

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年9月30日 (30.09.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/190431 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 16/28* (2006.01)    *A61K 38/16* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)    *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 5/07* (2010.01)

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号:

PCT/CN2021/081993

(22) 国际申请日:

2021年3月22日 (22.03.2021)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

202010208900.0    2020年3月23日 (23.03.2020)    CN

(71) 申请人: 百奥泰生物制药股份有限公司 (**BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(72) 发明人: 梁世忠(**LIANG, Shizhong**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 郑丹丹(**ZHENG, Dandan**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 俞金泉(**YU, Jin-Chen**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 李胜峰(**LI, Shengfeng**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。

(74) 代理人: 北京信诺创成知识产权代理有限公司 (**SINO-CREATIVITY INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 中国北京市朝阳区光华路7号汉威大厦东区25A3-1室, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) **Title:** DEVELOPMENT AND APPLICATION OF IMMUNE CELL ACTIVATOR

(54) 发明名称: 一种免疫细胞激活剂的开发及应用

(57) **Abstract:** Provided are development and applications of an anti-OX40 antibody and an immune cell activator. The anti-OX40 antibody of the present invention or a fragment thereof maintains strong binding to human OX40 or Rhesus OX40.

(57) 摘要: 本发明提供一种抗OX40抗体及免疫细胞激活剂的开发及应用, 本发明的抗OX40抗体或其片段保留对人OX40或恒河猴OX40有较强的结合。



## 一种免疫细胞激活剂的开发及应用

### 技术领域

本发明涉及生物免疫技术领域，尤其涉及特异性结合 OX40 的新型抗体和抗体片段。

### 背景技术

免疫系统的检查点有两类，一类是抑制性的，如 PD-1，一类是激活性的，如 OX40。而免疫系统中 T 细胞的充分激活，需要两级信号。第一信号由 T 细胞抗原受体识别抗原产生，经由 CD3 分子将激活信号转至细胞内，而第二信号被称为共刺激信号，由抗原提呈细胞或者靶细胞表面的共刺激分子与激活的 T 细胞表面的共刺激分子受体相互作用而产生。共刺激信号促进抗原特异性 T 细胞增殖和分化为效应 T 细胞。(Lindsay K 等 *Immunity* 2016, 44(5):1005-1019)。

OX40，也称为 TNFRSF4、ACT35、CD134 等，属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)，也是一种 I 型跨膜糖蛋白。OX40 不在静息的 T 细胞上表达，而是表达于被激活的 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞上、NK 细胞和 NKT 细胞上(Paterson DJ 等 *Mol. Immunol.* 1987; 24:1281-1290)。T 细胞被抗原激活后，会在 1-3 天内高表达 OX40 分子。而 OX40 信号的激活会进一步增强 T 细胞的激活信号，以增强免疫系统的反应(Gramaglia I 等 *J. Immunol.* 2000; 165:3043-3050)。

OX40L，也称为 TNFSF4、TXGP1、gp34 和 CD252，是 II 型跨膜糖蛋白，是 OX40 的天然配体，以三聚体的形式存在于被活化的抗原呈递细胞(APC)上，如 DC 细胞和 B 细胞，且受 CD40、toll 样受体(TLR)以及炎症因子的介导而表达。OX40L 还广泛地存在于非造血细胞中，如平滑肌和血管内皮细胞(Murata K 等 *J. Immunol.* 2002; 169:4628-4636)。

通过 OX40L 所激活的 OX40 的胞内信号通路和 T 细胞胞内的多个信号通路相关联。通过分子内二硫键所形成的三聚体 OX40L 和 T 细胞膜上的 OX40 结合后(Compaan DM 等 *Structure.* 2006; 14:1321-30)，能初步激活 OX40 的胞内信号通路。而要想进一步或充分激活 OX40 胞内信号，需要受体的进一步寡聚化，形成六聚体或以上(H Wajant. *Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 1727-1741)。OX40 被激活后，通过其胞内区募集 TNF receptor-associated factor (TRAF) 2 和 5，从而激活 NF $\kappa$ B 信号通路，发挥抗凋亡效果，抑制细胞的凋亡(Song J 等 *J. Immunol.* 2008; 180:7240-8)。

此外，OX40 的胞内信号通路还特定地辅助 T 细胞的 TCR 胞内信号通路，主要是 PKB/PI3K 和钙离子相关的 NFAT 信号通路。前者能促进被激活的 T 细胞的存活和细胞周期的进行(Song J 等 *Nat Immunol.* 2004; 5:150-8)。后者主要是促进活化的 T 细胞的增殖以及相应细胞因子的分泌(So T 等 *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:3740-5)。

有研究者发现在肿瘤浸润的 CD4+Treg 细胞（调节性 T 细胞）上，也会高表达 OX40。Treg 是能抑制效应 T 细胞(Teff)。目前，关于 OX40 信号通路对 Treg 细胞的功能的调节作用的还有没有统一确定的观点。有些研究表明 OX40 信号通路能够抑制 Treg 细胞的免疫抑制功能(Piconese S 等 *J. Exp. Med.* 2008; 205:825-39; Voo KS 等 *J. Immunol.* 2013; 191:3641-50)。而有些则发现 OX40 对于 Treg 细胞充分发挥其免疫抑制功能是必须的

(Piconese S 等 Eur. J. Immunol. 2010; 40:2902-13; Griseri T 等 J. Exp. Med. 2010; 207:699-709)。OX40 胞内信号通路对 Treg 细胞的增殖和凋亡的影响,会随着细胞所处的微环境不同而发生改变。还有研究所发现,在没有 IFN- $\gamma$  和 IL-4 存在或是有 FoxP3 表达时,OX40 的激活能够有力促进 Treg 细胞的增殖(Ruby CE 等 J. Immunol. 2009; 183:4853-7)。而在其它微环境中,则观察到 OX40 的激活对于 Treg 细胞的增殖毫无影响(Vu MD 等 Blood. 2007; 110:2501-10)。

目前,普遍认为,抗 OX40 抗体主要通过以下三种细胞生理机制,达到激活免疫系统的 T 细胞和抑制肿瘤的效果。一是,通过直接激活 CD4+ 和 CD8+ 的效应 T 细胞,促进它们的增殖和生存,以及分泌相关的炎性因子。二是,通过抑制 Treg 的信号和活性,从而减弱其对免疫系统的抑制效果。三是,通过 ADCC 或 ADCP 等,耗竭 Treg 细胞,减少其对效应 T 细胞的抑制(J. Willoughby 等 Molecular Immunology 83, 2017, 13-22)。

抗 OX40 抗体或利用 OX40 的信号通路,来治疗肿瘤的概念,已经在大量的小鼠肿瘤模型上得到有力的验证。根据现有的研究有力地表明,OX40 是肿瘤免疫疗法中的一个非常有潜力的激活性靶点,能为肿瘤免疫治疗提供新的手段。

## 发明内容

本发明提供了能特异识别并结合 OX40 (尤其是人 OX40 (hOX40)) 的新的抗体或其片段。其中所述抗体或其片段能够以更高的亲和力结合 hOX40,同时不和 OX40 配体(OX40L)竞争,能更有效活化 T 细胞,产生更强的免疫应答,提高抗肿瘤活性。

本发明公开了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其片段特异性结合 OX40,所述抗体或其片段包含 (a) - (f) 中一种或多种氨基酸序列:

- (a) 如 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 所示的 VH CDR1;
- (b) 如 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 所示的 VH CDR2;
- (c) 如 SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 所示的 VH CDR3;
- (d) 如 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 所示的 VL CDR1;
- (e) 如 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 所示的 VL CDR2;
- (f) 如 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 所示的 VH CDR1。在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 所示的 VH CDR2。在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 所示的 VH CDR3。在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 所示的 VL CDR1。在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 所示的 VL CDR2。在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1。在一

些实施方案中，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 7、11、13 或 26 所示的 VH CDR2。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 12 或 27 所示的 VH CDR3。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 37、43 或 61 所示的 VL CDR1。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 19、25、38、44 或 62 所示的 VL CDR2。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 34、39、41、45、53 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 所示的 VH CDR2；以及如 SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 所示的 VH CDR3。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 7、11、13 或 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 12 或 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 37、43 或 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 19、25、38、44 或 62 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34、39、41、45、53 或 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 29 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 30 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 4 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 31 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 32 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 33 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 8 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 9 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 31 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 35 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 36 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 37 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 38 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 39 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 40

所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 29 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 43 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 44 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 39 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 15 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 46 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 47 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 48 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 49 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 50 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 51 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 52 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 29 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 54 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 55 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 56 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 57 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 23 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 24 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 58 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 59 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 60 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 62 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 63 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 62 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 44 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 39 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 39 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 44 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 39 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 44 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 64、65、66、67、68、69、70、71 或 72 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 67 或 72 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 67 或 72 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段还包含轻链可变区，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 或 84 所示氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83 或 84 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段还包含轻链可变区,所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 76、78 或 84 所示氨基酸序列,或与 SEQ ID NO: 76、78 或 84 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 72 所示重链可变区,和如 SEQ ID NO: 84 所示轻链可变区。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段是 IgG、IgM、IgA、IgE 或 IgD 的其中一种同种型。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段是 IgG 同种型;在一些实施方案中,所述抗体或其片段是 IgG1 同种型、IgG2 同种型、IgG3 同种型或 IgG4 同种型。没有限制地,抗体或其片段是一种嵌合抗体、一种人源化抗体或是一种全人源抗体。在某一方面,抗体或其片段是一种人源化抗体。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段还包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc 区或其结合。

在一些实施方案中,本文所述的抗体是 IgG 同种型。在一些实施方案中,抗体的恒定区为人 IgG1 同种型,具有包含 SEQ ID NO: 90 所示氨基酸序列的重链恒定区和包含 SEQ ID NO: 91 所示氨基酸序列的轻链恒定区。

在一些实施方案中,抗体的恒定区为人 IgG2 同种型,具有包含 SEQ ID NO: 92 所示氨基酸序列的重链恒定区和包含 SEQ ID NO: 93 所示氨基酸序列的轻链恒定区。

在一些实施方案中,抗体的恒定区为人 IgG4 同种型,具有包含 SEQ ID NO: 94 所示氨基酸序列的重链恒定区和包含 SEQ ID NO: 95 所示氨基酸序列的轻链恒定区。

在一些实施方案中,所述 Fc 区是人抗体的 Fc 区。在一些实施方案中,所述人 Fc 区重链在 345 位 (Eu 编号) 的氨基酸为 R (E345R)。在一些实施例中,所述人 Fc 区重链在 440 位 (Eu 编号) 的氨基酸为 Y (S440Y)。在一些实施例中,所述人 Fc 区包含于 SEQ IN NO: 88 或 SEQ IN NO: 89 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 88、89 或 90 所示的氨基酸序列,和/或所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 90 所示的氨基酸序列,和/或所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段是嵌合抗体或其片段,或人源化抗体或其片段,或全人源抗体或其片段。

在一些实施方案中,所述抗体包含重链和轻链,所述重链包含如 SEQ ID NO: 86 所示的氨基酸序列,或与 SEQ ID NO: 86 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列,所述轻链包含如 SEQ ID NO: 87 所示的氨基酸序列,或与 SEQ ID NO: 87 所示氨基酸序列至少有 90%、至少有 91%、至少有 92%、至少有 93%、至少有 94%、至少有 95%、至少有 96%、至少有 97%、至少有 98%、至少有 99% 序列同源性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗体包含如 SEQ ID NO: 86 所示的重链,以及如 SEQ ID NO: 87 所示的轻链。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段能特异识别并结合人 OX40 或恒河猴 OX40。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段激活、增强或诱导 OX40 的活性。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段可以活化 T 细胞。

在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段促进被激活的 T 细胞的进一步活化,分泌更多的炎性因子。

在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段能激活所述的 OX40 的胞内信号通路。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 5\text{nM}$ 。在一些实施方案中,所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 3.5\text{nM}$ 。在一些实施方案中,所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 2\text{nM}$ 。在一些实施方案中,所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 1\text{nM}$ 。在一些实施方案中,所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 0.2\text{nM}$ 。

在一些实施方案中,所述抗体或片段为单克隆抗体或片段。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段在 CHO 细胞中表达。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段在一种基因组被编辑的 CHO 细胞中表达,所述 CHO 细胞表达低岩藻糖含量或不含岩藻糖的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述基因组被编辑的 CHO 细胞为  $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶基因(fut8 基因)、GDP-甘露糖 4,6-脱水酶(GMD)基因、GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-表异构酶-4-还原酶(GMER)基因、GDP-岩藻糖转运子(GFT)基因(如 Slc35c1 基因)中的一个或多个被减少或敲除的 CHO 细胞。在一些实施方案中,所述抗体或其片段在敲除 fut8 基因的 CHO 细胞中表达。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段中的一个、两个或三个氨基酸残基有岩藻糖修饰。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段中,岩藻糖的含量不超过 10%。在一些实施方案中,所述抗体或其片段中,岩藻糖的含量不超过 5%。在一些实施方案中,所述抗体或其片段中,岩藻糖的含量不超过 1%。在一些实施方案中,所述抗体或其片段中,岩藻糖的含量不超过 0.5%。在一些实施方案中,所述抗体或其片段没有结合岩藻糖。

在一些实施方案中,所述抗体或其片段是分离的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中,本发明还提供一种多聚核苷酸,所述多聚核苷酸编码所述的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸为分离的多聚核苷酸。

在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 96-101 所示的一种或多种核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 96、97 和 98 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 102 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 103 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 102 所示的核苷酸序列,和/或如 SEQ ID NO: 103 所示的核苷酸序列。

在一些实施方案中,本发明还提供一种载体,所述载体包含编码所述的抗体或其片段



的一种或多种多聚核苷酸。在一些实施方案中，所述载体为分离的载体。在一些实施方案中，所述载体是表达载体，所述表达载体包括质粒或病毒。

在一些实施方案中，本发明还提供一种细胞，所述细胞包含编码所述的抗体或其片段的一种或多种多聚核苷酸。在一些实施方案中，所述细胞为分离的细胞。在一些实施方案中，所述细胞为 CHO 细胞。在一些实施方案中，所述细胞包含所述载体。在一些实施方案中，所述细胞中一种或多种基因组被编辑，进而所述 CHO 细胞表达低岩藻糖含量或不含岩藻糖的抗体或其片段。在一些实施方案中，所述基因组被编辑的 CHO 细胞为 Slc35c1 基因、fut8 基因、GDP-甘露糖 4,6-脱水酶 (GMD) 基因、GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-表异构酶-4-还原酶 (GMER) 基因、GDP-岩藻糖转运子 (GFT) 基因中的一个或多个被减少或敲除的 CHO 细胞。

在一些实施方案中，本发明还提供一种组合物，所述组合物包含所述的抗体或其片段、所述的多聚核苷酸或所述的细胞，以及药学上可接受的载体。

在一些实施方案中，本发明还提供一种在有需要的患者中治疗癌症或感染的方法，所述方法包括向所述患者施用有效剂量的所述的抗体或其片段。在一些实施方案中，本发明还提供本文所述的抗体或其片段在治疗癌症或感染中的用途。在一些实施方案中，本发明还提供本文所述的抗体或其片段在制备治疗癌症或感染的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述癌症是实体瘤。

在一些实施方案中，所述癌症选自非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤 (MM)、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤等。实体瘤包括例如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。

在一些实施方案中，所述方法还包括向所述患者施用第二种癌症治疗剂。

在一些实施方案中，所述感染是病毒感染、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染。

在一些实施方案中，本发明还提供一种在有需要的患者中治疗癌症或感染的方法，所述方法包括：(a) 在体外，用本文所述的抗体或其片段处理细胞，和 (b) 将处理后的细胞施用于患者体内。在一些实施方案中，所述方法在步骤 (a) 之前还包括从个体分离出所述细胞。在一些实施方案中，所述细胞从所述患者体内分离出来。在一些实施方案中，所述细胞从不同于所述患者的供体个体中分离出来。

在一些实施方案中，所述细胞是 T 细胞。在一些实施方案中，所述 T 细胞是肿瘤浸润性 T 淋巴细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞或其组合。

在一些实施方案中，本发明还提供一种检测样品中 OX40 表达的方法，使样品与本文所述的抗体或其片段抗体接触，使得所述抗体或其片段结合 OX40，并检测反映样品中 OX40 的表达量的所述结合。在一些实施方案中，所述样品包含肿瘤细胞、肿瘤组织、感染组织或血液样品。

在一些实施方案中，本发明还提供一种在有需要的患者中治疗需要增强免疫机能的疾病的方法，其特征在于，所述方法包括向所述患者施用有效剂量的所述的抗体或其片段。

本发明提供了结合人 OX40 或恒河猴 OX40 的抗体或其片段，其中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段保留对人 OX40 或恒河猴 OX40 有较强的结合。

### 附图说明

图 1 表示的是候选抗体和高表达 OX40 的 Jurkatx 细胞结合的流式图验证。X 轴表示 50nM 的 hOX40-FC 结合的荧光强度。

图 2 表示抗体-F23-32k 不结合 Jurkat-TIM3、Jurkat-CTLA4、Jurkat-TIGIT、CHO 以及 raji 细胞。

图 3 表示用 NF $\kappa$ B 报告基因系统检测候选抗体的体外激活活性。

图 4 表示用 NF $\kappa$ B 报告基因系统, 利用 protein A 使得候选抗体发生聚集时, 体外激活活性;

图 4 中 EC50 值的单位是  $\mu$ g/ml。

图 5 表示的是检测经 SEB 活化后 PBMC, 在本发明抗体的刺激下, IL-2 炎性因子的分泌水平。

图 6 表示用 NF $\kappa$ B 报告基因系统检测实验抗体的 Fc 突变体 32k-RY 和 32k-R 的体外激活活性, 以及在 protein A 或 raji 存在时, 其激活活性的变化。

