



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110392696 B

(45)授权公告日 2020.09.11

(21)申请号 201880005123.0

A61K 39/395(2006.01)

(22)申请日 2018.01.05

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110392696 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2019.10.29

CN 1867585 A,2006.11.22

CN 1357009 A,2002.07.03

(30)优先权数据

62/443,281 2017.01.06 US

WO 2016134358 A1,2016.08.25

WO 2017205745 A1,2017.11.30

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.17

Jienny Lee,等.Administration of

agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of inflammatory bowel disease.《Immunology Letters》.2005,第101卷(第2期),

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/000043 2018.01.05

Hong HJ,等.A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in nonhuman primates.《Journal of immunotherapy》.2000,第23卷(第6期),

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/127787 EN 2018.07.12

周桓,等.鼠抗人4-1BB单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定.《细胞与分子免疫学杂志》.2011,第27卷(第9期),

(73)专利权人 优特力克斯有限公司

地址 韩国首尔

审查员 王康

(72)发明人 权炳世 李承柱 金永昊 吴好植

李重远

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖 钱文字

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书47页

序列表18页 附图12页

(54)发明名称

抗-人4-1BB抗体及其应用

(57)摘要

本文提供了具有参比抗-人4-1BB抗体不存在的一个或更多个结构特征的抗-人4-1BB抗体和其片段,其中所述特征相对于参比抗体可以改善抗体的某些特征。还提供了与本文所述抗-人4-1BB抗体相关的各种体外和体内方法和试剂。方法包括例如使用抗-人4-1BB抗体和其片段诱导T细胞增殖,诱导IFN γ 的T细胞分泌,以及检测、预防和/或治疗性处理癌症。

1. 一种抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,包含:
 - (a) 由序列SEQ ID NO:5组成的重链CDR1、由序列SEQ ID NO:6组成的重链CDR2和由序列SEQ ID NO:7或8组成的重链CDR3;和
 - (b) 由序列SEQ ID NO:1组成的轻链CDR1、由序列SEQ ID NO:2组成的轻链CDR2和由序列SEQ ID NO:4组成的轻链CDR3。
2. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段包含:
 - (a) 由序列SEQ ID NO:16或17组成的重链框架1 (FR1) 区;和/或
 - (b) 由序列SEQ ID NO:18-20中任一序列组成的重链框架3 (FR3) 区。
3. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段包含以下任一项:
 - (a) 由选自SEQ ID NO:11-14的序列组成的重链可变域;
 - (b) 由序列SEQ ID NO:10组成的轻链可变域;或者
 - (c) 由选自SEQ ID NO:11-14的序列的组成的重链可变域和由序列SEQ ID NO:10组成的轻链可变域。
4. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段对人4-1BB分子具有 1×10^{-7} 至 1×10^{-12} M的结合亲和力(K_D)。
5. 如权利要求1所述的抗-4-1BB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4-1BB多肽胞外域内的表位结合。
6. 如权利要求5所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,与人4-1BB胞外域内的表位的结合因SEQ ID NO:44位置N30、D38、N39和R41处的一个或更多个突变消除。
7. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或抗原结合片段不能结合或弱结合犬4-1BB多肽。
8. 如权利要求1所述的抗-4-1BB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抗体或其抗原结合片段。
9. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体包含免疫球蛋白恒定域,其中所述恒定域选自IgG1、IgG2、IgG4、IgA、IgE、IgM和IgD。
10. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体是人IgG1。
11. 如权利要求10所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述IgG1含与SEQ ID NO:22或23至少95%相同的序列。
12. 如权利要求1所述的抗-4-1BB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克隆抗体或其抗原结合片段。
13. 如权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段或scFv片段。
14. 一种药物组合物,包含:
 - (a) 权利要求1所述的抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段;和
 - (b) 药学上可接受的运载体。

抗-人4-1BB抗体及其应用

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求2017年1月6提交的美国专利申请第62/443,281号的优先权权益,通过引用将该申请的公开内容全文纳入本文。

背景技术

[0003] 癌症至今仍是世界上主要的死亡原因之一。最近的统计数据报道称全球人口有13%死于癌症。根据国际癌症研究机构(IARC)的估计,2012年全球新发癌症病例1410万例,癌症死亡人数820万例。到2030年,由于人口增长和老龄化以及接触诸如吸烟、不健康饮食和缺乏身体活动等风险因素,全球负担预计将增加至2170万新癌症病例和1300万癌症死亡人数。此外,癌症治疗的痛苦和医疗开支导致癌症患者及其家人生活品质降低。显而易见,癌症是一种亟需寻求更好治疗方法的疾病。

发明内容

[0004] 本文提供的内容包括抗体及其片段,所述抗体及其片段结合人4-1BB多肽。在一些方面,提供的抗-人4-1BB抗体和其片段是参比抗-人4-1BB抗体的变体,其中它们包含参比抗-人4-1BB抗体中不存在的一个或更多个特定的结构特征。本文认识到,相对于缺少本文所述一个或多个结构特征的参比抗-人4-1BB抗体,所提供的变体抗-人4-1BB抗体具有改善的性质。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体和其片段改善一个或更多个性,例如,改善结合亲和力,改善T细胞增殖的诱导(例如,CD8⁺T细胞的增殖),改善T细胞诱导IFN γ 生产的能力(例如,CD8⁺T细胞的增殖),改善减少和/或消除体内癌症增殖的能力(例如,以较低的剂量)。

[0005] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包含1、2或3个重链CDR序列,它们是或包括SEQ ID NO:5-8的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下所述中的一项或多项:重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下每一项:重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列。

[0006] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包含1、2或3个轻链CDR序列,它们是或包括SEQ ID NO:1-4的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下所述中的一项或多项:轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:3或4所示序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下每一项:轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:3或4所示序列。

[0007] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域和/或轻链

可变域,所述重链可变域包含重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列,所述轻链可变域包含轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:3或4所示序列。

[0008] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含含有序列SEQ ID NO:16或17的重链框架1 (FR1) 区。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含含有SEQ ID NO:18-20中任一序列的重链框架3 (FR3) 区。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含重链框架1 (FR1) 区和重链框架3 (FR3) 区,所述重链框架1 (FR1) 区含有序列SEQ ID NO:16或17,所述重链框架3 (FR3) 区含有SEQ ID NO:18-20中任一序列。

[0009] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的重链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-17的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域是或包括与选自SEQ ID NO:11-14的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列。

[0010] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:9或10。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括轻链可变域,所述轻链可变域是或包括与序列SEQ ID NO:9或10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括轻链可变域,所述轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:9或10。

[0011] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的轻链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列,而轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:10。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段的轻链可变域是或包括与选自SEQ ID NO:11-14的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列,且轻链可变域是或包括与序列SEQ ID NO:10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包含重链可变域和轻链可变域,重链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列,而轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:10。

[0012] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是激动性抗体。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段的特征在于具有比人源化抗-人4-1BB抗体94G1(即,包含分别为SEQ ID NO:9和11的轻链和重链可变域的抗体)更优的激动活性。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段的特征在于具有比人源化抗-人4-1BB抗体94G1(即,包含分别为SEQ ID NO:9和11的轻链和重链可变域的抗体)改善的亲和力。

[0013] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是或包含人源化抗体。某些实

实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段具有人免疫球蛋白恒定域,所述恒定域选自IgG1或其变体、IgG2或其变体、IgG4或其变体、IgA或其变体、IgE或其变体、IgM或其变体和IgD或其变体。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是或包含人IgG1。某些实施方式中,IgG1是或包含与SEQ ID NO:22或23至少95%相同的序列。

[0014] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是单克隆抗体。

[0015] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是全长抗体。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段是或包含Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、二硫键结合的Fv片段、scFv片段、单域抗体、Humabody、纳米抗体或双功能抗体(diabody)。

[0016] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段对人4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-7} 至 1×10^{-12} M。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段对人4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-8} 至 1×10^{-12} M。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段对人4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-9} 至 1×10^{-12} M。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段对人4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-10} 至 1×10^{-12} M。

[0017] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段结合人4-1BB多肽胞外域内的表位。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段结合人4-1BB多肽胞外域内的表位。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段的结合因SEQ ID NO:44位置N30、D38、N39和R41处的一个或更多个突变消除。

[0018] 某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段无法结合或弱结合非灵长类动物4-1BB多肽。某些实施方式中,提供的抗-人4-1BB抗体或其片段无法结合或弱结合犬4-1BB多肽。

[0019] 某些实施方式中,本公开提供了编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸分子。某些实施方式中,本公开提供了这样的载体,所述载体包含编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸分子。某些实施方式中,本公开提供了这样的宿主细胞,所述宿主细胞包含编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸分子和/或载体。某些实施方式中,宿主细胞选自细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞。某些实施方式中,选自大肠杆菌(E.coli)、毕赤酵母(P.pastoris)、Sf9、COS、HEK293、CHO和哺乳动物淋巴细胞。

[0020] 某些实施方式中,本公开提供了包含抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的药物组合物和药学上可接受的运载体。某些实施方式中,本公开提供了包含编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸和/或载体的药物组合物和药学上可接受的运载体。

[0021] 某些实施方式中,本公开提供了对此需要的对象进行处置的方法,所述方法包括向该对象给予包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物。某些实施方式中,本公开提供了对此需要的对象进行处置的方法,所述方法包括向该对象给予组合物,所述组合物包含或递送编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸和/或载体。某些实施方式中,对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。

[0022] 某些实施方式中,本公开提供了对此需要的对象诱导免疫响应的方法,所述方法包括向该对象给予包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物。某些实施方式中,本公开提供了对此需要的对象诱导免疫响应的方法,所述方法包括向该对象给予组合物,所述组合物包含或递送编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸和/或载体。某些实施方式中,对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。

[0023] 某些实施方式中,本公开提供了对有此需要的对象增强免疫响应的方法,所述方法包括向该对象给予包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物。某些实施方式中,本公开提供了对有此需要的对象增强免疫响应的方法,所述方法包括向该对象给予组合物,所述组合物包含或递送编码抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的核酸和/或载体。某些实施方式中,对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。

[0024] 某些实施方式中,待通过本公开所述方法处理的癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠癌、头颈癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌和前列腺癌。

[0025] 某些实施方式中,组合物包含或递送剂量为0.01mg/kg至100mg/kg的本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段。某些实施方式中,组合物包括或递送剂量为约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg的抗-人4-1BB抗体或其抗原结合片段。

[0026] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体和/或其片段和/或包含抗-人4-1BB抗体和/或其片段的组合物的特征在于在对象中诱导T细胞增殖(例如,CD8⁺T细胞增殖)增加和/或由T细胞(例如,CD8⁺T细胞)的IFN γ 分泌增加。

[0027] 某些实施方式中,本公开提供了向对象给予组合物的方法,所述组合物包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段至曾接受或将要接受一种或多种其他抗癌治疗的对象。某些实施方式中,本公开提供了向对象给予组合物的方法,所述组合物包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段至曾接受或将要接受电离辐射、化学治疗剂、抗体类药物和细胞疗法中的一种或多种的对象,从而使得所述对象接受两方面治疗。

[0028] 某些实施方式中,本公开提供了向对象给予组合物的方法,所述组合物包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段至曾接受或将要接受免疫检查点抑制剂、IL-12、GM-CSF、抗CD4药物、氟尿嘧啶、多柔比星、伊立替康、紫杉醇或环磷酰胺中的一种或多种的对象,从而使得所述对象接受两方面治疗。

[0029] 某些实施方式中,本公开提供了向对象给予组合物的方法,所述组合物包含或递送抗-4-1BB抗体或抗原结合片段至曾接受或将要接受包含免疫检查点抑制剂的组合物的对象,从而使得所述对象接受两方面治疗。某些实施方式中,免疫检查点抑制剂是抑制PD-1信号转导的物质。某些实施方式中,抑制PD-1信号转导的物质是抗-PD-1抗体。某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是尼莫单抗(nivolumab)、彭美罗珠单抗(pembrolizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、度伐鲁单抗(durvalumab)或阿维单抗(avelumab)。

[0030] 某些实施方式中,本公开提供了确定抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段的剂量以用于治疗有此需要的对象的方法。某些实施方式中,这类方法包括(i)提供或获取对象生物样品中分泌IFN- γ 的测量值,所述对象接受过包含或递送一定量本文所述抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物;和(ii)将分泌IFN- γ 的测量值与参比值相比,如果分泌IFN- γ 的测量值高于或低于参比值,则调整抗-4-1BB抗体或其抗原结合片段的给药量,由此确定用于治疗所述对象的剂量。某些实施方式中,参比值包括指数值,所述指数值包括来自一名或多

名健康对象的值,来自一名或多名癌症确诊对象的值或来自癌症风险预测算法的值。某些实施方式中,生物样品是全血样品、血浆样品或血清样品。某些实施方式中,对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。某些实施方式中,癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠癌、头颈癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌和前列腺癌。

[0031] 某些实施方式,本公开还提供了用于体内或体外提高细胞IFN- γ 分泌的方法,所述方法包括:将细胞与本文所述的抗-4-1BB抗体或抗原结合片段接触。

[0032] 某些实施方式中,本公开提供了增殖或分离活化的T细胞的离体方法,所述方法包括:将T细胞群与本文所述的抗-4-1BB抗体或抗原结合片段接触,从而增加活化T细胞的增殖。

[0033] 某些实施方式中,本公开提供了用于分离抗原特异性活化的T细胞的方法,所述方法包括下述一步或多步:(a)在培养基中与IL-2和感兴趣表位的肽一起培养外周血单核细胞(PBMC);(b)通过添加感兴趣表位的肽在培养的细胞中诱导4-1BB表达;(c)将培养的细胞与涂覆有本文所述抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的表面接触,其中表达4-1BB的培养的细胞附着于所述涂覆的表面;和(d)去除未附着的细胞,从而分离抗原特异性活化的T细胞。某些实施方式中,活化的T细胞为CD8⁺T细胞。

[0034] 某些实施方式中,本公开提供了用于治疗或预防有此需要对象中癌症的方法,其包括向该对象给予组合物,所述组合物包含治疗有效量的通过本文所述方法中任何一种产生的活化的T细胞。某些实施方式中,癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠癌、头颈癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌和前列腺癌。某些实施方式中,组合物包含至少10⁹个、至少10¹⁰个细胞、或超过10¹⁰个活化的T细胞。某些实施方式中,活化的T细胞为CD8⁺T细胞。

[0035] 本文还提供了用于表征本文所述的抗-人4-1BB抗体和/或其片段和/或包含抗-人4-1BB抗体和/或其片段的组合物的技术。某些实施方式中,提供了用于表征结合AML细胞(例如,HL60)的抗-人4-1BB抗体和/或其片段和/或包含抗-人4-1BB抗体和/或其片段的组合物的方法。某些实施方式中,提供了用于表征抗-人4-1BB抗体和/或其片段和/或包含抗-人4-1BB抗体和/或其片段的组合物的方法是通过ELISA、免疫组织化学、Biacore结合试验、质谱、等电点聚焦(IEF)色谱和/或western印迹。

[0036] 本公开还提供了涉及制备或制造本文所述的抗-人4-1BB抗体和/或其片段和/或包含所述抗体或其片段的组合物的各种技术。

[0037] 本申请中,术语“约”和“大致”同义。文中引用的公开文献、专利或专利申请均通过援引全文纳入。本申请中,所有数值,不论有无“约”/“大致”等约略表示,都涵盖本领域技术人员所能认可的任何正常波动。

[0038] 由以下详细描述可见本发明的其他特征、目的和优势。但应理解,详细描述虽然指示了本发明实施方式但仅仅是说明性的,不构成限定。通过详细的说明,本领域技术人员可以看出本发明范围内的各种改换。

[0039] 附图简要说明

[0040] 如下所述的本文附图仅用于说明而非限定。后文描述结合附图有助于更清楚、更好地理解本发明如前文所述及其他目的、内容、特征和优点。

[0041] 图1A显示了人4-1BB胞外域(ECD)构建体。顶部是全长4-1BB ECD(167个氨基酸)的示意图,下部显示了4-1BB ECD:R1(1-55aa),R2(56-110aa),R3(110-167aa),R1.1(1-45aa),R1.2(1-35aa),R1.3(11-55aa),R1.4(21-55aa)R1.5(1-25aa)和R1.6(1-30aa)的各种片段。这些4-1BB ECD构建体各自与GST融合。图1B显示了示例性人源化抗-4-1BB抗体与图1A所述的4-1BB ECD融合构建体结合的western印迹。如所示,示例性人源化抗-4-1BB抗体结合全长4-1BB ECD融合多肽和R1融合多肽,但是不结合R2或R3融合多肽。分子尺寸标志物在左侧以kDa示出。

[0042] 图2A显示了提取自表达4-1BB ECD融合构建体的细胞的全细胞提取物的SDS-PAGE凝胶。如上述图2A所述融合构建体在用1mM IPTG诱导的大肠杆菌BL21细胞中表达,而全细胞提取物通过12%SDS-PAGE解析。如所示,所有的融合构建体(ECD,R1,R1.1,R1.2,R1.3,R1.4,R1.5和R1.6)具有稳健的蛋白质表达。图2B显示了示例性人源化抗-4-1BB抗体结合全长4-1BB ECD融合多肽以及R1.1、R1.2、R1.3和R1.6融合多肽但是不结合R1.4或R1.5融合多肽的western印迹。以示例性抗-人4-1BB抗体进行免疫印迹。分子尺寸标志物在左侧以kDa示出。

[0043] 图3显示了通过ELISA测量的抗-4-1BB单克隆抗体对重组人4-1BB抗原的结合亲和力。 OD_{450nm} 值在y轴上表示,而抗-4-1BB抗体浓度(以 $\mu\text{g/ml}$)沿x轴增加。BBK-4(圆形)是鼠抗-人4-1BB抗体,94G1(方形)、94K(向上指三角形)、94KV(菱形)、94KVT(星形)和EU101(向下指三角形)是示例性人源化变体抗-4-1BB抗体。

[0044] 图4显示了抗-4-1BB单克隆抗体与表达4-1BB的Jurkat T细胞(Jurkat 8-1)的结合。平均荧光强度(MFI)在y轴上表示,而抗体的 Log_{10} 浓度(以 $\mu\text{g/ml}$)沿x轴。BBK-4(圆形)是鼠抗-人4-1BB抗体,94G1(方形)、94K(向上指三角形)、94KV(菱形)、94KVT(星形)和EU101(向下指三角形)是示例性人源化变体抗-4-1BB抗体。

[0045] 图5提供了示出变体抗-4-1BB抗体对4-1BB的体外结合亲和力的表格。结合亲和力使用表面等离子体共振(SPR,Biacore 3000)测量。94G1和EU101是示例性人源化变体抗-4-1BB抗体。

[0046] 图6显示了抗-4-1BB单克隆抗体与表达4-1BB的 CD8^+ T细胞的结合。 CD8^+ T细胞分离自人PBMC并通过抗-CD3抗体活化2天。4-1BB-PE是示例性的可商购的抗-4-1BB抗体,BBK-4是鼠抗-人4-1BB抗体,94G1、94K、94KV、94KVT和EU101是示例性的人源化变体抗-4-1BB抗体。下图中的表格显示了上图中FACS数据中各抗体示出的值。

[0047] 图7显示了对经抗-4-1BB抗体处理的 CD8^+ T细胞体外增殖进行定量的图表。增殖的 CD8^+ T细胞经无抗体、单独的人IgG、BBK-4或示例性的人源化变体抗-4-1BB抗体(94G1、94K、94KV、94KVT和EU101)处理,并用WST-1(水溶性四唑盐)处理以对增殖的(即,代谢活性的)细胞进行染色。

[0048] 图8显示了对经抗-4-1BB抗体处理的 CD8^+ T细胞体外 $\text{IFN } \gamma$ 分泌进行定量的图表。 CD8^+ T细胞分离自人PBMC并经无抗体、单独的人IgG或 $1\mu\text{g/ml}$ 抗-4-1BB抗体处理,所述 $1\mu\text{g/ml}$ 抗-4-1BB抗体包括BBK-4、94G1、94K、94KV、94KVT和EU101。在第1、3和5天评价 $\text{IFN } \gamma$ 分泌。

[0049] 图9显示了描述(A) CD4^+ 和(B) CD8^+ 中 $\text{IFN } \gamma$ 分泌的图表。分离自健康供体的PBMC

后,存在于PBMC中的活化的T细胞于RPMI-1640+2%FBS培养基中静置24小时,并用附着铁珠的抗-CD4抗体或抗-CD8抗体处理静置的PBMC,使用MACS磁性分离器分离CD4⁺细胞或CD8⁺细胞。用T细胞激活剂抗-CD3处理分离的CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞以诱导4-1BB表达,并用不同浓度(0.5、1.0、2.5和5.0 μ g/ml)的EU101或对照IgG(5.0 μ g/ml)处理3天。3天后,获得排除细胞的培养基,并通过ELISA(ebioscience公司)评估培养基中人IFN- γ 的荧光。结果与IFN- γ ELISA试剂盒中提供的标准曲线比较。

[0050] 图10A显示了描述示例性抗-人4-1BB抗体BBK4、94G1、94KVT和EU101的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的图表。图10B显示了描述示例性抗-人4-1BB抗体BBK4、94G1和EU101的补体依赖性细胞毒性(CDC)的图表。

[0051] 图11显示了示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)由浓度的体内抗癌作用,这是在将结肠癌肿瘤细胞(HT29)皮下注射到人源化小鼠后由肿瘤大小测得,并且当肿瘤大小达到100至200mm³时,将示例性的抗-人4-1BB抗体(EU101)以1.0mg、5.0mg和10.0mg/1kg体重的剂量每5天1次共3次静脉内注射于小鼠(代表性数据)。

[0052] 图12显示了示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)和示例性抗-PD-1抗体(Keytruda,“KD”)抗体由于浓度的抗癌作用。在将结肠癌肿瘤细胞(HT29)皮下注射到人源化小鼠和抗体治疗后由肿瘤大小测量抗癌作用。当肿瘤大小达到100至150mm³,通过静脉内注射用示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)或示例性抗-PD-1抗体(Keytruda)治疗小鼠,剂量为5.0mg和10.0mg/1kg体重,每5天1次共3次。

[0053] 图13显示了比较示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)与示例性抗-PD-1抗体(Keytruda)抗体的单独治疗和联合疗法的抗癌作用。在将结肠癌肿瘤细胞(HT29)皮下注射到人源化小鼠和抗体治疗后由肿瘤大小测量抗癌作用。当肿瘤大小达到300至450mm³时,示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)以2.5mpk给予单独治疗,示例性抗-PD-1抗体(Keytruda)以2.5mpk给予单独治疗,而EU101,2.5mpk+Keytruda以2.5mpk给予联合疗法。给药通过小鼠腹腔内注射,每三天一次,共3次。

[0054] 图14A显示了如图13所述以示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)和示例性抗-PD-1抗体(Keytruda)单独地和联合地对植入肿瘤的人源化小鼠处理后34天的小鼠血液或1克肿瘤组织中流通的人CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的数量。肿瘤中T细胞浸润淋巴细胞(TIL)的数量通过计算总细胞数量的百分比测量,所述总细胞的百分比通过使用流式细胞仪测量CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的比例(%)测量。细胞经FITC-标记的CD4抗体、荧光BV510-标记的CD8抗体和荧光APC-cy7-标记的CD45抗体染色后,进行流式细胞术以测量CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的比例(%),由流式细胞术程序分离人血细胞标志物CD45-阳性细胞(门控)。图14B显示了细胞经荧光APC-cy7-标记的CD45、荧光BV510-标记的CD8抗体、荧光FITC-标记的CD4抗体、荧光PE-标记的INF γ 和荧光APC-标记的Foxp3抗体染色后,通过使用流式细胞仪计算CD8⁺INF- γ ⁺T细胞比例和Treg(CD4⁺Foxp3高T细胞)比例之间的构成比(proportional ratio)计算的Treg(CD4⁺Foxp3高T细胞)比例与CD8⁺INF- γ ⁺T细胞比例之比。

[0055] 图15A和图15B显示了示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)与示例性抗-PD-1抗体(Keytruda)抗体的单独和联合治疗后血清和肿瘤液的INF- γ 分析结果。在对图15A和15B中显示的所有经处理的组进行解剖后,用人INF- γ 和人TGF- β ELISA试剂盒分析10 μ l血清和100 μ l肿瘤液。

[0056] 图16A显示了以示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)淘选前测量的抗原特异性CD8⁺T细胞比例(4-1BB⁺CD8⁺T细胞比例:43.2%,CD8⁺T细胞比例:58.6%)。图16B显示了以示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)淘选后测量的抗原特异性CD8⁺T细胞比例(pCMV⁺CD8⁺T细胞比例:60.0%,CD8⁺T细胞比例:79.3%)。

[0057] 定义

[0058] 下文中,使用了大量重组DNA和免疫学相关术语。为提供对说明书和权利要求更清楚、一致的理解,包括这些术语的范围,提供以下定义。

[0059] 约:本文中,术语“约”用于某值时表示该值的近似值。一般而言,熟悉相关内容的本领域技术人员将理解就所述相关内容而言“约”所涵盖的差异程度。例如,某些实施方式中,术语“约”表示与参比值相差25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少范围内的值。

