体制备的标准技术将人OX40的分离片段用作免疫原以产生抗体。可通过多次注射(例如皮下或腹腔注射)抗原性肽或蛋白质在动物中产生多克隆抗体。在一些实施方案中,抗原性肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施方案中,抗原性肽或蛋白质可与在待免疫接种的物种中具有免疫原性的试剂缀合。可向动物注射抗原性肽或蛋白质多于一次(例如两次、三次或四次)。

[0171] 可使用全长多肽或蛋白质,或者替代地,可使用其抗原性肽片段作为免疫原。蛋白质的抗原性肽包含OX40的氨基酸序列的至少8(例如,至少10、15、20或30)个氨基酸残基,并且包含蛋白质的表位,使得针对该肽产生的抗体与蛋白质形成特异性免疫复合物。如上所述,人OX40的全长序列是本领域已知的(SEQ ID NO:49)。

[0172] 免疫原通常用于通过免疫接种合适的对象(例如人或表达至少一个人免疫球蛋白基因座的转基因动物)来制备抗体。合适的免疫原性制备物可包含例如重组表达或化学合成的多肽(例如人OX40的片段)。该制备物可进一步包含佐剂,例如弗氏完全或不完全佐剂,或类似的免疫刺激剂。

[0173] 可如上所述通过用OX40多肽或其抗原性肽(例如,OX40的一部分)作为免疫原对合适的对象进行免疫接种来制备多克隆抗体。可通过标准技术随时间监测经免疫接种对象中的抗体效价,例如使用固定化OX40多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)。如果需要,可从哺乳动物中(例如从血液中)分离抗体分子,并通过公知的技术例如蛋白A或蛋白G色谱进一步纯化以获得IgG部分。在免疫接种之后的适当时间,例如,当特异性抗体效价最高时,可从对象获得产生抗体的细胞,并用于通过标准技术制备单克隆抗体,例如Kohler et al. (Nature 256:495-497,1975)最初所述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunol. Today 4:72,1983)、EBV-杂交瘤技术(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985)或三瘤体(trioma)技术。用于产生杂交瘤的技术是公知的(一般参见, Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY)。通过例如使用标准ELISA测定筛选杂交瘤培养物上清液中结合目标多肽或表位的抗体来检测产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0174] 可通过将适当的核苷酸改变引入编码本文所述的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、或其抗原结合片段的DNA中或通过肽合成来制备本文所述的抗体或抗原结合片段的变体。这样的变体包括例如构成抗体或抗原结合结构域的抗原结合位点的氨基酸序列中残基

的缺失、插入或替换。在这样的变体的群体中，一些抗体或抗原结合片段将对靶蛋白（例如 OX40）具有提高的亲合力。可进行缺失、插入和/或组合的任意组合以获得对靶标具有提高的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入抗体或抗原结合片段中的氨基酸变化也可改变抗体或抗原结合片段或向其中引入新的翻译后修饰，例如改变（例如，增加或减少）糖基化位点的数量、改变糖基化位点的类型（例如，改变氨基酸序列以使通过细胞中存在的酶附着不同的糖），或引入新的糖基化位点。

[0175] 本文公开的抗体可来源于任何动物物种，包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括来源于以下的抗体：人、灵长类（例如猴和猿）、牛、猪、马、绵羊、骆驼科（例如骆驼和美洲驼）、鸡、山羊和啮齿动物（例如大鼠、小鼠、仓鼠和兔），包括经过基因改造以产生人抗体的转基因啮齿动物。

[0176] 人抗体和人源化抗体包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列（或与来源于其的那些具有相同的氨基酸序列）的可变区和恒定区的抗体。人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变），例如在CDR中。

[0177] 人源化抗体通常具有移植非人CDR的人框架（FR）。因此，人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或更多氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入（import）”残基，其通常取自“输入”可变结构域。人源化可基本上通过例如用啮齿动物CDR或CDR序列替代人抗体的相应序列来进行。这些方法在例如以下中描述：Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988); 其各自通过引用整体并入本文。因此，“人源化”抗体是嵌合抗体，其中基本上少于完整的人V结构域已被来自非人物种的相应序列替换。实际上，人源化抗体通常是小鼠抗体，其中一些CDR残基和一些FR残基被来自人抗体中类似位点的残基替换。

[0178] 用于制备人源化抗体的人VH和VL结构域的选择对于降低免疫原性非常重要。根据所谓的“最佳拟合”方法，针对已知人结构域序列的整个文库筛选小鼠抗体的V结构域的序列。然后将最接近小鼠的序列的人序列作为人源化抗体的人FR（Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)）。

[0179] 进一步重要的是将抗体进行人源化，同时保留对抗原的高特异性和亲合力以及其他有利的生物学特性。为了实现该目的，可通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型对亲本序列和各种概念性人源化产物进行分析的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可获得的并且为本领域技术人员所熟悉。说明并展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用，即，分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式，可从接受体序列和输入序列中选择FR残基并进行组合，从而获得期望的抗体特征，例如对靶抗原的提高了的亲合力。

[0180] 通常，人、人源化或嵌合抗OX40抗体的氨基酸序列变体将包含与原始抗体的轻链或重链中存在的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%百分比同一性的氨基酸序列。

[0181] 相对于原始序列的同一性或同源性通常是在将序列对齐并引入缺口（如果必要的

话)以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守替换视为序列同一性的一部分的情况下,候选序列中存在的与人、人源化或嵌合抗OX40抗体或片段中存在的序列相同的氨基酸残基的百分比。

[0182] 可以对抗OX40抗体或抗原结合片段进行另外的修饰。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区域中,从而允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可具有任何提高的体外和/或体内半衰期。还可使用异双官能交联剂制备具有延长的体外和/或体内半衰期的同二聚体抗体,如例如,Wolff et al. (Cancer Res.53:2560-2565,1993)中所述。或者,可以改造具有两个Fc区的抗体(参见,例如,Stevenson et al.,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230,1989)。

[0183] 在一些实施方案中,可以对抗OX40抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可通过化学或酶促合成,或通过酶促或化学裂解来进行。通过使抗体或片段的所靶向氨基酸残基与能够与所选侧链或者N或C末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰引入分子中。

[0184] 在一些实施方案中,提供了具有糖结构的抗体变体,其缺乏衔接(直接或间接)于Fc区域的岩藻糖。例如,这样的抗体中岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量如例如W02008/077546中所述如通过MALDI-TOF质谱测量的通过计算相对于衔接于Asn297的全部糖结构(例如复杂、杂合和高甘露糖结构)的总和的在Asn297处糖链中岩藻糖的平均量来确定。Asn297是指位于Fc区中约第297位(Fc区残基的Eu编号;或Kabat编号中的第314位)的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于在第297位上游或下游的约±3个氨基酸,即在第294位至第300位之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。在一些实施方案中,为了降低聚糖的异质性,可以进一步改造抗体的Fc区以用丙氨酸代替在第297位的天冬酰胺(N297A)。

重组载体

[0185] 本公开内容还提供了包含本文公开的分离的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸)的重组载体(例如表达载体),其中引入重组载体的宿主细胞(即,使得宿主细胞包含多核苷酸和/或含有多核苷酸的载体),以及通过重组技术的重组抗体多肽或其片段的产生。

[0186] 如本文所用,“载体”是当将载体引入宿主细胞中时能够将一种或更多种目的多核苷酸递送至宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够递送一种或更多种目的多核苷酸并且在已引入表达载体的宿主细胞中将一种或更多种目的多核苷酸表达为编码的多肽。因此,在表达载体中,通过与在载体中或在宿主细胞基因组中的调控元件例如启动子、增强子和/或poly-A尾可操作地连接,将目的多核苷酸定位用于在载体中表达,所述调控元件在目的多核苷酸的整合位点处或附近或侧翼,使得目的多核苷酸将在引入了表达载体的宿主细胞中翻译。

[0187] 可通过本领域已知的方法例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染和感染和/或转导(例如用重组病毒进行)来将载体引入宿主细胞中。因此,载体的非限制性实例包括病毒载体(其可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、黏粒、噬菌体载体以及与阳离子凝缩剂缔合的DNA或RNA表达载体。

[0188] 在一些实施方式中,使用病毒表达系统(例如牛痘病毒或其他痘病毒、逆转录病毒

或腺病毒)引入本文公开的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸),这可涉及使用非致病性(缺陷型)的可复制型病毒,或可使用复制缺陷型病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常只会在互补的病毒包装细胞中发生。合适的系统公开于例如以下中:Fisher-Hoch et al.,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321;Flexner et al.,1989,Ann.N.Y.Acad.Sci.569:86-103;Flexner et al.,1990,Vaccine,8:17-21;U.S.Pat.No.4,603,112,4,769,330和5,017,487;WO 89/01973;U.S.Pat.No.4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner-Biotechniques,6:616-627,1988;Rosenfeld et al.,1991,Science,252:431-434;Kolls et al.,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:215-219;Kass-Eisler et al.,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:11498-11502;Guzman et al.,1993,Circulation,88:2838-2848;以及Guzman et al.,1993,Cir.Res.,73:1202-1207。将DNA并入这样的表达系统中的技术是本领域普通技术人员公知的。DNA也可以是“裸”的,如例如Ulmer et al.,1993,Science,259:1745-1749和Cohen,1993,Science,259:1691-1692中所述。可通过将DNA包被在生物可降解的珠上来提高裸DNA的摄取,所述珠有效地转运到细胞中。

[0189] 为了表达,可将包含本文公开的编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入物有效连接至合适的启动子(例如异源启动子),例如噬菌体 λ PL启动子,大肠杆菌(*E. coli*) lac、trp和tac启动子,SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子等。其他合适的启动子是技术人员已知的。表达构建体可进一步包含用于转录起始、终止的位点,以及在转录区域中的用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录物的编码部分可以包含在起始处的翻译起点和适当地位于待翻译多肽末端的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0190] 如所示的,表达载体可包含至少一种选择标记。这样的标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,以及用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素或氨基青霉素抗性基因。合适宿主的一些代表性实例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌、链霉菌(*Streptomyces*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的细胞;真菌细胞,例如酵母细胞;昆虫细胞,例如果蝇(*Drosophila*) S2和夜蛾(*Spodoptera*) Sf9细胞;动物细胞,例如CHO、COS、Bowes黑色素瘤和HK 293细胞;和植物细胞。本文所述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。

[0191] 用于细菌的非限制性载体包括可获自Qiagen的pQE70、pQE60和pQE-9;可获自Stratagene的pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A;以及可获自Pharmacia的ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。非限制性的真核载体包括可获自Stratagene的pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;以及可获自Pharmacia的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对于技术人员将是显而易见的。

[0192] 适合使用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、 λ PR和PL启动子以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、SV40早期和晚期启动子、逆转录病毒LTR的启动子,例如劳斯肉瘤病毒(*Rous sarcoma virus*, RSV)的启动子,以及金属硫蛋白启动子,例如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0193] 在酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可使用许多含有组成型或诱导型启动子(例如 α 因子、醇氧化酶和PGH)的载体。综述参见Ausubel et al.(1989)Current

Protocols In Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, N.Y., 以及 Grant et al., Methods Enzymol., 153:516-544 (1997)。

[0194] 可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法实现将构建体引入宿主细胞中。在许多标准实验室手册中描述了这样的方法,例如 Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)。

[0195] 可通过将增强子序列插入载体中来提高高等真核生物对编码本公开内容的抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,其在给定宿主细胞类型中起提高启动子的转录活性的作用。增强子的一些实例包括于碱基对100至270处位于复制起点的后侧的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点的后侧的多瘤病毒增强子,和腺病毒增强子。

[0196] 为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔中、周质空间中或细胞外环境中,可将合适的分泌信号并入表达的多肽中。信号可以针对多肽是内源性的,或者其可以是异源信号。

[0197] 多肽(例如抗体)可以以经修饰形式(例如融合蛋白(例如GST-融合体)或具有组氨酸标签)表达,并且不仅可包含分泌信号,而且还可包含另外的异源性功能区。例如,可向多肽的N末端添加另外的氨基酸(特别是带电荷氨基酸)的区域,以改善在宿主细胞中、在纯化期间或在随后的处理和储存期间的稳定性和持久性。另外,可以向多肽添加肽部分以便于纯化。可在最终制备多肽之前除去这些区域。向多肽添加肽部分以引起分泌或排泄、以提高稳定性和便于纯化等是本领域熟知且常规的技术。

治疗方法

[0198] 本公开内容的抗体或其抗原结合片段可用于多种治疗目的。一方面,本公开内容提供了用于治疗对象中癌症的方法、降低对象中肿瘤的体积随时间增大的速率的方法、降低发生转移的风险的方法、或降低在对象中发生额外的转移的风险的方法。在一些实施方案中,治疗可停止、减慢、延迟或抑制癌症的进展。在一些实施方案中,治疗可导致对象中癌症的一种或更多种症状的数量、严重程度和/或持续时间降低。

[0199] 在一方面,本公开内容的特征在于方法,所述方法包括将治疗有效量的本文公开的抗体或其抗原结合片段施用于有此需要的对象(例如,患有癌症或被鉴定或诊断为患有癌症的对象),例如,乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、类癌、宫颈癌、子宫内膜癌、胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、结直肠癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌或恶性血液病。在一些实施方案中,癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌或转移性激素难治性前列腺癌。在一些实施方案中,对象患有实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。

[0200] 在一些实施方案中,本文公开的组合物和方法可以用于治疗有癌症风险的患者。可通过本领域已知的多种方法来鉴定患有癌症的患者。

[0201] 如本文所用,“有效量”意指足以产生有益或期望结果(包括停止、减慢、延迟或抑制疾病例如癌症的进展)的量或剂量。有效量将根据例如以下而变化:待施用抗体、抗原结合片段、编码抗体的多核苷酸、包含多核苷酸的载体、和/或其组合物的个体的年龄和体重,症状的严重程度和施用途径,并且因此可根据个人情况决定施用。

[0202] 可在一次或更多次施用中施用有效量。举例来说,抗体或抗原结合片段的有效量

是足以改善、停止、稳定、逆转、抑制、减慢和/或延迟患者中癌症进展的量,或者是在体外足以改善、停止、稳定、逆转、减慢和/或延迟细胞(例如,活检细胞、本文所述的任何癌细胞、或细胞系(例如,癌细胞系))的增殖的量。如本领域所理解的,抗体或抗原结合片段的有效量可以变化,这尤其取决于患者的病史以及其他因素,例如所使用的抗体的类型(和/或剂量)。

[0203] 可凭经验确定施用本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的有效量和时间表,并且进行这样的确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将根据例如以下而变化:例如,将接受本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的哺乳动物,施用途径,使用的本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗原结合片段和/或组合物的具体类型,以及哺乳动物施用的其他药物。选择抗体或抗原结合片段的合适剂量的指南可在关于抗体和抗原结合片段的治疗用途的文献中找到,例如,Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch.22 and pp.303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, pp.365-389。

[0204] 抗体的有效量的典型日剂量为0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施方案中,剂量为约10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0205] 在本文描述的任何方法中,至少一种抗体、其抗原结合片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合片段或药物组合物)和任选地至少一种另外的治疗剂可至少一周一次(例如,一周一次、一周两次、一周三次、一周四次、一天一次、一天两次或一天三次)向对象施用。在一些实施方案中,在相同组合物(例如液体组合物)中施用至少两种不同的抗体和/或抗原结合片段。在一些实施方案中,在相同组合物(例如液体组合物)中施用至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂。在一些实施方案中,至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂在两种不同的组合物(例如,包含至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和包含至少一种另外的治疗剂的固体经口组合物)中施用。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂以丸剂、片剂或胶囊剂施用。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂为缓释口服制剂。

[0206] 在一些实施方案中,可在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)之前或之后向对象施用一种或更多种另外的治疗剂。在一些实施方案中,向对象施用一种或更多种另外的治疗剂和至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物),使得在对象中一种或更多种另外的治疗剂与至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗原结合片段)的生物活性期存在重叠。

[0207] 在一些实施方案中,可在延长的时间段内(例如,在至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3

年、4年或5年的时间段内)向对象施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)。熟练的医学专业人员可使用本文所述的用于诊断或追踪治疗的有效性的任何方法(例如,观察癌症的至少一种症状)来确定治疗期的长度。如本文所述,基于对治疗有效性的评估(例如使用本文所述和本领域已知的任何方法),熟练的医学专业人员还可改变施用于对象的抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或更多种另外的治疗剂)的身份和数量(例如,增加或减少),并且还可调整(例如,提高或降低)向对象施用至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或更多种另外的治疗剂)的剂量或频率。

[0208] 在一些实施方案中,可以将一种或更多种另外的治疗剂施用给对象。所述另外的治疗剂可以包含一种或更多种选自以下的抑制剂:B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase,ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K/mTOR双重抑制剂、Bruton酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase,BTK)抑制剂、以及异柠檬酸脱氢酶1(Isocitrate dehydrogenase 1,IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(Isocitrate dehydrogenase 2,IDH2)的抑制剂。

[0209] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含一种或更多种选自以下的抑制剂:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化hedgehog信号传导途径的抑制剂和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0210] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含一种或更多种选自以下的治疗剂:曲贝替定(Trabectedin)、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、曲巴那尼(Trebananib)、帕唑帕尼(Pazopanib)、西地尼布(Cediranib)、帕博西尼(Palbociclib)、依维莫司(everolimus)、氟嘧啶、IFL、瑞戈非尼(regorafenib)、溶素(Reolysin)、力比泰(Alimta)、赞可达(Zykadia)、索坦(Sutent)、替西罗莫司(temsirrolimus)、阿昔替尼(axitinib)、依维莫司、索拉非尼(sorafenib)、维全特(Votrient)、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼(cabozantinib)、长春氟宁(Vinflunine)、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFN α 、长春碱、反应停(Thalomid)、达卡巴嗪(dacarbazine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、来那度胺(lenalidomide)、阿扎胞苷(azacytidine)、来那度胺、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙(pralatrexate)和恩扎妥林(enzastaurin)。

[0211] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含一种或更多种选自以下的治疗剂:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF) α 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择素(Selectin)激动剂。

[0212] 在一些实施方案中,将卡铂、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞(pemetrexed)、吉西他滨(gemcitabine)、FOLFOX或FOLFIRI施用给对象。

[0213] 在一些实施方案中,另外的治疗剂是抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0214] 修饰和使用抗OX40抗体的方法描述于例如US 20150307617中,其通过引用整体并入本文。

药物组合物和施用途径

[0215] 本文还提供了包含至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)本文所述的抗体或抗原结合片段的药物组合物。两种或更多种(例如,两种、三种或四种)本文所述的任何抗体或抗原结合片段可以以任意组合存在于药物组合物中。可以以本领域已知的任何方式配制药组合物。

[0216] 将药物组合物配制成与其预期的施用途径(例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹腔内)相容。组合物可包含无菌稀释剂(例如无菌水或盐水)、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂或抗真菌剂,例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及等渗剂,例如糖(例如葡萄糖)、多元醇(例如甘露醇或山梨糖醇)或盐(例如氯化钠);或其任意组合。脂质体悬浮液也可用作可药用载体(参见,例如,美国专利号4,522,811)。可配制组合物的制剂并将其封装在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在需要时(如在例如可注射制剂中),可通过例如使用包衣(例如卵磷脂)或表面活性剂来维持适当的流动性。可通过包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来延长抗体或其抗原结合片段的吸收。或者,可通过植入物和微囊化的递送系统来实现控制释放,该植入物和微囊化的递送系统可包含生物可降解的生物相容性聚合物(例如,乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸;Alza Corporation和Nova Pharmaceutical, Inc.)。

[0217] 包含一种或更多种本文所述的任何抗体或抗原结合片段的组合物可配制成以剂量单位形式(即,包含预定量的活性化合物的物理分散单元,以易于施用和剂量均匀)进行肠胃外(例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹腔内)施用。

[0218] 组合物的毒性和治疗效力可在细胞培养物或实验动物(例如猴)中通过标准药理学操作来确定。例如,可以确定LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗有效的剂量):治疗指数为LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的药剂是优选的。如果药剂表现出不期望的副作用,则应注意将潜在危害降到最低(即降低不想要的副作用)。毒性和治疗效力可通过其他标准药理学操作确定。

[0219] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制合适剂量的任何给定药剂以用于对象(例如人)。一种或更多种(例如,一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效量是这样的量:其在对象(例如被确定为患有癌症的人对象)中,或者被确定为处于疾病发生风险之中的对象(例如先前曾发生癌症但是现在已经治愈的对象)中治疗对象中的疾病(例如杀伤癌细胞),降低对象(例如人)中疾病的一种或更多种症状的严重程度、频率和/或持续时间。可以由健康护理专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法以及通过观察对象(例如,人)中疾病的一种或更多种症状来确定本文所述的任何抗体或抗原结合片段的有效性和剂量。某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量和时机(例如,疾病或病症的严重程度、先前的治疗、对象的总体健康和/或年龄以及其他疾病的存在)。

[0220] 示例性剂量包括每千克对象体重的数毫克或微克量的本文所述的任何抗体或抗原结合片段(例如,约1 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约50mg/kg;约10 μ g/kg至约5mg/kg;约10 μ g/kg至约0.5mg/kg;或约1 μ g/kg至约50 μ g/kg)。尽管

这些剂量涵盖了广泛的范围,但是本领域普通技术人员将理解,包括抗体及其抗原结合片段在内的治疗剂的功效不同,并且可通过本领域已知的方法确定有效量。通常,首先施用相对较低的剂量,并且主治健康护理专业人员或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(在仍处于研发阶段时)可随后并逐渐增加剂量,直到获得适当的响应。另外,应当理解,任何特定对象的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性,对象的年龄、体重、总体健康、性别和饮食,施用时间、施用途径、排泄速率以及抗体或抗体片段在体内的半衰期。

[0221] 药物组合物可与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。本公开内容还提供了制备用于本文所述的多种用途的抗体或其抗原结合片段的方法。

实施例

[0222] 在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

实施例1.产生小鼠抗hOX40抗体

[0223] 为了产生针对人OX40 (hOX40; SEQ ID NO:49) 的小鼠抗体,用人OX40免疫接种6-8周大的雌性BALB/c小鼠。通过如下所述的方法收集抗hOX40抗体(图1和图2)。

小鼠的免疫接种

[0224] 以100 μ g/ml的浓度以20 μ g/小鼠用经His标记的人OX40蛋白免疫接种6-8周大的雌性BALB/c小鼠。将经His标记的人OX40蛋白用佐剂乳化,并注射在小鼠背部的四个位置。对于第一次皮下(s.c.)注射,将稀释的抗原用等体积的完全弗氏佐剂(CFA)乳化。在随后的皮下注射中,将蛋白质用等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)乳化。在第三次注射或加强免疫接种之后三天,收集血液(血清)并使用ELISA分析抗体效价。

[0225] 在另一个实验中,通过将编码人OX40的表达质粒注射到小鼠中来免疫接种6-8周大的雌性BALB/c小鼠。通过使用基因枪以1000 μ g/ μ l的浓度以每只小鼠60 μ g将编码抗原的质粒注射到小鼠的胫骨前肌中(肌内注射;i.m.注射)。进行至少四次注射,每次注射之间间隔至少14天。在最后一次免疫接种之后7天收集血液(血清),并通过ELISA测试血清的抗体效价。

[0226] 在前一次免疫接种之后至少十四天还进行了增强免疫接种的程序(通过注射质粒或通过注射蛋白质)。将在表面表达OX40抗原的CHO细胞通过尾静脉静脉内注射到小鼠体内。然后在注射之后四天收集脾。

SP2/0细胞与脾细胞的融合

[0227] 研磨脾组织。首先通过CD3 ϵ 微珠和抗小鼠IgM微珠选择脾细胞,然后使其与SP2/0细胞融合。然后将细胞平板接种在具有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基的96孔板中。