图 7 表示候选抗体在体内对肿瘤 (MC38) 生长的抑制效果。

图 8 表示亲和力成熟后的抗体和细胞表面的 OX40 的结合能力; 图 8 中 EC50 值的单位是 nM。

图 9 表示候选抗体 ADCC 效应的检测; 图 9 中 EC50 值的单位是  $\mu$ g/ml。

图 10 表示用 NF $\kappa$ B 报告基因系统, 检测在 raji 细胞存在时亲和力成熟后的抗体的体外激活活性。

图 11 表示亲和力成熟后的抗体在体内对肿瘤 (MC38) 生长的抑制效果。

图 12 表示亲和力成熟后的抗体在体内对肿瘤 (MC38) 生长的第 21 天的抑制效果。

图 13 表示抗体的 ADCC 效应的检测; 其中, 横坐标表示浓度, 纵坐标表示细胞毒性。

图 14 表示抗体对被激活的 PBMC 的 IL-2 的分泌的影响。

图 15 表示抗体对非激活条件下 PBMC 细胞因子释放的影响。

### 具体实施方式

#### 定义

除非另有定义, 本发明中使用的科学和技术术语的含义是本领域技术人员所通常理解的含义。通常, 本文所述的细胞培养、分子生物学以及蛋白质纯化使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。对于重组 DNA、寡核苷酸合成和细胞培养与转化 (如电穿孔、脂质转染), 使用了标准技术。酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。前述技术和方法通常根据本领域公知且本说明书中引用和讨论的多部综合和较具体的文献中描述的那样使用。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, 纽约冷泉港 (1989))。

在本发明中, 术语“多肽”旨在涵盖单数的“多肽”以及复数的“多肽”, 并且是指由通过酰

胺键（也称为肽键）线性连接的单体（氨基酸）组成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何单条链或多条链，并且不涉及产物的特定长度。因此，“多肽”的定义中包括肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或多个氨基酸链的任何其他术语，并且术语“多肽”可以用来代替上述任何一个术语，或者与上述任何一个术语交替使用。术语“多肽”也意在指多肽表达后修饰的产物，包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割或非天然发生的氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生，但其不必从指定的核酸序列翻译所得。它可以包括化学合成等任何方式产生。

“氨基酸”是指含有氨基和羧基两种官能团化合物，比如  $\alpha$ -氨基酸。两个或多个氨基酸可以通过酰胺键（也称为肽键）组成多肽。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。每一个氨基酸由至少一个密码子编码。相同氨基酸由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(三字母代码: Ala, 一字母代码: A)、精氨酸(Arg, R)、天冬酰胺(Asn, N)、天冬氨酸(Asp, D)、半胱氨酸(Cys, C)、谷氨酰胺(Gln, Q)、谷氨酸(Glu, E)、甘氨酸(Gly, G)、组氨酸(His, H)、异亮氨酸(Ile, I)、亮氨酸(Leu, L)、赖氨酸(Lys, K)、甲硫氨酸(Met, M)、苯丙氨酸(Phe, F)、脯氨酸(Pro, P)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、色氨酸(Trp, W)、酪氨酸(Tyr, Y)和缬氨酸(Val, V)。

本发明中关于细胞、核酸、多肽、抗体等所使用的术语“分离的”，例如“分离的”DNA 或 RNA 是指分别与天然来源中的其它组分如天然 DNA 或 RNA 所分离的分子。本发明使用的术语“分离的”还指当通过重组 DNA 技术产生基本上不含细胞材料、病毒材料或细胞培养基的核酸或多肽，或化学合成时的化学前体或其他化学品。此外，“分离的核酸”意在包括不以天然状态存在的核酸片段。术语“分离的”在本发明中也用于指从其他细胞蛋白质或组织分离的细胞或多肽。分离的多肽意在包括纯化的和重组的多肽。分离的多肽、抗体等通常通过至少一个纯化步骤制备。在一些实施方案中，分离的核酸、多肽、抗体等的纯度至少为 50%、60%、70%、80%、90%，或 95%。

在本发明中，术语“重组”涉及多肽或多聚核苷酸，意指天然不存在的多肽或多聚核苷酸的形式，可以通过组合产生通常并不存在的多聚核苷酸或多肽。

“同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。通过比较每个序列中可以比对的位置来确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则分子在该位置是同源的。序列之间的同源程度是由序列共有的匹配或同源位置的数目组成的一个函数。

多聚核苷酸或多聚核苷酸区域（或多肽或多肽区域）与另一序列有具有一定百分比（例如，60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或者 99%）的“序列同一性”或“序列同源性”是指当序列比对时，所比较的两个序列中该百分比的碱基（或氨基酸）相同。可以使用本领域已知的软件程序来确定该比对和同源性百分比或序列同一性，比如 Ausubel et al. eds. (2007) 在 *Current Protocols in Molecular Biology* 中所述的软件程序。在一些实施方案中，使用默认参数进行比对。其中一种比对程序是使用默认参数的 BLAST。生物学上等同的多聚核苷酸是具有上述指定百分比的同源性并编码具有相同或相似生物学

活性的多肽的多聚核苷酸。

术语“多聚核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用，是指任何长度的核苷酸的聚合形式，无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸或其类似物。多聚核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行已知或未知的任何功能。比如：基因或基因片段（例如探针、引物、EST 或 SAGE 标签）、外显子、内含子、信使 RNA (mRNA)、转运 RNA、核糖体 RNA、核糖酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA 和、任何序列的分离的 RNA。多聚核苷酸可以包含修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。对核苷酸的结构修饰可以在组装多聚核苷酸之前或之后进行。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后可以进一步修饰多聚核苷酸。这个术语也指双链和单链分子。除另有说明或要求外，本公开的任何多聚核苷酸包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种可互补单链形式中的每一种。

术语“编码”应用于多核苷酸时，是指可以“编码”多肽的多核苷酸，如果在其天然状态或当通过本领域技术人员公知的方法操作时，其可以被转录和/或翻译以产生多肽和/或其片段的 mRNA。反义链是这种核酸的互补序列，其编码序列可以从中推导出来。

在本发明中，“抗体”或“抗原结合片段”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整的抗体或其任何抗原结合片段或其单链。因此术语“抗体”包括分子中含有与抗原结合的具有生物学活性的免疫球蛋白分子的部分或整体的蛋白质或肽。包括但不限于重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区 (CDR)、重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL)、重链恒定区 (CH)、轻链恒定区 (CL)、框架区 (FR) 或其任何部分。CDR 包括轻链的 CDR (VL CDR) 和重链的 CDR (VH CDR)。抗体重链的类别包括  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ ，其中还有一些亚类（例如  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ）。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为 IgG、IgM、IgA、IgG 或 IgE。其中一些可进一步分成免疫球蛋白亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等。轻链的类别包括  $\kappa$ 、 $\lambda$ 。每个重链可以与  $\kappa$  或  $\lambda$  轻链结合。一般来说，当由杂交瘤，B 细胞或基因工程宿主细胞生产免疫球蛋白时，其轻链和重链通过共价键结合，两条重链的“尾巴”部分通过共价二硫键或非共价键结合。在重链中，氨基酸序列从 Y 构型的叉状末端的 N 末端延伸至每条链底部的 C 末端。免疫球蛋白  $\kappa$  轻链可变区为  $V\kappa$ ；免疫球蛋白  $\lambda$  轻链可变区为  $V\lambda$ 。本发明通常用的 VL 为  $V\kappa$ 。虽然某些讨论针对免疫球蛋白分子的 IgG 种类，所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。关于 IgG，标准的免疫球蛋白分子包含分子量约 23,000 道尔顿的两条相同的轻链多肽和分子量约为 53,000-70,000 的两条相同的重链多肽。轻链和重链都可分成结构和功能同源性的区域。术语“恒定的”和“可变的”根据功能被使用。就这点而言，应理解，VL 和 VH 决定了抗原识别和特异性。VL 和 VH 上的抗原结合位点能够识别抗原决定簇并且与抗原特异性的结合。抗原结合位点由 VH 和 VL 中各自的三个 CDR 定义（即 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3）。CL 和 CH (CH1、CH2 或 CH3) 赋予重要的生物学性质，如分泌、经胎盘移动、Fc 受体结合、补体结合等。按照惯例，恒定区的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N 端部分是可变区，C 端部分是恒定区；CH3 和 CL 结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

在本发明中，抗体的重链恒定区可以来源于不同的免疫球蛋白分子。例如，抗体的重

链恒定区可以包括源自 IgG1 分子的 CH1 结构域和源自 IgG3 分子的铰链区。在另一实施例中，重链恒定区可以包括部分源自 IgG1 分子和部分源自 IgG3 分子的铰链区。在另一实施例中，部分重链可以包括部分源自 IgG1 分子和部分源自 IgG4 分子的嵌合铰链区。

在本发明中，术语“铰链区”包括连接 CH1 结构域和 CH2 结构域的部分重链结构。所述铰链区包含约 25 个残基并且是有韧性的，从而使得两个 N 端抗原结合区能够独立移动。

在本发明中，术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。半胱氨酸包含可以与第二个硫醇基团形成二硫键或桥接的硫醇基团。在大多数天然存在的 IgG 分子中，CH1 和 CL 区通过二硫键连接，两条重链通过两个二硫键相连接。

在本发明中，术语“片段”、“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分，例如 F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv 等。不管其结构如何，抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗原结合片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体，还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

“scFv”是指免疫球蛋白的 VH 和 VL 的融合蛋白。在一些方面，这些区域与约 10 个至约 25 个氨基酸的短接头肽连接。接头可以富含甘氨酸以增加柔韧性，以及富含丝氨酸或苏氨酸以增加溶解性，并且可以连接 VH 的 N 端和 VL 的 C 端，反之亦然。尽管该蛋白质被除去了恒定区和引入了接头，但其保留了原始免疫球蛋白的特异性。

本发明公开的抗体、抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性，全人源、人源化、灵长类化，或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段。

本文所用术语“表位”包括任意能够特异性结合免疫球蛋白或其片段或 T 细胞受体的蛋白决定区。表位决定区通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成且通常有特定的三维结构性质以及特定的电荷性质。当解离常数小于等于 1 $\mu$ M (例如小于等于 100nM、小于等于 10nM 或小于等于 1nM) 时，即可称抗体特异性结合抗原。

在本领域中使用和/或接受的术语有两个或多个定义的情况下，除非明确地对立指出，否则本文使用的术语的定义包括所有这些含义。

除非另有说明，抗体各个结构域中的残基的编号根据 EU 编号系统，其也被称为 EU 索引，如在 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

本发明公开的抗体可以来源于任何动物，包括鸟类和哺乳动物。较佳地，抗体是人源、鼠源、驴源、兔源、山羊源、豚鼠源、骆驼源、美洲驼源、马源或鸡源抗体。在另一实施例中，可变区可以是软骨鱼纲来源(例如来自鲨鱼)。

在本发明中，术语“嵌合抗体”被认为是指抗体的可变区从第一个物种中获得或衍生，而其恒定区(在本发明中可以是完整的、部分的或修饰过的)来源于第二个物种的任何抗体。在一些实施例中，可变区来自非人源(例如小鼠或灵长类动物)，而恒定区是人源。

“特异性结合”或“对……具有特异性”通常是指抗体通过其抗原结合结构域与表位结合，并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间具有互补性。根据这个定义，当抗体通过其抗原结合结构域与该表位结合时，比它结合到随机的、不相关的表位更容易，其被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本发明中用于限定特定抗体与特定表位结合的相对亲和力。免疫学结合相互作用的强度或亲和力可以以相互作用的平衡解离常数(K<sub>D</sub>)表示，其中较小

的  $K_D$  代表亲和力较强。所选多肽的免疫结合特性可使用本领域熟知方法进行定量。一种方法，需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率，其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力和在两个方向同等影响该速率的几何参数。因此，“结合速率常数”(K<sub>on</sub>)和“解离速率常数”(K<sub>off</sub>)两者可通过计算浓度和实际的缔合和解离速率测定(参见 Nature 361:186-87 (1993))。K<sub>off</sub>/K<sub>on</sub> 比率能够消除与亲和力无关的参数，并且等于平衡解离常数  $K_D$ ，即为亲和力数值。(通常参见 Davies 等人 (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。当与 OX40 的平衡结合常数(K<sub>D</sub>) $\leq$ 1 $\mu$ M 时，本公开的抗体可以视为与 OX40 特异性结合。

在本发明中，抗体的岩藻糖的“含量”，是指在抗体中，含有岩藻糖的糖型部分在抗体所有糖型部分中占的摩尔比。在一些实施方案中，抗体的岩藻糖含量不低于约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99%。在一些实施方案中，抗体的岩藻糖含量约为 96%。在一些实施方案中，抗体的岩藻糖含量不超过约 10%、约 9%、约 8%、约 7%、约 6%、约 5%、约 4%、约 3%、约 2%、约 1% 或约 0.5%。在一些实施方案中，抗体的岩藻糖含量约为 0。

在本发明中，术语“治疗”是指预防性措施和/或治疗性治疗，其目的是预防、减缓和/或消除不良的生理改变或紊乱(如癌症)的进程。有益的或期望的临床结果包括但不限于以下结果：如症状的缓解、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和等。“治疗”还意指延长的生存期限(与不接受治疗时预期的生存期限相比)。需要治疗的包括那些已经患有病症或紊乱的人，以及那些容易患有病症或紊乱的人，或者那些需要预防该病症或紊乱的人。

“患者”通常指需要诊断、预后或治疗的任何患者，特别是哺乳动物患者。哺乳动物患者包括人类、狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等，特别是人类。

在本发明中，诸如“需要治疗的患者”包括从施用本发明公开的抗体或组合物中用于检测、诊断过程、预防和/或治疗中受益的患者，例如哺乳动物患者。

除非另有说明，术语“OX40”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物诸如灵长类(如人、恒河猴)和啮齿类(如小鼠和大鼠))的任何天然 OX40。该术语涵盖“全长”，未加工的 OX40 以及因细胞中的加工所致的任何形式的 OX40。

“OX40 活化”指 OX40 受体的活化。通常，OX40 活化导致信号转导。

“活化 T 细胞”意指诱导、引起或刺激效应或记忆 T 细胞具有更新、持续或放大的生物学功能。增强 T 细胞功能的例子包括：相对于干预前，来自 CD8<sup>+</sup>效应 T 细胞的  $\gamma$ -干扰素(例如 IFN $\gamma$ )或白细胞介素(例如 IL-2)分泌增加，来自 CD4<sup>+</sup>记忆和/或效应 T 细胞的  $\gamma$ -干扰素(例如 IFN $\gamma$ )或白细胞介素(例如 IL-2)分泌增加，CD4<sup>+</sup>效应和/或记忆 T 细胞增殖增强，CD8<sup>+</sup>效应 T 细胞增殖增强，抗原响应性(例如清除)增强。相关的测量方法是本领域技术人员已知的。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放的，作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子、白介素(IL)(诸如 IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15)、肿瘤坏死因子(诸如 TNF- $\alpha$  或 TNF- $\beta$ )及其它多肽因子(包括 LIF 和 kit 配体(KL)和  $\gamma$ -干扰素)。如本文中使用的，术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子

的生物学活性等效物。生物学活性等效物包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

如本文所用，术语“标记”或“经标记的”是指掺入可检测标记，例如，通过掺入放射性标记的氨基酸，或者附着于可标记的亲合素(例如，含有荧光标记或可由光学方法或量热法检测的具有酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下，标记物或标记也可用于治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。用于多肽的标记物的示例包括但不限于以下项：放射性同位素或放射性核素(例如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、荧光标记物(例如 FITC、罗丹明、镧系磷光体)、酶标记物(例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记、生物素酰基、被二级报告基因识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中，标记通过各种长度的间隔臂连接以减小可能的空间位阻。

### 抗 OX40 抗体

本发明的抗体具有结合 OX40 的能力，能激活 OX40 的胞内信号通路，特别是在 Fc 受体或表达 Fc 受体的细胞参与时，以此促进 T 细胞的激活，并抑制肿瘤的生长或转移。例如，可使用本文实施例中描述的 NF $\kappa$ B 报告基因系统检验其激活 T 细胞的功能。

在一些实施方案中，本发明提供了结合人 OX40 或恒河猴 OX40 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段保留对人 OX40 或恒河猴 OX40 的强的结合(例如与已知的抗 OX40 抗体，例如 OX40mAb24 和 11D4 相当或更强)。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段结合人 OX40 或恒河猴 OX40。本发明的抗体或其抗原结合片段不结合或相比与人 OX40 或恒河猴 OX40 的结合较低地结合鼠 OX40，例如小鼠 OX40。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段结合人 OX40 的  $K_D$  小于或等于约 20nM、约 19nM、约 12nM、约 6nM、约 5nM、约 4nM 或约 2nM。在一些实施方案中， $K_D$  小于或等于约 1nM、约 0.8nM、约 0.6nM、约 0.4nM 或约 0.2nM。在一些实施方案中， $K_D$  为约 0.16nM。在一些实施方案中，抗体结合亲和力是使用生物光干涉测定法(例如 Fortebio 亲和测量)测定的。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段对人 OX40 的结合是使用流式细胞术测定法测定的。在一些实施方案中，对人 OX40 的结合具有小于或等于约 1.5nM 的  $EC_{50}$ 。在一些实施方案中，对人 OX40 的结合具有小于或等于约 1.33nM 或约 1.0nM 的  $EC_{50}$ 。

在一些实施方案中，抗 OX40 抗体的激动剂活性由 OX40 信号传导来评估。主要是利用转染了 OX40 和 NF $\kappa$ B 报告基因的 Jurkat 细胞来检测。本发明提供了与用 IgG 对照抗体相比，提高 NF $\kappa$ B 介导的转录活性水平的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，与相应的对照 IgG 相比，在 raji 细胞的参与下，抗 OX40 抗体或其抗原结合片段能够将 NF $\kappa$ B 介导的转录活性水平提高大约 9 倍多。在一些实施方案中，与相应的对照 IgG 相比，本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够将 NF $\kappa$ B 介导的转录活性水平提高大约 5 倍或更多。

在一些实施方案中,抗 OX40 抗体的 Fc 经过 RY(E345R 和 S440Y)和 R(E345R)突变后,利用转染 OX40 和 NFκB 报告基因的 Jurkat 细胞来检测它们的活性。经过 RY 突变后的抗体的活性比没突变的抗体的高 12 倍,而经过 R 突变的抗体的活性比没突变的抗体高 10 倍。

在一些实施方案中,抗 OX40 抗体的激动剂活性由 PBMC 细胞活化后释放的细胞因子(IL-2)的水平来评估。与相应的对照 IgG 相比,本发明的抗 OX40 抗体或其片段能够将 PBMC 细胞分泌的 IL-2 水平增加高达约 1 倍、约 2 倍、约 3 倍或更高。