[0060] 给药(给予):本文中,“给药(给予)”通常是指将组合物给予对象或系统以实现物质的递送,所述物质即所述组合物或包含于所述组合物中。本领域普通技术人员知道适当情形下用于对象(如人)给药的各种途径。例如,某些实施方式中,给药可以是眼部、口服、胃肠外、局部给药等。某些具体实施方案中,给药可以是支气管(如通过支气管灌注)、口颊、皮肤(其可以是或包括例如局部至真皮、真皮内(intradermal)、皮内(interdermal)、透皮等中的一种或多种)、肠内、动脉内、皮内、胃内、髓内、肌肉内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、特定器官内(如肝内)、黏膜、鼻腔、口腔、直肠、皮下、舌下、局部、气管(如通过气管内灌注)、阴道、玻璃体等。某些实施方式中,给药仅包括一个剂次。某些实施方式中,给药可包括施用固定数目的剂次。某些实施方式中,给药可包括间歇给药(例如在时间上分开的多个剂次)和/或定期给药(例如各剂次间隔相同)。某些实施方式中,给药可以包括连续给药(如输液)至少选定的一段时间。

[0061] 亲和力:如本领域所知,“亲和力”是特定配体与其配偶体(partner)结合紧密度的量度。亲和力可用不同方法来测定。某些实施方式中,亲和力是用定量试验测定的。某些实施方式中,可以将结合配偶体浓度固定为超过配体浓度,以此模拟生理条件。或者或另外,某些实施方式中,可改变结合配偶体的浓度和/或配体浓度。某些实施方式中,可在可比条件(例如浓度)下将亲和力与参照进行比较。

[0062] 激动剂:本领域技术人员知道,术语“激动剂”可用于指代物质状况或事件,其存在、水平、程度、类型或形式与另一物质(即被激动物质)活性或水平的升高相关联。通常,激动剂可以是或包括任何化学类别的物质,包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂类、金属和/或显示相关活化活性的任何其他实体。某些实施方式中,激动剂可以是直接的(此时,它直接对其靶标施加影响);某些实施方式中,激动剂可以是间接的(此时,它通过与其靶标结合以外的其他方式发挥其影响;例如,通过与靶标的调节物相互作用来改变靶标的水平或活性)。

[0063] 动物:在此指动物界内任何成员。某些实施方式中,“动物”指任一性别、任意发育阶段的人。某些实施方式中,“动物”指任一性别、任意发育阶段的非人动物。某些实施方式中,非人动物是哺乳动物(例如啮齿类动物、小鼠、大鼠、兔子、猴子、狗、猫、羊、牛、灵长类动物和/或猪)。某些实施方式中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类、昆虫和蠕虫。某些实施方式中,动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆体。

[0064] 拮抗剂:本领域技术人员知道,“拮抗剂”可用于指代物质状况或事件,其存在、水平、程度、类型或形式与另一物质(即被抑制物质或靶标)活性或水平的降低相关联。通常,拮抗剂可以是或包括任何化学类别的物质,包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂类、金属和/或显示相关抑制活性的任何其他实体。某些实施方式中,拮抗剂可以是直接的(此时,它直接对其靶标施加影响);某些实施方式中,拮抗剂可以是间接的(此时,它通过与其靶标结合以外的其他方式发挥其影响;例如,通过与靶标的调节物相互作用来改变靶标的水平或活性)。

[0065] 抗体:本文中,术语“抗体”指这样的多肽,其包含足以令其与特定靶抗原特异性结合的典型免疫球蛋白序列元件。如本领域所知,天然产生的完整抗体是约150kD的四聚体,其包含两条相同重链多肽(各约50kD)和两条相同轻链多肽(各约25kD),它们彼此缔合成常说的“Y型”结构。各重链包含至少四个结构域(各长约110个氨基酸)—氨基末端可变(VH)结构域(位于Y结构的两个顶端),其后的三个恒定结构域:CH1、CH2和羧基末端的CH3(位于Y的干底部)。称为“转换岔(switch)”的短区域将重链可变区与恒定区相连。“铰链”将CH2和CH3结构域与抗体其余部分相连。完整抗体中,铰链区内的两个二硫键将两条重链多肽彼此相连。各轻链包含两个结构域—氨基末端可变(VL)结构域,其后的羧基末端恒定(CL)结构域,它们通过另一“转换岔(switch)”彼此分开。完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中重链和轻链通过一个二硫键彼此相连;另两个二硫键将重链铰链区域彼此相连,从而使所述二聚体彼此连接形成所述四聚体。天然产生的抗体还是糖基化的,通常在CH2结构域上糖基化。天然抗体中的各结构域具有以“免疫球蛋白折叠”为特征的结构,该结构由压扁的反向平行 β 桶内两个 β 折叠(例如3-、4-或5-股折叠)相叠而成。各可变域包含三个称为“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3)的高变环和四个某种程度上不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成 β 折叠提供结构域的结构框架,重链和轻链的CDR环区在三维空间上相互聚拢,从而形成位于Y结构顶端的一个高变抗原结合位点。天然抗体的Fc区结合补体系统的元件,还结合效应细胞上的受体,效应细胞包括例如介导细胞毒性的效应细胞。如本领域所知,Fc区对于Fc受体的亲和性和/或其它结合属性可通过糖基化或其它修饰来调节。某些实施方式中,据本发明生成和/或使用的抗体包含糖基化的Fc结构域,包括具有经修饰或工程改造的所述糖基化的Fc结构域。就本发明而言,某些实施方式中,包括足够的天然抗体中所见免疫球蛋白结构域序列的任何多肽或多肽的复合物都可称作和/或用作“抗体”,不论这些多肽是天然产生(例如由生物体对抗原的反应而产生)还是重组工程法产生、化学合成或由其它人工系统或方法产生。某些实施方式中,抗体是多克隆抗体;某些实施方式中,抗体是单克隆抗体。某些实施方式中,抗体的恒定区序列具有小鼠、兔、灵长类或人抗体特性。某些实施方式中,抗体序列元件是人源化的、灵长类化的、嵌合的等,如本领域所知。此外,本文中术语“抗体”在合适的实施方式中指本领域已知的或已有的以其它表现形式利用抗体结构和功能特征的任何构建体或形式(除非另有说明或基于上下文可以明确)。例如,作为实施方式,本发明所用抗体可以是选自以下所述但不限于以下所述的形式:完整IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双或多特异性抗体(如Zybodies®等);抗体片段,例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段和分离的CDR或CDR组;单链Fvs;多肽-Fc融合体;单域抗体(如鲨鱼单域抗体,如IgNAR或其片段);骆驼抗体;掩蔽抗体(如Probodies®);小模块免疫药物(“SMIPsTM”);单链或串联双功能抗体(TandAb®);

Humabody抗体, VHH; Anticalins®; Nanobodies®微型抗体; BiTE®; 锚蛋白重复蛋白或DARPINs®; Avimers®; DART; TCR样抗体;

Adnectins®; Affilins®; Trans-bodies®; Affibodies®; TrimerX®;

MicroProteins; Fynomers®; Centyrins®; 和 KALBITOR®。某些实施方式中, 抗体可缺失天然形式中的共价修饰(例如接装聚糖)。某些实施方式中, 抗体可包含共价修饰(例如接装聚糖、负载物[如可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其它附属基团[例如聚乙二醇等])。

[0066] 抗体片段: 本文中, “抗体片段”指如本文所述抗体或抗体类物质的一部分, 通常是指包括抗原结合部分或其可变区的部分。抗体片段可用任何方式来制造。例如, 某些实施方式中, 抗体片段可以通过将完整抗体或抗体类物质通过酶促或化学方法片段化来产生。或者, 某些实施方式中, 抗体片段可用重组技术产生(即通过工程化核酸序列的表达)。某些实施方式中, 抗体片段可以全部或部分合成产生。某些实施方式中, 抗体片段(尤其抗原结合性抗体片段)的长度可为至少约50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190个氨基酸或更长, 某些实施方式中至少约200个氨基酸。

[0067] 结合: 本文中, 术语“结合”应理解为通常指两个或更多实体间的非共价结合。“直接”结合包括实体或部分之间的物理接触; 间接结合包括通过与一个或多个中间实体的物理接触发生的物理相互作用。通常可在各种情形下评估两个或更多实体之间的结合—包括对相互作用的实体或部分单独进行研究或在更复杂系统背景中(例如, 与载体共价或以其他方式相关联和/或在生物系统或细胞内)进行研究。

[0068] 癌症: 术语“癌症”、“恶性肿瘤”、“赘生物”、“肿瘤”和“癌”在本文中指表现出相对异常、失控和/或自主性生长的细胞, 它们因此表现出以细胞繁殖明显失控为特征的异常生长表型。某些实施方式中, 肿瘤可以是或包含癌前(如良性)、恶性、转移前、转移性和/或非转移性的细胞。本文具体提示了某些可能特别相关的癌症。某些实施方式中, 相关癌症可以实体瘤为特征。某些实施方式中, 相关癌症可以血液肿瘤为特征。总体来说, 本领域已知的不同类型癌症例子包括例如: 包括白血病、淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金)、骨髓瘤和骨髓增生性疾病的造血系统癌症; 肉瘤, 黑色素瘤, 腺瘤, 实体组织癌, 口腔、喉咙、喉和肺的鳞状细胞癌, 肝癌, 泌尿生殖系统癌如前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌、子宫内膜癌和肾细胞癌, 骨癌, 胰腺癌, 皮肤癌, 皮肤或眼内黑素瘤, 内分泌系统癌症, 甲状腺癌, 甲状旁腺癌, 头颈癌, 乳腺癌, 胃肠癌和神经系统癌症, 良性病变如乳头状瘤, 等等。

[0069] CDR: 指抗体可变区内的互补决定区。重链和轻链的可变区各自有三个CDR, 它们是各可变区的CDR1、CDR2和CDR3。“CDR组”或“成组CDR”指一组三个或六个CDR, 它们或者是能够结合抗原的单个可变区内的CDR, 或者是能够结合抗原的相互关联的重链和轻链可变区的CDR。本领域已确立了用于定义CDR边界的某些系统(例如Kabat、Chothia等); 本领域技术人员知道这些系统之间的差异, 并且能够理解CDR的边界即能够理解和实践权利要求所要求保护的本发明所需的边界。

[0070] 化学治疗剂: 本文中, 术语“化学治疗剂”具有其本领域公知的含义, 指一种或多种促细胞凋亡、细胞抑制性和/或细胞毒性物质, 例如具体包括用于和/或推荐用于治疗一种或多种与不期望的细胞增殖有关的疾病、紊乱或病症。许多实施方式中, 化学治疗剂能用于

治疗癌症。某些实施方式中,化学治疗剂可以是或包含一种或多种烷化剂,一种或多种蒽环类抗生素,一种或多种细胞骨架破坏剂(如微管靶向剂,如紫杉烷、美登素及其类似物),一种或多种埃坡霉素,一种或多种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDAC),一种或多种拓扑异构酶抑制剂(如拓扑异构酶I和/或拓扑异构酶II的抑制剂),一种或多种激酶抑制剂,一种或多种核苷酸类似物或核苷酸前体类似物,一种或多种肽抗生素,一种或多种铂基药物,一种或多种类视黄醇,一种或多种长春花生物碱,和/或一种或多种下列物质的一种或多种类似物(即同样具有相关的抗增殖活性)。某些具体实施方式中,化学治疗剂可以是或包含一种或多种以下所述:放线菌素,全反式视黄酸,奥瑞他汀,阿扎胞苷,硫唑嘌呤,博来霉素,硼替佐米,卡铂,卡培他滨,顺铂,苯丁酸氮芥,环磷酰胺,姜黄素,阿糖胞苷,柔红霉素,多西紫杉醇,多西氟尿苷,多柔比星,表柔比星,埃坡霉素,依托泊苷,氟尿嘧啶,吉西他滨,羟基脲,伊达比星,伊马替尼,伊立替康,美登素和/或其类似物(例如DM1),二氯甲基二乙胺(氮芥, Mechlorethamine),巯嘌呤,甲氨蝶呤,米托蒽醌,美坦生类化合物,奥沙利铂,紫杉醇,培美曲塞,替尼泊苷,硫鸟嘌呤(Tioguanine),拓扑替康,戊柔比星(valrubicin),长春碱,长春新碱,长春地辛,长春瑞滨及其组合。某些实施方式中,化学治疗剂可以用于抗体-药物缀合物。某些实施方式中,化学治疗剂是选自以下所述抗体-药物缀合物中的化学治疗剂:hLL1-多柔比星、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-多柔比星、吉妥珠单抗-奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、本妥昔单抗-维多汀(brentuximab vedotin)、曲妥珠单抗-美坦新(trastuzumab emtansine)、依托珠单抗-奥佐米星(inotuzumab ozogamicin,) 格巴妥莫单抗-维多汀(glembatumomab vedotin)、SAR3419、SAR566658、BIIB015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗-PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、伏司妥珠单抗-马弗多汀(vorsetuzumab mafodotin)和罗瓦妥珠单抗-美登木素DM1(lorvotuzumab mertansine)。

[0071] 联合治疗:本文所用术语“联合治疗”是指其中对象同时接触2种或更多种治疗方案(例如,2种或更多种治疗剂)的情况。某些实施方式中,可以同时给予2种或更多种治疗方案。某些实施方式中,依次给予2种或更多种治疗方案(例如,在给予任何剂量的第二方案之前给予第一方案)。某些实施方式中,2种或更多种治疗方案以重叠给药方案给予。某些实施方式中,联合疗法的给药包括向接受其他试剂或方案(modality)的对象给予1个或更多个治疗剂或方案。

[0072] 对应于:本文中,术语“对应于”可用来通过与适当的参照化合物或组合物比较来指示化合物或组合物中结构元素的位置/个性特征(identity)。例如,某些实施方式中,聚合物中的单体残基(如多肽中的氨基酸残基或多核苷酸中的核酸残基)可用“对应于”适当参照聚合物中某残基来表示。例如,本领域普通技术人员知道,简单起见,多肽中的残基通常用标准编号系统基于相关参照多肽来编号,这样,举例来说,“对应于”第190位残基的氨基酸不必真地是特定氨基酸链的第190个氨基酸,而是对应于参照多肽中第190位的残基;本领域普通技术人员容易理解如何确定“对应的”氨基酸。例如,本领域技术人员知晓各种序列比对策略,包括软件测序,例如BLAST、CS-BLAST、CUSASW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/

GLSEARCH、Genoogle、HMMER、HHpred/Hhsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、Parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalaBLAST、Sequillab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMM或SWIPE,它们可原来例如确定本文所述多肽和/或核酸中“相应的”残基。

[0073] 工程化的:一般来说,“工程化的”指经人工操作。例如,当多肽序列经人工处理过则将多肽认为是“工程(化)的”。例如,本发明某些实施方式中,工程化多肽包含的序列中含有人工引入参照多肽序列的一处或多处氨基酸突变、缺失和/或插入。相似地,如果细胞或生物经操作改变了其遗传信息(例如,经转化、交配、体细胞杂交、转染、转导或其他机制引入了原先没有的新遗传物质,或原有遗传物质经例如取代或缺失突变或经交配而改变或消除)。正如本领域技术人员所做和所知的,工程化多肽或细胞的衍生物和/或后代通常仍被称为是“工程化的”,即使实际操作是在先前的实体上进行的。

[0074] 表位:在本文中包括被免疫球蛋白(如抗体或受体)结合元件所识别的各种组成部分。某些实施方式中,表位包括抗原上的多个化学原子或基团。某些实施方式中,当抗原呈特定三维构象时,这些化学原子或基团外露于表面。某些实施方式中,当抗原呈这种构象时,这些化学原子或基团在空间上彼此物理上接近。某些实施方式中,当抗原呈另一种构象(如线性化)时,这些化学原子中至少部分是彼此物理上隔开的基团。

[0075] 离体(ex vivo):在此指多细胞生物体外部的生物事件。例如,就基于细胞的系统而言,这可用来表示人造环境中细胞群内发生的事件(如细胞繁殖、细胞因子分泌等)。

[0076] 框架或框架区:在此指可变区序列扣除CDR的部分。由于CDR序列可据不同更多系统来确定,同样,框架区序列也适用相应的不同解释。六个CDR将重链和轻链上的框架区在各链上分成四个亚区(FR1、FR2、FR3和FR4),其中,CDR1位于FR1与FR2之间,CDR2位于FR2与FR3之间,CDR3位于FR3与FR4之间。除非特指亚区为FR1、FR2、FR3或FR4,如其他所称,框架区代表单个天然免疫球蛋白链可变区内FR的总和。本文中,单个FR表示四个亚区中的一个,例如,FR1表示最靠近可变区氨基末端的第一个框架区,位于CDR1的5'侧,而多个FR表示构成框架区的两个或更多亚区。

[0077] 人源化:如本领域所知,术语“人源化”通常用于指抗体(或抗体组分),其氨基酸序列包括来自非人物种(如小鼠)中产生的参比抗体的V_H和V_L区序列,但也包括相对于参比抗体的序列修饰,所述序列修改旨在使它们更具备“人样特征”,即更类似于人种系可变序列。某些实施方式中,“人源化”抗体(或抗体组分)免疫特异性结合目标抗原,且其框架(FR)区具有基本上与人抗体框架区相同的氨基酸序列而互补决定区(CDR)具有基本上与非人抗体相同的氨基酸序列。人源化抗体包含基本上全部至少一个、通常两个可变域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白(即供体免疫球蛋白)的那些而所有或基本上所有框架区是人免疫球蛋白共有序列框架区。某些实施方式中,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,一般是人免疫球蛋白的恒定区。某些实施方式中,人源化抗体既含有轻链又至少含有重链的可变区。抗体还可包含重链恒定区的C_{H1}、铰链区、C_{H2}、C_{H3}和可选地C_{H4}区。

[0078] 体外(in vitro):术语“体外”在此指人工环境中(如试管或反应容器中、细胞培养物中等)而非多细胞生物体内发生的事件。

[0079] 体内(in vivo):在此指多细胞生物体(如人和非人动物)内发生的事件。就基于细胞的系统而言,该术语可指活细胞内发生的事件(相对于体外(in vitro)系统)。

[0080] 分离的：在此指这样的物质和/或实体：(1) 已分离掉其原初产生时（无论天然和/或实验环境中）与之关联的组分中至少部分组分，和/或(2) 是人工设计的、生成的、制备的和/或制造的。分离的物质和/或实体可以是已经分离掉约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约99%以上原初与之关联的其他组分。某些实施方式中，分离物质为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%，或超过约99%纯。本文中，如果某物质基本不含其他组分，则认为其是“纯”的。某些实施方式中，如本领域技术人员理解的，某物质在与某些其他组分（例如一种或多种运载体或赋形剂（如缓冲剂、溶剂、水等））组合后仍可被认为是“分离的”或甚至是“纯的”。仅举一个例子：某些实施方式中，在以下情形时天然生物聚合物如多肽或多核苷酸被认为是“分离的”：a) 就其起源或衍生之源而言，与其天然状态下的伴随组分部分或全部不相关联；b) 它基本上不含其天然生产者所产同种物质中的其他多肽或核酸；c) 经表达或因其他方式或原因而关联细胞或其他表达系统的组分，但所述细胞或其他表达系统不是其天然生产者。因此，举例来说，某些实施方式中，将化学合成或由非其天然生产者的细胞系统合成的多肽认为是“分离的”多肽。或者或此外，某些实施方式中，在以下程度上可以将已经历一种或多种纯化技术的多肽认为是“分离的”，即它已经与其他组分分离，所述其他组分是a) 天然情况下与之关联的，和/或b) 在其原初产生时与之关联的。

[0081] K_D ：在此指结合性物质（如抗体或其结合性组分）从与其配偶体（如所述抗体或其结合性组分所结合的表位）组成的复合物上解离的解离常数。

[0082] 操作性连接：在此指并置位置（juxtaposition），其中如此描述的组分的关系允许其以所需方式发挥功能。“操作性连接”功能元件的控制元件以这样的方式相互关联：功能元件的表达和/或活性在与控制元件相容的条件下实现。某些实施方式中，“操作性连接”的控制元件与感兴趣的编码元件相邻（例如，共价连接的）；某些实施方式中，控制元件与感兴趣的功能元件以反式或其他方式作用。

[0083] 药物组合物：术语“药物组合物”在此指这样的组合物即其中的活性物质与一种或多种药学上可接收的运载体制成在一起。某些实施方式中，组合物适合给予人或动物对象。某些实施方式中，活性物质以单位剂量存在，该单位剂量需适合在治疗方案中给药并在用于相关群体时显示出实现预定疗效的统计学显著性概率。

[0084] 多肽：术语“多肽”在此总体上具有其领域内公知的含义即至少三个氨基酸的聚合物。本领域普通技术人员明白，术语“多肽”应理解为足够广义从而不仅涵盖具有本文中的全序列的多肽，还涵盖代表这些完整多肽的功能性片段（即保留至少一种活性的片段）的多肽。并且，本领域普通技术人员明白，蛋白质序列通常容许一些不损害其活性的取代。因此，本文中，相关术语“多肽”涵盖如下所述的任何多肽：相比另一同类多肽，其保留活性并具有至少约30-40%的整体序列相同性，一般高于约50%、60%、70%或80%，且通常在一个或多个高度保守性区域内包括至少一个相同性高得多的区域，该相同性一般超过90%或甚至95%、96%、97%、98%或99%，通常包括至少3-4个、一般多达20或更多个氨基酸。多肽可含有L-氨基酸、D-氨基酸或这两者，并可含有本领域已知的多种氨基酸修饰或类似物中的任何一种。有用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。某些实施方式中，蛋白质可包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合。术语“肽”通常用于指长度小于约100

个氨基酸、小于约50个氨基酸、小于20个氨基酸或小于10个氨基酸的多肽。某些实施方式中,蛋白质是抗体、抗体片段、其生物活性部分和/或其特性部分。

[0085] 预防或避免:在本文中用于疾病、紊乱和/或病症的出现时指降低发展成所述疾病、紊乱和/或病症的风险和/或延迟所述疾病、紊乱和/或病症一种或多种特征或症状的发生和/或严重程度。某些实施方式中,预防是基于群体评估的,即如果在疾病、紊乱或病症易感人群中观察到所述疾病、紊乱或病症一种或多种症状的发生发展、频率和/或强度有统计学显著的降低,则认为某药剂/物质能够“预防”所述具体疾病、紊乱或病症。

[0086] 重组:在此指用重组手段设计、工程化、制备、表达、创造、制造和/或分离的多肽,如用转染到宿主细胞中的重组病毒载体表达的多肽;分离自重组、组合的人多肽文库的多肽;分离自这样的动物(例如,小鼠、兔、羊、鱼等)的多肽,所述动物经转基因或以其他方式经操作以表达编码和/或直接表达多肽或其一种或更多种组分、部分、元件或结构域的一种或更多种基因或基因组;和/或通过任何其他方式制备、表达、产生或分离的多肽,所述任何其他方式涉及涉及将选定的核酸序列元件彼此之间剪接或连接,化学合成选定的序列元件和/或以其他方式产生编码和/或直接表达多肽其一种或更多种组分、部分、元件或结构域的核酸。某些实施方式中,一种或多种所述选定序列元件是天然的。某些实施方式中,一种或多种所述选定序列元件是计算机模拟(in silico)设计的。某些实施方式中,一种或多种所述选定序列元件来自已知序列元件的突变(如体内或体外),例如来自天然或合成来源,如在目标源生物种系(如人、小鼠等)中。

[0087] 特异性结合:术语“特异性结合”在此指能够在结合发生的环境中在可能的结合配偶体之间进行区分的能力。结合性物质在存在有其他潜在靶标时与一种特定靶标相互作用时则称其为“特异性结合”其与之相互作用的靶标。某些实施方式中,特异性结合通过检测或确定结合性物质与其配偶体之间的结合程度来评定;某些实施方式中,特异性结合通过检测或确定结合剂-配偶体复合物的解离程度来评定;某些实施方式中,特异性结合通过检测或确定结合剂竞争其配偶体和其他实体之间选择性相互作用的能力来评定。某些实施方式中,特异性结合通过在一系列浓度上进行这样的检测或测定来评定。

[0088] 对象:本文中,术语“对象”指生物体,通常是哺乳动物(如人,某些实施方式中包括人的产前形式)。某些实施方式中,对象患有相关疾病、紊乱或病症。某些实施方式中,对象易患相关疾病、紊乱或病症。某些实施方式中,对象表现出疾病、紊乱或病症的一种或多种症状或特征。某些实施方式中,对象未表现出疾病、紊乱或病症的任何症状或特征。某些实施方式中,对象具有疾病、紊乱或病症的一种或多种易感特征或风险特征。某些实施方式中,对象是人。某些实施方式中,对象是确诊和/或接受治疗的个体或是已经确诊过和/或接受过治疗的个体。

[0089] 治疗剂:短语“治疗剂”在此泛指给予生物体后激发所需药理学效应的任何物质。某些实施方式中,如果某物质在适当的群体中表现出统计学上显著的作用,则认为其是治疗剂。某些实施方式中,合适的群体可以是模式生物群体。某些实施方式中,合适的群体可以用各种标准来界定,例如特定年龄组、性别、遗传背景、原有临床病症等。某些实施方式中,治疗剂是可用于减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟疾病、紊乱和/或病症一种或多种症状或特征的发作,降低其严重性和/或降低其发生率的物质。某些实施方式中,“治疗剂”是曾经或目前须经政府机构批准才能上市人用的物质。某些实施方式中,“治疗剂”是须经处

