

(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
2022年7月14日 (14.07.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/148413 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/070627

(22) 国际申请日: 2022年1月7日 (07.01.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110025248.3 2021年1月8日 (08.01.2021) CN

(71) 申请人: 北京韩美药品有限公司(BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。

(72) 发明人: 刘洋(LIU, Yang); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 张瑞景(ZHANG, Ruijing); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 范菲(FAN, Fei); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 李晓春(LI, Xiaochun); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 于璐(YU, Lu); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 刘家望(LIU, Jiawang); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。 李炅祐(LEE, Kyoung Woo); 中国北京市顺义区天竺空港工业区A区天柱西路10号, Beijing 101312 (CN)。

(74) 代理人: 北京律智知识产权代理有限公司(BEIJING INTELLEGAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区慧忠路5号远大中心B座1802, 1803, 1805, Beijing 100101 (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, 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。

(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))。

(54) **Title:** ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO 4-1BB AND ANTIGEN-BINDING FRAGMENT OF ANTIBODY

(54) 发明名称: 特异性结合4-1BB的抗体及其抗原结合片段

(57) **Abstract:** Provided are an antibody specifically binding to 4-1BB and an antigen-binding fragment of the antibody. The antibody specifically binding to 4-1BB and the antigen-binding fragment of the antibody have high specificity, and after being binded to an antigen, the antibody and the antigen-binding fragment thereof can enhance an immune killing function of T cells, can induce activation of immune cells and promote secretion of cytokines, and can significantly inhibit the growth of tumors in the body.

(57) 摘要: 提供一种特异性结合4-1BB的抗体及其抗原结合片段。特异性结合4-1BB的抗体及其抗原结合片段特异性强, 所述抗体及其抗原结合片段与抗原结合后可增强T细胞的免疫杀伤功能, 同时可诱导免疫细胞的活化并促进细胞因子的分泌, 能够在体内显著抑制肿瘤的生长。



WO 2022/148413 A1

特异性结合 4-1BB 的抗体及其抗原结合片段

技术领域

本发明涉及抗体和抗体人源化改造研究领域，具体而言，本发明涉及一种能够特异性地结合 4-1BB 的抗体及其抗原结合片段。

背景技术

单克隆抗体是只作用于单一抗原表位的高度靶向特异性抗体，已被广泛用于许多疾病的治疗，例如，癌症、炎症和自身免疫性疾病、感染性疾病等，尤其是在癌症的化疗失效后，这种靶向特异性药物尤为重要。

4-1BB 是一种共刺激分子，属于 TNFRSF。它是在 80 年代末进行 T 细胞因子筛选时，对小鼠辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞用刀豆球蛋白 A 刺激发现的。人 4-1BBL 于 1994 年首次通过直接表达克隆从活化的 CD4+T 淋巴细胞群中分离出来。4-1BBL 主要在树突状细胞、B 细胞或巨噬细胞上表达。已有研究表明，TNFSF-TNFRSF 的配体受体（如 CD40-CD40L、CD27-CD70 或 OX40-OX40L）信号通路可以调节体内许多重要的过程，如细胞的发育和死亡，细胞因子和趋化因子的诱导。越来越多的证据表明，TNFRSF 和 TNFSF 成员参与了包括癌症在内的多种疾病的炎症和病理学。在免疫治疗中，有效的免疫反应需要两种生物信号来充分激活 T 细胞和其他免疫细胞。第一种信号即抗原特异性信号，是由淋巴细胞受体与抗原呈递细胞（APCs）上主要组织相容性复合体（MHC）分子结合的特异性肽相互作用而产生的。第二种是非抗原特异性的共刺激信号。这种类型的信号是通过 T 细胞和 APCs 上表达的共刺激分子之间的相互作用提供的。

因此，针对 TNFSF 和 TNFRSF 配体-受体相互作用的免疫治疗技术在癌症治疗中具有很高的潜力。本领域依然存在开发更有效的特异性结合 4-1BB 的抗体的需求。

发明内容

本发明的第一方面涉及一种分离的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段、其变体或其衍生物，所述抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO.7 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，以及如 SEQ ID NO.8 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR。

所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和/或重链可变区，其中，轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID No. 3 所示的 LCDR3；和/或重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID No.4 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID No.5 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID No. 6 所示的 HCDR3。

所示轻链可变区或重链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别与 SEQ ID No. 1-3 或 4-6 所示序列具有至少 70% 的同一性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，例如至少 75%、80%、85%、90%、95% 或更高的同一性；或者，所述轻链可变区或重链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别为 SEQ ID No. 1-3 或 4-6 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，例如 1 个、2 个、3 个或更多个。

在一些实施方案中，所述变体选自嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

在一些实施方案中，所述抗体的重链恒定区序列选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD 之一的恒定区序列，和/或，所述抗体的轻链恒定区序列选自 κ 链或 λ 链；优选地，重链恒定区序列选自 IgG1 或者 IgG4 的恒定区序列，和/或轻链恒定区序列选自轻链 κ 链的恒定区序列。

在一些实施方案中，4-1BB 嵌合抗体及其功能片段的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示；或与 SEQ ID No. 7 所示序列具有至少 70% 的同一性且保留相应母体序列生物活性，例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的同一性；或为 SEQ ID NO.7 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个、20 个或更多个；和/或重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示；或与 SEQ ID No. 8 所示序列具有至少 70% 的同一性且保留相应母体序列生物活性，例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的同一性；或为 SEQ ID NO.8 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、15 个、20 个或更多个。

在一些实施方案中，所述 4-1BB 嵌合抗体及其功能片段的轻链恒定区和重链恒定区，

其中：

- (a) 轻链可变区具有选自 SEQ ID NO.13-20 所示的氨基酸序列；和/或重链可变区具有选自 SEQ ID NO.21-31 的氨基酸序列；
- (b) 轻链可变区具有如 SEQ ID NO.11 所示的氨基酸序列；和/或重链可变区具有选自 SEQ ID NO.21-31 的氨基酸序列；
- (c) 轻链可变区具有选自 SEQ ID NO.13-20 所示的氨基酸序列；和/或重链可变区具有如 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列。

优选地，轻链可变区具有如 SEQ ID NO.11 所示的氨基酸序列；和/或重链可变区具有如 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗原结合片段选自 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fd、Fv、scFv、双特异抗体、骆驼抗体、CDR 和抗体最小识别单位 (dAb) 中的一种或多种，优选地，所述抗原结合片段为 Fab、F(ab')₂ 或 scFv。

本发明第二方面还涉及一种分离的核酸分子，其选自：

- (1) DNA 或 RNA，其编码第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物；
- (2) 与(1)中定义的 DNA 或 RNA 完全互补的核酸。

本发明的第三方面涉及一种载体，其包含有效连接的第二方面所述的核酸分子，优选地，所述载体为表达载体。

本发明的第四方面涉及一种宿主细胞，其包含第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的载体。

本发明的第五方面涉及一种组合物，其包含第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物，第二方面所述的核酸分子，第三方面所述的载体或第四方面所述的宿主细胞，以及药学上可接受的赋形剂。

本发明的第六方面涉及一种生产第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物的方法，其包括步骤：将第四方面所述的宿主细胞在适合所述抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段或其变体表达的培养条件下表达，任选地，分离、纯化所得的产物，任选地，将所得产物偶联如上所述的诊断剂和/或治疗剂。

本发明的第七方面涉及第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体

或其衍生物, 第二方面所述的核酸分子, 第三方面所述的载体或第四方面所述的宿主细胞在制备用于预防和/或治疗自身免疫性疾病、针对移植物的免疫应答、变态反应、感染性疾病、神经退行性疾病和肿瘤的药物中的用途。

本发明的第八方面涉及第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物, 第二方面所述的核酸分子, 第三方面所述的载体或第四方面所述的宿主细胞, 其用于预防和/或治疗 4-1BB 介导的疾病或病症的药物中的用途, 其中所述的疾病或病症优选为肿瘤; 更优选地, 所述肿瘤选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤的一种或多种。

本发明的第九方面涉及一种预防和/或治疗肿瘤的方法, 其包括向有此需求的受试者施用第一方面所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物, 第二方面所述的核酸分子, 第三方面所述的载体或第四方面所述的宿主细胞。

在一些实施方案中, 所述肿瘤选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肾细胞癌、骨肉瘤、黑色素瘤和梅克尔细胞癌的一种或多种; 优选地, 所述肿瘤选自淋巴瘤、骨髓瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、前列腺癌、尿路上皮癌、肾细胞癌、骨肉瘤、黑色素瘤和梅克尔细胞癌的一种或多种; 更优选地, 所述肿瘤选自淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌、宫颈癌、尿路上皮癌、肾细胞癌、黑色素瘤和梅克尔细胞癌的一种或多种。

在一些实施方案中, 所述受试者选自哺乳动物, 包括但不限于人和/或其它灵长类动物; 哺乳动物, 包括商业上相关的哺乳动物, 如牛、猪、马、羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠。

在一些实施方案中, 本发明的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物, 核酸分子, 载体或宿主细胞以本领域的常规施用方法使用, 例如胃肠外途径, 例如静脉注射。