在一些实施方案中,抗 OX40 抗体或其抗原结合片段,经过亲和力成熟后,其亲和力提高了约 5 倍、约 10 倍、约 20 倍或约 70 倍。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH),其中所述 VH 包含互补决定区域 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3,其中 VH CDR1 包含与选自 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成,VH CDR2 包含与选自 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成,且 VH CDR3 包含与选自 SEQ ID NO:3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中,本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(VL),其中所述 VL 包含互补决定区域(CDR)VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3,其中 VL CDR1 包含与选自 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成,VL CDR2 包含与选自 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成,VL CDR3 包含与选自 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性或者 100%同一性的氨基酸序列或由其组成。本发明抗体或其抗原结合片段中 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 可以是表 1 中各 CDR 对应的任一氨基酸序列的示例性组合。

表 1 各序号对应的 CDR 序列

SEQ ID NO	VH CDR1	SEQ ID NO	VH CDR2	SEQ ID NO	VH CDR3
1	GFTFSSYA	2	ISYDGSNK	3	ARELGVYSGYDTPFDY
4	GFTFDDYA	5	IGGSGGST	6	AKDRGYGDYYWYFDL
10	SYGMH	7	VI SEDGSNQYYADSVKG	9	AKDPLGSSWFEYFQH
16	GFTFSTYA	8	ISGSGGNT	12	DNQDSSPDVGIDY
22	GFTVSSNY	11	VISYDGSNQYYADSVKG	15	AKDGPYFDY



104	GFTFSSYG	13	VIAEVGSNQYYADSVKG	18	AKSSSTVATDFDYGMDV
		14	ISNSGGST	21	ARGDSSSWFIFQD
		17	ISGTGDWA	24	ARVVVPGYFDL
		20	ISGSGGST	27	DNQDTSPDVGIDY
		23	IYYGGST		
		26	VIWEDGSNQYYADSVKG		
SEQ ID NO	VL CDR1	SEQ ID NO	VL CDR2	SEQ ID NO	VL CDR3
28	RDIRDD	19	AAVALQS	30	LQSDYPLT
31	SSDVGGYNY	25	AAVGLQS	33	SSYTTSSTLV
37	QDILGY	29	AAS	34	QQYTDYPLT
40	QSISSYLN	32	DVS	36	SSYSSSTLVV
43	RASQNISPFLN	35	EVS	39	QQYNSYPLT
46	QGIGDD	38	ATS	41	QQYDDYPLT
49	EEIGSWLAW	44	AASSLQS	42	LQIDSYPLT
52	EDIGRW	47	KAS	45	QQYNDYPLT
55	SSNMGSNP	50	EAS	48	QQAHSFPPT
58	DSLRSYYAS	56	NNN	51	QQYGSYPPT
61	RASQNISPFLN	59	NNR	53	QQYSDYPLT
		62	AAVGSQS	54	QQYNYNPPPT
				57	AAWDDGLNGWV
				60	HSRDSSGKYV
				63	QQYTDYPL

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其片段包含重链可变区 VH，其包含与选自 SEQ ID NO: 64-72 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性或者 100% 同一性的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区 VL，其包含与选自 SEQ ID NO: 73-84 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性或者 100% 同一性的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明抗体或其抗原结合片段中重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 为表 3 的示例性组合。

在一些实施方案中，所述抗体或其片段还包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc 区或其结合。

在一些实施方案中，所述抗体包含如 SEQ ID NO: 86 所示的重链，以及如 SEQ ID NO: 87 所示的轻链。

本发明公开的抗体、抗原结合片段、变体或衍生物。变体是指对抗体或其抗原结合片段中的一个或多个氨基酸残基进行删除和/或替换，或插入一个或多个氨基酸残基而得到的抗体或其抗原结合片段。衍生物包括被修饰的衍生物，即通过任何类型的分子与抗体的共价连接进行修饰，其中共价连接不会阻止抗体与表位结合。包括但不限于以下实例，抗体可以通过例如糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其他蛋白质等。众多化学修饰中的任一种修饰

可以通过现有技术进行，包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，抗体可以含有一个或多个非自然的氨基酸。

在一些实施例中，抗体可以与治疗剂、药物前体、肽、蛋白质、酶、病毒、脂类、生物反应调节剂、药剂或 PEG 缀合。

抗体可以与治疗剂缀合或融合，所述治疗剂可包括可检测标记，如放射性标记、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂或诊断剂、可以是药物或毒素的细胞毒性剂、超声增强剂、非放射性标记物及其组合物，和本领域已知的其它此类试剂。

抗体可通过将其偶联至化学发光化合物来被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中出现的发光从而确定化学发光标记的抗原结合片段的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例包括鲁米诺、异鲁米诺、芳香吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

在一些实施方案中，本发明抗 OX40 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列，例如 MEFGLSWVFLVAILKGVQC(SEQ ID NO:85)。

在一些实施方案中，本发明的抗体还涵盖抗 OX40 抗体的氨基酸序列的变体，以及与上文所述的任何抗体结合相同表位的抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗 OX40 抗体还涵盖其抗体片段；在一些实施方案中，选自以下的抗体片段：Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或 (Fab')<sub>2</sub> 片段。

本发明的抗 OX40 抗体可通过常规重组 DNA 技术制备，例如，通过使用本领域技术人员公知的重组 DNA 技术可以选择、构建和培养编码抗体的 DNA、生产抗体的载体及细胞系。这些技术在各种实验室手册和主要出版物中均有描述。在这方面，下文描述的适合本发明使用的技术参考 Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)，其全部内容包括补充内容通过引用并入全文。

在一些实施方案中，可以按常规方法根据本文所述抗体氨基酸序列设计合成编码抗体的 DNA，将其置入表达载体中，然后转染宿主细胞，在培养基中培养被转染的宿主细胞产生单克隆抗体。在一些实施方案中，表达抗体载体包括至少一个启动子元件，抗体编码序列，转录终止信号和 polyA 尾。其他元件包括增强子，Kozak 序列及插入序列两侧 RNA 剪接的供体和受体位点。可以通过 SV40 的前期和后期启动子，来自逆转录病毒的长末端重复序列如 RSV、HTLV1、HIV1 及巨细胞病毒的早期启动子来获得高效的转录，也可应用其它一些细胞的启动子如肌动蛋白启动子。合适的表达载体可包括 pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, 或者 Plncx, pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo(+/-), pcDNA3.1/Hygro (+/-), PSVL, PMSG, pRSVcat, pSV2dhfr, pBC12MI 和 pCS2 等。常使用的哺乳动物细胞包括 293 细胞, Cos1 细胞, Cos7 细胞, CV1 细胞, 鼠 L 细胞和 CHO 细胞等。

在一些实施方案中，插入基因片段需含有筛选标记，常见的筛选标记包括二氢叶酸还原酶，谷氨酰胺合成酶，新霉素抗性，潮霉素抗性筛选基因，以便于转染成功的细胞的筛选分离。将构建好的质粒转染到宿主细胞，经过选择性培养基培养，转染成功的细胞大量生长，产生想要获得的目的蛋白。

在一些实施方案中，本发明提供了编码以上任何抗 OX40 抗体或其片段的核酸。在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。表达载体

包括质粒、逆转录病毒、YAC、EBV 衍生的附加体等等。在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293F 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 96-101 所示的一种或多种核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 96、97 和 98 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 99、100 和 101 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 102 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 103 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述多聚核苷酸包含如 SEQ ID NO: 102 所示的核苷酸序列，和/或如 SEQ ID NO: 103 所示的核苷酸序列。在一些实施方案中，包含如 SEQ ID NO: 96、97、98、99、100 或 101 所示的核苷酸序列的多聚核苷酸可分别编码产生包含如 SEQ ID NO: 10、26、27、61、62 或 63 所示的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中，包含如 SEQ ID NO: 102 所示的核苷酸序列的多聚核苷酸可编码产生包含如 SEQ ID NO: 72 所示的氨基酸序列的多肽；在一些实施方案中，包含如 SEQ ID NO: 103 所示的核苷酸序列的多聚核苷酸可编码产生包含如 SEQ ID NO: 84 所示的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中，包含如 SEQ ID NO: 105 所示的核苷酸序列的多聚核苷酸可编码产生包含如 SEQ ID NO: 90 所示的氨基酸序列的多肽；在一些实施方案中，包含如 SEQ ID NO: 106 所示的核苷酸序列的多聚核苷酸可编码产生包含如 SEQ ID NO: 91 所示的氨基酸序列的多肽。其中，各核苷酸序列如下表 2 所示。

表 2 各编号核苷酸的序列表

SEQ ID NO:	序列
96	tcctacggcatgcac
97	gtgatctgggaggatggctccaaccagtactatgccacagcgtgaaggga
98	gacaaccaagacaccagccccgacgtggcatcgattat
99	agagccagccagaacatctcccccttctgaat
100	gccgctgtgggactgcagagc
101	cagcagtataccgactaccctctgacc
102	caagtgcagctggtgagagcggaggaggagtgggtgcaaccggcgagtcctcagactgagctgtgccgaccggttcaccttcagctcctacggcatgcactgggtgagacaagccccggcaaggactggagtgggtggccgtgatctgggaggatggctccaaccagtactatgccgacagcgtgaagggaagatcaccatctctagagacaactcaagaacacactgtatctgcagatgaactctctgagggccgaggacaccggcgtgtactactgcgccaaggacaaccaagacaccagccccgacgtgggcatcgattatggggccagggtaccctggttaccgttagcagc
103	gacatccagatgaccagagccctagctctctgtccgctagcgtgggagatagagtaccatcacatgcagagccagccagaacatctcccccttctgaattggtatcagcagaagccccggcaaggccccctaaagctgctgatctatgccgctgtgggactgcagagcggagtccttcagattctcggcagcggcagcggaaaccgactcacactgaccatcagctctctgcagcccagagacttcgacacactactgcccagcagataccgactaccctctgacctcggaggcggcaccgaaggtggagatcaag
105	gcgagcaccaaaggccccgagcgtgttccgctggccccgagcagcaaaagcaccagcgggtggcaccgcagcgtgggttcctggtgaaagattattccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccccctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtcttacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtccccccagcagcttggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaagttgagcccaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagctctcctctccccccaaacccaaggacacctcatgctccccgaccctgaggtcacatgcgtgtggtggacgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatccaagacaagccgaggagagcagtagaacagcacgtaccgtgt

	<p>ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcg                  agaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacagggttacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccagggt                  cagcctgacctgctgcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggcagccggagaacaactacaagacc                  acgctcccgtctgactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat                  gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa</p>
106	<p>cgtaagggtgctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgttgtgtgctgctgaataacttctat                  cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccccaatcggttaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggac                  agcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcaagtcaccatcagggcct                  gagctgcccgtcacaagagcttcaacagggagagtg</p>

本发明的药物组合物可包括本发明的抗体或其抗原结合片段。这些药物组合物可包括于试剂盒中，如诊断试剂盒。

本发明还提供了通过给予有需要的患者一种或多种本文所述抗体或片段从而缓解癌症或其他肿瘤病症或感染症状的方法。所述抗体的给药剂量应足够缓解患者中癌症或其他肿瘤病症或感染症状。在一些实施方案中，所述患者是人。在一些实施方案中，所述抗体是嵌合、人源化或全人源的。在一些实施方案中，所述抗体或其片段能激活 T 细胞，促进其增殖或分泌炎症因子。在一些实施方案中，所述抗体或其片段是一种 IgG 同种型，所述 IgG 同种型选自 IgG1 同种型、IgG2 同种型、IgG3 同种型和/或 IgG4 同种型组成的组。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段是选自 IgG4P 和 IgG4PE 的 IgG 同种型。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段是选自含 RY(E345R 和 S440Y)和 R(E345R)的 IgG 同种型。

在一些实施方案中，所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂被制备为单个治疗组合物，并同时给予所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂。或者，所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂彼此独立，例如分别制备为独立的治疗组合物，并同时给予所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂，或在治疗方案期间在不同时间给予所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂。例如，在给予其它治疗剂前给予所述抗 OX40 抗体，在给予其它治疗剂后给予所述抗 OX40 抗体，或在以交替的方案给予所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂。本文中，以单个剂量或多个剂量给予所述抗 OX40 抗体和其它治疗剂。

本领域技术人员应理解本发明的抗体有多种用途。例如，本发明的抗体可用作治疗剂、用作诊断试剂盒中的试剂或用作诊断工具、或用作竞争实验中的试剂以生成治疗剂。

本发明提供了表 3 中的抗体及其序列。本文中，这些抗体被统称作抗 OX40 抗体。

本文所述抗体的一些特性包括：与人 OX40 和恒河猴 OX40 特异性结合；能激活 OX40 的胞内信号通路；能促进 T 细胞的激活；针对癌症，显示有力的抑制肿瘤活性。

本发明的抗体及其片段与人 OX40 表位结合的平衡解离常数 ( $K_D$ ) 是用生物光干涉测定法和 BIACORE 测定的，其小于或等于约 20nM、约 19nM、约 12nM、约 6nM、约 5nM、约 4nM、约 2nM。在一些实施方案中，所述  $K_D$  小于或等于大约 1nM 或 0.16nM。

本发明的抗体或其片段对人 OX40 表位结合的平衡结合常数 ( $K_D$ ) 是用流式细胞术测定法测定的。在一些实施方案中，对人 OX40 的结合具有小于或等于大约 1.5nM 的 EC50。在一些实施方案中，对人 OX40 的结合具有小于或等于大约 1.33nM 或 1.0nM 的 EC50。其所测定的  $K_D$  等于或小于已知的对照抗体。

本发明的抗 OX40 抗体激活 OX40 的活性是用 NFκB 报告基因系统鉴定的, 在 protein A 存在时, EC50 约为 0.14μg/ml, 而在 Raji 细胞存在时, EC50 约 0.0602μg/ml 和 0.0722μg/ml。

本发明的示例性抗体包括抗体-F10、抗体-F15-1L、抗体-A2、抗体-X35-6L、抗体-A6-1k、抗体-M5-5k、抗体-M5-7k、抗体-F23-4k、抗体-F23-7k、抗体-F23-32k、抗体-FE-16H 和抗体 M。本发明的示例性抗体包括含有序列选自 SEQ ID NO:64-72 的可变重链和序列选自 SEQ ID NO:73-84 的可变轻链 (VL) 的抗体。特别地, 示例性抗体包括表 3 所提供的抗体。

表 3 各编号抗 OX40 抗体的序列表

编号	名称	重链可变区	轻链可变区
1	抗体-F10	<p>QVQLQESGGGLEKPGRSLRLSCAASGFTF  <u>SSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN</u>  <u>KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</u>  RAEDTAVYYCARELGVYSGYDTPFDYWG  QGTLTVSS  (SEQ ID NO:64)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRDIR  <u>DDLAWYQQKPGGAPKLLIYAAS TLQSG</u>  VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY  <u>CLQSDYPLTFGGG</u>TKLEIK  (SEQ ID NO:73)</p>
2	抗体-X35-6L	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTF  <u>DDYAMHWVRQAPGRGLEWVSGIGGGGG</u>  <u>STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNG</u>  LGAEDTAVYYCAKDRGYGDYYWYFDLW  GRGTLTVSS  (SEQ ID NO:65)</p>	<p>SSELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG  <u>GYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRP</u>  SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA  DYYC<u>SSYTTSS TLV</u>FGGGTKVTVL  (SEQ ID NO:74)</p>
3	抗体-F15-1L	<p>QVQLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF  <u>SSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGN</u>  <u>TYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNSL</u>  RAEDTAVYYCAK<u>DPLGSSWFEYFQHWGQ</u>  GTLTVSS  (SEQ ID NO:66)</p>	<p>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG  <u>GYNYVSWYQKHPGKAPKLM IYEVSNRP</u>  SGVSNRFSGSKSANTASLTISGLQAEDEA  DYFC<u>SSYSSS TLV</u>VFGGGTKLTVL  (SEQ ID NO:75)</p>
4	抗体-F23-4k	<p>QVQLEESGGGVVQPGESLRLSCAASGFTF  <u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN</u>  <u>QYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</u>  RAEDTAVYYCAK<u>DNQDSSPDVGIDYWGQ</u>  GTLTVSS  (SEQ ID NO:67)</p>	<p>DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDI  <u>LGYVNWYQQKPGKAPILLIYATSG LQGG</u>  VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY  CQQYNSYPLTFGGGTKVDIK  (SEQ ID NO:76)</p>
5	抗体-F23-7k	<p>QVQLEESGGGVVQPGESLRLSCAASGFTF  <u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN</u>  <u>QYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</u>  RAEDTAVYYCAK<u>DNQDSSPDVGIDYWGQ</u>  GTLTVSS  (SEQ ID NO:67)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQIS  <u>SYLNWYQQKPGKAPKLLMYAASSLQSG</u>  VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY  <u>CLQIDSYPLTFGGG</u>TKVEIK  (SEQ ID NO:77)</p>
6	抗体-F23-32k	<p>QVQLEESGGGVVQPGESLRLSCAASGFTF  <u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN</u>  <u>QYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</u>  RAEDTAVYYCAK<u>DNQDSSPDVGIDYWGQ</u>  GTLTVSS  (SEQ ID NO:67)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDVTITCRASQNI  <u>SPFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG</u>  VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY  CQQYNSYPLTFGGGTKVEIK  (SEQ ID NO:78)</p>