方才能人用的物质。

[0090] 治疗有效量:术语“治疗有效量”在此指按照治疗剂量给药方案给予患有或易患疾病、紊乱和/或病症的群体时足以治疗所述疾病、紊乱和/或病症的量。某些实施方式中,治疗有效量是降低疾病、紊乱和/或病症一种或多种症状的发病率和/或严重性,稳定所述症状的一种或多种特征和/或延迟所述症状发生的量。本领域普通技术人员会明白,“治疗有效量”实际上不需要在特定个体中实现治疗成功。相反,治疗有效量可以是给予需要这种治疗的患者时在显著数量的对象中提供特定的所需药理学反应的量。例如,某些实施方式中,术语“治疗有效量”是指这样的量,即创新疗法背景下,给予有需要的个体时能阻断、稳定、减轻或逆转该个体内的癌症支持性进程,或将增强或增加该个体内的癌症抑制性进程的量。就癌症治疗而言,“治疗有效量”是当给予癌症确诊个体时能预防、稳定、抑制或减少个体内癌症进一步发展的量。本文所述组合物的特别优选的“治疗有效量”逆转(在治疗性处置中)恶性肿瘤如胰腺癌的发展或辅助实现或延长恶性肿瘤的缓解。给予个体以治疗该个体癌症的治疗有效量可以与用于促进缓解或抑制转移的治疗有效量相同或不同。像就大多数癌症疗法而言的那样,本文描述的治疗方法不应解释为限于或以其他方式限于癌症的“治愈”;相反,治疗方法指使用所述组合物来“处理”癌症,即,对患癌个体的健康产生期望的或有益的改变。这样的益处是肿瘤学领域有经验医疗保健提供者所知道的,包括但不限于患者病情稳定,肿瘤减小(肿瘤消退),重要机能改善(例如患癌组织或器官的功能改善),进一步转移的减少或抑制,机会性感染的减少,生存能力的提高,疼痛的减轻,运动机能改善,认知功能改善,精力改善(活力,不适减少),健康感改善,恢复正常食欲,恢复健康的体重增加,以及它们的组合。此外,个体内特定肿瘤的消退(例如作为本文所述治疗的结果)还可以如下来评估:从肿瘤部位取样癌细胞如胰腺癌(例如在治疗过程中)并对癌细胞进行代谢标志物和信号传导标志物水平检测,从而监测癌细胞的状态,由此在分子水平上验证癌细胞消退为低恶性表型。例如,采用本发明方法诱导的肿瘤消退可由以下所述来指示:发现任一前文所述促血管生成标志物减少,本文所述抗血管生成标志物增加,代谢路径或细胞间信号传导路径或细胞内信号传导路径(在癌症确诊个体内表现出异常活性)的正常化(即以非癌患正常个体的状态为方向的改变)。本领域普通技术人员会明白,某些实施方式中,治疗有效量可以配制成单剂量和/或以单剂量给药。某些实施方式中,治疗有效量可以配制成多剂量和/或以多剂量给药,例如作为给药方案的一部分。

[0091] 变体:在本文中就分子(如核酸、蛋白质或小分子)而言,术语“变体”指与参照分子显示出显著的结构同一性但结构上区别于参照分子的分子,例如,与参照相比,在一个或多个化学部分的存在或不存在或水平下有区别。某些实施方式中,变体在功能上也区别于其参照分子。通常,将特定分子认为参照分子的“变体”是否恰当是基于其与参照分子的结构同一性程度。如同本领域技术人员所理解的,任何生物或化学参照分子都具有某些特征性结构元件。根据定义,变体是共享一种或多种此类特征性结构元件但在至少一个方面与参照分子有差异的不同分子。仅举几个例子,多肽可具有由多个氨基酸组成的特征性序列元件,这些氨基酸在线性或三维空间上具有彼此相对的指定位置和/或参与构成特定的结构基序和/或生物学功能;核酸可具有多个核苷酸残基组成的特征性序列元件,这些核苷酸残基在线性或三维空间上具有彼此相对的指定位置。某些实施方式中,变体多肽或核酸可能因氨基酸或核苷酸序列上一处或多处差异而区别于参照多肽或核酸。某些实施方式中,变

体多肽或核酸与参照多肽或核酸的总体序列相同性为至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%。某些实施方式中,变体多肽或核酸与参照多肽或核酸不共有至少一种特征序列元件。某些实施方式中,参照多肽或核酸具有一种或多种生物活性。某些实施方式中,变体多肽或核酸与参照多肽或核酸共有一种或多种生物学活性。

[0092] 载体:在此指能够运输与之相连的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,指可在其中连接其他DNA区段的环状双链DNA环。载体的另一类型是病毒载体,其中,其他DNA区段可连入病毒基因组。某些载体能够在其引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和其他游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。并且,某些载体能够引导与其操作性连接的基因的表达。此类载体在此称为“表达载体”。重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养与转化可采用标准技术(如电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可按照生产商的说明书或按照本领域常规操作或按照本文所述来进行。以上所述技术和方法可以一般性地按照如本领域所知、亦如本说明书所引用和论述的众多综合性和专论性文献中所述来进行。参见,例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》)(第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(1989)),该书通过援引纳入本文用于所有目的。

[0093] 示例性实施方式的具体说明

[0094] 本公开尤其涉及诱导型共刺激分子4-1BB以及与其结合的治疗性抗体,所述治疗性抗体经工程化以具有比参比抗-4-1BB抗体改善的特征。例如,相对于特异性识别人4-1BB(韩国专利号10-0500286,登记号KCTC 0952BP)胞外域内表位的参比激动剂抗体的抗原亲和力和,本文所述工程化抗体经修饰而增强了抗原亲和力。具体地,如本文所述,发明人工程改造了参比人源化抗-人4-1BB抗体94G1(美国专利号7,932,045)。如本文实施例所述,参比抗体94G1的轻链和重链CDR序列分别经工程化以改善各链的亲和力。此外,如本文所述,示例性工程化抗-4-1BB抗体可以有效地诱导活化的T细胞增殖。值得注意的是,由于4-1BB人源化抗体结合4-1BB分子并抑制活化诱导的细胞死亡(AICD)所引起的刺激,示例性工程化抗-4-1BB抗体能够诱导CD8⁺T细胞活性出人意料的改善。因此,本公开提供了工程化抗-人4-1BB抗体,相比参比抗体其具有改善的特性,并且还表明这些抗体在体外和体内具有出人意料的有益活性。

[0095] 4-1BB

[0096] 4-1BB(也称之为CD137、TNFRSF9等)是属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的受体。4-1BB是通常表达于活化的T细胞细胞中并涉及免疫和自身免疫疾病的共刺激分子(Kwon等PNAS 84:2896,1987;Kwon等PNAS(1989)86:1963;Son等Journal of Immunological Methods(2004)286(1-2):187-201,其各自通过引用其全部内容纳入本文)。人4-1BB是255个氨基酸的蛋白质(登记号NM_001561;NP_001552)。完整的人4-1BB氨基酸序列在SEQ ID NO:44中提供。4-1BB以单体(30kDa)和二聚体(55kDa)形式表达于细胞表面,并且有可能与4-1BB配体三聚化以发出信号。

[0097] 当前对4-1BB的理解表明,其在许多细胞上组成型表达,包括Foxp3⁺Treg和树突细胞(DC),虽然以低水平(参见,Vinay和Kwon(2014)BMB Rep.47(3):122-129,其通过引用纳

入本文)。采用许多激动剂如细胞因子(例如,IL-2、IL-4)、多克隆活化剂(例如,Con A和PHA)、细胞表面分子(例如,抗-CD3和抗-CD28)以及Ca²⁺诱导和PKC活性的启动子(例如,离子霉素和佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯)的活化将进一步增强4-1BB的表达。同上。

[0098] 对于小鼠和人T细胞的许多研究表明4-1BB促进细胞增殖、存活和细胞因子产生增强(Croft,2009,Nat.Rev.Immunol.9:271-285)。研究已经表明,一些4-1BB激动剂单克隆抗体可以增加共刺激分子表达并显著地增强溶细胞T淋巴细胞应答,在各种模型中产生抗肿瘤功效。已经证明了4-1BB激动剂单克隆抗体在预防性和治疗性条件下的功效。此外,4-1BB单一疗法和联合疗法肿瘤模型已经建立了持久的抗肿瘤保护性T细胞记忆应答(Lynch(2008)Immunol.Rev.22:277-286)。4-1BB激动剂还在各种本领域认可的自身免疫模型中显示出抑制自身免疫响应(Vinay(2006)J.Mol.Med.84:726-736)。4-1BB的这种双重活性提供了在给予抗肿瘤活性的同时抑制可能与免疫疗法途径相关的自身免疫副作用的潜力。

[0099] 4-1BB抗体及其片段

[0100] 本文,至少在部分内容中,提供了工程化的抗-人4-1BB抗体及其片段,它们表现出显著且出人意料优异的体外和/或体内特征。例如,某些提供的抗体相对于参比人源化抗-人4-1BB抗体的亲和性增加。

[0101] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包含1、2或3个轻链CDR序列,它们是或包括SEQ ID NO:5-8的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下所述中的一项或多项:重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下每一项:重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列。

[0102] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包含1、2或3个轻链CDR序列,它们是或包括SEQ ID NO:1-4的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下所述中的一项或多项:轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:3或4所示序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括以下每一项:轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:3或4所示序列。

[0103] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域和/或轻链可变域,所述重链可变域包含重链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:5所示序列,重链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:6所示序列,和重链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:7或8所示序列,所述轻链可变域包含轻链CDR1,其是或包括SEQ ID NO:1所示序列,轻链CDR2,其是或包括SEQ ID NO:2所示序列,和轻链CDR3,其是或包括SEQ ID NO:4所示序列。

[0104] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含是或含有序列SEQ ID NO:6的重链CDR2区,其中第5个氨基酸天冬酰胺(N)被谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)或丝氨酸(S)取代。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含是或含有序列SEQ ID NO:6的重链CDR2区,其中第5个氨基酸天冬酰胺(N)被缬氨酸(V)、甘氨酸(G)或脯氨酸(P)取代。

[0105] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括轻链可变域,所述轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:3或4,其中LCDR3的第6个氨基酸位置发生突变。

[0106] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含含有序列SEQ ID NO:16或17的重链框架1 (FR1) 区。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含含有SEQ ID NO:18-20中任一项序列的重链框架3 (FR3) 区。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域包含重链框架1 (FR1) 区和重链框架3 (FR3) 区,所述重链框架 (FR) 区含有序列SEQ ID NO:16或17,所述重链框架3 (FR3) 区含有SEQ ID NO:18-20中任一项的序列。

[0107] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的轻链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域是或包括与选自SEQ ID NO:11-14的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括重链可变域,所述重链可变域是或包括选自SEQ IDNO:11-14的序列。

[0108] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的轻链可变域具有或包括序列SEQ ID NO:9或10。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括轻链可变域,所述轻链可变域是或包括与序列SEQ ID NO:9或10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段包括轻链可变域,所述轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:9或10。

[0109] 某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段具有与如下所述抗体或抗体片段的实质同源性:所述抗体或抗体片段的轻链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列,而轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:10。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段的轻链可变域是或包括与选自SEQ ID NO:11-14的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列,且轻链可变域是或包括与序列SEQ ID NO:10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%相同的序列。某些实施方式中,抗-4-1BB抗体或抗原结合抗体片段的轻链可变域是或包括选自SEQ ID NO:11-14的序列,而轻链可变域是或包括序列SEQ ID NO:10。

[0110] 本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的氨基酸序列可通过保守取代进行取代。术语“保守取代”在此指多肽的修饰,其中一个或多个氨基酸被生化特性相似的氨基酸取代,从而不会导致损失对应多肽的生物学或生物化学功能。术语“保守序列变体”或“保守氨基酸取代”在此指氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代。具有相似侧链的氨基酸残基其定义如本领域所知。这些残基包括:具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸和谷氨酸),具有不带电极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸),具有 β -分支

侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸)。所以,预计本发明抗体可以具有保守氨基酸取代并仍然确保活性。

[0111] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段可包括选自下组的恒定区:IgG1恒定域、IgG2恒定域、IgG1/IgG2杂合恒定域、人IgG4恒定域、IgA恒定域、IgE恒定域、IgM恒定域和IgD恒定域。

[0112] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是或包括IgA、IgD、IgE、IgM、IgG或其变体。

[0113] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体包含在下述一个或多个位置处具有氨基酸突变和/或取代的变体Fc区:234、235、236、237、238、239、253、254、265、266、267、268、269、270、288、297、298、299、307、311、322、327、328、329、330、331、332、434和435。

[0114] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是人IgG1同种型。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括变体IgG1。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或其抗原结合片段包括在233、234、235、236、265、297、329、331和322的一个或多个位置处具有氨基酸突变的IgG1多肽。

[0115] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或其抗原结合片段包括在L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329中包含一个或多个突变的IgG1多肽。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或其抗原结合片段包括在L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329中包含两个、三个、四个或多个突变的IgG1多肽。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括在L234A和L235A中具有突变的IgG1多肽。

[0116] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包含轻链恒定区。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包含κ和/或λ轻链和/或其变体。

[0117] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是单克隆抗体。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、二硫键结合的Fv片段、scFv片段、单域抗体、Humabody、纳米抗体和/或双功能抗体。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是单价抗体。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是多价抗体。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是多特异性抗体(如双特异性抗体)。

[0118] 某些实施方式中,本文涵盖通过添加或缺失糖基化位点来修饰本文抗体的碳水化合物含量的方法。用于修饰抗体碳水化合物含量的方法是本领域熟知的,这些都包含在本文内容之中,此类方法参见例如美国专利No.6,218,149、EP 0 359 096 B1、美国专利申请公开US 2002/0028486、WO 03/035835、美国专利申请公开No.2003/0115614、美国专利No.6,218,149、美国专利No.6,472,511,以上全部通过引用完全并入本文。其他一些实施方式中,本文包括通过缺失抗体一个或多个内源性碳水化合物部分来修饰本文抗体碳水化合物含量的方法。具体的实施方式中,本文包括通过将位置297由天冬酰胺修饰至丙氨酸使抗体Fc区的糖基化位点缺失。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段在CH2结构域中包含N297A突变。某些实施方式中,N297A突变导致无糖基化,这使FcR或C1q结合降低。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包含含有Fc区的重链,所述Fc区域包含N297A突变和K322A突变。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包含含有Fc区的重链,所述Fc区域包含N297A突变和D265A突变。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗

原结合片段包含含有Fc区的重链,所述Fc区域包含N297A突变、D265A突变和K322A突变。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括具有L234A突变和/或L235A突变的Fc区。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括具有选自L234A-、L235A、N297A、D265A和K322A中的一个或更多个突变的Fc区。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括具有选自L234A-、L235A、N297A、D265A和K322A中的两个或更多个突变的Fc区。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段包括具有选自L234A-、L235A、N297A、D265A和K322A中的三个、四个或五个或更多个突变的Fc区。

[0119] 工程化的糖型可用于多种目的,包括但不限于提高或降低效应功能。工程化的糖型可用任何本领域技术人员所知方法产生,例如采用工程化或变异表达株,与一种或多种酶如DI N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III (GnTIII) 共表达,在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达含有Fc区的分子,或者含Fc区的分子表达后进行碳水化合物修饰。产生工程化糖型的方法是本领域已知的,并且包括但不限于Umana等,1999,Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等,20017Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等,2003,J Biol Chem 278:3466-3473);美国专利No.6,602,684;美国专利系列号10/277,370;美国专利系列号10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1;POTILLEGENT™技术(波娃公司(BiowaBiowa,Inc.),新泽西州普林斯顿);GLYCOMAB™糖基化工程技术(GLYCART生物技术公司(GLYCART biotechnology AG),瑞士苏黎世)中所述的那些;以上均通过引用全文纳入本文。参见例如WO 00061739;EA01229125;US 20030115614;Okazaki等,2004,JMB,336:1239-49,以上均通过引用全文纳入本文。

[0120] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是人4-1BB的激动剂。

[0121] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合人4-1BB分子。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段特异性结合人4-1BB分子。

[0122] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合SEQ ID NO:15所示序列或结合包含SEQ ID NO:15的序列。某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合SEQ ID NO:15所示的4-1BB胞外域表位或结合包含SEQ ID NO:15序列的4-1BB胞外域表位。

[0123] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段与人4-1BB胞外域的结合因选自N30、D38、N39、R41、A56、G57、R60或T61的SEQ ID NO:44的一个或更多个突变消除。

[0124] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合人-4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-7} 至 1×10^{-12} M。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合人-4-1BB分子的结合亲和力(K_D)为 1×10^{-8} 至 1×10^{-12} M。结合亲和力(K_D)的测定可例如采用表面等离子体共振(如用BIAcore系统)。

[0125] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合人4-1BB抗体分子或其片段的结合亲和力(K_D)低于 1.0×10^{-8} M。某些实施方式中,本文抗-人源化4-1BB抗体或抗原结合片段结合人4-1BB分子或其片段的结合亲和力(K_D)低于 1.0×10^{-9} M。某些实施方式中,本文抗-人源化4-1BB抗体或抗原结合片段结合人4-1BB抗体分子或其片段的结合亲和力(K_D)低于 1.0×10^{-10} M。

[0126] 某些实施方式中,本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段不能结合或弱结合非灵长类动物4-1BB多肽(如犬、小鼠和大鼠4-1BB多肽)。某些实施方式中,本文抗-4-1BB抗体或抗原

结合片段高效结合人或猴4-1BB。这样的结合亲和力提示灵长类动物4-1BB抗体的表位结构和/或序列可能与犬、小鼠和大鼠非常不同。

[0127] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段是激动性抗体。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段介导T细胞活化。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段结合表达CD8⁺和/或CD4⁺T的人4-1BB。

[0128] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段不具有或具有低ADCC活性。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段不具有或具有低CDC活性。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段不具有或具有低ADCC活性和CDC活性。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的ADCC细胞杀伤活性小于约20%、小于约10%、小于约8%或小于约5%。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的ADCC细胞杀伤活性小于约10%。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的CDC细胞杀伤活性小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约8%或小于约5%。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的CDC细胞杀伤活性小于约20%。

[0129] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段具有低毒性特征(如给药后细胞死亡程度低)。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的特征在于低肝脏毒性。某些实施方式中,接受过治疗剂量本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的对象其ALT、AST和总胆红素中一项或多项的水平在正常范围内。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的特征包括能够长时间治疗患者,提供可测知的症状缓解且毒性低和/或可接受。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他合适的性质可有助于实现治疗结果。低免疫原性在此定义为在少于约75%或更好的是少于约50%接受治疗的患者中引起显著的HAHA、HACA或HAMA反应,和/或,在接受治疗的患者中仅引发低效价(Elliott等,Lancet 344:1125-1127(1994),通过引用完全纳入本文)。

[0130] 核酸

[0131] 本文提供包含编码本文抗-人4-1BB抗体及其片段的核苷酸序列的多核苷酸。本文所述抗-人4-1BB抗体及其片段可用本领域所知的分子生物学方法由核酸分子产生。本文中的核酸包括例如DNA和/或RNA。

[0132] 某些实施方式中,核酸构建体包括编码抗-人4-1BB抗体或其片段(例如,94K、94KV、94KVT、EU101)的区域。某些实施方式中,所述抗体或其片段包含V_H和/或V_L区。可对抗-人4-1BB抗体或其片段就所需结合和/或功能特性进行鉴定和/或选择,并对所述抗体的可变区进行分离、扩增、克隆和/或测序。可对V_H和V_L核苷酸序列进行修饰,包括添加编码氨基酸和/或携带限制性位点的核苷酸序列,和/或对编码氨基酸的核苷酸序列进行取代。某些实施方式中,核酸序列可以包括也可以不包括内含子序列。

[0133] 适当情况下,编码抗-人4-1BB抗体及其片段(例如,94K、94KV、94KVT、EU101)的核酸序列可修饰成包含针对在特定细胞类型或生物中表达而优化的密码子(例如,参见美国专利No.5,670,356和美国专利No.5,874,304)。密码子优化的序列是合成序列,优选其编码与非密码子优化亲本多核苷酸所编码多肽相同的多肽(或具有与全长多肽基本相同活性的全长多肽的生物活性片段)。某些实施方式中,编码抗体组分的遗传物质的编码区可全部或部分包括经改变的序列以针对特定细胞类型(例如真核或原核细胞)优化密码子使用。例如,本文所述人源化重链(或轻链)可变区的编码序列可以针对在细菌细胞中表达进行优

化。或者,编码序列可以为了在哺乳动物(如CHO细胞)中表达进行优化。这样的序列可称为密码子优化序列。

[0134] 本文核酸构建体可用本领域所知方法插入表达载体或病毒载体,核酸分子可操作性连接表达调控序列。本文还提供包含任意以上所述核酸分子或其片段的载体。任何以上所述核酸分子或其片段均可克隆到任何合适的载体中,且均可用于转化或转染任何合适的宿主。载体的选择及其构建方法是本领域普通技术人员公知的,并且可见一般技术参考文献(大致来说,可见“Recombinant DNA Part D”(“重组DNA部分D”),*Methods in Enzymology*,153卷,Wu和Grossman编,学术出版社(Academic Press)(1987))。

[0135] 某些实施方式中,常用技术如电泳、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染、脂质转染等可用来将外源核酸(DNA或RNA)引入原核或真核宿主细胞。理想的是,在合适且考虑载体DNA还是RNA的情况下,载体可包含调节序列,如转录和翻译起始密码子和终止密码子,调节序列对引入载体的宿主类型(如细菌、真菌、植物或动物)是特异性的。某些实施方式中,载体包含对宿主所在属特异性的调节序列。较好的是,载体包含对宿主所属种特异性的调节序列。

[0136] 除了复制系统和插入的核酸之外,核酸构建体可以包括一个或多个标志基因,由此可选择被转化或被转染的宿主。标志物基因包括抗生素抗性如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中提供原养型的互补机制,等等。

[0137] 合适的载体包括设计用于增殖和扩增或用于表达或两者的载体。例如,克隆载体可以选自:pUC系列、pBluescript系列(司查塔基公司(Stratagene),加利福尼亚州拉荷亚)、pET系列(诺瓦基公司(Novagen),威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(药物生物技术公司(Pharmacia Biotech),瑞典乌普萨拉(Uppsala))和pEX系列(克隆泰克公司(Clontech),加利福尼亚州帕洛阿尔托)。也可以使用噬菌体载体,如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(司查塔基公司(Stratagene))、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的例子包括pBI110、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(克隆泰克公司)。动物表达载体的例子包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(克隆泰克公司)。还可采用TOPO克隆系统(英杰公司(Invitrogen),加利福尼亚州卡尔斯巴德),按制造商的建议使用。

[0138] 病毒载体可包含天然或非天然启动子,其操作性连接分离或纯化的前文所述核酸分子。本领域技术人员知道如何选择启动子(例如强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性启动子)。类似的,本领域技术人员知道如何将前文所述核酸分子或其片段与启动子联合。

[0139] 合适的病毒载体包括例如逆转录病毒载体,基于细小病毒的载体,如基于腺相关病毒(AAV)的载体,AAV-腺病毒嵌合载体和基于腺病毒的载体,以及慢病毒载体,例如基于单纯疱疹病毒(HSV)的载体。这些病毒载体可用标准重组DNA技术制备,参见例如Sambrook等的*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*(《分子克隆:实验室手册》),第2版,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1989)和Ausubel等的*Current Protocols in Molecular Biology*(《新编分子生物学实验指南》),纽约州纽约的格林出版联合公司(Greene Publishing Associates)和约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons)(1994)。

[0140] 逆转录病毒载体来源于逆转录病毒。逆转录病毒是能广泛感染宿主细胞的RNA病毒。转染后,逆转录病毒基因组整合到宿主细胞的基因组中,并且与宿主细胞DNA一起复制,由此持续生成病毒RNA和逆转录病毒基因组中整合的任意核酸序列。如此,使用逆转录病毒时可获得一种或多种治疗因子的长期表达。考虑用于基因治疗的逆转录病毒是相对非致病

性的,尽管也有致病性逆转录病毒。当使用致病性逆转录病毒例如人免疫缺陷病毒(HIV)或人T细胞淋巴营养性病毒(HTLV)时,必须小心改变病毒基因组以消除对宿主的毒性。逆转录病毒还可改造成病毒复制缺陷型。如此,逆转录病毒载体被认为对体内稳定基因转移尤其有用。慢病毒载体例如基于HIV的载体代表了用于基因递送的逆转录病毒载体。不同于其他逆转录病毒,已知基于HIV的载体将其乘客(passenger)基因整合到非分裂细胞,因此能用于治疗持久型疾病。

[0141] 可向这些克隆克隆和/或表达序列添加其他序列来优化它们在克隆和/或表达中的功能、协助多核苷酸的分离或改善多核苷酸向细胞中的引入。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域熟知的。(见例如Ausubel,同上;或Sambrook,同上)。

[0142] 某些实施方式中,可对本文核酸和载体进行分离和/或纯化。本文还提供组合物,其中包含前文所述分离或纯化的核酸分子,所述核酸分子可以是载体形式的。分离的核酸和载体可用本领域所知标准技术来制备,包括例如碱/SDS处理、CsCl结合、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域所知其他技术。组合物可含有其他组分,如后文所述。

[0143] 某些实施方式中,将核酸分子插入载体,该载体能够在引入合适的宿主细胞后表达抗-人4-1BB抗体或其片段。合适的宿主细胞包括但不限于细菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。示例性宿主细胞包括原核细胞(如大肠杆菌)和真核细胞(如COS或CHO细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞包括人HeLa 293、H9和Jurkat细胞,小鼠NIH3T3和C127细胞,Cos 1、Cos 7和CV 1,鹌鹑QC1-3细胞,小鼠L细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(如DG44细胞)。某些实施方式中,适合表达抗体的哺乳动物宿主细胞可以是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如包括与DHFR可选标志联用的DHFR-CHO细胞),NSO骨髓瘤细胞,COS细胞或SP2细胞。

