



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109562165 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780044931.3

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(22)申请日 2017.07.20

代理人 陈扬扬 陶启长

(30)优先权数据

62/364,763 2016.07.20 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.18

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/043165 2017.07.20

C12N 5/0783(2006.01)

C12N 5/09(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/017888 EN 2018.01.25

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

(71)申请人 IGM生物科学股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 B·T·Y·王 D·R·罗斯纳

R·巴利加 B·A·基特

权利要求书5页 说明书48页 附图7页

(54)发明名称

多聚OX40结合分子及其用途

(57)摘要

本公开提供了二聚、五聚和六聚OX40激动剂结合分子以及使用这类结合分子诱导抗肿瘤免疫的方法。

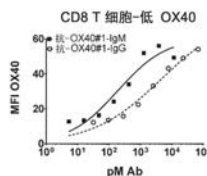


图 3A

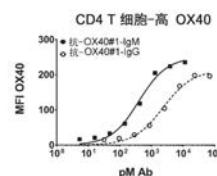


图 3B

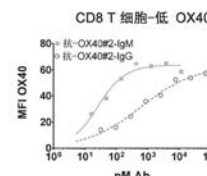


图 3C

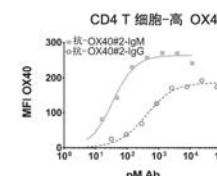


图 3D

1. 一种多聚结合分子,包含两个、五个或六个二价结合单元或其变体或片段,其中每个结合单元包含两个IgA或IgM重链恒定区或其片段,各自与抗原结合结构域相关联,

其中所述结合分子的至少三个抗原结合结构域能特异性地和激动性地结合表达OX40的细胞上的OX40单体,并且

其中所述结合分子能在没有二级交联部分的情况下在细胞中诱导OX40介导的信号转导。

2. 如权利要求1所述的多聚结合分子,所述多聚结合分子能在不存在二级交联部分的情况下结合并接合表达于细胞表面的三个或更多个OX40单体。

3. 如权利要求1或2所述的多聚结合分子,其中所述表达OX40的细胞是T细胞。

4. 如权利要求3所述的多聚结合分子,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

5. 如权利要求3或4所述的多聚结合分子,其中细胞中OX40介导的信号转导能增加OX40的表面表达,增加CTL增殖,增加促炎细胞因子的产生,增加对由CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞的抑制作用的抗性,增加或增强肿瘤细胞杀伤,或其组合。

6. 如权利要求3所述的多聚结合分子,其中所述T细胞是CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞。

7. 如权利要求3或6所述的多聚结合分子,其中细胞中OX40介导的信号转导能干扰细胞抑制肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫的能力。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的多聚结合分子,所述多聚结合分子能以比等量二价IgG抗体或其片段更高的效力在表达OX40的细胞中诱导OX40介导的信号转导,所述二价IgG抗体或其片段包含两个等效OX40抗原结合结构域。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的多聚结合分子,包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性且激动性地结合表达于所述细胞的表面的OX40单体,从而激活细胞中OX40介导的信号转导。

10. 如权利要求9所述的多聚结合分子,其中,所述至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域结合相同的胞外OX40表位。

11. 如权利要求9所述的多聚结合分子,其中,所述至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域各自特异性地结合两种或更多种不同胞外OX40表位之一。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的多聚结合分子,其中所述两个、五个或六个结合单元是人、人源化或嵌合免疫球蛋白结合单元。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的多聚结合分子,其中所述结合分子的至少三个抗原结合结构域是OX40激动剂结合结构域,并且其中至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH和VL包含六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含抗体的CDR,所述抗体包含分别包含以下序列或包含于以下序列内的VH和VL氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:

12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;或者,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含抗体的CDR,所述抗体包含分别包含以下序列或包含于以下序列内的VH和VL氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52,除了CDR中的一个或多个中的一个或两个氨基酸被取代。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的多聚结合分子,其中所述多聚结合分子的至少一个,至少两个,至少三个,至少四个,至少五个,至少六个,至少七个,至少八个,至少九个,至少十个,至少十一个或十二个抗原结合结构域包含抗体VH和VL,其中VH和VL包含与分别包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH和VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的多聚结合分子,所述多聚结合分子是包含两个二价IgA结合单元或其片段和J链或其片段或变体的二聚结合分子,其中每个结合单元包含两

个IgA重链恒定区或其片段,所述两个IgA重链恒定区或其片段各自与抗原结合结构域相关联。

16.如权利要求15所述的多聚结合分子,还包含分泌型组分,或其片段或变体。

17.如权利要求15或16所述的多聚结合分子,其中,所述IgA重链恒定区或其片段各包含Ca2结构域或Ca3-tp结构域。

18.如权利要求17所述的多聚结合分子,其中,一个或多个IgA重链恒定区或其片段还包含Ca1结构域。

19.如权利要求15-18中任一项所述的多聚结合分子,其中,所述IgA重链恒定区是人IgA恒定区。

20.如权利要求15-19中任一项所述的多聚结合分子,其中,各结合单元包含两个IgA重链和两个免疫球蛋白轻链,所述两个IgA重链各自含有位于IgA恒定区或其片段的氨基末端的VH,所述两个免疫球蛋白轻链各自含有位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

21.如权利要求1-14中任一项所述的多聚结合分子,所述多聚结合分子为分别包含五个或六个二价IgM结合单元的五聚或六聚结合分子,其中各结合单元包含两个IgM重链恒定区或其片段,所述两个IgM重链恒定区或其片段各自与抗原结合结构域相关联。

22.如权利要求21所述的多聚结合分子,其中所述IgM重链恒定区或其片段各包含Cu3结构域或其片段或变体和Cu4-tp结构域或其片段或变体。

23.如权利要求21或权利要求22所述的多聚结合分子,其中一个或多个IgM重链恒定区或其片段还包含Cu2结构域、Cu1结构域,或其任何组合。

24.如权利要求21-23中任一项所述的多聚结合分子,其中所述结合分子是五聚的,并且还包含J链,或其片段,或其变体。

25.如权利要求21-24中任一项所述的多聚结合分子,其中所述IgM重链恒定区是人IgM恒定区。

26.如权利要求21-25中任一项所述的多聚结合分子,其中各结合单元包含两个IgM重链和两个免疫球蛋白轻链,所述两个IgM重链各自含有位于IgM恒定区或其片段的氨基末端的VH,所述两个免疫球蛋白轻链各自含有位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

27.如权利要求1-26中任一项所述的多聚结合分子,其中各结合单元包括两个重链和两个轻链,其中重链和轻链包含VH和VL氨基酸序列,所述VH和VL氨基酸序列与分别包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH和VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,

或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

28. 如权利要求1-14或21-27中任一项所述的多聚结合分子,其中所述结合分子是五聚IgM分子,还包含J链或其片段或变体。

29. 一种组合物,包含如权利要求1-28中任一项所述的多聚结合分子。

30. 一种多核苷酸,包含编码如权利要求1-28中任一项所述的结合分子的多肽亚基的核酸序列。

31. 如权利要求30所述的多核苷酸,其中,所述多肽亚基包含IgM重链恒定区和所述多聚结合分子的抗原结合结构域的至少抗体VH部分。

32. 如权利要求31所述的多核苷酸,其中,所述多肽亚基包含融合至VH的C末端的人IgM恒定区或其片段,所述VH包含:

(a) HCDR1、HCDR2和HCDR3区域,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3区域包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VH氨基酸序列所含的CDR:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49,或SEQ ID NO:51,或者,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3区域包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VH氨基酸序列所含的CDR:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49,或SEQ ID NO:51,并且一个或多个HCDR中具有一个或两个单氨基酸取代;或

(b) 与包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49,或SEQ ID NO:51。

33. 如权利要求30-32中任一项所述的多核苷酸,其中,所述多肽亚基包含轻链恒定区和所述多聚结合分子的抗原结合结构域的抗体VL部分。

34. 如权利要求33所述的多核苷酸,其中,所述多肽亚基包含融合至VL的C末端的人κ或λ轻链恒定区或其片段,所述VL包含:

(a) LCDR1、LCDR2和LCDR3区域,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3区域包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VL氨基酸序列所含的CDR:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52,或者,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3区域包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VL氨基酸序列所含的CDR:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,

SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52,并且一个或多个LCDR中具有一个或两个单氨基酸取代;或

(b) 与包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52。

35. 一种组合物,包含如权利要求30-32中任一项所述的多核苷酸,和如权利要求30、33或34中任一项所述的多核苷酸。

36. 如权利要求35所述的组合物,其中,所述多核苷酸处于分开的载体上。

37. 如权利要求35所述的组合物,其中,所述多核苷酸处于单一载体上。

38. 如权利要求35-37中任一项所述的组合物,还包含含有编码J链或其片段或其变体的核酸序列的多核苷酸。

39. 一种载体,其为权利要求37中所述的载体。

40. 载体,其为权利要求36中所述的载体。

41. 一种宿主细胞,包含权利要求30-34中任一项所述的多核苷酸,权利要求35-38中任一项所述的组合物,或权利要求39或40所述的载体,其中,所述宿主细胞能表达如权利要求1-28中任一项所述的结合分子,或其亚基。

42. 一种产生如权利要求1-28中任一项所述的结合分子的方法,包括:培养权利要求41所述的宿主细胞,并且回收所述结合分子。

43. 一种在OX40-表达细胞中诱导OX40-介导的活化的方法,包括使所述OX40-表达细胞与权利要求1-28中任一项所述的多聚结合分子接触。

44. 一种在OX40-表达T细胞中诱导OX40易位和聚类的方法,包括使所述OX40-表达T细胞与权利要求1-28中任一项所述的多聚结合分子接触。

45. 一种治疗癌症的方法,包括向需要治疗的对象给予有效量的权利要求1-28中任一项所述的多聚结合分子,其中所述多聚结合分子能活化OX40-表达效应T细胞,从而引发肿瘤杀伤性CTL响应。

46. 如权利要求45所述的方法,其中所述对象是人。

多聚OX40结合分子及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年7月20日提交的美国临时专利申请系列号62/364,763的优先权,其公开内容通过引用全文纳入本文。

技术背景

[0003] 肿瘤坏死因子超家族受体 (TNFSFR) 蛋白是免疫肿瘤治疗剂的重要靶标。例如,针对TNFSFR靶标(例如CD40,GITR,CD137和OX40等)的激动剂单克隆抗体目前正处于无数癌症适应症临床试验中。

[0004] 在许多情况下,TNFSFR靶标的激活需要表达受体的细胞表面上的至少三个非相互作用受体单体交联以形成稳定的受体三聚体,导致跨细胞膜的信号转导。将TNFSFR蛋白三聚体聚类成三聚体的“筏”导致更有效地激活信号转导级联。(参见,Valley等,J.Biol.Chem.,287(25):21265-21278,2012)。通常,TNFSFR在细胞表面上的聚类可以通过多聚配体(例如三聚配体)的接合来实现。最近的工作已经证明,针对TNFSFR DR5的多聚激动性IgM抗体可以在不存在二级交联的情况下有效结合细胞表面上的多个DR5受体单体,并且相对于具有相同结合结构域的IgG分子具有增加的细胞毒性。参见2016年1月20日提交的PCT申请号PCT/US16/14153,其通过引用全文并入本文。

[0005] OX40,也称为CD134或TNFRSF4,是在活化的T细胞上表达的TNFSFR。OX40在活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞上均有表达,但在静息幼稚T细胞或大多数静息记忆T细胞上未发现,并且也在调节性T细胞(Treg),NKT细胞,NK细胞和中性粒细胞上表达(Croft,M,等,Immunol Rev.229:173-191(2009))。OX40表达对鼠CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg是组成型的,但它仅在活化的人FoxP3⁺Treg上表达(Croft,M,Ann Rev Immunol 28:57-78(2010))。激活后,效应T细胞和Treg均以延迟的动力学上调OX40表达(同上)。OX40与在活化的抗原呈递细胞(APC)(例如巨噬细胞和树突细胞(DC))上表达的其三聚配体(OX40L,TNFSF4)的相互作用在CD4⁺和CD8⁺效应T细胞中提供增强的共刺激增殖,存活和效应功能(同上,Stüber E,等,Immunity 2:507-21(1995))。给予适当的细胞因子环境,OX40信号转导还可以阻断Treg的免疫抑制能力,从而增强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)功能(Linch,SN,等,Front.Oncol.5:doi:10.3389/fonc.2015.00034(2015))。OX40激动剂mAb可以增强CTL的效应功能和增殖,并且可以通过肿瘤内CD25⁺CD4⁺FoxP3⁺Treg细胞阻断免疫抑制(Piconese S,等,JExp Med.205:825-839(2008))。针对OX40的激动剂单克隆抗体已在临床前模型中显示出治疗活性(参见例如Linch,SN,等,Front.Oncol.5:doi:10.3389/fonc.2015.00034(2015))。此外,几种OX40IgG激动剂mAb正在人类临床试验中单独或与其他疗法组合进行研究,包括但不限于9B12(鼠抗OX40mAb,Curti BD,等,Cancer Res.73:7189-98(2013));KHK4083(完全人抗OX40mAb,ClinicalTrials.gov#NCT02647866);Medi0562(人源化抗OX40mAb,ClinicalTrials.gov#NCT02705482);PF-04518600(完全人抗OX40mAb,ClinicalTrials.gov#NCT02315066);和GSK3174998(人源化抗OX40mAb,ClinicalTrials.gov#NCT02528357)。然而,典型的二价IgG激动剂抗体需要交联以充分接合细胞表面上的TNFSFR以引发信号转导。

[0006] 仍然需要开发更强效且因此更有效的OX40激动剂抗体用于癌症免疫疗法。

发明内容

[0007] 本公开内容提供了多聚结合分子,例如二聚,五聚或六聚结合分子,其包含两个,五个或六个二价结合单元或其变体或片段,其中每个结合单元包含两个IgA或IgM重链恒定区或其片段,各自与抗原结合结构域相关联,其中结合分子的至少三个抗原结合结构域特异性地和激动性地结合OX40,所述OX40表达于活化的T细胞表面(例如CTL,或静息或活化的Treg),其中结合分子可以在不存在二级交联部分的情况下结合表达于Treg或活化的CTL的多个,例如三个或更多个OX40单体,从而引发抗肿瘤免疫应答。

[0008] 本公开内容提供了多聚结合分子,其包括两个,五个或六个二价结合单元或其变体或片段,其中每个结合单元包括两个IgA或IgM重链恒定区或其片段,各自与抗原结合结构域相关,其中结合分子的至少三个抗原结合结构域可以特异性地和激动性地结合表达OX40的细胞上的OX40单体,并且其中结合分子可以在没有二级交联部分的情况下在细胞中诱导OX40介导的信号转导。在某些方面,本文提供的多聚结合分子可以在不存在二级交联部分的情况下结合并接合表达于细胞表面的三个或更多个OX40单体。在某些方面,表达OX40的细胞是T细胞,细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或CD4+CD25+FoxP3+T调节(Treg)细胞。在某些方面,细胞中OX40介导的信号转导可以增加OX40的表面表达,增加CTL增殖,增加促炎细胞因子的产生,增加对由CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞的抑制作用的抗性,增加或增强肿瘤细胞杀伤,或其组合。在某些方面,CD4+CD25+FoxP3Treg细胞中的OX40介导的信号转导可以干扰细胞抑制肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫的能力。在某些方面,本文提供的多聚结合分子可以在比包含两个等效OX40抗原结合结构域的等量二价IgG抗体或其片段更高的效力下在表达OX40的细胞中诱导OX40介导的T细胞活化。

[0009] 在某些方面中,本文提供的多聚结合分子包括至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或十二个抗原结合结构域,所述抗原结合结构域特异性且激动性地结合至在所述细胞的表面上表达的OX40单体,从而激活细胞中OX40介导的信号转导。在某些方面,三个,四个,五个,六个,七个,八个,九个,十个,十一个或十二个抗原结合结构域结合相同的细胞外OX40表位。在某些方面,三个,四个,五个,六个,七个,八个,九个,十个,十一个或十二个抗原结合结构域各自特异性结合两种或更多种不同的细胞外OX40表位中的一种。

[0010] 在某些方面,本文提供的多聚结合分子的两个,五个或六个结合单元是人,人源化或嵌合免疫球蛋白结合单元。

[0011] 在某些方面,本文提供的多聚结合分子的至少三个抗原结合结构域是OX40激动剂结合结构域,其中至少一个,至少两个,至少三个,至少四个,至少五个,至少六个,至少七个,至少八个,至少九个,至少十个,至少十一个或十二个抗原结合结构域包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL共同具有抗体的六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2,HCDR3,LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述抗体包括分别包含以下序列或包含于以下序列内的VH和VL氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID

NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52,或具有分别包含以下序列或包含于以下序列内的VH和VL氨基酸序列的抗体的CDR:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52,除了一个或多个CDR中的一个或两个氨基酸被取代。

[0012] 在某些方面,本文提供的多聚结合分子的至少一个,至少两个,至少三个,至少四个,至少五个,至少六个,至少七个,至少八个,至少九个,至少十个,至少十一个或十二个抗原结合结构域包括抗体VH和VL,其中VH和VL具有与分别包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH和VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

[0013] 在某些方面中,本文提供的多聚结合分子是二聚结合分子,它包括两个二价IgA结合单元或其片段和J链或或其片段或变体,其中各结合单元具有两个IgA重链恒定区或其片段,该两个IgA重链恒定区或其片段各自与抗原结合结构域相关联。在某些方面,该多聚结合分子还包括分泌部分或其片段或变体。在某些方面,IgA重链恒定区或其片段各自包括Ca

2结构域或Ca3-tp结构域,并且可以还包括Ca1结构域。在某些方面,IgA重链恒定区是人重链恒定区。在某些方面中,该多聚结合分子各结合单元包括两个IgA重链和两个免疫球蛋白轻链,所述两个IgA重链各自具有位于IgA恒定区的氨基末端的VH,或其片段,所述两个免疫球蛋白轻链各自具有位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

[0014] 在某些方面,本文提供的多聚结合分子是五聚或六聚结合分子,其分别包括五个或六个二价IgM结合单元,其中各结合单元包括两个IgM重链恒定区或其片段,所述两个IgM重链恒定区或其片段各自与抗原结合结构域相关联。在某些方面,该多聚体结合分子的IgM重链恒定区或其片段各自包括C μ 3结构域和C μ 4-tp结构域,或其片段或变体,并且还可以包括C μ 2结构域、C μ 1结构域、或其任意组合。在结合分子是五聚化的某些方面,其可以还包括J链,或其片段,或其变体。在某些方面中,所述IgM重链恒定区是人IgM恒定区。在某些方面中,该多聚结合分子各结合单元包括两个IgM重链和两个免疫球蛋白轻链,所述两个IgM重链各自包含位于IgM恒定区的氨基末端的VH,或其片段,所述两个免疫球蛋白轻链各自包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

[0015] 在某些方面,本文提供的多聚结合分子各抗原结合结构域包括两条重链和两条轻链,其中重链和轻链包含VH和VL氨基酸序列,所述VH和VL氨基酸序列与分别包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH和VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

[0016] 在本文提供的多聚结合分子是五聚IgM分子的那些方面,多聚结合分子可以进一步包括J链或其变体。

[0017] 本公开还提供了包含本文提供的多聚结合分子的组合物。

[0018] 本文还提供多核苷酸,其包括编码本文提供的多聚结合分子的多肽亚基的核酸序列。

[0019] 在某些方面,由多核苷酸编码的多肽亚基包含IgM重链恒定区和所述多聚结合分子的抗原结合结构域的至少抗体VH部分。在某些方面,多肽亚基包括融合至VH的C末端的人IgM恒定区或其片段,所述VH包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VH氨基酸序列中所包含的HCDR1、HCDR2和HCDR3区:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID

NO:49;或SEQ ID NO:51,或所述VH包含由以下序列或包含于以下序列内的VH氨基酸序列所包含的CDR:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51,并且一个或多个HCDR中具有一个或两个单氨基酸取代;或多肽亚基包括融合至VH的C末端的人IgM恒定区或其片段,所述VH包含与成熟VH氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列,所述成熟VH氨基酸序列包含以下序列或包含于以下序列内:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51。

[0020] 在某些方面,由多核苷酸编码的多肽亚基包含轻链恒定区和所述多聚结合分子的抗原结合结构域的至少抗体VL部分。在某些方面,由多核苷酸编码的多肽亚基包括融合至VL的C末端的人 κ 或 λ 轻链恒定区或其片段,该VL包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VL氨基酸序列所包含的LCDR1、LCDR2和LCDR3区:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50;或SEQ ID NO:52,或该VL包含由包含以下序列或包含于以下序列内的VL氨基酸序列所包含的CDR:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52,并且一个或多个LCDR中具有一个或两个单氨基酸取代;或由多核苷酸编码的多肽亚基包括融合至VL氨基酸序列的C末端的人 κ 或 λ 轻链恒定区或其片段,该VL氨基酸序列与成熟VL氨基酸序列至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同,所述成熟VL氨基酸序列包含以下序列或包含于以下序列内:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52。

[0021] 本公开还提供了包含编码VH的多核苷酸和编码VL的多核苷酸的组合物。在某些方面,所述多核苷酸位于分开的载体上。在某些方面,所述多核苷酸位于单一载体上。在某些方面,组合物还包括含有编码J链或其片段或其变体的核酸序列的多核苷酸,其可以在相对于VH和/或VL的相同或分开的载体上。还提供了这个载体或这些载体。

[0022] 本公开还提供了宿主细胞,其包括以下中的一种或多种:所提供的多核苷酸,所提供的组合物和/或所提供的一种或多种载体。在某些方面,所提供的宿主细胞可以表达本文提供的多聚结合分子。本公开还提供了一种产生本文所提供的多聚结合分子的方法,其中该方法包括培养提供的宿主细胞,并且回收所述结合分子。

[0023] 本公开还提供了在表达OX40的细胞中诱导OX40易位和聚类的方法,其中该方法包括使表达OX40的细胞与本文提供的多聚结合分子接触。

[0024] 本公开还提供了治疗癌症的方法,其中该方法包括向需要治疗的对象给予有效量的本文提供的多聚结合分子,其中多聚结合分子可以激活表达OX40的效应T细胞从而引发肿瘤杀伤性CTL应答。在某些方面中,该对象是人。另一方面,本发明提供了本文提供的多聚结合分子在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中多聚结合分子可激活表达OX40的效应T细胞,从而引发肿瘤杀伤性CTL应答。另一方面,本发明提供了本文提供的多聚结合分子,其用于治疗癌症。

附图说明

[0025] 图1A-C:抗OX40IgM的产生。图1A:还原凝胶显示抗OX40#1-IgM和抗OX40#2-IgM重链和轻链。图1B:抗J链Western印迹证实IgM五聚体中存在J链。图1C:纯化的抗OX40#1-IgM WT J和抗OX40#2-IgM WT J的非还原凝胶,包括纯化的抗体,流穿和洗涤。

[0026] 图2A-D:抗OX40IgM抗体对OX40的特异性增加。在两种不同抗原密度的ELISA测定中测量抗OX40#1和抗OX40#2的IgG和IgM形式对OX40的特异性。将ELISA板用0.4ng/mL OX-40-Fc包被过夜,并与抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM(图2A)或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM(图2C)一起孵育。或者,将ELISA板用1.6ng/mL OX-40-Fc包被过夜,并与抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM(图2B)或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM(图2D)一起孵育。空心圆:抗OX40#1-IgG;实心圆:抗OX40#1-IgM;空心方块:抗OX40#2-IgG;实心方块:抗OX40#2-IgM。

[0027] 图3A-D:抗OX40IgM抗体与T细胞的结合增强。图3A和图3C:用Activator Dynabeads活化T细胞以在CD8+T细胞上诱导低水平的OX40表达,并针对抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM(图3A)或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM(图3C)测量OX40结合。图3B和图3D:用Activator Dynabeads活化T细胞以在CD4+T细胞上诱导高水平的OX40表达,并针对抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM(图3B)或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM(图3D)测量OX40结合。深色空心圆:抗OX40#1-IgG;深色实心圆:抗OX40#1-IgM;浅色空心方块:抗OX40#2-IgG;阴影实心方块:抗OX40#2-IgM。

[0028] 图4A-B:抗OX40IgM抗体增加NF- κ B途径的活化。将抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM(图4A)或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM(图4B)的稀释液与OX40一起孵育。使用来自最高浓度Ab的RLU和信号转导测定法来计算IgM与IgG相比的信号转导强度的增加(倍数变化)。图4A的图例:空心圆:抗OX40#1-IgG;实心圆:抗OX40#1-IgM;空心方块:抗OX40#1-IgG+交联剂。图4B的图例:空心方块:抗OX40#2-IgG;实心方块:抗OX40#2-IgM;空心圆:抗OX40#2-IgG+交联剂。

具体实施方式

[0029] 定义

[0030] 应注意,术语“一个”或“一种”实体指一种或多种该实体;例如,“一种结合分子”应理解为代表一种或多种结合分子。如此,本文所述术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0031] 此外,本文所用“和/或”应被视作具体公开了两种特征或组分的每一种,伴随或不

伴随另一种。因此,本文短语“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、和“B”(单独)。同样,短语诸如“A、B、和/或C”中使用的术语“和/或”旨在包括各种以下实施方式:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0032] 除非另有定义,本文使用的科技术语与本公开所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。例如,《生物医药和分子生物学简明词典》(Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology), Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC出版社(CRC Press);《细胞和分子生物学词典》(The Dictionary of Cell and Molecular Biology), 第3版, 1999, 学术出版社(Academic Press);和《牛津生物化学和分子生物学辞典》(Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology), 修订, 2000, 牛津大学出版社(Oxford University Press), 向技术人员提供了本公开使用的很多术语的常用词典。

[0033] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外说明,氨基酸以氨基到羧基的取向从左到右书写。本文提供的标题不是本公开各方面或某方面的限制,可以参考说明书整体理解本公开的各种方面或实施方式。因此,下面紧接着定义的术语完全参考说明书全文定义。

[0034] 本文所用的术语“多肽”意在包括单数形式“多肽”和复数形式“多肽”,指由酰胺键(也称肽键)线性连接的多个单体(氨基酸)所组成的分子。术语“多肽”指的是两个或更多个氨基酸的任何一条链或多条链,并且不表示特定长度的产物。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或其它任何用于指两个或多个氨基酸的一条或多条链的术语均包含于“多肽”的定义内,术语“多肽”可与任意这些术语替代或互换使用。术语“多肽”还指多肽表达后修饰的产物,所述修饰包括但不限于糖基化、乙酰基化、磷酸化、酰胺化,和通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白酶切割或非天然产生氨基酸修饰。多肽可由生物来源衍生或由重组技术产生,但不必定由指定核酸序列翻译而来。其可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0035] 本文公开的多肽的大小可以是约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或者2,000个或更多个氨基酸。多肽可具有确定的三维结构,但它们不必定具有这种结构。具有确定三维结构的多肽被称为折叠多肽,不具有确定三维结构但能采用大量不同构象的多肽被称为非折叠多肽。本文所用的术语糖蛋白指偶联至少一个糖部分的蛋白质,所述糖部分通过某一氨基酸如丝氨酸或天冬酰胺的含氧或含氮侧链连接于该蛋白质。

[0036] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物指不处于其天然环境中的多肽。没有规定的具体纯化水平。例如,可从其自然或天然环境中移出分离的多肽。在宿主细胞中表达的重组产生多肽和蛋白质被认为是如本文公开的分离的,通过任何合适技术分离、分级,或者部分或基本上纯化的天然或重组多肽也如此。

[0037] 本文中所述的术语“非天然产生的多肽”或其任何语法变化形式,是条件性的限定,其明确地排除,但仅排除,被法官或管理部门或司法机关或可能会被法官或管理部门或司法机关确定或解释为“天然产生的”那些多肽形式。

[0038] 本文公开的其它多肽是前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合。

本文所述的术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保持对应的原始抗体或多肽的至少一些性质(例如,特异性结合至抗原)的任何多肽。除本文他处讨论的具体抗体片段外,多肽的片段还包括,例如,蛋白酶水解片段以及缺失片段。例如,多肽的变体包括如上所述的片段,以及因氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。在某些方面中,变体可以是非天然产生的。可使用本领域已知的诱变技术生成非天然产生变体。变体多肽可包含保守或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。衍生物是已经改变从而显示原始多肽上不存在的其它特征的多肽。例子包括融合蛋白。多肽变体在本文中也可称作“多肽类似物”。本文所用的多肽的“衍生物”还可指:具有通过功能侧基的反应经由化学方法衍生的一个或多个氨基酸的对象多肽。“衍生物”还包括含有20种标准氨基酸中的一个或多个衍生形式的那些肽。例如,4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可取代丝氨酸;且鸟氨酸可取代赖氨酸。

[0039] “保守性氨基酸取代”是其中一个氨基酸被具有相似侧链的另一个氨基酸替代的情况。本领域中已定义了具有类似侧链的氨基酸的家族,包括碱性侧链(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(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、色氨酸)、 β -分支侧链(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。在某些实施方式中,本公开的多肽和抗体的序列中的保守取代不废除包含所述氨基酸序列的多肽或抗体与所述结合分子结合的抗原的结合。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993); Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:.412-417(1997))。

[0040] 术语“多核苷酸”意在包括单个核酸和多个核酸,指分离的核酸分子或构建物,例如信使RNA(mRNA)、cDNA或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可包含常规磷酸二酯键或非常规键(如酰胺键,如肽核酸(PNA)中发现的酰胺键)。术语“核酸”或“核酸序列”指多核苷酸中存在的任何一种或多种核酸区段,如DNA或RNA片段。

[0041] “分离的”核酸或多核苷酸意为与其原始环境分离的核酸或多核苷酸的任何形式。例如,凝胶纯化的多核苷酸,或编码载体中所含多肽的重组多核苷酸将被视作是“分离的”。并且,认为已被工程改造以具有供于克隆的限制性位点的多核苷酸区段,例如,PCR产物,是“分离的”。分离的多核苷酸的其它示例包括在异源性宿主细胞中维持的重组多核苷酸或在非原始溶液(例如缓冲液或盐水)中(部分地或基本上地)纯化的重组多核苷酸。分离的RNA分子包括多核苷酸的体内或体外RNA转录本,其中,所述转录本不是自然中存在的转录本。分离的多核苷酸或核酸还包括通过合成方式产生的这样的分子。此外,多核苷酸或核酸可以是或可包括调节元件例如启动子、核糖体结合位点,或转录终止子。

[0042] 本文中所用的术语“非天然产生的多核苷酸”或其任何语法变化形式,是条件性的限定,其明确地排除,但仅排除,被判定机构或管理部门或司法机关或可能会被判定机构或管理部门或司法机关确定或解释为“天然产生的”那些核酸或多核苷酸形式。

[0043] 本文所用的术语“编码区”指由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但它可被认为是编码区的一部分,而任何侧接

序列如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等均不是编码区的一部分。两个或更多个编码区可存在于单一多核苷酸构建物中,例如在单一载体上,或者在分开的多核苷酸构建物中,例如在单独(不同)载体上。此外,任何载体均能包含单一编码区,或可包含两个或更多个编码区,例如,单一载体可分开编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外,载体、多核苷酸或核酸可包括异源性的编码区,其融合或未融合至另一个编码区。异源性的编码区包括不限于,编码专有的元件或基序(例如分泌信号肽或异源性的功能结构域)的那些。

[0044] 在某些实施方式中,所述多核苷酸或核酸是DNA。对DNA而言,包含多肽编码核酸的多核苷酸通常包含启动子和/或其它转录或翻译控制元件,这些元件与一个或多个编码区操作性连接。操作性连接指当基因产物如多肽的编码区与一个或多个调控序列以此方式连接时,将该基因产物的表达置于该调控序列的影响或控制下。如果启动子功能的诱导使编码所需基因产物的mRNA转录,且如果两个DNA片段间连接的属性不干扰表达调控序列指导基因产物表达或不干扰转录DNA模板的能力,则两个DNA片段(如多肽编码区及其相连的启动子)“操作性连接”。因此,如果启动子能够影响核酸的转录,则启动子区域与多肽编码核酸操作性连接。启动子可以是在预定细胞中指导DNA实质转录的细胞特异性启动子。启动子以外的其它转录控制元件如增强子、操纵子、阻遏物和转录终止信号,能与多核苷酸可操作连接以指导细胞特异性转录。

[0045] 多种转录控制区对于本领域技术人员而言是已知的。它们包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥作用的转录控制区,例如但不限于,来自巨细胞病毒(立即早期启动子,与内含子-A联用)、猿病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(如劳氏肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其它转录控制区包括源自脊椎动物基因的那些,例如肌动蛋白、热激蛋白、牛生长激素和兔 β -球蛋白,以及能够控制真核细胞中的基因表达的其它序列。其它合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导型启动子(例如,通过干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0046] 类似地,本领域普通技术人员了解各种翻译控制元件。它们包括但不限于:核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子以及衍生自小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0047] 在其它实施方式中,多核苷酸可以是RNA,例如,信使RNA(mRNA)、转移RNA或核糖体RNA的形式。

[0048] 多核苷酸和核酸编码区可与编码分泌或信号肽的其它编码区相关联,所述编码分泌或信号肽引导本文所述的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说,哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦生长的蛋白质链跨粗面内质网的输出启动,所述序列从成熟蛋白质上切除。本领域普通技术人员了解,脊椎动物细胞分泌的多肽可具有融合于所述多肽N末端的信号肽,它们从完整或“全长”多肽上切割产生分泌或“成熟”形式的多肽。在某些实施方式中,使用天然信号肽,例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或者使用仍然能够指导与其操作性相连多肽分泌的该序列的功能衍生物。或者,可采用异源性的哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可用小鼠 β -葡萄糖醛酸酶或人组织纤溶酶原激活剂(TPA)的前导序列取代。

[0049] 本文中所述的术语“TNF超家族受体蛋白”、“TNFSFR”、“TNF受体家族”、“TNF受体”

或此类短语的任何组合,指的是在多种细胞和组织的表面上表达的肿瘤坏死因子跨膜受体蛋白的家族。该超家族的家族成员包括,在通过配体结合或激动剂抗体结合而活化之后可引发表达所述受体蛋白的细胞中的活化、炎症反应、凋亡(或抑制凋亡)、增殖和/或形态发生的成员。TNFSFR包括,但不限于:TNFR1(DR1)、TNFR2、TNFR1/2、CD40(p50)、Fas(CD95、Apo1、DR2)、CD30、4-1BB(CD137、ILA)、TRAILR1(DR4、Apo2)、TRAILR2(DR5)、TRAILR3(DcR1)、TRAILR4(DcR2)、OPG(OCIF)、TWEAKR(FN 14)、LIGHTR(HVEM)、DcR3、DR3、EDAR、XEDAR、LT- β R、GITR(AITR)、TACI、BCMA、CD27、OX40(CD134)、RANK(TRANCER)、RELT、和BAFF-R。参见,例如, Wajant, H. Cell Death and Differentiation 22:1727-1741 (2015)。

[0050] 本文公开了某些结合分子或其抗原结合片段,变体或衍生物,其激动性结合TNFSFR OX40,并因此可在表达OX40的活化CTL中引发例如增殖和增强的效应功能,和(例如在肿瘤周围的微环境中)引发通过CD25+CD4+FoxP3+Treg的免疫抑制缺陷,因此促进抗肿瘤免疫。除非特定地提及全尺寸抗体,否则术语“结合分子”涵盖全尺寸抗体以及所述抗体的抗原结合亚基、片段、变体、类似物或衍生物,例如,以类似于抗体分子的方式结合抗原但采用不同的支架的工程改造的抗体分子或片段。

[0051] 人OX40的同种型1的前体形式包含氨基酸序列SEQ ID NO:7(UniProtKB/Swiss-Prot:P43489.1)。成熟蛋白质包括SEQ ID NO:7的氨基酸29至277,并且氨基酸1-28包含信号肽。人OX40的胞外结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸29至214。人OX40的跨膜结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸215至235。人OX40的胞质结构域包括SEQ ID NO:7的氨基酸236至277。SEQ ID NO:7:

[0052] MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCPKCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI

[0053] 鼠OX40的前体形式包含氨基酸序列SEQ ID NO:8(NCBI参考序列:NP_035789.1)。成熟蛋白质包括SEQ ID NO:8的氨基酸20至272,并且氨基酸1-19包含信号肽。鼠OX40的胞外结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸20至211。鼠OX40的跨膜结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸212至236。鼠OX40的胞质结构域包括SEQ ID NO:8的氨基酸237至272。SEQ ID NO:8:

[0054] MYVWVQQPTALLLLGLTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPTLVTPEGPAFAVLLGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNFSRFTPIQEEHTDAHFTLAKI

[0055] 本文中所述的术语“结合分子”以其最宽泛的含义指特异性结合至受体(例如,表位或抗原决定簇)的分子。如本文进一步描述,结合分子可包含本文所述的多种“抗原结合结构域”之一。结合分子的非限制性示例是抗体或其保持抗原-特异性结合性的片段。

[0056] 本文中所述的术语“结合结构域”或“抗原结合结构域”指的是必需且足以特异性结合至表位的结合分子的区域。例如,“Fv”,例如,抗体的可变重链和可变轻链,以两个分开多肽亚基或作为单一链形式,被视作是“结合结构域”。其它结合结构域包括,但不限于,源自骆驼科物种的抗体的可变重链(VHH),或在纤连蛋白支架上表达的六个免疫球蛋白互补决定区(CDR)。本文所述的“结合分子”可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八

个、九个、十个、十一个、十二个或更多个“抗原结合结构域”。

[0057] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体(或其片段、变体或衍生物,如本文所述)包括:至少重链的可变区(对于骆驼科物种而言)或至少重链和轻链的可变区。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对较好地了解的。参见例如,Harlow等,《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1988)。除非另有说明,术语“抗体”涵盖从抗体的小抗原结合片段到全尺寸抗体的范围内的任何物质,例如,IgG抗体,其包括两个完整重链和两个完整轻链,IgA抗体,其包括四个完整重链和四个完整轻链,并且任选地包括J链和/或分泌型组分,或IgM抗体,其包括十个或十二个完整重链和十个或十二个完整轻链且任选地包括J链。

[0058] 正如下文中更详细讨论,术语“免疫球蛋白”包括可通过生化性质区分的各种类型多肽。本领域技术人员应理解,重链分为gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ),其中还有一些亚类(如 $\gamma 1-\gamma 4$ 或 $\alpha 1-\alpha 2$)。该链的特性决定抗体“同种型”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(亚型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等已被充分表征,且已知赋予功能特化。根据本文公开内容,本领域技术人员能容易地区分这些免疫球蛋白各自的经修饰形式,从而,它们涵盖在本发明范围内。