杂交瘤的初步筛选

[0228] 根据标准程序,使用荧光激活细胞分选(Fluorescence-Activated Cell Sorting,FACS)对96孔板中的杂交瘤上清液进行初步筛选。在筛选之前,将中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞添加到96孔板中(每孔 2×10^4 个细胞)。使用50 μ l上清液。实验中使用的抗体是:

[0229] (1) 荧光素(FITC)缀合的AffiniPure F(ab)₂片段山羊抗小鼠IgG,Fc γ 片段特异性的;和

[0230] (2) AlexaFluor®647缀合的AffiniPure F(ab) 2片段山羊抗人IgG, Fc γ 片段特异性的。

亚克隆

[0231] 使用ClonePix2进行亚克隆。简单地说,将在初步筛选中鉴定出的阳性孔转移到半固体培养基中,并鉴定和测试IgG阳性克隆。使用FITC抗小鼠IgG Fc抗体。

腹水抗体

[0232] 将 1×10^6 个阳性杂交瘤细胞腹腔内注射至B-NDG®小鼠(北京百奥赛图,中国北京(Beijing Biocytogen, Beijing, China))。通过使杂交瘤细胞在小鼠腹腔内生长来产生单克隆抗体。杂交瘤细胞在小鼠腹部扩增并且产生腹水。腹水含有高浓度的抗体,可将其收获以备后用。

抗体纯化

[0233] 使用GE AKTA蛋白色谱(GE Healthcare, Chicago, Illinois, United States)纯化腹水中的抗体。07-9H3(“9H3”)、07-9A4(“9A4”)、11-5C1(“5C1”)、17-5D10(“5D10”)、08-6A11(“6A11”)和14-7F11(“7F11”)在通过上述方法产生的小鼠抗体之中。

[0234] 确定了一些抗体的VH、VL和CDR区。9H3的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示出在SEQ ID NOs:1-6(Kabat编号)或SEQ ID NOs:25-30(Chothia编号)中。

[0235] 9A4的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示出在SEQ ID NOs:7-12(Kabat编号)或SEQ ID NOs:31-36(Chothia编号)中。

[0236] 5C1的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示出在SEQ ID NOs:13-18(Kabat编号)或SEQ ID NOs:37-42(Chothia编号)中。

[0237] 5D10的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示出在SEQ ID NOs:19-24(Kabat编号)或SEQ ID NOs:43-48(Chothia编号)中。

实施例2. 小鼠抗体的人源化

[0238] 人源化的起点是小鼠抗体(例如9H3、9A4、5C1和5D10)。确定这些小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0239] 构建了9H3的三种人源化重链可变区变体(SEQ ID NOs:53-55)和三种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NOs:56-58),其包含不同的替换排列。

[0240] 构建了9A4的三种人源化重链可变区变体(SEQ ID NOs:59-61)和四种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NOs:62-65),其包含不同的替换排列。

[0241] 构建了5C1的三种人源化重链可变区变体(SEQ ID NOs:66-68)和四种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NOs:69-72),其包含不同的替换排列。

[0242] 构建了5D10的三种人源化重链可变区变体(SEQ ID NOs:73-75)和三种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NOs:76-78),其包含不同的替换排列。

[0243] 这些人源化重链可变区变体可以与任何相应的人源化轻链可变区变体组合。例如,可以将9H3-H1(SEQ ID NO:53)与任何9H3人源化轻链可变区变体(例如9H3-K2(SEQ ID NO:57))组合,并相应地标记抗体(例如9H3-H1K2)。

[0244] 然后使用BioLuminate 1.0(Schrodinger,中国上海)产生这些人源化抗体。

实施例3. 小鼠抗hOX40抗体的体外测试:阻断人OX40(hOX40)与人OX40L(hOX40L)的结合

[0245] 进行阻断测定以确定抗hOX40抗体是否可阻断hOX40与hOX40L之间的结合。

[0246] 从小鼠腹水中收集抗hOX40抗体,并通过色谱纯化。将25 μ l用人OX40瞬时转染的CHO细胞加入板中的每个孔中。将纯化的抗体滴定至终浓度为50、5、0.5、0.05、0.005 μ g/ml。将滴定的抗体在4 $^{\circ}$ C下以每孔25 μ l添加到每个孔中,并孵育30分钟。

[0247] 将hOX40L-Fc以1:200稀释。将50 μ l的配体溶液添加至每个孔。将细胞与hOX40L-Fc和抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育15分钟。

[0248] 在用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤两次之后,将50 μ l抗小鼠IgG Fc抗体藻红蛋白缀合物(抗mIgG Fc-PE)以1:500的稀释度以及抗人IgG Fc抗体异硫氰酸荧光素缀合物(抗hIgG Fc-FITC)以1:100的稀释度添加到每个孔中,在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后用PBS洗涤。通过流式细胞术确定FITC和PE的信号。

[0249] 如图3所示,当小鼠抗hOX40抗体9H3(“07-9H3”)的浓度提高时,FITC的信号降低,表明抗hOX40抗体阻断了人OX40与OX40L之间的结合。

实施例4. 抗hOX40抗体针对人OX40的结合活性

[0250] 从小鼠腹水中收集抗hOX40抗体,并通过色谱纯化。将25 μ l用人OX40瞬时转染的CHO细胞加入板中的每个孔中。将纯化的抗体滴定至终浓度为50、5、0.5、0.05、0.005 μ g/ml。将滴定的抗体在4 $^{\circ}$ C下以每孔25 μ l添加到每个孔中,并孵育30分钟。

[0251] 在用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤两次之后,将50 μ l抗小鼠IgG Fc抗体藻红蛋白缀合物(抗mIgG Fc-PE)以1:500的稀释度添加到每个孔中,在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后用PBS洗涤。通过流式细胞术确定PE的信号。

[0252] 如图4所示,当小鼠抗hOX40抗体9H3(“07-9H3”)的浓度提高时,PE的信号升高,表明9H3可以与人OX40结合。

实施例5. 抗hOX40抗体针对猴、小鼠和人-小鼠嵌合OX40(chiOX40)的交叉反应性

[0253] 用恒河猴OX40(rmOX40,SEQ ID NO:51)、小鼠OX40(mOX40,SEQ ID NO:50)和嵌合(小鼠和人)OX40(chiOX40,SEQ ID NO:52)转染CHO细胞。

[0254] 将25 μ l CHO细胞添加至每个孔。将25 μ l纯化的抗hOX40抗体(1 μ g/ml)(9H3或“07-9H3”)添加至每个孔,并在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。

[0255] 在用PBS(1200rpm,5分钟)洗涤两次之后,将50 μ l抗小鼠IgG Fc抗体异硫氰酸荧光素缀合物(抗mIgG Fc-FITC)以1:500的稀释度添加到每个孔中,并在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后用PBS洗涤(1200rpm,5分钟)。通过流式细胞术确定FITC的信号。

[0256] 如图5所示,9H3与小鼠OX40没有交叉反应,但是与rmOX40和嵌合OX40具有强交叉反应性。在图5中,NC代表阴性对照。

实施例6. 抗hOX40抗体的结合亲和力

[0257] 测试了抗体与hOX40的结合。抗体的亲和力通过装备有预先固定的蛋白A传感器芯片的表面等离子体共振(Biacore T200生物传感器,Biacore,INC,Piscataway N.J.)确定。

[0258] 将抗hOX40抗体9H3-mHvKv-IgG1(1 μ g/ml)以10 μ L/分钟进样到Biacore T200生物传感器中持续25秒,以达到期望的蛋白质密度(约112个响应单位(RU))。然后将浓度为100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625nM的人OX40蛋白(hOX40-His)以30 μ L/分钟进样120秒。监测解离300秒。在每种滴定度的最后进样之后用甘氨酸(pH 2.0,30 μ L/分钟持续12秒)将芯片再生。9H3-mHvKv-IgG1的结果示于图6中。

[0259] 通过使用Biacore T200评价软件3.0将数据全局拟合于1:1Langmuir结合模型来同时获得动力学缔合速率(kon)和解离速率(koff) (Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B.,1994.Methods Enzymology 6.99-110)。由动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导亲和力。

[0260] 对于所有其他受试抗体,进行相同的方法并对其参数(例如,抗体的浓度)进行必要的适当调整。下表总结了受试抗hOX40抗体的结果。

表1

抗hOX40抗体	缔合速率 kon (1/Ms)	解离速率 koff (1/s)	亲和力 KD (M)
9H3-mHvKv-IgG1	2.575E+05	5.938E-04	2.306E-09
9H3-H2K1-IgG1	2.230E+05	7.483E-04	3.355E-09
9H3-H2K2-IgG1	2.267E+05	8.696E-04	3.836E-09
9H3-H2K3-IgG1	2.543E+05	3.931E-04	1.546E-09
9H3-H3K1-IgG1	2.437E+05	6.059E-04	2.486E-09
9H3-H3K2-IgG1	1.923E+05	6.424E-04	3.341E-09
9H3-H3K3-IgG1	2.351E+05	4.509E-04	1.918E-09
5C1-mHvKv-IgG1	5.489E+04	1.633E-03	2.975E-08
5D10-mHvKv-IgG1	3.171E+05	1.474E-02	4.649E-08
9A4-mHvKv-IgG1	1.210E+05	6.693E-03	5.534E-08
9A4(小鼠抗体)	8.910E+04	1.922E-03	2.160E-08

[0261] 在这些受试抗体中,9A4是实施例1中的小鼠抗hOX40抗体。9H3-mHvKv-IgG1、5C1-mHvKv-IgG1、5D10-mHvKv-IgG1和9A4-mHvKv-IgG1是嵌合抗hOX40抗体。它们具有来自小鼠抗hOX40抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域,以及人IgG1抗体恒定结构域(CL、CH1、CH2、CH3)。

[0262] 9H3-H2K1-IgG1、9H3-H2K2-IgG1、9H3-H2K3-IgG1、9H3-H3K1-IgG1、9H3-H3K2-IgG1和9H3-H3K3-IgG1是人源化抗体。它们具有人IgG1抗体恒定结构域(CL、CH1、CH2、CH3)。中间的数字表示人源化可变结构域变体(图34)。例如,9H3-H2K1-IgG1具有人源化9H3重链可变结构域H2(SEQ ID NO:54)和人源化9H3轻链可变结构域K1(SEQ ID NO:56)。类似地,9H3-H2K3-IgG1具有人源化的9H3重链可变结构域H2(SEQ ID NO:54)和人源化的9H3轻链可变结构域K3(SEQ ID NO:58)。

实施例7.抗hOX40抗体的热稳定性

[0263] 使用Protein Thermal Shift™染料试剂盒(Thermo Fisher Scientific)和QuantStudio™ 5实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific)进行Thermofluor测定分析。该测定使用与在蛋白质展开时暴露的疏水性补丁结合的荧光染料测量热稳定性。

[0264] 实验是根据制造商的方案进行的。将2μL抗体、10.5μL水、5μL Protein Thermal Shift缓冲液和2.5μL稀释的Protein Thermal Shift染料混合。将样品以1.6℃/秒加热到25℃,然后以0.05℃/秒加热到99℃。

[0265] 由于IgG可以描述为多结构域蛋白,因此溶解曲线通常显示两次转变,即第一变性温度Tm D1和第二变性温度Tm D2。这两个峰的存在通常分别指示Fc和Fab结构域的变性。但是,在一些情况下,只能观察到一个峰。

[0266] 下表总结了多种抗hOX40抗体的Tm。如果有两次转变,则下表中的Tm D2视为Tm。

表2

抗体	可变结构域	类型 (恒定结构域)	热稳定性 (T_m)
9H3 (小鼠抗体)	mHvKv	小鼠 IgG	74.94
9H3 嵌合抗体	mHvKv	人 IgG1	79.12
		人 IgG2	79.68
		人 IgG4	78.72
		具有N297A突变的人 IgG1	80.31
9H3 人源化抗体	H2K1	人 IgG1	73.93
	H2K2	人 IgG1	74.08
	H2K3	人 IgG1	73.49
	H3K1	人 IgG1	81.18
		人 IgG2	81.47
		人 IgG4	80.59
		人 IgG1-N297A	81.92
	H3K3	人 IgG1	81.62
		人 IgG2	81.47
		人 IgG4	80.29
		人 IgG1-N297A	81.62
	9A4 嵌合抗体	mHvKv	人 IgG1
9A4 人源化抗体	H1K1	人 IgG1	85.33
	H1K2	人 IgG1	84.89
	H2K1	人 IgG1	84.30
	H2K2	人 IgG1	83.04
5C1 嵌合抗体	mHvKv	人 IgG1	71.21
5C1 人源化抗体	H1K1	人 IgG1	82.52
	H1K2	人 IgG1	82.82
	H1K3	人 IgG1	82.59
	H1K4	人 IgG1	83.56
	H2K2	人 IgG1	83.26
	H2K3	人 IgG1	82.67
	H2K4	人 IgG1	83.63
	H3K1	人 IgG1	79.12
	H3K2	人 IgG1	79.64

	H3K3	人 IgG1	79.12
	H3K4	人 IgG1	79.93
5D10 嵌合抗体	mHvKv	人 IgG1	74.39
5D10 人源化抗体	H1K1	人 IgG1	86.51
	H1K2	人 IgG1	87.10
	H2K1	人 IgG1	86.59
	H2K2	人 IgG1	87.10

[0267] 在表2中,除9H3小鼠抗体外,所有抗体是嵌合抗体或人源化抗体。这些抗体的名称和序列在下面列出。名称指示抗体的来源、可变区和恒定区。例如,在本公开内容中,具有人源化重链可变区H1和人源化轻链可变区K1以及人IgG1恒定区的人源化5D10抗体被标记为5D10-H1K1-IgG1。类似地,具有小鼠VH和VL以及人IgG1恒定区的5C1嵌合抗体被标记为5C1-mHvKv-IgG1。此外,为了降低聚糖的异质性,一些抗体的Fc区被进一步改造为用丙氨酸替换第297位的天冬酰胺(N297A)。

表3

类型	抗体名称	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	恒定区
9H3 嵌合抗体	9H3-mHvKv-IgG1	79	80	人 IgG1
	9H3-mHvKv-IgG2	79	80	人 IgG2
	9H3-mHvKv-IgG4	79	80	人 IgG4
	9H3-mHvKv-IgG1-N297A	79	80	具有N297A 突变的人 IgG1
9H3 人源化抗体	9H3-H2K1-IgG1	54	56	人 IgG1
	9H3-H2K2-IgG1	54	57	人 IgG1
	9H3-H2K3-IgG1	54	58	人 IgG1
	9H3-H3K1-IgG1	55	56	人 IgG1
	9H3-H3K1-IgG2	55	56	人 IgG2

	9H3-H3K1-IgG4	55	56	人 IgG4
	9H3-H3K1-IgG1-N297A	55	56	具有N297A 突变的人 IgG1
	9H3-H3K2-IgG1	55	57	人 IgG1
	9H3-H3K3-IgG1	55	58	人 IgG1
	9H3-H3K3-IgG2	55	58	人 IgG2
	9H3-H3K3-IgG4	55	58	人 IgG4
	9H3-H3K3-IgG1-N297A	55	58	具有N297A 突变的人 IgG1
9A4 嵌合抗体	9A4-mHvKv-IgG1	81	82	人 IgG1
9A4 人源化抗体	9A4-H1K1-IgG1	59	62	人 IgG1
	9A4-H1K2-IgG1	59	63	人 IgG1
	9A4-H2K1-IgG1	60	62	人 IgG1
	9A4-H2K2-IgG1	60	63	人 IgG1
5C1 嵌合抗体	5C1-mHvKv-IgG1	83	84	人 IgG1
5C1 人源化抗体	5C1-H1K1-IgG1	66	69	人 IgG1
	5C1-H1K2-IgG1	66	70	人 IgG1
	5C1-H1K3-IgG1	66	71	人 IgG1
	5C1-H1K4-IgG1	66	72	人 IgG1
	5C1-H2K2-IgG1	67	70	人 IgG1
	5C1-H2K3-IgG1	67	71	人 IgG1
	5C1-H2K4-IgG1	67	72	人 IgG1
	5C1-H3K1-IgG1	68	69	人 IgG1
	5C1-H3K2-IgG1	68	70	人 IgG1
	5C1-H3K3-IgG1	68	71	人 IgG1
	5C1-H3K4-IgG1	68	72	人 IgG1
5D10 嵌合抗体	5D10-mHvKv-IgG1	85	86	人 IgG1
5D10 人源化抗体	5D10-H1K1-IgG1	73	76	人 IgG1
	5D10-H1K2-IgG1	73	77	人 IgG1
	5D10-H2K1-IgG1	74	76	人 IgG1
	5D10-H2K2-IgG1	74	77	人 IgG1

[0268] 在一些受试抗体中观察到两次转变。下表示出了一些受试抗体的T_m D1和T_m D2的结果。

表4

抗体	T _m D1	T _m D2
9H3-H2K1-IgG1	无*	73.93
9H3-H2K2-IgG1	无*	74.08

9H3-H2K3-IgG1	无*	73.49
9H3-H3K2-IgG1	70.68	81.18

*仅观察到一条转变曲线。

[0269] 结果显示9H3-H2K1-IgG1、9H3-H2K2-IgG1和9H3-H2K3-IgG1的T_m D2比另一些抗体(例如9H3-H3K2-IgG1)低得多。可能是9H3人源化重链H2(SEQ ID NO:54)不如其他人源化重链稳定。该结果也与通过FACS确定的来自CHO-S上清液(含有表达的抗体)的热稳定性结果一致。

表5

抗体	T _m D1	T _m D2
9H3-H3K1-IgG1	70.09	81.18
9H3-H3K1-IgG1-N297A	61.37	81.92
9H3-H3K1-IgG2	69.65	81.47
9H3-H3K1-IgG4	65.65	80.59

表6

抗体	T _m D1	T _m D2
9H3-H3K3-IgG1	70.09	81.62
9H3-H3K3-IgG1-297N/A	61.37	81.62
9H3-H3K3-IgG2	69.65	81.47
9H3-H3K3-IgG4	66.25	80.29

[0270] 表5和表6中的结果表明,具有IgG1恒定区和IgG2恒定区的人源化抗体具有相似的T_m D1并且具有相似的T_m D2。IgG1中的N297A突变可以显著降低T_m D1,但不会降低T_m D2。此外,具有IgG4恒定区的人源化抗体的T_m D1和T_m D2较低。

实施例8. 小鼠和嵌合抗hOX40抗体的体内测试

[0271] 为了在体内测试抗hOX40抗体并预测这些抗体在人体中的作用,产生了OX40人源化小鼠模型。设计OX40人源化小鼠模型以表达嵌合OX40蛋白(SEQ ID NO:52),其中小鼠OX40蛋白的细胞外区域的一部分被人OX40细胞外区域替代。小鼠OX40(SEQ ID NO:50)的第31-195位氨基酸残基被人OX40(SEQ ID NO:49)的第35-197位氨基酸残基替代。人源化小鼠模型(B-hOX40人源化小鼠)通过显著降低人与表达小鼠OX40的普通小鼠中临床结局之间的差异来为在临床环境中测试新的治疗性治疗提供新的工具。关于OX40人源化小鼠模型的详细描述可以在PCT/CN2017/099575中找到,其通过引用整体并入本文。

[0272] 在结肠癌模型中测试了抗hOX40抗体以显示其对体内肿瘤生长的作用。在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)。当小鼠中的肿瘤达到150±50mm³的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组。

[0273] 然后通过腹腔内施用向小鼠注射生理盐水(PS)和抗hOX40抗体。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0274] 根据小鼠的体重以3mg/kg计算注射体积。测量肿瘤的长轴和短轴的长度,并且将肿瘤的体积作为0.5×(长轴)×(短轴)²计算。还在注射之前、在将小鼠分为不同组时(第一次抗体注射之前)、在抗体注射期间每周两次、以及在实施安乐死之前测量小鼠的体重。

[0275] 使用下式计算肿瘤生长抑制百分比(TGI%): $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times$

100。 T_i 是第*i*天处理组的平均肿瘤体积。 T_0 是第0天处理组的平均肿瘤体积。 V_i 是第*i*天对照组的平均肿瘤体积。 V_0 是第0天对照组的平均肿瘤体积。

[0276] 进行t检验以进行统计学分析。TGI%高于60%表明肿瘤生长的显著抑制。 $p < 0.05$ 是指示显著差异的阈值。

小鼠抗hOX40抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1、17-5D10、08-6A11和14-7F11的体内结果

[0277] 将小鼠抗-hOX40抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1、17-5D10、08-6A11和14-7F11施用给B-hOX40人源化小鼠(OX40人源化小鼠)。在整个处理期期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图7和图8)。在对照组和抗hOX40处理组之间未观察到体重的显著差异。结果表明,抗hOX40抗体被良好耐受,并且对小鼠无毒。

[0278] 然而,在用抗体07-9H3、07-9A4、11-5C1和17-5D10处理的组中肿瘤体积显示出显著差异(图9)。

[0279] 如下表所示,还计算了每个处理组在第24天的TGI%。

表7

组	抗体	第24天时的平均 肿瘤体积 (mm^3)	TGI%	P值
G1	PS	1441	-	-
G2	08-6A11 (3mg/kg)	1288	11.5%	0.704
G3	11-5C1 (3mg/kg)	248	90.0%	0.005
G4	14-7F11 (3mg/kg)	1133	23.3%	0.403
G5	17-5D10 (3mg/kg)	311	85.3%	0.010
G6	07-9H3 (3mg/kg)	614	62.4%	0.031
G7	07-9A4 (3mg/kg)	366	81.1%	0.010

[0280] 结果表明,5C1具有最佳的TGI%。6A11和7F11在抑制肿瘤生长方面无效。

嵌合抗hOX40抗体的体内结果

[0281] 通过腹腔内施用将小鼠抗hOX40抗体9H3和嵌合抗hOX40抗体9H3-mHvKv-IgG1、9H3-mHvKv-IgG2、9H3-mHvKv-IgG4和9H3-mHvKv-IgG1-N297A施用给B-hOX40人源化小鼠(人源化OX40小鼠)。根据小鼠的体重以3mg/kg计算注射量。在每周的第一天和第四天给予抗体(共注射5次)。

[0282] 在整个处理期期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图10和图11)。在对照组和抗hOX40处理组之间未观察到体重的显著差异。结果表明,小鼠对抗hOX40抗体耐受良好,并且无毒。

[0283] 然而,在用抗体9H3-mHvKv-IgG1、9H3-mHvKv-IgG2、9H3-mHvKv-IgG4和9H3-mHvKv-IgG1-N297A处理的组中肿瘤体积显示出显著差异(图12)。

[0284] 如下表所示,还计算了每个处理组在第21天的TGI%。

表8

组	抗体	第21天时的平均 肿瘤体积 (mm ³)	TGI%	P值
G1	PS	1971	-	-
G2	9H3-mHvKv-IgG1 (3mg/kg; i. p. 施用; 每周两次; 共注射5次)	706	68.3%	0.009
G3	9H3-mHvKv-IgG2 (3mg/kg; i. p. 施用; 每周两次; 共注射5次)	1117	46.1%	0.031
G4	9H3-mHvKv-IgG4 (3mg/kg; i. p. 施用; 每周两次; 共注射5次)	1323	35.0%	0.117
G5	9H3-mHvKv-IgG1-N297A (3mg/kg; i. p. 施用; 每周两次; 共注射5次)	1760	11.4%	0.573
G6	9H3 (3mg/kg; i. p. 施用; 每周两次; 共注射5次)	794	63.5%	0.003

[0285] 结果表明,小鼠抗hOX40抗体9H3和嵌合抗hOX40抗体9H3-mHvKv-IgG1和9H3-mHvKv-IgG2可以显著抑制肿瘤的生长。其中,9H3-mHvKv-IgG1的TGI%最高。