[0144] 本领域技术人员所知用于将DNA片段插入载体的任何方法均可用于构建受转录/翻译控制信号控制的编码本文抗-人4-1BB抗体或其片段的表达载体。这些方法包括体外重组DNA和合成技术以及体内重组(见例如Ausubel,同上;或Sambrook,同上)。

[0145] 抗体的生产

[0146] 本发明的抗体和抗原结合片段可用各种本领域所知技术来制备和/或纯化,以便后续形成稳定的抗体或抗体片段。

[0147] 使用常规方法可方便地对编码本文抗-人4-1BB抗体和/或抗原结合片段的核酸进行分离和测序。例如,可以使用设计用来从杂交瘤或噬菌体模板DNA特异性扩增相应的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物。可以将分离的核酸插入表达载体中,然后通过将该表达载体导入宿主细胞从合适的被转化宿主细胞(即转化体)产生所需单克隆抗体。某些实施方式中,用于制备本文抗-人4-1BB抗体和/或抗原结合片段的方法可包括扩增包含编码抗体的核酸的表达载体,但不限于此。

[0148] 某些实施方式中,宿主细胞是真核宿主细胞,包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。根据在重组生产过程中采用的宿主,可对本文抗体和抗体片段进行糖基化或非糖基化。某些实施方式中,将编码本文抗-人4-1BB抗体和/或抗原结合片段的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中,可通过对这样的宿主细胞进行足够时间的培养来表达抗体从而制得抗体。某些实施方式中,哺乳动物宿主细胞经培养足够时间后向培养基中分泌本文抗体或抗体片段。

[0149] 某些实施方式中,表达的本文抗体可在与宿主细胞分离后均匀纯化。本文抗体的

分离和/或纯化可用蛋白质分离与纯化的常规方法进行。例如,不希望受理论束缚,可用众所周知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化本文抗-人4-1BB抗体和/或抗原结合片段,这些方法包括但不限于蛋白A纯化、蛋白G纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。也可用高效液相色谱(“HPLC”)纯化。见例如Colligan, *Current Protocols in Immunology* (《新编免疫学方案》)或*Current Protocols in Protein Science* (《新编蛋白质科学方案》), John Wiley&Sons出版社, NY, N.Y., (1997-2001), 如第1、4、6、8、9和10章,各自通过援引全文纳入本文。某些实施方式中,本文抗体可通过进一步联合过滤、超滤、盐析、透析等来分离和/或纯化。

[0150] 纯化的本文抗-人4-1BB抗体和/或抗原结合片段可通过例如以下所述进行鉴定: ELISA、ELISPOT、流式细胞术、免疫细胞学、BIACORE™分析、SAPIDYNE KINEXA™动力学排斥测试(kinetic exclusion assay)、SDS-PAGE和Western印迹,或通过HPLC分析以及本文中许多其他功能测试来鉴定。

[0151] 治疗性应用

[0152] 本文认识到,工程化抗-人4-1BB抗体和抗原结合片段可用于诊断、预防和/或治疗某些疾病例如癌症。任何本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段均可用于治疗。例如本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段可用作免疫治疗剂,例如用于治疗恶性病(如癌症)。

[0153] 本文提供治疗和/或预防恶性病的方法,所述方法包括给予对象本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段。调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者内至少一种恶性病的方法包括但不限于癌症,和/或处理炎症性疾病。

[0154] 本文中,癌症的处理可通过提高细胞毒性T细胞和抗癌细胞因子来介导。通常,抗原特异性细胞介导的免疫是由细胞毒性T细胞所导致,并且包括两个信号转导事件:在T细胞经受体从抗原呈递细胞识别抗原时诱导第一信号转导事件,而第二信号转导通过共刺激分子诱导。由于第一和第二刺激,T细胞活性和相关因子增加,从而形成在癌症处理中特异性运作的T细胞,并且形成的T细胞由于共刺激分子的刺激而增加细胞毒性、细胞分离、细胞活力和抗癌细胞因子分泌。

[0155] 具体地,已经证明的是,通过4-1BB的刺激可以增强CD8⁺T细胞的活性,增强分泌抗癌细胞因子,如干扰素 γ (IFN γ),增强表达抗细胞凋亡分子,如Bcl-2、BclXL和Bfl-1,和/或抑制活化诱导的细胞死亡(AICD)。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段可以增强或增加下述一种或多种:CD8⁺T细胞活性,抗癌细胞因子如干扰素 γ (IFN γ)的分泌,抗细胞凋亡分子如Bcl-2、BclXL和Bfl-1的表达,和活化诱导的细胞死亡(AICD)的抑制。某些实施方式中,用本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的治疗能降低和/或抑制癌细胞的生长。

[0156] 某些实施方式中,本文提供延迟或抑制肿瘤生长的方法,这包括通过给予本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段来体内或体外调节细胞因子分泌。某些实施方式中,本文提供降低肿瘤负荷的方法,这包括通过给予本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段来体内或体外调节细胞因子分泌。

[0157] 某些实施方式中,本文提供通过监测待治疗癌症或肿瘤生物对象来治疗癌症或肿瘤的方法,其包括:(i)给予对象本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段,(ii)然后从该对象

分离生物样品, (iii) 由样品测定INF γ 或TGF β 的分泌量并估测比例和 (iv) 通过比较接受或不接受抗-人4-1BB抗体或其抗原结合片段的对照样品来确定抗体或其抗原结合片段的治疗有效量。

[0158] 某些实施方式中, 本文提供对有此需要对象的治疗方法, 所述方法包括给予所述对象包含或递送本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和/或其核酸的组合物。某些实施方式中, 对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。某些实施方式中, 本文提供用于预防或治疗患者癌症或肿瘤的方法, 所述方法包括给予癌症或肿瘤患者治疗有效量的人源化4-1BB抗体或其抗原结合片段。

[0159] 某些实施方式中, 本文提供在有此需要的对象中诱导免疫响应的方法, 所述方法包括给予对象包含或递送本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和/或其核酸的组合物。某些实施方式中, 对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。

[0160] 某些实施方式中, 本文提供在有此需要的对象中增强免疫响应或提高免疫细胞活性的方法, 所述方法包括给予对象包含或递送本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和/或其核酸的组合物。某些实施方式中, 对象有罹患癌症的风险或正处于所述风险中。

[0161] 适合用本文方法治疗的癌症可包括但不限于: 膀胱癌, 乳腺癌, 宫颈癌, 结肠癌, 子宫内膜癌, 食道癌, 输卵管癌, 胆囊癌, 胃肠癌, 头颈癌, 血液癌, 喉癌, 肝癌, 肺癌, 淋巴瘤, 黑色素瘤, 间皮瘤, 卵巢癌, 原发性腹膜癌, 唾液腺癌, 肉瘤, 胃癌, 甲状腺癌, 胰腺癌和前列腺癌。某些实施方式中, 可用本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段治疗的癌症可包括但不限于癌瘤、淋巴瘤(如霍奇金和非霍奇金淋巴瘤)、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。某些实施方式中, 癌症可包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、白血病和其他淋巴组织增生性异常以及各种类型的头颈癌。

[0162] 包含本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物可按照处理癌细胞或其转移或抑制癌生长的药用有效量来给予。为了用于治疗, 本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段将采用良好的医学实践方式进行配制、确定剂量和给药。就此而言的考量因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、患者个体临床状况、患者年龄、患者体重、病因、药物的递送位点、给药方法、给药安排, 以及医务人员所知的其它因素。

[0163] 本文提供高亲和力抗-人4-1BB抗体, 其性能可优于参比抗体。本文认识到这些抗体或许具有更好的诱导T细胞活化和/或分泌细胞因子如IFN- γ 的能力。于是本文认识到本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段可以低于参照抗体的剂量来给药。

[0164] 某些实施方式中, 包含本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物可在需要时以推注或连续注射的形式给予患者。某些实施方式中, 推注给药的是本文所述抗-4-1BB Fab, 可按以下剂量给药: 0.0025至100mg/kg、0.025至0.25mg/kg、0.010至0.10mg/kg或0.10至0.50mg/kg。连续注射时, Fab片段形式的本发明抗体可按照以下剂量给药: 0.001至100mg/kg/min、0.0125至1.25mg/kg/min、0.010至0.75mg/kg/min、0.010至1.0mg/kg/min或0.10至0.50mg/kg/min, 持续1至24小时、1至12小时、2至12小时、6至12小时、2至8小时、或1至2小时。某些实施方式中, 本文抗体是全长抗体(具有完整的恒定区)。某些实施方式中, 全长抗体给药剂量约为0.01至10mg/kg、1至8mg/kg或2至6mg/kg。某些实施方式中, 全长抗体通过

30至35分钟注射来给药。给药频率根据病情严重程度而异。例如,所述频率可以是每2-7天一次、每周一次或每1、2、3或4周一次。

[0165] 某些实施方式中,组合物可通过皮下注射给予患者。具体来说,抗体可每2-7天一次、每周一次、每两周一次或每月一次皮下注射给予患者,剂量为0.1-100mg。

[0166] 联合治疗

[0167] 本文提供了这样的治疗方法,所述治疗方法包括联合给予本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和一种或更多种其他疗法。

[0168] 某些实施方式中,抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段与已经批准用于癌症处理的一种或更多种疗法联合给予。例如,抗-4-1BB抗体和常规化疗剂顺铂的联合治疗已经显示出在肿瘤杀伤和预防器官特异性毒性中具有协同作用(Kim等,Cancer Research (2008) 68 (18):7264-9)。

[0169] 某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段与选自下述的第二疗法联合给予:免疫检查点抑制剂,白介素12 (IL-12),粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子 (GM-CSF),抗-CD4物质和化疗剂,从而使对象接受两方面治疗。

[0170] 某些实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含化疗剂的组合物的对象,从而使对象接受两方面治疗。本公开的治疗方法可以包括给予本领域已知的任何化疗剂。某些实施方式中,将化疗剂给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0171] 某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含氟尿嘧啶的组合物的对象。某些实施方式中,将氟尿嘧啶给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含多柔比星的组合物的对象。某些实施方式中,将多柔比星给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含伊立替康的组合物的对象。某些实施方式中,将伊立替康给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含紫杉醇的组合物的对象。某些实施方式中,将紫杉醇给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0172] 某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含顺铂的组合物的对象。某些实施方式中,将顺铂给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。某些实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含环磷酰胺的组合物的对象。某些实施方式中,将环磷酰胺给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0173] 某些实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含GM-CSF的组合物的对象,从而使对象接受两方面治疗。某些实施方式中,将GM-CSF给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0174] 某些实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含IL-12的组合物的对象,从而使对象接受两方面治疗。某些实施方式中,将IL-12给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0175] 某些实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含抗-CD4物质的组合物的对象,从而使对象接受两方面治疗。某些实施方式中,将抗-CD4物质给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0176] 某些实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予已经给予或将要给予包含检查点抑制剂(例如,免疫检查点抑制剂)的组合物的对象,从而使对象接受两方面治疗。某些实施方式中,将免疫检查点抑制剂给予已经给予或将要给予包含抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物的对象。

[0177] 与抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段联用的检查点抑制剂可以是例如任何免疫检查点抑制剂。抑制性检查点分子的实例包括A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、CD277、IDO、KIR、PD-1、LAG-3、TIM-3、TIGIT和VISTA。免疫检查点抑制剂可以指抑制免疫抑制性检查点蛋白功能的任何化合物。抑制包括功能减少和完全阻滞。某些实施方式中,检查点抑制剂是特异性识别免疫检查点蛋白的抗体。已知许多免疫检查点抑制剂,并且与这些已知的免疫检查点蛋白抑制剂类似,可以在(不远的)未来开发出替代性免疫检查点抑制剂。免疫检查点抑制剂包括但不限于,肽,抗体,核酸分子和小分子。

[0178] 某些实施方式中,免疫检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂。某些实施方式中,检查点抑制剂是靶向CTLA-4的抗体,例如伊匹单抗(ipilimumab)。某些实施方式中,检查点抑制剂靶向CD366,其是又称为T细胞免疫球蛋白和包含粘蛋白结构域的蛋白质-3(TIM-3)的跨膜蛋白。某些实施方式中,免疫检查点抑制剂是抑制PD-1信号转导的物质。

[0179] PD-1(即,程序化细胞死亡蛋白-1)是分布于免疫细胞(如T或B细胞)表面的蛋白质,并且还称为CD279。在人类中,PD-1通过PDCD1基因表达,所述PDCD1基因位于染色体2的2p37.3位置。已知PD-1结合PD-L1和PD-L2两个配体。

[0180] 某些实施方式中,将抗-PD-1物质给予正在接受、已经接受或将要接受本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段治疗的患者。某些具体实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予正在接受、已经接受或将要接受抗-PD-1物质治疗的患者。

[0181] 某些实施方式中,将抗-PD-L1物质给予正在接受、已经接受或将要接受本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段治疗的患者。某些具体实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予正在接受、已经接受或将要接受抗-PD-L1物质治疗的患者。某些实施方式中,抑制PD-L1的物质包括例如AMP-244、MEDI-4736、MPDL3280A、MIH1。

[0182] 某些实施方式中,抗-PD-1物质是抑制PD-1的物质。某些实施方式中,抗-PD-1物质是抑制PD-L1和/或PD-L2的物质。某些实施方式中,抑制PD-1信号转导的抗体物质是单克隆抗体或其片段。某些实施方式中,抑制PD-1信号转导的抗体物质是抗-PD-1抗体或其片段。

[0183] 某些实施方式中,将抗-PD-1抗体给予正在接受、已经接受或将要接受本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段治疗的患者。某些具体实施方式中,将本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予正在接受、已经接受或将要接受抗-PD-1抗体治疗的患者。抗-PD-1抗体包括例如尼莫单抗(nivolumab),彭美罗珠单抗(pembrolizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、度伐鲁单抗(durvalumab)和阿维单抗(avelumab)。彭美罗珠单抗(Keytruda,Merck公司)是抑制PD-1活性的抗体治疗剂。

[0184] 如本申请实施例中所述,联合给予本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和抗-PD-1抗体相对于单独的治疗可以增强效力,并且还可以减少通常已知的副作用。

[0185] 某些具体实施方式中,将彭美罗珠单抗给予正在接受、已经接受或将要接受本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段治疗的患者。某些具体实施方式中,将抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段给予正在接受、已经接受或将要接受彭美罗珠单抗治疗的患者。

[0186] 某些实施方式中,免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD-1物质)以约0.01mg/kg至约100mg/kg的量给予患者。某些实施方式中,免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD-1物质)以在下限和上限限定的范围内的量给予患者,所述上限大于所述下限。某些实施方式中,下限可以是约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg或90mg/kg。某些实施方式中,上限可以是约0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg。某些实施方式中,免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD-1物质)可以约1mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约5mg/kg、约2mg/kg至约4mg/kg、约3mg/kg至约5mg/kg或约3mg/kg至约4mg/kg的量给予患者。某些实施方式中,免疫检查点抑制剂(例如,抗-PD-1物质)以约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg或约5mg/kg的量给予患者。

[0187] 某些实施方式中,免疫检查点抑制剂和本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的联合治疗可以增强对象中CD8⁺T细胞的增殖、迁移、持久性和/或细胞毒性活性。

[0188] 基于细胞的应用

[0189] 本发明的另一目的是提供用于通过给予4-1BB人源化抗体或其抗原结合片段使活化的T细胞离体增殖的方法。

[0190] 某些实施方式中,用于使活化的T细胞离体增殖和/或分离的方法包括:将T细胞群与本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段接触,从而增强活化的T细胞的增殖。

[0191] 某些实施方式中,用于使活化的T细胞离体增殖的方法包括给予本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段。某些实施方式中,由外周血单核细胞(PBMC)样品增殖和/或分离活化的T细胞。可以使用本领域已知的方法获得/分离PBMC。

[0192] 某些实施方式中,用于离体增殖和/或分离活化的T细胞的方法包括向培养基给予抗-CD3单克隆抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)。某些实施方式中,用于离体增殖和/或分离活化的T细胞的方法包括向培养基给予IL-2和/或IL-15(例如,以至少约10单位/ml的浓度)。

[0193] 某些实施方式中,用于分离抗原特异性活化的T细胞的方法包括:(a)在培养基中用IL-2和感兴趣表位的肽一起培养外周血单核细胞(PBMC);(b)通过添加感兴趣表位的肽在培养的细胞中诱导4-1BB表达;(c)将培养的细胞与涂覆有抗-4-1BB抗体或抗原结合片段的表面接触,其中表达4-1BB的培养的细胞附着于涂覆的表面;和(d)去除未连接的细胞,从而分离抗原特异性活化的T细胞。

[0194] 某些实施方式中,活化的T细胞为CD8⁺T细胞。

[0195] 某些实施方式中,以至少约25°C的温度培养淋巴细胞(例如,T细胞),优选至少约30°C,更优选约37°C。

[0196] 本公开认识到,通过本文所述方法生成的活化的T细胞(例如,CD8⁺T细胞)是治疗

上有用的(例如,用于癌症治疗)。

[0197] 基于细胞的疗法

[0198] 本文提供了选择性分离并大量培养识别自体癌症抗原(自身肿瘤抗原)的CD8⁺T细胞的方法,例如,在癌细胞中过表达但是在正常细胞中以低比例存在的自体癌症抗原。本文通过这些方法分离的细胞(例如,CD8⁺T),可以用于癌症治疗。

[0199] 某些实施方式中,用于治疗 and/或预防有此需要对象中癌症的方法包括向该对象给予治疗有效量的通过本文所述离体方法中任何一种产生的活化的T细胞。

[0200] 适当再活化后,肿瘤抗原特异性T细胞可以识别和消除自体肿瘤细胞。例如,肿瘤抗原特异性T细胞可以使用本文所述方法离体生成。过继转移后,癌症患者的特异性活化的T细胞可以有效地抵制体内自体人肿瘤。

[0201] 本公开提供了用于预防和/或治疗患者的癌症和/或肿瘤的方法,其包括给予治疗有效量的活化的T细胞,所述活化的T细胞通过给予本文抗-4-1BB抗体或抗原结合片段离体制备。

[0202] 某些实施方式中,用于治疗方法的T细胞与受体对象为同种异体的(来自相同物种但是不同的供体)。某些实施方式中,用于治疗方法的T细胞为自体同源的(供体和受体相同)。某些实施方式中,用于治疗方法的T细胞为同基因的(供体和受体不同,但是为同卵双生的(identical twins))。

[0203] 在一些实施方式中,细胞通过这样进行配置,首先将其由其培养基收获,然后清洗,并将细胞浓缩于适合以治疗有效量给予的培养基和容器系统(药学上可接受的摄运载体)。合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,通常是生理盐水、Normosol R(雅培公司(Abbott))或Plasma-Lyte A(巴克斯特(Baxter)),并且可以使用5%右旋糖水溶液或林格氏乳酸。该输注介质可以补充有人血清白蛋白。

[0204] 组合物中细胞的治疗有效量是至少 10^8 ,通常大于 10^8 ,至少 10^9 个细胞,并且一般大于 10^{10} 。细胞的数量将取决于该组合物预期的最终用途,其中包含的细胞类型也是如此。例如,如果需要对特定抗原具有特异性的细胞,那么该群体将包括大于70%,通常是大于80%、85%和90-95%的这样的细胞。对于本文所提供的用途,细胞通常为1升或更少的体积。某些实施方式中,用于给药的细胞为小于500ml、小于250ml或100ml或更少的体积。某些实施方式中,所需细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,并且常常大于 10^7 个细胞/ml,常常是 10^8 个细胞/ml或更大。可以将免疫细胞的临床相关数量分配成累积等于或超过 10^8 个细胞、 10^9 个细胞、 10^{10} 个细胞、 10^{11} 个细胞或 10^{12} 个细胞的多次输注。

[0205] 组合物

[0206] 本文提供包含特异性结合人4-1BB多肽表位的抗体和抗原结合片段的组合物。本文组合物(如递送抗-人4-1BB抗体或抗体片段的组合物)可包含任意合适且有效量的组合物用于将本文抗-人4-1BB抗体或抗体片段递送至需要该调节、处置或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。本文还提供包含本文所述方法(例如,包括细胞与抗-人4-1BB抗体或抗体片段接触这一步骤的方法)产生的活化的细胞群(例如,活化的T细胞群)的组合物。

[0207] 本文组合物包括药物组合物,其包括本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段和/或用本文方法所得细胞群。某些实施方式中,药物组合物可包含缓冲剂、稀释剂、赋形剂或以上所述的任意组合。某些实施方式中,如果需要,组合物还可含有一种或多种其他治疗活性

物质。

[0208] 某些实施方式中,本文抗-4-1BB抗体、抗原结合片段和/或细胞群适合给予哺乳动物(如人)。虽然有关本文所述药物组合物的描述主要涉及在伦理上适合给予人的药物组合物,但本领域技术人员应理解这类组合物通常适合给予所有种类的动物。为适合给予各种动物的人用药物组合物改造是众所周知,兽药领域普通技术人员仅通过常规实验(如果需要)即可设计和/或进行这种改变。

[0209] 某些实施方式中,提供的组合物配制成用于胃肠外给药。例如,本文所述药物组合物可以无菌注射形式(例如适合皮下注射或静脉输液的形式)提供。例如,某些实施方式中,药物组合物可以适合注射的液体形式提供。某些实施方式中,药物组合物以粉剂(如冻干和/或无菌粉剂)形式提供,可任选地将其置于真空条件下,这样的组合物可用水性稀释剂(如水、缓冲液、盐溶液等)在注射前重建。某些实施方式中,药物组合物在水、氯化钠溶液、乙酸钠溶液、苯甲醇溶液、磷酸盐缓冲盐溶液等中稀释和/或重建。某些实施方式中,可将粉剂与水性稀释剂温和混合(如避免摇振)。

[0210] 某些实施方式中,本文抗-4-1BB抗体、抗原结合片段和/或细胞群用药学上可接受的胃肠外载剂来配制。此类载剂的例子包括水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和1-10%人血清白蛋白。还可用脂质体和非水性载剂如非挥发油。载剂或冻干粉可含有维持等渗性的添加剂(例如氯化钠,甘露醇)和维持化学稳定性的添加剂(例如缓冲剂和防腐剂)。某些实施方式中,制剂用已知或合适的技术稳定化。

[0211] 本文所述药物组合物的制剂可通过药理学领域已知或此后开发的任何方法制备。通常,这些制备方法包括将活性成分与稀释剂或其他赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分混合的步骤,然后,如果必要和/或想要,将产物成形和/或包装成合适的单剂量单位或多剂量单位。

[0212] 某些实施方式中,包含本文抗-4-1BB抗体、抗原结合片段和/或细胞群的药物组合物可以包含在用于储存或给药的容器中,例如小瓶、注射器(例如IV注射器)或袋子(例如IV袋)。本文药物组合物可以单个单位剂量和/或多个单独单位剂量的形式大量制备、包装和/或出售。本文中,“单位剂量”是包含预定量活性成分的独立量的药物组合物。活性成分的量通常等于能给予对象的活性成分的剂量和/或是该剂量的适当分量(例如该剂量的一半或三分之一)。

[0213] 本文药物组合物中活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任意其他成分的相对量可根据受治对象个性特征(identity)、身量和/或病情而不同,还取决于所述组合物的给药途径。后文实例部分描述了对啮齿动物的示例性抗-人4-1BB抗体给药。本领域中已知如何在动物系统中调节剂量的标准方法。参见例如,J Basic Clin Pharm.2016年3月-2016年5月;7(2):27-31,本文通过援引将其全文纳入。例如,组合物可包含0.1%至100%(w/w)活性成分。

[0214] 某些实施方式中,组合物包含或递送剂量为0.01mg/kg至100mg/kg的本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段。某些实施方式中,组合物包含或递送抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段,其剂量在由下限和上限限定的范围内,上限大于下限。某些实施方式中,下限可以是约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、

30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg或90mg/kg。某些实施方式中,上限可以是约0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg。

[0215] 药物组合物可另外包含药学上可接受的赋形剂,本文中,所述赋形剂包括适合所需特定剂型的任一和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体载剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘结剂、润滑剂等。《雷明顿:药物科学和实践》(Remington's: The Science and Practice of Pharmacy),第21版,A.R.Gennaro(马里兰州巴尔的摩市的利平科特·威廉姆斯·威尔金斯(Lippincott Williams&Wilkins)公司)记载了用于配置药物组合物的各种赋形剂及所知的其制备技术。除非某常规赋形剂介质都与物质或其衍生物不相容,如产生不希望的生物作用或者与药物组合物的任意其他组分发生有害的相互作用,否则均被考虑在本文范围内使用。

[0216] 某些实施方式中,药学上可接受的赋形剂至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯。某些实施方式中,赋形剂获批用于人用和兽用。某些实施方式中,赋形剂得到美国食品药品监督管理局的批准。某些实施方式中,赋形剂是药用级别的。某些实施方式中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0217] 用于制备药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于:惰性稀释剂、分散剂和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、结合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油脂。药物制剂中可任选地包含这些赋形剂。赋形剂如可可脂和栓剂蜡、着色剂、涂布剂、甜味剂、风味剂和/或芳香剂可根据配制者的判断包含在组合物中。

[0218] 某些实施方式中,所提供的药物组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂(如防腐剂、惰性稀释剂、分散剂、表面活性剂和/或乳化剂、缓冲剂等)。某些实施方式中,药物组合物包含一种或多种防腐剂。某些实施方式中,药物组合物不含防腐剂。