7	抗体 -A6-1 k	<u>QVQLQRSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF</u> <u>SSYGMTWVRQAPGKGLEWVSAISNSGGS</u> <u>TYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKDGPFYFDYWGQGLTVT</u> <u>SS</u> (SEQ ID NO:68)	<u>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRVSOGI</u> <u>GDDLGWYQQKPGKAPKLLIYKASNLES</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATY</u> <u>FCQQAHSPPTFGGGTKLEIK</u> (SEQ ID NO:79)
8	抗体 -M5-5 k	<u>QVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCTASGFTFS</u> <u>TYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGTGDW</u> <u>ASYADSVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN</u> <u>LRDEDTAIYYCAKSSSTVATDFDYGMDV</u> <u>WGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:69)	<u>ETTLTQSPSTLSASVGDRTITCRASEEIG</u> <u>SWLAWYQQTPGKAPKRLIYEASSLQSGV</u> <u>PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC</u> <u>QQYGSYPPTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:80)
9	抗体 -M5-7 k	<u>QVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCTASGFTFS</u> <u>TYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGTGDW</u> <u>ASYADSVKGRFTISRDN SRNTLYLQMN</u> <u>LRDEDTAIYYCAKSSSTVATDFDYGMDV</u> <u>WGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:69)	<u>DIVMTQSPSTLSASVGDRTVTTCRASEDI</u> <u>GRWLAWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY</u> <u>YCQQYYNPPTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:81)
10	抗体 -FE-1 6H	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF</u> <u>SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS</u> <u>TYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARGDSSWFIFQDWGQGT</u> <u>LTVTVSS</u> (SEQ ID NO:70)	<u>QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNM</u> <u>GSNPNVNWYQQLPGEAPQLLMYNNNQR</u> <u>PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA</u> <u>EYYCAAWDDGLNGWVFGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO:82)
11	抗体 -A2	<u>QVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTV</u> <u>SSNYMSWVRQAPGEGLEWIATIIYGGST</u> <u>YYNPSLKSRTVISADMSKNQFSLKLSMT</u> <u>AADTAVYYCARVVVPGYFDLWGRGTLTV</u> <u>VSS</u> (SEQ ID NO:71)	<u>SSELTQDPAVSVALGQTVSITCQGDSLRS</u> <u>YYASWYQQKPGQAPVPVIYGKNNRPSGI</u> <u>PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY</u> <u>CHSRDSSGKYVFGVGTCLTVL</u> (SEQ ID NO:83)
12	抗体 M	<u>QVQLVESGGGVVQPGESLRLSCAASGFTF</u> <u>SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWEDGS</u> <u>NQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKDNQDTPDVGIDYWG</u> <u>QGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:72)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQNI</u> <u>SPFLNHWYQQKPGKAPKLLIYA AVGLQSG</u> <u>VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY</u> <u>CQQYTDYPLTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:84)

本发明还包括与本文所述抗 OX40 抗体结合同一表位的抗体。例如，本发明的抗体特异性结合包括人 OX40 上一个或多个氨基酸残基的表位(参见例如 Uniprot 上的 P434489)。

本领域技术人员将认识到，只需要通过查明待测抗体是否阻止已知抗体与 OX40 结合，而无需进行过多实验就可以确定抗体是否与本文所述抗体(例如表 3 所列抗体，或者具有选自 SEQ ID NO:64-72 的可变重链和序列选自 SEQ ID NO:73-84 的可变轻链中的一种)结合同一表位。如由本文所述抗体的结合减少所示出的那样，如果受试抗体与本公开抗体竞争，则两种抗体可能结合至相同或相近的表位。

一种用于确定抗体是否具有本文所述抗体的特异性的替代方法是将本文所述抗体与通常该抗体对其有反应的可溶 OX40 蛋白质一起预温育，然后加入测试的抗体以确定测试的

抗体与 OX40 结合的能力是否受到抑制。如果测试的抗体受到抑制，则其具有与本公开的抗体相同、或功能相同的表位特异性。

在一些实施方案中，本发明的抗体，可以使用例如下文所提供实施例中描述的方法制备。在一些实施方案中，还可通过使用 Trioma 技术，人 B 细胞杂交瘤技术(参见 Kozbor 等人, 1983, *Immunol Today* 4:72)，以及 EBV 杂交瘤技术(参见 Cole 等人, 1985, In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页)等来制备产生。

抗体可以通过公知的技术纯化，例如利用蛋白 A 或蛋白 G 进行亲和层析，免疫亲和色谱等。例如 D. Wilkinson (*The Scientist*, 由 The Scientist, Inc., Philadelphia Pa. 出版, 第 14 卷, 第 8 期(2000), 第 25-28 页)讨论了免疫球蛋白的纯化。

本发明的单克隆抗 OX40 抗体具有调节、促进、激活、启动和或以其它方式使得 OX40 胞内信号被激活的能力。在一些实施方案中，抗 OX40 抗体可以通过例如酵母表面展示方法来产生抗 OX40 抗体（如全人源抗体或人源化抗体），参考 WO2009036379 和 WO2010105256 专利。在该方法中，使用天然或重组 OX40 来源或其片段来筛选携带有随机的轻链和重链对的酵母组合库。

### Fc 修饰

本文所述抗体的有关效应子功能可以通过修饰，以提高例如抗体在治疗与 OX40 信号传导相关的疾病和障碍中的有效性。例如，因为在肿瘤浸润的调节性 T 细胞 (Treg) 是遍在表达的，所以可将一个或多个突变引入到抗体的 Fc 区中，从而提高 ADCC 的功能，由此更有效杀死 Treg。也例如，OX40 的胞内信号的充分激活，需要多个 OX40 受体的聚集，甚至需要其发生寡聚化，所以可将一个或多个突变引入到抗体的 Fc 区中，从而提高抗体本身的聚集能力或提高和 Fc 受体的结合能力来促进抗体的聚集，从而更充分激活 OX40 的胞内信号。

在一些实施方案中，本文所述的抗体是 IgG 同种型。在一些实施方案中，抗体的恒定区为人 IgG1 同种型，具有 SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列。在一些实施方案中，对人 IgG1 恒定区上的特定氨基酸进行修饰以修改抗体的糖基化，例如 N297 的去岩藻糖。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段含有少量的岩藻糖修饰，或几乎不含岩藻糖修饰，或不含岩藻糖修饰，ADCC 效果明显提高。在一些实施例中，所述抗体或其片段最多有一个（或者最多两个，或三个）氨基酸残基有岩藻糖修饰。在一些实施例中，包含所述抗体或其片段最多有不到 0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、或 5% 的蛋白分子被岩藻糖修饰。在一些实施方案中，减低或者去除岩藻糖修饰的抗体有更强的 ADCC，适合于某些治疗用途。在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段用经过改造的 CHO 细胞表达。在一些实施方案中，经过改造的 CHO 细胞为 Slc35c1 基因、fut8 基因、GDP-甘露糖 4,6-脱水酶 (GMD) 基因、GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-表异构酶-4-还原酶 (GMER) 基因、GDP-岩藻糖转运子 (GFT) 基因中的一个或多个被减少或敲除的 CHO 细胞。在一些实施方案中，经过改造的 CHO 细胞为 fut8 基因被敲除的 CHO 细胞。

在一些实施方案中，对抗体恒定区上的特定氨基酸进行修饰以改变 Fc 受体相互作用，例如 S267E/L328F 的突变。

在一些实施方案中，抗体的恒定区为人 IgG2 同种型，具有 SEQ ID NO: 92 和 93 的氨基酸序列。其中 SEQ ID NO: 92 的氨基酸序列为：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQ  
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKSNTKVDKTKVERKCCVECPPEPCAPPVAGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TFRVVSVELTVVHVDLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK；

其中 SEQ ID NO: 93 的氨基酸序列为：

RTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

在一些实施方案中，抗体的恒定区为人 IgG4 同种型，具有 SEQ ID NO: 94 和 95 的氨基酸序列。其中 SEQ ID NO: 94 的氨基酸序列为：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQ  
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW  
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK；

其中 SEQ ID NO: 95 的氨基酸序列为：

RTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

在一些实施方案中，对人 IgG4 恒定区内的铰链区进行修饰以避免或减少链交换。在其他实施方式中，对人 IgG4 恒定区上的氨基酸 235 进行修饰以改变 Fc 受体相互作用。

### 针对抗 OX40 抗体或其抗原结合片段的使用

本文所述抗 OX40 抗体可以治疗的疾病或病症包括血液癌症和/或实体瘤。血液癌症包括例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施方案中，白血病包括急性淋巴细胞性白血病 (ALL)；急性骨髓性白血病 (AML)；慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)；慢性骨髓性白血病 (CML)；骨髓性增生疾病/肿瘤 (MPDS)。淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤、无瘤性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤 (小细胞和大细胞)。骨髓瘤包括多发性骨髓瘤 (MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤和轻链或本斯-琼斯骨髓瘤。实体瘤包括例如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。

本发明的抗体的治疗有效量涉及达到治疗目标所需的量。给药所需的量取决于抗体对其特异抗原的结合亲和力，疾病、紊乱或病症的严重程度、给药途径、在接受给药的对象中给予的抗体从自由体积耗尽的速率等。在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体片段的治疗有效剂量的范围为从约 0.01mg/kg 到约 100mg/kg。在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体片段的治疗有效剂量的范围为从约 0.1mg/kg 到约 30mg/kg。剂量频率范围可以是例如每两周一次或每三周一次。

在另一些实施方案中，针对 OX40 的抗体可用于本领域中已知的与 OX40 定位和/或定



量相关的方法(例如,用于测定适当生理样品中的 OX40 和/或 OX40 和 OX40L 两者的水平,用于诊断方法,用于蛋白成像等等)。

在一些实施方案中,将抗 OX40 抗体给予经诊断具有一种或多种前述疾病(包括但不限于癌症或其他肿瘤病症)相关临床症状的患者。诊断后,给予抗 OX40 抗体以减轻或反转一种或多种前述疾病相关临床症状的效果。

在某些肿瘤样品中观察到 OX40 的过表达,并且具有 OX40 过表达的细胞的患者可能对使用本发明的抗 OX40 抗体的治疗有响应。因此,本发明的抗体也可以用于诊断和预后。

在一些实施方案中,包含细胞的样品可以从患者体内获得,该患者可以是癌症患者或待诊断的患者。细胞是肿瘤组织或肿瘤块、血液样本、尿液样本或来自患者的任何样本的细胞。在选择性地对样品进行预处理之后,可以在允许抗体与可能存在于样品中的 OX40 蛋白相互作用的条件下,将样品与本发明的抗体一起孵育,利用抗 OX40 抗体来检测样品中 OX40 蛋白的存在。

本发明的抗体还用于检测患者样品中的 OX40,并因此可用于诊断。例如,本发明的抗 OX40 抗体用于体外试验(如 ELISA)以检测患者样品中的 OX40 水平。

在一个实施方式中,本发明的抗 OX40 抗体固定在固体支持物(如微量滴定板的孔)上。固定的抗体作为捕捉抗体,捕捉测试样品中可能存在的任何 OX40。在使固定的抗体接触患者样品前,清洗固相载体并使用封闭试剂(如牛奶蛋白或白蛋白)处理以避免分析物的非特异性吸附。随后使用可能含有抗原的测试样品或使用含有标准量抗原的溶液处理所述孔。这类样品是例如来自对象的血清样品,其可能具有被认为可诊断某一病变的循环抗原水平。洗去测试样品或标准品后,使用可检测标记的二抗处理固相支持物。标记的二抗用作检测抗体。测量可检测标记的水平,通过与标准样品所建立的标准曲线进行比较确定测试样品中 OX40 的浓度。

基于使用本发明的抗 OX40 抗体在体外诊断试验中获得的结果,可以基于 OX40 和/或 OX40L 的表达水平对对象的疾病进行分级(例如与缺血、自身免疫性或炎性疾病相关的临床症状)。对于特定的疾病,从被诊断处于疾病发展的多个阶段和/或处于疾病治疗的多个点上的对象中提取血液样品。使用对发展或疗法的各阶段提供统计显著性结果的样品群体,确定了被认为是各阶段特征的抗原浓度范围。

在一些实施方案中,使用本文所述的抗 OX40 抗体或其抗原结合片段时,抗体或其片段以药物组合物的形式存在。其中,药物组合物可以由抗 OX40 抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组成。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适载体描述于最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences 中。此类载体或稀释剂包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和/或 5% 的人血清白蛋白。

药物组合物的配制应与其预期的给药途径相容。给药途径的示例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部的)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:注射用无菌稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苜醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲

剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及调节渗透压的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH 可用酸或碱进行调节,例如盐酸或氢氧化钠。可将肠胃外制剂包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。

适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(在此是水溶性的)或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些实施方案中,组合物须是无菌的并且易于注射的。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质,及其适宜的混合物。在一些实施方案中,药学上可接受的载体可以包含抗菌剂和/或抗真菌剂,如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在一些实施方案中,药学上可接受的载体可以包含等渗剂,如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨醇)、氯化钠。

根据需要,可以通过将抗体以所需量掺入具有上文所列成分中的一种或多种组合(按需要)的合适溶剂中来制备无菌注射溶液,然后过滤消毒。也可以将前述的无菌溶液通过冷冻干燥获得粉末,用于在给药时制备无菌注射溶液。

在一些实施方案中,本发明的抗体可以激活免疫应答,从而用于治疗感染。

感染是由致病因子侵入生物体组织、它们的繁殖以及宿主组织对这些生物体及它们产生的毒素的反应。感染可能由传染原引起,例如病毒、类病毒、朊病毒、细菌、线虫如寄生性蛔虫和蛲虫、节肢动物如蝉、螨虫、跳蚤和虱子、真菌如癣以及其他大寄生物如绦虫和其他蠕虫。在某一方面,传染原是细菌,如革兰氏阴性细菌。在某一方面,传染原是病毒,例如 DNA 病毒、RNA 病毒和逆转录病毒。病毒的非限制性实例包括腺病毒、柯萨奇病毒、EB 病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、巨细胞病毒、人疱疹病毒 8 型、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒、水痘-带状疱疹病毒。

本发明的抗体还可以用于治疗由微生物引起的传染病,或者通过靶向结合微生物和免疫细胞杀灭微生物以实现消除微生物的目的。在某一方面,微生物是包括 RNA 和 DNA 病毒的病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、原生动植物或真菌。

## 实施例

### 实施例 1: OX40 抗原以及对照抗体的生产和纯化

#### 1.1 人源 OX40 抗原的制备:

从蛋白数据库 Uniprot 上,找到人 OX40 的氨基酸序列(P43489),其中人 OX40 的胞外区的氨基酸序列是 1 到 216 位残基。从蛋白数据库 Uniprot 上,找到人的 IgG1-Fc 的氨基酸序列(P01857)是 104 到 330 位残基。然后通过人工合成(通用公司),得到 OX40 和 Fc 对应的核苷酸序列,通过酶切连接,将其插入到 pCDNA3.0 载体(购自 Invitrogen 公司)。得到重组质粒:pCDNA-OX40-his 和 pCDNA-OX40-Fc。再把上述质粒通过 PEI 瞬转 HEK293,在培养 7 天后收集上清液,最后通过纯化得到 hOX40-FC 和 hOX40-his 蛋白样品,用于下

面各种实施例。

### 1.2 阳性对照抗体 11D4 和 OX40mAb24 的制备。

11D4 的重链和轻链的序列来自美国专利 US8236930。OX40mAb24 的重链和轻链的序列来自美国专利 US2016/0137740。通过人工合成得到上述对应的核苷酸序列，再通过酶切连接分别把重链的核苷酸和轻链的核苷酸连接到 pCHO1.0 质粒中（购自 Invitrogen），得到用于表达全抗的重组质粒。根据制造商的说明书使用 Freedom CHO-S 试剂盒（购自 Invitrogen），把上述重组质粒转入 CHO-S 细胞系，培养 11 天后，收集上清液，最后通过纯化得到 11D4 和 OX40mAb24 抗体蛋白样品，用于下面各种实施例。

### 实施例 2：抗 OX40 抗体的制备

按照如表 3 所示第 1-11 号的各抗体的可变区，如 SEQ ID NO: 90 所示重链恒定区，如 SEQ ID NO: 91 所示轻链恒定区，通过分子克隆技术，把其对应核酸序列插入到 pCHO1.0 质粒中（购自 Invitrogen），得到用于表达全抗的重组质粒。根据制造商的说明书使用 Freedom CHO-S 试剂盒（购自 Invitrogen），把上述重组质粒转入 CHO-S 细胞系，培养 11 天后，收集上清液，最后通过纯化得到十一株抗体的蛋白样品，测序证实序列，用于下面各种实施例。

其中，重链恒定区的序列 SEQ ID NO: 90 如下：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

轻链恒定区的序列 SEQ ID NO: 91 如下：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### 实施例 3：抗人 OX40 抗体的结合能力鉴定

#### 3.1 通过生物光干涉测量抗人 OX40 抗体的亲和力

ForteBio 亲和力测定按照现有的常规方法(Estep, P 等 MAbs, 2013, 5(2):270-8)。粗略过程如下，传感器在分析缓冲液，如 PBS，中线下平衡 20 分钟，然后上机检测 60 秒建立信号基线，上机加载如上所述获得的经纯化后的抗体至相应传感器(ForteBio)上，最后进行 ForteBio 亲和力测量。用 SA 传感器吸附生物素化的候选抗体，再检测 hOX40-FC 的结合与解离，各约 5min，结果如表 4；表 4 中，N.D 表示未检测出。最后都用 1:1 结合模型进行动力学的分析。结果表明，部分本发明的抗体的亲和力优于或接近和对照抗体的亲和力。

表 4：通过生物光干涉测量本发明候选抗体和 hOX40-FC 的亲和力 (K<sub>D</sub>)

候选抗体 测定方法	SA 吸附生物素化的抗体，检测 OX40-Fc (50nM，二价)
OX40mAb24	0.3nM
抗体-F10	N.D

抗体-X35-6L	<0.1nM
抗体-F15-1L	3nM
抗体-F23-4k	0.6nM
抗体-F23-7k	2nM
抗体-F23-32k	0.4nM
抗体-A6-1k	4nM
抗体-M5-5k	2nM
抗体-M5-7k	0.4nM
抗体-FE-16H	3nM
抗体-A2	9nM

### 3.2 抗人 OX40 抗体的细胞表面抗原的结合能力

通过转染带有的人 OX40 cDNA 的 pCMV 载体产生过表达人 OX40 的 Jurkat 细胞 (Jurkat-hOX40 细胞)。将 Jurkat-hOX40 细胞( $0.5 \times 10^6$  个细胞)与 100nM 的实验抗体在 PBS 含 0.1%BSA 中在冰上孵育 40 分钟。然后将细胞洗涤两次,并与二抗在 PBS 0.1%BSA 中在冰上孵育 25 分钟。将细胞洗涤两次,在 Accuri C6 系统(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析,结果见图 1。

抗体-F23-4k 和抗体-F23-32k,以及两个对照抗体 11D4 和 OX40mAb24,用不同浓度的抗体去孵育 Jurkat-hOX40 细胞。抗体浓度从 50nM 开始,按照 3 倍往下稀释,共九个浓度点,统计 MFI,并用 SoftMax Pro 处理数据,测得 EC50 值分别为 1.5nM、1.0nM、1.5nM 和 5nM。

用抗-CD3/CD28 磁珠(购自 Invitrogen)激活来自健康人的 PBMC 细胞(购自雷德生物)48 小时,并将  $0.5 \times 10^6$  个细胞与 50nM 的实验抗体,共孵育在 PBS 中,孵育 40 分钟。然后将细胞洗涤两次,并与 anti-FC-PE 二抗(购自 ebioscience)在 PBS 中在冰上孵育 30 分钟。将细胞洗涤两次并,通过流式细胞术进行分析,计算 MFI。结果如表 5 所示。