实施例9. 人源化抗hOX40抗体的体内测试

[0286] 在OX40人源化小鼠中测试了人源化抗hOX40抗体,以显示其对体内肿瘤生长的作用。

[0287] 在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)。当小鼠中的肿瘤达到 $150 \pm 50 \text{mm}^3$ 的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组8只小鼠)。

[0288] 然后通过腹腔内注射以3mg/kg或1mg/kg向小鼠注射人IgG(对照)和抗hOX40抗体。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0289] 在整个处理期期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图13和图14)。在对照组和抗hOX40处理组之间未观察到体重的显著差异。结果表明,小鼠对抗hOX40抗体耐受良好,并且无毒。

[0290] 在用抗hOX40抗体处理的组中肿瘤体积显示出显著差异(图15)。

[0291] 如下表所示,还计算了每个处理组在第18天(分组之后18天)的TGI%。

表9

组	抗体	第18天时的平均 肿瘤体积 (mm ³)	TGI%	P值
G1	人 IgG (3 mg/kg)	1989	-	-
G2	9H3-H3K1-IgG1 (1 mg/kg)	447	82.7%	0.004
G3	9H3-H3K1-IgG1 (3 mg/kg)	514	79.0%	0.005
G4	9H3-H3K3-IgG1 (1 mg/kg)	694	69.4%	0.025
G5	9H3-H3K3-IgG1 (3 mg/kg)	268	92.3%	0.001
G6	9H3 (1 mg/kg)	583	75.3%	0.006
G7	9H3 (3 mg/kg)	880	59.4%	0.042

[0292] 上面的结果表明,所有抗h0X40抗体均可抑制肿瘤生长。其中,9H3-H3K3-IgG1 (3mg/kg) 具有最高的肿瘤生长抑制百分比。

[0293] 选择G1组中的三只小鼠和G5组中的三只小鼠进行进一步评价。

[0294] 检查了这些小鼠的肝组织(图16)。结果总结在下表中。结果表明,与对照组相比,未观察到明显的肝损伤。

表10

小鼠编号	组	抗体	剂量和施用	肝组织的病理分析
25829	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肝组织结构总体上正常, 具有轻度肝细胞水肿和轻度库普弗细胞(Kupffer cell)增生。观察到多个小局灶性肝细胞坏死部位。
25861	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	轻度肝细胞水肿。观察到一个小的局灶性肝细胞坏死部位。
25878	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	轻度至中度肝细胞水肿。观察到两个小的局灶性肝细胞坏死部位。
25832	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肝组织结构总体上正常, 具有中度肝细胞水肿。 一些细胞发生了气球样变性。
25867	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	轻度肝细胞水肿。
25874	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	轻度肝细胞水肿。 观察到一个小的局灶性肝细胞坏死部位。

[0295] 还检查了这些小鼠的肾(图17)。结果总结在下表中。结果表明,与对照组相比,

9H3-H3K3-IgG1未对肾造成严重损害。

表11

小鼠编号	组	抗体	剂量和施用	肾的病理分析
25829	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。
25861	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。
25878	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。
25832	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。
25867	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。
25874	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肾的结构总体上是正常的, 在近端小管有 中度水肿。

[0296] 还检查了这些小鼠的肠(图18)。结果总结在下表中。结果表明, 与对照组相比, 9H3-H3K3-IgG1未对肠造成严重损害。

表12

小鼠编号	组	抗体	剂量和施用	肠的病理分析
25829	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肠黏膜组织有轻度慢性炎症。
25861	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肠黏膜组织有轻度慢性炎症。
25867	G1	人 IgG	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肠黏膜组织有轻度慢性炎症。
25832	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	未发现明显的病理变化。
25874	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肠黏膜组织有轻度慢性炎症。
25878	G5	9H3-H3K3-IgG1	3mg/kg, 每周两次, 共注射 6 次	肠黏膜组织有轻度慢性炎症。

[0297] 总的来说,结果表明9H3-H3K3-IgG1在人源化小鼠中没有严重的副作用。

实施例10. 与可瑞达的组合治疗

[0298] 为了评价组合治疗的效力,将抗hOX40抗体与一些其他治疗剂一起施用于小鼠。

9H3和可瑞达对人源化小鼠中MC-38癌肿瘤细胞的体内结果

[0299] 在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞。当小鼠中的肿瘤达到 $150 \pm 50 \text{mm}^3$ 的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组6只小鼠)。然后通过腹腔内注射向小鼠注射:(G1) PS (对照), (G2) 可瑞达(0.3mg/kg) (Merck), (G3) 9H3 (3mg/kg), 以及(G4) 可瑞达(0.3mg/kg) 和9H3 (3mg/kg)。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0300] 在整个处理期期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图19和图20)。在对照组和抗hOX40处理组之间未观察到体重的显著差异。结果表明,这些抗体被良好耐受,并且对小鼠无毒。

[0301] 在用抗hOX40抗体处理的组中肿瘤体积显示出显著差异(图21)。还计算了每个处理组在第21天(分组之后21天)的TGI%并且显示在下表中。

表13

组	抗体	第21天时的平均 肿瘤体积 (mm^3)	TGI%	P值
G1	PS	2256	-	-
G2	可瑞达 (0.3 mg/kg)	1380	41.0%	0.127
G3	9H3 (3 mg/kg)	662	74.6%	0.003
G4	9H3 (3 mg/kg) + 可瑞达 (0.3 mg/kg)	187	96.8%	0.0003

[0302] 结果表明,与可瑞达组合的9H3可以改善肿瘤生长抑制作用。

9H3和可瑞达对人源化小鼠中EL4癌肿瘤细胞的体内结果

[0303] 在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射EL4癌肿瘤细胞(源自化学诱导的淋巴瘤的鼠肿瘤细胞系)。当小鼠中的肿瘤达到 $150 \pm 50 \text{mm}^3$ 的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组5只小鼠)。然后通过腹腔注射向小鼠注射:(G1) PS (对照), (G2) 9H3 (3mg/kg), (G3) 可瑞达(3mg/kg), 以及(G4) 可瑞达(3mg/kg) 和9H3 (3mg/kg)。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0304] 在整个处理期期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图22和图23)。结果表明,这些抗体被良好耐受,并且对小鼠无毒。

[0305] 在用9H3以及9H3与可瑞达的组合处理的组中,肿瘤体积显示出显著差异(图24)。下表示出了每个处理组在第18天(分组之后18天)的TGI%。

表14

组	抗体	第18天时的平均 肿瘤体积 (mm ³)	TGI%	P值
G1	PS	3075	-	-
G2	9H3 (3 mg/kg)	1637	48.7%	0.048
G3	可瑞达 (3 mg/kg)	2592	16.3%	0.545
G4	9H3 (3 mg/kg) + 可瑞达 (3 mg/kg)	920	73.0%	0.018

[0306] 结果表明,可瑞达本身不能抑制肿瘤的生长。但是,可瑞达和9H3的组合比单独使用9H3具有更好的TGI%。

实施例11. 与抗PD1或抗PDL1抗体的组合治疗

[0307] 为了评价组合治疗的效力,将抗hOX40抗体与抗PD1或抗PDL1抗体一起施用于小鼠。

[0308] 在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞。当小鼠中的肿瘤达到150±50mm³的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组5只小鼠)。然后通过腹腔注射向小鼠注射:(G1) PS(对照);(G2) 9H3 (1mg/kg);(G3) mPD-1 (RMP1-14) (小鼠抗mPD1抗体;BioXcell,货号BE0146) (1mg/kg);(G4) 9H3 (1mg/kg) 和mPD-1 (RMP1-14) (1mg/kg);(G5) mPD-L1 (10F.9G2) (小鼠抗mPDL1抗体;BioXcell,货号BE0101) (1mg/kg);或(G6) 9H3 (1mg/kg) 和mPD-L1 (10F.9G2) (1mg/kg)。每周两次施用抗体,持续3周(共注射6次)。

[0309] 在整个处理期间期间监测小鼠的体重(图25和图26)。结果表明,这些抗体对小鼠无毒。

[0310] 在用抗体处理的组中肿瘤体积减小(图27)。下表示出了每个处理组在第25天(分组之后25天)的TGI%。

表15

组	抗体	第25天时的平均 肿瘤体积 (mm ³)	TGI%	P值
G1	PS	2796	-	-
G2	9H3 (1 mg/kg)	1013	66.7%	0.080
G3	mPD-1(RMP1-14) (1 mg/kg)	1851	35.4%	0.329
G4	9H3 (1 mg/kg) + mPD-1(RMP1-14) (1 mg/kg)	516	85.2%	0.032
G5	mPD-L1(10F.9G2) (1 mg/kg)	1801	37.2%	0.296
G6	9H3 (1 mg/kg) + mPD-L1(10F.9G2) (1 mg/kg)	804	74.5%	0.056

[0311] 结果表明,与mPD-1 (RMP1-14) (抗PD-1抗体)组合的9H3具有最佳的肿瘤生长抑制率。

实施例12. 与抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4或抗GITR抗体的组合治疗

[0312] 为了评价组合治疗的效力,将抗hOX40抗体与抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4

或抗GITR抗体一起施用给小鼠。

[0313] 在B-h0X40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞。当小鼠中的肿瘤达到 $150 \pm 50\text{mm}^3$ 的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组5只小鼠)。然后通过腹腔注射向小鼠注射以下:

- (G1) PS (对照);
- (G2) 9H3 (1mg/kg);
- (G3) mLAG-3 (C9B7W) (小鼠抗LAG-3抗体;BioXcell,货号:BE0174) (3mg/kg);
- (G4) 9H3 (1mg/kg) 和mLAG-3 (C9B7W) (3mg/kg);
- (G5) mTIGIT (1G9) (小鼠抗mTIGIT抗体;BioXcell,货号:BE0274) (3mg/kg);
- (G6) 9H3 (1mg/kg) 和mTIGIT (1G9) (3mg/kg);
- (G7) mBTLA (PJ196) (小鼠抗mBTLA抗体;BioXcell,货号:BE0196) (10mg/kg);
- (G8) 9H3 (1mg/kg) 和mBTLA (PJ196) (10mg/kg);
- (G9) mCTLA-4 (9D9) (小鼠抗mCTLA-4抗体;BioXcell,货号:BE0164) (1mg/kg);
- (G10) 9H3 (1mg/kg) 和mCTLA-4 (9D9) (1mg/kg);
- (G11) mGITR (DTA-1) (小鼠抗mGITR抗体;BioXcell,货号:BE0063) (0.3mg/kg);
- (G12) 9H3 (1mg/kg) 和mGITR (DTA-1) (0.3mg/kg)。

[0314] 每周两次施用抗体(共注射3次)。

[0315] 在整个处理期期间监测小鼠的体重(图28和图29)。结果表明,这些抗体对小鼠没有明显的毒性。

[0316] 在G2、G3、G4、G6、G8、G10、G11和G12处理组中,肿瘤体积减小(图30)。下表示出了每个处理组在第25天(分组之后25天)的TGI%。

表16

组	抗体	第25天时的平均 肿瘤体积 (mm ³)	TGI%	P值
G1	PS	2166	-	-
G2	9H3 (1 mg/kg)	1586	28.8%	0.393
G3	mLAG-3(C9B7W) (3 mg/kg)	1654	25.4%	0.436
G4	9H3 (1 mg/kg) + mLAG-3(C9B7W) (3 mg/kg)	587	78.4%	0.017
G5	mTIGIT(1G9) (3 mg/kg)	2901	-36.5%	0.336
G6	9H3 (1 mg/kg) + mTIGIT(1G9) (3 mg/kg)	1244	45.7%	0.142
G7	mBTLA(PJ196) (10 mg/kg)	2328	-8.0%	0.825
G8	9H3 (1 mg/kg) + mBTLA(PJ196) (10 mg/kg)	1232	46.3%	0.149
G9	mCTLA-4(9D9) (1 mg/kg)	2977	-40.2%	0.267
G10	9H3 (1 mg/kg) + mCTLA-4(9D9) (1 mg/kg)	397	87.8%	0.026
G11	mGITR(DTA-1) (0.3 mg/kg)	1924	12.0%	0.665
G12	9H3 (1 mg/kg) + mGITR(DTA-1) (0.3 mg/kg)	735	71.0%	0.283

[0317] 结果显示,与单独使用9H3相比,与抗LAG-3、抗TIGIT、抗BTLA、抗CTLA-4或抗GITR抗体组合的9H3具有更好的肿瘤生长抑制作用。

实施例13.人源化9A4、5C1和5D10抗体的体内测试

[0318] 还在OX40人源化小鼠中测试了人源化9A4、5C1和5D10抗体,以显示其对体内肿瘤生长的作用。

[0319] 在B-hOX40人源化小鼠中皮下注射MC-38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)。当小鼠中的肿瘤达到 $150 \pm 50 \text{mm}^3$ 的体积时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组。然后通过腹腔内注射以3mg/kg或1mg/kg向小鼠注射人IgG(对照)和人源化9A4、5C1和5D10抗体。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0320] 在整个处理期期间监测小鼠的体重。预期在对照组和抗hOX40抗体处理组之间可观察不到体重的显著差异,并且人源化的9A4、5C1和5D10抗体可抑制小鼠的肿瘤生长。

其他实施方案

[0321] 应当理解,尽管已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但是前述描述旨在举例说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点和修改方案在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 祐和医药科技（北京）有限公司

<120> 抗 OX40 抗体及其用途

<130> MP2004795P

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ser Tyr Gly Val Leu

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Glu Glu Phe Gly Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1

5

10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 19

Ser Tyr Gly Val His

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 21

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 22

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

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 23

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 24

Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 25

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 26

Trp Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 27

Glu Glu Phe Gly Tyr

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 29

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 30

Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 31

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp

1 5 10

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 32

Asn Pro Asn Tyr Asp Ser

1 5

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 33

Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 34

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 35

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 39

Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 42

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 43

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His

1 5 10

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 44

Trp Ala Gly Gly Asn

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 45

1 5

<210> 49

<211> 277

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240

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> 50

<211> 272

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 50

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
 35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
 195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
 210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
 225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
 245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
 260 265 270

<210> 51

<211> 277

<212> PRT

<213> 猴

<400> 51

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 Thr Ala Lys Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ala Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Pro Thr Gln Pro
 165 170 175

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

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Arg Gly Pro Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Ala
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Met Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala Pro Lys Ala 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

Ala Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 52

<211> 270

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 52

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30

Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met
 35 40 45

Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly
50 55 60

Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys
65 70 75 80

Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr
 85 90 95

Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu
 100 105 110

Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His

115	120	125
Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr		
130	135	140
Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala		
145	150	155
Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln		
	165	170
		175
Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro		
	180	185
		190
Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro Glu Gly		
	195	200
		205
Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu Ala Pro		
210	215	220
Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp Arg Leu		
225	230	235
		240
Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr Pro Ile		
	245	250
		255

Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
 260 265 270

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Phe
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Glu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 54

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Val Tyr Phe

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Glu Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 56

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 Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg
 100 105

<210> 57

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 57

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 Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 58

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 Asp Ile Asn Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 59

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

1

5

10

15

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 61

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 62

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr 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 Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 63

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr 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 Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 64

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 65

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr

20

25

30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro

65

70

75

80

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

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

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 66

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 67

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 68

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

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

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

35

40

45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 69

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Ser Ala
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 70

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 71

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 72

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 73

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 73

115

<210> 75
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 75

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

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

Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Asn Cys Ala
 85 90 95

Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Val
 115

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 76

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 Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 77

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 Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<p><210> 79</p> <p><211> 113</p> <p><212> PRT</p> <p><213> 人工序列</p> <p><400> 79</p>			
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Gly Val Leu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu			
	35	40	45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile			
50	55	60	

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 81

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 81

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 82

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr

20

25

30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 83

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 83

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 84

<400> 85

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Asn Cys Ala
 85 90 95

Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Val
 115

<210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 86

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

序列表

<110> 裕和医药科技(北京)有限公司

<120> 抗OX40抗体及其用途

<130> MP2004795P

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ser Tyr Gly Val Leu

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Glu Glu Phe Gly Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 19

Ser Tyr Gly Val His

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 21

Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 22
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 23
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 24
Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 25
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val Leu
1 5 10
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 26
Trp Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 27
Glu Glu Phe Gly Tyr
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 28
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 29
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 30
Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 31
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp
1 5 10

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 32
Asn Pro Asn Tyr Asp Ser
1 5

<210> 33

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 33
Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 34
Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 35
Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5
<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 36
Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 37
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10
<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 38

Tyr Pro Gly Asn Ser Asp

1 5

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 39

Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 42

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 43

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His

1 5 10

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 44

Trp Ala Gly Gly Asn

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 45

Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 47

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 48

Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 49

<211> 277

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu

1	5	10	15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val			
	20	25	30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro			
	35	40	45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys			
	50	55	60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro			
65	70	75	80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys			
	85	90	95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly			
	100	105	110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys			
	115	120	125
Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp			
	130	135	140
Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn			
145	150	155	160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro			
	165	170	175
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr			
	180	185	190
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu			
	195	200	205
Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val			
	210	215	220
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu			
225	230	235	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>	50		
<211>	272		
<212>	PRT		
<213>	小鼠		

<400> 50
 Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
 35 40 45
 Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
 50 55 60
 Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
 65 70 75 80
 Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
 85 90 95
 Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
 100 105 110
 Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
 115 120 125
 Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
 130 135 140
 Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
 165 170 175
 Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
 180 185 190
 Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
 195 200 205
 Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
 210 215 220
 Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
 225 230 235 240
 Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
 245 250 255
 Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
 260 265 270
 <210> 51
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 猴

<400> 51

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 Thr Ala Lys Leu His Cys Val
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln Glu Cys Arg Pro
 35 40 45
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ala Lys Pro
 65 70 75 80
 Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95
 Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Pro Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Thr Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205
 Val Pro Arg Gly Pro Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Ala
 210 215 220
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Met Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala Pro Lys Ala 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
 Ala Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 52

<211> 270

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 52

```

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1           5           10           15
Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
           20           25           30
Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met
           35           40           45
Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly
           50           55           60
Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys
65           70           75           80
Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr
           85           90           95
Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu
           100          105          110
Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His
           115          120          125
Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr
           130          135          140
Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala
145          150          155          160
Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln
           165          170          175
Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro
           180          185          190
Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro Glu Gly
           195          200          205
Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu Ala Pro
           210          215          220
Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp Arg Leu
225          230          235          240
Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr Pro Ile
           245          250          255
Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
           260          265          270

```

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 53

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

Ser

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 54

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

Ser

<210> 55

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 55

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

Ser

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 56

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 Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg
 100 105

<210> 57

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 57

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	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr
		20						25						30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	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	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp
				85					90						95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100						105						

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 58

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

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 59

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30
Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
           100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120

```

<210> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 60