[0219] 某些实施方式中,包含本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的组合物被稳定配制。某些实施方式中,本文抗-人4-1BB抗体或抗原结合片段的稳定制剂可包含:含有盐水或选定盐的磷酸盐缓冲液,以及含有防腐剂的保存溶液和制剂,以及适合药用或兽用的多用途的保存制剂。保存制剂含有水性稀释剂中的至少一种已知防腐剂或可任选地至少一种选自以下所述的防腐剂:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁(例如六水合物)、羟苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞,或它们的混合物。可采用本领域已知的任何合适的浓度或混合物,例如0.001-5%,或其间的任意范围或值,例如但不限于:0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9,或其间的任意范围或值。非限定性例子包括:无防腐剂,0.1-2%间甲酚(如0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%),0.1-3%苯甲醇(如0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%),0.001-0.5%硫柳汞(如0.005、0.01),0.001-2.0%苯酚(如0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%)、0.0005-1.0%羟苯甲酸烷基酯(如0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、

0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%)，等等。

[0220] 某些实施方式中，药物组合物以可冷藏和/或冷冻的形式提供。某些实施方式中，药物组合物以不可冷藏和/或冷冻的形式提供。某些实施方式中，重建的溶液和/或液体剂型可在重建后保存一段时间(如2小时、12小时、24小时、2天、5天、7天、10天、2周、一个月、两个月或更长)。某些实施方式中，抗体组合物保存超过指定的时间会导致抗体降解。

[0221] 液体剂型和/或重建溶液在给药前可能含有颗粒物和/或变色。某些实施方式中，如果发生变色或混浊和/或如果在过滤后仍有颗粒物，则该溶液不得使用。

[0222] 药物的制剂和/或制药中的总体考虑可见例如《雷明顿：药物科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)，第21版，利平科特·威廉姆斯·威尔金斯(Lippincott Williams&Wilkins)公司)，2005。

[0223] 试剂盒

[0224] 本文还提供药品套装或试剂盒，其中包含一个或多个容器，所述容器装有至少一种本文所述抗-人4-1BB抗体或抗体片段。试剂盒可用于各种适用的方法，这包括例如治疗方法、诊断方法、细胞增殖和/或分离方法等。这类容器任选附有药品或生物制品生产、使用或销售的政府管理机构规定的告知书，该告知书反映(a)已获批生产、使用或销售用于人体给药，(b)使用指南，或上述两者。

[0225] 某些实施方式中，试剂盒可包括一种或多种用于检测的试剂(例如，检测抗-人4-1BB抗体或抗体片段)。某些实施方式中，试剂盒可包括可检测形式(如共价结合可检测部分或物质)的抗-人4-1BB抗体或抗体片段。

[0226] 某些实施方式中，本文抗-人4-1BB抗体或抗体片段可包含在用于对象治疗的试剂盒中。某些实施方式中，本文抗-人4-1BB抗体或抗体片段可包含在用于T细胞(例如，CD8⁺T细胞)增殖和/或分离的试剂盒中。

[0227] 本申请中所有引用的文献(包括非专利文献、授权专利、专利申请公开和关联的未决专利申请)其内容在此明确通过援引纳入本申请。

[0228] 通过以下示例性实施方式的描述可看出本发明的其他特征。然而，提供以下实施例仅用于说明本发明，本发明的范围不限于以下实施例。

实施例

[0229] 本文的至少部分内容提供了特性改善的人源化抗-人4-1BB抗体和其片段，其包含不存在于参比人源化抗人4-1BB抗体94G1的一个或多个结构特征。94G1通过人源化小鼠抗人4-1BB抗体BBK-4抗体产生。使用CDR环分布(loop assignment)(IMGT;Lefranc,1997)和3-D模型(Swiss-Pdb Viewer(www.expasy.org))确定抗原识别位点(CDR区)。制备在总计10个位点中具有多样性的噬菌体展示文库，构建了包括轻链氨基酸序列上的4个位点和重链的6个位点。淘选后，从1,000个克隆选择大约14个人源化抗体克隆(针对总计6个人源化scFv)，并从选定的克隆中获得94G1(Son等J.Immunol.Methods(2004)286:187-201)。包括94G1在内的这些人源化抗体对人4-1BB抗原的亲和力小于对BBK-4的1/10，但是在体外具有活性。本文认识到，94G1的结构变体具有改善的特性。变体人源化抗-人4-1BB抗体及其片段的产生和表征在以下实施例中有进一步的详细说明。

[0230] 实施例1-制备人源化抗-人4-1BB抗体

[0231] 该实施例描述了产生具有相比参比94G1抗体亲和力改善的示例性抗-人4-1BB抗体。94G1通过对小鼠抗人4-1BB抗体(BBK 4)进行人源化产生,如Son等J.Immunol.Methods (2004) 286:187-201中所述,通过引用将其全部内容纳入本文。本文还使用的是H4-1BB抗原(登记号:KCTC 0952BP),其特异性地分离自活化的T细胞(例如,活化的T细胞系),并且尚未由未刺激的T细胞鉴定。例如,H4-1BB抗原可以分离自这样的T细胞,所述T细胞已经通过佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)、离子毒素、伴刀豆球蛋白A或抗CD3i而成熟,该H4-1BB抗原的大小为1.4kb,并且与小鼠4-1BB的同源性为60% (Garni-Wagner等,Cellular Immunology (1996) 169:91-98,通过引用将其全部内容纳入本文)。在该实施例中,94G1被分为轻链和重链载体,各自经优化以生成改善的人源化抗体。

[0232] 本文认识到,产生改善的人源化抗-人4-1BB抗体或其片段的合适方法是通过单一、逐步的氨基酸取代和/或其组合。本文提供了具有不存在于94G1抗体的一个或多个结构特征(例如,氨基酸取代)的人源化抗-人4-1BB抗体和其片段的各种结构变体。本文还认识到,可以合并结构特征用于逐步改善一个或多个抗体特性(例如,增加抗体亲和力)。

[0233] 首先,通过改变轻链而非重链的CDR区获得相对于94G1参比抗体亲和力增加的人源化抗-人4-1BB抗体。固定该轻链结构变体,并与在例如94G1的CDR区具有突的人源化抗-人4-1BB抗体重链结构变体合并。整合其他结构特征以产生具有高亲和力和/或其他改善的特征的人源化抗-人4-1BB抗体。

[0234] 1.1载体的构建

[0235] 通过改变Fab型中待表达的pComb3H-HA构建分别具有94G1轻链和94G1重链的载体以改善大肠杆菌中人源化抗体的重链和轻链(J.Immunol Methods (2008) 329 (1-2) :176-83;Virology (2004) 318:598)。具体地,将94G1轻链插入通过用flag标签(SEQ ID NO:43-DYKDDDDK)替换AP2标签(SEQ ID NO:42-NANNPDWDFNP)设计的载体,该flag标签被设计成将位于其下游,并且具有获自NCBI GenBank已知数据的人重链序列(登记号AB019438)作为恒定域置于重链位置中。此外,在将94G1轻链克隆到载体后,通过转化将其转移到大肠杆菌(例如,TG1) (F' [traD36 proAB+lacIqlacZ Δ M15] supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM) 5, (rK-mK-),然后筛选名为pCOM-Fab-94G1-L的转化的载体,所述转化的载体用作诱导轻链亲和力成熟的骨架(表1)。将上述方法相似地用于94G1重链,并且选择的载体称为pCOM-Fab-94G1-H。将改善的轻链94/w设计为pCOM-Fab-94G1的轻链,其作为骨架用于产生具有改善的亲和力的重链变体。

[0236] 表1-94G1和94/w LCDR氨基酸序列

SEQ ID NO.	氨基酸序列	CDR
SEQ ID NO: 1	QTISDY	LCDR 1
SEQ ID NO: 2	YAS	LCDR 2
SEQ ID NO: 3	QDGHSFPPT	LCDR 3
SEQ ID NO: 4	QDGHSWPPT	LCDR 3.6 变体 94/w

[0237] 1.2-人源化抗-人4-1BB抗体轻链的亲和力成熟

[0239] 本文所述的是开发具有这样轻链变体的人源化抗-人4-1BB抗体,所述轻链变体具有改善的结合亲和力。通过在如上所述的pCOM-Fab-94G1-L在中改变94G1轻链的LCDR3 (SEQ ID NO:3) 获得具有高亲和力的抗体。通过PCR使用引物[使用NNS (N:A,T,C,G;S:C,G)] 扩增编码轻链的各种DNA序列,所述引物设计成将19个不同的氨基酸插入9氨基酸SEQ ID NO:3的各氨基酸位置,组成94G1轻链的LCDR3部分。将扩增产物连接到载体的轻链,然后转化到大肠杆菌TG1中。以不同形式取代具有LCDR3轻链结构变体的所有克隆并将其收集以制备9个位置混合物(position mix)。为了评价各氨基酸位置是否被不同的氨基酸取代,随机选择各位置变化的两个克隆并使用ABI-3730x1测序仪通过测序分析,这显示出各位置的氨基酸残基在不同的位置被替换。

[0240] 为了研究在不同LCDR3位置具有突变的94G1Fab变体的抗体亲和力是否增强,通过向大肠杆菌TG1添加IPTG (至1mM的最终浓度) 表达各位置混合物,然后对存在于悬浮液中的Fab抗体进行ELISA。具体地,各位置混合物在2YT培养基中于37°C孵育器中振荡培养,直到培养物在600nm处具有0.8或更大的吸光度,然后在30°C下与IPTG (例如,以1mM的最终浓度) 一起过夜培养。第二天对获自4°C 12,000rpm离心10分钟的上清液进行ELISA。通过将各克隆相对于4-1BB Fab的结合活性除以各突变克隆的表达水平确定各种94G1 LCDR3变体Fab的结合亲和力。具有LCDR3位置6突变(LCDR3.6)的94G1 LCDR3变体显示出最强的结合亲和力。

[0241] 然后,为了确定LCDR3.6位置处94G1的各种突变如何影响抗体亲和力,由pCOM-Fab94G1-LCDR3.6位置混合物分离25个单克隆抗体并通过向大肠杆菌(例如TG1) 添加IPTG (例如,以1mM的最终浓度) 表达,进行培养,然后对存在于悬浮液中的Fab抗体进行ELISA。通过将各克隆的4-1BB Fab结合活性除以各自的表达水平确定各种94G1 LCDR3.6克隆的结合亲和力。

[0242] LCDR3.6位置苯丙氨酸被取代为色氨酸的94G1 LCDR3.6变体展现出最高的结合亲和力。通过在改善的94G1轻链上用骨架94G1的重链取代pCOM-Fab94G1-L的恒定重链制备的Fab抗体被称为94/w。因此,94/w变体包含94G1重链和改善的94G1轻链,其中LCDR3的第6个氨基酸被色氨酸(W) (QDGHSWPPT-SEQ ID NO:4) 取代。使用大肠杆菌中IPTG诱导的表达和94/w Fab的ELISA确定上述结合亲和力。使用该方法,确定94/w Fab抗体的结合活性比94G1 (Fab抗体) (数据未示出) 高3.5倍。

[0243] 1.3-人源化抗-人4-1BB抗体重链CDR的亲和力成熟

[0244] 本文所述的是开发具有这样重链结构变体的人源化抗-人4-1BB抗体,所述重链结构变体具有改善的结合亲和力。为了实现进一步改善抗-人4-1BB抗体,使用如上所述的94/w轻链,并使94G1重链亲和力成熟。下述表2中提供的是参比94G1抗体重链的HCDR氨基酸序列。

[0245] 表2-94G1和94K HCDR氨基酸序列

SEQ ID NO.	氨基酸序列	CDR
SEQ ID NO: 5	GYTFSSYW	HCDR 1
[0246] SEQ ID NO: 6	INPGNGHT	HCDR 2
SEQ ID NO: 7	ARSFTTARAFAY	HCDR 3
SEQ ID NO: 8	ARSFKTARAFAY	HCDR 3.5 变体 94K

[0247] 通过与上述94G1轻链所述相似的方法进行使用94/w作为起始序列改善重链。具体地,为了改善94G1重链,在HDR2和/或HCDR3的各氨基酸位置的氨基酸残基被各种氨基酸取代。在重链的第三CDR(HCDR3,SEQ ID NO:7)的情况中,将通过不同氨基酸随机取代94/w HCDR3氨基酸残基产生的克隆收集以制备12个位置混合物。还制备了HCDR3长度增加的突变克隆。当HCDR3的第5个氨基酸残基被不同的氨基酸取代时,观测到亲和力增加。然后,为了确定HCDR3.4位置处的各种突变如何影响94/w抗体的亲和力,由位置混合物分离19个单克隆抗体,其中94/w抗体的HCDR3.5位置被随机取代。通过添加IPTG(例如,至1mM的浓度)在大肠杆菌中表达HCDR3.5变体Fab,并使用存在于上清液中的抗体进行ELISA。测序鉴定出当HCDR3.5(第5个位子)位置(SEQ ID NO:8-ARSFKTARAFAY)处的苏氨酸被赖氨酸取代时,显示出最高的亲和力,并且产生的产物被称为94K/w。

[0248] 在重链的第二CDR(HCDR2)的情况中,通过随机取代94G1HCDR2(SEQ ID NO:6)的9个氨基酸中的每一个来制备位置混合物用于ELISA。ELISA结果显示,当第二、第五和第六位置的氨基酸残基改变时,亲和力增加。对于94/wHCDR2.2、HCDR2.5和HCDR2.6位置混合物中的每一个,分别分离22、19和36个单克隆抗体,并且根据Fab表达水平分析各克隆相对于4-1BB的结合亲和力。在HCDR2.5的情况中,ELISA值相对高于天冬酰胺被缬氨酸(V)、甘氨酸(G)或脯氨酸(P)取代的那些。此外,根据抗体重链的测序数据,在HCDR2(SEQ ID NO:6)的第5个氨基酸——天冬酰胺处存在脱氨基的风险,而变体HCDR2序列藉由在该残基处用谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)和丝氨酸(S)的取代制备。

[0249] 如上所述制备的在重链HCDR3和/或HDR2中具有突变的94G1结构变体的DNA通过PCR使用三碱基序列NNS扩增,连接具有94/w轻链恒定域的载体的重链位置,然后通过如上所述的改善轻链中所用方法转化到大肠杆菌TG1中。

[0250] 1.4优化人源化抗-人4-1BB抗体重链框架区

[0251] 还使用优化的框架序列产生重链变体。例如,产生重链框架1(FR1)区,其中重链FR1(SEQ ID NO:16)经修饰,从而使第5个氨基酸谷氨酰胺(Q)被缬氨酸(V)取代。下表3提供了示例性FR1区。

[0252] 表3-94G1重链FR1和其变化形式

SEQ ID NO.	氨基酸序列	
SEQ ID NO: 16	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	94G1 FR1
SEQ ID NO: 17	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	FR1 Gln 5Val

[0254] 此外,还制备了框架3(FR3)区,其中重链FR3(SEQ ID NO:18)经修饰,从而使小鼠序列的第10个氨基酸丙氨酸(A)和/或第33个氨基酸色氨酸(S)分别被缬氨酸(V)和苏氨酸

(T) 取代。下表4提供了示例性FR3区。

[0255] 表4-94G1重链FR3和其变化形式

SEQ ID NO.	氨基酸序列	
SEQ ID NO: 18	NYNEKFKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC	94G1 FR3
SEQ ID NO: 19	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC	FR3 Ala 10 Val
SEQ ID NO: 20	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYC	FR3 Ala 10 Val; FR3 Ser 33 Thr

[0257] 1.5人源化抗-人4-1BB可变区和全长抗体的制备

[0258] 产生这样的抗-人4-1BB抗体可变区,其包含上述重链和轻链CDR和框架区的各种组合。例如,这样产生Fab型94KVT/w抗体:重链CDR3的第5个氨基酸苏氨酸被赖氨酸(K)取代,而重链FR3的第10个氨基酸丙氨酸和重链FR3的第33个氨基酸丝氨酸分别被缬氨酸(V)和苏氨酸(T)取代,以产生分别是或包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:34的重链和轻链可变区序列。此外,产生94KVT重链变体,其中HCDR2(SEQ ID NO:6)的第5个氨基酸天冬酰胺(N)被谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)或丝氨酸(S)取代。下表5中提供了示例性重链和轻链可变域序列(CDR序列标有下划线)

[0259] 表5-示例性人源化抗-人4-1BB抗体可变域

[0260]

抗体	轻链可变域	重链可变域
94G1	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKY <u>AS</u> QSIGIPSRFSGS GSGTDFTFISSLEAEDAATYY CQDGHSFPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA <u>Y</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
94w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKY <u>AS</u> QSIGIPSRFSGS GSGTDFTFISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA <u>Y</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
94K/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKY <u>AS</u> QSIGIPSRFSGS GSGTDFTFISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFKTARAFA <u>Y</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 12)
94KV/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKY <u>AS</u> QSIGIPSRFSGS GSGTDFTFISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSEKTAARAFA <u>Y</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

[0261]	94KVT/w, EU101	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSIGIPSRFSGS GSGTDFTFITISSLEAEDAATYY <u>CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYC <u>CARSFKTARAFA</u> <u>YWGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 14)
--------	-------------------	---	--

[0262] 为了转化成全长抗-人4-1BB抗体(完整Ig型),将Fc结构域与相应的Fab连接。例如,94K/w Fab包含其中苏氨酸在HCDR3.5处被赖氨酸取代的重链和由94/w变体的轻链,所述94/w变体中LCDR3的第6个氨基酸被色氨酸(W)取代,并且延伸自CH2和CH3结构域的各区域和人IgG1的序列通过PCR扩增以重叠并进行剪接PCR以产生全长IgG DNA,然后将产生的DNA克隆到哺乳动物表达载体中。以相似的方式生产本文所述其他人源化抗-人4-1BB抗体的全长抗体。下表6提供了示例性免疫球蛋白恒定区序列。

[0263] 表6-示例性免疫球蛋白恒定域

	SEQ ID NO.	氨基酸序列	描述
	SEQ ID NO: 21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	κ 恒定域
[0264]	SEQ ID NO: 22	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1

[0265]	SEQ ID NO: 23 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 变体 (L234; L235; K322)
--------	--	-------------------------------------

[0266] 本文所用全长94KVT/w抗体包含IgG1序列,如SEQ ID NO:22所示。此外,产生在本文中称之为EU101的全长抗体,其包含上述94KVT/w可变域(SEQ ID NO:10和14分别为轻链和重链可变域),具有包含下述3个突变的变体IgG1恒定域:L234、L235和K322(SEQ ID NO:23)。因此,实施例提供了已经工程化以潜在地增强抗原结合亲和力的许多示例性人源化抗-人4-1BB抗体和抗体片段。这些示例性抗体和片段在下述实施例中表征。

[0267] 实施例2-人源化抗-人4-1BB抗体的表征

[0268] 2.1确定抗-人4-1BB抗体的结合表位

[0269] 本文认识到,即本文提供的人源化抗-人4-1BB抗体能够用于4-1BB共刺激。本文抗体的治疗性应用可以包括促进抗癌免疫力和/或抗病毒免疫力。然而,对于临床应用,重要的是鉴定人4-1BB的哪个部分被抗-人源化4-1BB抗体识别和/或与其反应(即,结合表位)。已经鉴定了识别4-1BB分子不同表位的4-1BB抗体,并且这些抗体已经显示出具有不同的临床效果(参见例如,Kwon等*Eur. J. Immunogenetics* (2002) 29:449-452,通过引用将其全部内容纳入本文)。表位作图(Epitope mapping)包括用于鉴定抗体-抗原识别的分子决定簇的方法。该实施例描述了对如上实施例1所示工程化的示例性抗-人4-1BB抗体进行表位作图。具体地,该实施例评估人源化抗人4-1BB抗体与94KVT/w可变域EU101的结合表位。

[0270] 用于研究人源化4-1BB抗体表位的人4-1BB抗原衍生自自由人外周血淋巴细胞制备的cDNA文库,所述人外周血淋巴细胞由至少一些本申请的发明人产生(参见例如,Kwon等*Cellular Immunology* (1996) 169:91-98; *Immunol. Lett.* (1995) 45:67-73; 和韩国专利号10-0500286,其各自通过引用纳入本文)。选择编码获得的4-1BB cDNA同源物(之后称之为H4-1BB)胞外域(ECD)的cDNA,与GST融合,然后插入载体(pGEX-6T)以表达。本文使用的产生GST-4-1BB融合多肽的细胞系作为韩国专利号10-0500286的公开部分保藏,访问号KCTC0952BP。人4-1BB的全长酸序列如下SEQ ID NO:44所示。人4-1BB胞外域对于全长H4-1BB序列的氨基酸1至167。

[0271] SEQ ID NO:44-全长人4-1BB序列

[0272] MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCK
GVFTRRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSV

LVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0273] 为了确定由本文人源化抗人4-1BB抗体识别的4-1BB表位,以各种大小的4-1BB胞外域片段(例如,R1、R2、R3)产生构建体,融合至GST,并复制。图1A显示了本实施例中所用GST-4-1BB多肽的示意图。而本文用于产生不同F-1BB胞外域构建体的示例性引物示于下述表7。单个重组GST-H-4-1BB构建体用1mM IPTG培养并在大肠杆菌BL21DX5 α 细胞中产生,并使用谷胱甘肽-琼脂糖柱纯化融合多肽。

[0274] 表7-用于产生能够用于表位作图的人4-1BB胞外域片段的示例性引物

	正向	反向
[0275]		
R1	5'-GGATCCACAAGATCATTGC AG-3' (SEQ ID NO. 24)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGA AAACA-3' (SEQ ID NO. 25)
R2	5'-CGCGTGGATCCAAGGAGTGTTC TCCA-3' (SEQ ID NO. 26)	5'-TTGAGCTCGAGACGTTTCTGAT CGTA-3' (SEQ ID NO. 27)
R3	5'-CGCGTGGATCCGGCATCTGTCGA CCCT-3' (SEQ ID NO. 28)	5'-TTGAGCTCGAGGATCTGCGGAG AGTGT-3' (SEQ ID NO. 29)
R1.1	5'-GGATCCACAAGATCATTGC AG-3' (SEQ ID NO. 30)	5'-CTCGAGGCATATGTCACA GGT-3' (SEQ ID NO. 31)
R1.2	5'-GGATCCACAAGATCATTGC AG-3' (SEQ ID NO. 32)	5'-CTCGAGGCTGGAGAAAC TAT-3' (SEQ ID NO. 33)
[0276]		
R1.3	5'-GGATCCTGCCAGCTGGT AC-3' (SEQ ID NO. 34)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGA AAACA-3' (SEQ ID NO. 35)
R1.4	5'-GGATCCAGGAATCAGATT TGC-3' (SEQ ID NO. 36)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGA AAACA-3' (SEQ ID NO. 37)
R1.5	5'-GGATCCACAAGATCATTGC AG-3' (SEQ ID NO. 38)	5'-CTCGAGGCAAATCTGATT CCT-3' (SEQ ID NO. 39)
R1.6	5'-GGATCCACAAGATCATTGC AG-3' (SEQ ID NO. 40)	5'-CTCGAGTGGAGGACAGGG ACT-3' (SEQ ID NO. 41)

[0277] 纯化的蛋白质样品通过裂解缓冲液(例如,10mM Tris-HCl-pH 7.4,50mM NaCl,5mM EDTA,30mM NaF,0.1mM Na₃VO₄,1%曲通X-100,0.5%Nonidet P-40,1mM PMSF和蛋白酶抑制剂混合物)获自转化的细菌细胞。在4X SDS样品缓冲液中稀释大约20 μ g的各融合多肽样品,在SDS-PAGE凝胶上进行电泳,然后转移到硝化纤维素膜(密理博公司(Millipore),马萨诸塞州贝德福德)。在硝化纤维素上,抗-人4-1BB mAb与抗-小鼠IgG辣根过氧化物酶(HRP)反应。通过化学发光(ECL)(法马西亚生物技术有限公司(Amersham Pharmacia Biotech),英国小查尔芬特)增强识别结合抗体。

[0278] 如上所示并如图1B所示,用GST-结合分解处理3个非重叠H4-1BB ECD片段-GST融合多肽R1、R2和R3中的每一个。通过western印迹确定本文所涵盖的示例性人源化抗-4-1BB抗体(EU101)结合大约32kDa的N-末端片段构建体(R1)融合构建体(4-1BB的氨基酸1至55)。此外,该结合是特异性的,因为R2或R3融合构建体并未观察到结合。参见图1B。

[0279] 此外,为了确定人源化抗-4-1BB抗体的最小结合位点,将R1胞外域进一步分成6个较小的片段:R1.1(4-1BB的氨基酸1至45)、R1.2(4-1BB的氨基酸1至35)、R1.3(4-1BB的氨基酸11至55)、R1.4(4-1BB的氨基酸21至55)、R1.5(4-1BB的氨基酸1至25)和R1.6(4-1BB的氨基酸1至30)多肽片段,如图A所示,并融合GST(谷胱甘肽S-转移酶,27kDa)。用于产生这些构建体的示例性引物如上表7所示。用IPTC诱导(例如,1mM IPTG)在大肠杆菌BL21细胞中产生融合多肽构建体,并且通过12%SDS-PAGE离析细菌全细胞提取物。如图2A所示,SDS-PAGE确认个别4-1BB融合多肽良好地表达。