表 5: 实验抗体和被激活的 T 细胞 (人的 PBMC) 上 OX40 的结合

	结合百分比%	MFI (万)
IgG1	23	0.7
OX40mAb24	81	6.0
抗体-F23-32K	79	5.8

#### 实施例 4: 抗人 OX40 抗体的特异性

和 3.2 实例中的方法类似,把 100nM 实验抗体和过表达不同抗原的 Jurkat 细胞 (Jurkat-TIM3、Jurkat-CTLA4、Jurkat-TIGIT)、CHO 以及 raji 孵育,然后用流式检测,结果如图 2。结果表明,抗体-F23-32k 和这些抗原或细胞株均没有明显结合,表明其特异性好。

用 ELISA 的方法,先包被 10ng 的小鼠的 OX40-his (mOX40-his)、hCD27-FC 以及 hOX40-his,4°C 过夜,洗涤后,再孵育抗体-F23-32K 和对照抗体,最后通过 HRP 标记的二

抗进行标记显色。检测所得的 OD 值如表 6。和实例 3.2 的方法类似，按照 protein A 传感器---Antibody---OX40-his (100nM) 程序设置，用 Fortebio 检测抗体-F23-32K 和对照抗体与恒河猴 OX40 (Rh-OX40) 的亲合力，结果如表 6。以上结果表明，抗体-F23-32K 不结合 hCD27 (hOX40 的同家族蛋白)，也不结合小鼠的 OX40，但明显结合恒河猴的 OX40。

表 6 抗体-F23-32k 与 hCD27、小鼠 OX40、恒河猴 OX40 的结合情况

ELISA (OD 值)	抗体-F23-32k		OX40mAb24	
mOX40-his	0.17	0.20	0.17	0.19
hCD27-FC	0.15	0.13	0.20	0.20
hOX40-his	3.68	3.48	3.10	3.20
Fortibio (K <sub>D</sub> )	抗体-F23-32k		OX40mAb24	
Rh-OX40-his	9nM		3nM	

#### 实施例 5：抗 OX40 抗体的生物活性检测

##### 5.1 用 NFκB 报告基因系统检测候选抗体的体外激活活性。

在 3.2 实例中的 Jurkat-hOX40 的基础上，把 pGL6-NFκB-luciferas-reporter 质粒（购自碧云天）电转入细胞中，最后经过抗生素的加压筛选，得到稳定的单克隆株，命名为 Jurkat-hOX40-NFκB。复苏细胞，传代三次，然后按  $20 \times 10^4$  细胞/孔进行铺板，每孔 60μl 培养基，加入相应 1μg/ml 的实验抗体和 2.5μg/ml 的 anti-FC 抗体（羊抗人，购自 invitrogen），孵育 5 小时，然后每孔添加荧光反应物 50μl（ONE-Glo™ Luciferase Assay System，购自 promega 公司），结果如图 3。数据表明在 1μg/ml 浓度下实验抗体的激活信号都强于对照抗体。

按照之前描述的方法，重新构建一个窗口值更大的 Jurkat-hOX40-NFκB-2 细胞，用于抗体的激活活性的验证。有研究表明针对激活性靶点受体的抗体，若想有力发挥激活活性，是需要 Fc-R 的参与。和上述方法类似，复苏 Jurkat-hOX40-NFκB-2 细胞，传代三次，然后按  $4 \times 10^4$  细胞/孔进行铺板，每孔 60μl 培养基，加入相应的实验抗体和 4 万个 raji 细胞（其表面天然带有一定 Fc-受体（即 Fc-R））每孔，孵育 4.5 小时，然后每孔添加荧光反应物 50μl，结果如表 7。数据表明，在 raji 细胞存在时，其能明显提高候选抗体的激活活性。

表 7 用 NFκB 报告基因系统检测在 raji 细胞存在时候选抗体的体外激活活性

	抗体-F23-32k	+raji	抗体-F23-32K + raji	OX40L
荧光素酶 IFM	3700	$1.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$5.9 \times 10^4$

和上述方法类似，复苏 Jurkat-hOX40-NFκB-2 细胞，传代三次，然后按  $4 \times 10^4$  细胞/孔进行铺板，每孔 60μl 培养基。先把实验抗体和 protein A/G 按 1: 1 孵育 2min，起始浓度为 1.5μg/ml，然后按梯度稀释，结果如图 4。抗体-F23-32k 和 11D4 的 EC50 分别为 0.1405μg/ml 和 0.2261μg/ml。

5.2 检测抗体对被激活的 PBMC 的 IL-2 的分泌的影响

通过测量 T 细胞活化后由 T 细胞释放的炎性细胞因子评估本发明的抗 OX40 抗体的激动剂活性。取得 PBMC 后，按 20 万个/孔铺板，200μl 培养基，铺到 96 孔板，并加入 80μg/ml 的 SEB 活化 PBMC，2 天后，收集 PBMC。洗涤后，按 20 万个/孔铺板，200μl 培养基，再加入 1μg/ml 的候选抗体或对照抗体和 2μg/ml 的 anti-FC 抗体（羊抗人，购自 invitrogen）。3 天后，通过 ELISA 试剂盒检测培养基中 IL-2 分泌水平，结果如图 5 所示。和上述操作类似，先把 1μg/ml 的候选抗体或对照抗体 4 摄氏度过夜包板，洗板三次后，把激活的 PBMC 进行铺板，按 20 万个/孔铺板，200μl 培养基。3 天后，通过 ELISA 试剂盒检测培养基中 IL-2 分泌水平，结果如图 5 所示。数据表明本发明的抗体-F23-32k 与阳性对照相当。

实施例 6: Fc 突变对抗 OX40 抗体生物活性的增强

通过人工合成得到两个 IgG1-Fc 突变序列，分别是 RY(E345R 和 S440Y)和 R(E345R)，各命名为 IgG1-FC-RY (SEQ IN NO:88) 和 IgG1-FC-R (SEQ IN NO:89)，序列如表 8 所示(下划线表示突变位置)。对抗体-F23-32k 进行 RY 或 R 突变，所得抗体分别命名为 32k-RY 和 32k-R。而且，经过 HPLC 验证，在游离状态，主要以单体的形式存在。复苏 Jurkat-hOX40-NFκB-2 和 Jurkat-hOX40-NFκB 细胞，分别用于以下实验。和 5.1 实例的操作类似，细胞传代三次，然后按 4x10<sup>4</sup> 或 20 万细胞/孔进行铺板，加入相应的抗体 (1μg/ml)、抗体突变体 (1μg/ml)、raji 细胞 (1 万个细胞每孔) 或 protein A (1μg/ml，购自生物工程有限公司)。添加到 96 孔的样品方案和组合，具体见图 6，结果也如图 6 所示。含 RY 或 R 突变的抗体，在 protein A 不存在是也能明显激活 OX40 的信号，而且比野生型的抗体强十倍左右。

表 8 两个 IgG1-Fc 突变序列

SEQ ID NO	序列
88	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQK <u>Y</u> LSLSPGK
89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQK <u>S</u> LSLSPGK

实施例 7: 通过人源化小鼠接种 MC38 肿瘤模型验证 anti-抗 OX40 抗体对肿瘤抑制的能力  
在 OX40 人源化小鼠模型(购自百奥赛图)中研究本发明的抗 OX40 抗体的抗肿瘤功效。

将 MC38 肿瘤细胞以  $5 \times 10^5$  个/0.1 mL 浓度接种于 B-hOX40 人源化雌性小鼠的右侧皮下，待肿瘤生长到 119 mm<sup>3</sup> 时按肿瘤体积随机分组，每组 6 只。抗体腹腔给药，按 Q3D（每 3 日 1 次）的频率给药，3mg/kg，共给药 6 次，PBS 作为阴性对照。

在整个研究期间每周测量两次肿瘤和体重，当肿瘤达到端点时或当小鼠具有 20% 体重减轻时使小鼠安乐死。每组用数字卡尺估计平均肿瘤体积，并且通过下式计算肿瘤体积 (mm<sup>3</sup>)：每组的(宽度)<sup>2</sup>×长度/2 约为 50mm<sup>3</sup>。结果如图 7。图 7 中，TGI%为相对肿瘤体积的抑制率，其计算公式为： $TGI\% = (1 - (\text{mean RTV 给药组}) / (\text{mean RTV 对照组})) \times 100\%$ ；mean RTV 给药组：给药组 RTV 平均值，mean RTV 对照组：对照组 RTV 平均值； $RTV_n = V_{nt} / V_{n0}$ ； $V_{nt}$ ：编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤体积， $V_{n0}$ ：编号为 n 的小鼠在第 0 天的肿瘤体积， $RTV_n$ ：编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤相对体积；抗体 4K-RY 的重链由抗体-F23-4k 的 FC 突变所得（E345R 和 S440Y）。

为了进步了解实验抗体给药后，对肿瘤浸润的 T 细胞（TIL）的影响。在上述实验，结束后，选择合适的小鼠，每组个 4 只。通过常规的解剖手段，获取肿瘤浸润的淋巴 T 细胞，以及血液中的淋巴 T 细胞。进步用不同标记物对细胞进行荧光标记，最后用流式分选仪，进行荧光检测。结果表明本发明的实验抗体能增加肿瘤内部 CD4+和 CD8+T 细胞比例。而对血液中的 CD4+和 CD8+T 细胞比例，没有影响。

实施例 8：

1) 候选抗体的亲和力成熟以及亲和力测定

表 9 显示抗体-F23-32K 的 CDR 的某些突变，其中，下划线的氨基酸为突变位点。表 10 例举含有这些氨基酸突变的 8 个全抗体的 CDR，其余序列与抗体-F23-32K 同。用 BIACORE 测定它们的亲和力，具体流程为先用探针结合抗体，再检测 20nM 的 OX40-his 的结合和解离。结果如表 11 所示，其中抗体 M 的亲和力提高了约 70 倍，达到 0.16nM，比 OX40mAb24 的亲和力高约 21 倍，比 11D4 的抗体高约 9 倍。如同前面所述的方法，用不同浓度的 WEST+VGTD 和 ST+VGTD 抗体，孵育过表达 OX40 的 jurkat 细胞，得到 EC50 值分别为 1.2nM 和 1.3nM，结果如图 8 所示。抗 OX40 抗体（抗体 M）的序列如表 12 所示；其中，以上抗体（包括抗体 M）采用的表达细胞为 CHO-S 细胞，抗体 M-KF 的制备方法为：抗体 M-KF 与抗体 M 的氨基酸序列是相同的，采用 fut8 基因被敲除的 CHO 细胞株表达（抗体 M-KF 的岩藻糖的含量约为 0%）。

表 9 抗体-F23-32K 的突变位点示意图

	VH-CDR2	VH-CDR3	VL-CDR2	VL-CDR3
抗体-F23-32K	VIS <u>Y</u> DGSNQ YYADSVKG	DNQD <u>S</u> SPDVGID Y	AASS <u>L</u> QS	QQY <u>N</u> SYPL
划线部位的氨基酸突变	WED、SED、 AEV	T	VGL、VAL、 VGS	TD、ND、DD、 SD

表 10 8 个突变的抗 OX40 抗体的 CDR 序列

	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
抗体 M	SYGMH	VIWEDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AAVGL QS	QQYTDY PLT
T+VGL +TD	SYGMH	VISYDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AAVGL QS	QQYTDY PLT
WEST+ VL	SYGMH	VIWEDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AASSLQ S	QQYNSY PLT
VH+VG TD	SYGMH	VISYDGSNQ YYADSVKG	DNQDSSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AAVGL QS	QQYTDY PLT
WEST+ VG	SYGMH	VIWEDGSNQ	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AAVGL QS	QQYNSY PLT
WEST+ TD	SYGMH	VIWEDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AASSLQ S	QQYTDY PLT
T+VG	SYGMH	VISYDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AAVGL QS	QQYNSY PLT
T+TD	SYGMH	VISYDGSNQ YYADSVKG	DNQDTSP DVGIDY	RASQNIS PFLN	AASSLQ S	QQYTDY PLT

表 11 8 个突变的抗 OX40 抗体的亲和力

抗体	$K_D$ (M)	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)
11D4	$1.31 \times 10^{-09}$	353000	0.000461
OX40mAb24	$3.45 \times 10^{-09}$	408100	0.001410
抗体-F23-32K	$1.15 \times 10^{-08}$	841000	0.00965
抗体 M	$1.6 \times 10^{-10}$	610000	0.0000977
T+VGL+TD	$2.66 \times 10^{-10}$	448000	0.000119
WEST+VL	$1.93 \times 10^{-09}$	371000	0.000714
VH+VGTD	$5.65 \times 10^{-10}$	431000	0.000243
WEST+VG	$7.7 \times 10^{-10}$	452000	0.000348
WEST+TD	$6.53 \times 10^{-10}$	491000	0.000321
T+VG	$4.54 \times 10^{-09}$	292000	0.00133
T+TD	$5.01 \times 10^{-09}$	278000	0.00139



表 12 抗 OX40 抗体 (抗体 M) 的序列

SEQ ID NO	名称	序列
86	抗体 M 重链	QVQLVESGGGVVQPGESELRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWE DGSNQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNQDTPDV GIDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
87	抗体 M 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIPIFLNWFYQQKPGKAPKLLIYAAVGLQS GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYTDYPLTFGGGKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## 2) 抗体的抗原结合特异性检测

采用 ELISA 方法测定了抗体 M-KF 与人及食蟹猴的 OX40 的结合能力。试验方法为：先 4℃ 过夜包被人或食蟹猴的 OX40，其浓度为 2ug/ml，再孵育不同浓度的抗体 M-KF 进行检测。抗体 M-KF 的起始浓度为 1μg/ml 或 2μg/ml，并以 2 倍的梯度进行稀释。

结果表明，抗体 M-KF 与人及食蟹猴的 OX40 能够结合，结合的 EC50 值分别约为 0.0340ng/ml 和 0.0352ng/ml。

实施例 9：抗体的 ADCC 效应和体外激活活性。

抗体 M 的岩藻糖含量约为 96%。抗体 M-KF 的岩藻糖含量约为 0%。在 jurkat 细胞上转入 FC-RIIIA 和 NF-AT 报告基因，得到 Jurkat-ADCC 细胞。把 Jurkat-hOX40 细胞和 jurkat-ADCC 细胞按 1:1 混匀，再加入相应浓度梯度的抗体 M 和抗体 M-KF，结果如图 9 所示。如前面所述的方法（实施例 5），用 NFκB 报告基因系统检测候选抗体的体外激活活性。复苏 Jurkat-hOX40-NFκB-2 细胞，传代三次，然后按  $4 \times 10^4$  个细胞/孔进行铺板，每孔 60μl 培养基，加入相应的实验抗体和 4 万个 raji 细胞，结果如图 10 所示。抗体 M、抗体 M-KF 的 EC50 值稍好于 11D4，但前两者的激活峰值约是后者的 2.5 倍。

实施例 10：抗体的体外药效实验

如前面所述，在 OX40 人源化小鼠模型(购自百奥赛图)中研究本发明的抗 OX40 抗体的抗肿瘤功效。将 MC38 肿瘤细胞以  $5 \times 10^5$  个/0.1 mL 浓度接种于 B-hOX40 人源化雌性小鼠的右侧皮下，待肿瘤生长到 119 mm<sup>3</sup> 时按肿瘤体积随机分组，每组 6 只。通过表达纯化得到一批无内毒抗体，抗体 M 和抗体 M-KF，腹腔给药，按 Q3D 的频率，三个剂量组 1mg/kg、0.2mg/kg、0.04mg/kg，共给药 6 次。

在整个研究期间每周测量两次肿瘤和体重，当肿瘤达到端点时或当小鼠具有 20% 体重减轻时使小鼠安乐死。每组用数字卡尺估计平均肿瘤体积，并且通过下式计算肿瘤体积 (mm<sup>3</sup>)：每组的(宽度)<sup>2</sup>×长度/2 约为 50mm<sup>3</sup>，结果如图 11；其中，第 21 天的结果如图 12

所示。抗体 M 和抗体 M-KF 的高剂量组能明显抑制肿瘤的生长( $P<0.05$ ), 且效果明显好于 11D4 的高剂量组。抗体 M-KF 的中剂量组也能明显抑制肿瘤的生长( $P<0.05$ )。

#### 实施例 11: 抗体的 ADCC 效应 (PBMC 法)

以 Jurkat-hOX40 细胞为靶细胞, 以来源于健康人的 PBMC 为效应细胞。PBMC 和 Jurkat-OX40 细胞以 25:1 的数量比例混合, 并加入抗体 M-KF 或抗体 M(起始浓度为  $1\mu\text{g/ml}$ , 并以 4 倍的梯度进行稀释),  $37^\circ\text{C}$  下孵育 4h, 然后采用试剂盒 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) 测定相应的信号, 通过此系统检测抗体的 ADCC 介导的活细胞杀伤作用。

结果如图 13 所示, 抗体 M-KF 具有明显的 ADCC 作用,  $\text{EC}_{50}$  约为  $1.891\text{ng/ml}$ , 比抗体 M 强 2 倍多。

#### 实施例 12: 检测抗体对被激活的 PBMC 的 IL-2 的分泌的影响

采用 ELISA 的方法, 通过检测 IL-2 细胞因子的释放, 检测抗体 M-KF 对外源刺激下的人外周血单个核细胞 (PBMC) 的激活效应。先用 SEB (金黄色葡萄球菌肠溶素 B) 的刺激 PBMC 24h, 再添加不同浓度的抗体 M-KF 或参照抗体 11D4, 继续孵育 3 天, 最后采 Human IL-2 ELISA development kit (HRP) 试剂盒 (Mabtech, 货号为 3445-1H-20), 检测 PBMC 所分泌的 IL-2。

结果如图 14 所示, 抗体 M-KF 在  $0.32\mu\text{g/ml}$  或更高浓度下, 刺激 PBMC 分泌 IL-2 的量约是阴性对照 IgG1 的 4 倍。

#### 实施例 13: 检测抗体对非激活条件下 PBMC 细胞因子释放的影响

采用 ELISA 的方法, 通过检测 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  细胞因子的释放, 检测抗体 M-KF 对无外源刺激的人 PBMC 的激活效应, 以考察其安全性。抗体 M-KF 作用机理的最终目的是活化 T 细胞从而刺激免疫系统, 增强免疫功能。从安全性角度考虑, 这类型的抗体有可能会导导致机体免疫系统过度活跃, 从而引起细胞因子风暴。而 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  皆是细胞因子风暴发生时常见的大量产生的因子之一, 选择这几个因子进行检测。