```

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

```

	115	120
<210>	61	
<211>	121	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<400>	61	
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
	20	25 30
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40 45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
	50	55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly		
	100	105 110
Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser		
	115	120
<210>	62	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<400>	62	
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr		
	20	25 30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
	35	40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr 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 Gln Pro		
65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr		
	85	90 95

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

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 63

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr 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 Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 64

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	100		105
<210>	65		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	65		
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr			
	20	25	30
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	66		
<211>	122		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	66		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp			
	100	105	110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 67
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 67
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 68
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 68
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

				85					90					95			
Thr	Thr	Phe	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp		
				100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				115					120								
<210>	69																
<211>	107																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<400>	69																
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	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Ser	Ala		
				20						25				30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
				35						40				45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
				50						55				60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Phe		
					85					90				95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
				100						105							
<210>	70																
<211>	107																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<400>	70																
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	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala		
				20						25				30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
				35						40				45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
				50						55				60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75				80			

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

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

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 71

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 72

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe

	85		90		95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		
<210>	73				
<211>	118				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<400>	73				
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr					
	20		25		30
Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met					
	50		55		60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu					
65	70		75		80
Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala					
	85		90		95
Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
	100		105		110
Leu Val Thr Val Ser Val					
	115				
<210>	74				
<211>	118				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<400>	74				
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr					
	20		25		30
Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu					
	35		40		45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met					
	50		55		60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu					
65	70		75		80

50		55		60														
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	His	Thr	Leu	Pro	Trp			
				85						90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
			100							105								
<210>	77																	
<211>	107																	
<212>	PRT																	
<213>	人工序列																	
<400>	77																	
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	Asp	Ile	Ser	Tyr	Tyr			
			20					25						30				
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Ile			
			35				40							45				
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly			
		50				55								60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	His	Thr	Leu	Pro	Trp			
				85						90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
			100							105								
<210>	78																	
<211>	107																	
<212>	PRT																	
<213>	人工序列																	
<400>	78																	
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly			
1				5						10				15				
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Tyr	Tyr			
			20					25						30				
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Leu	Ile			
			35				40							45				
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly			
		50				55								60				

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 81

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 81

Glu Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 82

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

50	55	60																	
Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala																			
65	70	75	80																
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr																			
	85	90	95																
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys																			
	100	105																	
<210>	83																		
<211>	122																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<400>	83																		
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala																			
1	5	10	15																
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr																			
	20	25	30																
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile																			
	35	40	45																
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Asn Asn Gln Lys Phe																			
	50	55	60																
Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr																			
65	70	75	80																
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys																			
	85	90	95																
Thr Thr Phe Tyr Tyr Arg Tyr Glu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp																			
	100	105	110																
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser																			
	115	120																	
<210>	84																		
<211>	107																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<400>	84																		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly																			
1	5	10	15																
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala																			
	20	25	30																
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile																			
	35	40	45																

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 85

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 85

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Asn Cys Ala
 85 90 95
 Ser Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Val
 115

<210> 86

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 86

