



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111518209 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202010387296.2

(22) 申请日 2020.05.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111518209 A

(43) 申请公布日 2020.08.11

(73) 专利权人 郑州航空港百桥生物科技有限公司

地址 450000 河南省郑州市航空港区新港大道西侧郑州台湾科技园C-3号楼1单元

专利权人 百创汇国际生物科技(武汉)股份有限公司

(72) 发明人 朱蓓莉 翟伟华 张莹 李雪飞
李喆 杨俊杰

(74) 专利代理机构 北京酷爱智慧知识产权代理有限公司 11514

专利代理师 王莹

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Brendan D. Curti等.OX40 Is a Potent Immune-Stimulating Target in Late-Stage Cancer Patients.《Cancer Res》.2013,第73卷(第24期),第7189-7198页.

Fanny Polesso等.OX40 Agonist Tumor Immunotherapy Does Not Impact Regulatory T Cell Suppressive Function.《J Immunol》.2019,第203卷(第7期),第2011-2019页.

审查员 刘晓晨

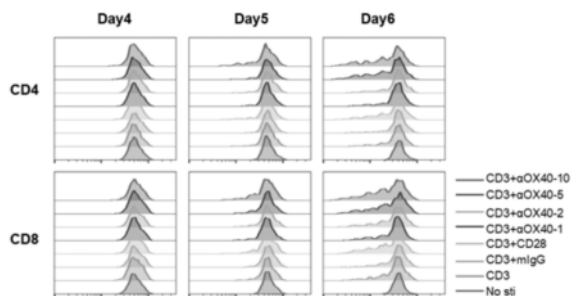
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

特异性结合人OX40的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种特异性结合人OX40的单克隆抗体及其应用,特异性结合人OX40(CD134)的单克隆抗体又名OX40抗体、抗OX40或抗OX40抗体,该抗体包括重链和轻链,其中重链的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1所示,轻链的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2所示。本发明提供的抗体能显著增加活化T细胞的增殖,对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应,可应用于制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物,具有重要的应用价值。



1. 一种特异性结合人OX40的抗体,其特征在于:
所述抗体包括重链和轻链;
所述重链为SEQ ID No.1所示的氨基酸序列;
所述轻链为SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。
2. 一种包括权利要求1所述抗体的药物组合物。
3. 核酸分子,其特征在于:所述核酸分子编码权利要求1所述抗体的重链和轻链。
4. 根据权利要求3所述的核酸分子,其特征在于:
编码所述抗体重链的核酸为SEQ ID No.3所示的核酸;
编码所述抗体轻链的核酸为SEQ ID No.4所示的核酸。
5. 包含权利要求3或4所述的核酸分子的重组载体。
6. 包含权利要求3或4所述的核酸分子的表达盒或重组菌。
7. 包含权利要求3或4所述的核酸分子的宿主细胞。
8. 权利要求1所述的抗体在制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物中的应用。
9. 权利要求3或4所述的核酸分子在制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物中的应用。

特异性结合人OX40的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体技术领域,具体涉及一种特异性结合人OX40的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] OX40又名CD134,是表达于细胞毒性T细胞和Treg细胞(调节型T细胞)的活化受体,是肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4),为I型跨膜糖蛋白。

[0003] OX40(CD134)是免疫反应调节的一个重要靶点,属于免疫共刺激通路(T细胞共刺激分子靶点),该靶点可以增强抗肿瘤免疫反应。

[0004] OX40信号可以激活下游的NF- κ B、PI3K和PKB通路,这些通路的持续激活最终能够延长T细胞的存活时间,并扩展T细胞记忆,促进T细胞的细胞杀伤能力;另外,OX40还能通过抑制调节性T细胞(Treg)的分化和活性,改善肿瘤微环境中的免疫抑制作用,进一步增强效应T细胞的功能。

[0005] 临床前研究显示,OX40同时抑制Treg细胞的生成和功能,以增强T细胞的活化,OX40抗体或者OX40配体(OX40L)与OX40结合后,可以抑制细胞凋亡,导致T细胞增殖,对肿瘤细胞发起免疫攻击,有时候还会发生肿瘤特异性的治疗效应。目前全球尚未有抗OX40抗体药物获批上市。

发明内容

[0006] 本发明目的在于提供一种特异性结合人OX40(CD134)的单克隆抗体及其应用。该抗体能显著增加活化T细胞的增殖,对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应,可应用于制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物。