把未经过激活处理的人 PBMC 和不同浓度的抗体 M-KF 或 CD28 抗体共同孵育, 抗体的起始浓度为  $200\mu\text{g/ml}$ , 并按 3 倍梯度进行稀释。最后用 Mabtech 公司相应的细胞因子检测试剂盒, 检测 PBMC 所分泌的 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 。

如图 15 所示, 于阳性对照 CD28 抗体相比, 抗体 M-KF 在  $200\mu\text{g/mL}$  及以下的浓度均不能使无外源刺激下的 PBMC 产生 IL-2、INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ , 预计抗体 M-KF 具有一定的安全性。

本文引用的所有出版物和专利文献都通过引用纳入本文, 就好像每个所述出版物或文献都特定和单独表示通过引用纳入本文。对上述出版物和专利文献的引用并不表示承认上述任何内容是相关的在先技术, 也并不表示承认其内容或日期。现在, 本发明已以书面说明书方式描述, 本领域技术人员应认识到可以多种实施方式实践本发明, 而上文的说明书和实施例旨在说明而非限制本发明的权利要求。

## 权利要求书

1. 一种抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其片段特异性结合 OX40，所述抗体或其片段包含 (a) - (f) 中一种或多种氨基酸序列：
  - (a) 如 SEQ ID NO: 1、4、10、16、104 或 22 所示的 VH CDR1；
  - (b) 如 SEQ ID NO: 2、5、7、8、11、13、14、17、20、23 或 26 所示的 VH CDR2；
  - (c) 如 SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24 或 27 所示的 VH CDR3；
  - (d) 如 SEQ ID NO: 28、31、37、40、43、46、49、52、55、58 或 61 所示的 VL CDR1；
  - (e) 如 SEQ ID NO: 19、25、29、32、35、38、44、47、50、56、59 或 62 所示的 VL CDR2；
  - (f) 如 SEQ ID NO: 30、33、34、36、39、41、42、45、48、51、53、54、57、60 或 63 所示的 VL CDR3。
2. 如权利要求 1 所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含：
  - 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；
  - 如 SEQ ID NO: 7、11、13 或 26 所示的 VH CDR2；
  - 如 SEQ ID NO: 12 或 27 所示的 VH CDR3；
  - 如 SEQ ID NO: 37、43 或 61 所示的 VL CDR1；
  - 如 SEQ ID NO: 19、25、38、44 或 62 所示的 VL CDR2；以及
  - 如 SEQ ID NO: 34、39、41、45、53 或 63 所示的 VL CDR3。
3. 如权利要求 1 所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1；如 SEQ ID NO: 26 所示的 VH CDR2；如 SEQ ID NO: 27 所示的 VH CDR3；如 SEQ ID NO: 61 所示的 VL CDR1；如 SEQ ID NO: 25 所示的 VL CDR2；以及如 SEQ ID NO: 34 所示的 VL CDR3。
4. 一种抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 64-72 所示的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 64-72 所示的任一氨基酸序列至少有 90% 序列同源性的肽；和/或所述抗体或其片段还包含轻链可变区，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 73-84 所示的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 73-84 所示的任一氨基酸序列至少有 90% 序列同源性的肽。
5. 一种抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含如 SEQ ID NO: 72 所示重链可变区，和如 SEQ ID NO: 84 所示轻链可变区。
6. 如权利要求 1-5 任一项所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段包含重链恒定区和/或轻链恒定区，所述重链恒定区为如 SEQ ID NO: 88、89 或 90 所示的重链恒定区，和/或所述轻链恒定区为如 SEQ ID NO: 91 所示的轻链恒定区。
7. 一种抗体，其特征在于，所述抗体包含如 SEQ ID NO: 86 所示的重链，以及如 SEQ ID NO: 87 所示的轻链。
8. 如权利要求 1-7 所述的抗体或其片段，其特征在于，所述抗体或其片段与 OX40 的亲和力数值  $K_D \leq 5nM$ 。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其片段, 其特征在于, 所述抗体的岩藻糖的含量不超过 10%。
10. 如权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其片段, 其特征在于, 所述抗体由 fut8 基因被敲除的 CHO 细胞表达。
11. 如权利要求 10 所述的抗体或其片段, 其特征在于, 所述抗体的岩藻糖的含量为 0%。
12. 一种多聚核苷酸, 其特征在于, 所述多聚核苷酸编码如权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其片段。
13. 一种细胞, 其特征在于, 所述细胞包含编码如权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其片段的一种或多种多聚核苷酸。
14. 一种组合物, 其特征在于, 所述组合物包含如权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其片段、如权利要求 12 所述的多聚核苷酸或如权利要求 13 所述的细胞, 以及药学上可接受的载体。
15. 一种在有需要的患者中治疗癌症或感染的方法, 其特征在于, 所述方法包括向所述患者施用有效剂量的如权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其片段。
16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述癌症选自非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤、前列腺癌、食道癌、肝癌和肾癌。
17. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括向所述患者施用第二种癌症治疗剂。

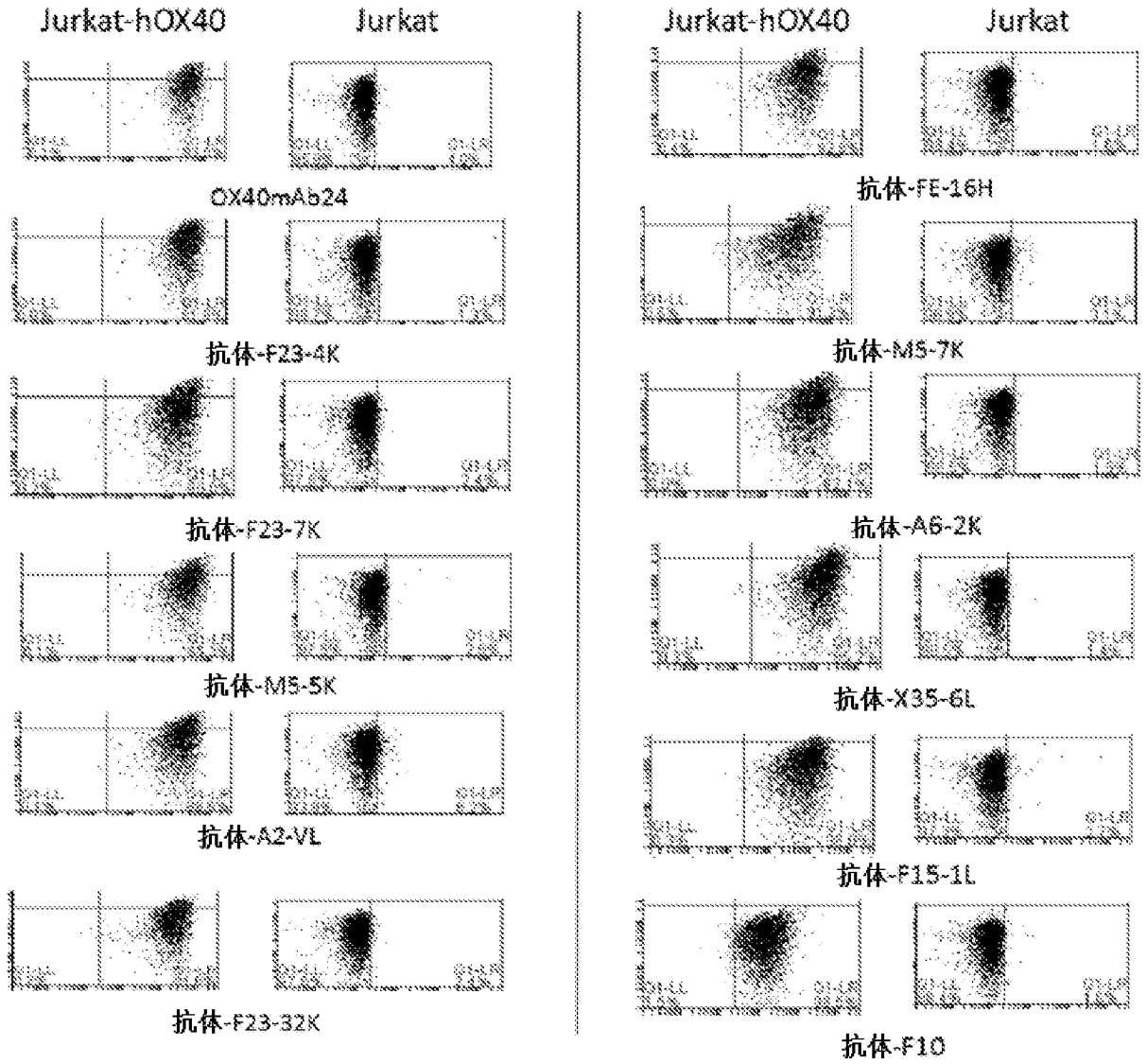


图 1

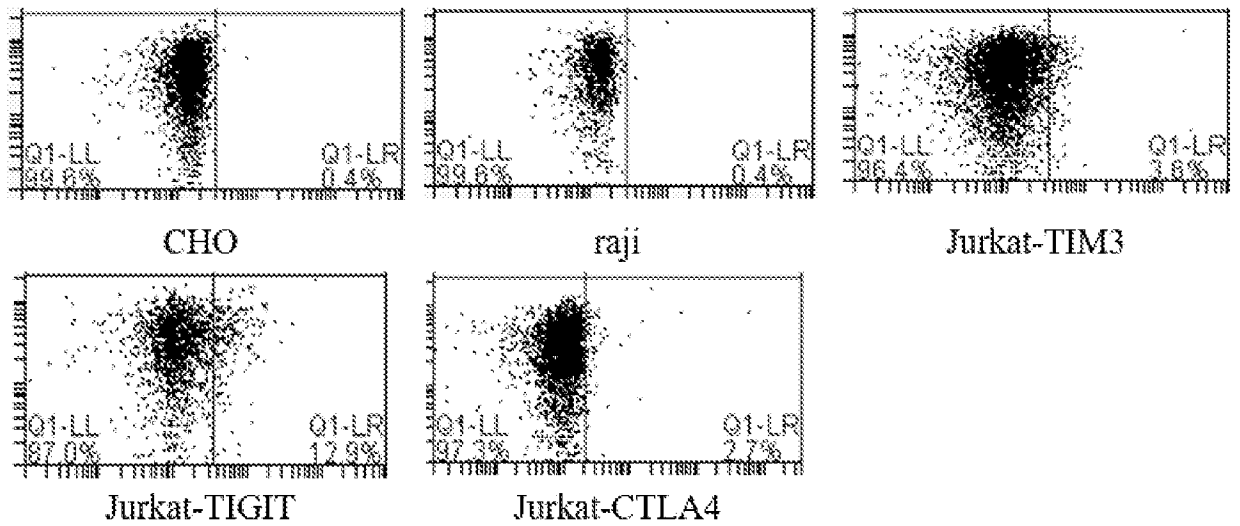


图 2

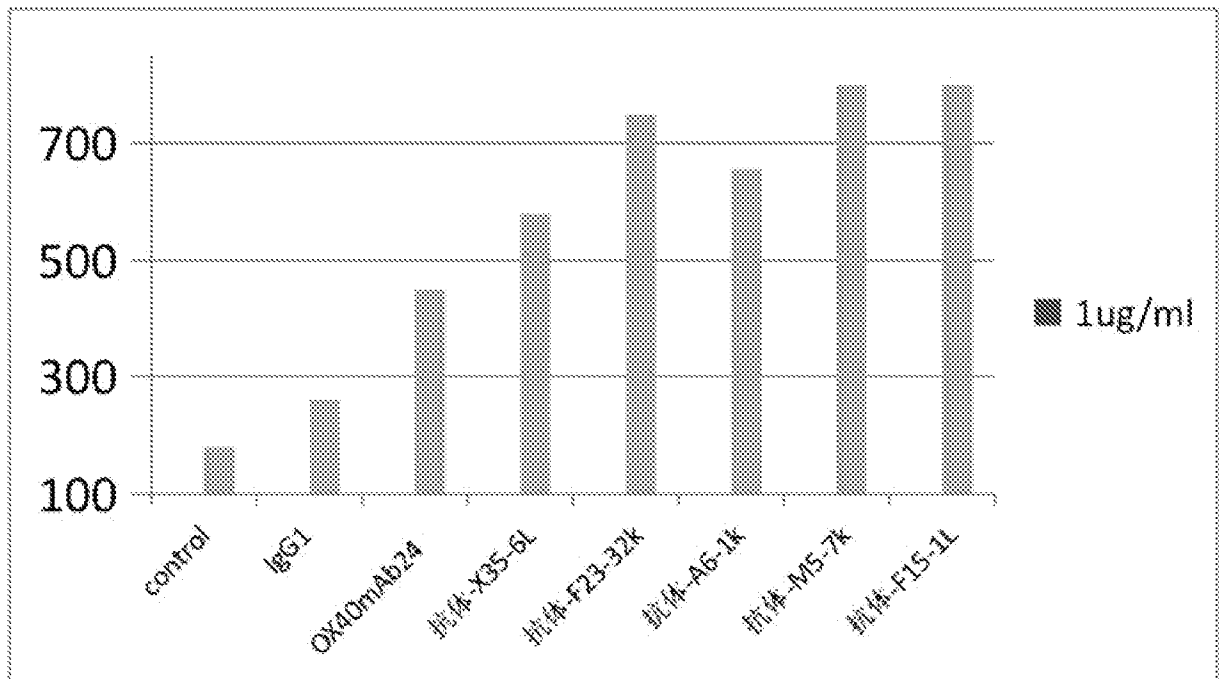
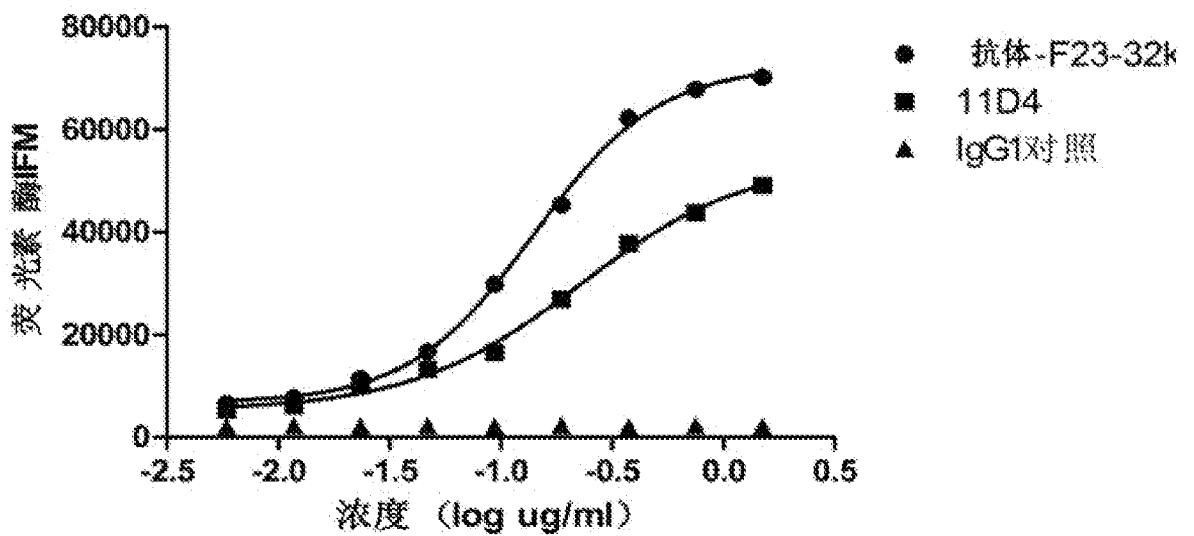


图 3



	抗体-F23-32k	11D4
EC50	0.1405	0.2261

图 4

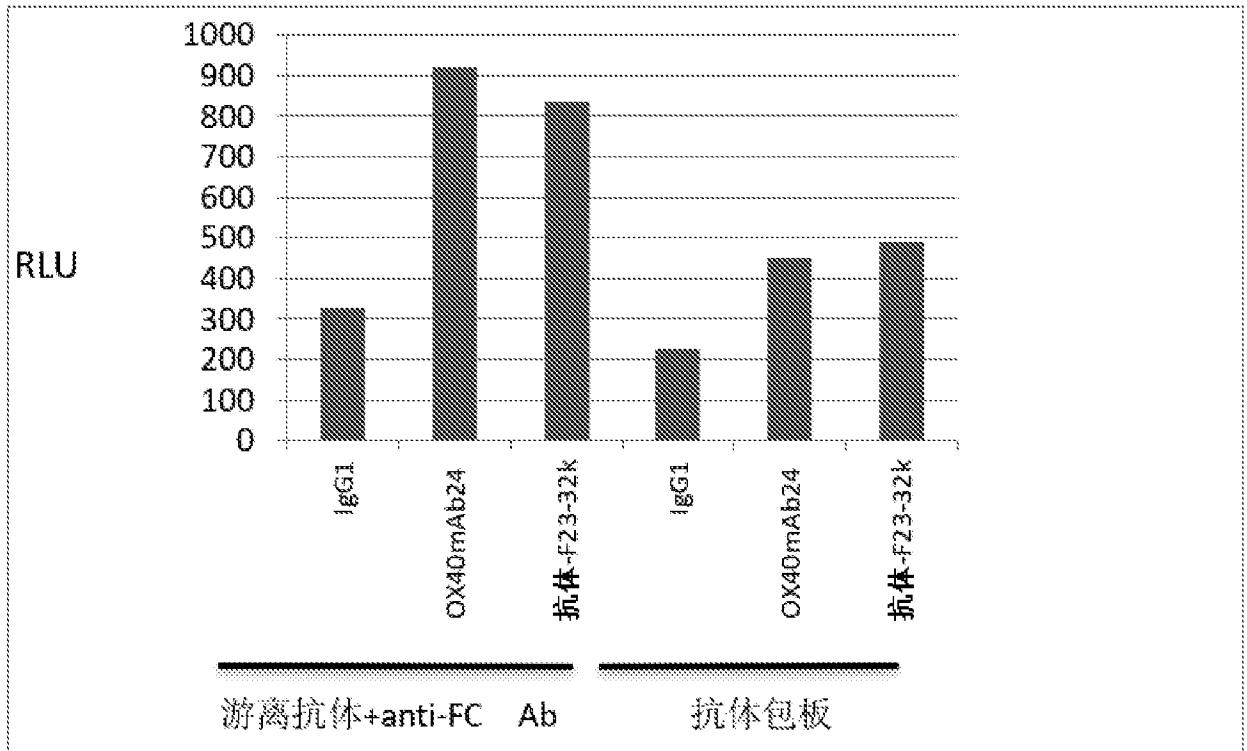


图 5

样品组	抗体-F23-32k	抗体-F23-32k + protein A	32k-RY	32k-R
Jurkat-hOX40-NFκB(RLU)	350	3700	2600	1523
Jurkat-hOX40-NFκB-2(RLU)	4300	$6.0 \times 10^4$	$5.2 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$