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

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

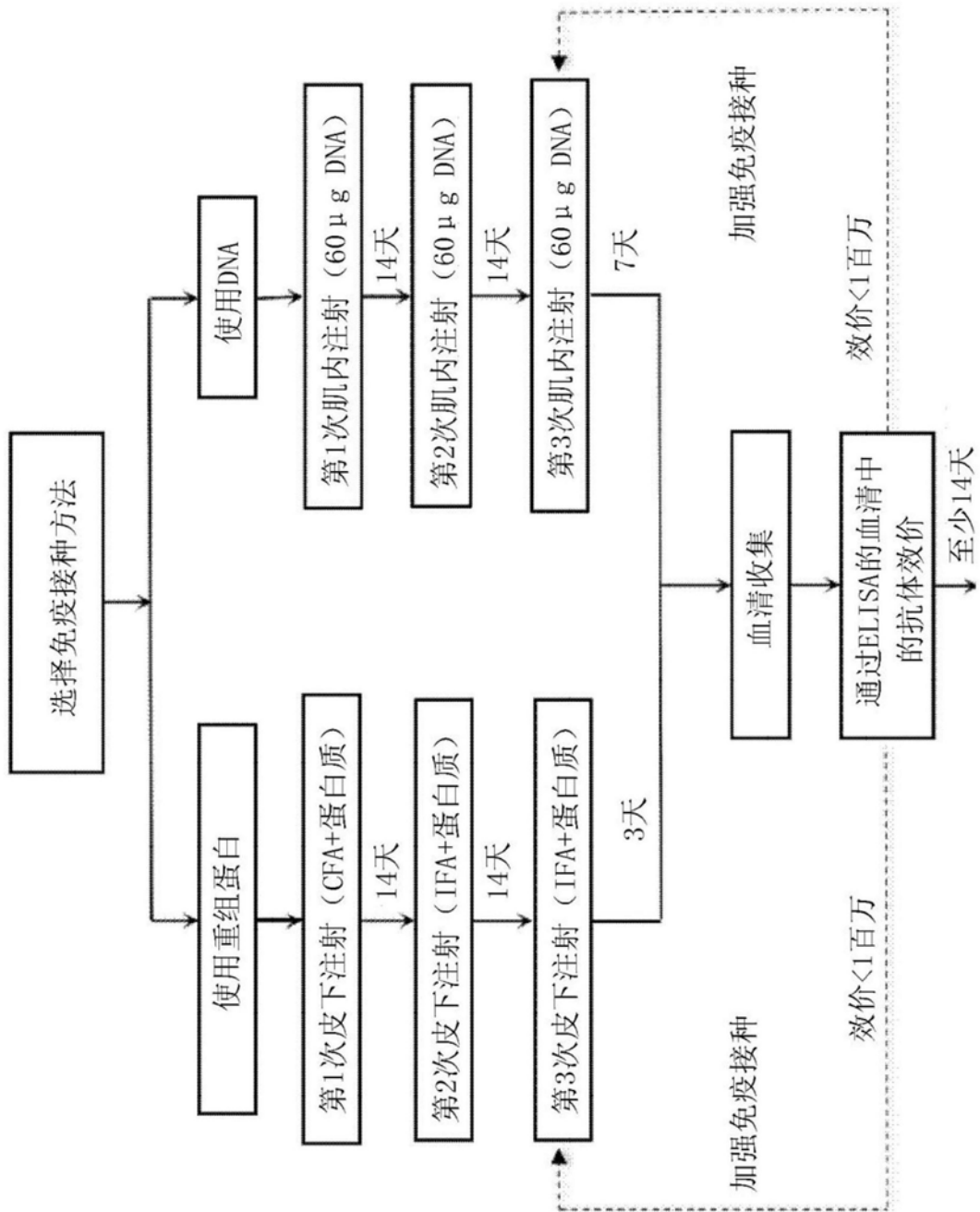


图1

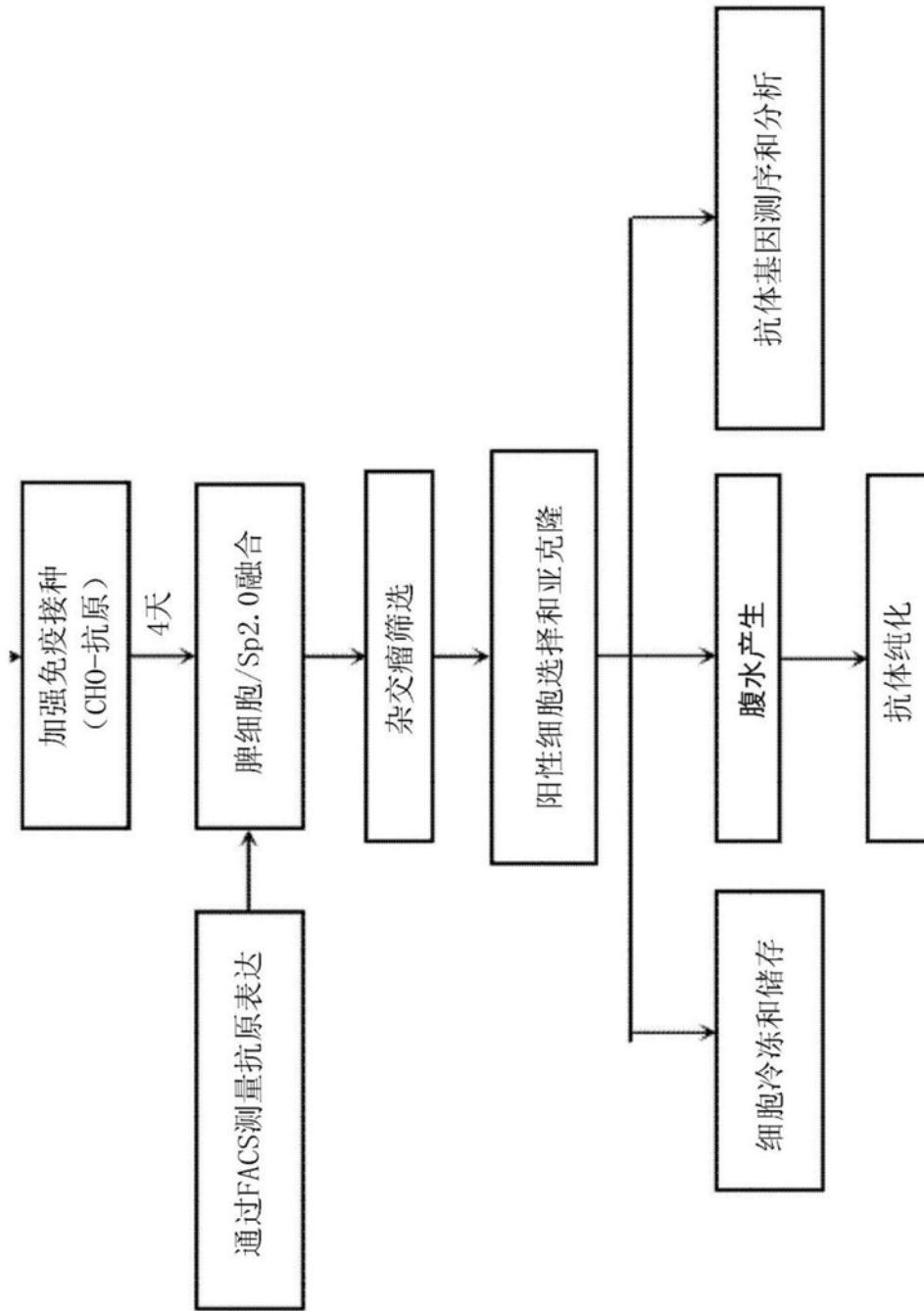


图2

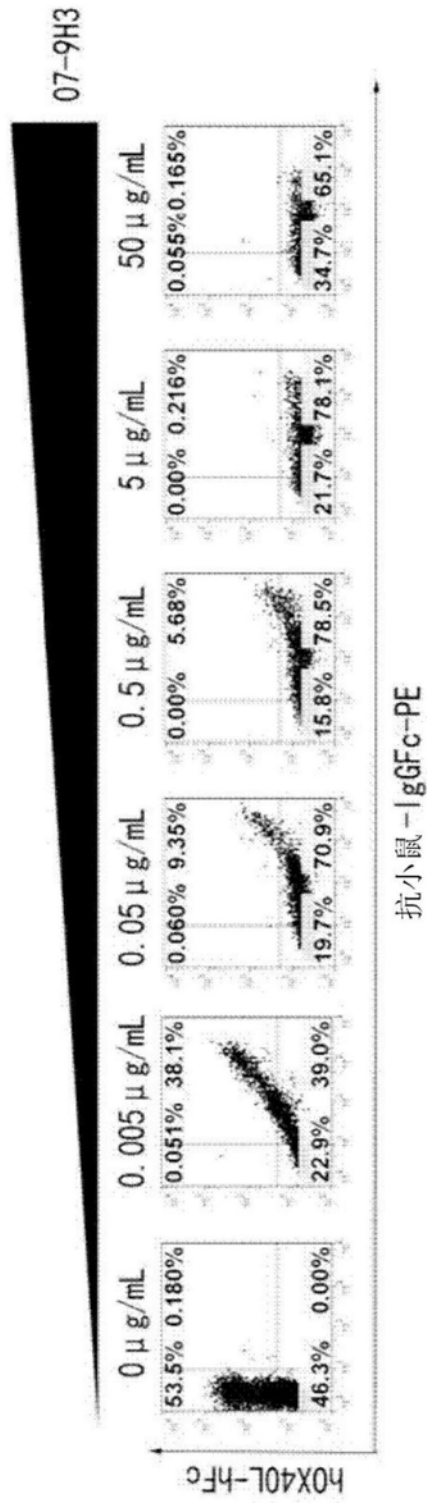


图3

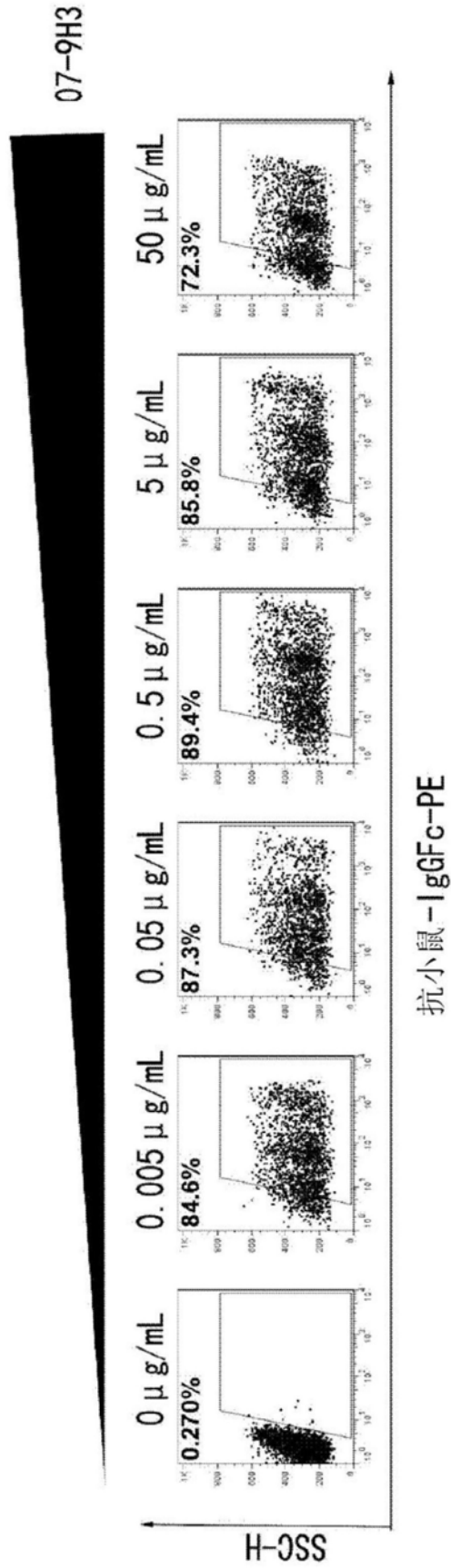


图4

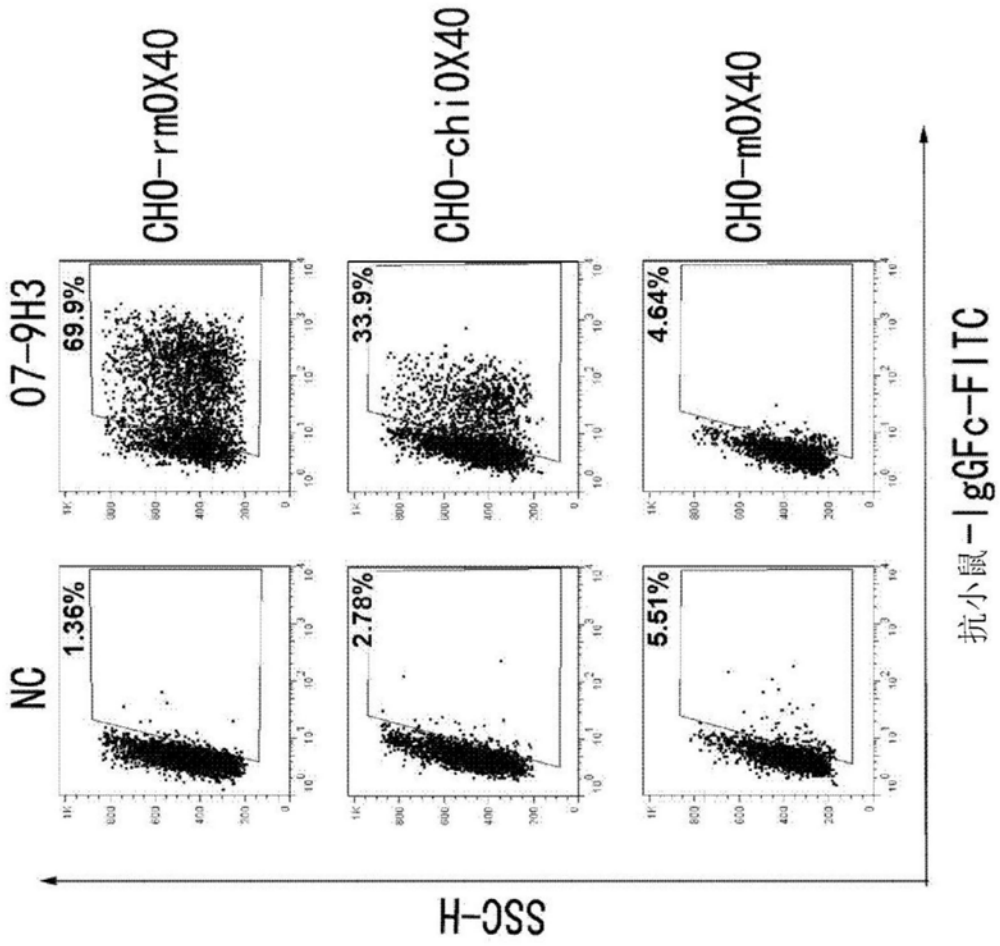


图5

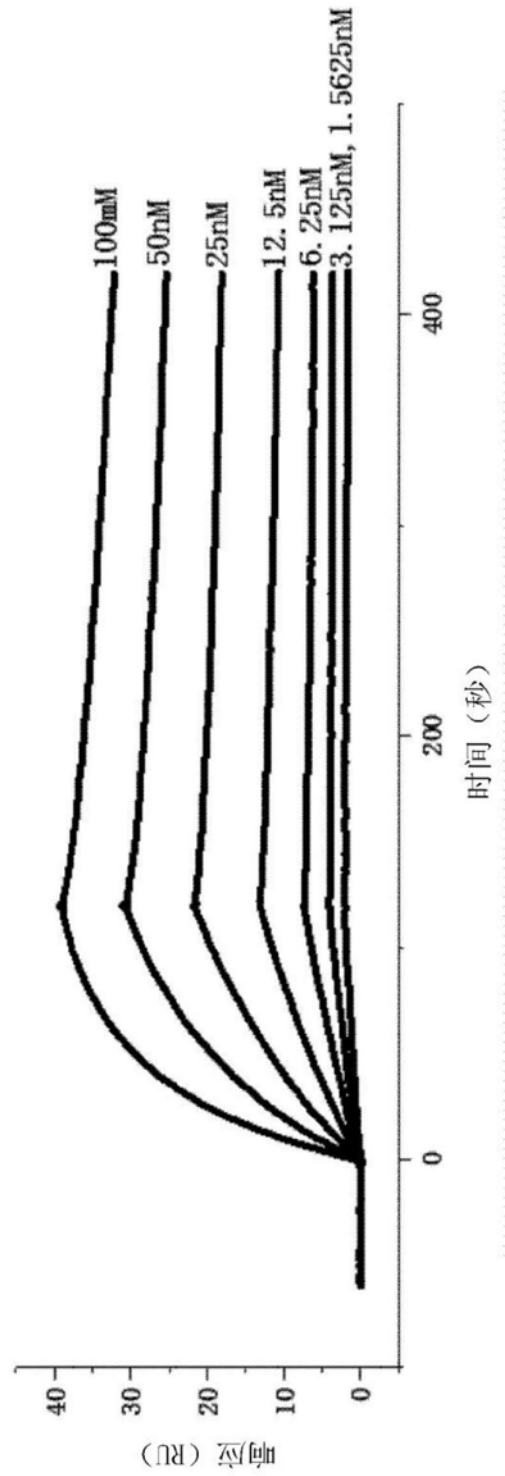


图6

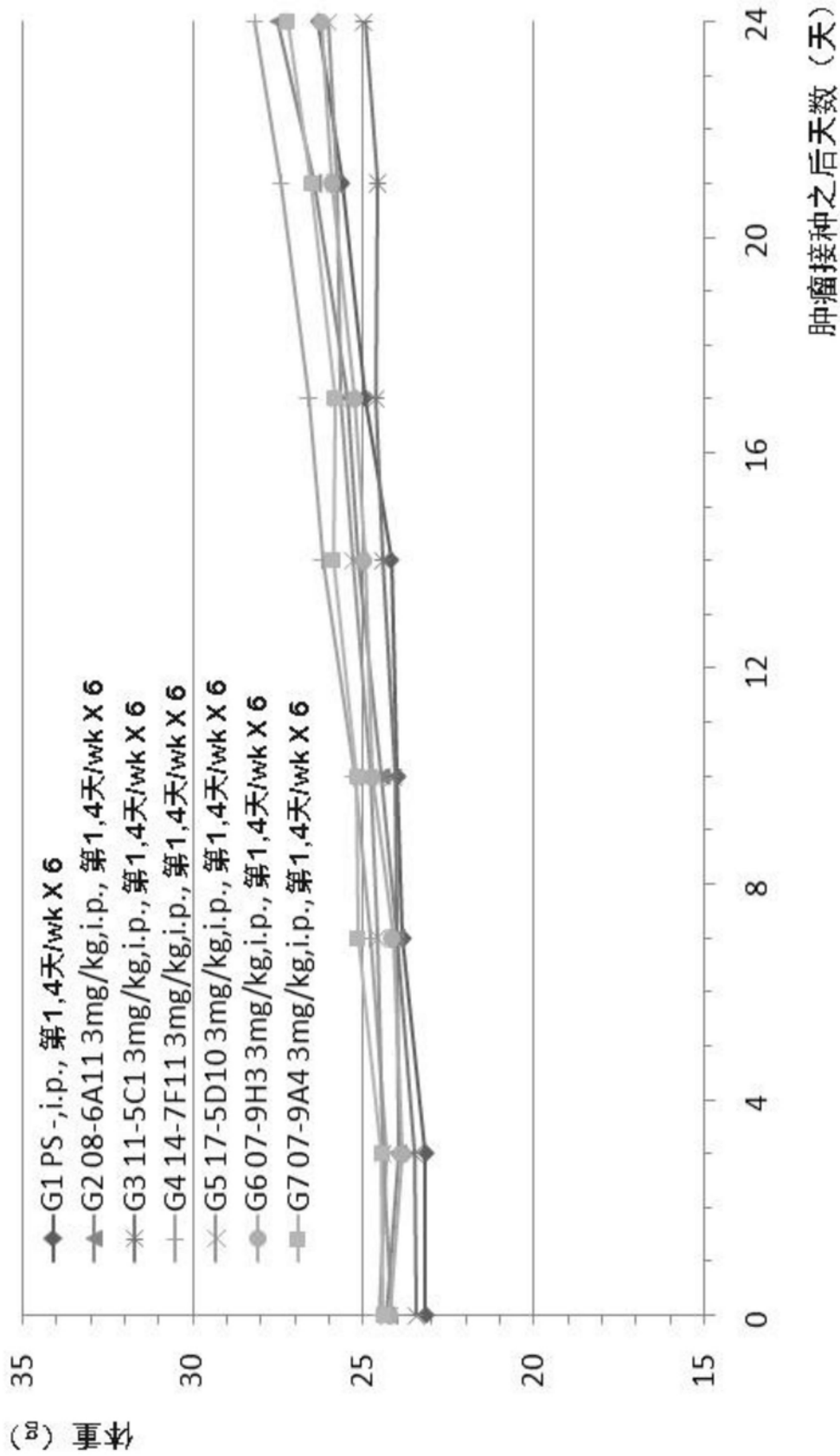


图7

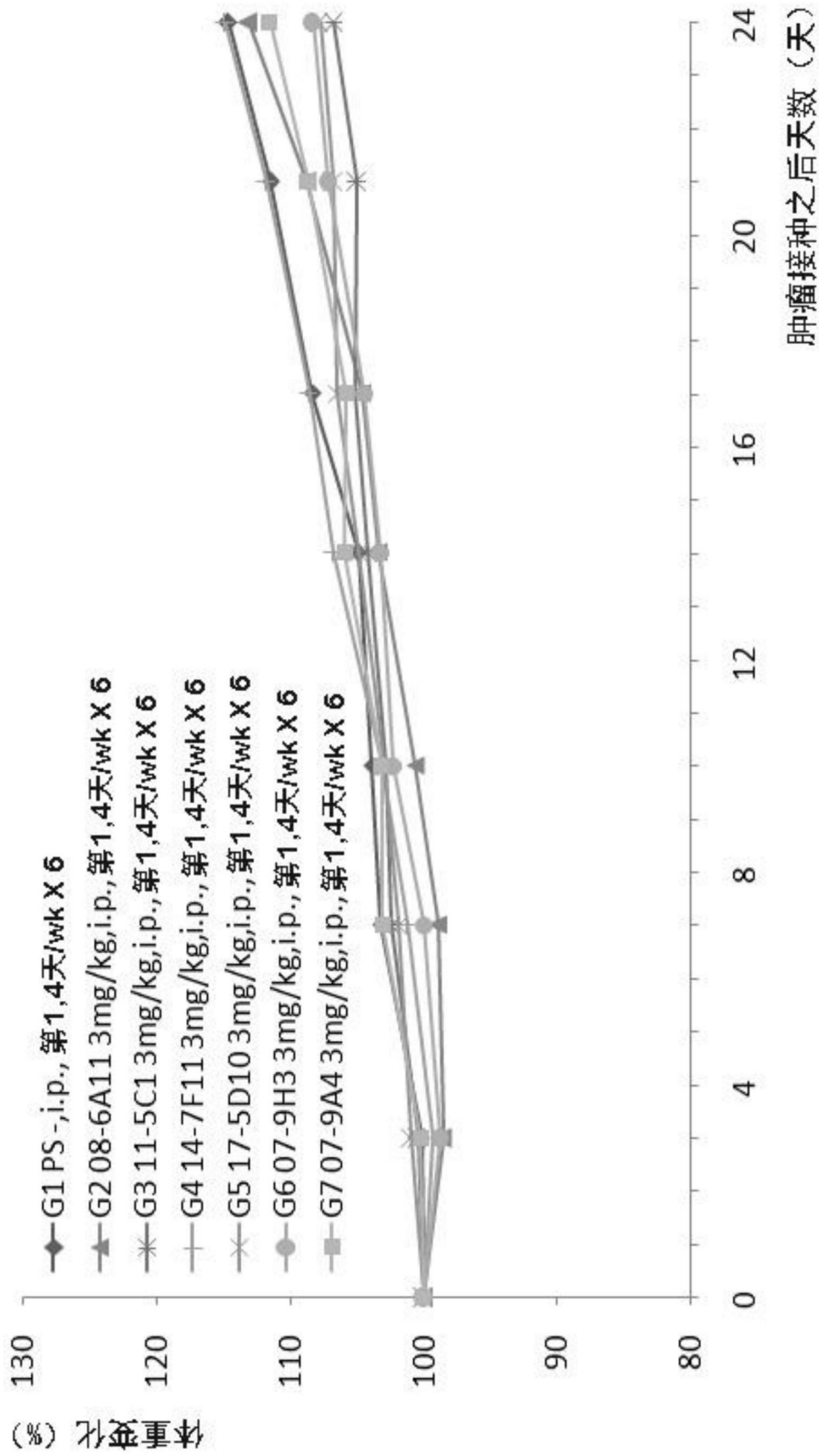


图8

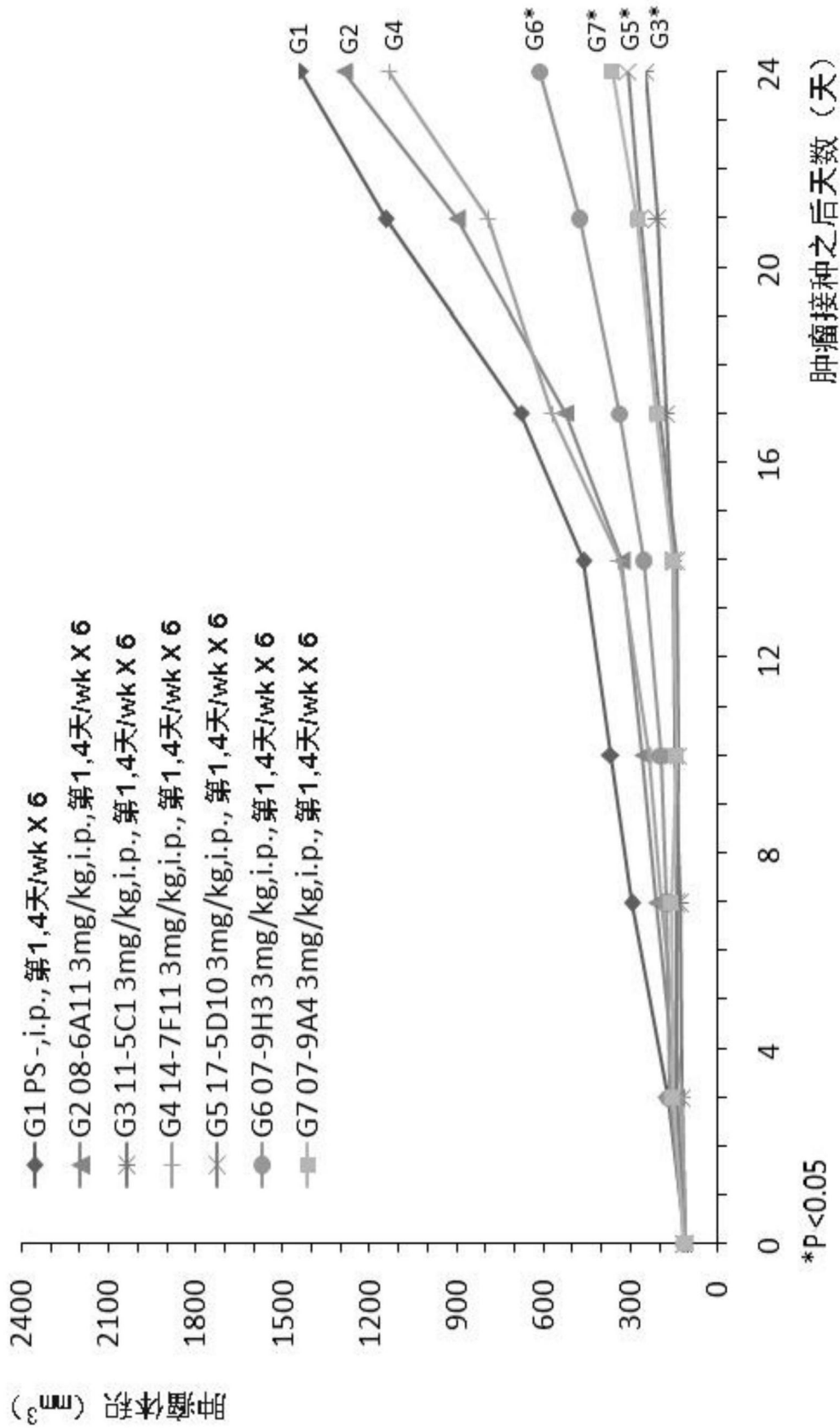


图9

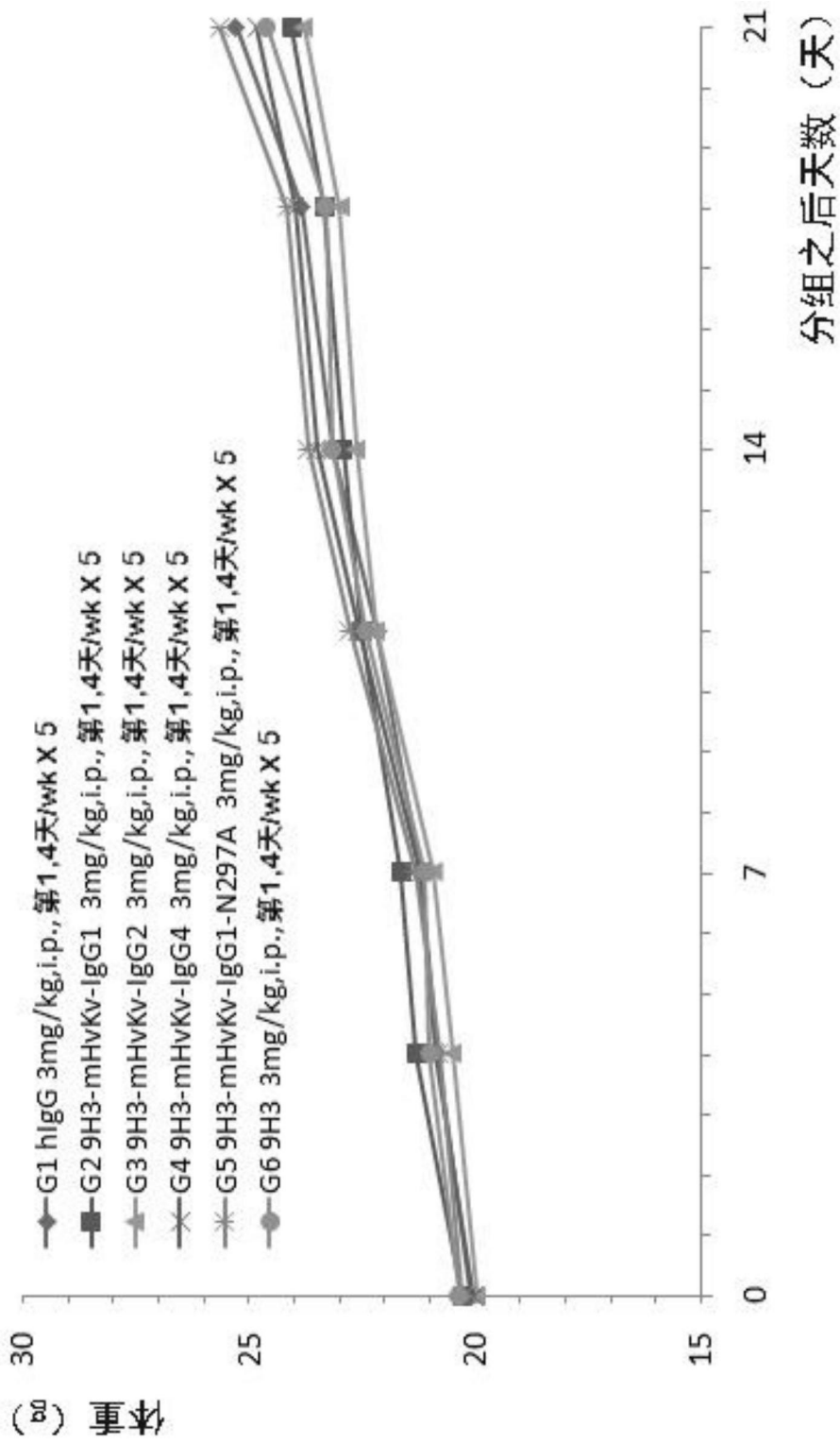


图10

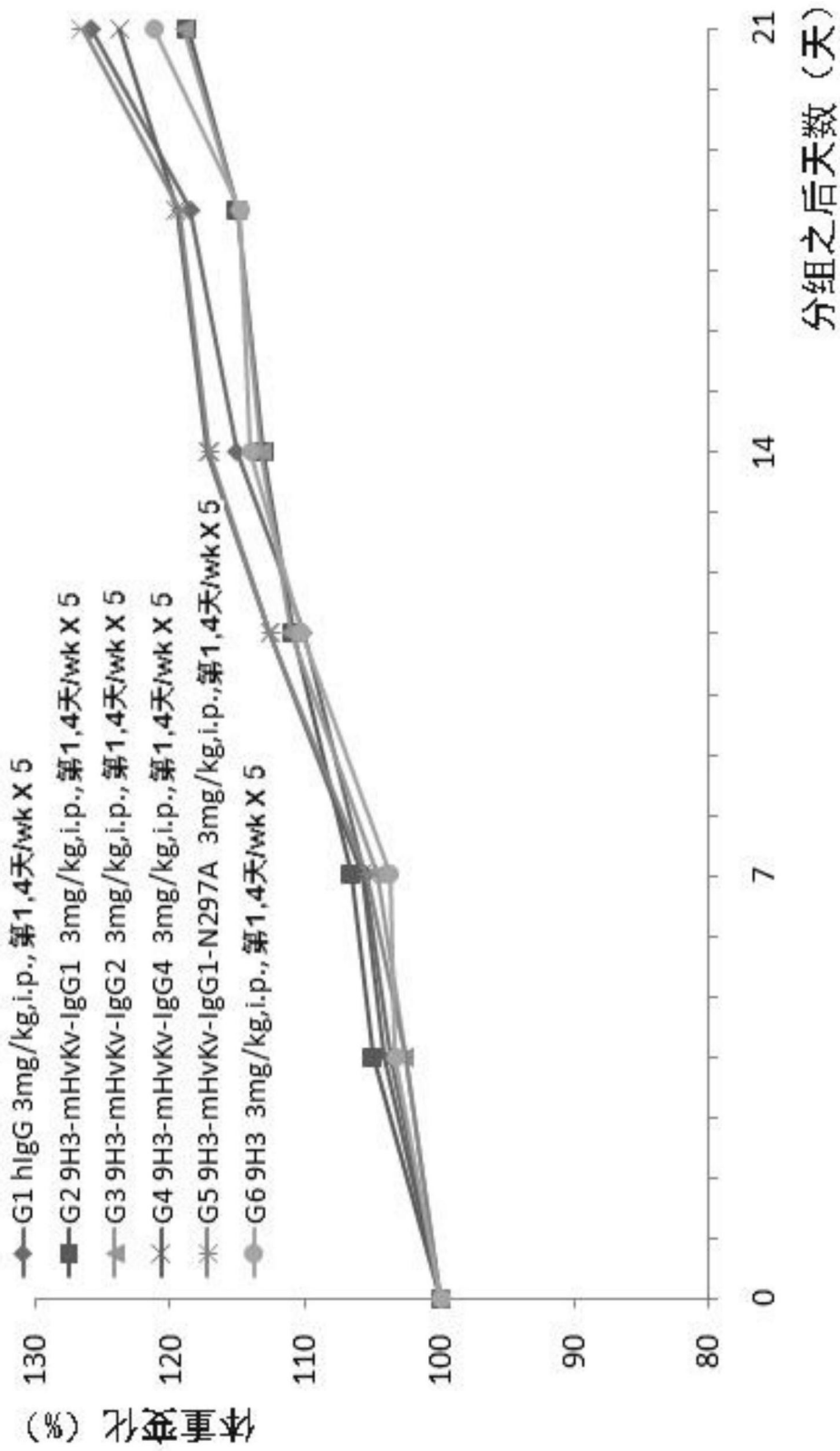


图11

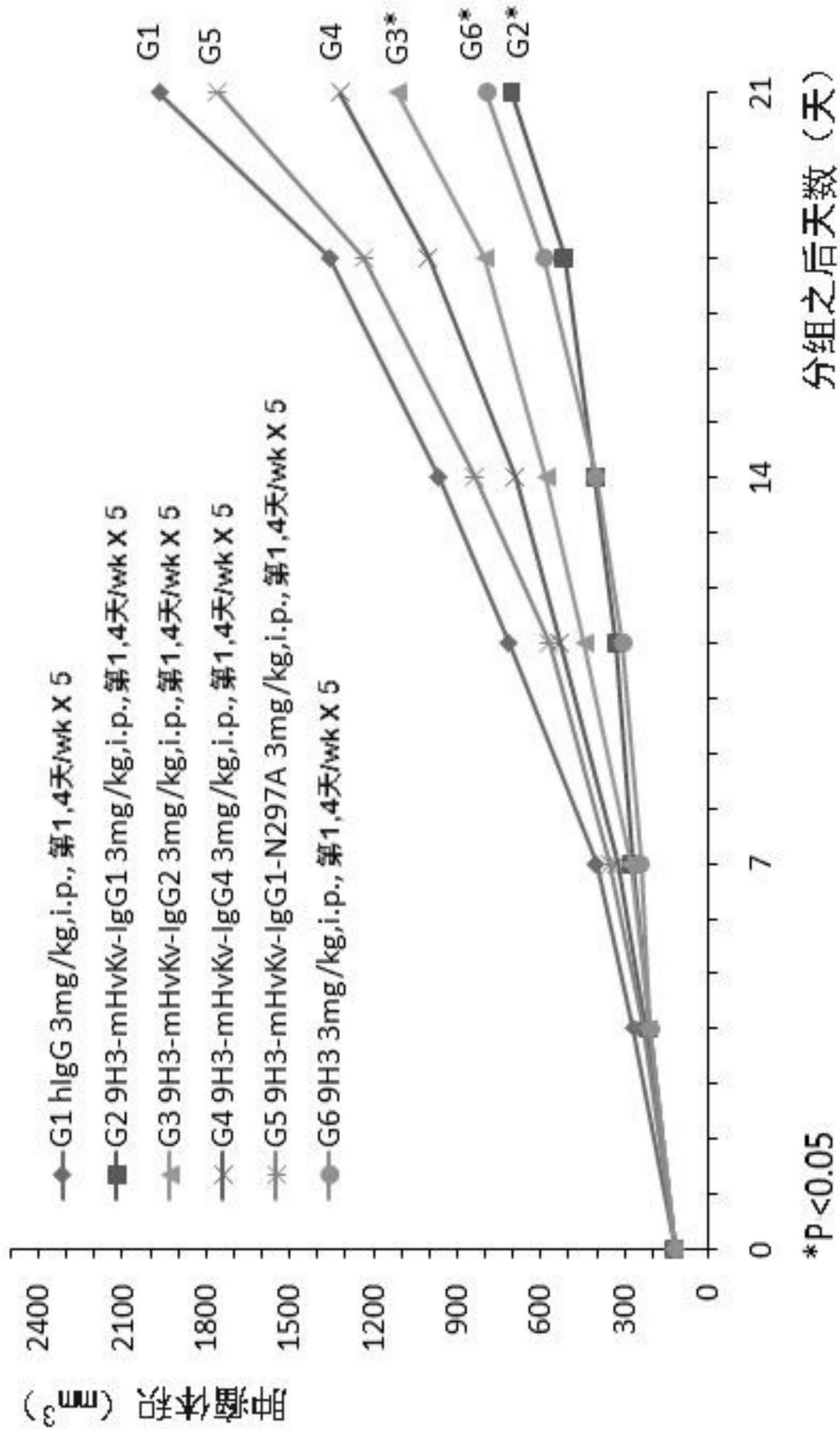


图12

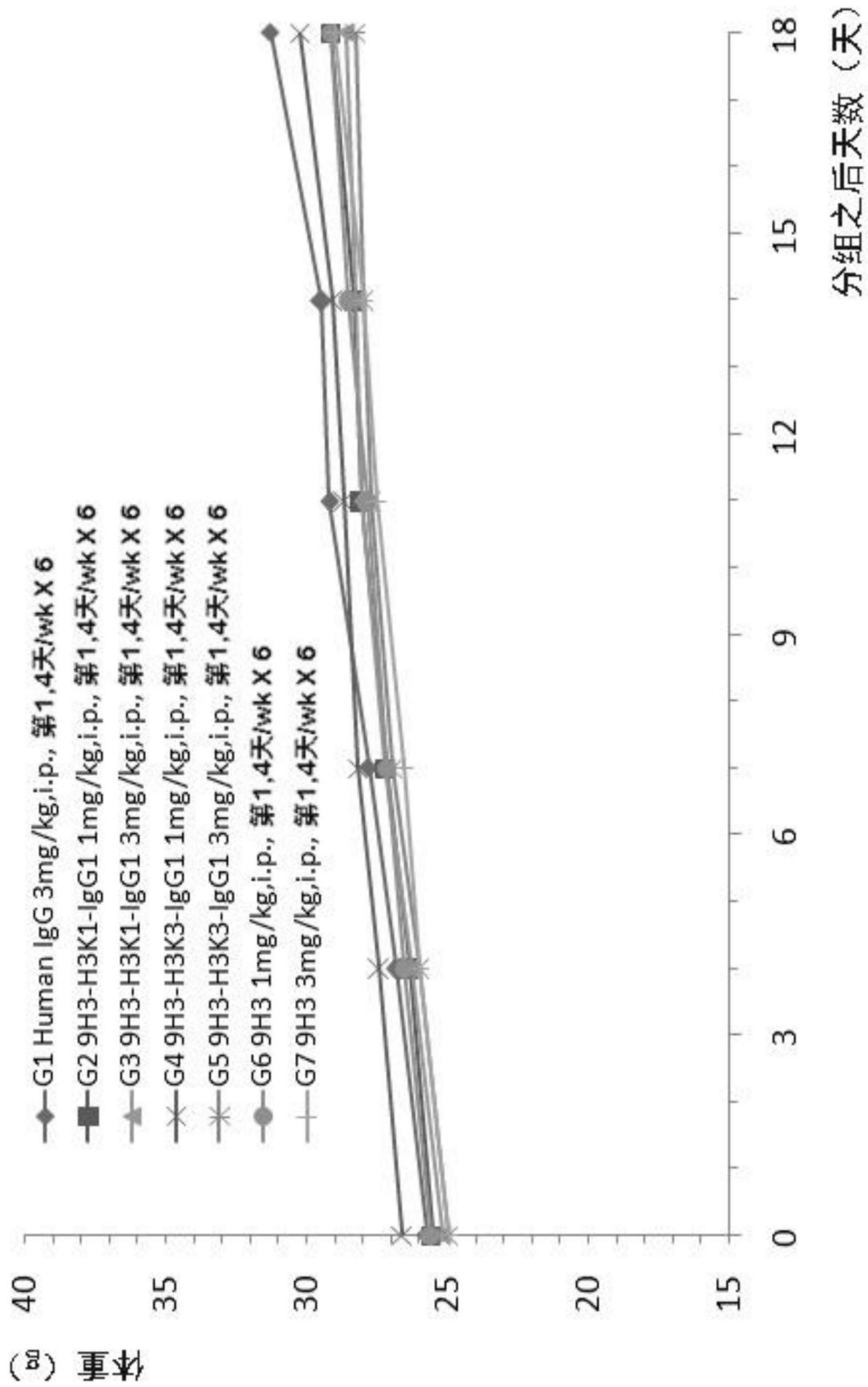


图13

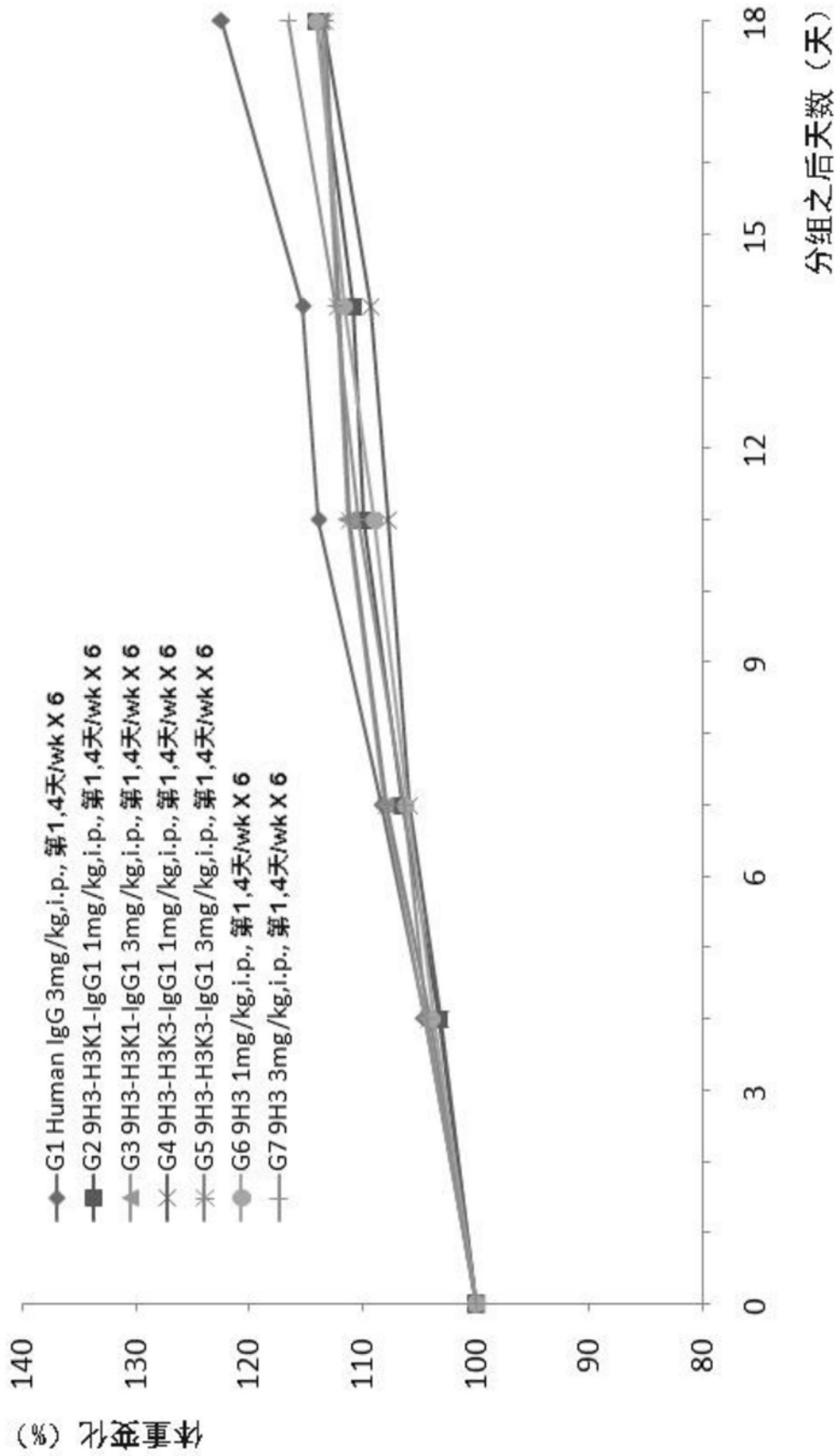


图14

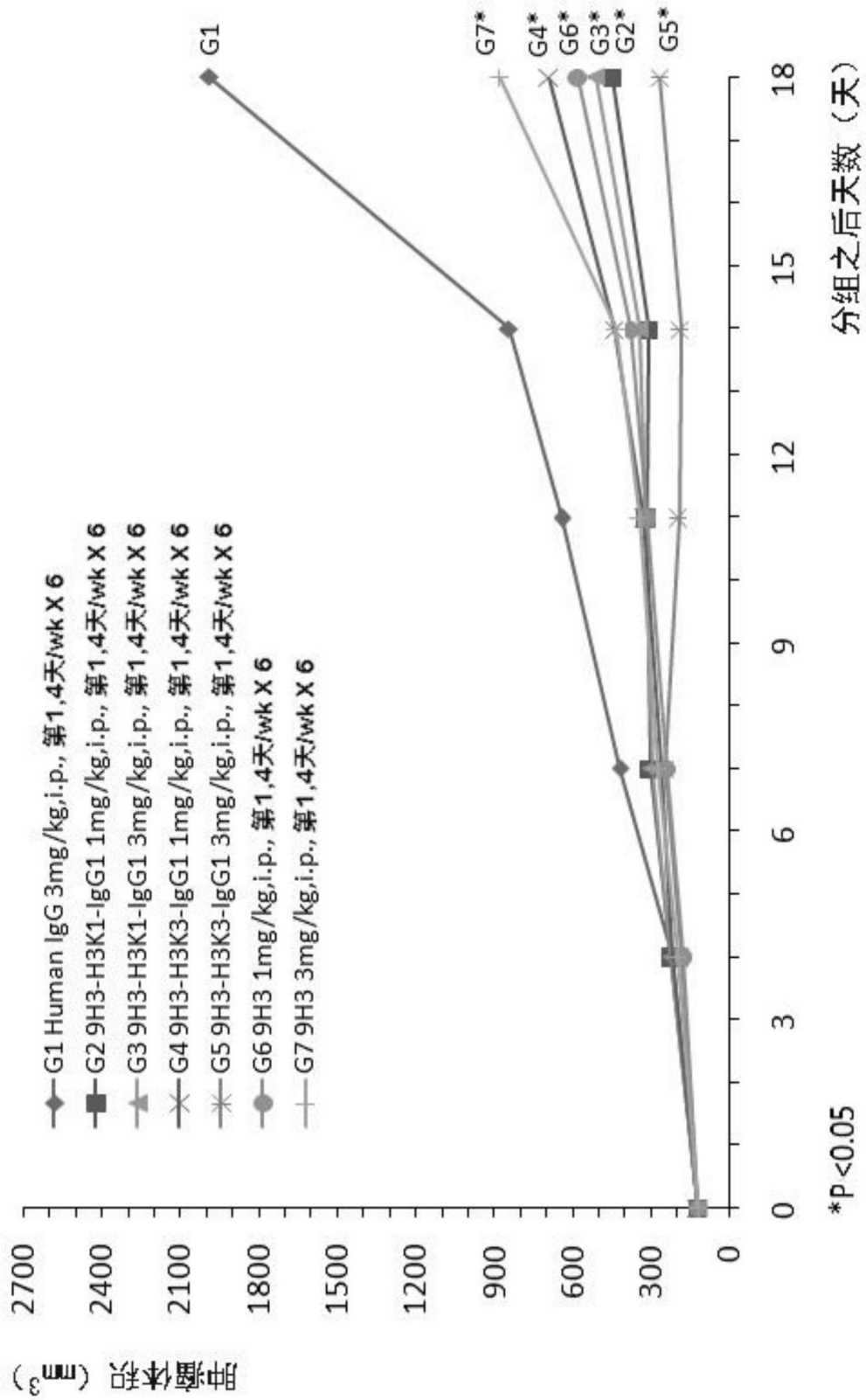


图15

肝组织病理 (H&E染色; 400X)

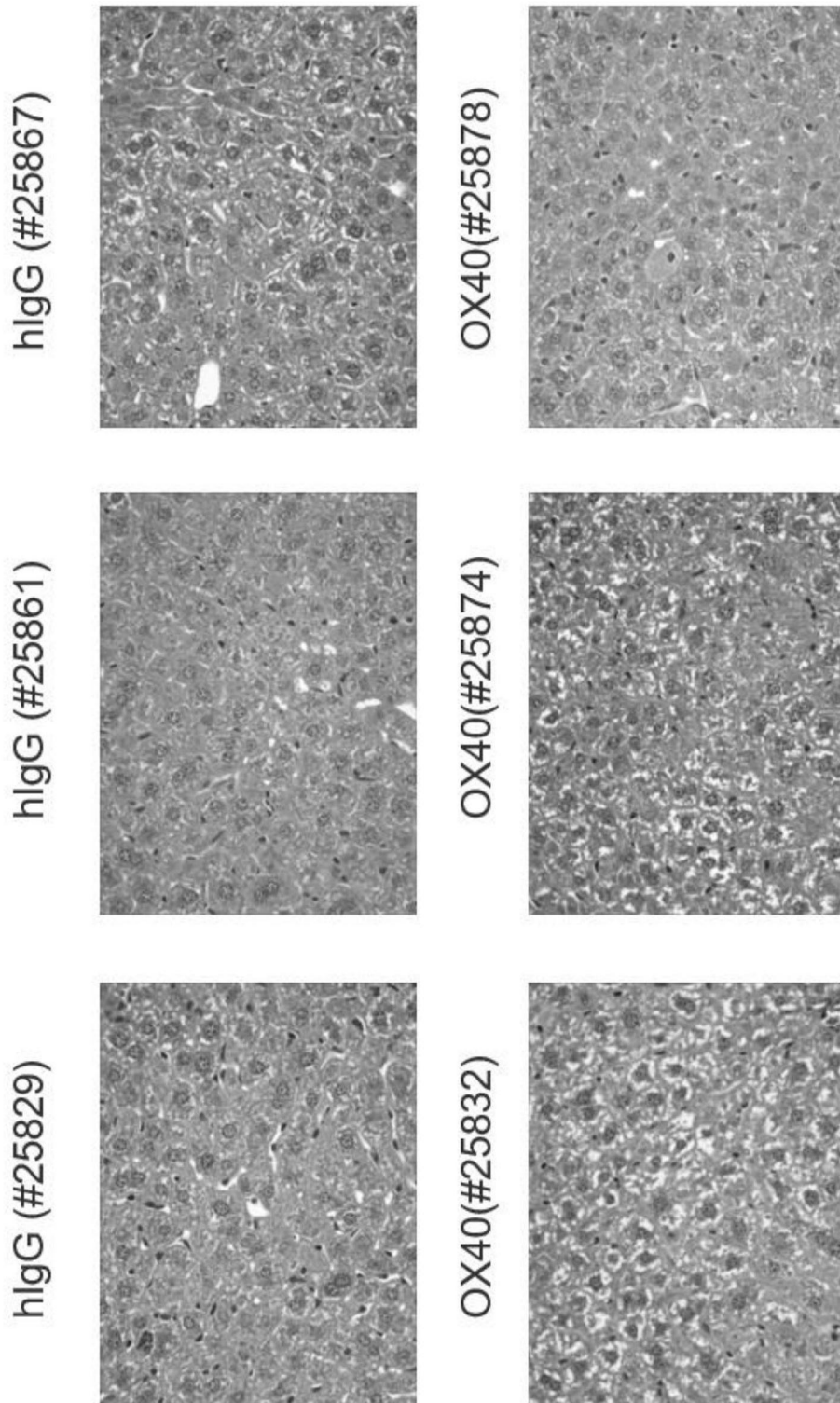
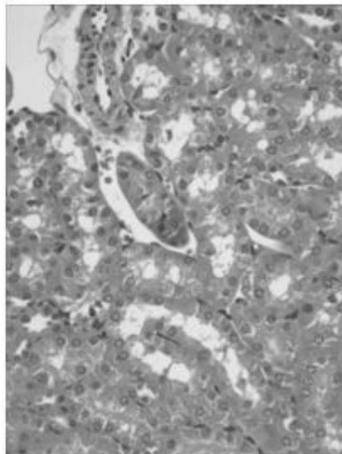


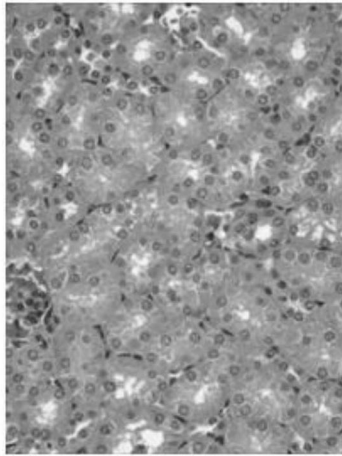
图16

肾组织病理 (H&E染色; 400X)

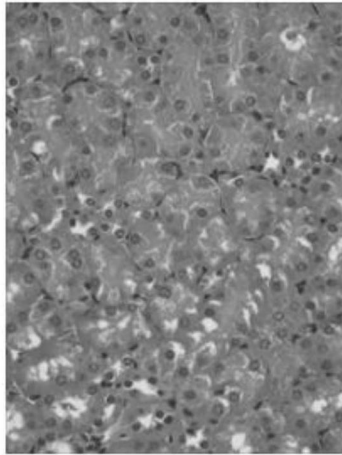
hIgG (#25829)



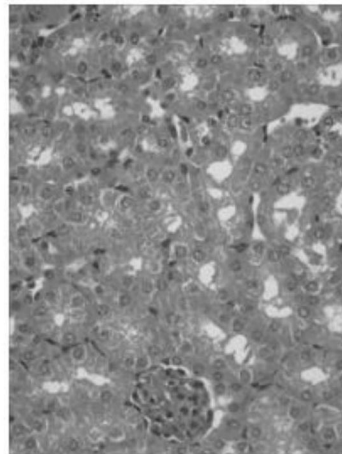
hIgG (#25861)



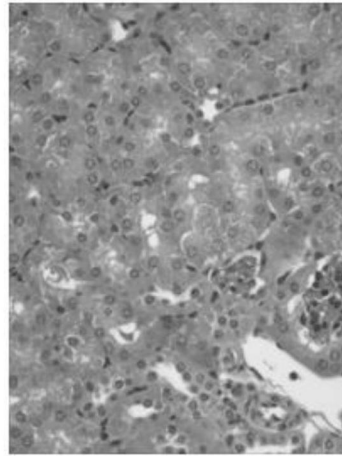
hIgG (#25867)



OX40(#25832)



OX40(#25874)



OX40(#25878)

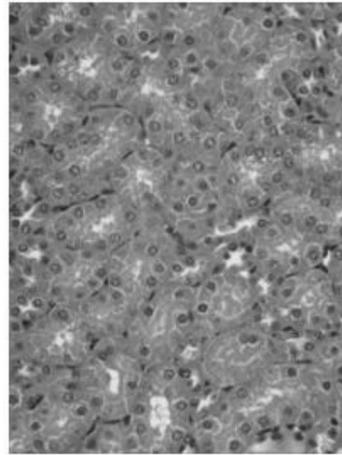
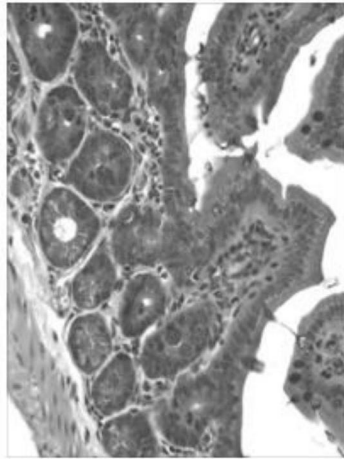


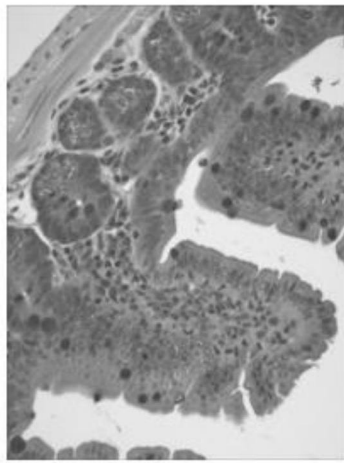
图17

肠组织病理 (H&E染色; 400X)

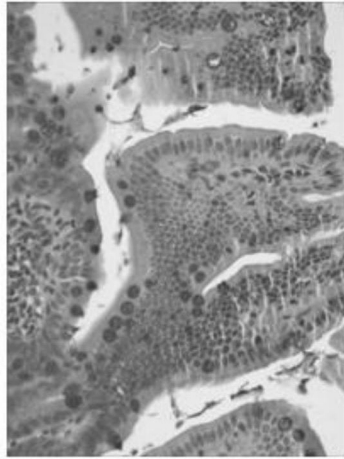
hIgG (#25829)



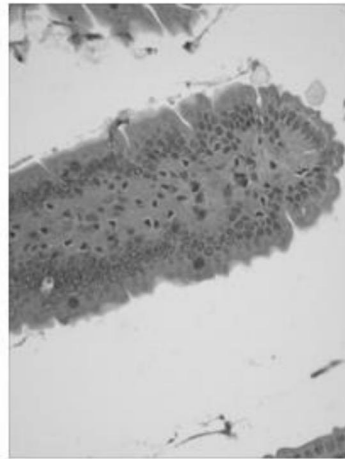
hIgG (#25861)



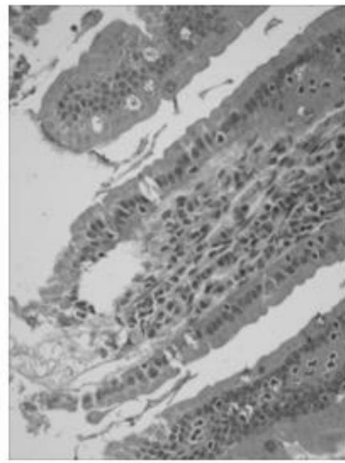
hIgG (#25867)



OX40(#25832)



OX40(#25874)



OX40(#25878)

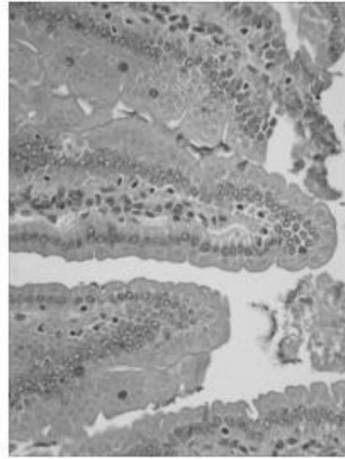


图18

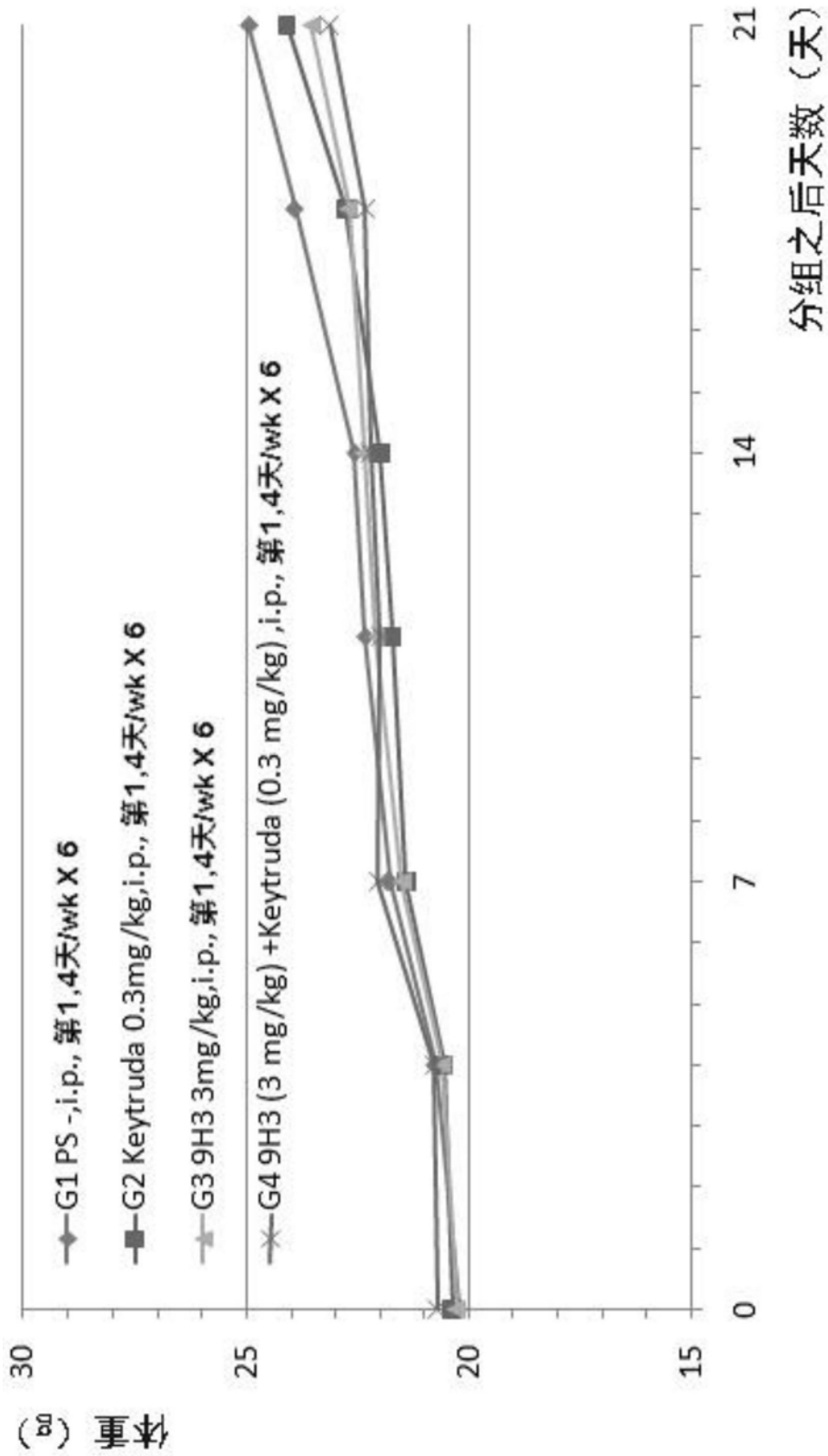


图19

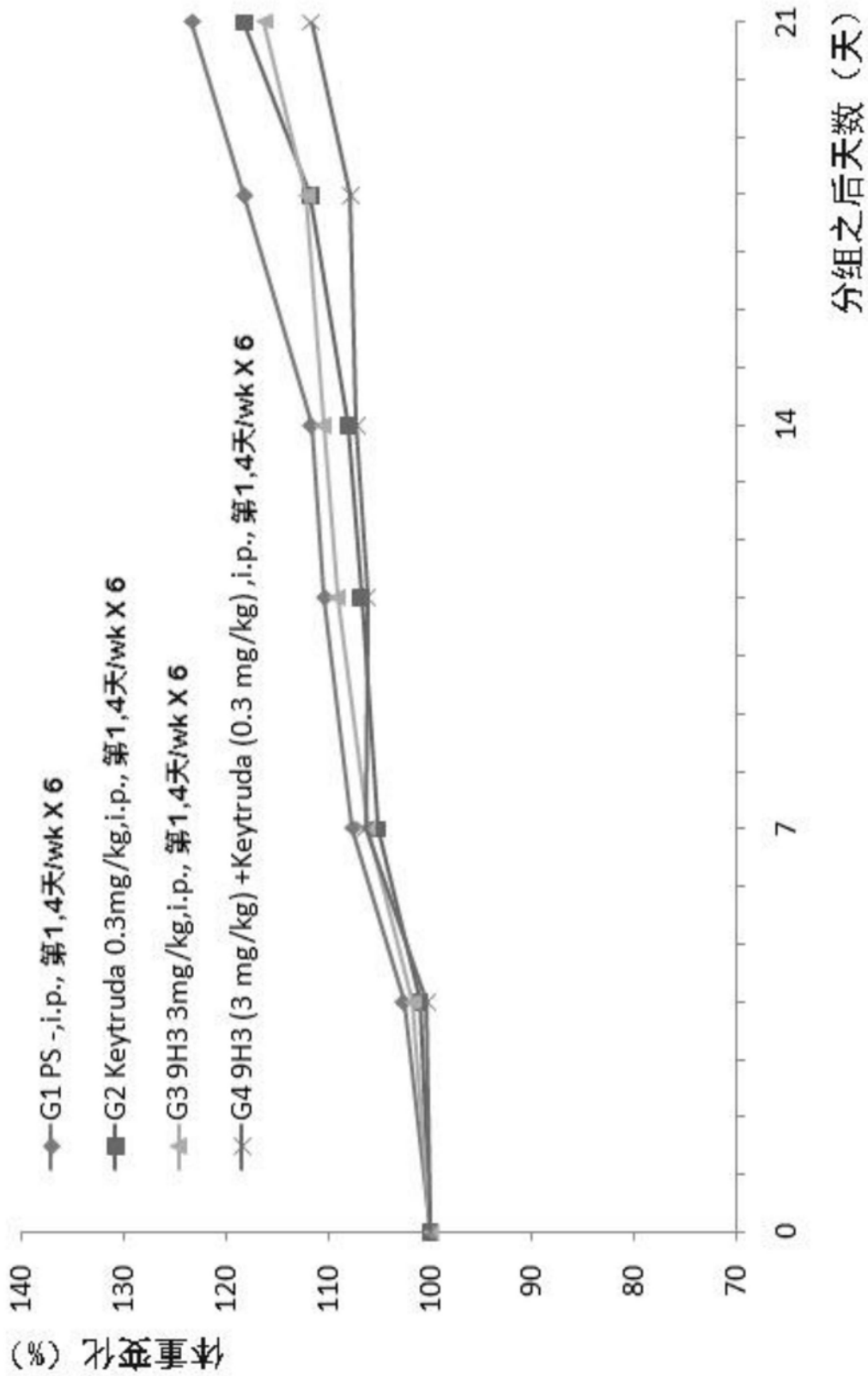


图20

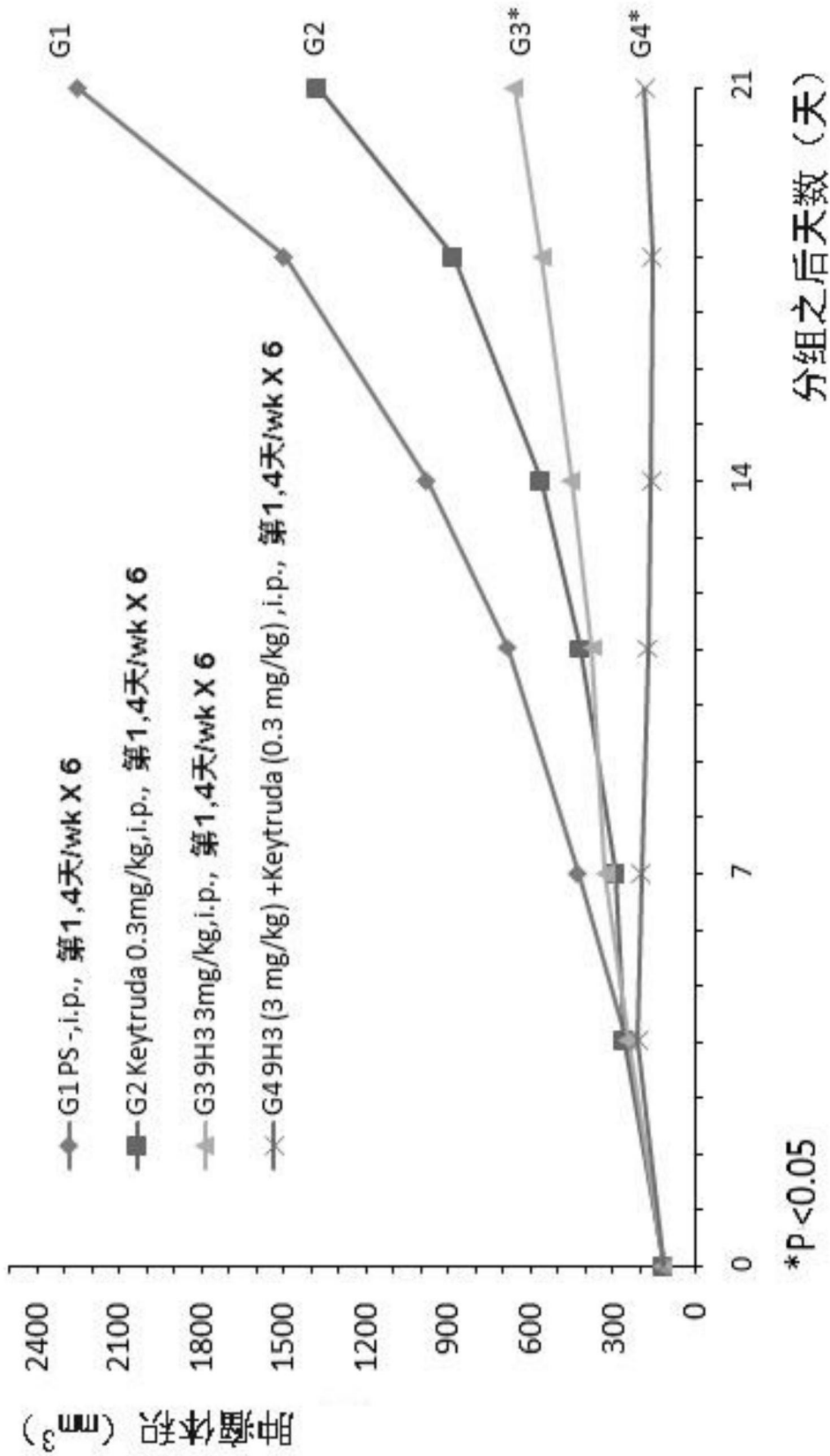


图21

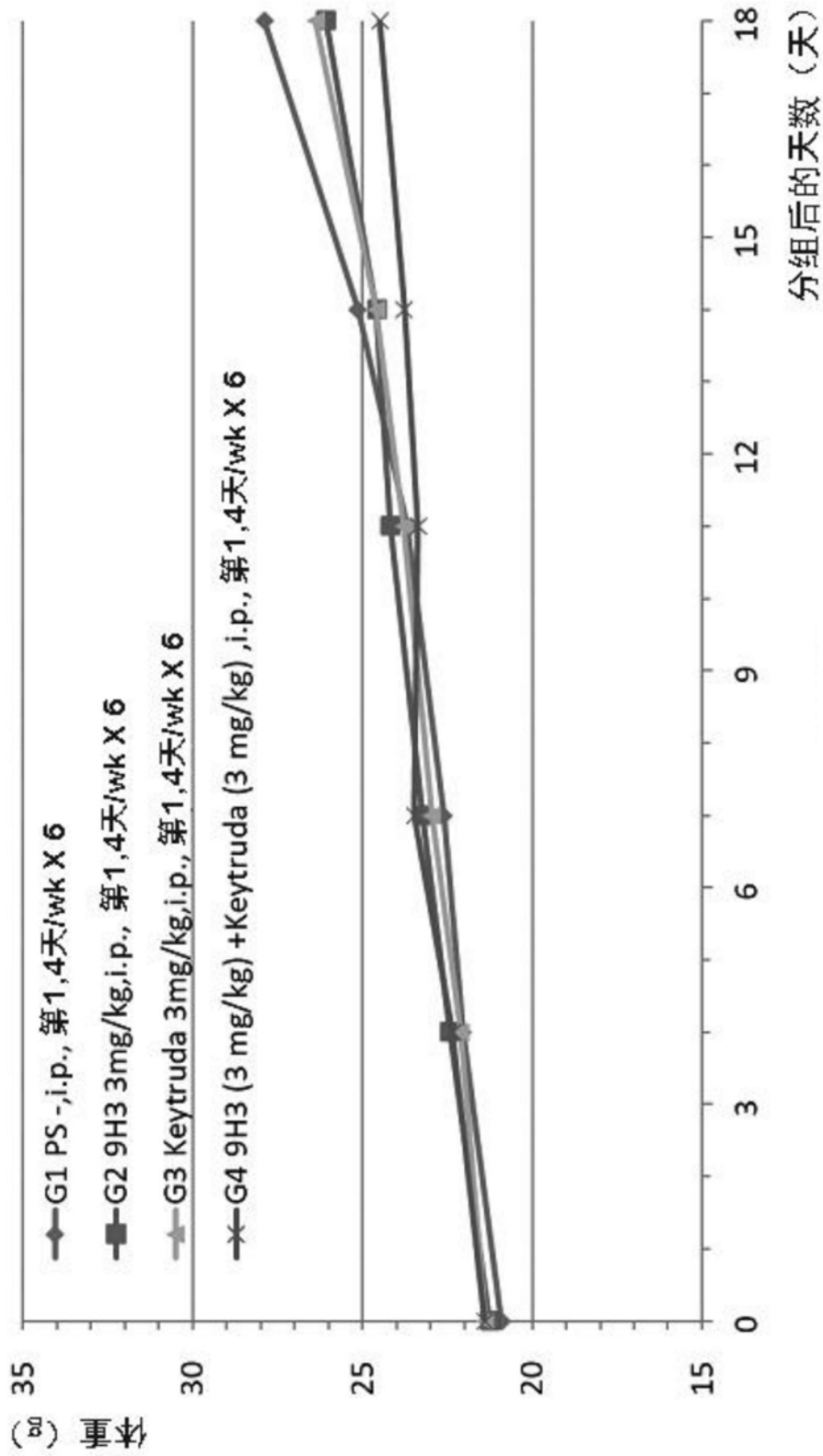


图22

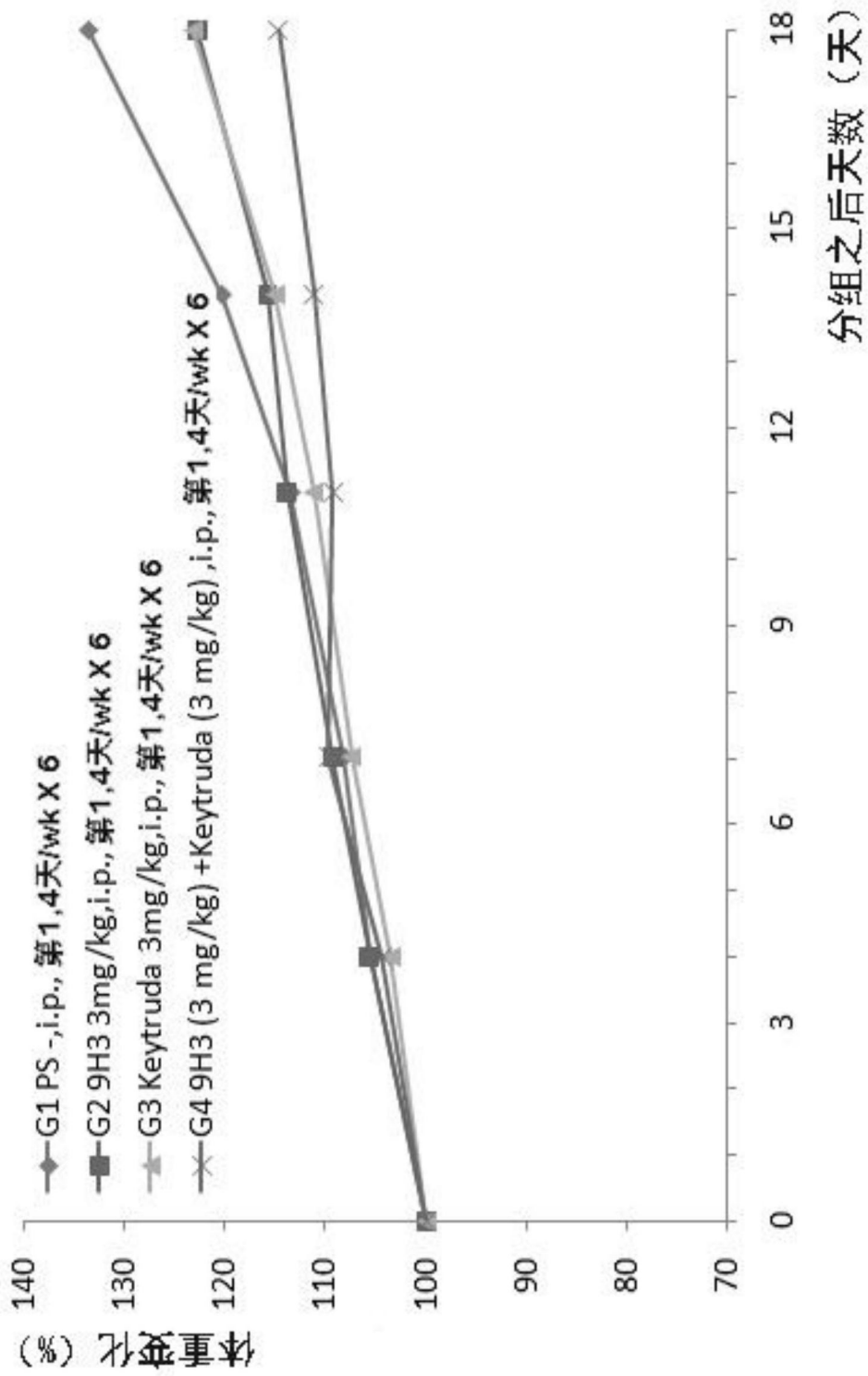


图23

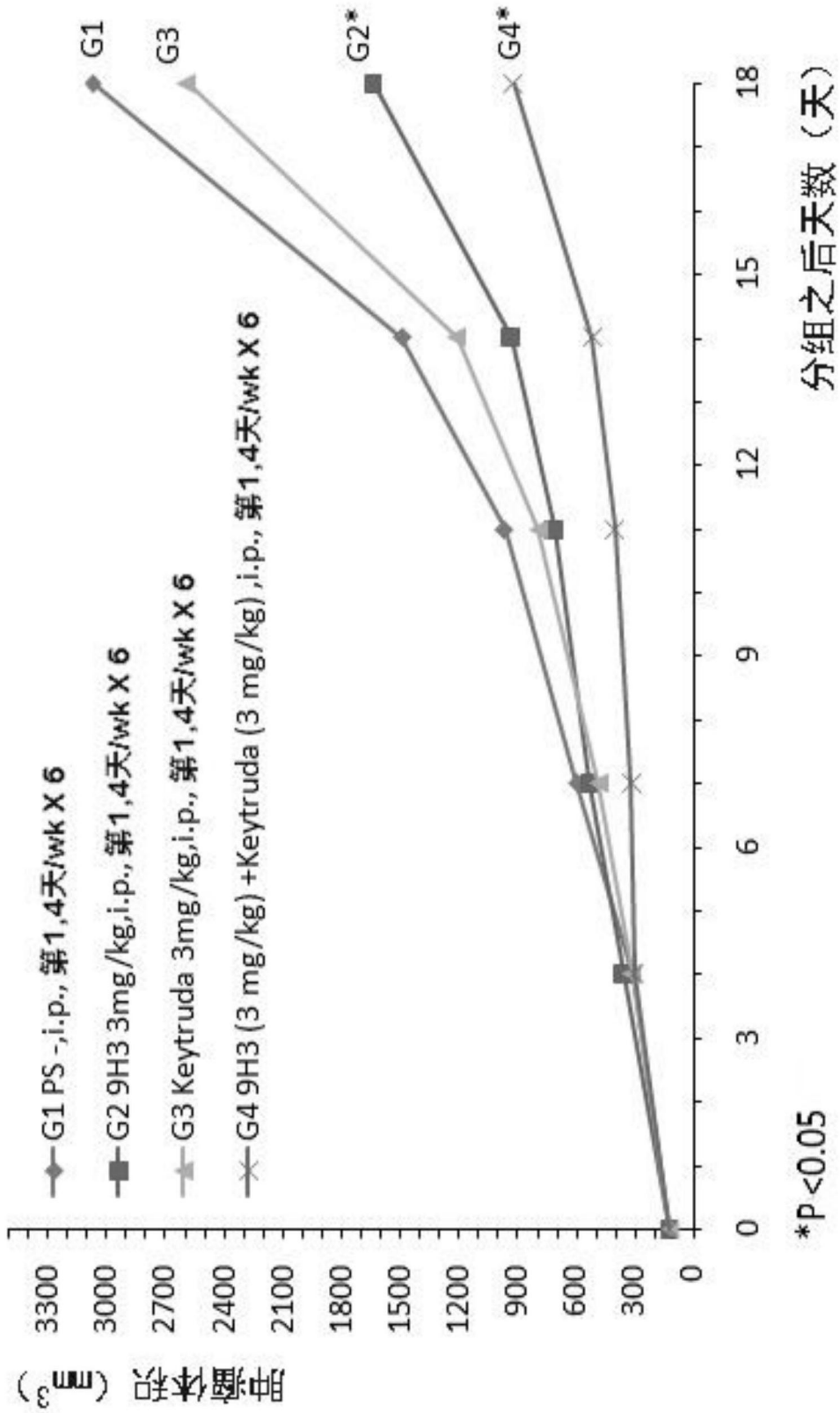


图24

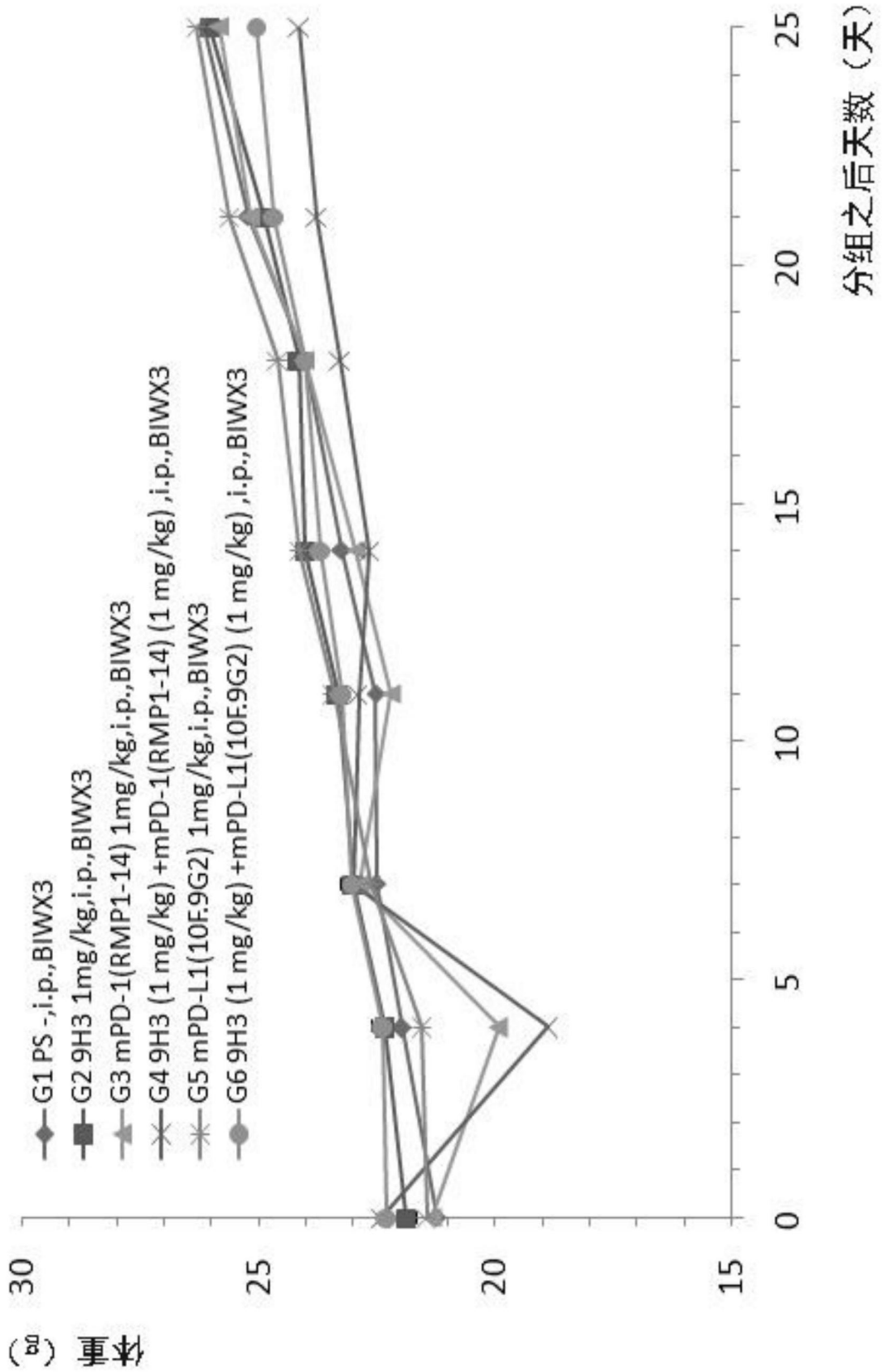


图25

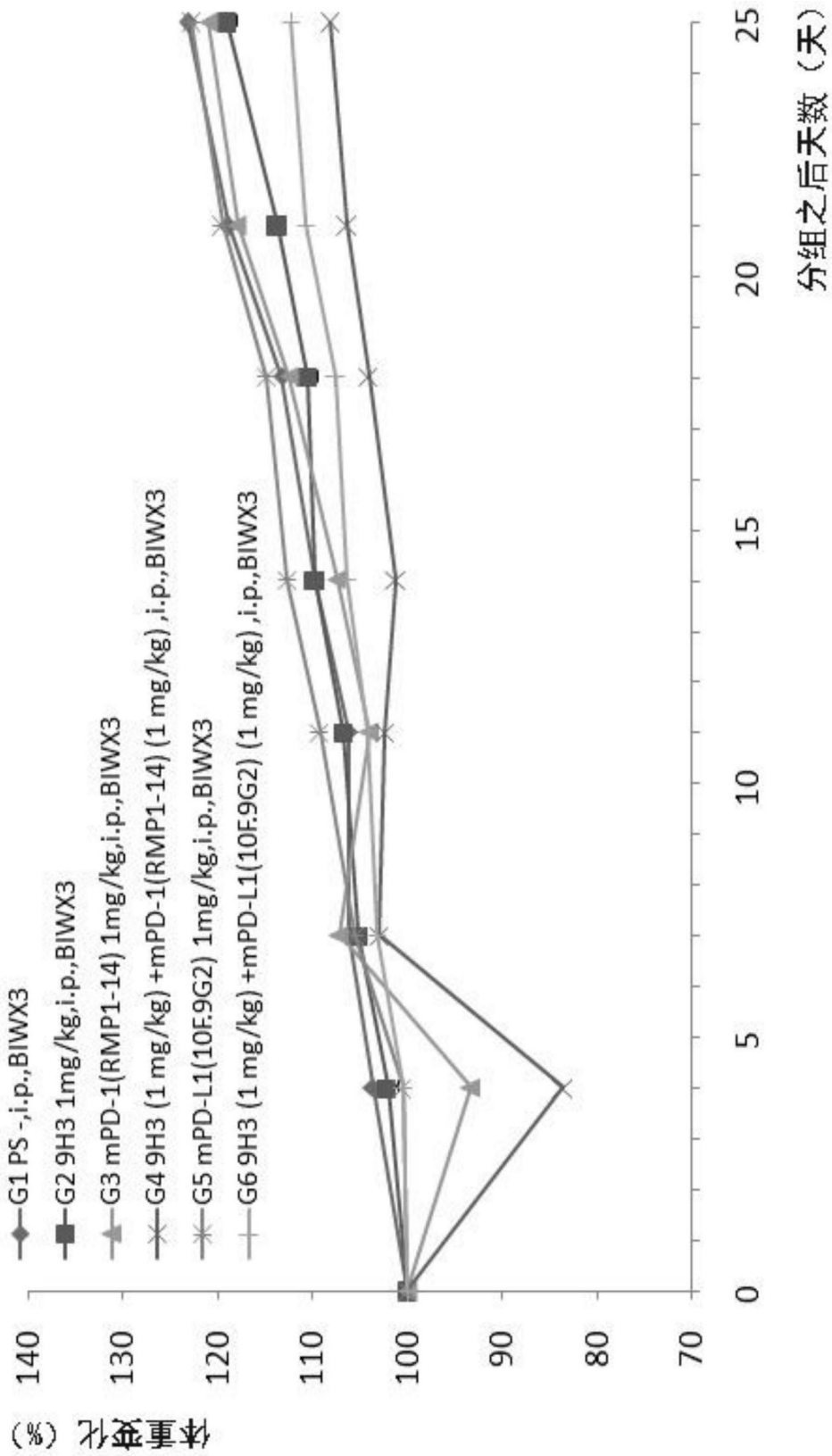


图26

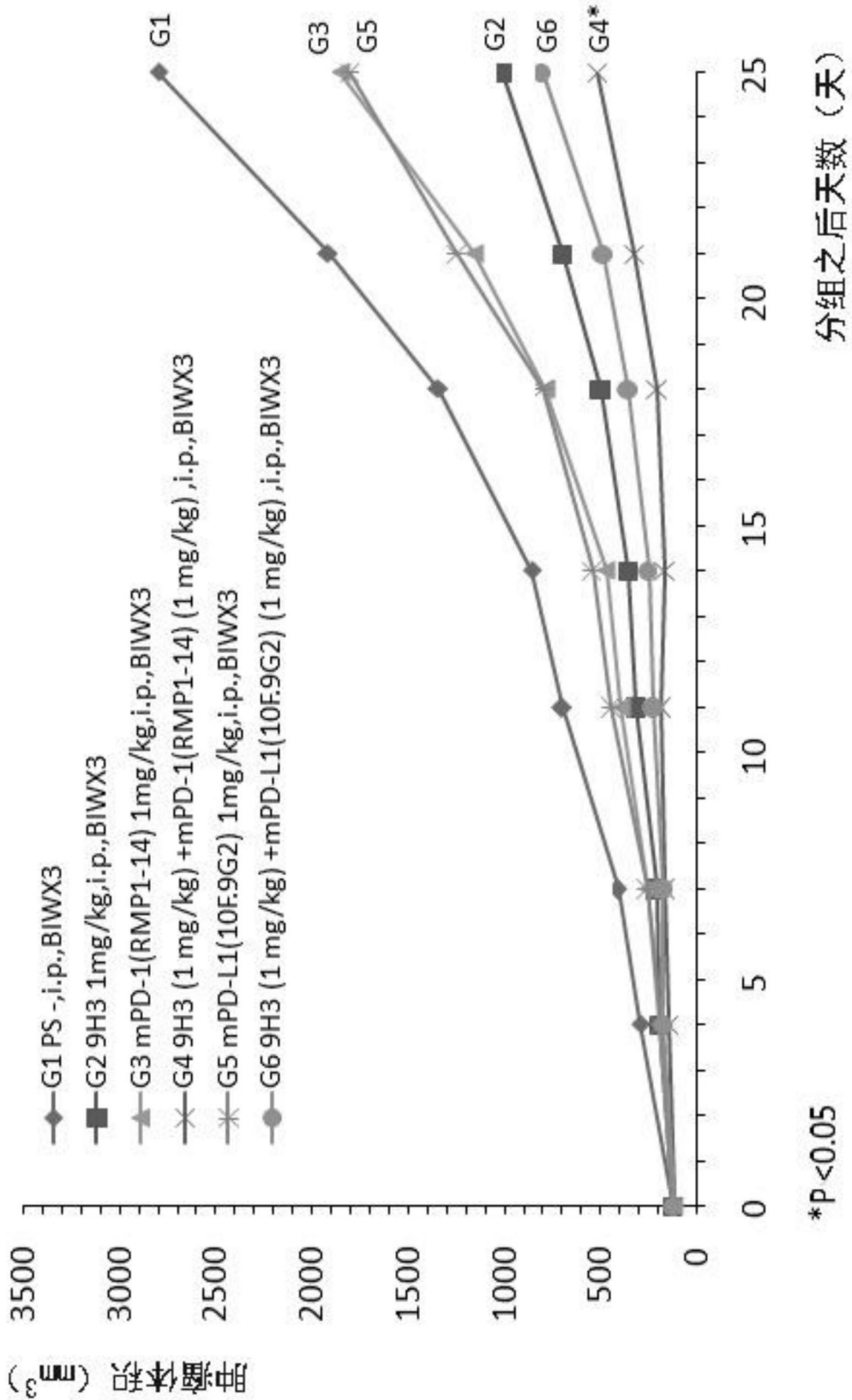


图27

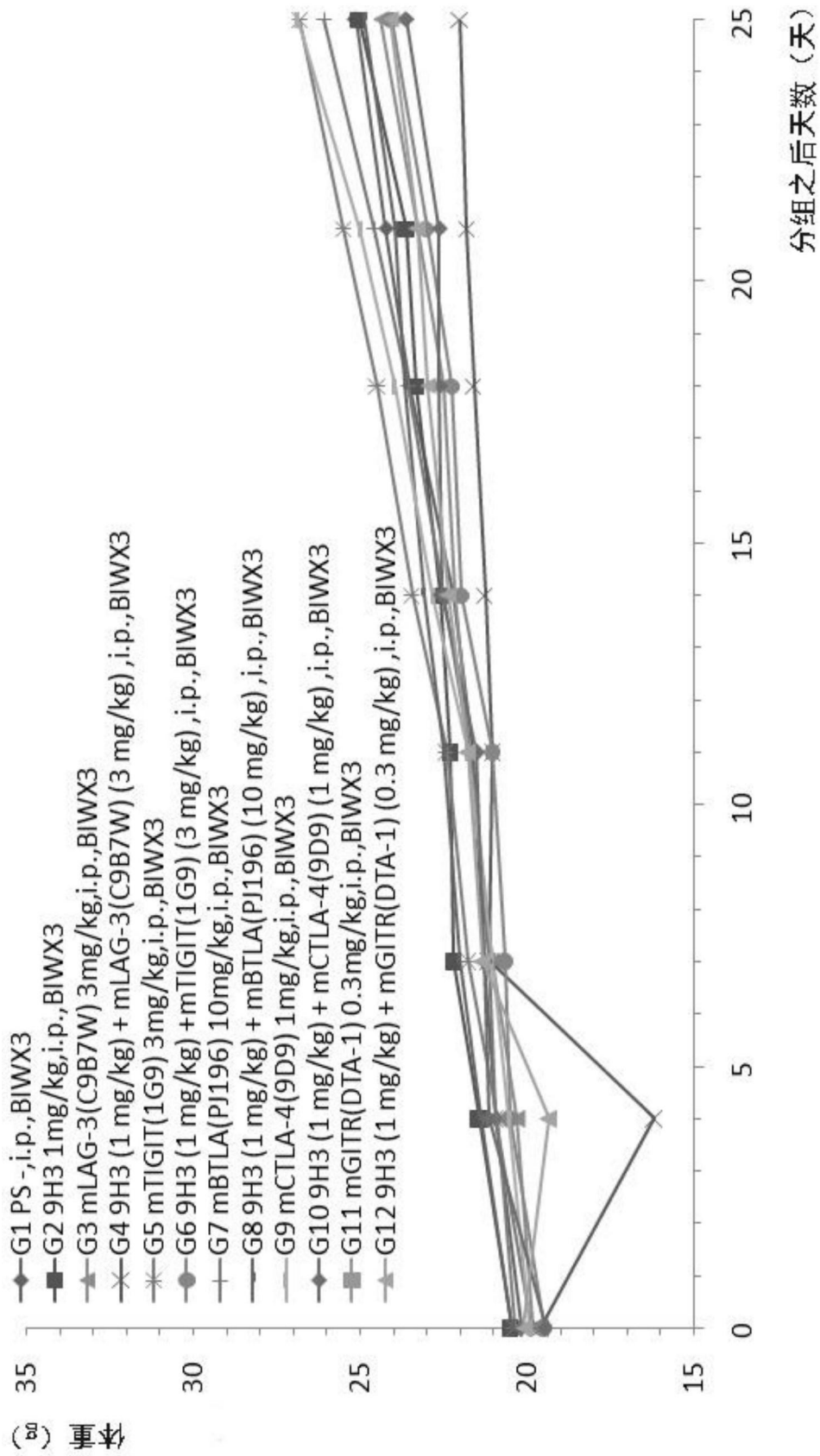


图28

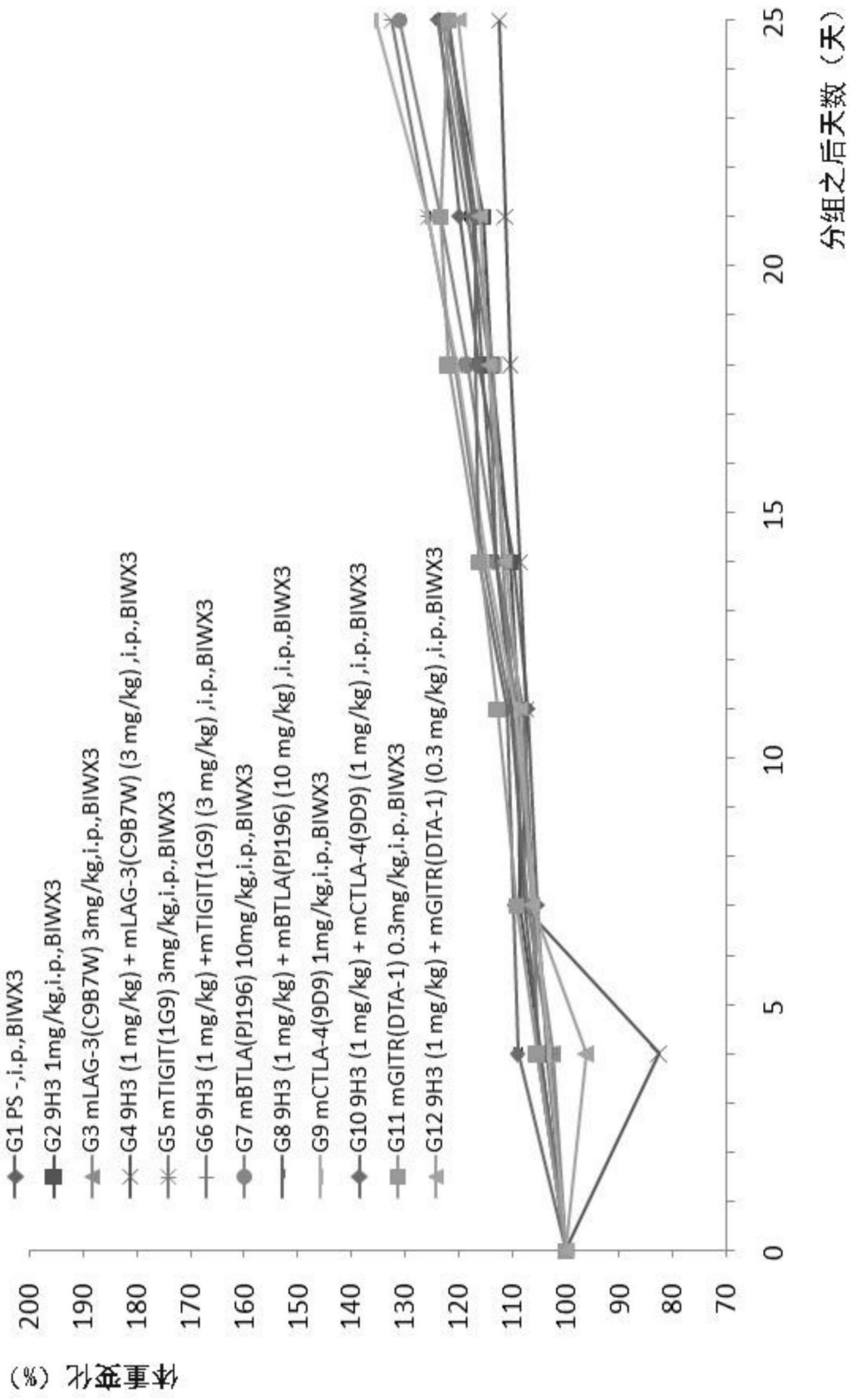


图29

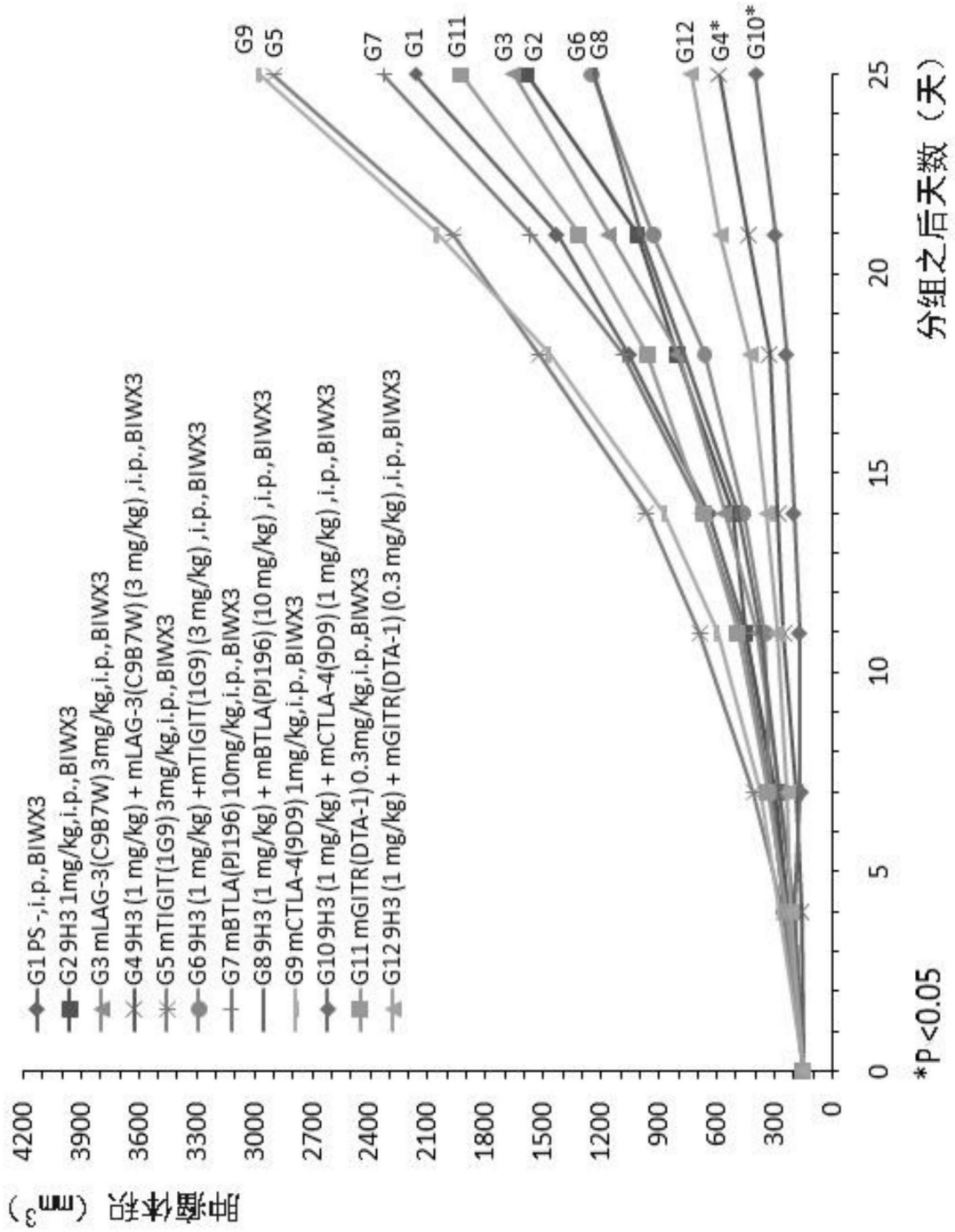


图30

Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
07-9H3 或人源化 07-9H3	SYGVL	1	VIWGGGSTDYNA AFIS	2	EEFGY	3	RASQDINNVLN	4	YTSRLHS	5	QQTNTLP WT	6
07-9A4 或人源化 07-9A4	DYN MD	7	DINPNYDST SYNQKFKG	8	GGYGY VDYFDY	9	KASENVVT YVS	10	GASNR YT	11	GQSYS YPYT	12
11-5C1 或人源化 11-5C1	SYWM H	13	TIYPGNSDTSNN QKFKG	14	FYRYEDYY AMDY	15	KASQDVNTAV A	16	SASYRYT	17	QQHYSTP FT	18
17-5D10 或人源化 17-5D10	SYGVH	19	VIWAGGNTNYN SALMS	20	YDGYGWF AY	21	RASQDISYVLN	22	YTSRLHS	23	QQGHTL PWT	24

图31

Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
07-9H3 或人源化 07-9H3	GFSLT SYGVL	25	WSGGG	26	EEFGY	27	RASQDINNVLN	28	YTSRLHS	29	QQTNTLP WT	30
07-9A4 或人源化 07-9A4	GYTF TDY NMD	31	NPNYDS	32	GGYGN Y VDYFDY	33	KASENVVT YVS	34	GASNR YT	35	GQSYS YPYT	36
11-5C1 或人源化 11-5C1	GYSFT SYWM H	37	YPGNSD	38	FVRYEDYY AMDY	39	KASQDVNTAV A	40	SASYRYT	41	QQHYSTP FT	42
17-5D10 或人源化 17-5D10	GFSLT SYGVH	43	WAGGN	44	YDGYGWF AY	45	RASQDISYVLN	46	YTSRLHS	47	QQGHTL PWT	48

图32

蛋白质	氨基酸序列	SEQ ID NO:
人 OX40 (hOX40) NP_003318.1	MCVGARRLGR GPCAAALLLIG IGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPTTVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG IGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSR TPIQEEQADA HSTIAKI	49
小鼠 OX40 (mOX40) NP_035789.1	MYVWQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCPTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNQACK PWTNCILSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSL L ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG IGLLAPLTVL LALYLLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	50
猴 OX40 (mOX40) XP_001090870.1	MCVGARRLGR GPCAAALLLIG IGLSTTAKLH CVGDTYPSND RCCQECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSAPK CKACTWCNLR SGERKQPC T ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPPTQPQETQ GPPARPTTVQ PTEAWPRTSQ RPSTRPVEVP RGPAAVAAILG IGLALGLLGP LAMLLALLLL RRDQRLPPDA PKAPGGGSR TPIQEEQADA HSALAKI	51