本发明的抗 4-1BB 单抗特异性强, 稳定性好, 具有较强的 T 细胞功能调控活性和良

好的药代动力学特性，能够在体内显著抑制肿瘤的生长。而且本发明的抗 4-1BB 单抗对于 4-1BB/4-1BBL 的封闭活性强于 Urelumab 单抗。

附图说明

为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1. A 图表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗序列对 4-1BB 的结合活性，B 图表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗序列对 4-1BB 的激动活性。

图 2. 表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 对 4-1BB 的结合活性。

图 3. A 图表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 的种属特异性，B 图表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 的结合特异性。

图 4. 表示出抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 阻断 4-1BB/4-1BBL 结合的活性。

图 5. 表示出了抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 在基因敲入小鼠同源肿瘤模型中的抗肿瘤药效。

图 6. 表示出了抗人 4-1BB 人源化单抗 BH3145b 对 4-1BB 的结合活性。

图 7. 表示出抗人 4-1BB 人源化单抗 BH3145b 阻断 4-1BB/4-1BBL 结合的活性。

具体实施方式

定义

术语“4-1BB”，即 CD137，属肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF9)，主要表达于活化的 T 细胞，是 T 细胞协同刺激分子，其配体为 4-1BBL。

本文所用的术语“抗 4-1BB 抗体”、“抗 4-1BB”、“4-1BB 抗体”、“抗 4-1BB 单抗”或“结合 4-1BB 的抗体”。是指能够以足够的亲和力结合 4-1BB 蛋白或其片段的抗体。在某些实施方案中，抗 4-1BB 抗体结合到来自不同物种的 4-1BB 中保守的 4-1BB 的表位。

术语“抗体”是指免疫球蛋白分子或免疫球蛋白分子的具有结合到抗原的表位上的能力的片段。天然存在的抗体典型地包含四聚体，其通常由至少两条重（H）链和至少两条轻（L）链构成。免疫球蛋白包括如下同种型：IgG（IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型）、

IgA (IgA1 和 IgA2 亚型)、IgM 以及 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。轻链根据恒定区的不同分为 κ 链和 λ 链。

在本文中, 术语“抗体”以最广泛意义使用, 指包含抗原结合位点的蛋白质, 涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体, 包括但不限于完整抗体和抗体的抗原结合片段。

“可变区”或“可变结构域”是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原的结合的结构域。抗体的每条重链由重链可变区 (本文中简称为 VH) 和重链恒定区 (本文中简称为 CH) 构成, 重链恒定区通常由 3 个结构域 (CH1、CH2 和 CH3) 构成。每条轻链由轻链可变区 (本文中缩写为 VL) 和轻链恒定区 (本文中缩写为 CL) 组成。重链和轻链可变区典型地负责抗原识别, 而重链和轻链恒定域可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子 (包括免疫系统的各种细胞 (例如, 效应细胞)、Fc 受体和经典补体系统的第一组分 (C1q)) 的结合。重链和轻链可变区含有与抗原相互作用的结合区。VH 和 VL 区可以进一步细分成称作“互补性决定区 (CDR)”的超变区 (HVR), 它们中间穿插着更保守的称为“骨架区” (FR) 的区域。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 域和四个 FR 域构成, 按以下顺序从氨基末端排到羧基末端: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

术语“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR” (在本文中与超变区“HVR”可以互换使用) 即指抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环 (“超变环”) 和/或含有抗原接触残基 (“抗原接触点”) 的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。在本文中, 重链的三个 CDR 称为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 轻链的三个 CDR 称为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

应该注意, 基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此, 在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时, 所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体, 其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列, 但是由于应用了不同的方案 (例如不同的指派系统规则或组合) 而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

术语“单抗”、“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组合物的抗体分子制剂, 指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即包含个体抗体的群体除可能少量存在的天然发生的突变之外是相同的。常规的单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。在某些实施方案中, 单克隆抗体可以由多于一种 Fab 域构成, 由此增加对多于一种靶标的特异性。术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”并不受限于任何具体的产

生方法（例如，重组的、转基因的、杂交瘤等）。

术语“双抗”、“双功能抗体”“双特异性抗体”、“bispecific antibody”或“BsAb”是指拥有 2 个不同的抗原结合位点，从而可以同时与两个靶抗原结合，在发挥抗体靶向性的同时具有介导另外一种特殊功能的作用，所介导的特殊功能效应分子还可以是毒素、酶、细胞因子、放射核素等，双特异性抗体结合抗原的两条臂可分别来自 Fab、Fv、ScFv 或 dSFv 等。

术语“多克隆抗体”是指包括抗不同决定簇(“表位”)的不同抗体的制备物。

术语“抗体的抗原结合片段”指能够与表位结合的抗体的片段、部分、区域或结构域(例如可经由切割、重组、合成等获得)。抗原结合片段可以含有该类抗体的 1、2、3、4、5 或所有 6 个 CDR 域，并且尽管能够结合到所述表位，仍可以展现出不同的特异性、亲和力或选择性。优选地，抗原结合片段含有所述抗体的所有 6 个 CDR 域。抗体的抗原结合片段可以是单条多肽链（例如，scFv）的一部分或包含单条多肽链，或者可以是两条或更多条多肽链（各自具有氨基末端和羧基末端）（例如，双抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段等）的一部分或包含两条或更多条多肽链。

本发明所包括的抗原结合片段的实例包括 (a) Fab'或 Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(b) F(ab')₂ 片段，包含两个由二硫键在铰链结构域连接的 Fab 片段的二价片段；(c) 由 VH 区和 CH1 域组成的 Fd 片段；(d) 由抗体单臂的 VL 区和 VH 区组成的 Fv 片段；(e) 单链抗体 (single chain Fv, scFv)，用基因工程方法将抗体 VH 和 VL 通过一段链接肽连接而成的重组蛋白；(f) dAb 片段 (Ward 等人, Nature, 341, 544-546 (1989))，其基本上由 VH 区组成并且也称为结构域抗体 (Holt 等人, Trends Biotechnol., 2i(11): 484-90)；(g) 骆驼或纳米抗体 (Revetts 等人, Expert Opin Biol Ther., 5 (1): 111-24) 以及 (h) 分离的互补决定区 (CDR)。

术语“嵌合抗体”，指重链和/或轻链的一部分与来自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类的抗体的相应序列是相同或同源的，而链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段的相应序列是相同的或同源的，只要它们展现出期望的生物学活性。本发明提供了来自人抗体的可变区抗原结合序列。因此，本文主要关注的嵌合抗体包括具有一个或多个抗原结合序列(如 CDR)并含有一个或多个来自非人抗体的序列如 FR 或 C 区序列的抗体。此外，本文所述的嵌合抗体是包含一种抗体类别或亚类的人可变区域抗原结合序列以及来自另一个抗体类别或亚类的另一个序列如 FR 或 C 区序列的抗体。

术语“人源化抗体”指其中来源于另一种哺乳动物物种如小鼠的种系的 CDR 序列已被移植到人框架序列上的抗体。可以在人框架序列内进行额外的框架区修饰。

术语“人抗体”或“全人抗体” (“humAb”或“HuMab”) 指包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变域和恒定域的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如, 在体外通过随机或位点特异性诱变或在基因重排期间或在体内通过体细胞突变引入的突变)。

变体抗体也包括在本发明范围之内。因此, 申请中所列举的序列的变体也包括在本发明范围之内。可以通过使用本领域已知的方法获得具有改良的亲合性的抗体序列的其他变体并且这些变体也包括在本发明范围之内。例如, 氨基酸替换可用于获得具有进一步改良的亲合性的抗体。或者, 核苷酸序列的密码子优化可用于改善抗体生产中的表达系统的翻译效率。这样的变体抗体序列与申请中列举的序列具有 70% 或更多 (例如 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或更高) 的序列同源性。这样的序列同源性是相对于参考序列 (即, 申请中列举的序列) 的全长计算获得的。

本发明区域中的氨基酸残基的编号是根据 IMGT[®]、the international ImMunoGeneTics information system[®] 或 Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesmann, K. S. & Foeller, C., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH 公开号 91-3242, 美国卫生与公众服务部; Chothia, C. & Lesk, A. M., (1987), Canonical structures For The Hypervariable domains Of Immunoglobulins., J. Mol. Biol., 196, 901-917 进行的。在没有明确指明的情况下, 本发明中的氨基酸残基的编号是根据 Kabat 编号系统进行。

抗体或其抗原结合片段“特异性地”结合另一分子的区域 (即, 表位) 是指, 它相对于另外的表位与该表位更加频繁地、更加快速地、以更长的持续时间和/或以更大的亲和力或亲合力反应或结合。在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段以至少 10^{-7} M 的亲和力结合人 4-1BB, 例如 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或更高。优选地, 抗体或其抗原结合片段在生理条件下 (例如, 在体内) 结合。因此, 特异性地结合到 4-1BB 是指该抗体或其抗原结合片段以上述特异性和/或在这样的条件下结合到 4-1BB 上的能力。适合于确定所述结合的方法是本领域已知的。

在抗体与指定抗原结合的背景下, 术语“结合”通常是指以对应于约 10^{-6} M 或更小的 KD 的亲和力结合, 该 KD 比该抗体对与除指定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原 (例如, BSA、酪蛋白) 结合的亲和力低至少 10 倍, 如低至少 100 倍、至少 1,000 倍。

如本文所用，术语“ k_d ”（ sec^{-1} 或 $1/\text{s}$ ）是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值又称为 k_{off} 值。