样品组	IgG + raji	抗体-F23-32k + raji	32k-RY + raji	32k-R + raji	OX40L
Jurkat-hOX40-NFκB(RLU)	900	N.D	6045	7800	N.D
Jurkat-hOX40-NFκB-2(RLU)	$1.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$5.9 \times 10^4$

图 6

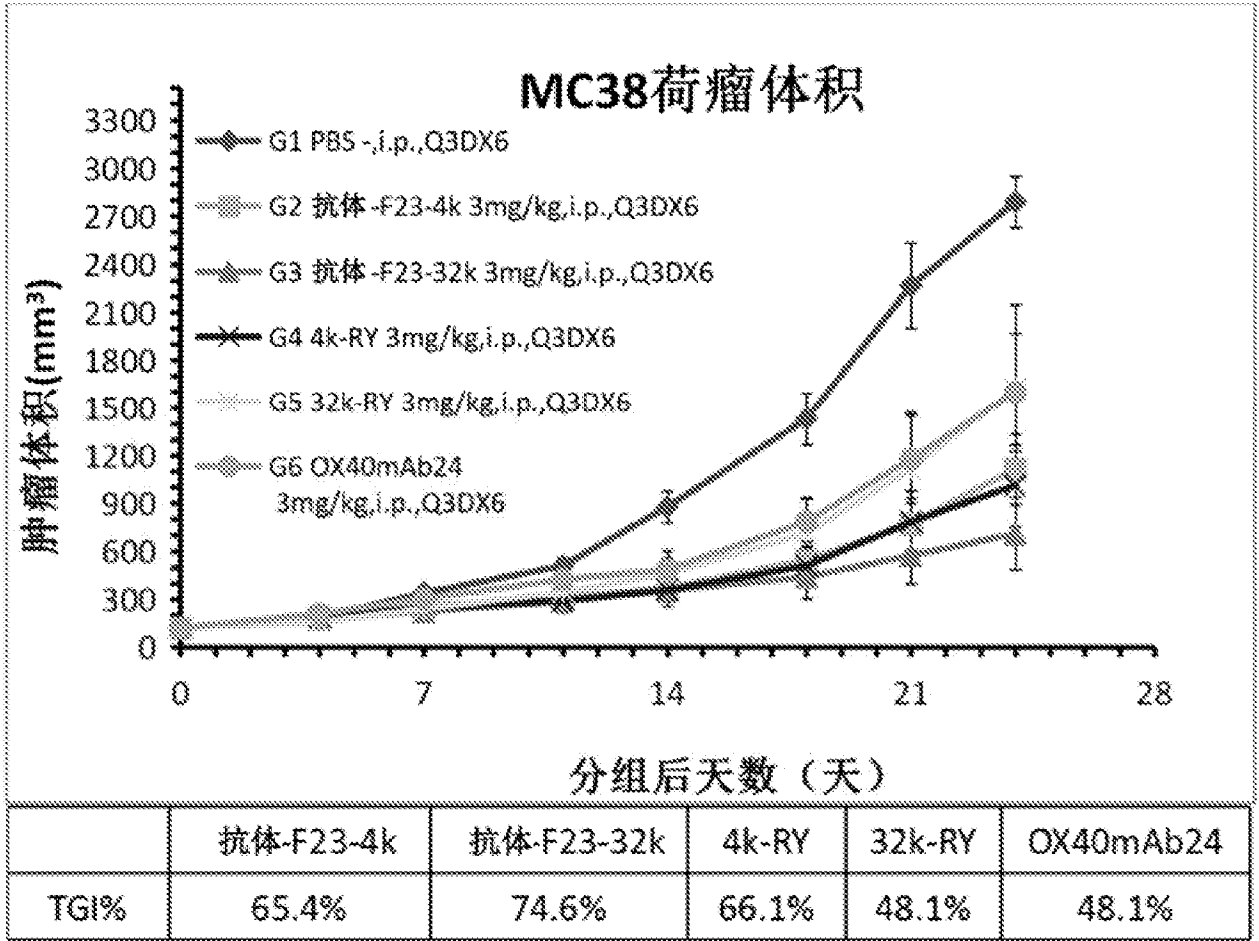


图 7

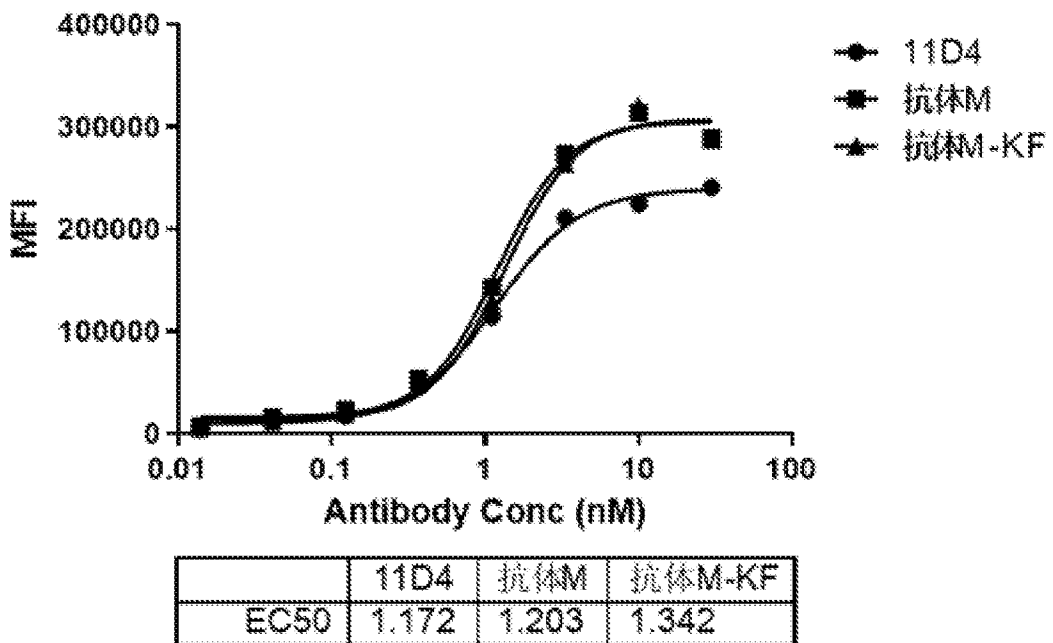


图 8



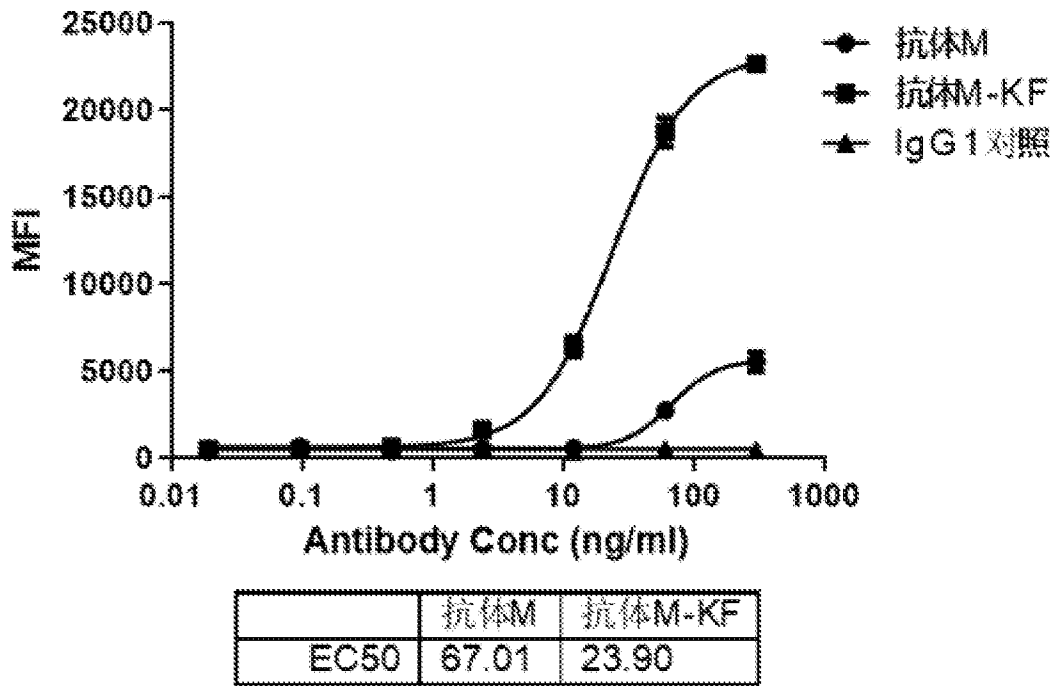


图 9

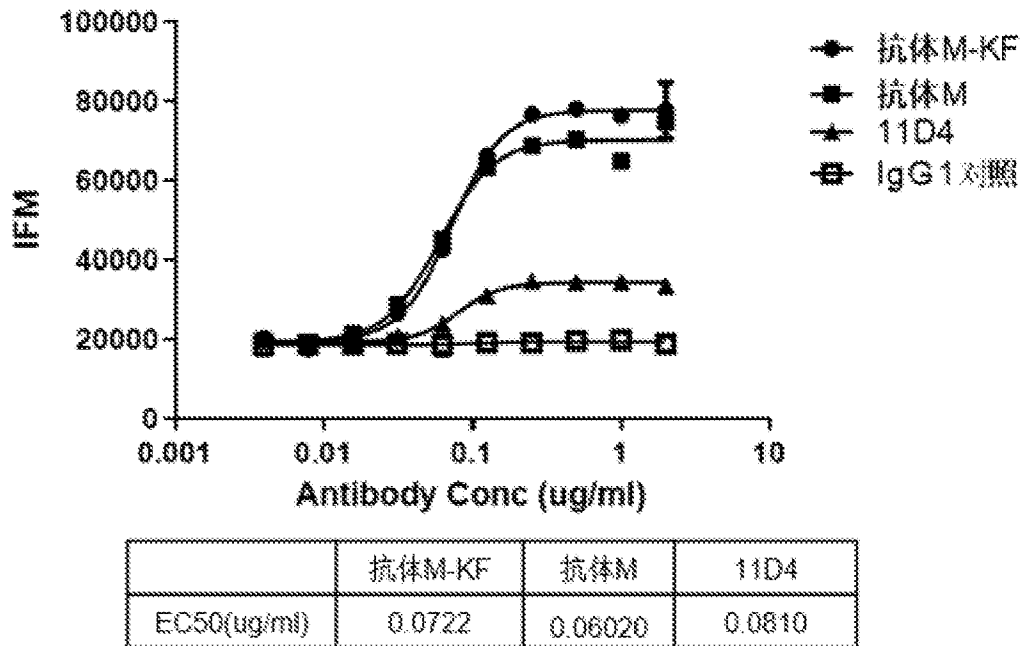


图 10

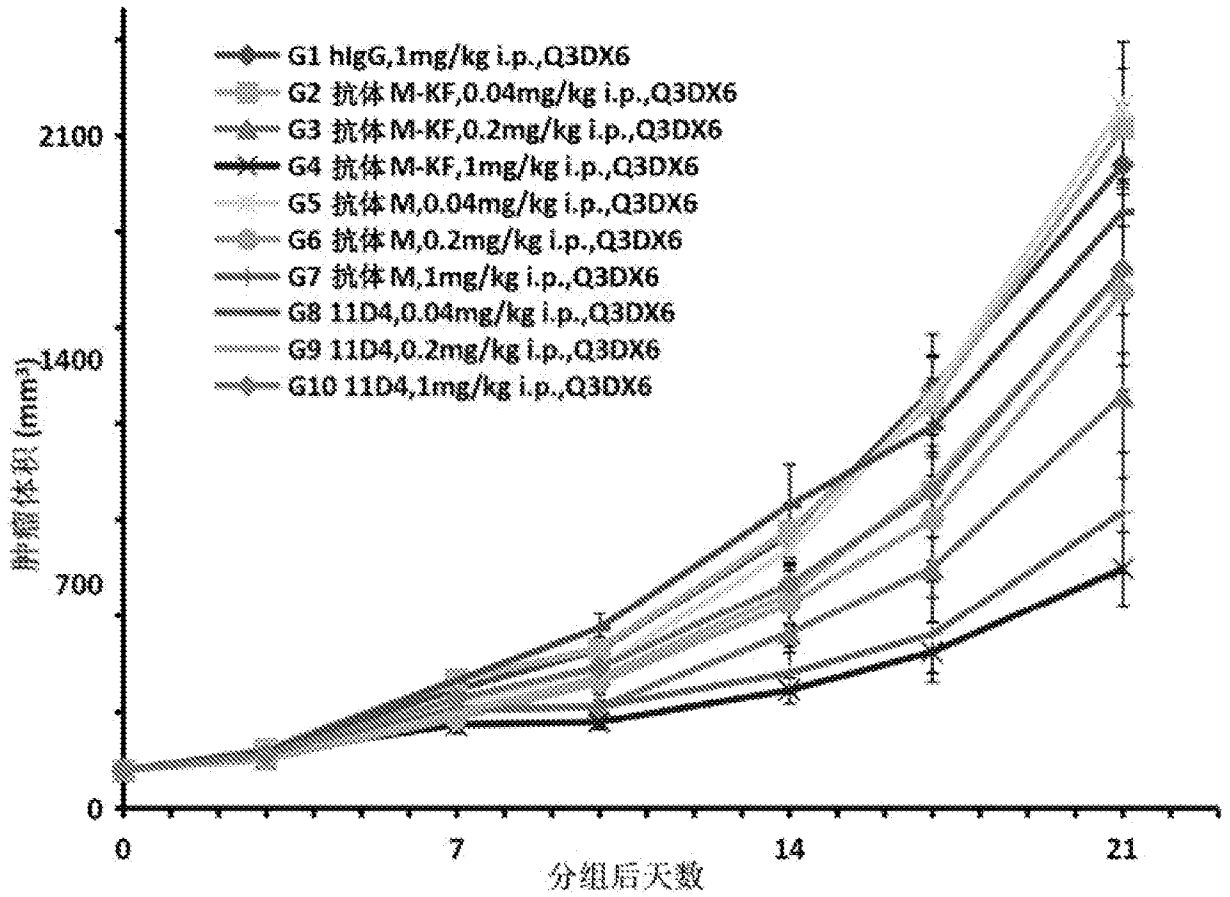


图 11

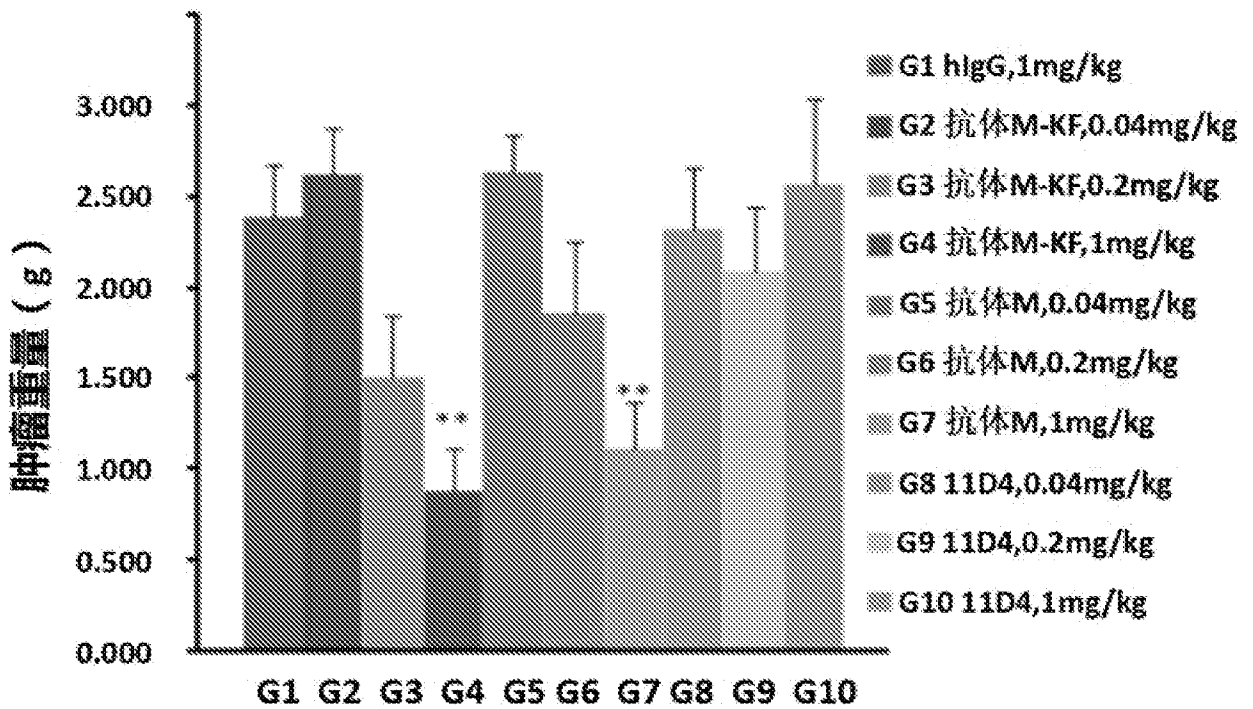


图 12

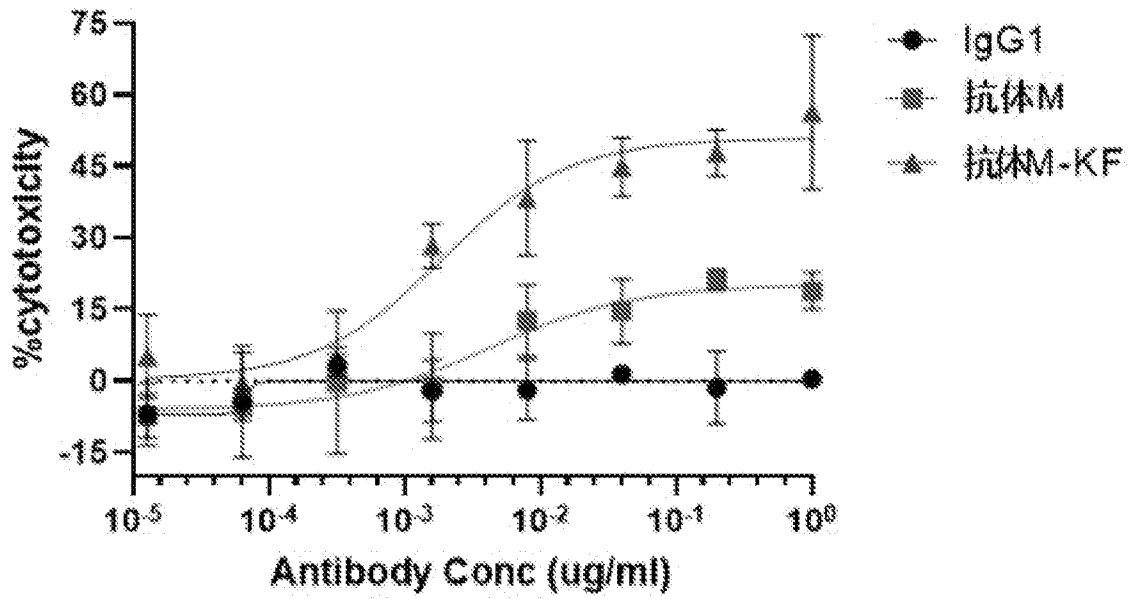


图 13

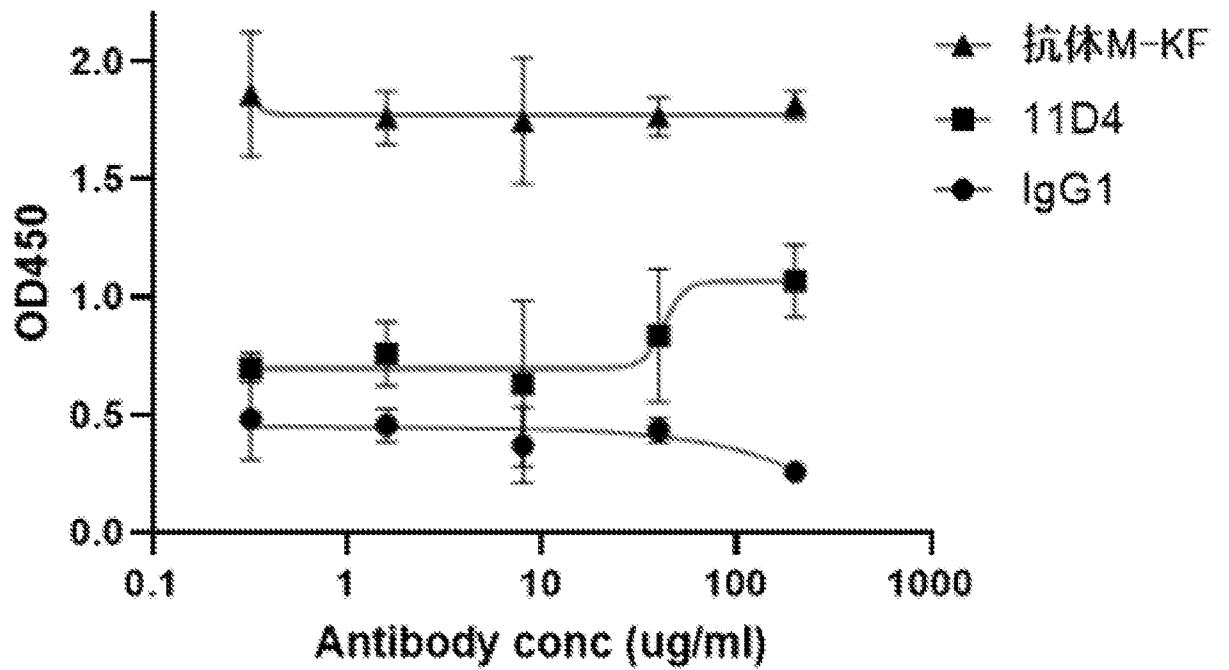


图 14

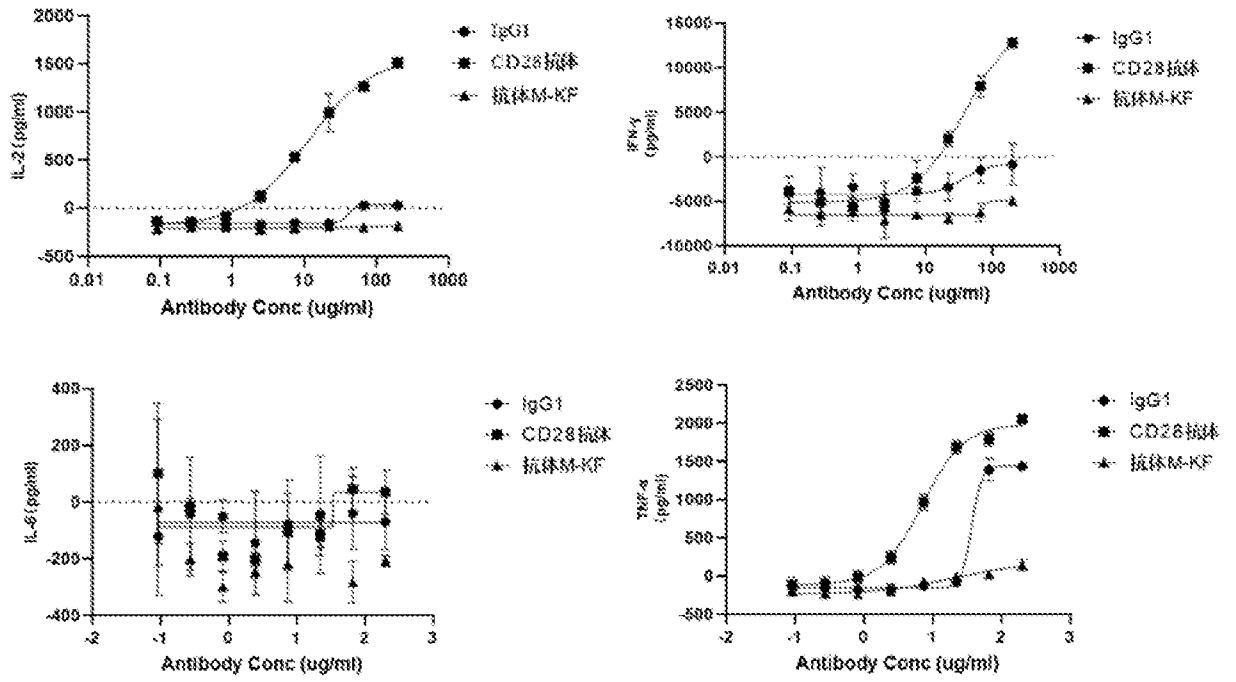


图 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/081993

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61P; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT, CNKI; WEB OF SCIENCE and Keywords: OX40, TNFRSF4, ACT35, CD134, OX40L, TNFSF4, TXGP1, gp34, CD252, 抗体, 肿瘤, 癌, antibody, tumour, cancer etc.; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank和检索的序列, Genbank and search sequence: SEQ ID NOs: 1-106.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110536903 A (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 03 December 2019 (2019-12-03) see entire document, especially claims 1-21	1-17
A	WO 2018112346 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.) 21 June 2018 (2018-06-21) see entire document, especially claims 1-33	1-17
A	CN 108137687 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 08 June 2018 (2018-06-08) see entire document, especially claims 1-20	1-17
A	CN 110467674 A (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 19 November 2019 (2019-11-19) see entire document	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>09 June 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>07 July 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **15-17**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] PCT Rule 39.1(iv) - methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy. The subject matter reasonably anticipated by the foregoing claims is the application of the antibody or fragment thereof of any one of claims 1-11 in the preparation of a drug for the treatment of cancer or infection.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/081993**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110536903	A	03 December 2019	JP	2020515247	A	28 May 2020
				CA	3056972	A1	04 October 2018
				WO	2018177220	A1	04 October 2018
				EP	3604338	A1	05 February 2020
				US	2020140562	A1	07 May 2020
				CN	108623686	A	09 October 2018
<hr/>							
WO	2018112346	A1	21 June 2018	US	2020181282	A1	11 June 2020
				HR	P20201259	T1	13 November 2020
				EC	SP19050049	A	31 July 2019
				TW	201825520	A	16 July 2018
				PL	3504242	T3	16 November 2020
				PE	20191403	A1	04 October 2019
				BR	112019012328	A2	19 November 2019
				US	10040864	B2	07 August 2018
				EP	3504242	A1	03 July 2019
				DO	P2019000165	A	15 July 2019
				CO	2019007288	A2	20 August 2019
				JP	2020504101	A	06 February 2020
				CL	2019001646	A1	23 August 2019
				US	2018171023	A1	21 June 2018
				KR	20190092552	A	07 August 2019
				EP	3725809	A1	21 October 2020
				SG	10201914126R	A	27 February 2020
				RU	2019121895	A	15 January 2021
				US	10604584	B2	31 March 2020
				RS	60664	B1	30 September 2020
				JP	2021019603	A	18 February 2021
				US	2020048363	A1	13 February 2020
				EP	3504242	B1	24 June 2020
				JP	6772385	B2	21 October 2020
				AR	110526	A1	10 April 2019
				CN	110573527	A	13 December 2019
				MX	2019007121	A	05 February 2020
				AU	2017377036	A1	11 July 2019
				CR	20190330	A	19 December 2019
				US	2021017289	A1	21 January 2021
				US	10556962	B2	11 February 2020
				US	2018194855	A1	12 July 2018
CA	3045940	A1	21 June 2018				
SI	3504242	T1	30 October 2020				
PT	3504242	T	26 August 2020				
PH	12019501357	A1	20 January 2020				
LT	3504242	T	10 September 2020				
DK	3504242	T3	17 August 2020				
US	2018346593	A1	06 December 2018				
UY	37523	A	31 July 2018				
IL	267070	D0	29 August 2019				
RU	2019121895	A3	15 February 2021				
ES	2813057	T3	22 March 2021				
<hr/>							
CN	108137687	A	08 June 2018	HK	1246308	A1	07 September 2018



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/081993**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		SG 10202008304T A	29 October 2020
		PE 9262018 A1	08 June 2018
		EP 3303396 A1	11 April 2018
		EA 035412 B1	10 June 2020
		BR 112017025191 A2	31 July 2018
		UY 36687 A	30 November 2016
		KR 20180010264 A	30 January 2018
		US 2016347849 A1	01 December 2016
		TW 201708255 A	01 March 2017
		TN 2019000101 A1	15 July 2020
		US 2017306035 A1	26 October 2017
		US 9644032 B2	09 May 2017
		AU 2016271111 A1	07 December 2017
		JP 6797137 B2	09 December 2020
		PE 20180926 A1	08 June 2018
		EA 201792572 A1	31 May 2018
		US 10683357 B2	16 June 2020
		MX 2017015041 A	26 February 2018
		PH 12017502129 A1	02 April 2018
		TN 2017000488 A1	12 April 2019
		CA 2987410 A1	08 December 2016
		US 2018237534 A1	23 August 2018
		US 2020399385 A1	24 December 2020
		IL 255949 D0	31 January 2018
		WO 2016196228 A1	08 December 2016
		JP 2018520657 A	02 August 2018
<hr/>			
CN	110467674 A	19 November 2019	WO 2019214624 A1
			14 November 2019
			SG 11202011201Q A
			30 December 2020
			EP 3790903 A1
			17 March 2021
			BR 112020023026 A2
			09 February 2021
			TW 202003575 A
			16 January 2020
			AU 2019264712 A1