嵌合 OX40 (chiOX40) (人源化 OX40)	MYVWQQPTALLLGLTLGV TARRLNCVKHTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRCPGPFYND VVSSKPKCPCWTCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPFGHSPGDNACKPW TNC TL AGKHTLQPASNSSDAICEDRDPATQPQETQGPAPRITVQPTAEAWPRTSELPPTLVTPGPPA FAVLLGLGLLAPLTVLLALYLLLRKAWRLPNTPKCWGNSFRTPIQE EHTDAHFTLAKI	52

图33

人源化抗体可变结构域	说明	氨基酸序列	SEQ ID NO:
9H3 人源化重链可变结构域 (H1)	HuVHv1: 人源化百分比 81.6%; 最高命中于人和食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>)	QQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTSYGVLWVRQAP GKLEWAVIWSGGSTDYNAAFISRLTISRDNKSKSTLYFQM NSLRAEDTAVYYCAREEFGYWGQGLLTVTVSS	53
9H3 人源化重链可变结构域 (H2)	HuVHv2: 人源化百分比 78.6%; 最高命中于人和食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>)	QQLVESGGGVVQPGRSLRISCAVSGFSLTSYGVLWVRQAP GKLEWAVIWSGGSTDYNAAFISRLTISRDNKSKSTLYFQM NSLRAEDTAVYYCAREEFGYWGQGLLTVTVSS	54
9H3 人源化重链可变结构域 (H3)	HuVHv3: 人源化百分比 76.5%; 不是最高命中于人和食蟹猴	QQLVESGGGVVQPGRSLRISCAVSGFSLTSYGVLWVRQAP GKLEWLVGIWSGGSTDYNAAFISRLTISRDNKSKSTLYFQM NSLRAEDTAVYYCAREEFGYWGQGLLTVTVSS	55
9H3 人源化轻链可变结构域 (K1)	HuVLv1: 人源化百分比 87.4%; 最高命中于人和食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDINNINLWYQQKPG GAVKLLIYYTSSLRHTGVPFRFSGSGGTDFTLTISSLQPED IATYCCQQNTNLPWTFGGGTKLEVKR	56
9H3 人源化轻链可变结构域 (K2)	HuVLv2: 人源化百分比 86.3%; 不是最高命中于人和食蟹猴	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDINNINLWYQQKPG GAVKLLIYYTSSLRHSVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPED IATYCCQQNTNLPWTFGGGTKLEIKR	57
9H3 人源化轻链可变结构域 (K3)	HuVLv3: 人源化百分比 84.2%; 不是最高命中于人和食蟹猴	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDINNINLWYQQKPG GAVKLLIYYTSSLRHSVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPED IATYFCQQNTNLPWTFGGGTKLEIKR	58
9A4 人源化重链可变结构域 (H1)	HuVHv1: 人源化百分比 81.6%; 不是最高命中于人和食蟹猴	EVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMDWVRQAP GKLEWIGDINPNYDSTYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGGYGNYVDYFDYWGQGLLTVTVSS	59
9A4 人源化重链可变结构域 (H2)	HuVHv2: 人源化百分比 80.6%; 不是最高命中于人和食蟹猴	EVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMDWVKQAP GKLEWIGDINPNYDSTYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGGYGNYVDYFDYWGQGLLTVTVSS	60

图34

9A4 人源化重链可变 结构域 (H3)	HuVHv3: 人源化百分比 78.6%; 不是最高命中于人和食蟹猴	EVQLQQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMDWVKQAP GKGLEWIGDINPNYDSTSYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYICARGGYGNYVDYFDYWGQGTLLTVSS	61
9A4 人源化轻链可变 结构域 (K1)	HuVLv1: 人源化百分比 84.4%; 最高命中于人和食蟹猴 (Macaca fascicularis)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVVTVVSWYQQKPG QAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPED FADYHCGQSYSPYTFGGQGTKLEIK	62
9A4 人源化轻链可变 结构域 (K2)	HuVLv2: 人源化百分比 84.2%; 最高命中于人和食蟹猴 (Macaca fascicularis)	NIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVVTVVSWYQQKPG QAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPED FADYHCGQSYSPYTFGGQGTKLEIK	63
9A4 人源化轻链可变 结构域 (K3)	HuVLv3: 人源化百分比 80%; 不是最高命中于人和食蟹猴	NIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVVTVVSWYQQKPG QAPRLLIYGASNRYTGVPDRFSGSATDFTLTISSVQPED FADYHCGQSYSPYTFGGQGTKLEIK	64
9A4 人源化轻链可变 结构域 (K4)	HuVLv4: 人源化百分比 77.9%; 不是最高命中于人和食蟹猴	NIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASENVVTVVSWYQQKPG QSPRLLIYGASNRYTGVPDRFSGSATDFTLTISSVQPED FADYHCGQSYSPYTFGGQGTKLEIK	65
5C1 人源化重链可变 结构域 (H1)	HuVHv1: 人源化百分比 81.2%; 不是最高命中于人和食蟹猴	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMCKASGYSFTSYWMHWVRQRP GQGLEWIGTIYPGNSDTSNQKFKGRVKLTAADTSASTAYME LSSLRSEDTAVYICTTFYRYEDYAMDYWGQGTLLTVSS	66
5C1 人源化重链可变 结构域 (H2)	HuVHv2: 人源化百分比 80.2%; 不是最高命中于人和食蟹猴	EVQLVQSGAEVVKPGASVKMCKASGYSFTSYWMHWVRQRP GQGLEWIGTIYPGNSDTSNQKFKGRVKLTAADTSASTAYME LSSLRSEDTAVYICTTFYRYEDYAMDYWGQGTLLTVSS	67
5C1 人源化重链可变 结构域 (H3)	HuVHv3: 人源化百分比 79.2%; 不是最高命中于人和食蟹猴	EVQLVQSGAEVVKPGASVKMCKASGYSFTSYWMHWVRQRP GQGLEWIGTIYPGNSDTSNQKFKGRVKLTAADTSASTAYME LSSLRSEDTAVYICTTFYRYEDYAMDYWGQGTLLTVSS	68