[0059] 轻链分类为 κ 或 λ (kappa或lambda)。各重链类别可与 κ 或 λ 轻链结合。通常,轻链和重链互相共价结合,并且当由例如杂交瘤、B细胞或遗传工程改造的宿主细胞表达免疫球蛋白时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价连接结合在一起。在重链中,氨基酸从Y构型的分叉末端处的N-端到各条链的底部处的C-端。某些抗体(例如,IgG抗体)的基础结构包括两条重链亚基和两条轻链亚基,其通过二硫键共价连接以形成“Y”结构,也在本文中称为“H2L2”结构,或“结合单元”。

[0060] 术语“结合单元”在本文中用于指结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段,的部分,其对应于标准“H2L2”免疫球蛋白结构,即,两个重链或其片段和两个轻链或其片段。在例如其中所述结合分子是二价IgG抗体或其抗原结合片段的某些方面中,术语“结合分子”和“结合单元”是等同的。在例如其中所述结合分子是IgA二聚体、IgM五聚体或IgM六聚体的其它方面中,所述结合分子包含两个或更多个“结合单元”。分别地,在IgA二聚体的情况中是两个,或在IgM五聚体或六聚体的情况中是五个或六个。结合单元不必包括全长抗体重链和轻链,但通常将是二价的,即,将包括两个“结合结构域”,如上定义。如本文所用,本发明提供的某些结合分子是“二聚的”,并且包括两个二价结合单元,其包括IgA恒定区或其片段。本文提供的某些结合分子是“五聚的”或“六聚的”,并且包括五个或六个二价结合单元,其包括IgM恒定区或其片段。包含两个或更多个,例如,两个、五个或六个结合单元的结合分子,在本文中称为“多聚的”。

[0061] 术语“价”、“二价”、“多价”和语法等同形式,指的是给定的结合分子或结合单元中的结合结构域的数量。如此,述及给定的结合分子,例如,IgM抗体或其片段,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示存在两个结合结构域、四个结合结构域,和六个结合结构域。在其中各结合单元是二价的典型的IgM源性的结合分子中,该结合分子本身可具有10或12价。二价或多价结合分子可以是单特异性的,即,所有的结合结构域均是相同的,或可以是双特异性的或多特异性的,例如,其中两个或更多个结合结构域是不同的,例如,结合至相同的抗

原上的不同的表位,或结合至完全不同的抗原。

[0062] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何分子决定簇。在某些方面中,表位可包括分子的化学活性的表面基团(例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基基团),而在某些方面中,表位可具有一定的三维结构特点和/或特定的电荷特点。表位是由抗体结合的靶标的区域。

[0063] 术语“靶标”以最广泛的含义使用以包括可由结合分子结合的物质。靶标可以是,例如,多肽、核酸、碳水化合物、脂质或其它分子。此外,例如,“靶标”可以是包含可被结合分子结合的表位的细胞、器官或生物体。

[0064] 轻链和重链都被划分成具有结构和功能同源性的区域。从功能角度使用术语“恒定”和“可变”。在这方面,应理解可变轻(VL)链或可变重(VK)链部分的可变区决定抗原识别和特异性。相反,轻链的恒定区(CL)和重链的恒定区(例如,CH1、CH2或CH3)提供生物学特性,例如分泌、经胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照习惯,恒定区结构域的编号随着远离抗原结合位点或抗体的N末端而增加。N末端部分是可变区,并且C末端部分是恒定区;CH3(或者,在IgM的情况中,CH4)和CL结构域实际上分别包括重链和轻链的羧基端。

[0065] “全长IgM抗体重链”是这样的多肽,其以N末端向C末端的方向包括,抗体重链可变结构域(VH)、抗体重链恒定结构域1(CM1或C μ 1)、抗体重链恒定结构域2(CM2或C μ 2)、抗体重链恒定结构域3(CM3或C μ 3),和抗体重链恒定结构域4(CM4或C μ 4),其可包括尾片段。

[0066] “全长IgA抗体重链”是这样的多肽,其以N末端向C末端的方向包括,抗体重链可变结构域(VH)、抗体重链恒定结构域1(CA1或C α 1)、抗体重链恒定结构域2(CA2或C α 2),和抗体重链恒定结构域3(CA3或C α 3),其可包括尾片段。

[0067] 如上所述,一个或多个可变区允许结合分子选择性地识别抗原上的表位并特异性地结合该表位。即,VL结构域和VH结构域或结合分子(例如,抗体)的互补决定区(CDR)的子集组合,以形成抗原结合结构域。更具体地,所述抗原结合结构域可由各VH和VL链上的三个CDR确定。某些抗体形成较大结构。例如,IgA可形成这样的分子,该分子包括两个H2L2结合单元和通过二硫键共价连接的J链,其还可与分泌型组分相关联,并且,IgM可形成这样的五聚或六聚分子,该分子包括五个或六个H2L2结合单元和任选的通过二硫键共价连接的J链。

[0068] 抗体抗原结合结构域中存在的六个“互补决定区”或“CDR”是氨基酸的非连续短序列,其特异性地定位,以随着抗体在水性环境中采用其三维构型而形成结合结构域。结合结构域中的其余氨基酸称为“构架”区,显示较小的分子间差异。构架区主要采用 β -片层构象,并且CDR形成连接 β -片层结构且在某些情况下形成 β -片层结构的部分的环。因此,构架区用于通过链间非共价相互作用形成为CDR提供正确方向位置的支架。由定位的CDR形成的结合结构域确定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促进了抗体与其互补表位的非共价结合。分别组成CDR和构架区域的氨基酸,可由本领域普通技术人员通过任何给定的重或轻链可变区而容易地鉴定,因为它们已以多种不同的方式被定义(参见,“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”,Kabat,E.等,美国卫生及公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services),(1983);和Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196:901-917(1987),其通过引用其全文纳入本文)。

[0069] 除非明确表述为相反的含义,否则在本领域内所使用和/或接受的某一术语有两种或多种定义的情况下,本文所用的术语定义应包括所有这些含义。具体示例是使用术语

“互补决定区”(“CDR”)描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非毗连抗原结合位点。这些具体的区域已被描述,例如,由Kabat等,美国卫生及公共服务部,“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”(1983),和由Chothia等, J.Mol.Biol.196:901-917(1987),其通过引用纳入本文。Kabat和Chothia定义包括氨基酸在彼此比较时的重叠或子集。不过,除非另有说明,述及抗体或其变体的CDR的定义(或本领域普通技术人员已知的其它定义)意图落在本文定义或所用的术语范围之内。合适的氨基酸残基包括上文引用的各参考文献中定义的CDR,如下表1所示以作对比。涵盖具体CDR的确切氨基酸编号将根据CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员能够常规地确定哪些氨基酸包含具体CDR。

[0070] 表1CDR定义*

[0071]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0072] *表1中所有CDR定义的编号均按照Kabat等所述的编号规则。(见下文)。

[0073] Kabat等还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员能明确地将所述“Kabat编号”系统应用于任何可变区序列,而不依赖序列本身外的任何实验数据。本文所用的“Kabat编号”指由Kabat等,美国卫生与公众服务部,“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”(1983)中所述的编号系统。除非明确注明采用Kabat编号系统,否则,对本公开的全部氨基酸序列采用连贯的编号。

[0074] 结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,包括但不限于,多克隆、单克隆、人、人源化的或嵌合抗体、单一链抗体、表位-结合片段,例如,Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fvs、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、通过Fab表达文库产生的片段。ScFv分子是本领域已知的,并且描述于例如美国专利号5,892,019。

[0075] “特异性结合”一般表示结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物通过其抗原结合结构域结合表位,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间的一些互补性。按照这一定义,当结合分子通过其抗原结合结构域与表位结合比其与随机、无关的表位结合更容易时,称该结合分子“特异性结合”该表位。本文中使用的术语“特异性”定性分析某一抗体与某一表位结合的相对亲和性。例如,可认为结合分子“A”比结合分子“B”对给定表位具有更高特异性,或者说结合分子“A”以比其对相关表位“D”的特异性更高的特异性结合表位“C”。

[0076] 可以说结合分子,例如,本文公开的抗体或其片段、变体或衍生物,以小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-2}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-3}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-4}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 或 10^{-5}秒^{-1} 至 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 。

10^{-6}秒^{-1} 、 10^{-6}秒^{-1} 、 $5\times 10^{-7}\text{秒}^{-1}$ 或 10^{-7}秒^{-1} 的解离速率(k(off))结合靶标抗原。

[0077] 可以说本文公开的结合分子,例如,抗体或抗原结合片段、变体或衍生物,以大于或等于 $10^3\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $5\times 10^3\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $10^4\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $5\times 10^4\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $10^5\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $5\times 10^5\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 或 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$ 的结合速率(k(on))结合靶标抗原。

[0078] 如果结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,以一定程度上阻断参比抗体或抗原结合片段与表位的结合的程度优先结合该表位,则可以说,该结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物竞争性地抑制参比抗体或抗原结合片段与给定的表位的结合。可通过本领域已知的任意方法确定竞争性抑制,例如,竞争ELISA试验。可以说,结合分子竞争性地抑制参比抗体或抗原结合片段与给定表位的至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%的结合。

[0079] 本文所用的术语“亲和性”指单独表位与例如免疫球蛋白分子的一个或多个结合结构域结合的强度量度。参见例如,Harlow等,《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1988),第27-28页。本文中使用的术语“亲和力(avidity)”指的是结合结构域的群和抗体之间的复合物的总体稳定性。参见,例如,Harlow,第29-34页。亲合力既与群体中单独结合结构域与特定表位的亲和性相关,也与免疫球蛋白分子和抗原的价态相关。例如,二价单克隆抗体和具有高度重复表位结构的抗原例如多聚体之间的相互作用是具有高亲合力的一个例子。二价单克隆抗体与以高密度存在于细胞表面上的受体之间的相互作用也将具有高亲合力。

[0080] 本文公开的结合分子或其抗原结合片段、变体或衍生物也可就其交叉反应性进行描述或说明。本文所用的术语“交叉反应性”指,结合分子(例如抗体或其片段、变体或衍生物)对某一种抗原具有特异性、与第二种抗原发生反应的能力;它是两种不同抗原性物质之间关联性的量度。因此,如果结合分子与诱导其形成的表位以外的其他表位结合,则具有交叉反应性。交叉反应性表位通常含有许多与诱导表位相同的互补结构特征,在某些情况下甚至比原始表位更匹配。

[0081] 结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物还可就它们与抗原的结合亲和性来描述或说明。例如,结合分子可以不超过 $5\times 10^{-2}\text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5\times 10^{-3}\text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5\times 10^{-4}\text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5\times 10^{-5}\text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5\times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5\times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5\times 10^{-8}\text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5\times 10^{-9}\text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5\times 10^{-10}\text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5\times 10^{-11}\text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5\times 10^{-12}\text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5\times 10^{-13}\text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5\times 10^{-14}\text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5\times 10^{-15}\text{M}$ 或 10^{-15}M 的解离常数或 K_D 结合抗原。

[0082] 包括单链抗体或其它结合结构域的抗体片段可单独存在或以如下一种或多种的组合的形式存在:铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链,或分泌型组分。还包括抗原结合片段,其可包括一个或多个可变区与铰链区、CH1、CH2、CH3或CH4结构域、J链或分泌型组分中的一个或多个的任何组合。结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段,可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。所述抗体可以是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方式中,可变区可以是软骨鱼(condricthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。本文中使用的“人”抗体包括,具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,且包括从人免疫球蛋白文库分离的或来自一种或多种人免疫球蛋白的动物转基因的抗体,并且其可在一些示例中表达内源性免疫球蛋白,但一些则不是,如下文所述,例如,描述于Kucherlapati等的

美国专利号5,939,598。

[0083] 本文中所述的术语“重链亚基”包括这样的氨基酸序列,其源自免疫球蛋白重链、结合分子,例如,包含重链亚基的抗体,可包括如下至少一项:VH结构域、CH1结构域、铰链(例如,上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域,或其变体或片段。例如,结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,除了VH结构域以外,还可包括但不限于:CH1结构域;CH1结构域,铰链和CH2结构域;CH1结构域和CH3结构域;CH1结构域,铰链和CH3结构域;或CH1结构域,铰链结构域,CH2结构域和CH3结构域。在某些方面中,结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物,除VH结构域以外,还可包括,CH3结构域和CH4结构域;或CH3结构域,CH4结构域和J链。此外,用于本公开的结合分子可缺乏某些恒定区部分,例如,CH2结构域的全部或部分。本领域普通技术人员应理解,可修饰这些结构域(例如重链亚基),从而其氨基酸序列不同于原始免疫球蛋白分子。

[0084] 本文所用的术语“轻链亚基”包括衍生自免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。轻链亚基包括至少VL,并且还可包括CL(例如,C_K或C_λ)结构域。

[0085] 结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可就它们识别或特异性结合的表位或抗原部分进行描述或说明。靶抗原与抗体的抗原结合结构域特异性相互作用的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶抗原可包含单个表位,或至少两个表位,并可包括任意数量的表位,这取决于抗原的大小、构象和类型。

[0086] 如前所述,各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。本文所用的术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变区,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最靠氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域邻近VH结构域,并且位于典型IgG重链分子的铰链区的氨基末端。

[0087] 本文所用的术语“CH2结构域”包括这样的重链分子部分,其例如从IgG抗体的约氨基酸244延伸到氨基酸360,采用常规的编号方案(氨基酸244至360,Kabat编号系统;和氨基酸231-340,EU编号系统;参见Kabat EA等,同前)。CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C末端并且包含约108个氨基酸。某些免疫球蛋白类别,例如,IgM,还包括CH4区。

[0088] 本文中所述的术语“铰链区”包括在IgG、IgA和IgD重链中将CH1结构域接合至CH2结构域的重链分子的部分。该铰链区包含约25个氨基酸并且是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区域独立地移动。

[0089] 本文所用的术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可形成二硫键或桥接第二巯基基团的巯基基团。

[0090] 本文所用的术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中免疫反应性区域或位点获自或衍生自第一物种,而恒定区(其可能是完整、一部分或修饰的)获自第二物种。在一些实施方式中,靶标结合区或位点将是来自非人来源(例如,小鼠或灵长类)并且恒定区是人的。

[0091] 术语“多特异性抗体”或“双特异性抗体”指的是在单一抗体分子中具有针对两个或更多个不同的表位的结合结构域的抗体。可构建除了标准抗体结构以外的具有两种结合特异性的其它结合分子。由双特异性抗体或多特异性抗体进行的表位结合可以是同时或相继的。三元杂交瘤(trioma)和杂合杂交瘤是可分泌双特异性抗体的细胞系的两个示例。双特异性抗体还可通过重组手段构建。(Ströhlein和Heiss,Future Oncol.6:1387-94(2010); Mabry和Snavely,IDrugs.13:543-9(2010))。双特异性抗体也可以是双特异抗体

(diabody)。

[0092] 本文中所述的术语“工程改造的抗体”指的是这样的抗体,其中重链和轻链之一或两者中的可变区通过在CDR或构架区域的一个或多个氨基酸的至少部分替代而被改变。在某些方面中,来自具有已知特异性的抗体的整个CDR可被移植到异源性抗体的构架区域中。虽然替代性的CDR可衍生自与产生构架区的抗体属于同一类或甚至亚类的抗体,但CDR仍可衍生自不同类别的抗体,例如,不同物种的抗体。将来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链构架区内形成的工程改造的抗体在本文中称为“人源化抗体”。在某些方面,并非全部CDR由来自供体可变区的完整CDR替代,而供体的抗原结合能力仍可被转移至受者可变结构域。鉴于例如美国专利号5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370中给出的解释,本领域技术人员完全有能力通过进行常规实验法或通过试验和误差检定来获得功能工程改造的或人源化的抗体。

[0093] 本文所用的术语“工程改造的”包括通过合成手段(例如通过重组技术、体外肽合成,通过酶或化学偶联肽,或这些技术的一些组合)进行的核酸或多肽分子的操作。

[0094] 本文中所述的术语“连接的”、“融合的”或“融合(体)”或其它语法等同形式可互换使用。这些术语指表示包括化学偶联或重组方式在内的各种方式将两个或更多元件或组件接合在一起。“框内融合”指以维持原始多核苷酸开放阅读框(ORF)翻译读框的方式,将两个或多个ORF连接形成连续的较长ORF。因此,重组融合蛋白是包含两个或多个区段的单一蛋白质,所述区段对应原始ORF编码的多肽(这些区段在自然条件下通常不如此连接)。尽管因此阅读框在融合片段中是连续的,但区段仍可被物理或空间分隔,如框内接头序列。例如,编码免疫球蛋白可变区CDR的多核苷酸可框内融合,但用编码至少一个免疫球蛋白构架区或额外CDR区的多核苷酸间隔开,前提是“融合的”CDR作为连续多肽的一部分共同翻译。

[0095] 本文中所述的术语“交联的”指的是两个或更多个分子通过第三分子接合在一起。例如,具有特异性结合至相同的抗原的两个结合结构域的二价抗体可“交联”该抗原的两个拷贝,例如,当它们表达在细胞上时。通过TNFSFR的信号转导通常需要使三种或更多种受体单体紧密接近细胞表面。这通过受体单体经由同源三聚体配体的接合而自然实现。典型的二价IgG抗体仅能够与细胞表面上的两种TNFSFR单体接合,因此这种二价抗体必须自身交联以有效激活受体。这种交联可以例如用结合二价抗体Fc区的二抗完成或通过Fc γ 受体完成。如本文所用的“二级交联部分”可以是能够交联结合分子的任何物质,例如对TNFSFR特异的结合分子。本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子在单个共价分子中包含最多四个,十个或十二个相同的抗原结合结构域。每个抗原结合结构域可以与TNFSFR单体接合,使单体紧密聚类。因此,本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子可以例如同时特异性结合并交联至少三个,例如四个,十个或十二个TNFSFR,从而在没有二级交联部分的情况下激活信号转导。

[0096] 对于多肽而言,“线性序列”或“序列”是多肽中从氨基到羧基末端方向上氨基酸的顺序,在序列中彼此相邻的氨基酸是多肽一级结构中的毗连残基。多肽的部分位于在连续的多肽链中出现得较早的多肽的另一部分的“氨基末端”或“N末端”。类似地,多肽的部分位于在连续的多肽链中出现得较晚的多肽的另一部分的“羧基末端”或“C末端”。例如,在典型的抗体中,可变区位于恒定区的“N末端”,并且恒定区位于可变区的“C末端”。

[0097] 本文所用的术语“表达”指基因产生生物物质如多肽的过程。该过程包括在细胞内

基因功能存在的任何表现,包括但不限于,基因敲减以及瞬时表达和稳定表达。它包括但不限于,基因转录成RNA,例如信使RNA (mRNA),和将这类mRNA翻译成多肽。如果所需的最终产物是生化物质 (biochemical),则表达包括产生该生化物质和任何前体。基因的表达产生“基因产物”。本文中所述的基因产物可以是核酸,例如,通过基因转录产生的信使RNA,或由转录本翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰的核酸,例如聚腺苷酸化,或具有翻译后修饰的多肽,如甲基化、糖基化、加入脂质、连接其它蛋白质亚基、经蛋白酶水解切割等。

[0098] 术语例如“处理”或“治疗”或“以治疗”或“缓解”或“以缓解”指的是治愈、减缓、减少现存的已经诊断的病理病症或紊乱的症状,和/或截停或减缓现存的已经诊断的病理病症或紊乱的进展的治疗性措施。术语例如“预防”、“防御”、“避免”、“遏制”等指的是预防未经诊断的目标病理病症或紊乱的进展的预防性的或预防用的措施。因此,需要治疗的那些(对象)敏可包括已经患有疾病的那些(对象);易于患有疾病的那些(对象);和需要预防疾病的那些(对象)。