			07 January 2021
			CA 3103040 A1
			14 November 2019
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/081993

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 5/07(2010.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61P; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE和关键词: 0X40, TNFRSF4, ACT35, CD134, 0X40L, TNFSF4, TXGP1, gp34, CD252, 抗体, 肿瘤, 癌, antibody, tumour, cancer等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank和检索的序列: SEQ ID NOs:1-106。</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 110536903 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 12月 3日 (2019 - 12 - 03) 参见全文, 尤其权利要求1-21</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018112346 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC) 2018年 6月 21日 (2018 - 06 - 21) 参见全文, 尤其权利要求1-33</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108137687 A (百时美施贵宝公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 参见全文, 尤其权利要求1-20</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110467674 A (上海药明生物技术有限公司) 2019年 11月 19日 (2019 - 11 - 19) 参见全文</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 110536903 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 12月 3日 (2019 - 12 - 03) 参见全文, 尤其权利要求1-21	1-17	A	WO 2018112346 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC) 2018年 6月 21日 (2018 - 06 - 21) 参见全文, 尤其权利要求1-33	1-17	A	CN 108137687 A (百时美施贵宝公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 参见全文, 尤其权利要求1-20	1-17	A	CN 110467674 A (上海药明生物技术有限公司) 2019年 11月 19日 (2019 - 11 - 19) 参见全文	1-17
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 110536903 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 12月 3日 (2019 - 12 - 03) 参见全文, 尤其权利要求1-21	1-17															
A	WO 2018112346 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC) 2018年 6月 21日 (2018 - 06 - 21) 参见全文, 尤其权利要求1-33	1-17															
A	CN 108137687 A (百时美施贵宝公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 参见全文, 尤其权利要求1-20	1-17															
A	CN 110467674 A (上海药明生物技术有限公司) 2019年 11月 19日 (2019 - 11 - 19) 参见全文	1-17															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 6月 9日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 7月 7日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>王颖</p> <p>电话号码 86-(10)-62412197</p>															

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 15-17  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科方法或治疗方法。上述权利要求合理预期的主题为：权利要求1-11任一项所述的抗体或其片段在制备治疗癌症或感染的药物中的应用。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/081993

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110536903	A	2019年 12月 3日	JP	2020515247	A	2020年 5月 28日
				CA	3056972	A1	2018年 10月 4日
				WO	2018177220	A1	2018年 10月 4日
				EP	3604338	A1	2020年 2月 5日
				US	2020140562	A1	2020年 5月 7日
				CN	108623686	A	2018年 10月 9日
WO	2018112346	A1	2018年 6月 21日	US	2020181282	A1	2020年 6月 11日
				HR	P20201259	T1	2020年 11月 13日
				EC	SP19050049	A	2019年 7月 31日
				TW	201825520	A	2018年 7月 16日
				PL	3504242	T3	2020年 11月 16日
				PE	20191403	A1	2019年 10月 4日
				BR	112019012328	A2	2019年 11月 19日
				US	10040864	B2	2018年 8月 7日
				EP	3504242	A1	2019年 7月 3日
				DO	P2019000165	A	2019年 7月 15日
				CO	2019007288	A2	2019年 8月 20日
				JP	2020504101	A	2020年 2月 6日
				CL	2019001646	A1	2019年 8月 23日
				US	2018171023	A1	2018年 6月 21日
				KR	20190092552	A	2019年 8月 7日
				EP	3725809	A1	2020年 10月 21日
				SG	10201914126R	A	2020年 2月 27日
				RU	2019121895	A	2021年 1月 15日
				US	10604584	B2	2020年 3月 31日
				RS	60664	B1	2020年 9月 30日
				JP	2021019603	A	2021年 2月 18日
				US	2020048363	A1	2020年 2月 13日
				EP	3504242	B1	2020年 6月 24日
				JP	6772385	B2	2020年 10月 21日
				AR	110526	A1	2019年 4月 10日
				CN	110573527	A	2019年 12月 13日
				MX	2019007121	A	2020年 2月 5日
				AU	2017377036	A1	2019年 7月 11日
				CR	20190330	A	2019年 12月 19日
				US	2021017289	A1	2021年 1月 21日
				US	10556962	B2	2020年 2月 11日
				US	2018194855	A1	2018年 7月 12日
				CA	3045940	A1	2018年 6月 21日
				SI	3504242	T1	2020年 10月 30日
				PT	3504242	T	2020年 8月 26日
				PH	12019501357	A1	2020年 1月 20日
				LT	3504242	T	2020年 9月 10日
				DK	3504242	T3	2020年 8月 17日
				US	2018346593	A1	2018年 12月 6日
				UY	37523	A	2018年 7月 31日
				IL	267070	D0	2019年 8月 29日
				RU	2019121895	A3	2021年 2月 15日
				ES	2813057	T3	2021年 3月 22日
CN	108137687	A	2018年 6月 8日	HK	1246308	A1	2018年 9月 7日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/081993

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		SG 10202008304T A	2020年 10月 29日
		PE 9262018 A1	2018年 6月 8日
		EP 3303396 A1	2018年 4月 11日
		EA 035412 B1	2020年 6月 10日
		BR 112017025191 A2	2018年 7月 31日
		UY 36687 A	2016年 11月 30日
		KR 20180010264 A	2018年 1月 30日
		US 2016347849 A1	2016年 12月 1日
		TW 201708255 A	2017年 3月 1日
		TN 2019000101 A1	2020年 7月 15日
		US 2017306035 A1	2017年 10月 26日
		US 9644032 B2	2017年 5月 9日
		AU 2016271111 A1	2017年 12月 7日
		JP 6797137 B2	2020年 12月 9日
		PE 20180926 A1	2018年 6月 8日
		EA 201792572 A1	2018年 5月 31日
		US 10683357 B2	2020年 6月 16日
		MX 2017015041 A	2018年 2月 26日
		PH 12017502129 A1	2018年 4月 2日
		TN 2017000488 A1	2019年 4月 12日
		CA 2987410 A1	2016年 12月 8日
		US 2018237534 A1	2018年 8月 23日
		US 2020399385 A1	2020年 12月 24日
		IL 255949 D0	2018年 1月 31日
		WO 2016196228 A1	2016年 12月 8日
		JP 2018520657 A	2018年 8月 2日
CN 110467674 A	2019年 11月 19日	WO 2019214624 A1	2019年 11月 14日
		SG 11202011201Q A	2020年 12月 30日
		EP 3790903 A1	2021年 3月 17日
		BR 112020023026 A2	2021年 2月 9日
		TW 202003575 A	2020年 1月 16日
		AU 2019264712 A1	2021年 1月 7日
		CA 3103040 A1	2019年 11月 14日