如本文所用，术语“ k_a ”（ $\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ 或 $1/\text{Msec}$ ）是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数。

如本文所用，术语“ K_D ”（ M ）是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数并且通过 k_d 除以 k_a 获得。

如本文所用，术语“ K_A ”（ M^{-1} 或 $1/\text{M}$ ）是指特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数并且通过 k_a 除以 k_d 获得。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段仅需要 CDR 的一部分（即结合所需的 CDR 残基亚群，称为 SDR）在人源化抗体中保持结合。可以通过分子建模和/或凭经验或者如在 Gonzales, N.R.等人, (2004), SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity, Mol. Immunol., 41:863-872 中所述的，基于先前研究（例如 CDR H2 中的残基 H60-H65 通常是不需要的）从位于 Chothia 超变环外的 Kabat CDR 区域（参见，Kabat 等人, (1992), Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, 公开号 91-3242; Chothia, C.等人, (1987), Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins, J. Mol. Biol., 196:901-917）中鉴定不接触相关表位并且不在 SDR 中的 CDR 残基。在此类人源化抗体中，在一个或多个供体 CDR 残基不存在或整个供体 CDR 被省略的位置处，占据该位置的氨基酸可以是在受体抗体序列中占据相应位置（通过 Kabat 编号）的氨基酸。此类取代在降低人源化抗体中小鼠氨基酸的数目以及因此降低潜在的免疫原性方面是潜在有利的。然而，取代还可能引起亲和力的变化，并且优选避免亲和力的显著减少。还可以凭经验选择 CDR 内的取代位置和待取代的氨基酸。

利用 CDR 残基的单个氨基酸改变可以导致失去功能性结合的事实（Rudikoff, S.等人, (1982), Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-binding Specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983），可以系统性鉴定可替代的功能性 CDR 序列。在一种用于获得此类变体 CDR 的优选方法中，将编码 CDR 的多核苷酸诱变（例如经由随机诱变或通过位点定向方法）以产生具有取代的氨基酸残基的 CDR。通过比较原始（功能性）CDR 序列中的相关残基的身份与取代的（非功能性）变体 CDR 序列的身份，可以鉴定出该取代的 BLOSUM62.ijj 取代得分。BLOSUM 系统提供了通过分析序列数据库创建的氨基酸

取代矩阵，用于可信比对 (Eddy, S.R., (2004), Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?, Nature Biotech., 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G., (1992), Amino acid substitution matrices from protein blocks), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89:10915-10919; Karlin, S.等人, (1990), Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes), PNAS, 87:2264-2268; Altschul, S.F., (1991), Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective, J. Mol. Biol., 219, 555-565。目前，最先进的 BLOSUM 数据库是 BLOSUM62 数据库 (BLOSUM62.iij)。表 1 呈现了 BLOSUM62.iij 取代得分 (得分越高取代越保守，并且因此更加可能地，该取代将不会影响功能)。例如，如果包含所得 CDR 的抗原结合片段不能结合到 4-1BB，则 BLOSUM62.iij 取代得分被认为是不充分保守的，并且选择且产生新的具有更高取代得分的候选取代。因此，例如，如果原始残基是谷氨酸 (E) 并且非功能性取代残基是组氨酸 (H)，则 BLOSUM62.iij 取代得分将为 0，并且更保守的变化 (如到天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或赖氨酸) 是优选的。

表1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1

F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

本发明因此考虑了随机诱变用于鉴定改进的 CDR 的用途。在本发明的背景下，保守取代可以由反映在以下三个表中的一个或多个中的氨基酸类别内的取代定义：

保守取代的氨基酸残基类别：

表2	
酸性残基	Asp (D) 和Glu (E)
碱性残基	Lys (K)、Arg (R) 和His (H)
亲水性不带电荷残基	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N) 和Gln (Q)
脂肪族不带电荷残基	Cly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L) 和Ile (I)
非极性不带电荷残基	Cys (C)、Met (M) 和Pro (P)
芳香族残基	Phe (F)、Tyr (Y) 和Trp (W)

替代性保守氨基酸残基取代类别：

表3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

氨基酸残基的物理和功能替代性分类：

表4	
含有醇基的残基	S和T

脂肪族残基	I、L、V和M
环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电荷的残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电荷的残基	H、K和R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
非常小的残基	A、G和S
转角形成中涉及的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

更保守的取代分组包括：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

在一些实施方案中，亲水性氨基酸选自 Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Tyr 和 Lys。

还可以使用描述于例如 Creighton, (1984), *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company) 中的原理制定另外的氨基酸组群。

因此，所包含的抗体或其抗原结合片段的 CDR 变体的序列可以通过取代而不同于亲本抗体的 CDR 的序列；例如 4、3、2 或 1 个氨基酸残基的取代。根据本发明的实施方案，CDR 区中的氨基酸可以用保守取代进行取代，如在以上 3 个表中所定义的。

“同源性”或“序列同一性”是指在序列比对和引入缺口后，多核苷酸或多肽序列变体的残基与非变体序列的相同的百分比。在具体实施方式中，多核苷酸和多肽变体与本文所述的多核苷酸或多肽具有至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、或至少约 99% 的多核苷酸或多肽同源性。

这样的变体多肽序列与申请所列举的序列具有 70% 或以上(即 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或更多)的序列同一性。在其他实施方式中，本发明提供了多肽片段，其包括本文所公开的氨基酸序列的各种长度的连续延伸段。例如，适用的情况下，本发明提供的肽序列包含至少约 5、10、15、20、30、40、50、75、100、150 或更多的本发明公开的一个或多个序列的连续肽以及其之间所有的中间长度的肽。

术语“治疗”指改善、减缓、减弱或逆转疾病或病状的进展或严重性，或者改善、减缓、

减弱或逆转这种疾病或病状的一种或多种症状或副作用。在本发明中，“治疗”还指用于获得有益的或希望的临床结果的方法，其中“有益的或希望的临床结果”包括但不限于症状的缓解、病状或疾病程度的减小、稳定化的（即没有恶化的）疾病或病状状态、疾病或病状状态进展的延缓或减缓、疾病或病状状态的改善或减轻以及疾病或病状的缓解，不论是部分地或全部地、可检出的或不可检出的。

术语“预防”指施用本发明的抗体及其功能片段，从而阻止或阻碍疾病或病况的至少一种症状的发展。该术语还包括治疗缓解中的受试者以预防或阻碍复发。

本发明的抗体可以通过重组 DNA 产生的单克隆抗体。

本发明的抗体可以具有任何同种型。同种型的选择通常由希望的效应物功能（如 ADCC 诱导）来决定。示例性同种型是 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。可以使用人轻链恒定域 κ 或 λ 中任一者。如果需要，可以通过已知方法转换本发明的抗 4-1BB 抗体的类别。例如，最初是 IgG 的本发明抗体可以类别转换为本发明的 IgM 抗体。此外，类别转换技术可以用来将一个 IgG 亚类转化成另一亚类，例如从 IgG1 转换为 IgG2。因此，本发明抗体的效应物功能可以通过同种型切换变为例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM 抗体，以用于各种治疗用途。在一些实施方案中，本发明的抗体是 IgG2 抗体，例如 IgG2a。如果抗体的氨基酸序列相对于其他同种型与该同种型大部分同源，则该抗体属于特定同种型。

在一些实施方案中，本发明的抗体是全长抗体，优选 IgG 抗体。在另一些实施方案中，本发明的抗体是抗体抗原结合片段或单链抗体。

在一些实施方案中，抗 4-1BB 抗体是单价抗体，优选如在 WO2007059782（通过引用将其全文并入此处）中描述的具有铰链区缺失的单价抗体。因此，在一些实施方案中，抗体是单价抗体，其中所述抗 4-1BB 抗体通过以下方法构建：i）提供编码单价抗体的轻链的核酸构建体，所述构建体包含编码所选抗原特异性抗 4-1BB 抗体的 VL 区的核苷酸序列和编码 Ig 的恒定 CL 区的核苷酸序列，其中编码所选抗原特异性抗体的 VL 区的所述核苷酸序列和编码 Ig 的 CL 区的所述核苷酸序列被有效连接在一起，并且其中，在 IgG1 亚型的情况下，编码 CL 区的核苷酸序列已经被修饰，这样使得在多克隆人 IgG 的存在下或当给予动物或人时，该 CL 区不含有能够与包含该 CL 区的一致氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价键的任何氨基酸；ii）提供编码单价抗体的重链的核酸构建体，所述构建体包含编码所选抗原特异性抗体的 VH 区的核苷酸序列和编码人 Ig 的恒定 CH 区的核苷酸

序列，其中编码 CH 区的核苷酸序列已经被修饰，这样使得在多克隆人 IgG 的存在下或当给予动物人时，对应于铰链区和（如由 Ig 亚型所要求的）CH 区的其他区域（如 CH3 区）的区域不包含参与和包含人 Ig 的 CH 区的一致氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价或稳定的非共价重链间键的任何氨基酸残基，其中编码所选抗原特异性抗体的 VH 区的所述核苷酸序列和编码所述 Ig 的 CH 区的所述核苷酸序列被有效连接在一起；iii）提供用于产生单价抗体的细胞表达系统；iv）通过在（iii）的细胞表达系统的细胞中共表达（i）和（ii）的核酸构建体来产生所述单价抗体。