[0099] “对象”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”指需要诊断、预防或治疗的任何对象,特别是哺乳动物对象。哺乳动物对象包括人、家养动物、家畜和动物园动物、竞技动物或宠物,如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、猪、奶牛、熊等。

[0100] 本文中所述的短语例如“将受益于治疗的对象”和“有治疗需求的动物”是指来自所有预期对象的对象亚组,其将受益于给定治疗剂,例如包含一个或多个抗原结合结构域的结合分子如抗体的给予。所述结合分子,例如,抗体,可用于,例如,诊断性操作方法和/或用于疾病的治疗或预防。

[0101] IgM结合分子

[0102] IgM是由B细胞响应抗原刺激产生的第一种免疫球蛋白,并且以约1.5mg/ml在血清中以5天的半衰期存在。IgM是五聚或六聚分子。IgM结合单元包括两个轻和两个重链。尽管IgG包含三个重链恒定结构域(CH1、CH2和CH3),IgM的重(μ)链还包含第四恒定结构域(CH4),其包括C末端“尾片段”。人IgM恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:1。人C μ 1区的范围是SEQ ID NO:1的约氨基酸5至约氨基酸102;人C μ 2区的范围是SEQ ID NO:1的约氨基酸114至约氨基酸205,人C μ 3区的范围是SEQ ID NO:1的约氨基酸224至约氨基酸319,C μ 4区的范围是SEQ ID NO:1的约氨基酸329至约氨基酸430,并且所述尾片段的范围是SEQ ID NO:1的约氨基酸431至约氨基酸453。SEQ ID NO:1如下所示:

[0103] GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATS
QVLLPSKDVMTGDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVI AELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICATGFSRQIQV
SWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLT IKESDWLQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVDPQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKHTHTNISESHPNATFSAVGEAS
ICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDPVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLY
NVSLVMSDTAGTCY

[0104] 五个IgM结合单元可与另一个小多肽链(J链)形成复合物,以形成IgM抗体。人J链包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。在没有J链的情况下,IgM结合单元通常组装成六聚体。尽管不希望受理论限制,认为IgM结合单元组装成五聚或六聚结合分子涉及C μ 3和C μ 4结构域。因此,本发明提供的五聚或六聚结合分子通常包括IgM恒定区,其包括至少C μ 3和C μ 4结构域。

SEQ ID NO:2如下所示:

[0105] MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNR
ENISDPTSPLRTRFRVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKM
VETALTPDACYPD

[0106] IgM重链恒定区还可包括C_μ2结构域或其片段、C_μ1结构域或其片段和/或其它IgM重链结构域。在某些方面中,本文提供的结合分子可包括完整IgM重(μ)链恒定结构域,例如,SEQ ID NO:1或其变体、衍生物或类似物。

[0107] 激动性五聚或六聚OX40结合分子

[0108] 本发明提供五聚或六聚结合分子,即具有如本文所定义的五或六个“结合单元”的结合分子,其可特异性结合三个或更多个,例如四个或更多个,例如五个,六个,七个,八个,九个,十个,十一个或十二个OX40单体,例如鼠和/或人OX40单体。在OX40表达于细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL)的某些方面,本文提供的五聚或六聚结合分子可以充分接合该细胞上的多个,例如三个或更多个OX40单体以在不存在二级交联部分的情况下引发信号转导途径,从而诱导抗肿瘤免疫。相较于由单一结合单元组成的结合分子,例如,二价IgG抗体,本文提供的结合分子可具有改善的结合特点或生物活性。例如,五聚或六聚结合分子可以更高效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,和/或在不存在二级交联部分(例如但不限于FcγR)的情况下,可以有效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,从而促进抗肿瘤免疫。

[0109] 本文提供的结合分子可同样地具有与由合成或嵌合结构组成的多价结合分子不同的特点。例如,相对于包含嵌合恒定区或合成结构的结合分子,人IgM恒定区的应用可提供减少的免疫原性,从而,增加的安全性。此外,基于IgM的结合分子可以持续地形成六聚或五聚寡聚体,产生更高同源性的表达产物。更优的补体固定也可以是基于IgM的结合分子的有利的效应功能。

[0110] 在某些方面中,本发明提供五聚或六聚结合分子,其分别包含五个或六个二价结合单元,其中各结合单元包括两个IgM重链恒定区或其片段。在某些方面中,两个IgM重链恒定区是人重链恒定区。

[0111] 如果所述本文提供的结合分子是五聚的,则该结合分子还可包含J链,或其片段,或其变体。在某些方面,可以修饰J链,如本文其他地方所讨论的。

[0112] IgM重链恒定区可包括以下的一个或多个:C_μ1结构域或其片段或变体、C_μ2结构域或其片段或变体、C_μ3结构域或其片段或变体、和/或C_μ4结构域或其片段或变体中,限制条件是,所述恒定区可在该结合分子中提供所需功能,例如,与第二IgM恒定区相关联以形成结合结构域,或与其它结合单元相关联以形成六聚体或五聚体。在某些方面,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段或变体各包含C_μ3结构域或其片段或变体、C_μ4结构域或其片段或变体、尾片段(TP)或其片段或变体,或C_μ3结构域C_μ结构域和TP或它们的片段或变体的任何组合。在某些方面,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段或变体还各自包含C_μ2结构域或其片段或变体、C_μ1结构域或其片段或变体,或C_μ1结构域或其片段或变体和C_μ2结构域或其片段或变体。

[0113] 在某些方面中,给定的结合单元中的两个IgM重链恒定区各自与抗原结合结构域,例如抗体的F_v部分,例如,人或鼠抗体的V_H和V_L相关联,其中,所述V_L可以与轻链恒定区相

关联。在本文提供的结合分子中,结合分子的至少三个抗原结合结构域是OX40结合结构域,其可以特异性地和激动性地结合OX40,例如人和/或鼠OX40。

[0114] IgA结合分子

[0115] IgA在粘膜免疫中起关键作用,并且占产生的总免疫球蛋白的约15%。IgA是单体或二聚分子。IgA结合单元包括两条轻链和两条重链。IgA包含三个重链恒定结构域(C α 1、C α 2和C α 3),并且包括C末端“尾片段”。人IgA具有两个亚型,IgA1和IgA2。人IgA1恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:3。人C α 1区的范围是SEQ ID NO:3的约氨基酸6到约氨基酸98;人C α 2区的范围是SEQ ID NO:3的约氨基酸125到约氨基酸220,人C α 3区的范围是SEQ ID NO:3的约氨基酸228到约氨基酸330,并且所述附属物的范围是SEQ ID NO:3的约氨基酸331到约氨基酸352。人IgA2恒定区通常包含氨基酸序列SEQ ID NO:4。人C α 1区的范围是SEQ ID NO:4的约氨基酸6到约氨基酸98;人C α 2区的范围是SEQ ID NO:4的约氨基酸112到约氨基酸207,人C α 3区的范围是SEQ ID NO:4的约氨基酸215到约氨基酸317,并且所述附属物的范围是SEQ ID NO:4的约氨基酸318到约氨基酸340。SEQ ID NO:3和4如下所示:

[0116] SEQ ID NO:3

[0117] ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQ
LTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLL GSEANLT
CTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSG
NTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRV
AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0118] SEQ ID NO:4

[0119] ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQ
LTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGAT
FTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGCYSVSSVLPGCAQPNWHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPP
SEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAEDWKKGDTFSC
MVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0120] 两个IgA结合单元可与两个其它多肽链,J链(SEQ ID NO:2)和分泌型组分(前体,SEQ ID NO:5,成熟,SEQ ID NO:6)形成复合物,以形成分泌IgA(sIgA)抗体。尽管不希望受理论限制,认为IgA结合单元向二聚sIgA结合分子的组装涉及C α 3和尾片段结构域。因此,本公开提供的二聚sIgA结合分子通常包括IgA恒定区,其包括至少C α 3和尾片段结构域。SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6如下所示:

[0121] SEQ ID NO:5:

[0122] MLLFVLTCLLAVFPAISTKSPIFGPEEVNSVEGNSV SITCYPPPTSVNRHTRKYWCRQGARGGCITLIS
SEGYVSSKYAGRANLTFPENGTFVVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGR
TVTINCPFKTENAQRKRSLYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPNTGRIRLDIQGTGQLLFSVINQLRLSDAGQYLCQAG
DDSNSNKKNADLQVLKPEPELVYEDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVVNTLGKRAPAFEGRILLN
PQDKDGSFSVITGLRKEDAGRYLCAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCYPYRKE
SKSIKYWCLWEGAQNGRCPLLVDSEGWVKAQYEGRLSLLPEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVE
IKIIEGEPNLKVPGNVAVLGETLKVPCHPCKFSSYEKYWCKWNNTGCQALPSQDEGPSKAFVNCENSRLVSLTL
NLVTRADEGWYWCVKQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVS LAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAIQDPRLF AEE

KAVADTRDQADGSRASVDSGSSEEQGGSSRALVSTLVPLGLVLAVGAVAVGVARARHRKNVDRVSIRSyrTDISMSD
FENSREFGANDNMGASSITQETSLLGGKEEFVATTESTTETKEPKKAKRSSKEEAEMAYKDFLLQSSTVAEEAQDGPQ
EA

[0123] SEQ ID NO:6:

[0124] KSPIFGPEEVNSVEGNSVSITCYYPPTSVNRHTRKYWCRQGARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTFN
PENGTFVVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGRTVTINCPFKTENAQRKS
LYKQIGLYPVLVIDSSGYVNPNTGRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCQAGDDSNKKNADLQVLKPE
PELVYEDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEGRILLNPQDKDGSFVSVITGLRKE
DAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAVLCYPYRKEKSIKYWCLWEQAQNGRC
PLLVDSEGWVKAQYEGRLSLLLEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNLKVPGNVTA
VLGETLKVPCHPCKFSSYEKYWCKWNNTGCQALPSQDEGSPKAFVNCDENSRLVSLTLNLVTRADEGWYWCQVKQG
HFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVS LAKADAAPDEKVLDSGFREIENKAIQDPR

[0125] IgA重链恒定区还可包括Ca2结构域或其片段、Ca1结构域或其片段,和/或其它IgA重链结构域。在某些方面中,本文提供的结合分子可包括完整IgA重(α)链恒定区(例如,SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4)或其变体、衍生物或类似物。

[0126] 激动性二聚OX40结合分子

[0127] 本发明提供二聚结合分子,例如,具有本文定义的两个IgA“结合单元”的结合分子,其可特异性结合至3个或更多个或多至4个OX40单体,例如,人或鼠OX40单体。在OX40表达于细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL)的某些方面,使细胞上的多个OX40受体与本文提供的结合分子接触可以在不存在二级交联部分的情况下引发信号转导途径,从而诱导抗肿瘤免疫。相较于由单一结合单元组成的结合分子,例如,二价IgG抗体,本文提供的二聚结合分子可具有改善的结合特点或生物活性。例如,IgA结合分子可以更高效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,和/或在不存在二级交联部分(例如但不限于Fc γ R)的情况下,可以有效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,从而促进抗肿瘤免疫。此外,IgA结合分子可到达粘膜位点,提供本文提供的结合分子的更大的组织分布。基于IgA的结合分子的应用可允许,例如,本文提供的结合分子的更大的组织分布。粘膜分布对于到达某些癌症,例如,肺癌、卵巢癌、结直肠癌或鳞状细胞癌的肿瘤微环境而言可能是有益的。同样地,本文提供的二聚结合分子可具有可与包含五个或六个结合单元的结合分子(例如,六聚或五聚IgM抗体)区分开的结合特点或生物活性。例如,二聚结合分子将更小,从而能够,例如,实现实体肿瘤中更好的组织穿透。

[0128] 在某些方面中,本发明提供二聚结合分子,其包含两个二价结合单元,其中各结合单元包括两个IgA重链恒定区或其片段或变体。在某些方面,两个IgA重链恒定区是人重链恒定区。

[0129] 本文提供的二聚IgA结合分子还可包含J链,或其片段,或其变体,例如本文其他地方公开的修饰的J链。本文提供的二聚IgA结合分子还可包含分泌型组分,或其片段,或其变体。

[0130] IgA重链恒定区可包括Ca1结构域、Ca2结构域和/或Ca3结构域中的一个或多个,限制条件是,所述恒定区可在该结合分子中发挥所需功能,例如,与轻链恒定区相关联以促进抗原结合结构域的形成,或与另一个IgA结合单元相关联以形成二聚结合分子。在某些方面

中,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段或变体各自包含Ca3结构域或其片段或变体、尾片段(TP)或其片段或变体,或Ca3结构域、TP或它们的片段或变体的任何组合。在某些方面,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段或变体还各自包含Ca2结构域或其片段或变体、Ca1结构域或其片段或变体,或Ca1结构域或其片段或变体和Ca2结构域或其片段或变体。

[0131] 在某些方面中,给定的结合单元中的两个IgA重链恒定区各自与抗原结合结构域,例如抗体的Fv部分,例如,人或鼠抗体的VH和VL相关联,其中,所述VL可以与轻链恒定区相关联。在本文提供的结合分子中,结合分子的至少三个抗原结合结构域特异性地和激动性地结合OX40,例如人和/或鼠OX40。

[0132] 多特异性二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子

[0133] 本文提供的多特异性,例如双特异性二聚OX40激动剂结合分子可以基于IgA抗体的二聚体形式,其中两对IgA重链序列可以存在或不存在相关的轻链序列。例如,本文提供的双特异性二聚OX40激动剂结合分子可以由两个IgA(IgA1或IgA2)二聚体组成,包括J链,例如本文其他地方提供的修饰的J链。

[0134] 本文所提供的多特异性(例如,双特异性)二聚OX40激动剂结合分子可以包括单特异性和双特异性结合单元,只要作为一个整体的分子具有至少两种结合特异性即可,例如,至少两个不相同的抗原结合结构域,例如,OX40的不同表位、来自其它TNFSFR分子的表位、或异源性抗原。

[0135] 因此,在一实施方式中,如本文提供的多特异性(例如,双特异性)二聚结合分子可以包括两个单特异性结合单元(AA、BB),其各自具有针对不同的结合靶标的二价结合特异性。在另一实施方式中,如本文提供的多特异性(例如,双特异性)二聚结合分子可以包括两个双特异性结合单元,各结合单元结合相同的两个结合靶标(AB、AB)以形成双特异性二聚结合分子。在其他实施方式中,存在于本文所提供的多特异性二聚结合分子中的一个结合单元是单特异性的(AA),而其它结合单元是双特异性的(BC),这导致具有三种(A、B、C)结合特异性的多特异性结合分子。在其他一些实施方式中,各结合位点是双特异性的,但是一种特异性是重叠的(例如,AB、AC),这导致多特异性结合分子具有三种(A、B、C)结合特异性。其它组合,例如,具有四个不相同的抗原结合结构域(A、B、C、D)的组合可以根据本公开容易地制造。

[0136] 本文提供的多特异性,例如双特异性五聚或六聚OX40激动剂结合分子可以基于IgM抗体的五聚体或六聚体形式,其中存在的五对或六对IgM重链序列可以具有或不具有相关的轻链序列。例如,本文提供的双特异性五聚或六聚OX40激动剂结合分子可以包含5个IgM二聚体(包括J链,例如本文其他地方提供的修饰的J链)或6个IgM二聚体。

[0137] 本文所提供的多特异性(例如,双特异性)五聚或六聚OX40激动剂结合分子可以包括单特异性和双特异性结合单元,只要作为一个整体的分子具有至少两种结合特异性即可,例如,至少两个不相同的抗原结合结构域,例如,OX40的不同表位、来自其它TNFSFR分子的表位、或异源性抗原。

[0138] 如上对于多特异性二聚结合分子的讨论,五个或六个结合单元各自可以独立地是单特异性或双特异性的(例如,AA、BB、CC等)或一个或多个结合单元可以是双特异性的(例如,AB、AB、AC、CD等)。因此,本文所提供的多特异性(例如,双特异性)五聚或六聚结合分子

可以包括至少两个独立的抗原结合结构域,和多达十二个不同的、独立的抗原结合结构域。

[0139] 修饰的J链

[0140] 在某些方面,可以修饰(例如通过引入异源部分,或两个或更多个异源部分)本文提供的二聚或五聚结合分子的J链,而不干扰IgM或IgA结合分子组装并结合其结合靶标的的能力。参见PCT申请号PCT/US2015/024149(公开号W0 2015/153912),PCT申请号PCT/US2016/055053(公开号W0 2017/059387)和PCT申请号PCT/US2016/055041(公开号W0 2017/059380),其各自通过引用全文并入本文。因此,如本文提供的二聚或五聚结合分子,包括如本文其他地方所述的多特异性二聚或五聚结合分子,可包含修饰的J链或其功能片段,其包含引入J链或其片段的异源部分。在某些方面,异源部分可以是与J链框内融合或与J链化学偶联的肽或多肽序列。在某些方面,异源部分可以是与J链偶联的化学部分。与J链连接的异源部分可以包括但不限于结合部分,例如抗体或其抗原结合片段,例如单链Fv(ScFv)分子,可以增加二聚或五聚结合分子半衰期的稳定肽,或化学部分,例如聚合物或细胞毒素。

[0141] 在一些实施方式中,经修饰的J链可以含有抗原结合结构域,其可包括但不限于能够特异性结合靶标抗原的多肽(包括小肽)。在某些方面,与修饰的J链相关的抗原结合结构域可以是抗体或其抗原结合片段,如本文其他地方所述。在某些方面,抗原结合结构域可以是衍生自例如骆驼科动物或软骨鱼抗体的单链结合结构域或scFv结合结构域。可以在允许抗原结合结构域与其结合靶标结合的任何位置将抗原结合结构域引入J链而不干扰J链功能或相关IgM或IgA抗体的功能。插入位置包括但不限于:C端处或C端附近,N端处或N端附近,或基于J链的三维结构可及的内部位置。在某些方面,可以将抗原结合结构域在SEQ ID NO:2的半胱氨酸残基92和101之间引入SEQ ID NO:2的人J链中。在另一方面,可以将抗原结合结构域在糖基化位点处或附近引入SEQ ID NO:2的人J链中。在另一方面,可以将抗原结合结构域在离C末端约10个氨基酸残基之内引入SEQ ID NO:2的人J链。

[0142] OX40结合结构域

[0143] 本文提供的OX40激动剂结合分子可以是二聚、五聚或六聚的,其分别包含两个、五个或六个二价结合单元。所述结合单元可以是全长的或其保持结合功能的变体或片段。

[0144] 各结合单元包含两个IgA或IgM重链恒定区或其片段,其各自与抗原结合结构域相关联。如上所述,抗原结合结构域是必需的且足以特异性结合至表位的结合分子的区域。本文所述的“结合分子”可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个或更多个“抗原结合结构域”。

[0145] 本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子可包括至少三个特异性和激动性结合OX40(例如人和/或鼠OX40)的抗原结合结构域。如上所述,本文提供的二聚体,五聚体或六聚体OX40激动剂结合分子可以特异性结合并接合多个,例如三个或更多个OX40单体。在OX40表达于细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL)的某些方面,使细胞上的三个或更多个OX40受体与本文提供的结合分子接触可以引发信号转导途径,从而诱导抗肿瘤免疫。当多个受体蛋白结合在一起时,可以引发信号转导途径,造成受体分子的交联,由此信号传递穿过细胞膜进入表达OX40的细胞的胞质溶胶中。