[0007] 本发明的目的可通过以下的技术方案来实现:

[0008] 本发明提供了一种特异性结合人OX40(CD134)的抗体,又称为OX40抗体、抗OX40或抗OX40抗体,该抗体包括重链(HC)和轻链(LC);其中,重链为如下(A1)-(A3)任一:(A1)氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1所示的蛋白质;(A2)将(A1)所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质;(A3)与(A1)-(A2)中任一所限定的氨基酸序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上同一性且具有相同功能的蛋白质;轻链为如下(B1)-(B3)任一:(B1)氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2所示的蛋白质;(B2)将(B1)所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质;(B3)与(B1)-(B2)中任一所限定的氨基酸序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上同一性且具有相同功能的蛋白质。本发明提供的SEQ ID No.1所示的蛋白质序列如下:LARPGASVKMSCASGYTFTDYTIHWVKRPGQGLEWIGYINPSSGYTEENQMFTDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWAGYDYAFAMDYWGQGTSTVTVS;SEQ ID No.2所示的蛋白质序列如下:MYASLGERVTITCKASQDIN

SYLNWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSQDYSLTISSLEYEDVGIYYCLQYDEFPLTSGAGTKLE。

[0009] 抗体可由宿主细胞和分离的细胞所产生；优选地，宿主或分离的细胞是杂交瘤细胞或CHO细胞。

[0010] 本发明提供一种特异性结合人OX40 (CD134)的抗体的制备方法，该抗体制备方法包括以下步骤：

[0011] 步骤a)：将人OX40Fc融合蛋白(可购自上海聿才生物科技有限公司；Lot:0331291)免疫Ba1b/C小鼠，使小鼠产生致敏B淋巴细胞；

[0012] 步骤b)：将步骤a)所得小鼠脾脏脾细胞，与骨髓瘤细胞混合，用50%PEG2000进行融合；

[0013] 步骤c)：将上述b)所得融合细胞，用HAT选择性培养基选择性培养，以筛选融合的杂交瘤细胞，采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化培养；

[0014] 步骤d)：将上述c)所得杂交瘤细胞，以 5×10^6 细胞/0.5ml/只腹腔注射免疫缺陷DKO小鼠三只。杂交瘤细胞在小鼠腹腔内增殖，并产生和分泌单克隆抗体。1周后用注射器抽取腹水，即可获得大量单克隆抗体。

[0015] 本发明提供的特异性结合人OX40的抗体能显著增加活化T细胞的增殖，对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应。

[0016] 本发明还保护包括上述抗体的药物组合物，药物组合物中还可以包括药学上可接受的载体或赋形剂。

[0017] 本发明提供了一种核酸，该核酸编码上述抗体的重链(HC)和/或轻链(LC)。核酸可以是人工合成序列，或是抗体重链或轻链可变区序列的分离的核酸。

[0018] 优选地，上述编码抗体重链的核酸为如下(C1) - (C3)任一：(C1)核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.3所示的核酸；(C2)在严格条件下与(C1)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能的核酸；(C3)与(C1) - (C2)中任一所限定的核苷酸序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上同源性且编码具有相同功能的核酸；和/或编码抗体轻链的核酸为如下(D1) - (D3)任一：(D1)核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.4所示的核酸；(D2)在严格条件下与(D1)限定的核苷酸序列杂交且编码具有相同功能的核酸；(D3)与(D1) - (D2)中任一所限定的核苷酸序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上同源性且编码具有相同功能的核酸。

[0019] 需要说明的是，本发明所述的严格条件可为如下：50℃，在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交，在50℃，2×SSC，0.1%SDS中漂洗；还可为：50℃，在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交，在50℃，1×SSC，0.1%SDS中漂洗；还可为：50℃，在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交，在50℃，0.5×SSC，0.1%SDS中漂洗；还可为：50℃，在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交，在50℃，0.1×SSC，0.1%SDS中漂洗；还可为：50℃，在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交，在65℃，0.1×SSC，0.1%SDS中漂洗；也可为：在6×SSC，0.5%SDS的溶液中，在65℃下杂交，然后用2×SSC，0.1%SDS和1×SSC，0.1%SDS各洗膜一次。

[0020] 抗体可由核酸序列编码，核酸编码如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的成熟的重链或轻链可变区序列的序列或其子序列。核酸序列包括SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4的简并