[0280] 将SDS-PAGE转移到硝酸纤维素膜上,并使用示例性抗人4-1BB抗体EU101进行免疫印迹。如图2B所示,确认H4-1BB胞外域氨基酸10至30的序列对于结合示例性人源化抗-4-1BB抗体是重要的。该分析表明,本文示例性的抗-人4-1BB抗体(EU101)结合人4-1BB的表位,其序列是或包含CPAGTFCDNRRNQICSPCPP(SEQ ID NO:15)。同样确认包含4-1BB胞外域氨基酸35至50的序列对于结合本文示例性的人源化抗体是重要的(图2B)。

[0281] 2.2评估示例性人源化抗-人4-1BB抗体与4-1BB抗原的结合亲和力

[0282] 示例性抗-人4-1BB抗体的结合能力

[0283] 为了验证实施例1中所述示例性人源化抗-人4-1BB抗体与人4-1BB抗原(H4-1BB)的结合能力,进行ELISA。将大肠杆菌表达的重组人4-1BB用作抗原。

[0284] 将小鼠BBK-4抗体,参比94G1人源化抗体和实施例1中所述示例性工程化抗体94K、94KV、94KVT和EU101各自在用组氨酸标记的4-1BB胞外域重组蛋白(H4-1BB)涂覆的96孔板上处理。示例性ELISA亲和力分析采用1.0 μ g/ml浓度的100 μ l总体积,并在室温下进行反应1小时。适当地,以识别抗体的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗-人IgG和抗-mIgG-HRP处理,并在室温下进行反应40分钟。洗涤后,用ABTS溶液(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))处理,该溶液适用于使反应着色的底物,并且在室温下进行反应30分钟,并且使用ELISA读数器检测着色反应中450nm处的吸光度以分析抗体的结合活性。结果如图3所示。如图3所示,因为抗体浓度增加,各抗体和4-1BB抗原(H4-1BB)之间的结合改善。该数据证明本文涵盖的抗体特异性地结合4-1BB。

[0285] 示例性抗-人4-1BB抗体与细胞表达的抗原的结合

[0286] 评估细胞环境中示例性人源化抗-人4-1BB抗体结合人4-1BB抗原(H4-1BB)的能力。Jurkat 8-1细胞经遗传工程化用于过表达4-1BB。使用抗-mIgG-HRP或抗-hIgG-HRP二抗(适当时)评估实施例1中所述的示例性工程化抗体94K、94KV、94KVT和EU101以及小鼠BBK-4抗体和参比94G1人源化抗体各自对Jurkat 8-1细胞的结合,并通过FACS分析。如图4所示,各抗体能够有效地结合Jurkat 8-1细胞表达的4-1BB,并且94KVT和EU101的亲和力高于BBK-4和94G1。

[0287] 示例性抗-人4-1BB抗体与抗原的体外结合亲和力

[0288] 实施例1中所述示例性工程化抗体EU101以及参比94G1人源化抗体的体外结合亲和力各通过Biacore分析确定。将抗-人IgG固定在CM5芯片上并且通过流过芯片与上述制备

的Fab抗体偶联,并且最终与人4-1BB抗原(H4-1BB)反应以测量抗体和抗原之间的结合亲和力(Biacore3000,传感器芯片CM5)。亲和力测量结果如图5所示。 K_a (1/MS)和 K_d (1/s)值分别表示抗体与抗原结合和解离的速度。解离常数(K_D)通过用 K_d 除以 K_a ($K_d/K_a=K_D$)获得。

[0289] 当解离常数降低,可以解释为解离以较低浓度发生并且亲和力增加。如图5所示,示例性工程化抗-人4-1BB抗体相对于参比94G1的结合亲和力改善。

[0290] 示例性抗-人4-1BB抗体识别由活化的CD8⁺T细胞表达的4-1BB

[0291] CD8⁺T细胞分离自人PBMC并通过1 μ g/ml的抗-CD3抗体活化2天。评估实施例1中所述示例性人源化抗-人4-1BB抗体(94K、94KV、94KVT和EU101)相对于示例性可商购的抗-4-1BB抗体(4-1BB-PE)检测活化的CD8⁺T细胞表面上4-1BB的能力。还示出了用BBK-4检测小鼠抗-人4-1BB抗体和94G1参比人源化抗体。用4-1BB抗体处理的浓度为25ng/ml。

[0292] 适当地用抗-mIgG-DyLight488或抗体-hIgG-DyLight488检测示例性抗体,并通过FACS分析。结果如图6所示。虽然参比94G1抗体在17.93%的CD8⁺T细胞检测到4-1BB,但是94KVT和EU101抗体各自显示出分别为25.3%和28.33%的稳健检测。证明示例性抗体94KVT和EU101两者相对于BBK-4和94G1结合亲和力改善。因此,本文人源化变体抗体具有对体外活化的T细胞优异的结合。

[0293] 实施例3-人源化抗-人4-1BB抗体的体外效力分析

[0294] 先前已经证明抗-4-1BB抗体对活化的CD8⁺T细胞中表达的共刺激分子4-1BB提供信号刺激以活化CD8⁺T细胞,诱导增殖并增加T_H1型细胞因子表达。在该实施例中,检测实施例1所述人源化抗-4-1BB抗体诱导CD8⁺T细胞增殖和T_H1型细胞因子表达的活性。

[0295] 3.1示例性抗-人4-1BB抗体诱导CD8⁺T细胞的细胞增殖

[0296] 为了评估CD8⁺T细胞的增殖,用WST-1(水溶性四唑盐)对细胞进行染色,其是细胞增殖试剂。制备WST-1-标记的CD8⁺T细胞,并用0.5 μ g/ml的抗-CD3抗体激活。活化的CD8⁺T细胞经1.0 μ g/ml的异型(iso-type)对照抗体,小鼠BBK-4抗体,参比94G1抗体和实施例1中所述示例性人源化抗-人4-1BB抗体(94K、94KV、94KVT和EU101)处理。使用MACS系统分析细胞,并且结果示于图7中。根据图7,确认本文示例性抗-人4-1BB抗体诱导CD8⁺T细胞的细胞增殖。此外,CD8⁺T细胞活化的程度以94G1<94K/94KV<94KVT/EU101的顺序增加。

[0297] 3.2示例性抗-人4-1BB抗体刺激细胞因子分泌

[0298] IFN- γ 是T淋巴细胞和天然杀伤细胞(NK细胞)分泌的代表性细胞因子,并且表现出增殖和抗病毒活性。此外,IFN- γ 是巨噬细胞的主要激活剂,并且具体地,区分T_H1细胞与其他类型细胞的一种主要的细胞因子。IFN- γ 分泌在细胞毒性T细胞、吞噬细胞和B细胞活化中起主要作用。因此,可以用T_H1诱导的IFN- γ 增量评估抗癌剂的效力。为此,测定特定刺激的IFN- γ 分泌可能是可用作T细胞功能变化的定量指标的适宜标准。

[0299] CD8⁺T细胞分离自人PBMC并经0.5 μ g/ml的抗-CD3 mAb抗体处理,然后经无抗体或经1.0 μ g/ml抗-4-1BB抗体处理,所述1.0 μ g/ml抗-4-1BB抗体包括BBK-4、94G1、94K、94KV、94KVT和EU101。在第1、3和5天评价IFN γ 分泌。结果如图8所示。如图8所示,IFN γ 分泌在所有抗-4-1BB抗体处理的样品中增加,并且这一增加与抗体处理持续时间相关。在第5天,用94KVT和EU101抗体的处理达到比对照组高13倍的分泌水平。相应地,示例性人源化抗体94KVT和EU101两者可以比94G1参比抗体更高效地诱导IFN γ 分泌。

[0300] 3.3 IFN- γ 水平增加取决于用示例性抗-人4-1BB抗体处理活化的CD4⁺T细胞或

CD8⁺T细胞

[0301] 由3个健康供体收集血液,通过Ficoll-plaque梯度离心分离从中获得的PBMC,并将存在于PBMC中的活化的T细胞在RPMI-1640+2%FBS培养基中静置24小时。用附着铁珠的抗-CD4抗体或抗-CD8抗体处理静置的PBMC,并使用MACS磁性分离器分离CD4⁺细胞或CD8⁺细胞。用T细胞激活剂抗-CD3处理分离的CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞以诱导4-1BB表达,并用不同浓度(0.5、1.0、2.5和5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的EU101处理3天。3天后,获得排除细胞的培养基,并通过ELISA(ebioscience公司)评估培养基中人IFN- γ 的荧光,并将结果与IFN- γ ELISA试剂盒中提供的标准曲线比较(图9)。

[0302] 如图9所示,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞中IFN- γ 的表达水平剂量依赖性地增加。具体地,当以5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的EU101处理时,相较于CD4⁺T中增加278%,CD8⁺T细胞中IFN- γ 的表达水平增加612%。根据涉及转化T细胞为T_H1的IFN- γ 的T细胞特异性表达模式,本文的示例性抗人4-1BB抗体EU101具有足够的体外活性以表明它可有效用于预防和/或治疗癌症。

[0303] 3.4测量示例性抗-人4-1BB抗体的ADCC和CDC活性

[0304] 免疫系统识别并攻击病毒感染的细胞或癌细胞,并且抗体可用于诱导细胞毒性介导的细胞凋亡。对于这种免疫系统,可以使用两种类型的机制,如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在两种情况中,细胞凋亡可以通过与细胞表面上的靶标结合的抗体介导。也就是当抗体具有ADCC活性时,通过抗体识别的细胞导致由天然杀伤(NK)细胞介导的细胞凋亡,并且当抗体具有CDC活性时,杀伤由补体蛋白介导。因此,在开发拮抗性抗体治疗剂的情况下,可以通过分析ADCC和CDC活性来鉴定抗体识别杀伤细胞的程度。然而,本公开中公开的人源化4-1BB抗体的靶标是T细胞,而非癌细胞。也就是考虑到通过结合4-1BB抗体作为激动性抗体诱导T细胞活化的机制,可能优选不具有ADCC和CDC活性的抗体用于治疗用途。

[0305] 在本公开中,对于ADCC试验,通过Ficoll离心使用相同的密度差分离人PBMC。PBMC孵育于RPMI(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))和10%FBS与IL-2(100U/ml)用于过夜培养。收获靶细胞(表达4-1BB的细胞系),以1ml重悬于培养基中,并用5 μM CFSE在37 $^{\circ}\text{C}$ 下标记5分钟。将本公开的效应物/靶细胞以10:1的比例洗涤,进行计数,然后分配。对于分析,制备本公开的抗体,最终浓度为10nM(1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$),并在平板上以37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4小时。向各孔添加5 μl 的7-AAD,并转移至FACS管,然后通过BDFACScan制造的FACS分析样品。测量无活力靶细胞(CFSE⁺7-AAD⁺)活力靶细胞(CFSE⁺7-AAD⁻)的频率。用总细胞的活细胞频率评估ADCC(图10A)。

[0306] 使用FACS作为读出值,与上述ADCC试验相似地进行补体依赖性细胞毒性(CDC)试验,并将上述靶细胞与抗-4-1BB抗体在冰上孵育30分钟,然后于37 $^{\circ}\text{C}$ 添加终浓度为20%的人补充的血清30分钟。然后,将得到的样品各自转移到FACS管中,并通过BDFACScan制造的FACS评估(图10B)。图10A和图10B中的结果证实,示例性人源化4-1BB抗体EU101几乎没有ADCC和CDC效应。因此,可以说本公开的示例性EU101抗体对于激动剂抗体具有有益的ADCC和CDC特性,并且是体内抗癌治疗的良好候选者。

[0307] 实施例4-示例性人源化抗-人4-1BB抗体体内效力的确认

[0308] 本公开的抗-人4-1BB抗体EU101在体外实施例中显示出剂量依赖性效应,并且显示出对常规抗体相当优异的效果。本实施例检查抗人-4-1BB抗体EU101是否能够单独使用

或与不同组合物一起使用以诊断、预防或治疗体内癌症或肿瘤,并有效抑制肿瘤生长。

[0309] 4.1人外周血单核细胞的NOD-scid IL2R $\gamma^{\text{无}}$ 小鼠移植和抗-人4-1BB抗体的抗肿瘤活性

[0310] 用肝素处理收集自HLA-A24型健康供体的外周静脉血,并在Ficoll-paque (GE医疗 (GE Healthcare),新泽西州皮斯卡塔韦)上进行浓度梯度离心以收获PBMC。用RPMI-1640培养基洗涤PBMC,并将 3×10^6 的细胞经腹膜内注射到免疫缺陷型小鼠,即NSG小鼠 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ;NOD-scid IL2r $\gamma^{\text{无}}$,杰克逊实验室公司 (Jackson Laboratory))。

[0311] 通过流式细胞术对人源化小鼠进行分析以检查人PBMC移植5周后通过小鼠眼眶血液采集收集的小鼠血液中是否存在人T细胞。7周龄的NSG小鼠 (杰克逊实验室公司,缅因州巴港)饲养在无特异病原体 (SPF) 环境下。

[0312] 用人血细胞标记物如APC-cy7荧光标记的CD45抗体和FITC荧光标记的CD4抗体和BV510荧光标记的CD8抗体染色细胞后,进行流式细胞术以检查CD4和CD8的比例。在由各小鼠收集眼眶血液后,观察来自小鼠血液样品的人T细胞以检查人免疫系统是否移植到小鼠中。在HLA型人源化小鼠模型中制备人肿瘤细胞,并将 1×10^7 个细胞皮下注射到各小鼠的背部。当肿瘤大小达到 $100-200\text{mm}^3$,静脉内给予示例性抗人4-1BB抗体 (EU101) 的制剂,以每1kg体重1.0mg、5.0mg或10.0mg,每5天一次,共3次。作为对照,使用人IgG。每3天测量各小鼠的肿瘤体积 (mm^3) (图11)。图11所示结果证实,相对于用人IgG处理的小鼠,用示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 处理的小鼠中的肿瘤大小减少,而且该减少与抗体浓度成比例。具体地,给予5mg/kg抗体的组中的肿瘤消退迅速发生。以5mg/kg剂量给药后一周内,肿瘤大小在人源化小鼠中下降并且肿瘤生长被根除。因此,本公开的示例性抗体EU101显示出体内抗癌作用。

[0313] 因此,上述结果证明,示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 特异性地识别H4-1BB的表位 (SEQ ID NO:15),但是由于该示例性抗体改善的特征,例如改善的亲合力,该抗体在体内小鼠模型中显示出优异的效果。因此,该实施例表明本公开内容所涵盖的抗体可以比参考抗体更低的剂量用作抗癌剂。

[0314] 4.2用示例性抗-人4-1BB抗体和抗-PD-1试剂抑制肿瘤生长的效果

[0315] 比较肿瘤注射到人源化小鼠后示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 和示例性抗-PD-1试剂单独处理所引起的效果

[0316] 通过与上文实施例4.1中所述相同的方法制备人源化小鼠。为了根据示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 和示例性抗-PD-1试剂 (Keytruda) (购自MSD公司,德国)的剂量进行确认抗癌效果增加的实验,将 1×10^7 个细胞的HLA-A型匹配的人结肠直肠癌细胞系HT29皮下注射到先前制备的人源化小鼠中。当注射的肿瘤体积达到 $100-150\text{mm}^3$ 时,将小鼠分成总共5组,每组3只小鼠,并比较EU101对肿瘤抑制的作用,各组小鼠用五次三种给药处理条件 (对照: IgG, 治疗组1: 5mg/kg, 和治疗组2: 10mg/kg) 的每种处理,间隔5天,53次,并且对抗-PD-1进行相同的操作 (图12)。实验结果是在EU101和keytruda (抗-PD1) 的两种情况下,肿瘤体积剂量依赖性地降低。但是,在图12中,5mg/kg的EU101对肿瘤生长没有影响,但是根据5mg/kg和10mg/kg的EU101的处理,抗肿瘤活性呈剂量依赖性。此外,确认EU101在比keytruda (抗-PD-1) 低的剂量下展现出更高的效率,并且特别是通过用5mg/kg的EU101处理完全阻断肿瘤

生长。

[0317] 肿瘤注射后用EU101和抗PD-1试剂的组合治疗人源化小鼠

[0318] 由于共抑制受体 (PD-1和CTLA-4) 信号和共刺激 (CD137) T细胞信号出于抑制肿瘤生长的相同目的分化, 因此两种受体的刺激可以产生协同效应 (Chen等, Cancer Immunol. Res. (2015) 3:149-160; Bartkowiak等, Front. Oncol. (2015) 5:117, 两者通过引用纳入本文)。此外, PD1免疫疗法显示出对一些癌症患者群体具有抗癌治疗效果的可能性, 但是在更广泛的患者群体中仍然可能需要在与不同抗癌剂的联合疗法中给予低剂量。为了研究由示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 和示例性抗PD-1试剂 (Keytruda) 联合疗法所引起的抗肿瘤效果, 用EU101和Keytruda的联合疗法处理携带肿瘤的人源化小鼠。通过与实施例4.1中所述相同的方法制备人源化小鼠。

[0319] 进行眼出血以鉴定人源化小鼠。人源化小鼠中, 将结肠癌HT29皮下注射到HLA-A24小鼠中, 维持正常状态 1×10^7 细胞/小鼠。当肿瘤大小为 $300-450 \text{mm}^3$, 如下进行实验。

[0320] 由该实施例可知, 虽然肿瘤生长在最低浓度或更低浓度的单独注射下没有延迟 (EU101: 2.5mg/kg , Keytruda (由德国的MSD公司制造): 2.5mg/kg), 但是肿瘤通过EU101和Keytruda的联合治疗大大消退。该结果表明, 本文所提供的示例性抗-人4-1BB抗体 (例如EU101) 是用于与不同抗癌剂进行联合治疗的良好候选物, 抗癌剂包括与一种或多种免疫检查点抑制剂组合 (图13)。

[0321] 在示例性抗-人4-1BB抗体和示例性抗PD-1试剂的单独和联合处理后, 正常组织和人结肠直肠腺癌组织中T细胞浸润淋巴细胞 (TIL) 的分析

[0322] 在向HT29植入的人源化小鼠单独给予示例性抗-人4-1BB抗体 (EU101) 和示例性抗-PD-1试剂 (Keytruda) (购自德国MSD公司) 以及联合给予EU101和Keytruda后, 在效果分析终止的那天, 将所有组解剖以分离肿瘤和血液。在 37°C 用胶原酶IV处理分离的肿瘤30分钟后, 将肿瘤组织中的细胞通过机械方法分离, 然后用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤。通过Ficoll梯度离心将PBMC与分离的血液分离, 并对分离的肿瘤细胞和PBMC进行下述实验。使用RBC裂解缓冲液从洗涤的细胞中除去红细胞 (RBC), 然后用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤。使用 $40\text{-}\mu\text{m}$ 尼龙细胞过滤器将洗涤的细胞中缠结的细胞碎片去除以生成单细胞状态, 并用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤单细胞, 然后使用细胞计数器对由各组分离的T细胞进行计数。

[0323] 用人血细胞标志物如CD45抗体 (荧光APC-cy7标记的)、荧光FITC标记的人CD4抗体和荧光BV510标记的人CD8抗体对分离的T细胞进行染色, 然后进行FACS分析。基于CD4和CD8细胞组的比率 (%) 进行FACS测定, CD4和CD8细胞组门选自CD45组 (图14A)。

[0324] 具体地, 为了在分离的T细胞中鉴定Treg组, 用人血细胞标志物如CD45抗体 (荧光APC-cy7标记的)、人荧光FITC标记的CD4抗体和人荧光PE对细胞表面进行染色, 并且使用使用Foxp3/转录因子染色缓冲液套装 (ebioscience公司) 以细胞转录因子Foxp3 (人荧光APC标记的Foxp3抗体) 进行细胞内和核内染色。在FACS试验中, 分离CD45组从而门选R1, 分离 $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{高}}$ 组从而门选R2, 并在R1和R2组中测量Foxp3^高组的比例 (%)。为了在分离的细胞中鉴定 $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T细胞, 细胞表面用血细胞标志物染色, 如荧光APC-cy7标记的人CD45抗体和荧光BV510标记的人CD8抗体, 用2% PFA固定, 并与0.5% 皂苷溶液和荧光PE-cy7标记的人 $\text{IFN-}\gamma$ 抗体反应。然后, 通过FACS试验测量CD8T细胞组中的细胞因子 $\text{IFN-}\gamma^+$ 细胞。通过与上述相同的方法鉴定细胞比例, 并计算 $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ 比例与Treg比例的比例, 如图14B所示。

[0325] 根据该实施方式的结果,除了单独给予外,EU101和Keytruda的联合给予极大地增加了肿瘤组织和T淋巴细胞组合的浸润。联合处理更加具体的结果如下所述。当对作为对照的健康人源化小鼠的PBMC进行联合处理时,淋巴细胞的数量增加大约3倍,并且肿瘤组织中每1g肿瘤的浸润淋巴细胞增加76倍。这意味着大多数肿瘤特异性淋巴细胞被激活并募集到肿瘤组织以杀死靶细胞。具体地,当测量联合治疗组中的PBMC时,如图14A所示,CD4⁺T细胞并不高度增加,但细胞毒性CD8⁺T细胞增加大约5倍。此外,联合治疗组的每1g肿瘤组织的CD8⁺T细胞计数中显示出100倍的增加。此外,因此,分泌IFN- γ 和调节性T细胞的CD8⁺T细胞的比例也大大增加(图14B)。也就是说,可以说EU101和抗PD-1试剂的联合处理使效应T细胞急剧增加,并且因此有效地进行肿瘤抑制。

[0326] 在示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)和示例性抗PD-1试剂(Keytruda)的单独和联合处理后,获自人结肠直肠癌组织中血清或肿瘤液的IFN- γ 分析

[0327] 单独给予或联合给予示例性抗-人4-1BB抗体(EU101)和示例性抗-PD-1试剂(Keytruda)至植入HT29的人源化小鼠。在效果分析终止的那天,解剖所有组以分离肿瘤和血液。在解剖肿瘤以分离存在于分离的肿瘤中的肿瘤液中,使用1cc注射器将300 μ l的1x PBS注射到肿瘤膜的上部,并且使用胰岛素注射器从肿瘤膜下部取出流动的溶液。此外,在肿瘤组织的解离中,添加取出的溶液以解离肿瘤组织,然后储存。此外,对于血清,通过Ficoll梯度离心从血液中分离PBMC时储存血清。使用0.22 μ m过滤器单元(制造商:康宁公司(corning))溶解并过滤储存的血清和肿瘤液。各使用10 μ l血清,并使用人IFN- γ ELISA Ready-SET-Go试剂盒(eBioscience公司)和人TGF β 1 ELISA Ready-SET-Go试剂盒(eBioscience公司)将100 μ l的肿瘤液用于测量人IFN- γ 和人TGF- β 。通过比较各ELISA试剂盒中提供的标准曲线分析结果。

[0328] 因此,相较于单独给予EU101和Keytruda,在联合给药中,肿瘤组血清中干扰素的浓度最高。因为EU101机制可用IFN- γ 与抗肿瘤作用之间的关系解释,评估健康供体血清和已应用联合治疗的肿瘤组血清中的IFN- γ 和TGF- β 表达水平。根据对于健康供体血清的实施例的材料,在图15A中所示联合治疗组中,IFN- γ 增加大约16倍,但从Treg细胞分泌的细胞因子TGF- β 减少约65%。此外,在图15B中,肿瘤液中由于联合给药而引起的IFN- γ 浓度显著地高于对照组(约213倍)。特别地,由于EU101,实例相较于对照组的结果表明联合组显示出IFN- γ 分泌的急剧增加。因此,可以确认的是,由本公开改善的抗人源化4-1BB抗体所引起的抗癌作用给予与癌细胞凋亡直接相关的效应T细胞有效的肿瘤浸润,以及相较于未处理组在肿瘤组织显著的特异性作用。换言之,在本公开中,确认EU101作为抗癌剂具有对癌细胞凋亡最佳的条件。通常,在癌症患者中,抗癌细胞因子和抗癌细胞免疫力被显著降低,但是在本公开中可以预期的是EU101诱导抗癌细胞因子和抗癌细胞免疫力增加,导致显著的治疗效果。

[0329] 因此,示例性抗-人4-1BB抗体EU101表现出由IFN- γ 的高表达介导的抗肿瘤作用,并且这种作用是剂量依赖性地展现,因此癌症患者血清中的IFN- γ 浓度可以用作诊断和估计肿瘤的生物标志物。因此,根据通过EU101和抗-PD-1的联合治疗实现的癌症或肿瘤的有效治疗以及通过测量IFN- γ 浓度显示的预后,期望对每个患者进行更有效的治疗。

[0330] 实施例5-使用示例性人源化抗-人4-1BB抗体离体分离和大量扩增4-1BB⁺CD8⁺T细胞

[0331] 在使用抗4-1BB抗体分离和纯化对各种抗原具有特异性的4-1BB⁺CD8⁺T细胞中,本发明人在抗原特异性激活的CD8⁺T细胞中使用4-1BB表达(韩国专利号10-1503341)。进行后续实验以检验本文所开发的EU101抗体是否也用于分离和大量扩增抗原特异性CD8⁺T细胞。