[0146] 本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子可与在细胞表面上表达的至少三个OX40单体交联。由于其二聚体,五聚体或六聚体性质,本文提供的OX40激动剂结合分子可交联多达

三个,四个,五个,六个,七个,八个,九个,十个,十一个或十二个OX40单体。OX40单体必须在空间上彼此接近,通常进入脂筏,这有助于它们的交联并进一步增强活化。当本文提供的五聚或六聚OX40激动剂结合分子的所有五个或所有六个二价结合单元在单个细胞上结合多达十个或十二个OX40单体时,可以高效地发生受体的交联和活化。

[0147] 因为所述结合单元各自是二价的,所以各结合分子可结合至多达10个(对于五聚结合分子而言)或12个(对于六聚结合分子而言)OX40单体。

[0148] 通过结合本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子激活受体后,可激活细胞,例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL,从而通过例如CTL活化(增殖,肿瘤细胞杀伤)或干扰Treg免疫抑制来诱导抗肿瘤免疫。

[0149] 在某些方面中,本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子能以高于等量的二价IgG抗体或其片段的效力诱导表达OX40的细胞中的信号转导,所述二价IgG抗体或其片段也特异性结合并激动相同的OX40表位。不希望受理论限制,因为提供结合分子是二聚、五聚或六聚的,并且因为各结合分子是二价的,所以,相较于任何单独的单一结合单元(例如等效的IgG结合单元)而言,所述结合分子能以更高效力诱导先前关于OX40所表征的受体介导的功能。IgG结合单元是二价的,包含两个结合位点,但如先前的临床研究所示,两个OX40单体与单一IgG分子的结合在不添加其它组分(例如交联剂等)的情况下可能是无效的。

[0150] “效力”或“改善的结合特征”是指,实现给定的生物结果所需的给定的结合分子的最小的量,所述生物结果例如,在给定的测定(例如,T细胞信号转导测定,T细胞增殖测定,T细胞活化和细胞因子分泌测定,细胞毒性测定,或如下文实施例中提供的其他测定)中实现20%、50%或90%的OX40信号转导活性的活化。

[0151] 因为本文提供的结合分子是二聚、五聚或六聚的,所以其可分别具有多达4、10或12个OX40特异性抗原结合结构域。每个抗原结合结构域可以特异性结合OX40单体,将单体聚集在一起以提供激动活性。此外,不同的抗原结合结构域可以对两种或更多种特定的OX40表位具有特异性。

[0152] 因此,单个的二聚、五聚或六聚结合分子可:a)同时结合许多OX40单体上的单一表位,或b)结合单一OX40单体上的不同表位,或c)除OX40以外还可结合不同TNFSFR蛋白上的不同表位。在实施方式a)中,本文提供的OX40激动剂结合分子可以结合多个OX40单体,从而在单个位置形成这类单体的筏,增加了受体被活化的可能性。在其它实施方式中,例如实施方式c),本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子可用于接触OX40以及其他TNFSFR蛋白,例如GITR和/或CD137/4-1BB,由此通过多种被靶向的受体活化超过一个途径,以实现细胞中的所需生物响应。在这些实施方式中,本文提供的OX40激动剂结合分子可接触并激动全部处于单一细胞上或跨多种细胞的此类受体。

[0153] 因此,本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子可包含三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个,或在六聚结合分子的情况中,包含多达十一个,或十二个抗原结合结构域,其特异性且激动性地结合至在一个或多个细胞的表面上表达的OX40以及任选的一个或多个TNF超家族受体蛋白,由此诱导该一个或多个细胞中的意图达到的或所需的生物响应。

[0154] 本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子的结合单元可以是人、人源化或嵌合免疫球蛋白结合单元。人源化免疫球蛋白序列的方法是本领域已知的。因此,编码二聚、五聚或六聚结合分子多肽的核苷酸序列可直接来自人序列,或可以是人源化的或嵌合的,即,由来

自多种不同的物种的序列编码。

[0155] 表达OX40的细胞可以是任何动物细胞。例如,在一个实施方式中,细胞是人细胞,例如人T细胞,例如人CTL。例如,所述细胞可以是灵长类、啮齿类、犬、马等的任何一种或多种的细胞。

[0156] 本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子可经遗传工程改造,从而其抗原结合结构域由已知特异性结合OX40(例如人和/或鼠OX40)的序列编码。许多团队已经公开了经表征且已知特异性结合至OX40的单克隆抗体(大多数为IgG同种型)的可变区的序列。已知特异性结合至OX40的非限制性免疫球蛋白可变区序列提供于表2。已公开了对OX40特异的其他单克隆抗体序列。本领域技术人员能够将这些公开的序列工程改造成免疫球蛋白结构,例如IgG、IgA、IgM结构,或其生物活性或功能片段(例如scFv片段等,如上所述)。用于将克隆的可变区遗传工程改造成免疫球蛋白结构域,并且表达和纯化所述构建体的方法是公开的并且处于本领域技术人员的能力范围内。

[0157] 因此,在某些方面,本文提供的OX40结合结构域包含某一抗OX40mAb的六个免疫球蛋白互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或在一个或多个CDR中具有一个、两个、三个、四个或五个单氨基酸取代的该六个免疫球蛋白互补决定区,该某一抗OX40mAb含有分别包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH和VL氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

[0158] 表2抗OX40-激动剂抗体VH和VL序列

[0159]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
US201601 37740A1	9	QVQLKESGPGLVQPSQTLS LTCTVSGFSLTGYNLHWV RQPPGKGLEWMGRMRYD GDTYYNSVLKSRLSISRDT SKNQVFLKMNSLQTDDTA IYYCTRDGRGDSFDYWGQ GVMVTVSS	10	DIVMTQGALPNPVPSGESA SITCRSSQSLVYKDGQTYL NWFLQRPGQSPQLLTYWM STRASGVSDRFSGSGSGTY FTLKISRVEAEDAGVYYCQ QVREYPFTFGSGTKLEIK
USP 7550140	11	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSNYTMNW VRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKDRYSQVHYAL DYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEL	12	DIVMTQSPDSLPTVTPGEPA SISCRSSQSLLSHNGYNYL DWYLQKAGQSPQLLIYLG SNRASGVDPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCQ QYYNHPTTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0160]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVNS NKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK		
USP 7550140	13	EVQLVESGGGLVQPRGSL RLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVAVISYD GSNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKDRYITLPNALD YWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVK	14	DIQMTQSPVSLPVTGPGEPA SISCRSSQSLLSNGYNYL DWYLRKPGQSPQLLIYLG NRASGVPDFRFGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCQ QYKSNPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNMFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0161]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		FNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK		
USP 7550140	15	EVQLVESGGGLVHPGGSL RLSCAGSGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEWVSAIGTG GGTTYADSVMGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYDNVMGLYWF DYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPAPPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLT	16	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATG IPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQRSNWPP AFGGGKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[0162]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
USP 7960515	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLLVTVSS	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGISSWLAWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQQYNSYPP TFGGGTKVEIK
USP 7960515	19	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDQSTADYYFYFGMDVWGQGTITVTVSS	20	EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK
USP 9006399	21	QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYTFDYSMHWVRQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDT	22	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYLYT GVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDIATYYCQQHYSTP

[0163]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		AVYYCANPYYDYVSYYA MDYWGQGTTVTVSS		RTFGQGKLEIK
USP 9006399	23	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASEYEFPSHDMSW VRQAPGKGLELVAAINSD GGSTYYPDTMERRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARHYDDYAWFA YWGQGTMTVTVSS	24	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASKSVSTSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQH SRELPLTFGGGKVEIK
US201403 77284A1	25	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWMGYINPY NDGTKYNEKFKGRVTITSD TSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCANYYGSSLSMDYW GQGTLVTVSS	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQQGNTLP WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A1	25	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWMGYINPY NDGTKYNEKFKGRVTITSD TSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCANYYGSSLSMDYW GQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAVKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYFCQQGNTLP WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A1	27	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWIGYINPYN DGTKYNEKFKGRATITSDT	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISS

[0164]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		SASTAYMELSSLRSED TAV YYCANYYGSSLSMDY WG QGTLVTVSS		LQPEDFATYYCQQGNT L WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A2	27	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWIGYIN PYN DGTKYNEKFKGRATITSD T SASTAYMELSSLRSED TAV YYCANYYGSSLSMDY WG QGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCRASQDISNYLN WYQQ KPGKAVKLLIYYT SRLHSG VPSRFSGSGSGTDY TLTISS LQPEDFATYFCQQG NTLP WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A3	29	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWIGYIN PYN DGTKYNEKFKGRATLTSD T KSASTAYMELSSLR SEDTA VYYCANYYGSSLSMDY W GQGTLVTVSS	26	DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCRASQDISNYLN WYQQ KPGKAPKLLIYYT SRLHSG VPSRFSGSGSGTDY TLTISS LQPEDFATYYCQQG NTLP WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A4	29	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYVMHW VRQAPGQRLEWIGYIN PYN DGTKYNEKFKGRATLTSD T KSASTAYMELSSLR SEDTA VYYCANYYGSSLSMDY W GQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCRASQDISNYLN WYQQ KPGKAVKLLIYYT SRLHSG VPSRFSGSGSGTDY TLTISS LQPEDFATYFCQQG NTLP WTFGQGTKVEIKR
US201403 77284A1	30	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KV SCKASGYTFKDYTMH WVRQAPGQGLEWMGGIY	31	DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCKASQDVGA AAVAWYQ QKPGKAPKLLIY WASTRH

[0165]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		PNNGGSTYNQNFKDRVITIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS		TGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYINY PLTFGGGKVEIKR
US201403 77284A1	30	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFKDYTMH WVRQAPGQGLEWMGGIY PNNGGSTYNQNFKDRVITIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS	33	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVGA AVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRH TGVPDFRSGGGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYIN YPLTFGGGKVEIKR
US201403 77284A1	32	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFKDYTMH WVRQAPGQGLEWIGGIYP NNGGSTYNQNFKDRVTLT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVGA AVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYINY PLTFGGGKVEIKR
US201403 77284A1	32	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFKDYTMH WVRQAPGQGLEWIGGIYP NNGGSTYNQNFKDRVTLT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS	33	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVGA AVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRH TGVPDFRSGGGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYIN YPLTFGGGKVEIKR
US201403 77284A1	34	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFKDYTMH	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVGA AVAWYQ

[0166]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		WVRQAPGQGLEWIGGIYP NNGGSTYNQNFKDRA TLT VDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS		QKPGKAPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYINY PLTFGGGTKVEIKR
US201403 77284A1	34	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYTFKDYTMH WVRQAPGQGLEWIGGIYP NNGGSTYNQNFKDRA TLT VDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARMGYHGPHLDF DVWGQGTTVTVSS	33	DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCKASQDVGA AVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRH TGV PDRFSGGGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYIN YPLTFGGGTKVEIKR
US201500 38682A1	35	MGRLTSSFLLLIVPAYVLS QVTLRESGPALVKPTQJLT LTCTFSGFSLSTSGVGVGW IRQPPGKALEWLAHIWWD DDKYYNTALKSGLTISKDT SKNQVVLMTNMDPVDTA TYFCARIDWDGIAYWGQG TLVTVSS	36	MDFVQVQIFSLLISASVIMS RGEIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASSSVSYMHWYQ QKPGQAPRPWIYATSNLAS GIPARFSGSGSGTDYTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSN PWTFGGGTKVEIK
USP 8,283,450	37	MEWGPCWVFLVVILEGVQ CGVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSYISSSS STIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTA VYYCARGVYHNGWSFFD	38	MDMRVLAQLLGLLLLCFP GARCDIQMTQSPSSLSASV GNRVTITCRASQDISSWLA WYQKPEKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQY NSYPLTFGQGTREIKR

[0167]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		YWGQGTLTIVSS		
USP 8,283,450	39	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS QITLKESGPTLVKPKQTLT LTCTFSGFSLSTSGMGVGVW IRQPPGKALEWLAVIYWD DHQLYSPSLKSRLTITKDT SKNQVVLMTNMDPVDTA TYECAHRRGAFQHWGQG TLVTVSSASTKG	40	METPAQLLFLLLLWLPDIT GEIVLTQSPGTLTSLSPGERA TLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDSSL TFGGGKVEIKRT
USP 8,283,450	41	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS QITLKESGPTLVKPTQTLTL SCTFSGFSLSTSGVGVGWI RQPPGKALEWLALIHWD AERYSPSLKSRLTITKDTSK NQVVLMTNMDLVDTAT YYCAHTRGAFDIWGQGM VTVSS	42	METPAQLLFLLLLWLPDIT GEIVLTQSPGTLTSLSPGERA ILSCRASQSVSSSFLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAFSRAT GIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDSS RTFGQKVEIK
USP 8,283,450	43	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS QITLKESGPTLVKPTQTLTL TCTFSGFSLSTSGVGVGWI RQPPGKALEWLALIYWDD HSPYSPSLKSRLTITKDTSK NQVVLMTNMDPVDAT YYCARTRGAFDIWGQGM VTVSS	44	MEAPAQLLFLLLLWLPDIT GEIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQGVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGPGTDFLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW HPTFGQKVEIK
USP 8,283,450	45	MTMITPSLVPSSDPLVTAA SVLEFALLIRLTIGQAVVST	46	MEAPAQLLFLLLLWLPDIT GEIVLTQSPATLSLSPGERA

[0168]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		QSTGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTLDDYGMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSDSIG YVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRVEDTALYYC VKDISGWYSFDYWGQGT LTVSS		TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PITFGQGTREIK
US201601 37740A1	47	EVQLQESGPSLVKPSQTLS LTCSVTGDSFTSGYWNWI RKFPGNRLEYMGYISYNGI TYHNPSLKSRSITRDTSKN HYLQLNSVTTEDTATYF CARYRYDYDGGHAMDYW GQGTLLTVSS	48	DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLNWYQQ KPDGTVKLLIYYTSKLSHG VPSRFSGSGSRTDYSLTITD LDQEDIATYFCQQGSALP WTFGQGTKVEIK
US201601 37740A1	49	QVQLQESGPGLVKPSQTLS LTCVYGGSFSSGYWNWI RKHPGKLEYIGYISYNGI TYHNPSLKSRTINRDTSKN QYSLQLNSVTPEDTAVYY CARYKYDYDGGHAMDYW GQGTLLTVSS	50	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSKLSHG VPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQQGSALP WTFGQGTKVEIK
US201503 07617A1	51	EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTDSYMSW VRQAPGQGLEWIGDMYPD NGDSSYNQKFRERVTITRD TSTSTAYLESSLRSEDTA VYYCVLAPRWYFSVWGQ	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSRLRSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQGHLP TFGQGTKVEIK

[0169]

来源	VH SEQ ID NO	VH (或完整重链)	VL SEQ ID NO	VL (或完整轻链)
		GTLVTVSS		

[0170] 在某些方面,VH可包含分别与包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VH氨基酸序列至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51。

[0171] 在某些方面,VL可包含分别与包含以下序列或包含于以下序列内的成熟VL氨基酸序列至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52。

[0172] 在某些方面,VH和VL氨基酸序列可包含与分别包含以下序列或包含于以下序列的成熟VH和VL氨基酸序列至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

[0173] 在某些方面,本文提供的二聚,六聚或五聚结合分子的OX40抗原结合结构域包含成熟VH和VL氨基酸序列的,HCDR1、HCDR2和HCDR3区域,或含有一个或两个单氨基酸取代的HCDR1、HCDR2和HCDR3区域,以及LCDR1、LCDR2和LCDR3区域,或含有一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2和LCDR3,该成熟VH和VL氨基酸序列分别包含以下序列或包含于以下序列内:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18;SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:

27和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:26;SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:31;SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48;SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。

[0174] 在某些方面,本文提供的二聚,六聚或五聚结合分子的OX40抗原结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的VL(“抗-OX40#1”)。

[0175] 在某些方面,本文提供的二聚,六聚或五聚结合分子的OX40抗原结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的VH和含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的VL(“抗-OX40#2”)。

[0176] “成熟VH氨基酸序列”或“成熟VL氨基酸序列”是指在分泌信号肽被切除后剩余的VH或VL氨基酸序列。

[0177] 尽管本领域普通技术人员基于本发明可设想多种不同的二聚、五聚和六聚结合分子,并因而包括在本发明中,但在某些方面中,提供如上所述的结合分子,其中各结合单元包含两个IgA或IgM重链,其各包含位于IgA或IgM恒定区或其片段的氨基末端的VH,和两个免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

[0178] 此外,在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个结合单元,包含或包括如上所述的OX40结合结构域中的两个。在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元中的两个OX40结合结构域,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个OX40结合结构域,可以彼此不同,或可以是相同的。

[0179] 在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元中的所述两个IgA或IgM重链,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的所述两个IgA或IgM重链,是相同的。在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元,或至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个相同的IgA或IgM重链包含公开于表2的重链可变结构域氨基酸序列。

[0180] 在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元中的两个轻链,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个轻链,是相同的。在某些方面中,结合分子的至少一个结合单元中的两条相同的轻链,或结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两条相同的轻链,是 κ 轻链,例如,人 κ 轻链,或 λ 轻链,例如,人 λ 轻链。在某些方面中,所述结合分子的至少一个结合单元内的两个相同的轻链,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元内的两个相同的轻链,各自包含公开于表2的轻链可变结构域氨基酸序列。

[0181] 在某些方面中,本发明提供的二聚、五聚或六聚结合分子的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元包含或各包含两个相同的IgA或IgM重链恒定区,其各自包含相同的公开于表2的重链可变结构域氨基酸序列,和两个相同的轻链,其各自包含相同的公开于表2的重链可变结构域氨基酸序列。根据该方面,所述结合分子的至少一个结合单元中的OX40结合结构域,或所述结合分子的至少两个、至少三个、至少

四个、至少五个,或至少六个结合单元中的OX40结合结构域可以是相同的。此外根据该方面,本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子可包含如上所述的OX40结合结构域的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或至少十二个拷贝。在某些方面中,所述结合单元中至少两个、至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个可以是相同的,并且,在某些方面中,所述结合单元可包含相同的结合结构域,例如,至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个,或至少十二个OX40结合结构域可以是相同的。

[0182] 在某些方面中,与具有相同抗原结合结构域的相应二价结合分子相比,本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子可具有有利的结构或功能性质。在某些方面,本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子可以比包含相同结合结构域的等量的单特异性二价IgG抗体或其片段更高效地引发表达OX40的细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL)的活化。在某些方面,本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子可以更高效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,和/或在不存在二级交联部分(例如但不限于Fc γ R)的情况下,可以有效地交联细胞表面上的多个(例如,三个或更多个)OX40受体,从而促进抗肿瘤免疫。与等量的包含相同结合结构域的单特异性二价IgG抗体或其片段相比,通过结合本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子而激活受体后,可以更有效地激活细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL),并且继而可以诱导改善的抗肿瘤免疫力,其中所述抗体包含与表2中提供的抗体相同的VH和VL区,或者抗体是例如,9B12,KHK4083,Medi0562,PF-04518600和/或GSK3174998。

[0183] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0184] 本公开还提供多核苷酸,例如,分离的、重组和/或非天然产生的多核苷酸,其包含编码上述二聚、六聚、或五聚结合分子的多肽亚基的核酸序列。述及“多肽亚基”指可被独立地翻译的结合分子、结合单元或抗原结合结构域的部分。示例包括但不限于,抗体可变结构域,例如,VH或VL、J链、分泌型组分、单链Fv、抗体重链、抗体轻链、抗体重链恒定区、抗体轻链恒定区和/或其任何片段、变体或衍生物。