序列。在具体方面中,核酸编码具有如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的重链或轻链可变区序列经一个或多个氨基酸残基取代、添加或缺失的氨基酸序列。核酸序列包括表达控制序列或载体。

[0021] 本发明还保护包含上述核酸的重组载体、表达盒、重组菌或宿主细胞。

[0022] 本发明还保护上述抗体在制备治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和T细胞功能障碍性疾病药物中的应用。

[0023] 本发明还保护上述核酸在制备治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和T细胞功能障碍性疾病药物中的应用。

[0024] 本发明所提供的抗体、核酸和其他组合物及方法可包括于或使用药物配方。这样的药物配方能用于体内局部、区域或全身性或离体治疗个体或给药或递送至个体。

[0025] 药物配方包括“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”载体、稀释剂或赋形剂。术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”包括与药物施用相容的溶剂(水溶剂或非水溶剂)、溶液、乳剂、分散介质、包衣、等渗和吸收促进或延迟剂。这样的配方可包含于液体;乳剂、混悬剂、糖浆剂或酞剂中,或包含于固体剂型;片剂(包衣或未包衣的片剂、直接释放、延迟释放、连续释放或脉冲式释放的片剂)、胶囊剂(硬胶囊剂或软胶囊剂、直接释放、延迟释放、连续释放或脉冲式释放的胶囊剂)、粉剂、颗粒剂、晶体或微珠中。补充的化合物(如防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)还可掺入配方中。

[0026] 可制备适合于特定的局部、区域或全身性给药或递送途径的药物配方。因此,药物配方包括适于通过特定途径给药的载体、稀释剂或赋形剂。对于本发明的组合物,给药途径的具体的非限制性例子是肠胃外如静脉内、动脉内、皮内、肌内、皮下、胸膜内、经皮(局部)、转化粘液质、颅内、脊柱内、眼内、直肠、经口(饮食)、粘膜给药,以及任何其他适于处理方法或给药方案的配方。

[0027] 用于肠胃外施用的溶液或混悬剂可包括:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、固定油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及用于调节张度的试剂如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱如盐酸或氢氧化钠调节pH。

[0028] 用于注射的药物配方包括无菌水溶液(水溶的)或分散剂以及用于临时制备无菌可注射的溶液或分散剂的无菌粉剂。对于静脉内给药,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇)以及适合的它们的混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用诸如卵磷脂的被覆层、通过保持就分散而言所要求的颗粒大小以及通过使用表面活性剂从而维持流动性。抗菌剂和抗真菌剂包括例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。等渗剂例如糖类、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,氯化钠可包括在组合物中。所包括的延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝或明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0029] 可通过将需要量的活性组合物掺入具有一种上述成分或上述成分组合的适合的溶剂中制备无菌可注射的配方。一般来说,通过将活性组合物掺入含有基础分散介质和任何其他成分的无菌载体中制备分散剂。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂而言,制备方法包括例如真空干燥和冷冻干燥,其由之前所制备的溶液生产出了活性成分外加任何额

外的所需成分的粉剂。

[0030] 对于转化粘液质或经皮给药,在配方中使用适合于要被透过的屏障的渗透剂。上述渗透剂是本领域已知的,包括例如,对于转化粘液质给药,为去垢剂、胆汁盐类和梭链孢酸衍生物。可通过使用鼻腔喷雾、吸入装置(如吸气器)或栓剂实现转化粘液质给药。对于经皮给药,活性化合物可配制为软膏剂、油膏剂、凝胶剂、霜剂或贴剂。

[0031] 可用免于从体内快速排除的载体制备药物配方,例如控制释放配方或时间延迟材料如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。还可使用加工产品如植入物和微囊密封的递送体系递送配方以达到局部、区域或全身性递送或控制或持续释放。

[0032] 可使用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙二醇二乙酸酯、聚酯、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。用于制备上述配方的方法是本领域技术人员所知道的。材料还可通过商业渠道获得。脂质体混悬剂(包括使用抗体或病毒外壳蛋白靶向细胞或组织的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。可根据已知的方法如在美国专利号4,522,811中所描述的方法制备这些载体。

[0033] 其他适于给药的药物配方是本领域已知的(参见如Gennaro(编),Remington:The Science and Practice of Pharmacy.第20版,Lippincott,Williams&Wilkins(2000); Ansel等,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.第7版,Lippincott Williams&Wilkins Publishers(1999);Kibbe(编),Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association,第3版.(2000)和 Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms,Technic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,Pa.,(1993))。