类似地，在一些实施方案中，抗 4-1BB 抗体是单价抗体，其包含：

(i) 如本文所述的本发明抗体的可变区或所述结构域的抗原结合部分，以及

(ii) 免疫球蛋白的 CH 区或其包含 CH2 和 CH3 域的结构域，其中该 CH 区或其结构域已经被修饰，这样使得对应于铰链区和（如果该免疫球蛋白不是 IgG4 亚型的话）CH 区的其他结构域（如 CH3 域）的结构域不包含任何氨基酸残基，这些任何氨基酸残基能够与相同 CH 区形成二硫键或在多克隆人 IgG 的存在下与相同 CH 区形成其他共价或稳定的非共价重链间键。

在另外的一些实施方案中，单价抗体的重链被修饰，使得缺失整个铰链区。

在另外的实施方案中，单价抗体的序列被修饰，使得它不包含用于 N-连接的糖基化的任何受体位点。

本发明还包括“双特异性抗体”，其中抗 4-1BB 结合区（例如，抗 4-1BB 单克隆抗体的 4-1BB 结合区）是靶向一种以上表位的二价或多价双特异性框架的一部分（例如第二表位可以包含主动转运受体的表位，这样使得该双特异性抗体将展现出跨生物屏障（如血脑屏障）的改进的胞转作用，或者第二表位是靶向另一种目标蛋白的表位）。因此，在另外的实施方案中，抗 4-1BB 抗体的单价 Fab 可以连接到另外的靶向不同蛋白的 Fab 或 scFv，以产生双特异性抗体。双特异性抗体可以具有双重功能，例如由抗 4-1BB 结合区赋予的治疗功能和可以结合到受体分子以增强跨生物屏障（如血脑屏障）转移的转运功能。

本发明的抗体及其抗原结合片段还包括单链抗体。单链抗体是重链和轻链 Fv 域被连接的肽。在一些实施方案中，本发明提供了单链 Fv（scFv），其中本发明的抗 4-1BB 抗体的 Fv 中的重链和轻链由柔性肽接头（典型地为约 10、12、15 或更多个氨基酸残基）连接成单条肽链。产生此类抗体的方法描述于例如 US 4,946,778；Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore ed., Springer-Verlag,

New York, pages: 269-315 (1994); Bird 等人, Science, 242, 423-426 (1988); Huston 等人, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)和 McCafferty 等人, Nature, 348, 552-554 (1990)。如果仅使用单个 VH 和 VL, 单链抗体是单价的; 如果使用两个 VH 和 VL, 则是二价的; 或如果使用两个以上 VH 和 VL, 则是多价的。

通过本领域已知的任何技术产生本发明的抗体, 如但不限于任何化学、生物学、遗传学或酶学技术, 可单独使用或组合使用。通常, 知道期望序列的氨基酸序列, 本领域技术人员可通过用于产生多肽的标准技术容易地产生所述抗体。例如, 可以使用公知的固相方法合成这些抗体, 优选使用市售的肽合成装置(如 Applied Biosystems, Foster City, California 制造的装置)并遵循制造商的说明书合成这些抗体。或者, 可以通过本领域熟知的重组 DNA 技术合成本发明的抗体。例如, 在将编码抗体的 DNA 序列并入表达载体并将这些载体导入合适的表达所需抗体的真核或原核宿主中后, 可以获得作为 DNA 表达产物的抗体, 之后可以使用已知技术从宿主分离抗体。

可以通过包含任何“适合”数目的经修饰的氨基酸和/或与偶联取代基结合来修饰本发明的抗体及其抗原结合片段。在这种情况下, “适合”通常由至少基本上保留与非衍生化亲本抗 4-1BB 抗体相关的 4-1BB 选择性和/或 4-1BB 特异性的能力决定。包含一个或多个经修饰的氨基酸在例如增加多肽血清半衰期、降低多肽抗原性或增加多肽储存稳定性中可以是有益的。对一种或多种氨基酸进行修饰, 例如, 在重组生产的过程中与翻译同时进行或在翻译之后进行(例如, 在哺乳动物细胞表达过程中在 N-X-S/T 基序上的 N-连接的糖基化作用), 或通过合成手段进行修饰。经修饰的氨基酸的非限制性实例包括糖基化的氨基酸、硫酸化的氨基酸、异戊二烯化(例如, 法尼基化、香叶基-香叶基化)的氨基酸、乙酰化的氨基酸、酰化的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸、生物素酰化的氨基酸、羧基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸等。进行氨基酸修饰的参考文献在本领域中司空见惯, 参见例如 Walker, (1998), Protein Protocols On CD-Rom, Humana Press, Totowa, New Jersey。经修饰的氨基酸可以例如选自糖基化的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素酰化的氨基酸、偶联到脂质部分的氨基酸或偶联到有机衍化剂的氨基酸。

本发明的抗体及其抗原结合片段还可以通过共价偶联到聚合物而化学修饰, 以增加其循环半衰期。示例性聚合物以及将它们连接到肽的方法参见例如 US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 和 US 4,609,546。另外的示例性聚合物包括聚氧乙基化的多元醇和聚乙二醇(PEG)(例如, 分子量在约 1,000~40,000D 之间, 如在约 2,000~20,000D 之间,

例如约 3,000~12,000D 的 PEG)。

本发明进一步涉及包含本发明的抗体(优选单克隆抗体)的融合蛋白。

术语"受试者"是指温血动物, 优选哺乳动物(包括人、家畜和农场动物、动物园动物、运动动物或宠物动物, 如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等), 更优选人。在一个实施方案中, 受试者可以是"患者", 即, 温血动物, 更优选是人, 其正在等待接收或正在接受医疗护理或将是医疗程序、或疾病发展监测的对象。在一个实施方案中, 受试者是成年人(例如 18 岁以上的受试者)。在另一个实施方案中, 受试者是儿童(例如, 18 岁以下的受试者)。在一个实施方案中, 受试者是男性。在另一个实施方案中, 受试者是女性。

在本发明的一个实施方案中, 样品是生物样品。生物样品的实例包括但不限于从患病组织, 体液, 优选血液, 更优选血清、血浆、滑液、支气管肺泡灌洗液、痰、淋巴液、腹水、尿液、羊水、腹膜液、脑脊液、胸膜液、心包液和肺泡巨噬细胞制备的组织裂解物和提取物。

在本发明的一个实施方案中, 术语"样品"旨在表示在任何分析之前取自个体的样品。

因此, 在一些实施方案中, 本发明的抗 4-1BB 抗体及其抗原结合片段包括完整抗体, 如 IgG (IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型)、IgA (IgA1 和 IgA2 亚型)、IgD、IgM 以及 IgE; 抗原结合片段如 SDR、CDR、Fv、dAb、Fab、Fab₂、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、骆驼抗体或纳米抗体; 抗体或其抗原结合片段的变体序列, 如与上述抗体或其抗原结合片段具有至少 80% 序列同一性的变体序列。在一些实施方案中, 本发明还包括包含抗 4-1BB 或其抗原结合片段的衍生物, 如来源于完整抗体的嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、重组抗体、双特异抗体、包含修饰的氨基酸的产物、偶联到聚合物的产物、包含放射性标记的产物、包含荧光标记的产物、包含酶标记物的产物、包含化学发光物的产物、包含顺磁标记的产物。

在另外的方面, 本发明涉及编码本发明的抗体或其抗原结合片段的一条或多条多肽链的表达载体。此类表达载体可以用于重组产生本发明的抗体和其抗原结合片段。

在本发明中, 表达载体可以是任何适合的 DNA 或 RNA 载体, 包括染色体载体、非染色体载体和合成核酸载体(包含一组适合的表达控制元件的核酸序列)。此类载体的实例包括 SV40 的衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒与噬菌体 DNA 的组的载体以及病毒核酸(RNA 或 DNA)载体。在一些实施方案中, 编码抗 4-1BB 抗体的核酸被包含在裸 DNA 或 RNA 载体中, 包括例如线性表达元件(如描

述于例如 Sykes and Johnston, *Nat Biotech*, 12, 355-59 (1997)、紧凑型核酸载体（如描述于例如 US 6,077,835 和/或 WO 00/70087）、质粒载体（如 pBR322、pUC 19/18 或 pUC 118/119）、最小尺寸的核酸载体（如描述于例如 Schakowski 等人, *Mol Ther*, 3, 793-800 (2001)），或作为沉淀型核酸载体构建体，如 CaPO₄ 沉淀型构建体（如描述于例如 WO 00/46147; Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986); Wigler 等人, *Cell*, 14, 725 (1978)以及 Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics*, 2, 603 (1981)）。此类核酸载体及其使用在本领域是熟知的（参见例如 US 5,589,466 和 US 5,973,972）。在一些实施方案中，表达载体是 X0GC（来源于专利 WO2008/048037），pCDNA3.1(ThermoFisher, 货号 V79520), pCHO1.0 (ThermoFisher, 货号 R80007)。

在一些实施方案中，载体适用于在细菌细胞中表达抗 4-1BB 抗体或其抗原结合片段。此类载体的实例包括例如 BlueScript (Stratagene)、pIN 载体 (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem*, 264, 5503-5509 (1989))、pET 载体 (Novagen, Madison, Wisconsin) 等。