[0185] 在某些方面,多肽亚基可以含有IgM或IgA重链恒定区或其片段,以及OX40抗原结合结构域的VH部分。在某些方面,多核苷酸可编码多肽亚基,所述多肽亚基包含与VH的C末端融合的人IgM或IgA恒定区或其片段,其中VH包含某一VH的HCDR1、HCDR2和HCDR3区域,或者包含具有一个或两个单氨基酸取代的该HCDR1、HCDR2和HCDR3区域,所述某一VH包含以下氨基酸序列或包含于以下氨基酸序列内:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49,或SEQ ID NO:51。

[0186] 在某些方面,如上文所述,多肽亚基可以含有OX40抗原结合结构域的VL部分。在某些方面,多肽亚基可以含有融合至VL的C末端的人抗体轻链恒定区或其片段,其中VL包含某一VL的LCDR1、LCDR2和LCDR3区域,或者包含一个或两个单氨基酸取代的LCDR1、LCDR2和LCDR3区域,所述某一VL包含以下氨基酸序列或包含于以下氨基酸序列内:SEQ ID NO:10,

SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50,或SEQ ID NO:52。

[0187] 在某些方面,多核苷酸可编码多肽亚基,其包含与VH的C末端融合的人IgM或IgA恒定区或其片段,其中VH包含与成熟VH氨基酸序列中的任意一个或多个至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列,所述成熟VH氨基酸序列包含以下序列或包含于以下序列内:SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:43,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:47,SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51。

[0188] 在某些方面,多核苷酸可编码多肽亚基,其包含与VL的C末端融合的人轻链恒定区或其片段,其中VL包含与成熟VL氨基酸序列中的任意一个或多个至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或100%相同的氨基酸序列,所述成熟VL氨基酸序列包含以下序列或包含于以下序列内:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:48,SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52。

[0189] 因此,为了形成抗原结合结构域,可以将与OX40特异性结合的抗体的可变区插入IgM和/或IgA结构的表达载体模板,从而创造出具有至少两个二价结合单元的多聚结合分子。简言之,可以由现有的分子合成或扩增编码重链和轻链可变结构域序列的核酸序列,并且将其以合适的取向和结构插入载体,这样在表达之后,载体将收获全长的重链或轻链。用于这些目的的载体是本领域所熟知的。这样的载体可以还含有增强子和为了实现所需链的表达所需的其它序列。可以使用多载体或单一载体。将这些载体转染至宿主细胞,然后表达和纯化链。在表达之后,链形成完全功能的多聚结合分子,如文献中所报道。完全组装的多聚结合分子接下来通过标准的方法进行纯化。如果需要,表达和纯化过程可以在工业规模下进行。

[0190] 本公开还提供一种含有两个或更多个多核苷酸的组合物,其中两个或更多个多核苷酸可共同地编码如上所述的二聚、六聚或五聚结合分子。在某些方面中,组合物可以包括编码IgM和/或IgA重链或其片段的多核苷酸,例如,如上所述的人IgM重链,其中IgM和/或IgA重链含有OX40抗原结合结构域的至少VH,和编码轻链或其片段的多核苷酸,例如,包含OX40抗原结合结构域的至少VL的人 κ 或 λ 轻链。提供的多核苷酸组合物还可包括编码J链(例如,人J链)或其片段、变体或衍生物的多核苷酸。在某些方面,组成本文提供的组合物的多核苷酸可以位于两个、三个或多个分开载体(例如,表达载体)上。本公开提供了这样的载体。在某些方面中,组成本文提供的组合物的两种或多种多核苷酸可以位于单一载体,例如,表达载体。本公开提供了这样的载体。

[0191] 本公开还提供宿主细胞,例如,原核或真核宿主细胞,其包含编码如本文所提供的

二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子或其任何亚基的多核苷酸或两个或更多个多核苷酸,如本文所提供的多核苷酸组合物,或载体或两个、三个或更多个载体,其共同地编码如本文所提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子或其任何亚基。在某些方面,本公开所提供的宿主细胞可以表达本公开所提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子,或其亚基。

[0192] 在一个相关方面中,本公开提供了生产本公开提供的二聚、五聚、或六聚OX40激动剂结合分子的方法,其中所述方法包括培养如上所述的宿主细胞,和回收结合分子。

[0193] 使用方法

[0194] 本公开内容提供了使用本文提供的二聚,五聚或六聚IgA或IgM基的OX40激动剂结合分子激活表达OX40的细胞中的信号转导的改进方法。下述方法可利用包含来自任何现有OX40抗体,包括但不限于表2中提供的抗体,或其变体,衍生物或类似物的OX40结合结构域的结合分子,其中,与表达OX40的细胞中的等效二价抗体,片段,变体,衍生物或类似物相比,二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子(例如,在通过结合本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子通过结合三个或更多个受体单体激活受体时)可以提供改善的活性,细胞(例如T细胞,例如Treg或活化的效应CTL)可以引发细胞中的信号转导途径,从而可以诱导抗肿瘤免疫。在某些方面,二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子的使用可导致比等效的单结合单元分子更强效的T细胞活化,并且继而可通过,例如,细胞因子释放、CTL增殖、杀伤肿瘤细胞和/或中断Treg细胞在肿瘤微环境中的抑制作用而诱导更有效的抗肿瘤免疫。基于本发明,包含任何感兴趣的OX40结合结构域的二聚、五聚或六聚的基于IgA或基于IgM的OX40激动剂结合分子的构建完全在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,改善的活性可以允许使用减少的剂量,可以治疗先前仍然无法治疗的癌症,或者可以产生更有效或更持久的抗肿瘤免疫。

[0195] 在某些方面,本公开内容提供了用于激活细胞(例如T细胞,例如Treg或表达OX40的活化效应CTL)的方法,其中该方法包括使表达OX40的细胞与如本文所述的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子接触,其中结合分子可以引发表达OX40的细胞的活化或增强的活化。当细胞是CTL时,“活化”可包括但不限于OX40的表面表达增加,增殖,促炎细胞因子的产生,对CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞的抑制作用的抗性,和/或增强的肿瘤细胞杀伤。在细胞是Treg的情况下,“活化”可以包括但不限于干扰细胞抑制肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫的能力。在某些方面,将表达OX40的细胞与如本文所述的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子接触可诱导OX40表达增加,OX40在细胞表面上的多聚化,以及OX40单体易位至细胞表面的脂筏(Croft, M, 等, Immunol Rev. 229:173-191 (2009))。在某些方面,使如本文所述的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子与表达OX40的细胞(例如T细胞,例如Treg或表达OX40的活化的效应CTL)接触可导致与包含相同或等效的OX40结合结构域的等量的单特异性二价IgG抗体或其片段相比更高效地激活细胞。在某些方面,使如本文提供的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子与表达OX40的细胞(例如T细胞,例如Treg或表达OX40的活化的效应CTL)接触可导致在不需要二级交联(例如,通过Fc γ R细胞)的情况下激活细胞,而包含相同或等效的OX40结合结构域的等量的单特异性二价IgG抗体或其片段将需要二级交联。

[0196] 而在另一个方面,当以有效剂量给予有癌症治疗需求的对象时,本文提供的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子可(例如,通过减缓肿瘤生长、停止肿瘤生长或减小现存肿

瘤的尺寸)促进癌治疗。本公开内容提供了治疗癌症的方法,其包括向需要治疗的对象给予有效剂量的本文提供的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子。

[0197] 术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”和“恶性”指或描述哺乳动物的生理病症,其典型特征是细胞生长失控。癌症的示例包括但不限于,癌,包括腺癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病。所述癌症的更具体的示例包括,鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、恶性胶质瘤、胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌例如肝细胞癌和肝细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌(包括激素介导的乳腺癌,参见,例如,Innes等(2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、涎腺癌、肾癌例如肾细胞癌和维尔姆斯瘤、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食管癌、多种类型的头颈癌,包括但不限于,鳞状细胞癌,和粘蛋白来源的癌,例如,粘蛋白卵巢癌、胆管癌(肝)和乳头状肾细胞癌。

[0198] 本发明还提供一种预防或治疗有此需要的对象的癌症的方法,包括,给予该对象有效量的本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子或其多聚抗原结合片段、包含所述结合分子的组合物或制剂,或本文所述的多核苷酸、载体或宿主细胞。

[0199] “治疗有效剂量或量”或“有效量”意在表示,当给予时,就癌症患者的治疗而言,获得积极免疫治疗响应的二聚、五聚、或六聚OX40激动剂结合分子的量。

[0200] 用于治疗癌症的组合物的有效剂量可根据许多不同的因素变化,包括给药方式、目标位点、患者的生理状态、患者是人还是动物、给予的其他药物和治疗是预防性还是治疗性。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物(包括转基因哺乳动物)。可使用本领域技术人员已知的常规方法对治疗剂量进行滴定以优化安全性和功效。

[0201] 待治疗的对象可以是有治疗需要的任何动物,例如,哺乳动物,在某些方面中,对象是人对象。

[0202] 待给予对象的制剂的最简形式是本文提供的二聚、五聚或六聚结合分子,或其多聚抗原结合片段,其以常规的剂型给予,其可与本文他处所述的药物赋形剂、运载体或稀释剂联合给予。

[0203] 在某些方面,本文提供的二聚,五聚或六聚结合分子可以与其他癌症疗法组合给予,包括但不限于化学疗法,放射疗法或其他免疫调节疗法,例如癌症疫苗,免疫检查点阻断抑制剂,免疫刺激剂,或过继细胞转移,如CAR-T细胞。

[0204] 本发明的组合物可以任何合适的方法给予,例如,肠胃外、心室内、经口、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、口腔、阴道或通过植入型储器。本文所用术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、脑内和颅内注射或输注技术。在某些方面,本文提供的OX40激动剂结合分子或其多聚体抗原结合片段可局部引入肿瘤中,或肿瘤细胞附近,例如肿瘤微环境(TME)内。

[0205] 如上所述,全部类型的肿瘤均能适于通过该方法的治疗,其包括但不限于,乳腺、肺、胰腺、卵巢、肾、结肠和膀胱的癌,以及黑素瘤、肉瘤和淋巴瘤。粘膜分布对于某些癌症,例如,肺癌、卵巢癌、结直肠癌或鳞状细胞癌可能是有益的。本文提供的OX40激动剂结合分子或其多聚抗原结合片段不需要与癌细胞或肿瘤本身有效接触,因此重要的是本文提供的治疗方法对不表达OX40的癌细胞同样有效,如同它对于表达OX40的癌细胞那样。

[0206] 用于本文提供的方法的二聚、五聚或六聚结合分子,是具有如本文定义的两个、五

个或六个结合单元的结合分子,其可特异性结合至OX40,例如,人和/或鼠OX40。在某些方面中,用于本文提供的方法的二聚、五聚或六聚结合分子分别包含两个、五个或六个二价结合单元,其中各结合单元包括两个IgA或IgM重链恒定区或其片段。在某些方面中,两个IgA或IgM重链恒定区是人重链恒定区。

[0207] 其中,用于本文提供的方法的结合分子是基于二聚IgA的结合分子,所述结合分子还可包含J链,或其片段,或其变体,并且还可包含分泌型组分,或其片段,或其变体。

[0208] 其中,用于本文提供的方法的结合分子是基于五聚IgM的结合分子,所述结合分子还可包含J链,或其片段,或其变体。

[0209] 用于本文提供的方法的结合分子的IgA重链恒定区可包括Ca1结构域、Ca2结构域和/或Ca3结构域中的一个或多个,限制条件是,所述恒定区能够在该结合分子中发挥所需功能,例如,与轻链恒定区相关联以促进结合结构域的形成,或与另一个结合单元相关联以形成二聚体。在某些方面中,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段各包含Ca3结构域或其片段、尾片段(TP)或其片段,或Ca3结构域和TP或其片段的任何组合。在某些方面,个体结合单元中的两个IgA重链恒定区或其片段还各自包含Ca2结构域或其片段、Ca1结构域或其片段,或Ca1结构域或其片段和Ca2结构域或其片段。

[0210] 用于本文提供的方法的结合分子的IgM重链恒定区可包括C μ 1结构域、C μ 2结构域、C μ 3结构域和/或C μ 4结构域中的一个或多个,限制条件是,恒定区可在该结合分子中发挥所需功能,例如,与轻链恒定区相关联以促进结合结构域的形成,或与其它结合单元相关联以形成六聚体或五聚体。在某些方面中,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段各包含C μ 3结构域或其片段、C μ 4结构域或其片段、尾片段(TP)或其片段,或C μ 3结构域C μ 4结构域,和TP或它们的片段的任何组合。在某些方面,个体结合单元中的两个IgM重链恒定区或其片段还各自包含C μ 2结构域或其片段、C μ 1结构域或其片段,或C μ 1结构域或其片段和C μ 2结构域或其片段。

[0211] 尽管本领域普通技术人员基于本发明可设想多种用于本文提供的方法的不同的二聚、五聚和六聚结合分子,并因而包括在本发明中,但在某些方面中,提供用于本文提供的方法的结合分子,其中各结合单元包含两个IgA或IgM重链,其各包含位于IgA或IgM恒定区或其片段的氨基末端的VH,和两个免疫球蛋白轻链,其各包含位于免疫球蛋白轻链恒定区的氨基末端的VL。

[0212] 此外在某些方面中,用于本文提供的方法的结合分子的至少两个结合单元,或用于本文提供的方法的结合分子的至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元,包含如上所述的OX40结合结构域中的两个。在某些方面中,所述结合分子的至少两个结合单元中的两个OX40结合结构域,或所述结合分子的至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个OX40结合结构域,可以彼此不同,或可以是相同的。

[0213] 在某些方面中,用于本文提供的方法的结合分子的至少两个结合单元中的两个IgA或IgM重链,或所述结合分子的至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个IgA或IgM重链,是相同的。

[0214] 在某些方面中,用于本文提供的方法的结合分子的至少两个结合单元中的两个轻链,或所述结合分子的至少三个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元中的两个轻链,是相同的。在某些方面中,用于本文提供的方法的结合分子的至少两个结合单元,或至少三

个、至少四个、至少五个,或至少六个结合单元内的两个相同的轻链是 κ 轻链,例如,人 κ 轻链,或 λ 轻链,例如,人 λ 轻链。

[0215] 相较于其它结合分子,用于本文提供的方法的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子可以具有有利的结构或功能性质。例如,相较于对应的IgG结合分子(例如,本文他处所述),用于本文提供的方法的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子可在生物试验(体外或体内)中具有改善的活性。

[0216] 药物组合物和给药方法

[0217] 制备和给予本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子至有此需要的对象的方法是本领域人员熟知且能根据本发明容易地确定的。TNF受体结合分子的给予途径可以是,例如,瘤内、经口、胃肠外、通过吸入或局部给予。本文所用的术语胃肠外包括例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道给药。尽管这些给予形式设想为合适的形式,但给予形式的其它示例将是注射用溶液,具体地是用于瘤内、静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。合适的药物组合物可包含缓冲剂(如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、表面活性剂(如聚山梨酯),以及任意的稳定剂(如人白蛋白)等。

[0218] 如本文所述,本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子能以对于癌症的体内免疫治疗而言药学上有效的量给予。在这方面,应理解,将配制本发明公开的结合分子以利于给药并提高活性物质的稳定性。药物组合物因此可含有药学上可接受的、非毒性无菌运载体,例如生理盐水、非毒性缓冲液、防腐剂等。本文提供的二聚、五聚或六聚TNF受体结合分子的药学有效的量表示足以实现有效结合至靶标并实现治疗益处的量。合适的制剂描述于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 马克出版公司(Mack Publishing Co.)第16版.(1980)。

[0219] 本文提供的某些药物组合物可以可接受的剂型口服给予,包括例如,胶囊、片剂、水性悬液或溶液。也可通过鼻气溶胶或吸入来给予某些药物组合物。这类组合物可采用苯甲醇或其他合适的防腐剂,吸收促经济以增强生物可及性,和/或其他常规增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0220] 可与运载体材料组合以产生单一剂型的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子的量将根据,例如,治疗的对象和具体的给予模式而变化。可以单剂型、多剂型或在确立的时间段内的输注中给予组合物。也可调整给药方案,以提供最优所需响应(例如,治疗或预防性响应)。

[0221] 保持在本发明范围内,本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子能以足够的量给予有治疗需求的对象以产生治疗作用。本文提供的二聚、五聚或六聚OX40激动剂结合分子能以常规的剂型给予该对象,该常规的剂型通过根据已知技术,将本发明的抗体或其多聚抗原结合片段、变体或衍生物与常规的药学上可接受的运载体或稀释剂相组合来制备。药学上可接受的运载体或稀释剂的形式和性质可根据其将要组合的活性成分的量、给予途径和其它熟知变量来描述。

[0222] 本公开内容还提供了如本文提供的二聚,五聚或六聚OX40激动剂结合分子在制备用于治疗,预防或控制癌症的药物中的用途。

[0223] 除非另有说明,本发明将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们均在本领域技术范围内。这些技术在文献中

已有充分描述。参见例如,Sambrook等编(1989)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));Sambrook等编(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual (《分子克隆:实验室手册》),(纽约州的冷泉港实验室出版社(Cold Springs Harbor Laboratory, NY));D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning(《DNA克隆》),第I和II卷;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis(《寡核苷酸合成》);Mullis等,美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》);Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation(《转录和翻译》);Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(《动物细胞培养》)(ARL公司(Alan R.Liss, Inc.));Immobilized Cells And Enzymes(《固定的细胞和酶》)(IRL出版社)(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning(《分子克隆实践指南》);论文,Methods In Enzymology(《酶学方法》)(学术出版社公司(Academic Press, Inc.), 纽约州);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(《哺乳动物细胞的转基因载体》)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory));Wu等编,Methods In Enzymology(《酶学方法》),第154和155卷;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》)(学术出版社(Academic Press), 伦敦);Weir和Blackwell编(1986)Handbook Of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),第I-IV卷;Manipulating the Mouse Embryo(《小鼠胚胎操作》),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), (1986);和Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)(马里兰州巴尔的摩的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons, Baltimore, Md.))。

[0224] 抗体工程的一般原理可参见Borrebaeck编(1995)Antibody Engineering(《抗体工程》)(第2版;牛津大学出版社(Oxford Univ.Press))。蛋白质工程的一般原理可参见Rickwood等编(1995)Protein Engineering, A Practical Approach(《蛋白质工程, 实践方法》),(英国牛津的牛津大学出版社的IRL出版公司(IRL Press at Oxford Univ.Press, Oxford, Eng.))。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可参见:Nisonoff(1984)Molecular Immunology(《分子免疫学》)(第2版;马萨诸塞州桑德兰的辛奥尔联合公司(Sinauer Associates, Sunderland, Mass.));和Steward(1984)Antibodies, Their Structure and Function(《抗体的结构和功能》)(Chapman和Hall, 纽约州纽约市)。此外,本领域已知且没有具体描述的免疫学标准方法可按照下述文献所述进行:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),纽约州的约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons);Stites等编(1994)Basic and Clinical Immunology(《基础和临床免疫学》)(第8版;Appleton和Lange, 康涅狄格州的诺沃克(Norwalk, Conn.))和Mishell和Shiigi(编)(1980)Selected Methods in Cellular Immunology(《细胞免疫学的选用方法》)(W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Co), 纽约州)。

[0225] 列出免疫学通用原理的标准参考文献包括:Current Protocols in Immunology(《新编免疫学实验指南》),约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons), 纽约州;Klein(1982)J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination(《免疫学: 自身-非自身