[0034] 包括OX40抗体、核酸、处理、治疗、试剂、药物和药物配方在内的根据本发明所使用的组合物可包装为易于给药和统一剂量的剂量单位形式。如本文所使用的,“剂量单位形式”指适合于单位剂量处理的物理上分离的单位;每单位含有被计算能产生所需处理或治疗(如有益)效果的量的与载体、赋形剂、稀释剂或媒介物结合的组合物。单位剂量形式取决于多种因素包括但无需受限于所使用的特定组合物、所要达到的效果以及待治疗的个体的药效动力学和药物基因组学。

[0035] 本发明提供的技术方案,具有如下的有益效果:本发明提供的特异性结合人OX40的单克隆抗体能显著增加活化T细胞的增殖,对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应,可应用于制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物,具有重要的应用价值。

[0036] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0037] 图1为本发明实施例1中的OX40抗体蛋白质电泳鉴定结果图;

[0038] 图2为本发明实施例2中的抗OX40抗体显著增加活化T细胞的增殖结果图;

[0039] 图3是本发明实施例2中的抗OX抗体对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应结果一图;

[0040] 图4是本发明实施例2中的抗OX抗体对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应结

果二图。

具体实施方式

[0041] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,因此只是作为示例,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0042] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,数据为三次重复实验的平均值或平均值±标准差。

[0043] 实施例1:特异性结合人OX40(CD134)的抗体(抗OX40抗体)的制备

[0044] 取完全弗氏佐剂(北京兰博利德商贸有限公司),与600 μ g人OX40Fc融合蛋白(上海聿才生物科技有限公司;Lot:0331291)混匀,皮下免疫三只Balb/C小鼠(6-8周龄);于1周、30天后,取不完全弗氏佐剂(北京兰博利德商贸有限公司),与600 μ g人OX40Fc融合蛋白混匀,皮下再次免疫过的三只Balb/C小鼠。10天后,取三只免疫小鼠的血,分离血清,测定抗体效价。在2个月、4个月、5个月后,取不完全弗氏佐剂,与600 μ g人OX40Fc融合蛋白混匀,皮下再次免疫上述三只Balb/C小鼠。

[0045] 1周后,取加强免疫的小鼠脾脏,制备单细胞悬液,裂解红细胞,计数 7×10^7 个细胞。取 2×10^8 个培养的SP2/0骨髓瘤细胞(购于ATCC)。将骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞混合,用50%PEG2000进行融合。用HAT培养基(购于SIGMA;SLCB7311)重悬细胞,用排枪100 μ l/孔转至96孔培养板(预先铺饲养细胞)中,放37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱培养。

[0046] 排枪吸取细胞培养液上清70 μ l/孔加至空白96孔酶标板(黑色)中;取培养的稳定表达人OX40的CHO细胞,稀释成 3.3×10^5 细胞/ml,并加入1/1000的APC-anti-mouseIgG(达科为生物技术有限公司;Lot:B267074),混匀,排枪吸取悬液加入上述酶标板。室温避光孵育4h后,上机检测。

[0047] 经两次检测,筛选获得亚克隆7个,继续进行2次克隆。筛选获得稳定单克隆进行扩大培养。

[0048] 取免疫缺陷DKO小鼠三只,腹腔注射液体石蜡0.5ml。收获上述培养的杂交瘤细胞, 5×10^6 细胞/0.5ml/只腹腔注射上述小鼠。一周后,小鼠腹腔穿刺取腹水,4 $^{\circ}$ C 2000rpm离心30min,避开上层油脂层,取中层上清,放4 $^{\circ}$ C冰箱保存。3天后小鼠腹腔穿刺取腹水,处理同上,放4 $^{\circ}$ C冰箱保存。次日,将所有腹水合在一起,得35ml。将腹水加至大小合适的烧杯中,滴加饱和硫酸铵溶液28.6ml至45%硫酸铵饱和度,边加边搅拌,然后4 $^{\circ}$ C搅拌过夜。取上述硫酸铵沉淀用20ml PBS溶解,转入透析袋,PBS中透析,每4h换液,换液5~6次。将上述收集透析过的抗体,进行蛋白质电泳鉴定(如图1所示):根据电泳结果,预估抗体浓度为1.5mg/ml,纯化较为彻底,纯度较高。无菌过0.22 μ m滤膜,1ml/支分装,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0049] 实施例2:特异性结合人OX40(CD134)的抗体(抗OX40抗体)对活化T细胞增殖的影响