表达载体还可以是适用于在酵母系统中进行表达的载体。可以采用任何适用于在酵母系统中进行表达的载体。适合的载体包括例如包含组成型或诱导型启动子（如 α 因子、醇氧化酶和 PGH）的载体（综述于：F. Ausubel 等人, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience, New York (1987); Grant 等人, *Methods in Enzymol*, 153, 516-544 (1987); Mattanovich, D.等人, *Methods Mol. Biol.*, 824, 329-358 (2012); Celik, E.等人, *Biotechnol. Adv.*, 30(5), 1108-1118 (2012); Li, P.等人, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142(2), 105-124 (2007); Böer, E.等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(3), 513-523 (2007); van der Vaart, J.M., *Methods Mol. Biol.*, 178, 359-366 (2002)和 Holliger, P., *Methods Mol. Biol.*, 178, 349-357 (2002)）。

在本发明的表达载体中，编码抗 4-1BB 抗体的核酸可以包含任何适合的启动子、增强子和其他有助于表达的元件或者与其结合。此类元件的实例包括强表达型启动子（例如，人 CMV IE 启动子/增强子以及 RSV、SV40、SL3-3、MMTV 和 HIV LTR 启动子）、有效的聚(A)终止序列、用于在大肠杆菌中产生质粒的复制起点、作为选择性标记的抗生素抗性基因和/或便利的克隆位点（例如，多聚接头）。核酸还可以包含与组成型启动子（如 CMV IE）相对的诱导型启动子。

在另外的方面，本发明涉及重组真核或原核宿主细胞（如转染瘤），其产生本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的双特异性分子。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳

动物细胞（如 CHO 或 HEK 细胞）。例如，在一些实施方案中，本发明提供了包含稳定整合进细胞基因组中的核酸的细胞，该基因组包含编码本发明的抗 4-1BB 抗体或其抗原结合片段的核酸序列。在另一些实施方案中，本发明提供了包含非整合型核酸（如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件）的细胞，该核酸包含编码本发明的抗 4-1BB 抗体或其抗原结合片段的序列。

本发明的抗体及其抗原结合片段可以在不同细胞系中产生，如人细胞系、非人哺乳动物细胞系和昆虫细胞系，例如 CHO 细胞系、HEK 细胞系、BHK-21 细胞系、鼠类细胞系（如骨髓瘤细胞系）、纤维肉瘤细胞系、PER.C6 细胞系、HKB-11 细胞系、CAP 细胞系和 HuH-7 人细胞系（Dumont 等人, 2015, Crit Rev Biotechnol., Sep. 18, 1-13., 其内容通过引用并入本文）。

通过常规免疫球蛋白纯化方法适当地将本发明的抗体与培养基分离，所述方法如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法。

本发明进一步涉及组合物，其包含本发明的抗体、由其组成或基本上由其组成。

如本文所用，关于组合物，"基本上由.....组成"是指至少一种如上所述的本发明抗体是所述组合物中具有生物学活性的唯一一种治疗剂或试剂。

在一个实施方案中，本发明的组合物是药物组合物，并且还包含药学上可接受的载体。

术语"药学上可接受的载体"是指当施用于动物，优选人时，不产生不利的、过敏或其他不良反应的赋形剂。其包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。对于人类施用，制剂应满足监管机构(例如 FDA 办公室或 EMA)所要求的无菌、致热原性、一般安全性和纯度标准。

本发明进一步涉及药物，其包含本发明的抗体、由其组成或基本上由其组成。

在一些实施方案中，修饰本发明抗体的糖基化。例如，可以制备无糖基化的抗体(即，抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲合力或改变抗体的 ADCC 活性。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如，可以进行一个或多个氨基酸取代，其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点，从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。在 Co 等人的美国专利 No.5,714,350 和 No.6,350,861(通过引用并入本文)中进一步详细描述了这种方法。另外或可替代地，可以制备具有改变的糖基化类型的抗体，如具有减少量或不具有岩藻糖基残基的低岩藻糖基化或非岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分 GlcNac 结构的抗

体。已经证明这种改变的岩藻糖基化模式增加了抗体的 ADCC 能力。这种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中描述，并且可用作宿主细胞，在该宿主细胞中表达本发明的重组抗体，从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如，Hang 等人的 EP1176195 (通过引用并入本文)描述了具有功能性破坏的 FUT8 基因的细胞系，该 FUT8 基因编码岩藻糖基转移酶，使得在这种细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖基化或缺少岩藻糖基残基。因此，在一些实施方案中，本发明的人抗体(优选单克隆抗体)可以通过在表现出低岩藻糖基化或非岩藻糖基化模式的细胞系中重组表达来产生，例如，具有缺少编码岩藻糖基转移酶的 FUT8 基因表达的哺乳动物细胞系。Presta 的 PCT 公开 WO 03/035835(通过引用并入本文)描述了变体 CHO 细胞系、Lecl3 细胞，其具有降低的将岩藻糖附着至 Asn(297)连接的碳水化合物的能力，也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见 Shields, R.L. 等人 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana 等人的 PCT 公开 WO 99/54342(通过引用并入本文)描述了工程化细胞系以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如， $\beta(1,4)$ -N 乙酰葡萄糖胺基转移酶 III(GnTIII))，使得在工程化的细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分 GlcNac 结构，其导致抗体的 ADCC 活性增加(还参见 Umana 等人 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180)。Eureka Therapeutics 进一步描述了基因工程化的 CHO 哺乳动物细胞，其能够产生具有缺少岩藻糖残基的改变的哺乳动物糖基化模式的抗体 (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>)。或者，本发明的人抗体(优选单克隆抗体)可以在酵母或丝状真菌中产生，所述酵母或丝状真菌用于哺乳动物样糖基化模式并且能够产生缺少岩藻糖作为糖基化模式的抗体(参见例如 EP1297172B1)。

4-1BB (CD137/TNFRSF9) 在抗原启动的 T 细胞上表达，而在静止的 T 细胞上不表达。此外，已知其在树突状细胞 (DC)、自然杀伤细胞 (NKs)、活化的 CD4+ 和 CD8+ T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤 T 细胞 (NKT) 和肥大细胞中表达，但骨髓源性抑制细胞 (MDSCs) 在其表面不表达该分子。抗 4-1BB 抗体具有激活细胞毒性 T 细胞和增加 γ 干扰素 (IFN- γ) 生成的能力，肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF) 是一个由 29 个成员组成的蛋白质超家族，在人类免疫系统中发挥着重要作用。这个分子家族分为两类：死亡受体 (8 个成员) 和激活受体。它们都含有一个细胞内信号通路激活域和一个细胞外受体位点。这些受体位点可通过与肿瘤坏死因子超家族 (TNFSF) 的相应配体结合来激活。

TNFSF-TNFRSF 的配体受体 (如 CD40-CD40L、CD27-CD70 或 OX40-OX40L) 信号

通路可以调节体内许多重要的过程，如细胞的发育和死亡，细胞因子和趋化因子的诱导。越来越多的证据表明，TNFRSF 和 TNFSF 成员参与了包括癌症在内的多种疾病的炎症和病理学。在免疫治疗中，有效的免疫反应需要两种生物信号来充分激活 T 细胞和其他免疫细胞。第一种信号即抗原特异性信号，是由淋巴细胞受体与抗原呈递细胞（APCs）上主要组织相容性复合体（MHC）分子结合的特异性肽相互作用而产生的。第二种是非抗原特异性的共刺激信号。这种类型的信号是通过 T 细胞和 APCs 上表达的共刺激分子之间的相互作用提供的。4-1BB 是一种共刺激分子，属于 TNFRSF。它是在 80 年代末进行 T 细胞因子筛选时，对小鼠辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞用刀豆球蛋白 A 刺激发现的。人 4-1BBL 于 1994 年首次通过直接表达克隆从活化的 CD4+T 淋巴细胞群中分离出来。4-1BBL 主要在树突状细胞、B 细胞或巨噬细胞上表达。

本发明的抗体作用于 4-1BB，4-1BB 作为一种强大的 T 细胞特异性共刺激分子，也在许多非 T 细胞表达，如：DC 细胞、单核细胞、B 细胞、肥大细胞、NK 细胞和中性粒细胞。通过抗-4-1BB 激动剂或 4-1BBL 转染激活 4-1BB 共刺激信号，可诱导细胞增殖、细胞因子表达、杀菌活性和支持 T 细胞效应器功能。激动性抗体与 4-1BB 结合后可增强 T 细胞的免疫杀伤功能。同时，可诱导免疫细胞的活化并促进细胞因子（如 IL-8）的分泌。

本发明提供的抗人 4-1BB 嵌合单抗可以结合人 4-1BB 和食蟹猴 4-1BB，且亲和力相似，但不与小鼠 4-1BB 结合，具有种属特异性。抗人 4-1BB 嵌合单抗具有很强的结合特异性，仅与 4-1BB 结合，不与 B7 家族成员、CD28 家族成员和 CTLA-4、LAG-3、TIM-3、OX40 和 CD27 蛋白结合，结果如图 3 所示。