5C1 人源化轻链可变 结构域 (K1)	HuVLv1: 人源化百分比 84.2%; 最高命中于人和食蟹猴 (Macaca fascicularis)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVNSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQPED FAVYCYCQHYSTPFTFGQGTKLEIK	69
5C1 人源化轻链可变 结构域 (K2)	HuVLv2: 人源化百分比 83.2%; 不是最高命中于人和食蟹猴	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQPED FAVYCYCQHYSTPFTFGQGTKLEIK	70

图34 (续)

<p>5C1 人源化轻链可变 结构域 (K3)</p>	<p>HuVlv3: 人源化百分比 82.1%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>DIQMTQSPSSLASVGDVRTITCKASQDVNTAVAWYQQKPG KSPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGGTDFTTISSLQPED FAVYYCQQHYSTPFTFGGQTKLEIK</p>	<p>71</p>
<p>5C1 人源化轻链可变 结构域 (K4)</p>	<p>HuVlv4: 人源化百分比 77.9%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>DIVMTQSPSSMSASVGDVRTITCKASQDVNTAVAWYQQKPG KSPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGGTDFTTISVQPED FAVYYCQQHYSTPFTFGGQTKLEIK</p>	<p>72</p>
<p>5D10 人源化重链可变 结构域 (H1)</p>	<p>HuVHv1: 人源化百分比 81.2%; 最高命中于人和食蟹猴 (<i>Macaca fascicularis</i>)</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHWIRQPP GKGLEWLGVIWAGGNTNYSALMSRLTISKDTSKNQVSLKM SSVTAADTAVYYCASIDGYYGWFAYWGQGLVTVSV</p>	<p>73</p>
<p>5D10 人源化重链可变 结构域 (H2)</p>	<p>HuVHv2: 人源化百分比 77.1%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLTSYGVHWIRQPP GKGLEWLGVIWAGGNTNYSALMSRLTISKDNSKQVSLKM SSVTAADTAVYYCASIDGYYGWFAYWGQGLVTVSV</p>	<p>74</p>
<p>5D10 人源化重链可变 结构域 (H3)</p>	<p>HuVHv3: 人源化百分比 75%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLTSYGVHWIRQPP GKGLEWLGVIWAGGNTNYSALMSRLTISKDNSKQVSLKM SSVTAADTAMYNCAIDGYYGWFAYWGQGLVTVSV</p>	<p>75</p>
<p>5D10 人源化轻链可变 结构域 (K1)</p>	<p>HuVlv1: 人源化百分比 86.3%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>DIQMTQSPSSLASVGDVRTITCRASQDISYILNWIYQQKPG KAVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISLQPED FATYFCQQGHTLTPWTFGGQTKLEIK</p>	<p>76</p>
<p>5D10 人源化轻链可变 结构域 (K2)</p>	<p>HuVlv2: 人源化百分比 85.3%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>DIQMTQSPSSLASVGDVRTITCRASQDISYILNWIYQQKPG GAVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISLQPED FATYFCQQGHTLTPWTFGGQTKLEIK</p>	<p>77</p>
<p>5D10 人源化轻链可变 结构域 (K3)</p>	<p>HuVlv3: 人源化百分比 82.1%; 不是最高命中于人和食蟹猴</p>	<p>DIQMTQSTSSLASVGDVRTITCRASQDISYILNWIYQQKPG GAVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISLQPED IATYFCQQGHTLTPWTFGGQTKLEIK</p>	<p>78</p>

图34 (续)

07-9H3 (“9H3”) 重链可变区 (SEQ ID NO: 79)
 QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTSYGVLWVRQPQPKGLEWLGVWISGGST
 DYNAAFISRLSISKDNSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCAREEFGYWGQGLVTVSA

07-9H3 (“9H3”) 轻链可变区 (SEQ ID NO: 80)
 DIQMTQTTSSLASLGDRTVISCRAQDINNVLNWNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLLHSGV
 PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQTNTLPWTFGGGKLEIK

07-9A4 (“9A4”) 重链可变区 (SEQ ID NO: 81)
 EVQLQQFGAELVKPGASVKISCKKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLWIGDINPNYDS
 TSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARGGYGNYVDYFDYWGQ
 GTTLTVSS

07-9A4 (“9A4”) 轻链可变区 (SEQ ID NO: 82)
 NIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTG
 VPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQSYSYPYTFGGGKLEIK

11-5C1 (“5C1”) 重链可变区 (SEQ ID NO: 83)
 EVLQQSGTVLARPGASVKMSCKKASGYSFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGTIYPGNS
 DTSNNQKFKGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTNEDSAVYYCTTFYRYEDYYAMDYV
 GQGTSVTVSS

11-5C1 (“5C1”) 轻链可变区 (SEQ ID NO: 84)
 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSICTCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYASRYTGT
 VPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPFTFGSGTKLEIK

17-5D10 (“5D10”) 重链可变区 (SEQ ID NO: 85)
 QVQLKESGPGLVAPSSQLSITCTVSGFSLTSYGVHWRIRQPPKGLEWLGVWAGGNT
 NYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYNCASVDGYGWFAYWGQGL
 VTVSV

17-5D10 (“5D10”) 轻链可变区 (SEQ ID NO: 86)
 DIQMTQTTSSLASLGDRTVISCRAQDISYVLNWNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLLHSGV
 PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGHTLPWTFGGGKLEIK

图35