[0050] 用PBS稀释抗人CD3抗体(品牌ebioscience货号16-0037-85)至3 μ g/ml和抗人CD28抗体(品牌ebioscience货号16-0289-85)1 μ g/ml或mIgG(品牌BD bioscience货号553485)2 μ g/ml或OX40对应抗体浓度。铺板96孔板,每孔200 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育一小时。取人外周血,分离

PBMC,计数。取 1×10^7 细胞,用CFSE进行标记。将上述包被的96孔板中的上清弃去,加入标记CFSE的PBMC,每孔 1×10^5 细胞,200 μ l1640培养基。

[0051] 取上述培养板中的细胞,加入0.5 μ l抗人CD8抗体(品牌ebioscience货号12-0089-42),0.5 μ l抗人CD4抗体(品牌ebioscience货号45-0049-42)以及0.5 μ l染死亡细胞的染料A780(品牌ebioscience货号65-0865-14),4 $^{\circ}$ C孵育20min;洗去未结合的抗体;用FACSbuffer重悬细胞,上机检测(流式机型Beckman cytoflex)。检测细胞增殖情况。

[0052] 如图2、3和4所示,上述抗OX40抗体显著增加活化T细胞的增殖,且抗OX抗体对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应。其中,图2中的每个图片中的线条由上至下依次为CD3+ α OX40-10、CD3+ α OX40-5、CD3+ α OX40-2、CD3+ α OX40-1、CD3+mIgG、CD3+CD28。图3中的每个图片中的线条由上至下依次为Anti-OX4010 μ g/ml、Anti-OX405 μ g/ml、Anti-OX402 μ g/ml、Anti-OX401 μ g/ml。图4中的每个图片中的线条由上至下依次为CD3+ α OX40-10、CD3+ α OX40-5、CD3+ α OX40-2、CD3+ α OX40-1、CD3+CD28、CD3+mIgG、CD3、No sti。

[0053] 以上实验结果说明:本发明提供的抗人OX40单克隆抗体能显著增加活化T细胞增殖,具有增强免疫功能,具有治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和T细胞功能障碍性疾病的潜在药用价值。

[0054] 实施例3:OX40杂交瘤细胞测序

[0055] 通过北京睿博兴科生物技术有限公司的3730XL DNA Analyzer测序仪进行OX40杂交细胞测序。ABI3730XL自动测序仪是基于毛细管电泳和荧光标记技术的DNA测序仪。3730XL测序仪拥有96道毛细管,并用荧光标记代替了Sanger法中的同位素标记,从而大大提高了DNA测序的速度和准确性。4种双脱氧核苷酸(ddNTP)的碱基分别用不同的荧光进行标记,在通过毛细管时,不同长度的DNA片段上的4种荧光基团被激光激发,发出不同颜色的荧光,被CCD检测系统识别,并直接翻译成DNA序列。测序结果如序列表中SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示;其中,本发明提供的SEQ ID No.3所示的核苷酸序列如下:AGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGACTACACGATACTGGGTAAAA CAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCAGTGGATATACTGAGGAGAATCAGATGT TCACGACAAGACCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATGGGCGGGATATGATTACGCTTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTC;SEQ ID No.4所示的核苷酸序列如下:TCTTCCATGTATGCATCTCTAGG AGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGTTATTTAAACTGGTTCCAGCAGAAACCAGGG AAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGTTCAGTGGCAGTGGAT CTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGATGTGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGA TGAGTTTCCGCTCACGTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT。

[0056] 本发明提供的特异性结合人OX40的单克隆抗体能显著增加活化T细胞的增殖,对T细胞增殖的增强作用具有剂量依赖效应,可应用于制备治疗或延缓癌症、免疫疾病和T细胞功能障碍性疾病药物。

[0057] 需要注意的是,除非另有说明,本申请使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域技术人员所理解的通常意义。除非另外具体说明,否则在这些实施例中阐述的部件和步骤的相对步骤、数字表达式和数值并不限制本发明的范围。在这里示出和描述的所有示例中,除非另有规定,任何具体值应被解释为仅仅是示例性的,而不是作为限制,因