在提供了范围的值时，应该理解，除非文中另有明确说明，否则每个插入值、到下限的单位的十分之一、该范围的上限和下限之间和任何其它在所述范围内的所述值或插入值都包含于本发明范围之内。可独立地包括于较小范围内的这些较小范围的上限和下限也包含在本发明内，只要去除被特地排除在外的极限所述范围内被特定排除在外的任何界限。当所述范围包括界限的一个或两个时，排除被包括的界限的一个或两个的范围也包括于本发明中。

除非另有定义，本文所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的具有相同的含义。虽然任何类似或等同于本文所述的方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用，但现在公开了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用而全部并入本文。

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限制本发明的范围。本发明提供实施例一方面是用于描述本发明抗体制备过程，该制备过程仅是说明相关方法，并非是限制性的，本领域技术人员公知，在不背离本发明精神的情况下，可以对本发明做出许多修改，这样的修改也落入本发明的范围。本发明提供实施例另一方面是用于表明本发明抗体的特征和优点，但本发明不限于这些特征和优点。

下述实验方法如无特别说明，均为常规方法，未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行，所使用的实验材料如无特别说明，均可容易地从商业公司获取。本发明下述实施例中使用的各种抗体均来源于商业途径的标准抗体。

实施例

实施例 1 鼠源抗人 4-1BB 单抗的制备

1.1、动物免疫

实验动物选用雌性 BALB/c 小鼠（购自北京维通利华），6 至 8 周龄。小鼠适应环境一周后，开始免疫。首次免疫使用 50 μg 重组人 4-1BB-Fc 蛋白（北京义翘神州，货号 10041-H03H）和弗氏完全佐剂（Sigma-Aldrich，货号 F5881），二者充分混合形成乳液，腹腔注射小鼠。两周之后，进行加强免疫。加强免疫使用 25 μg 重组人 4-1BB-Fc 蛋白与弗氏不完全佐剂（Sigma-Aldrich，货号 F5806），二者充分混合形成乳液，腹腔注射小鼠。每隔 2 周以同样的方法加强免疫，共 3 次。末次免疫后第 10 天，从小鼠眼眶后静脉丛采血并离心分离血清，针对重组人 4-1BB-His 蛋白（北京义翘神州，货号 10041-H08H）用酶联免疫吸附试验（ELISA）测定抗体效价。选择效价高的小鼠用来融合制备杂交瘤。融合前三天，腹腔注射 50 μg 重组人 4-1BB-His 蛋白，不含佐剂。融合当天，无菌取脾，用 DMEM 培养基（Gibco，货号 11965）制成单脾细胞悬液，准备融合。

1.2、杂交瘤细胞的制备

取对数生长的骨髓瘤细胞 SP2/0（购自中国科学院），1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，用不完全 DMEM 培养液混悬细胞后计数。取所需的细胞数与脾细胞按照一定比例混合在 50 mL 离心管中，离心 5 分钟。弃上清，在手掌上轻击离心管底，使沉淀细胞松散均匀。缓慢加入 1mL PEG（Sigma，货号 P7181）用时 1 分钟，静置 90 秒。加入不完全 DMEM 培养基至 50mL 终止融合，静置 5 分钟，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清。加入 20 mL HAT 培养基（Sigma，货号 H0262- 10VL）轻柔吹散融合细胞，按照每孔细胞数 1×10^5 个至 HAT

培养基中并铺板，置 37°C，5% CO₂ 培养箱内培养。在 7-10 天后用 HT 培养基（Sigma，货号 H0137-10VL）换出 HAT 培养基。定期观察杂交瘤细胞生长情况，待其长至孔底面积 1/10 以上时吸出上清供抗体检测。将阳性克隆的细胞扩大培养并冻存。

1.3、克隆筛选与鉴定

用酶联免疫吸附试验（ELISA）筛选杂交瘤培养上清液的抗人 4-1BB 抗体。用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 4-1BB（北京义翘神州，货号 10041-H08H），包被浓度为 1 μ g/mL，包被量为 100 μ L 每孔，包被在 4°C 过夜进行。PBST 缓冲液洗涤 5 次。用含 1% 牛血清白蛋白（BSA）的 PBST 缓冲液按 300 μ L/孔封闭，25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入培养上清液样品以及阳性血清对照，每孔加入 100 μ L，25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。然后加入 1:10000 稀释在含 1% BSA 的 PBST 缓冲液里的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 抗体（Abcam，货号 Ab7068），每孔加入 100 μ L，25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入比色底物 TMB，100 μ L/孔，室温显色 10 分钟。加入 1M H₂SO₄，100 μ L/孔，终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。根据 OD_{450nm} 的强弱选取能够分泌抗人 4-1BB 选择抗体的阳性克隆。

激动性抗体与 4-1BB 结合后可增强 T 细胞的免疫杀伤功能。同时，可诱导免疫细胞的活化并促进细胞因子（如 IL-8）的分泌。激动性抗人 4-1BB 抗体的筛选基于 GS-H2/4-1BB 细胞实验。接种阳性克隆的杂交瘤细胞于小鼠腹腔，一周提取腹水，纯化得到抗体蛋白。培养 GS-H2/4-1BB 细胞。筛选当日，胰酶消化 GS-H2/4-1BB 细胞，完全培养基终止消化，1000rpm 离心 5 分钟，弃上清，含 2% 血清的 MEM 培养基（Gibco，货号 10370-021）重悬细胞，细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/mL，每孔 100 μ L 铺 96 孔板，置 37°C，5% CO₂ 培养箱内培养 2 小时。生物素标记的抗小鼠 IgG 抗体（中杉金桥，货号 ZB-2020）和 Dynabeads 链霉亲和素磁珠 M-280（Invitrogen，货号 112-05D）室温孵育 30 分钟，吸铁石分离磁珠 2-3 分钟，PBS 洗磁珠 4-5 次。在培养 2 小时后细胞板的每孔中加入 50 μ L 终浓度 10 μ g/mL 的待测抗体，50 μ L 终浓度 100 μ g/mL 的孵育磁珠。37°C，5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时。用 IL-8 检测试剂盒（达科为，货号 1110802）按照说明书检测检测 GS-H2/4-1BB 细胞上清中 IL-8 的表达量，根据 OD_{450nm} 的强弱选取能够分泌抗人 4-1BB 激动性抗体的阳性克隆。

结果如表 1 和图 1 的 A 所示，多个抗人 4-1BB 克隆分泌的抗体具有 4-1BB 结合活性。结果如图 1 的 B 所示，多个抗人 4-1BB 克隆分泌的抗体具有 4-1BB 激动活性。

表 1. 抗人 4-1BB 的 4-1BB 结合活性

检测样品	4-1BB 结合(EC50, nM)
4-1BB-215-8-2-8	0.185
4-1BB-215-8-6-50	0.292
4-1BB-215-8-10-62	1.251
4-1BB-215-8-12-2	0.239
4-1BB-246-6-5-48	0.202
4-1BB-246-8-33-83	0.195

1.4、单克隆抗体序列的测定

将筛选得到的同时具有抗原结合活性以及激动活性的克隆，进行抗体 DNA 序列的测定。首先提取细胞 mRNA，使用 RNAPrep Pure 试剂盒(Tiagen, DP419)。然后使用 SMART 5'RACE 试剂盒 (Clontech 目录号 634849) 将杂交瘤提取的总 RNA 反转录合成 4-1BB cDNA 第一条链，分别设计 PCR 扩增可变区的引物 VHGSP (SEQ ID NO.32) 和 VLGSP (SEQ ID NO.33)。将 PCR 扩增得到的目的条带用 in-fusion 方式克隆到线性化的 pRACE 载体 (Clontech, 货号: 634859) 中，挑单克隆进行 DNA 测序。

实施例 2 嵌合的抗人 4-1BB 单抗的制备

4-1BB-246-8-33-83 克隆经过 PCR 扩增得到其抗体轻链可变区序列如 SEQ ID NO. 7 所示，抗体重链可变区序列如 SEQ ID NO. 8 所示。根据小鼠可变区序列排除骨架区序列后即可得到其互补决定区序列；其中轻链的三个互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 1、2 和 3 所示；重链的三个互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 4、5 和 6 所示。4-1BB-246-8-33-83 克隆构建的嵌合的 4-1BB 单抗命名为 mAb-33-83，嵌合单抗 mAb-33-83 的轻链由 4-1BB-246-8-33-83 克隆轻链可变区 (序列如 SEQ ID NO. 7 所示) 与轻链恒定区 (序列如 SEQ ID NO. 9 所示) 连接而成，mAb-33-83 抗体重链是由重链可变区 (序列如 SEQ ID NO. 8 所示) 与重链恒定区 (序列如 SEQ ID NO. 10 所示) 连接而成。将上述抗体轻重链的编码的氨基酸序列进行基因合成 (由苏州金唯智生物科技有限公司完成)，获得相应的编码核苷酸序列并克隆到真核细胞表达载体 X0GC 中，然后重组表达载体转染 ExpiCHO 细胞系 (ExpiCHOTM, 货号 A29133, invitrogen)。转染前一天接种细胞，细胞重悬于新鲜的 ExpiCHOTM 表达