[0332] 如实施例4.1中所述,由癌症患者外周血构建PBMC。然而,在该实施例中,癌抗原特异性未分化T细胞可通过本发明人提交的韩国专利申请号10-2016-0165224中所述方法获得。在该实施例中,为了有效分离4-1BB⁺CD8⁺T细胞并大规模生产具有高纯度的4-1BB⁺CD8⁺T细胞,使用利用抗-人4-1BB抗体(EU101)的淘选方法。将PBS中稀释的10 μ g/ml抗-人4-1BB抗体(EU101)抗体添加到10ml的烧瓶中,然后在4 $^{\circ}$ C下储存20-24小时。存储后,去除含有抗体的上清液,不进行洗涤,将以2.5%溶解于PBS中的BSA溶液添加到10ml烧瓶中的细胞沉淀,然后在4 $^{\circ}$ C下储存20-24小时。然后,去除BSA溶液,各烧瓶用15ml的PBS洗涤两次。将先前制备的细胞悬浮于X-VIVO 10培养基中,添加到EU101抗体涂覆的烧瓶中,然后在CO₂培养箱中以37 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育后,去除上清液,用10ml的RPMI1640培养基洗涤细胞沉淀两次以去除非特异性结合的细胞。将1%自身血清和1000IU/ml含IL-2的X-VIVO 10培养基添加到烧瓶中,然后培养14天。在该实施例中,收获一些细胞,然后染色以测量分离细胞的纯度和表型。如图16A和16B所示,确认在用94kvt抗体淘选之前,抗原特异性4-1BB⁺CD8⁺T细胞的比例增加43.2%(CD8⁺T细胞比率:58.6%),并且在用EU101抗体淘选之后,抗原特异性pCMV⁺CD8⁺T细胞比例增加60.0%(CD8⁺T细胞比例:79.3%)。这意味着可以使用EU101以高纯度分离抗原特异性4-1BB⁺CD8⁺T细胞。如上所述分离的抗原特异性4-1BB⁺CD8⁺T细胞可以通过本发明人提交的韩国专利申请号10-2016-0165224中所述方法容易地大规模生产。

[0333] 基于上述说明,本领域普通技术人员将理解的是在不改变本发明的技术理念或本质特征的情况下,可以不同的具体形式实现本发明。然而,并非旨在将本发明限制于特定的示范性实施例,并且应当理解是由所附权利要求及其等同物的含义和范围所推导出的所有修改或修改形式都包括在本公开的范围,而非详述的说明书。

[0334] 本公开所涵盖的抗-人4-1BB抗体显示出许多有益的特性,例如,对参比抗体优异的亲和力,和/或可单独使用或与另一种抗癌剂组合使用以诊断、预防或治疗癌症或肿瘤,或用于抑制癌症的生长。

[0335] 以上,已经参照实施例描述了本发明,但是本领域普通技术人员可以理解是在不背离所附权利要求中所述的本发明的精神和范围的情况下,可以各种形式改变和修改本发明。

[0336] 等同形式

[0337] 本领域技术人员将会明白,或者仅需常规试验即可确定本文所述本发明具体实施方式的众多等同形式。本发明的范围不限于以上描述,而是如权利要求中所述。

序列表

- <110> 优特力克斯有限公司 (EUTILEX CO., LTD.)
 <120> 抗-人4-1BB抗体及其应用
 <130> FE18042W0
 <140> PCT/IB2018/000043
 <141> 2018-01-05
 <150> 62/443,281
 <151> 2017-01-06
 <160> 44
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 1
 [0001] Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 2
 Tyr Ala Ser
 1
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽
 <400> 3
 Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 4
 Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 5
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
 1 5

[0002]

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 6
 Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 7
 Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 8

Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 9

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

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

[0003] Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 10

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

[0004]

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成的多肽

 <400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 12

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

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

[0005]

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

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

Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 13

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

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

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

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

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

[0006]

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

Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 14

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr 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 Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

[0007] <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser
1 5 10 15

Pro Cys Pro Pro
20

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 16

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 17

<211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 18
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 18
 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

[0008]

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 19
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 19
 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 20
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 20
 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

[0009] <400> 21
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 22
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

 <400> 22
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 [0010] 85 90 95

 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

	195		200		205														
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly			
	210						215					220							
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu			
	225					230					235					240			
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr			
				245						250					255				
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn			
				260					265					270					
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe			
			275					280					285						
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn			
	290						295					300							
[0011]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr			
	305					310					315					320			
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
				325						330									
	<210>	23																	
	<211>	330																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<220>																		
	<223>	人工序列的描述:	合成的多肽																
	<400>	23																	
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys			
	1			5					10						15				
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr			
				20					25					30					
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser			
			35					40				45							

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

[0012]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的引物

<400> 24

ggatccacaa gatcattgca g

21

[0013]

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的引物

<400> 25

ttgagctcga gcctggctct gaaaaca

27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的引物

<400> 26

cgcgtggatc caaggagtgt tctcca

27

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	27	
		ttgagctcga gacgtttctg atcgta	27
	<210>	28	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	28	
		cgcgaggatc cgcatctgt cgaccct	27
	<210>	29	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0014]	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	29	
		ttgagctcga ggatctgcgg agagtgt	27
	<210>	30	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	30	
		ggatccaca gatcattgca g	21
	<210>	31	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	31	
		ctcgaggcat atgtcacagg t	21

	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 32	
	ggatccacaa gatcattgca g	21
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 33	
	ctcgaggctg gagaaactat	20
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0015]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 34	
	ggatcctgcc cagctggtac	20
	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 35	
	ttgagctcga gcctggtcct gaaaaca	27
	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成的引物	

	<400> 36 ggatccagga atcagatttg c	21
	<210> 37 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 37 ttgagctcga gcctggctcct gaaaaca	27
	<210> 38 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 38 ggatccacaa gatcattgca g	21
[0016]	<210> 39 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 39 ctcgaggcaa atctgattcc t	21
	<210> 40 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的描述: 合成的引物	
	<400> 40 ggatccacaa gatcattgca g	21
	<210> 41 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的引物	
	<400>	41	
		ctcgagtgga ggacagggac t	21
	<210>	42	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的肽	
	<400>	42	
		Asn Ala Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro	
		1 5 10	
	<210>	43	
	<211>	8	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
[0017]	<220>		
	<223>	人工序列的描述：合成的肽	
	<400>	43	
		Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
		1 5	
	<210>	44	
	<211>	255	
	<212>	PRT	
	<213>	智人 (Homo sapiens)	
	<400>	44	
		Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu	
		1 5 10 15	
		Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro	
		20 25 30	
		Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys	
		35 40 45	
		Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile	
		50 55 60	

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

[0018]

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

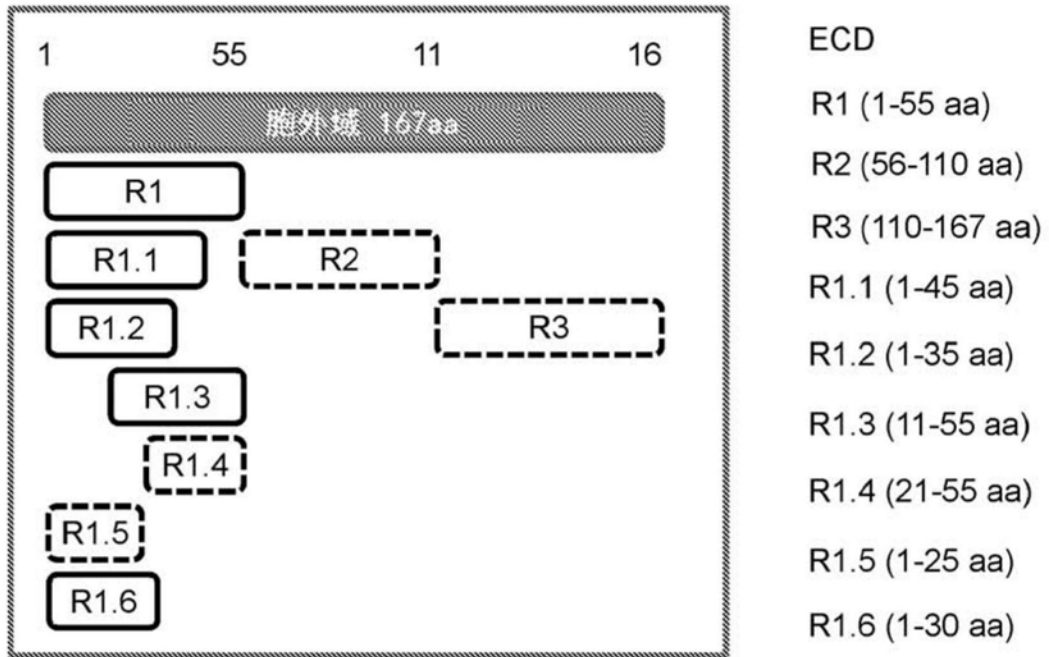


图1A

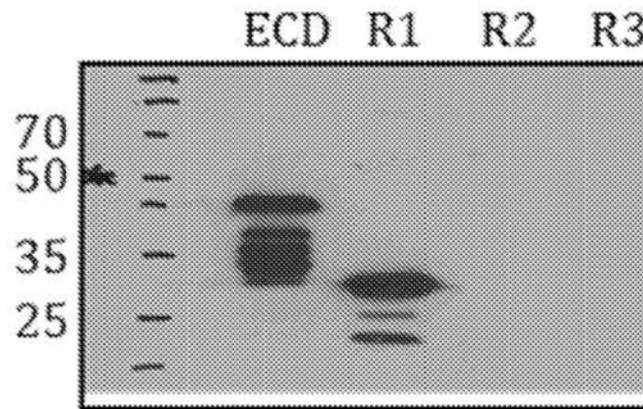


图1B

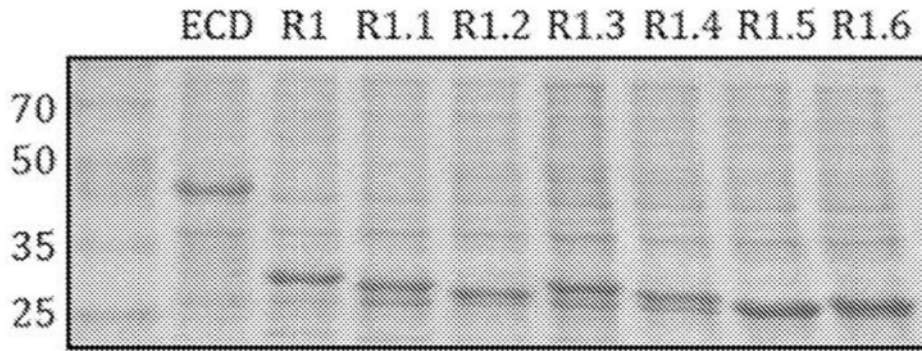


图2A

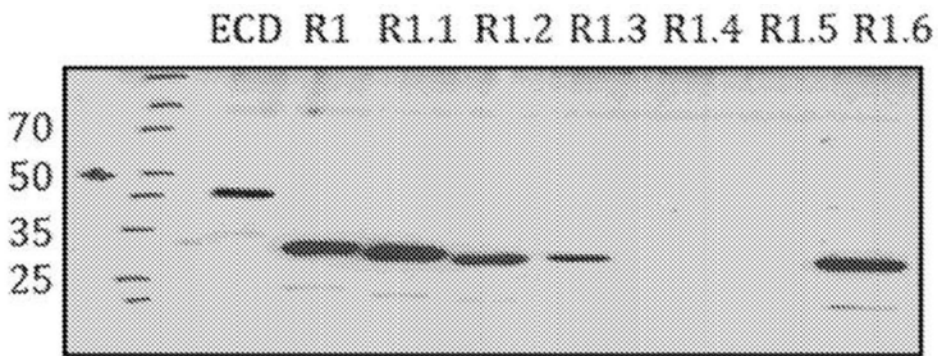


图2B

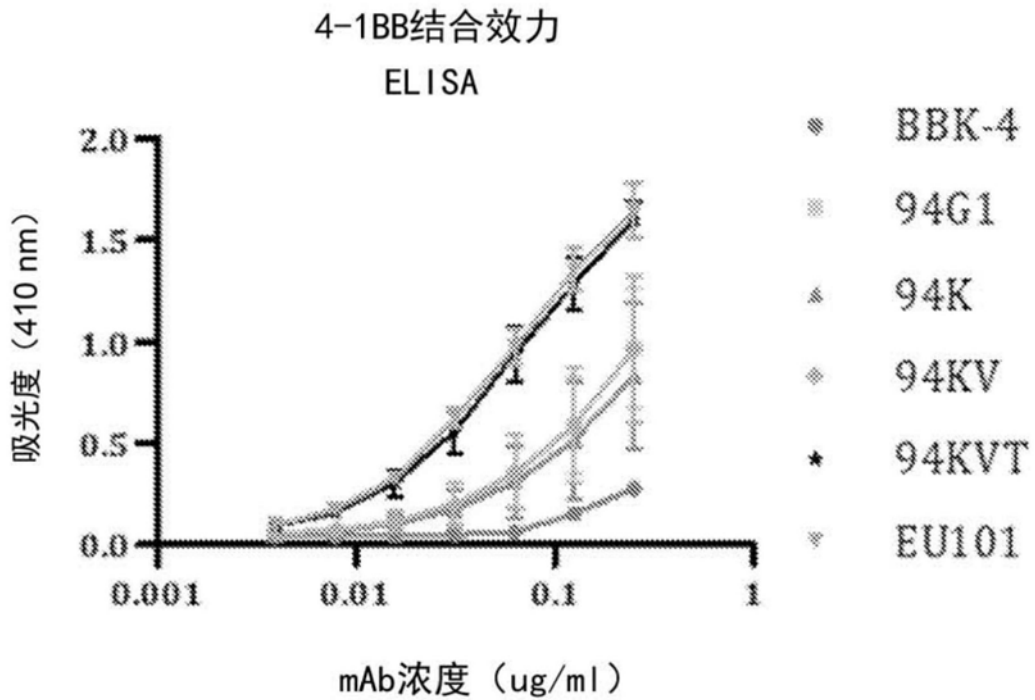


图3

对Jurkat 8-1上4-1BB的结合效力

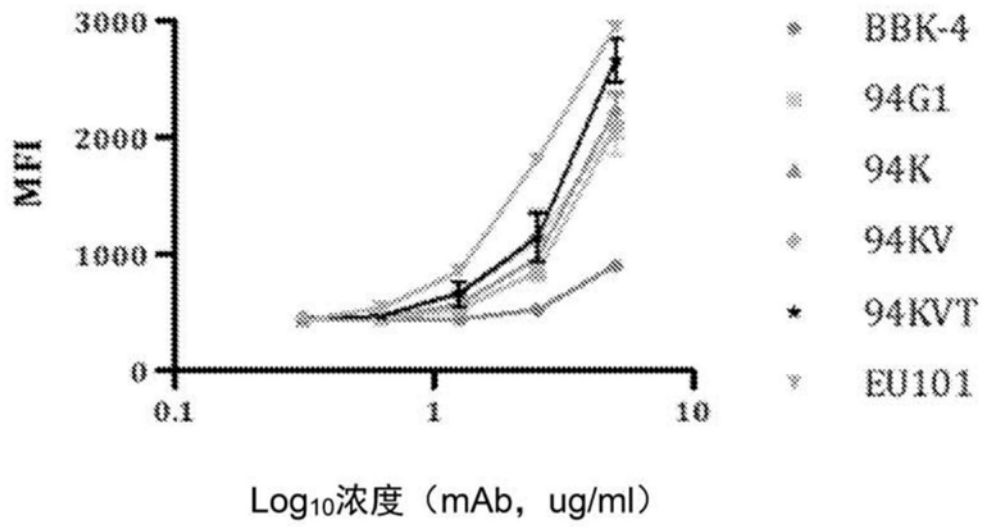
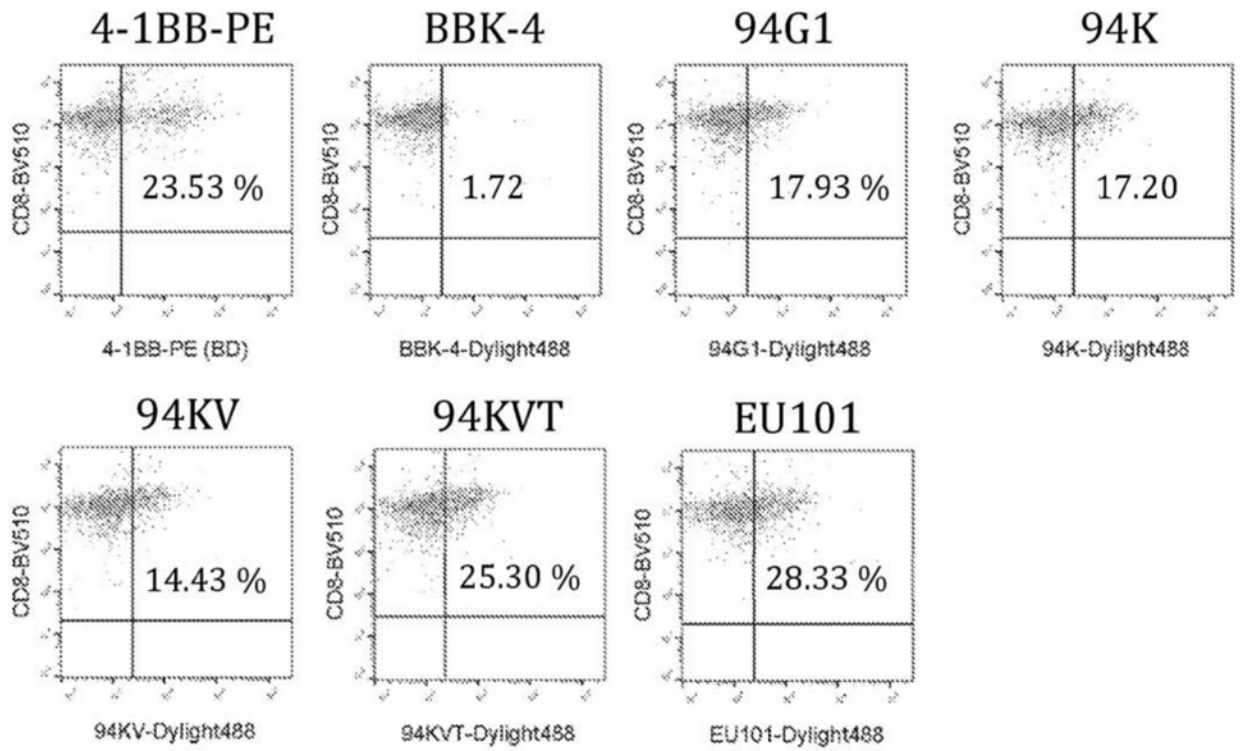


图4

抗体	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	$K_D (M)$
EU101	1.57e10	1.8e-5	6.36e-11
94G1	1.66e9	1.18e-4	6.02e-10