区别的科学》(约翰韦利父子公司,纽约州);Kennett等编(1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (《单克隆抗体,杂交瘤:生物学分析的新领域》)(普莱努公司(Plenum Press),纽约州);Campbell(1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (《生化和分子生物学实验室技术》中的“单克隆抗体技术”),Burden等编(的埃尔斯威尔公司(Elsevier),阿姆斯特丹);Goldsby等编(2000) *Kuby Immunology* (《库比免疫学》)(第4版;H.弗里曼公司(H.Freeman&Co.));Roitt等(2001) *Immunology* (《免疫学》)(第6版;伦敦:摩兹比公司(Mosby));Abbas等(2005) *Cellular and Molecular Immunology* (《细胞和分子免疫学》)(第5版;埃尔斯威尔健康科学分公司(Elsevier Health Sciences Division));Kontermann和Dubel(2001) *Antibody Engineering* (《抗体工程》)(施普林格公司(Springer Verlag));Sambrook和Russell(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆:实验室手册》)(冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press));Lewin(2003) *Gene VIII* (《基因VIII》)(普伦蒂斯霍尔出版社(Prentice Hall)2003);Harlow和Lane(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (《抗体:实验室手册》)(冷泉港出版社);Dieffenbach和Dveksler(2003) *PCR Primer* (《PCR引物》)(冷泉港出版社)。

[0226] 将上文中引用的所有参考文献以及其中引用的所有参考文献通过引用全文纳入本文。

[0227] 通过说明的方式,而非限制性方式提供以下实施例。

[0228] 实施例

[0229] 实施例1:抗体产生和纯化

[0230] 抗-0X40IgM和抗-0X40IgG#1和#2

[0231] 作为示例性构建体,根据标准克隆方案,将来自表2的两种抗OX40抗体的VH和VL区掺入IgM(加野生型J链)和IgG形式。抗OX40#1分别包括VH和VL氨基酸序列SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50,并且抗OX40#2分别包括VH和VL氨基酸序列SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52。如下所述表达和纯化这些抗体构建体。如下所述,在还原和非还原的凝胶上分离IgM(加J链)分子。在还原和非还原条件下在SDS-PAGE凝胶上分析纯化的抗OX40IgM抗体。图1A描绘了显示IgM重链和轻链的还原凝胶,图1C描绘了用于解析高分子量IgM的非还原凝胶。将非还原的凝胶样品与NuPage LDS样品缓冲液(Life Technologies#NP0007)混合并上样到NativePage Novex 3-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies#BN1003)上。Novex Tris-乙酸盐SDS运行缓冲液(Life Technologies#LA0041)用于凝胶电泳,并且凝胶用胶体蓝染料(Life Technologies#LC6025)染色。对于还原的凝胶,将样品与样品缓冲液和NuPage还原剂(Life Technologies#NP0004)混合并加热至80℃持续10分钟并上样到NuPage Novex4-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies#NP0322)上。NuPage MES SDS运行缓冲液(Life Technologies#NP0002)用于凝胶电泳,并且凝胶用胶体蓝染色。结果表明抗OX40IgM五聚体均匀组装,并显示IgM重链和轻链。

[0232] 为了证实IgM五聚体中存在J链,进行抗J链Western印迹(图1B)。对于蛋白质印迹,使用iBlot系统(生命技术公司(Life Technologies))根据制造商的说明将蛋白质转移至膜。用含有0.05%Tween-20的PBS中的2%BSA封闭膜,然后使用iBind系统(生命技术公司)与抗J链抗体(Thermo#MA5-16419)一起孵育,随后与HRP偶联的二抗(Jackson

ImmunoResearch#111-035-144)一起孵育。结果证明J链存在于纯化的抗OX40IgM抗体中。

[0233] 其他抗-OX40IgM和IgG构建体

[0234] OX86是IgG1同种型的大鼠抗小鼠OX40单克隆抗体,其分别包含VH和VL氨基酸序列SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10(可从例如加利福尼亚州圣迭戈的电子生物科学公司(eBioscience)获得)。根据标准克隆方案,将VH和VL掺入大鼠,小鼠或人IgM和IgG形式中。通过根据标准克隆方案将选定的VH和VL序列(例如表2中列出的那些)掺入人IgM和IgG形式中来产生抗人OX40IgM。另外,产生针对OX40的新抗体,并且基于它们例如干扰OX40-OX40L相互作用和/或使T细胞信号转导,T细胞增殖和/或细胞因子分泌成熟的能力来选择。如前所述,将选择的抗体结合结构域重排为IgM结合分子。

[0235] 蛋白质表达、纯化和表征

[0236] 转染。将重链,轻链,和修饰的或未修饰的J链DNA(针对IgM五聚体构建体)转染到例如CHO细胞或HEK293细胞中。将表达载体的DNA与聚乙胺(PEI)试剂混合,然后加入细胞中。根据已建立的技术用CHO-S细胞进行PEI转染(参见Biotechnology and Bioengineering,第87卷,553-545页)。

[0237] 例如,根据制造商的推荐,采用MabSelectSuRe亲和基质(GE生命科学(GE Life Sciences),目录号#17-5438-01)纯化IgG表达产物。

[0238] 纯化具有或不具有J链的IgM表达产物,例如采用Capture Select IgM亲和基质(BAC,Thermo Fisher,目录号#2890.05)按照生产商推荐进行纯化。

[0239] 实施例2:抗体表征

[0240] 通过ELISA测量的抗体特异性

[0241] 在如下两种不同抗原密度的ELISA测定中测量抗OX40#1和抗OX40#2的IgG和IgM形式对人OX40的特异性。用在pH 9.5的100mM碳酸氢钠中稀释的0.4或1.6ng/mL的OX40-Fc(R&D)包被ELISA板过夜。所有后续洗涤均使用PBS+0.05%Tween,并且所有孵育步骤均在封闭缓冲液(PBS中的2%BSA)中进行。将板洗涤3次,封闭1小时,然后再次洗涤。然后将板与抗-OX40#1-IgG,抗-OX40#1-IgM,抗-OX40#2-IgG和抗-OX40#2-IgM的四倍稀释曲线一起孵育1小时。洗涤后,将板与1:6000小鼠抗人 κ 轻链-HRP(南方生物技术公司(Southern Biotech))一起孵育1小时。将板洗涤5次,并使用TMB(BD生物科学公司(BD Biosciences))和2N H₂SO₄终止溶液显影ELISA。使用SoftMax Pro软件在SpectraMax340(分子装置公司(Molecular Devices))上在OD450处读板。显示一个代表性实验的技术重复的平均值±SEM。进行三项独立实验。然后在GraphPad Prism软件中使用一个位点特异性结合(One site-Specific binding)与Hill斜率在每个包被密度下计算B_{max}。将倍数变化计算为IgG与IgM的比率,以证明IgM的量增加抗原敏感性。

[0242] 结果显示于图2A和图2B(分别为0.4ng/mL和1.6ng/mL抗原密度下的抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM),以及图2C和图2D(分别为0.4ng/mL和1.6ng/mL抗原密度下的抗-OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM)。对于抗OX40#1-IgM,抗体在0.4ng/mL抗原密度下比抗OX40#1-IgG结合高约28倍,在1.6ng/mL抗原密度下比抗OX40#1-IgG结合高1.2倍。抗-OX40#2-IgM在较低密度下比抗-OX40#2-IgG结合高4倍,在较高密度下比抗-OX40#2-IgG结合高3倍。所有构建体都与人OX40特异性结合。结果显示IgM构建体与OX40结合的亲和力比IgG强得多,特别是在较低抗原密度下。

[0243] 在ELISA测定中测量嵌合IgG和IgM形式的OX86的特异性,例如,下文所述。人或小鼠OX40的胞外结构域以其带标签蛋白质获得(例如,来自纽约州舍利的创造生物标志公司(Creative Biomart))。将抗原以一系列递减浓度包被在板上以确定多聚体形式的抗体是否具有结合低抗原密度的优势。在该方法中,96孔白色聚苯乙烯ELISA板(Pierce 15042)用100 μ L每孔的10 μ g/mL或0.3 μ g/mL的带his标签的鼠OX40胞外结构域于4 $^{\circ}$ C包被过夜。然后用0.05%PBS-Tween洗涤平板,并用2%BSA-PBS封闭平板。封闭后,向孔中加入100 μ L连续稀释的OX86-IgM,OX86-IgG(或如上所述的其他抗人抗体),标准品和对照,并在室温下孵育2小时。然后,板经冲洗并用HRP偶联的小鼠抗人 κ (Southern Biotech,9230-05.1:6000,在2%BSA-PBS中稀释)孵育30分钟。在采用0.05%PBS-吐温进行10次最终冲洗之后,采用SuperSignal化学发光底物(ThermoFisher,37070)读板。发光数据在EnVision酶标仪(Perkin-Elmer)上采集并用GraphPad Prism采用4参数逻辑模型分析。

[0244] 通过使用附着于ELISA板的带his标签的人OX40胞外结构域,使用其他抗人OX40抗体进行类似的实验。

[0245] 抗原亲和性和选择性测量

[0246] 将人或小鼠OX40-Ig(纽约州法明代尔的恩佐生物科学公司(Enzo Life Sciences,Inc.))和对照蛋白接种到Maxisorb ELISA板(Nunc,VWR)上浓度为0.2-2.0 μ g/ml的碳酸氢盐缓冲液中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。在使用之前,将板解冻,洗涤一次,然后用含0.5%BSA的洗涤缓冲液(含有0.05%Tween-20的PBS)封闭。加入如实施例1中所述产生的各种浓度的抗OX40MAb或对照抗KLH抗体,并将样品在室温下孵育1小时,洗涤3次,并与1:7000稀释的生物素化抗人 κ (阿拉巴马州伯明翰的南方生物技术公司)在封闭缓冲液中孵育1小时。然后将链霉亲和素-HRP(宾夕法尼亚州西格鲁甫的杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson ImmunoResearch))与TMB底物(伊利诺州洛克福德的赛默飞世尔公司(Thermo Scientific))一起加入,并在Spectramax酶标仪上读取650nm处的光密度。选择性计算为针对OX40的净信号与其他靶标的比率。

[0247] 使用Forte Bio Octet仪器,使用生物层干扰量度法(Biolayer Interferometry, BLI),使用固定化的鼠或人OX40-Ig进行进一步的亲和性测量。针对市售的抗人OX40抗体,例如Ber-ACT35(白乐津公司(BioLegend))或443318(RD系统公司(R&D Systems)),以及OX40配体(TNFSF4,可从白乐津公司获得)评估表位作图。

[0248] 测试OX40表达

[0249] 外周血单核细胞(PBMC)用如实施例1中所述制备的抗OX40MAb在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。洗涤细胞,用抗- κ -A647检测抗体在4 $^{\circ}$ C下染色15分钟,并再次洗涤。通过流式细胞术评估与CD4+和CD8+效应T细胞和CD4+FoxP3+调节性T细胞的结合。

[0250] T细胞结合测定

[0251] 为了评估IgG和IgM形式的抗OX40#1和抗OX40#2在活化的T细胞上结合OX40的能力,进行结合测定。在用人T细胞活化剂Dynabeads(赛默飞世尔公司)活化3天的PBMC上测试Ab结合,以在CD8+T细胞上诱导低水平的OX40(图3A,3C)或在CD4+T细胞上诱导高水平的OX40(图3B,3D)。0.5 \times 10⁵个细胞/条件用三倍稀释的IgG和IgM形式的抗OX40#1和抗OX40#2染色,然后用20 μ g/mL AlexaFluor[®]488抗人Ig轻链 κ 抗体MHK-49染色。对于PBMC,还包括抗CD3-A647(白乐津公司)和CD4-PerCP-CY5.5(白乐津公司)以对CD4+CD3+CD4T细胞和CD4-

CD3+CD8T细胞进行门控。在FACSCalibur (BD) 上获得FACS数据,在FlowJo (TreeStar) 中分析,并在GraphPad Prism中绘图。显示了CD8T细胞 (n=3个供体) 和CD4T细胞 (n=5个供体) 的一个代表性实验。使用一个位点特异性结合与Hill斜率,在GraphPad Prism软件中计算每种抗体的Kd。将倍数变化计算为IgG与IgM的比率,以证明IgM的量增加抗原敏感性。

[0252] 图3A-D中显示的结果表明,与抗OX40IgG抗体相比,抗OX40IgM抗体表现出增强的与T细胞的结合。图3A和3C显示分别用抗OX40#1-IgM和抗OX40#1-IgG,或抗OX40#2-IgM和抗OX40#2-IgG染色低OX40表达CD8+T细胞时的FACS结果。图3B和3D显示分别用抗OX40#1-IgM和抗OX40#1-IgG,或抗OX40#2-IgM,或抗OX40#2-IgG染色高OX40表达CD4+T细胞时的FACS结果。对于抗OX40#1-IgM,该抗体在低OX40表达CD8+T细胞上比抗OX40#1-IgG结合高约25倍,在高OX40表达CD4+T细胞上比抗OX40#1-IgG高6倍。抗CD8+T细胞上,抗OX40#2-IgM的结合比抗OX40#2-IgG高24倍,并且在CD4+T细胞上抗OX40#2-IgM的结合比抗OX40#2-IgG高约11倍。这些结果表明IgM表现出与T细胞的结合增加。

[0253] 同样可以评估如实施例1中所述产生的抗OX40MAb的细胞结合,例如,如下所述。抗体与刺激的(+抗-CD3)或静止的(无抗-CD3)T细胞在4℃孵育30分钟。洗涤后,细胞用抗- κ -A647检测抗体在4℃下染色15分钟。再次洗涤细胞,然后通过流式细胞术测定。

[0254] T细胞信号转导测定

[0255] 使用市售的OX40信号转导测定法NF- κ B报告基因测定法(DiscoverX)测定抗体的激动剂活性。按照生产商说明进行该实验。两倍稀释的抗OX40#1-IgG和抗OX40#1-IgM或抗OX40#2-IgG和抗OX40#2-IgM,单独与PathHunter U20S OX40信号转导测定(DiscoverX)孵育16小时,或与10 μ g/mL平板结合抗人IgG Fc交联剂(Biolegend#409302)一起与PathHunter U20SOX40信号转导测定(DiscoverX)孵育16小时,随后用PK/PL底物孵育1小时。裂解细胞并在发光计上读数。使用来自最高浓度抗体的RLU来计算IgM与IgG相比的信号转导强度增加(倍数变化)。

[0256] 图4中显示的结果表明,与交联和未交联的抗OX40IgG抗体相比,抗OX40IgM抗体表现出增强的NF- κ B途径活化。与未交联的抗OX40#1-IgG相比,抗OX40#1-IgM抗体显示NF- κ B活化增加23倍,并且与交联的抗OX40#1-IgG抗体相比,抗OX40#1-IgM抗体显示信号活化增加13倍(图4A)。与未交联的抗OX40#2-IgG相比,抗OX40#2-IgM抗体显示NF- κ B活化增加4倍,并且与交联的抗OX40#2-IgG抗体相比,抗OX40#2-IgM抗体信号活化增加2倍(图4B)。这些结果证明了IgM构建体作为超级激动剂的能力。

[0257] 或者,使用市售的OX40表达NF- κ B报告基因测定法(普洛麦格公司(Promega))测定抗体的激动剂活性。将如实施例1中所述制备的抗OX40MAb在含或不含抗CD3MAb的板上包被1小时,然后将板与报告细胞在37℃下孵育4小时。然后裂解细胞并在发光计上读数。

[0258] T细胞增殖测定

[0259] 将如实施例1中所述制备的抗OX40MAb在含或不含抗CD3MAb的板上包被1小时,然后接种幼稚T细胞。15小时后,使用Cell Titer Glo发光试剂(普洛麦格公司)测量T细胞增殖。为了在调节性T细胞存在下评价效应T细胞增殖,用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染料与调节性T细胞以1:1混合来标记效应T细胞,然后将效应T细胞加入预包被抗OX40MAb的板中,含有或不含抗CD3。通过流式细胞术监测效应T细胞增殖。

[0260] T细胞活化和细胞因子分泌

[0261] 在存在或不存在抗CD3抗体的情况下,用如实施例1中所述产生的抗OX40MAb刺激T细胞。24小时后,通过流式细胞术分析IFN γ +和TNF α +T细胞。另外,使用标准ELISA试剂盒测量上清液中分泌的细胞因子IL-2和IFN γ 。

[0262] T细胞介导的细胞毒性

[0263] 用肿瘤细胞特异性肽刺激效应T细胞7天。用CFSE染料标记鼠CT26结肠肿瘤细胞或A20B细胞淋巴瘤细胞,然后与活化的T细胞和如实施例1中所述产生的抗OX40MAb混合。24小时后,通过流式细胞术测量肿瘤细胞的细胞毒性。

[0264] 体内活性

[0265] 对于OX86IgM和OX86IgG抗体,使用同基因小鼠模型。向Ba1b/c小鼠皮下植入CT26或A20肿瘤细胞,然后根据肿瘤大小随机化小鼠。然后向动物给予OX86IgG,OX86IgM或载剂对照,并测量肿瘤体积。

[0266] 对于如实施例1中所述产生的抗人OX40MAb,使用OX40敲入HuGEMM小鼠模型(Crown Bio公司)。在小鼠模型中敲除鼠OX40并用人OX40替换。皮下植入CT26或A20肿瘤,向小鼠给予抗OX40IgG或IgM或载剂,并测量肿瘤体积。