此, 示例性实施例的其他示例可以具有不同的值。

[0058] 在本发明的描述中, 需要理解的是, 术语“第一”、“第二”仅用于描述目的, 而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此, 限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中, “多个”的含义是两个以上, 除非另有明确具体的限定。

[0059] 最后应说明的是: 以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制; 尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明, 本领域的普通技术人员应当理解: 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换; 而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围, 其均应涵盖在本发明的保护范围当中。

[0001]	SEQUENCE LISTING															
[0002]	<110>	郑州航空港百桥生物科技有限公司														
[0003]	<120>	特异性结合人OX40的单克隆抗体及其应用														
[0004]	<130>	2														
[0005]	<160>	4														
[0006]	<170>	PatentIn version 3.3														
[0007]	<210>	1														
[0008]	<211>	110														
[0009]	<212>	PRT														
[0010]	<213>	人工序列														
[0011]	<400>	1														
[0012]	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
[0013]	1				5					10					15	
[0014]	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Thr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly
[0015]				20				25					30			
[0016]	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr
[0017]			35				40					45				
[0018]	Glu	Glu	Asn	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys
[0019]		50					55					60				
[0020]	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
[0021]	65				70					75					80	
[0022]	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Ala	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Phe
[0023]				85					90						95	
[0024]	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser		
[0025]				100					105					110		
[0026]	<210>	2														
[0027]	<211>	95														
[0028]	<212>	PRT														
[0029]	<213>	人工序列														
[0030]	<400>	2														
[0031]	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser
[0032]	1				5					10					15	
[0033]	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
[0034]				20					25				30			
[0035]	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val
[0036]			35				40					45				
[0037]	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr
[0038]		50					55					60				

[0039]	Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln	
[0040]	65	70 75 80
[0041]	Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr Ser Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu	
[0042]		85 90 95
[0043]	<210>	3
[0044]	<211>	339
[0045]	<212>	DNA
[0046]	<213>	人工序列
[0047]	<400>	3
[0048]	agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc tgcaaggctt ctggctacac	60
[0049]	ctttactgac tacacgatac actgggtaaa acagaggcct ggacagggtc tggaatggat	120
[0050]	tggatacatt aatcctagca gtggatatac tgaggagaat cagatgttca cggacaagac	180
[0051]	cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg caactgagca gcctgacatc	240
[0052]	tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atgggcccga tatgattacg cttttgctat	300
[0053]	ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctc	339
[0054]	<210>	4
[0055]	<211>	303
[0056]	<212>	DNA
[0057]	<213>	人工序列
[0058]	<400>	4
[0059]	tcttccatgt atgcatctct aggagagaga gtcactatca cttgcaaggc gagtcaggac	60
[0060]	attaatagtt atttaaactg gttccagcag aaaccaggga aatctcctaa gaccctgac	120
[0061]	tatcgtgcaa acagattggt agatggggtc ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg	180
[0062]	caagattatt ctctcacat cagcagcctg gagtatgaag atgtgggaat ttattattgt	240
[0063]	ctacagtatg atgagtttcc gctcacgtcc ggtgctggga ccaagctgga gctgaaacgg	300
[0064]	gct	303