培养基(ExpiCHOTM Expression Medium, 货号 A29100, invitrogen)中, 细胞密度为 35×10^5 细胞/mL, 转染当天计数, 细胞密度在 $(70-200) \times 10^5$ 细胞/mL 范围内, 活率应高于 95%, 用预热的 ExpiCHOTM 表达培养基稀释细胞, 最终密度为 60×10^5 细胞/mL。按照转染体积用 OptiPROTM 培养基(货号 12309, invitrogen)分别稀释质粒和转染试剂 ExpiFectamineTM CHO 试剂(货号 A29131, invitrogen), 质粒的终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。轻轻将稀释后的转染试剂加入到质粒中, 静置 1-5 min, 之后将质粒转染试剂复合物加入到细胞中, 放入细胞培养箱, 125 rpm 摇床 37°C、8% CO₂。转染第二天, 补加 ExpiFectamineTM CHO Enhancer (货号 A29131, invitrogen) 和 ExpiCHOTM Feed (货号 A29101-02, invitrogen), 细胞培养箱调整为 125 rpm 摇床 32°C、5% CO₂, 离心收集转染 10 天的细胞培养上清。

实施例 3 嵌合的抗人 4-1BB 单抗与人 4-1BB 的结合活性

用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定嵌合的抗人 4-1BB 单抗与人 4-1BB 的结合能力。具体实施过程如下: 用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 4-1BB (北京义翘神州, 货号 10041-H08H), 包被浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 包被量为 $100 \mu\text{L}$ 每孔, 包被在 4°C 过夜进行。PBST 缓冲液洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 缓冲液按 $300 \mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入抗人 4-1BB 抗体样品以及对照 Urelumab (来源于专利序列 WO2004010947), 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。然后加入 1:10000 稀释在含 1%BSA 的 PBST 缓冲液里的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 抗体(Abcam, 货号 Ab7068), 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入比色底物 TMB, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 室温显色 10 分钟。加入 $1 \text{M H}_2\text{SO}_4$, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

结果如图 2 所示, 抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 具有良好的人 4-1BB 结合亲和力, 与对照 Urelumab 的结合活性相当。

实施例 4 嵌合的抗人 4-1BB 单抗的种属特异性和结合特异性

用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定嵌合的抗人 4-1BB 单抗的种属特异性。具体实施过程如下: 用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 4-1BB、食蟹猴 4-1BB 和小鼠 4-1BB, 均购自北京义翘神州, 包被浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 包被量为 $100 \mu\text{L}$ 每孔, 包被在 4°C 过夜进行。PBST 缓冲液洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 缓冲液按 $300 \mu\text{L}/$

孔封闭, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入序列稀释在含 1%BSA 的 PBST 缓冲液里的抗人 4-1BB 嵌合单抗样品, 每孔加入 100 μ L, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。然后加入 1:10000 稀释在含 1%BSA 的 PBST 缓冲液里的辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体 (Chemicon, 货号 AP309P), 每孔加入 100 μ L, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入比色底物 TMB, 100 μ L/孔, 室温显色 10 分钟。加入 1 M H₂SO₄, 100 μ L/孔, 终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

用 ELISA 测定嵌合的抗人 4-1BB 单抗的结合特异性。具体实施过程如下: 用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 CD80、CD86、4-1BB、PD-L2、B7-H2、CTLA4、PD-1、LAG-3、TIM-3、BTLA、CD28、4-1BB、OX40、CD27、ICOS。CD28 蛋白购自北京百普赛斯, 其余蛋白均购自北京义翘神州, 包被浓度为 1 μ g/mL, 包被量为 100 μ L 每孔, 包被在 4°C 过夜进行。PBST 缓冲液洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 缓冲液按 300 μ L/孔封闭, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入序列稀释在含 1%BSA 的 PBST 缓冲液里的抗人 4-1BB 嵌合单抗样品以及对照 Urelumab, 同型对照, 每孔加入 100 μ L, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。然后加入 1:10000 稀释在含 1% BSA 的 PBST 缓冲液里的辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体 (Chemicon, 货号 AP309P), 每孔加入 100 μ L, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入比色底物 TMB, 100 μ L/孔, 室温显色 10 分钟。加入 1 M H₂SO₄, 100 μ L/孔, 终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

如图 3 的 A 图所示, 抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 可以结合人 4-1BB 和食蟹猴 4-1BB, 且亲和力相似, 但不与小鼠 4-1BB 结合, 具有种属特异性。如图 3 的 B 图所示, 抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 具有很强的结合特异性, 仅与 4-1BB 结合, 不与 B7 家族成员、CD28 家族成员和 CTLA-4、LAG-3、TIM-3、OX40 和 CD27 蛋白结合。

实施例 5 嵌合的抗人 4-1BB 单抗的封闭 4-1BB 与受体结合的活性

用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定嵌合的抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 的封闭 4-1BB 与受体结合的活性。具体实施过程如下: 用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 4-1BB (北京义翘神州, 货号 10041-H08H), 包被浓度为 1 μ g/mL, 包被量为 100 μ L 每孔, 包被在 4°C 过夜进行。PBST 缓冲液洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 缓冲液按 300 μ L/孔封闭, 25°C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入抗人 4-1BB 抗

体样品,每孔加入 50 μ L,并加入生物素标记的 4-1BBL(北京百普赛斯,货号 41L-H82F9),浓度为 200ng/mL(终浓度 100ng/mL),每孔加入 50 μ L, 25 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟。PBST 缓冲液洗涤 5 次。然后加入 1:1000 稀释在含 1 % BSA 的 PBST 缓冲液里的链霉亲和素-HRP (Streptavidin-HRP) (BD, 货号 554066),每孔加 100 μ L, 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液洗涤 5 次。加入比色底物 TMB, 100 μ L/孔, 室温显色 10 分钟。加入 1 M H₂SO₄, 100 μ L/孔, 终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

结果如图 4 所示,抗人 4-1BB 嵌合单抗的 4-1BB/4-1BBL 封闭活性优于对照 Urelumab。

实施例 6 嵌合的抗人 4-1BB 单抗的抗肿瘤药效研究

实验材料选用 h4-1BB/h4-1BB 双人源化小鼠(敲除了鼠源的 4-1BB 和 4-1BB,过表达人源的 4-1BB 和 4-1BB,江苏百奥赛图),雌性,6-8 周龄。小鼠适应环境一周后,每只小鼠于右侧背部皮下接种 1×10^6 个 MC38/h4-1BB 小鼠结肠瘤细胞(MC38 购自上海舜冉)。待肿瘤体积长至约 100 mm³ 时,根据肿瘤体积进行分组,每组 6 只荷瘤小鼠。分别给予溶媒(DPBS, GIBCO, 货号 14190-136)、抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 35nmol/kg 和对照 Urelumab 35nmol/kg。每周给药 2 次,连续给药 2 周,给药方式为腹腔注射。自给药之日起,每周测量 2 次肿瘤体积,测量其长径 a, 短径 b, 肿瘤体积计算公式为: 肿瘤体积 (mm³) = (a \times b²) / 2。肿瘤体积测量持续时间为 2 周,即停药后,再观察 2 周。

结果如图 5 所示,在同源肿瘤模型中,抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 具有抗肿瘤活性,显著抑制了肿瘤的生长,药效好于对照 Urelumab。

实施例 7 人源化抗人 4-1BB 单抗的制备

人源化抗人 4-1BB 单抗是根据 Leung 等人(1995, Molecule Immunol 32:1413-27)的方法获得的。在 Germline 数据库中选取与鼠源抗体可变区序列匹配最好的人源化模板,其中轻链可变区的模板为 hIGKV1-27*01 + hIGKJ4;重链可变区的模板为 hIGHV1-69*02 + hIGHJ6 *01。将鼠源抗体轻链 CDR 区移植到选择的人源化模板上,替换人模板的 CDR 区,得到移植的人源化抗体轻链可变区,序列如 SEQ ID NO. 11 所示。移植的人源化抗体重链可变区,序列如 SEQ ID NO. 12 所示。在 SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12 上选择位点进行回复突变,得到轻链可变区序列如 SEQ ID NO. 13-20 所示,得到重链可变区序列如 SEQ ID NO. 21-31 所示。将轻链可变区分别与轻链恒定区(序列 SEQ ID NO. 9)连接,

得到对应的轻链全长序列；将重链可变区分别与重链恒定区（序列 SEQ ID NO. 10）连接，得到对应的重链全长序列。通过亲和力和稳定性筛选得到可用的人源化序列，得到的人源化单抗的轻链可变区和重链可变区的序列信息详见表 2，其中 ID 列为分别获得的嵌合单抗及人源化单抗的简称。

表 2 嵌合单抗及人源化单抗轻链可变区和重链可变区的序列信息

ID	VH SEQ ID NO.	VL SEQ ID NO.	ID	VH SEQ ID NO.	VL SEQ ID NO.
嵌合单抗	8	7	z11	27	16
z0	12	11	z12	28	16
z1	21	11	z13	29	16
z2	21	13	z14	30	16
z3	22	11	z15	31	16
z4	22	13	z16	26	15
z5	22	14	z17	26	17
z6	22	15	z18	26	14
z7	23	13	z19	22	18
z8	24	13	z20	22	19
z9	25	13	z21	22	20
z10	26	16	-	-	-

实施例 8 人源化抗人 4-1BB 单抗的抗原结合活性

将实施例 7 中获得的 ID 为 z0 的人源化抗 4-1BB 单抗命名为 BH3145b（序列信息为：VH SEQ ID NO.12; VL SEQ ID NO.11）。检测人源化抗 4-1BB 单抗 BH3145b 的抗原结合活性，试验步骤同实施例 4。试验结果如图 6 所示，由图 6 可知，人源化抗 4-1BB 单抗