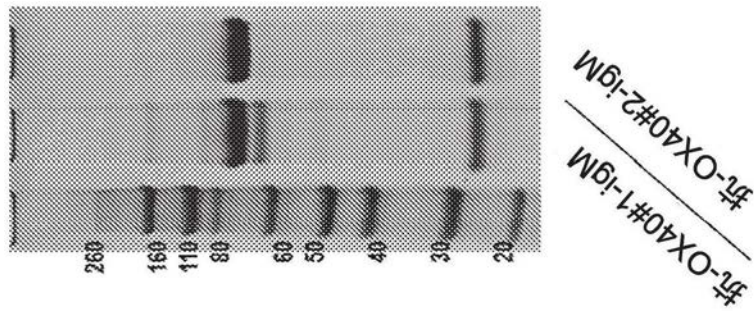


图1A

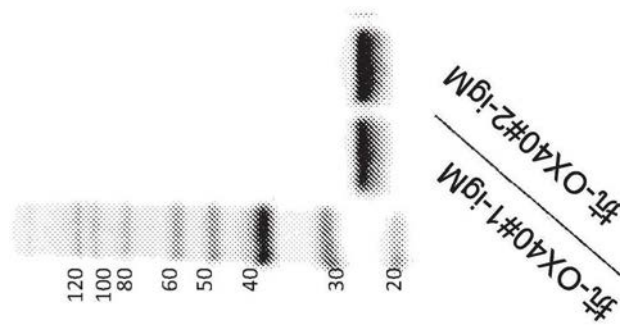


图1B

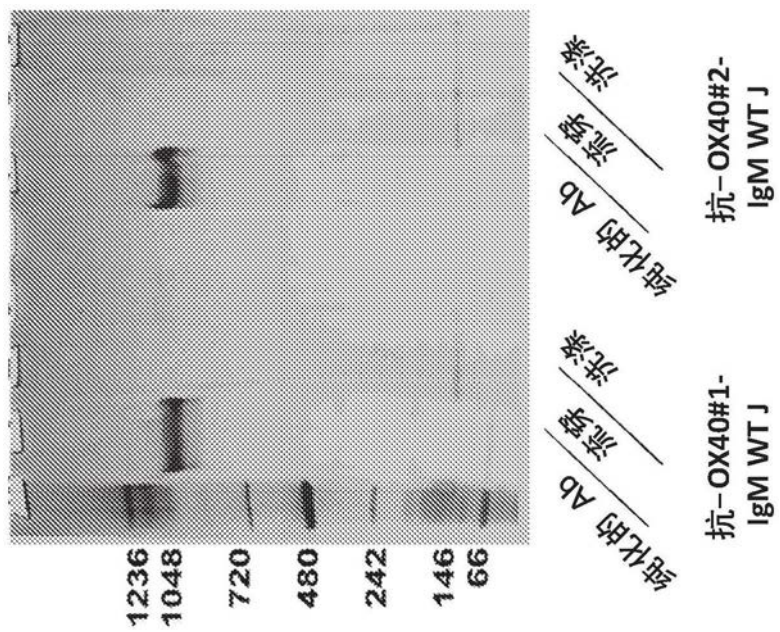


图1C

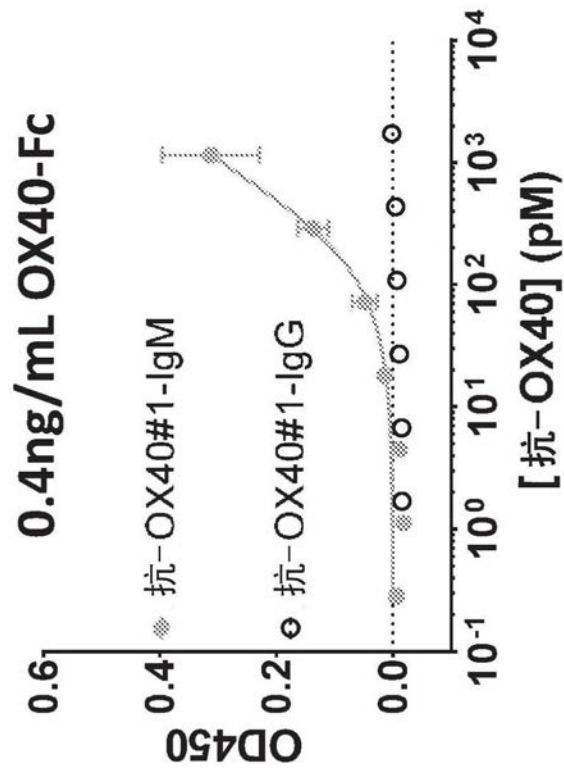


图2A

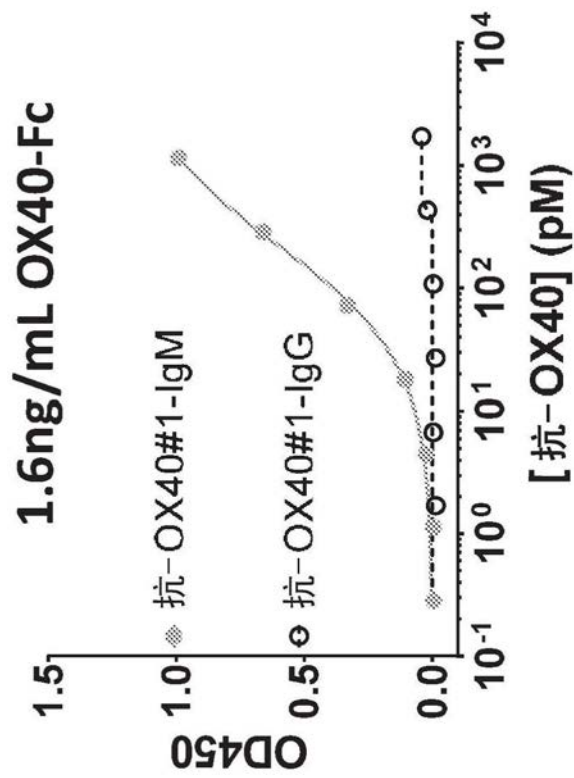


图2B

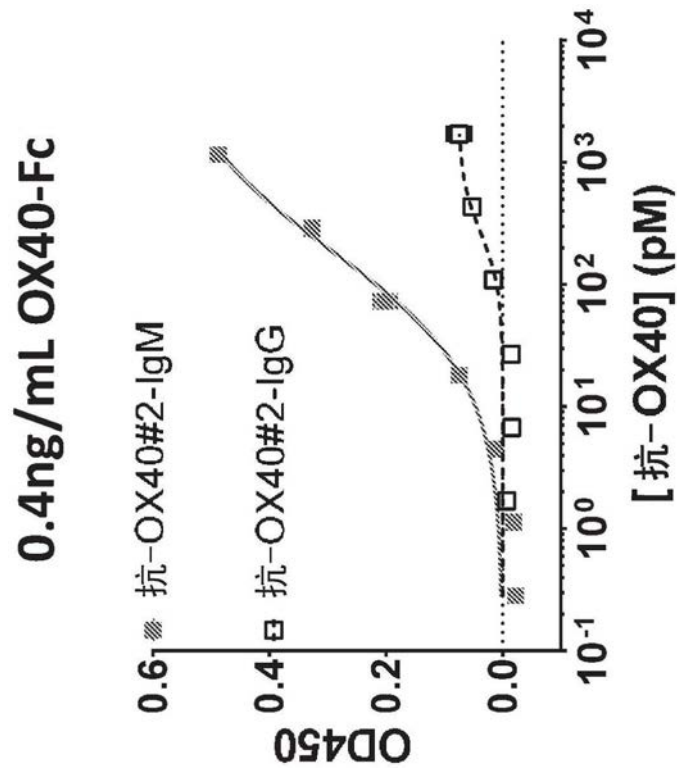


图2C

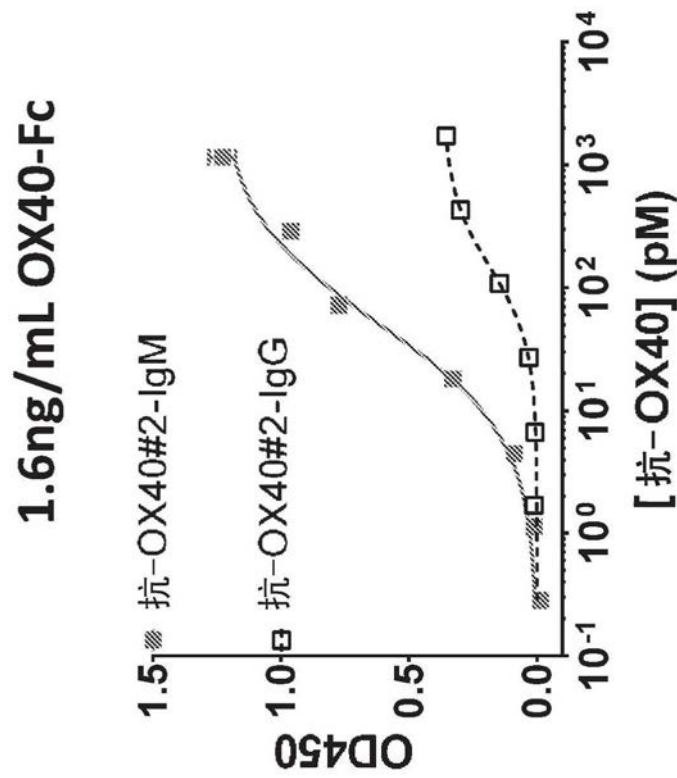


图2D

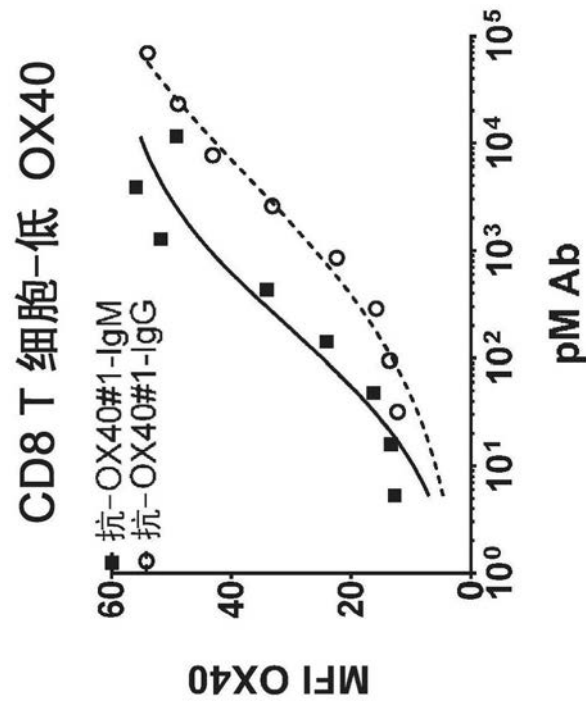


图3A

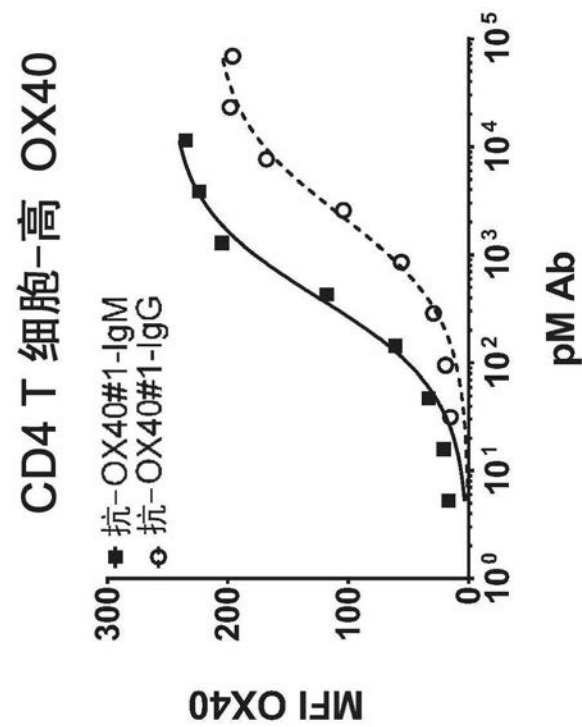


图3B

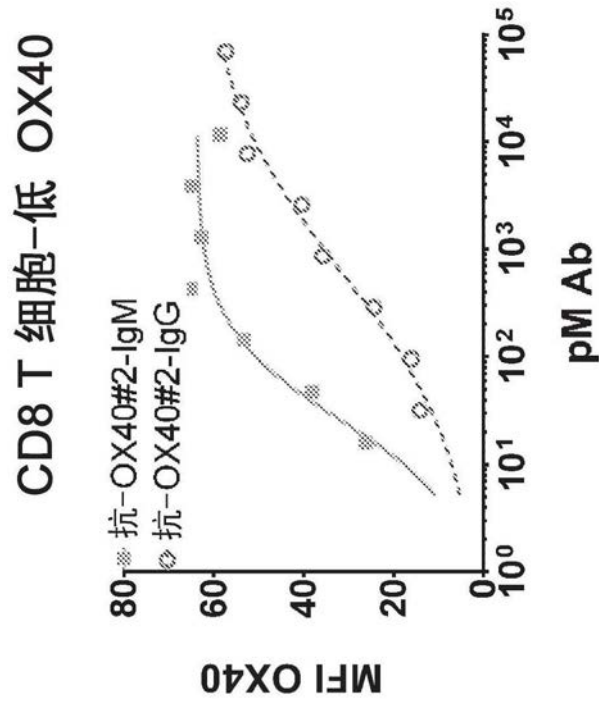


图3C

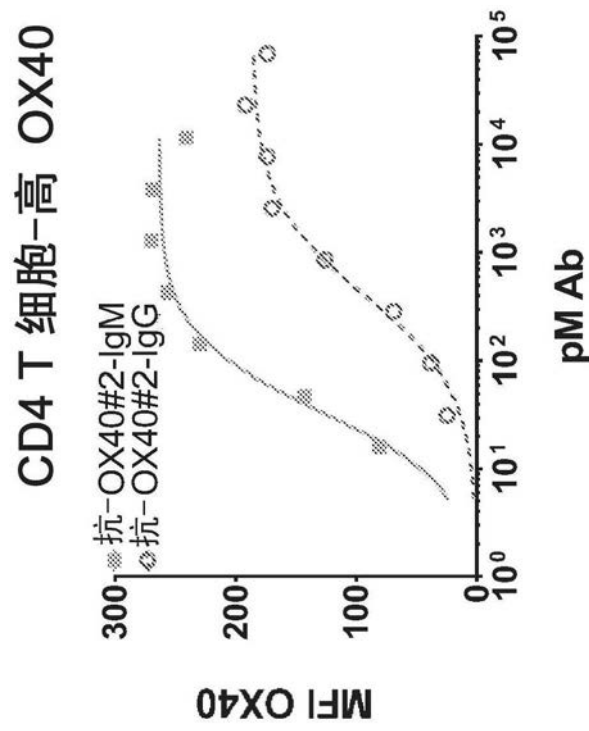


图3D

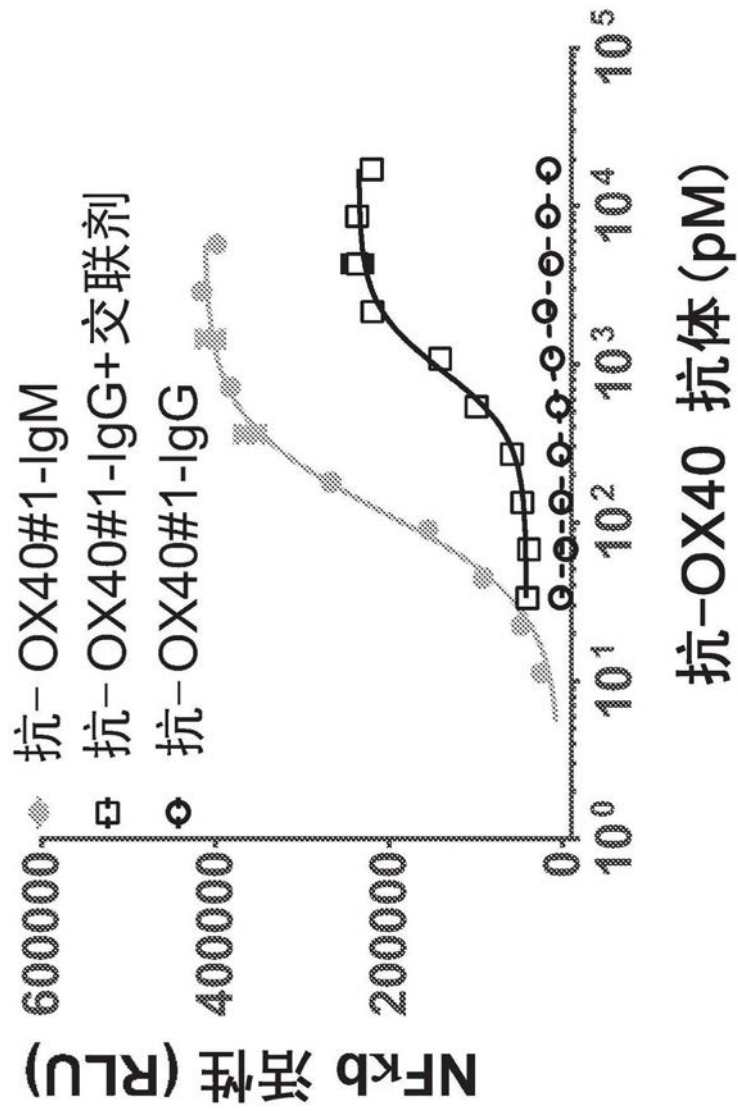


图4A

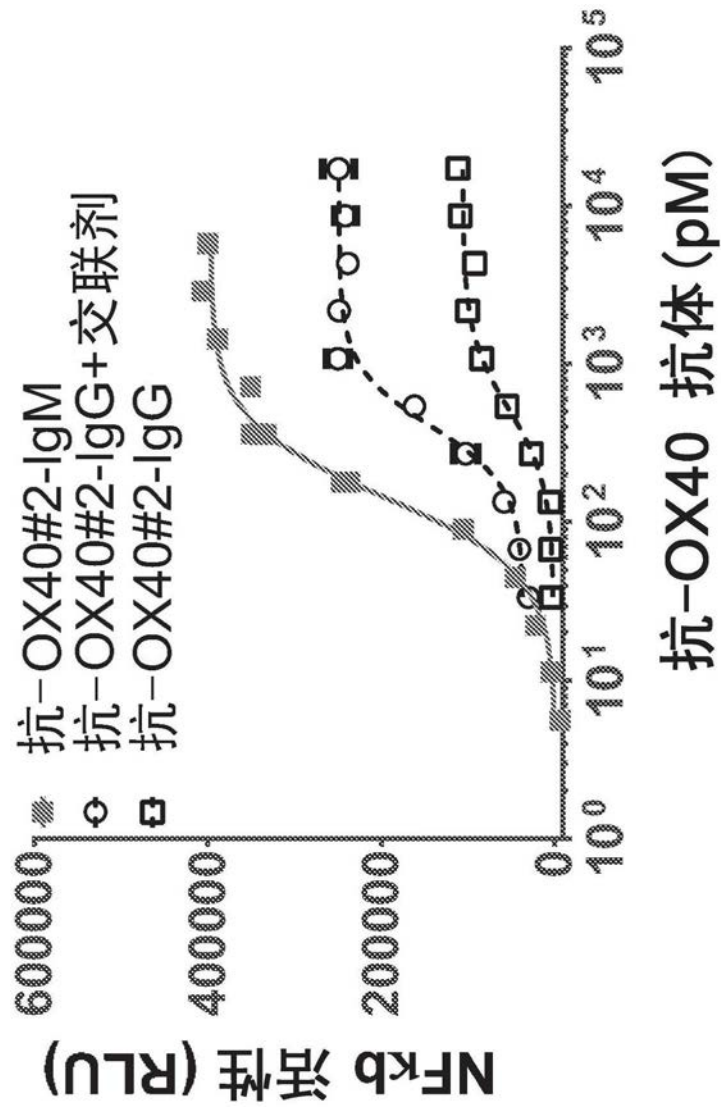


图4B

专利名称(译)	多聚OX40结合分子及其用途		
公开(公告)号	CN109562165A	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201780044931.3	申请日	2017-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	IGM BIOSCI		
[标]发明人	B T Y 王 R 巴利加 BA基特		
发明人	B·T·Y·王 D·R·罗斯纳 R·巴利加 B·A·基特		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/28 C07K16/46 C12N5/0783 C12N5/09 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/2878 C07K16/46 C07K2317/35 C07K2317/52 C07K2317/75 G01N33/5005 G01N33/505 A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/468 C07K2317/14 C07K2317/565 C07K2317/92		
代理人(译)	陈扬扬		
优先权	62/364763 2016-07-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开提供了二聚、五聚和六聚OX40激动剂结合分子以及使用这类结合分子诱导抗肿瘤免疫的方法。

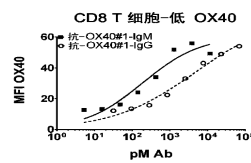


图 3A

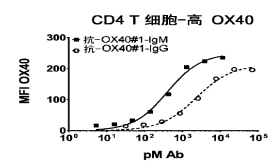


图 3B

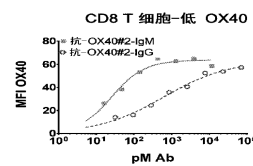


图 3C

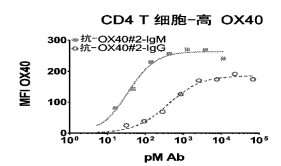


图 3D