图5



CD8⁺ T细胞中4-1BB抗体的结合效力

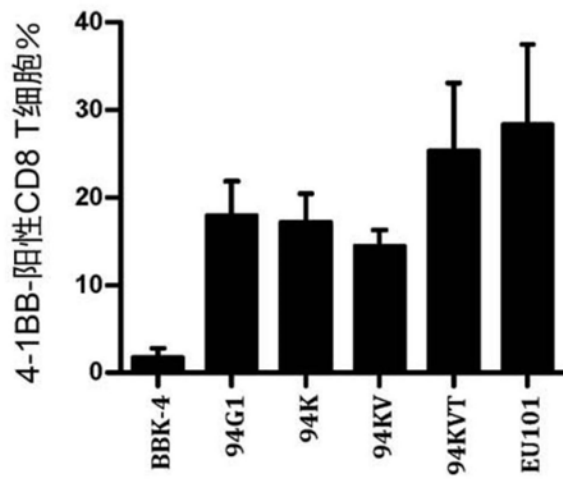


图6

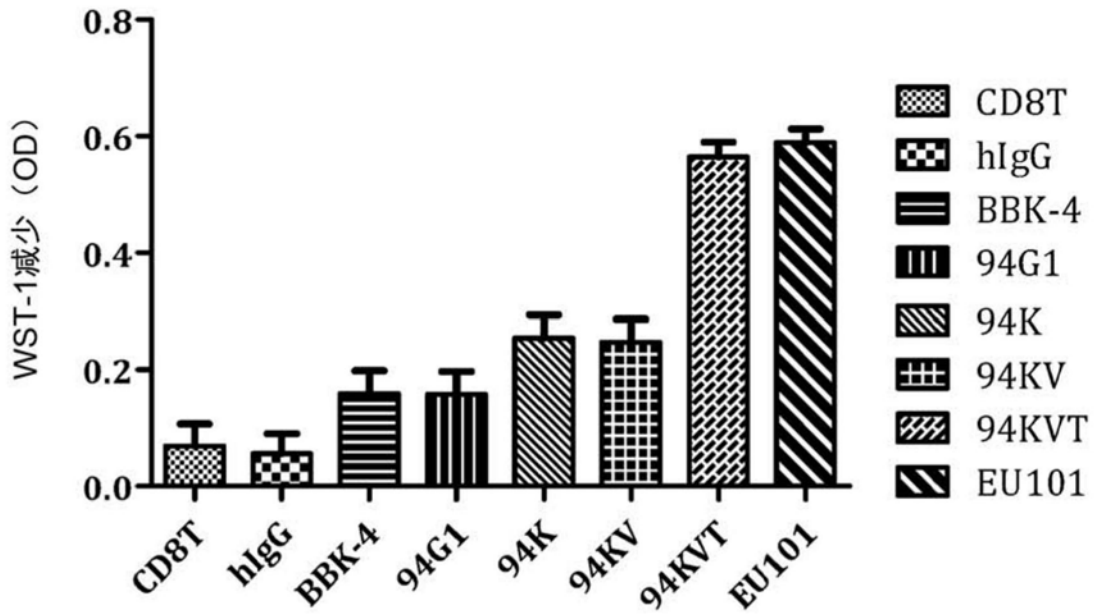


图7

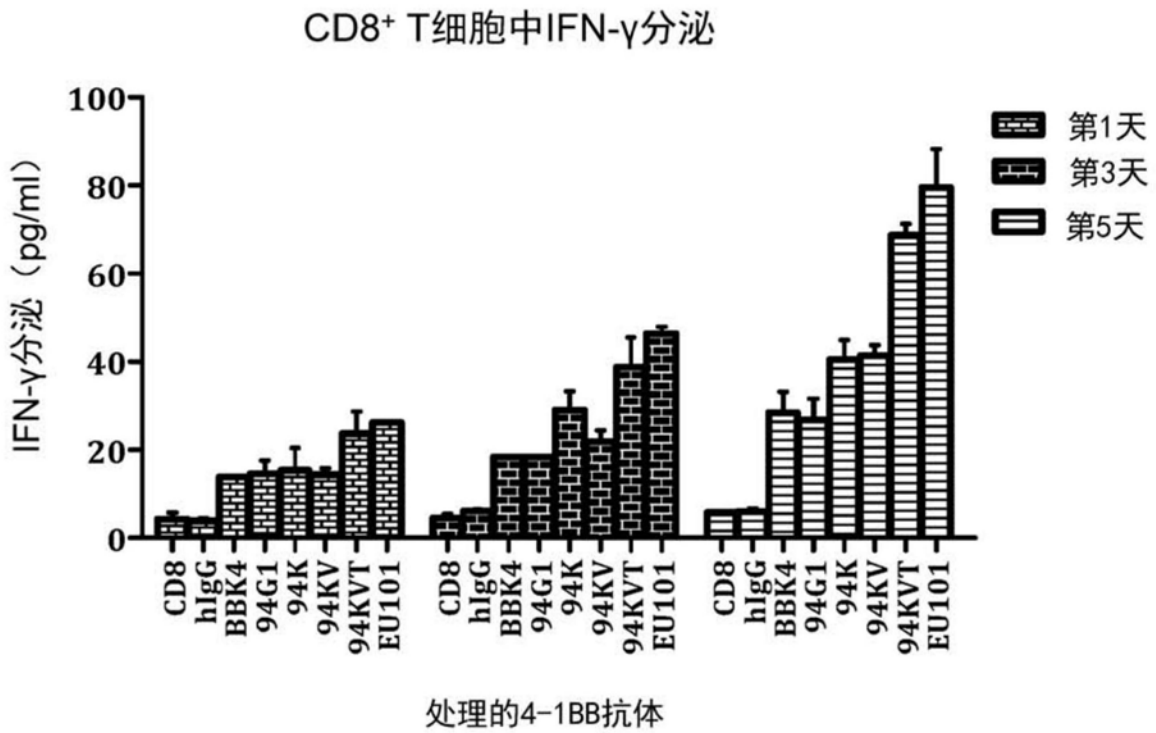


图8

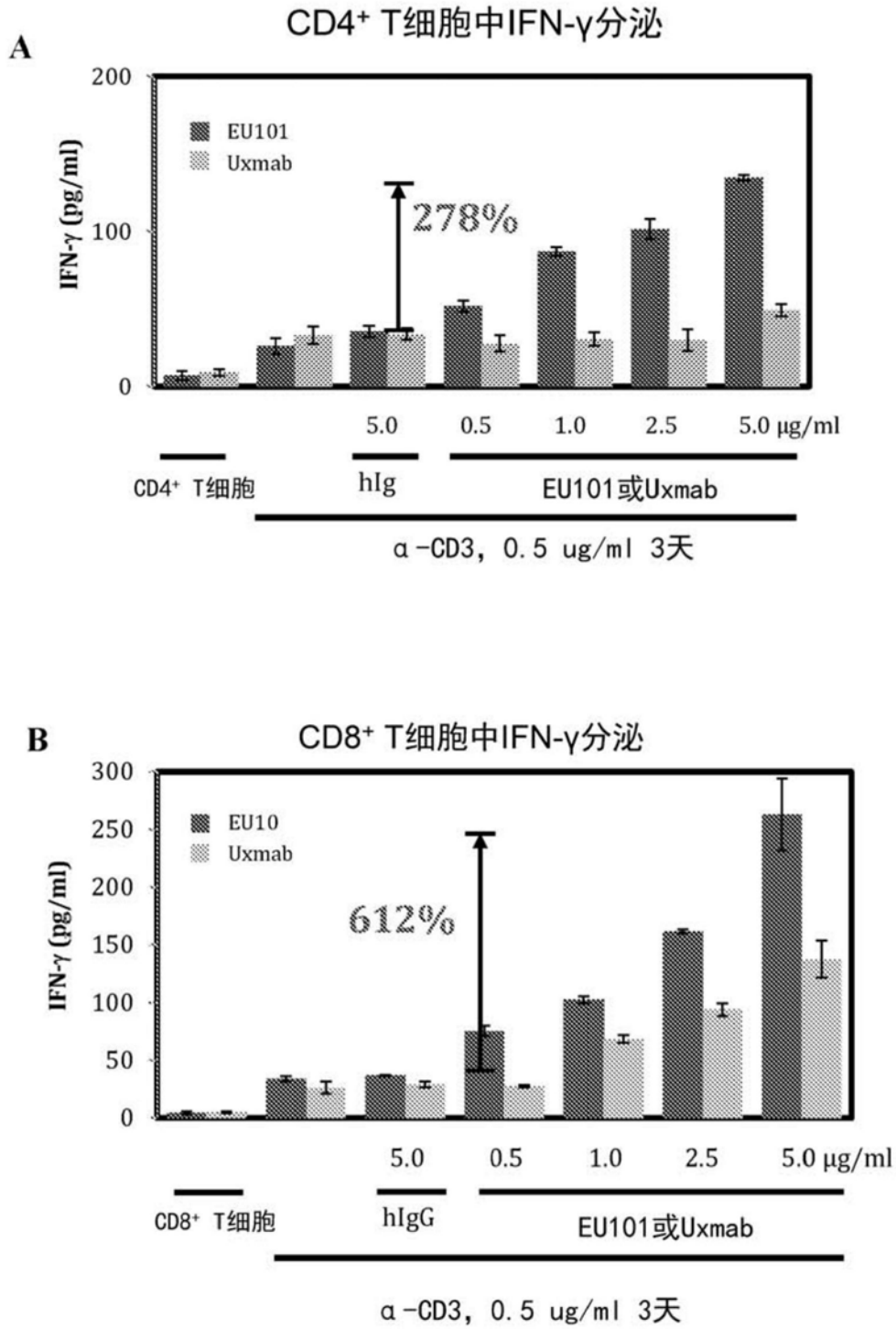


图9

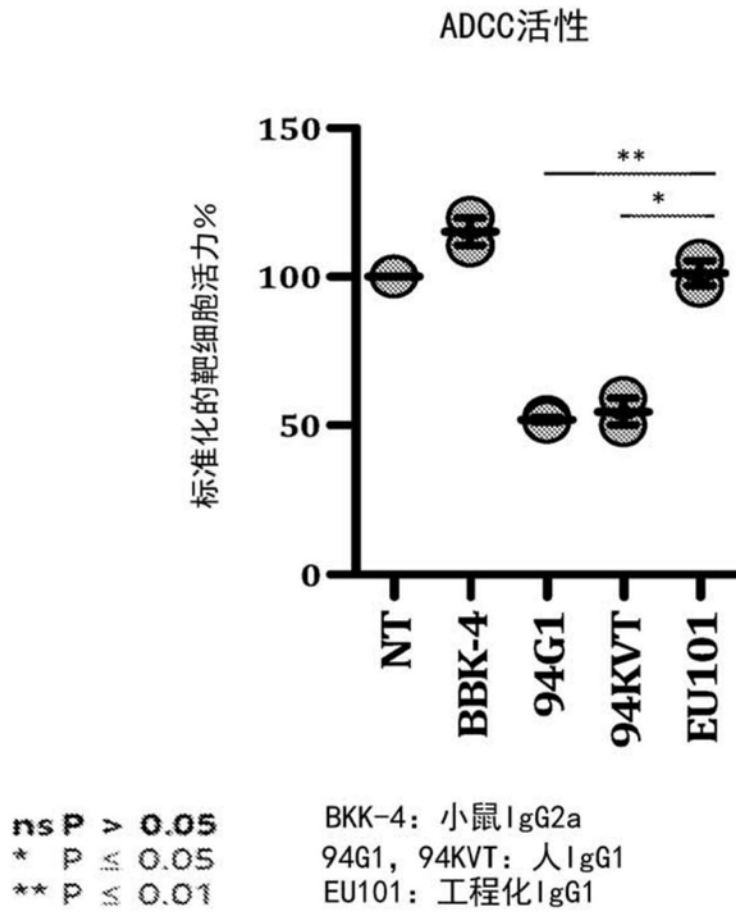


图10A

4-1BB抗体的CDC活性

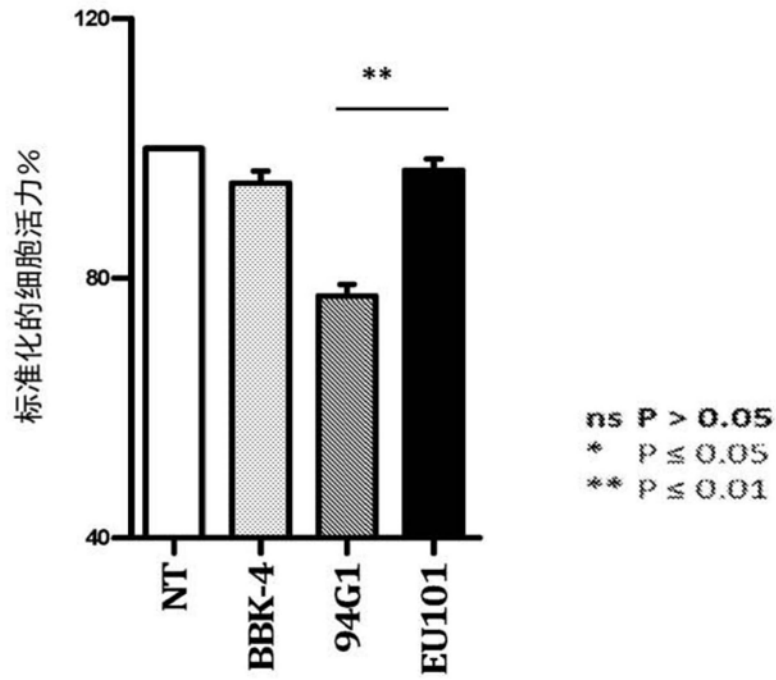


图10B

抗-肿瘤作用：EU101

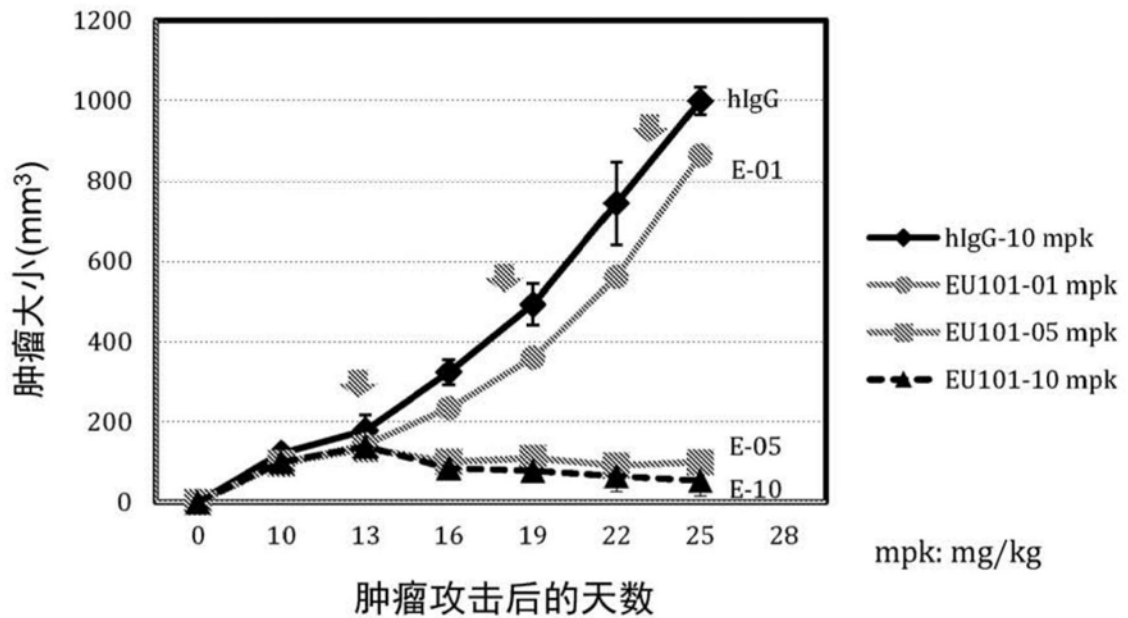


图11

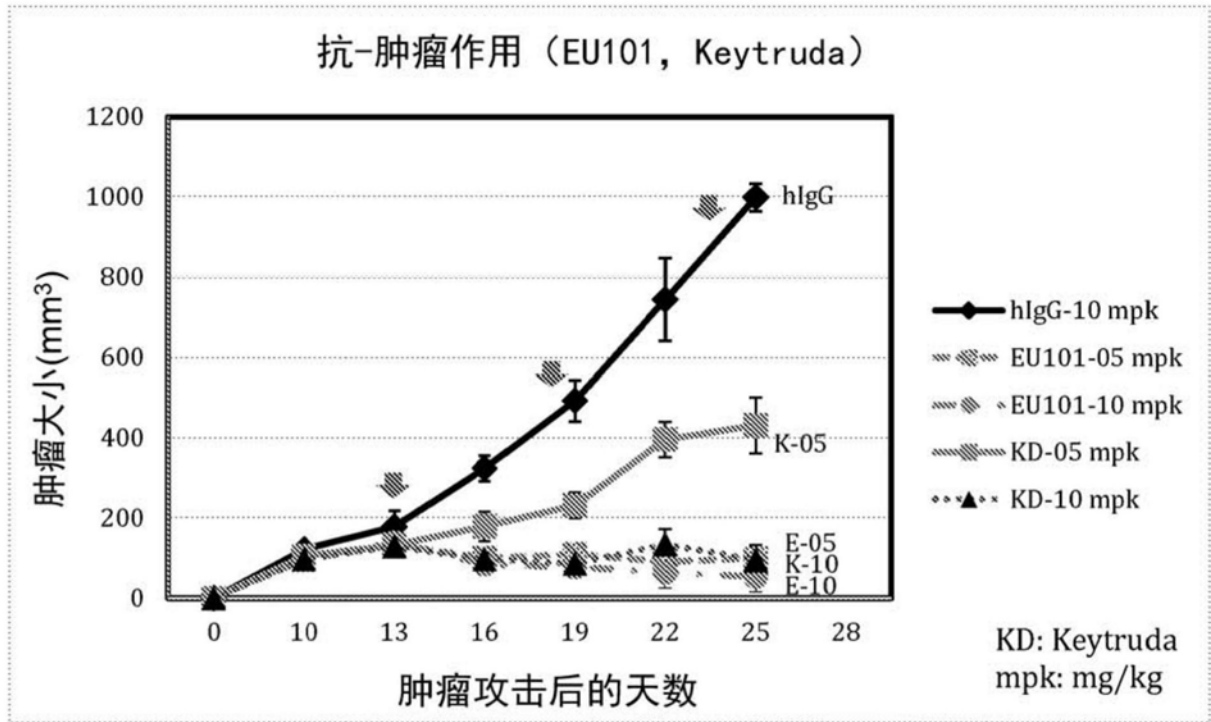


图12

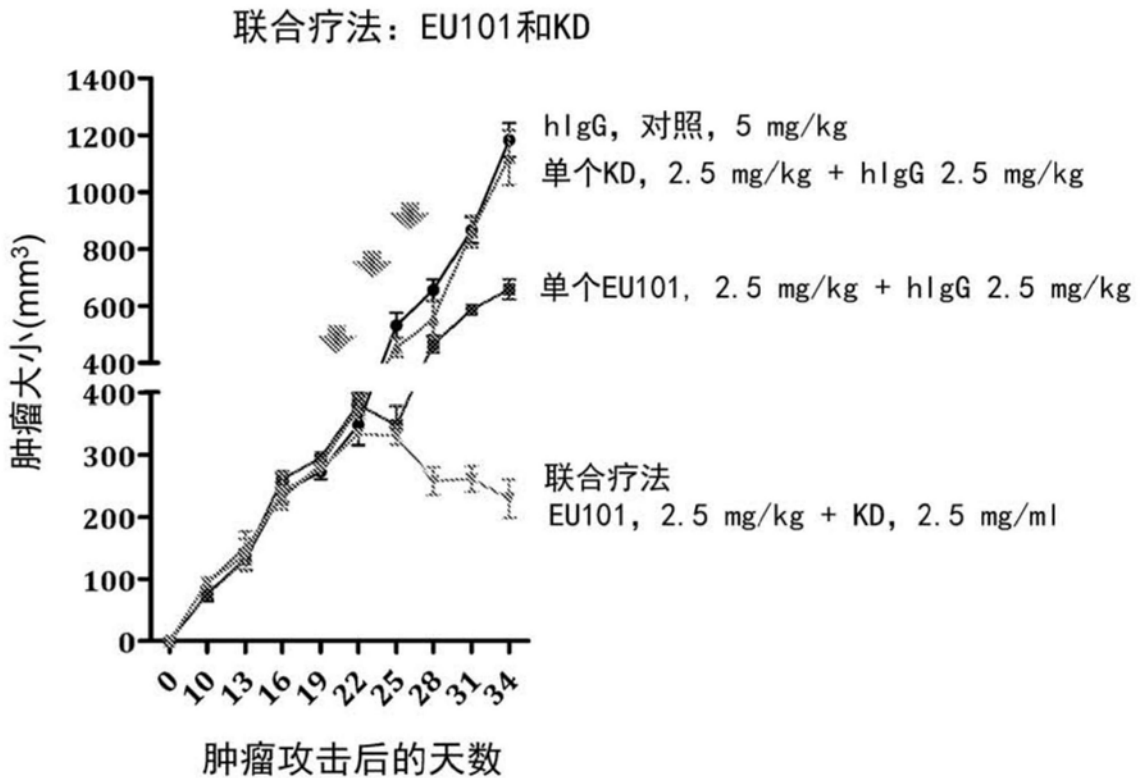


图13

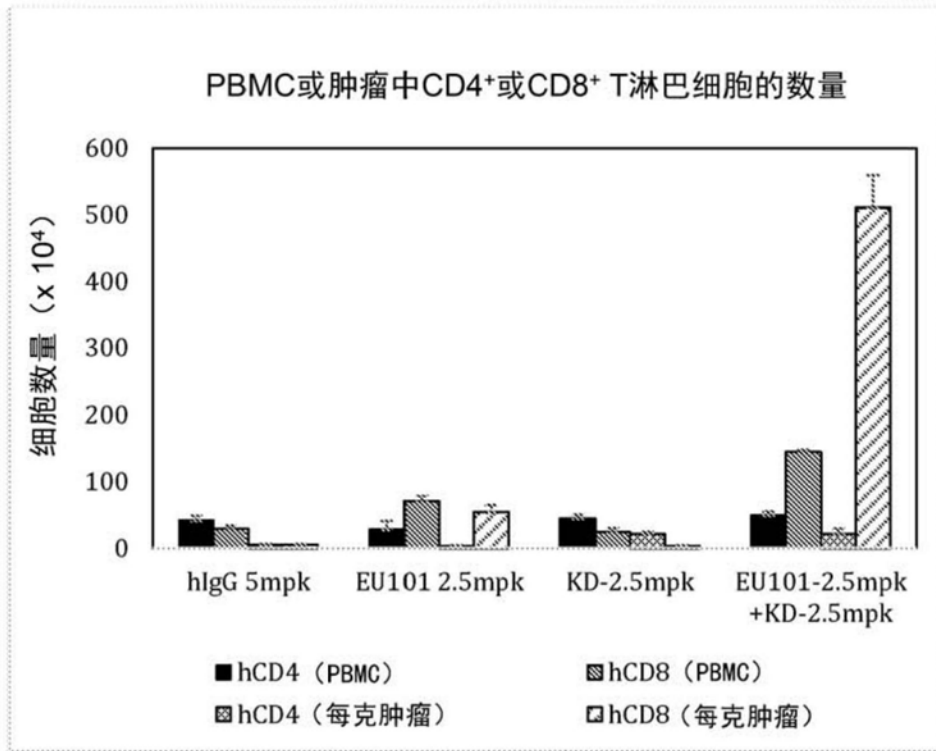


图14A

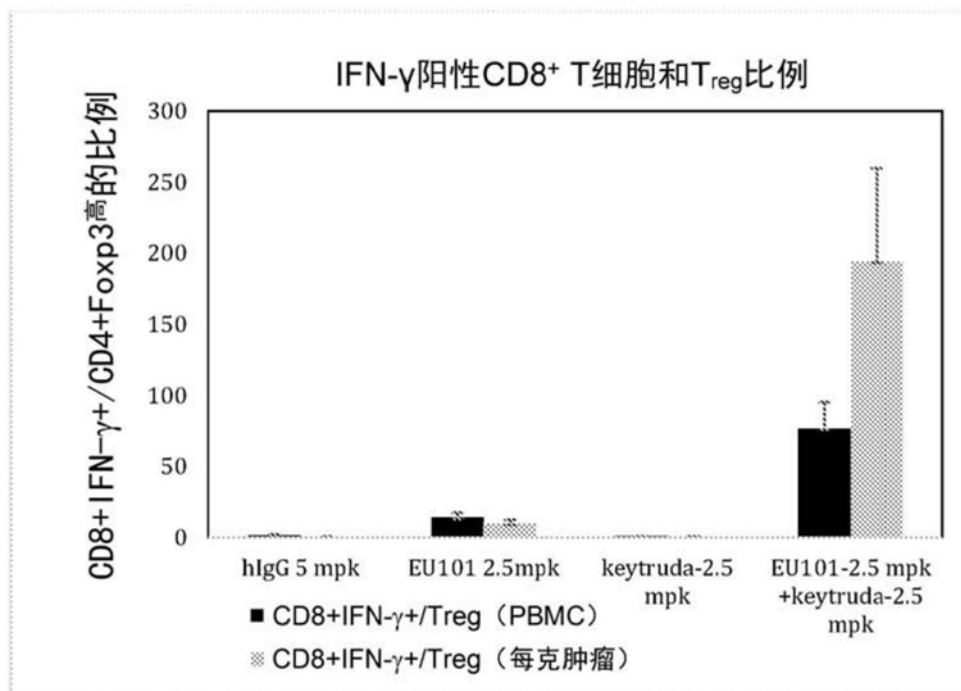


图14B

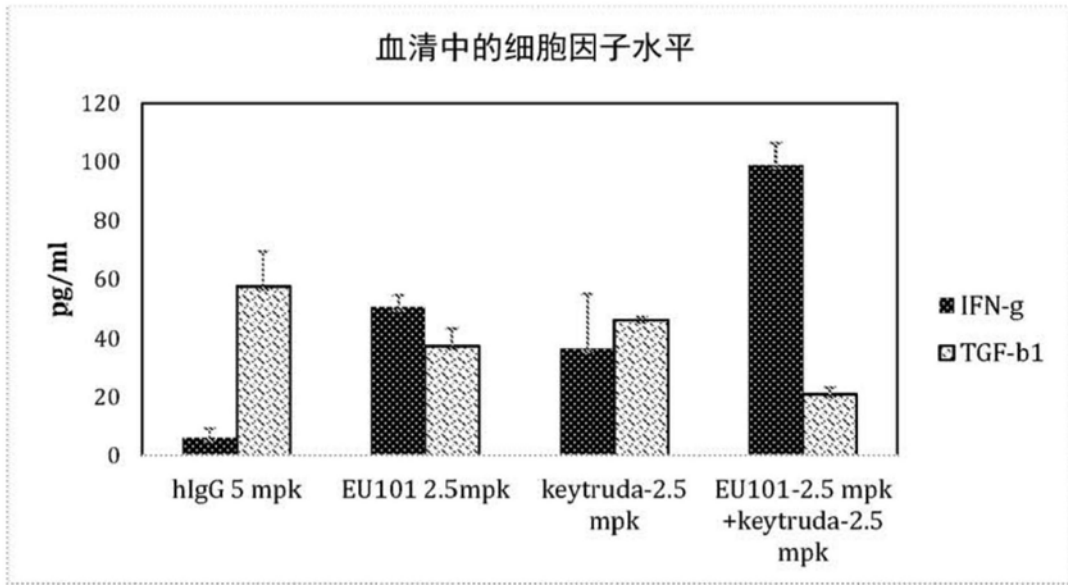


图15A

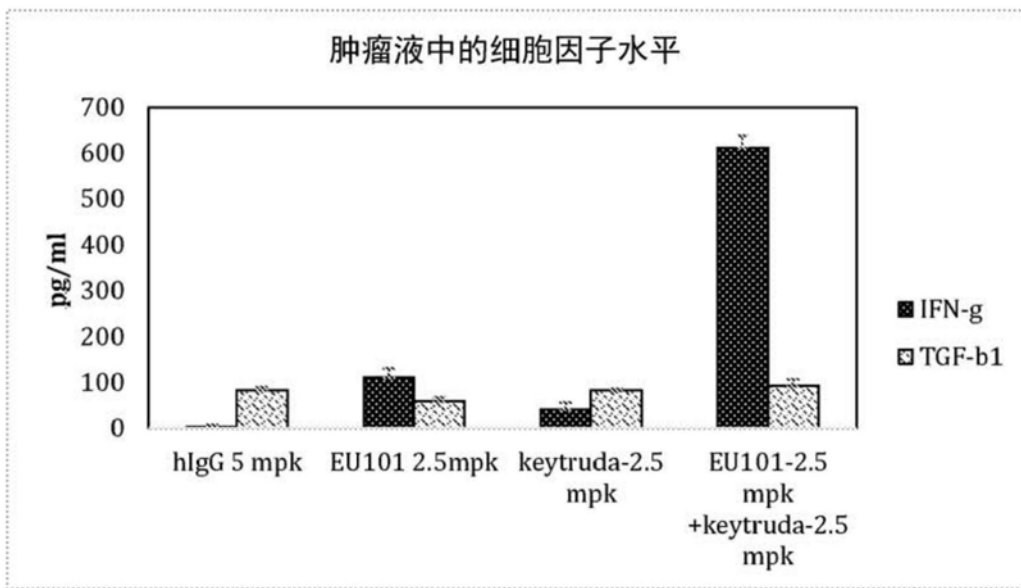


图15B

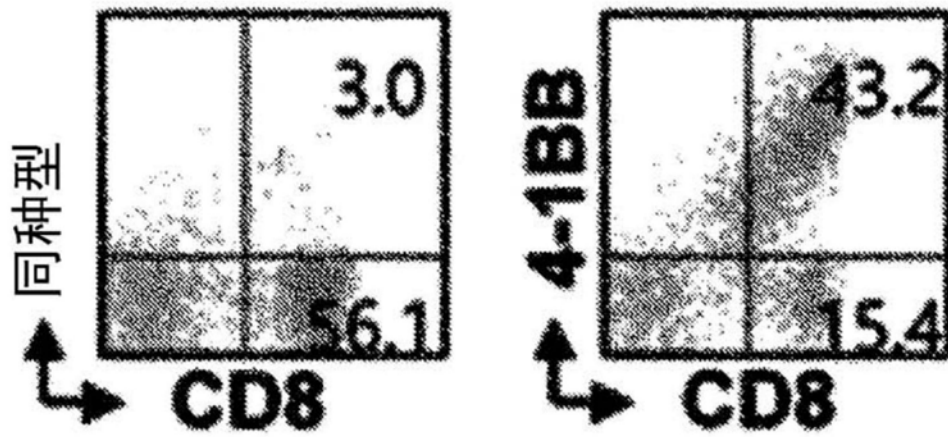


图16A

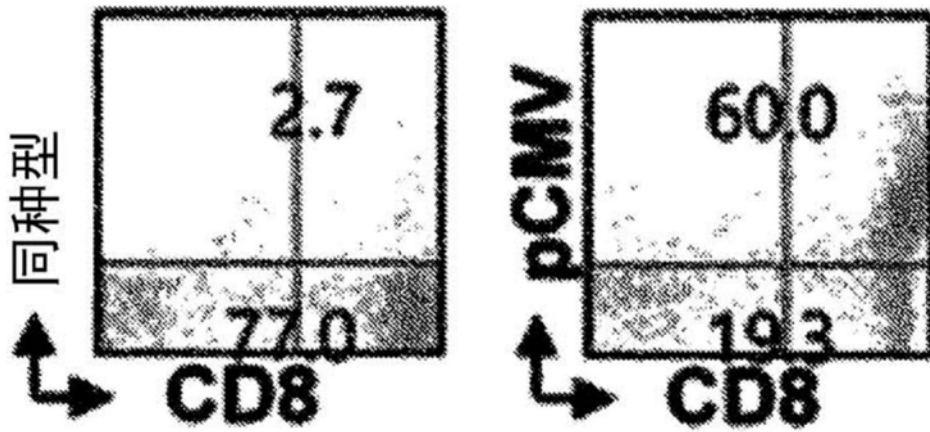


图16B