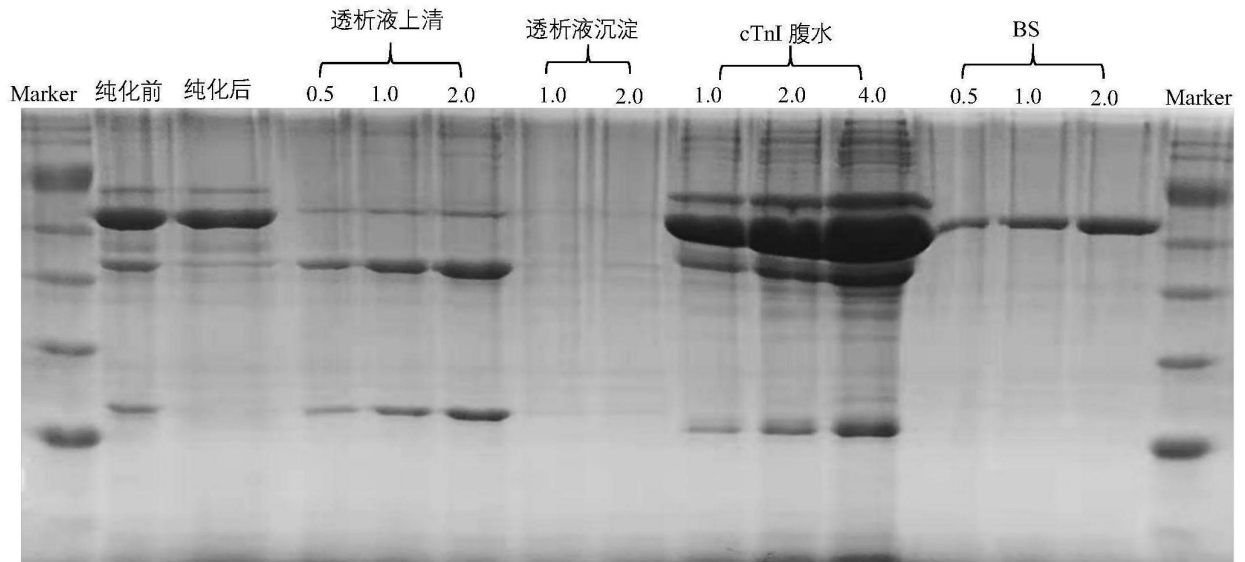


图1

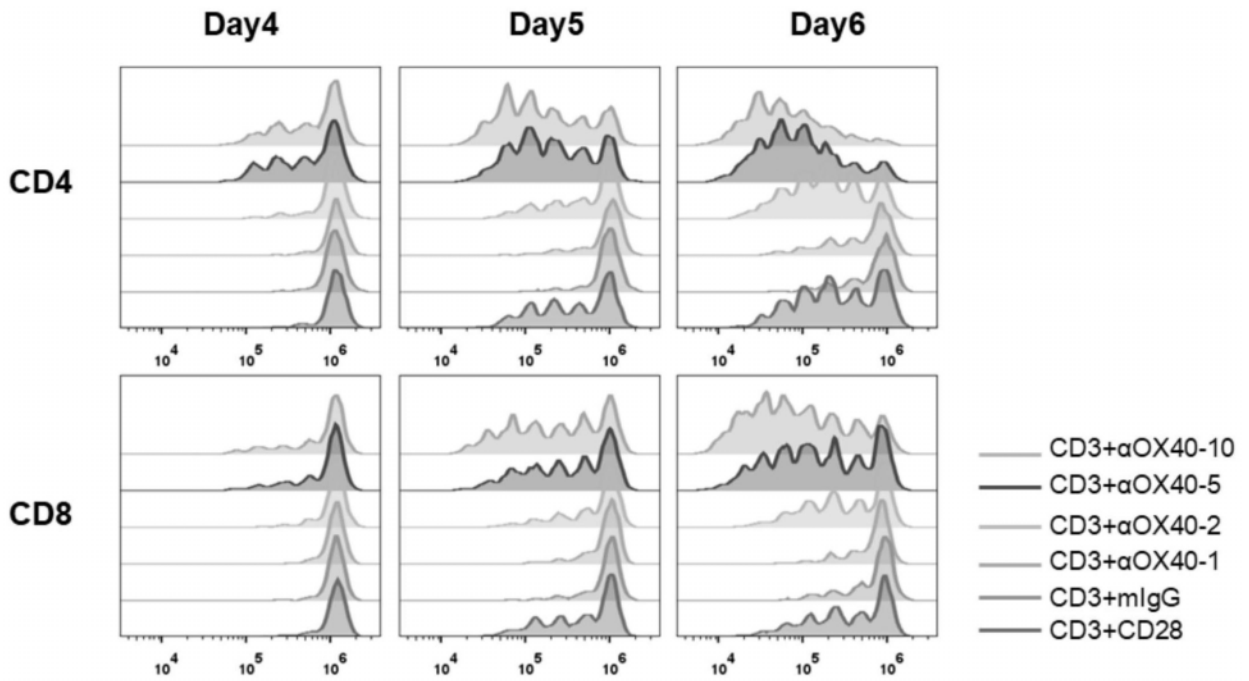


图2

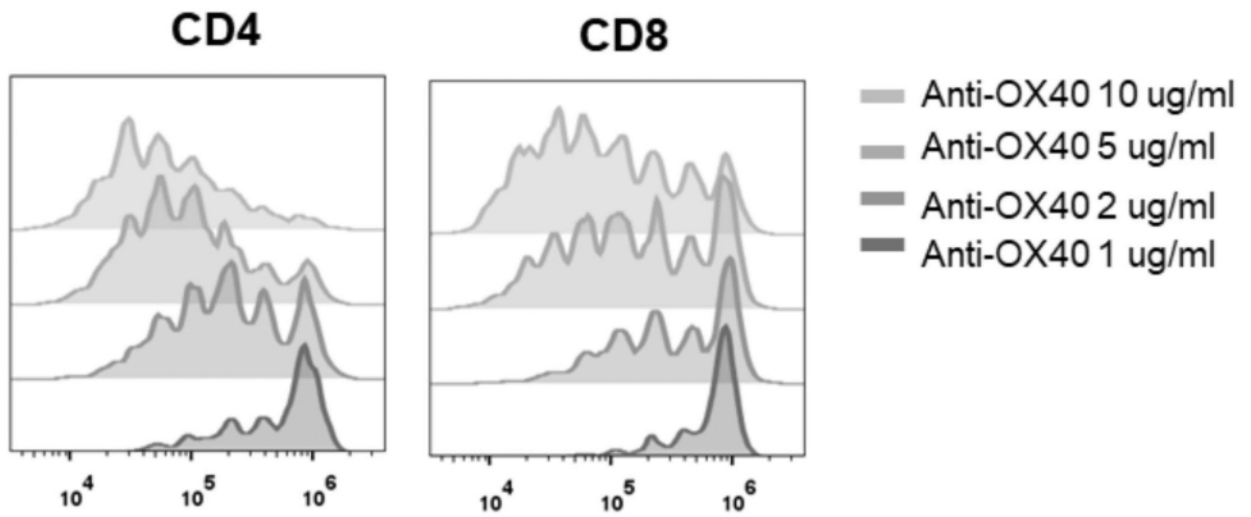


图3

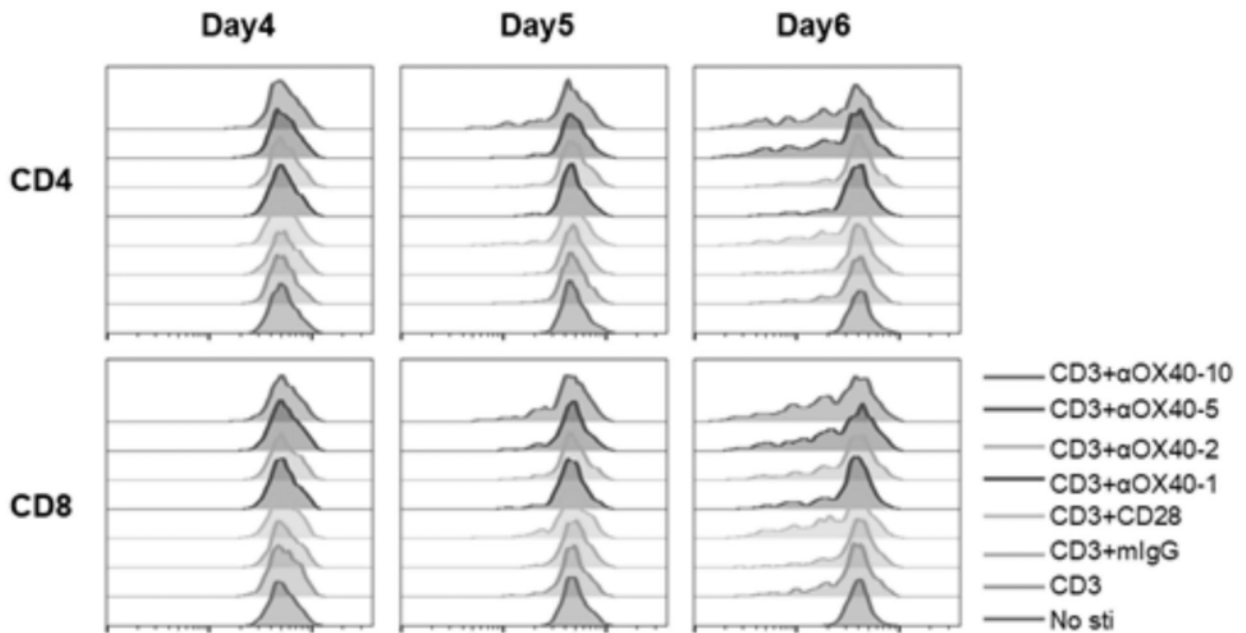


图4