BH3145b 具有良好的人 4-1BB 结合亲和力，与抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83 和对照 Urelumab 的结合活性相当。

实施例 9 人源化抗人 4-1BB 单抗封闭 4-1BB 与受体结合的活性

将实施例 7 中所述人源化抗 4-1BB 单抗命名为 BH3145b。进行人源化抗 4-1BB 单抗封闭 4-1BB 与受体结合活性的检测，试验步骤同实施例 5，结果如图 7 所示，由图 7 可知，人源化抗 4-1BB 单抗 BH3145b 的 4-1BB/4-1BBL 封闭活性略差于抗人 4-1BB 嵌合单抗 mAb-33-83，但封闭活性优于对照 Urelumab。

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，但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。

权利要求书

1、一种分离的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO.7 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，以及如 SEQ ID NO.8 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR。

2、一种分离的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区和/或重链可变区，其中，

轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID No. 3 所示的 LCDR3；和/或

重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID No.4 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID No.5 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID No. 6 所示的 HCDR3。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体的重链恒定区序列选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD 之一的恒定区序列，和/或，所述抗体的轻链恒定区序列选自 κ 链或 λ 链；优选地，所述重链恒定区序列选自 IgG1 或者 IgG4 的恒定区序列，和/或所述轻链恒定区序列选自轻链 κ 链的恒定区序列。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的抗人 4-1BB 抗体或其功能片段，其中，所述轻链可变区具有如 SEQ ID NO.7 所示的氨基酸序列；和/或所述重链可变区具有如 SEQ ID NO.8 所示的氨基酸序列。

6、根据权利要求 1-4 任一所述的抗人 4-1BB 抗体或其功能片段，其中：

(a) 轻链可变区具有选自 SEQ ID NO.13-20 所示的氨基酸序列；和/或

重链可变区具有选自 SEQ ID NO.21-31 的氨基酸序列；

(b) 轻链可变区具有如 SEQ ID NO.11 所示的氨基酸序列；和/或

重链可变区具有选自 SEQ ID NO.21-31 的氨基酸序列；

(c) 轻链可变区具有选自 SEQ ID NO.13-20 所示的氨基酸序列；和/或

重链可变区具有如 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列。

7、根据权利要求 1-4 任一所述的抗人 4-1BB 抗体或其功能片段，其中：

轻链可变区具有如 SEQ ID NO.11 所示的氨基酸序列；和/或

重链可变区具有如 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列。

8、根据权利要求 1-7 任一所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗原结合片段选自 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fd、Fv、scFv、双特异抗体、骆驼抗体、CDR 和抗体最小识别单位 (dAb) 中的一种或多种，优选地，所述抗原结合片段为 Fab、F(ab')₂ 或 scFv。

9、一种分离的核酸分子，其选自：

(1) DNA 或 RNA，其编码权利要求 1-8 任一项所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段；

(2) 与(1)中定义的核酸完全互补的核酸。

10、一种表达载体，其包含有效连接的权利要求 9 所述的核酸分子的表达载体。

11、一种宿主细胞，其包含权利要求 9 所述的核酸分子或权利要求 10 所述的表达载体。

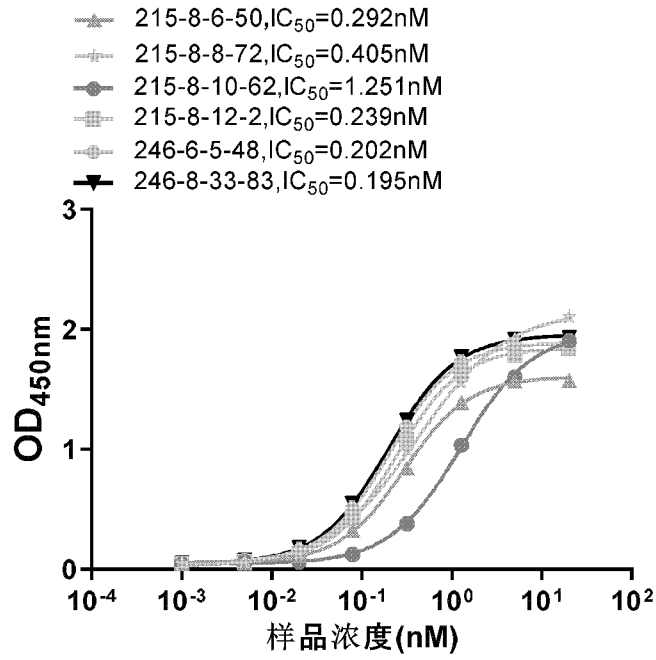
12、一种组合物，其包含权利要求 1-8 任一项所述的抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段、其变体或其衍生物，权利要求 9 所述的核酸分子，权利要求 10 所述的载体或权利要求 11 所述的宿主细胞，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13、一种生产权利要求 1-8 任一项所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段的方法，其包括步骤：

将权利要求 11 所述的宿主细胞在适合所述抗人 4-1BB 抗体、其抗原结合片段或其变体表达的培养条件下培养，任选地，分离、纯化所得的产物。

14、权利要求 1-8 任一项所述的抗人 4-1BB 抗体或其抗原结合片段，权利要求 9 所述的核酸分子，权利要求 10 所述的载体或权利要求 11 所述的宿主细胞在制备用于预防和/或治疗 4-1BB 介导的疾病或病症的药物中的用途，其中所述的疾病或病症优选为肿瘤；更优选地，所述肿瘤选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤的一种或多种。

A



B

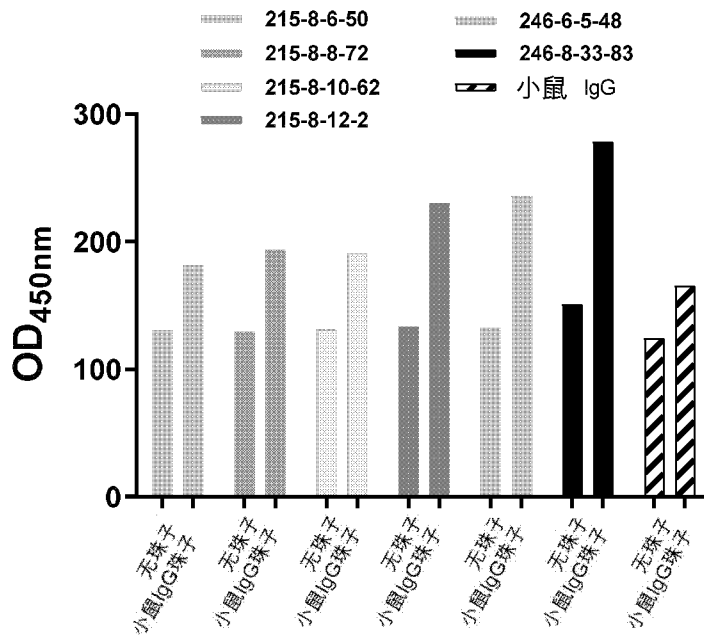


图 1

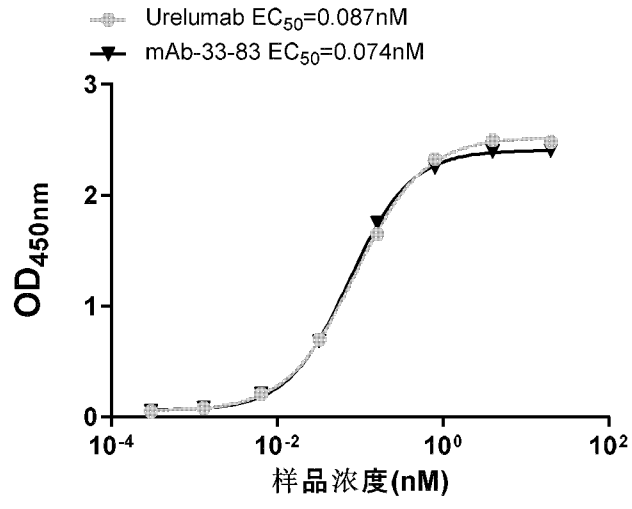


图 2

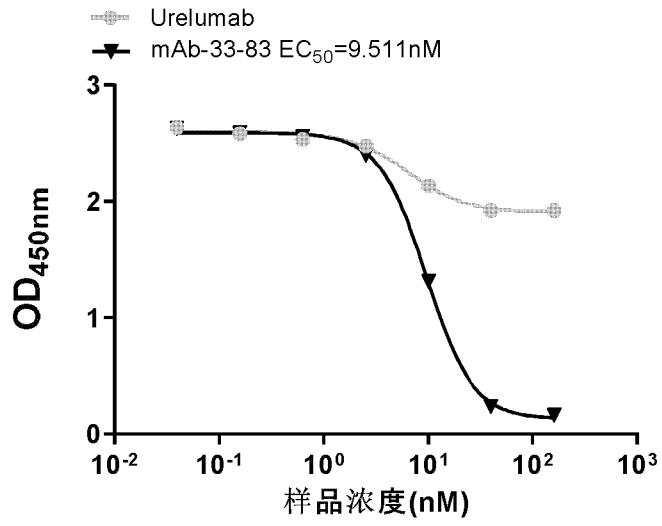


图 4

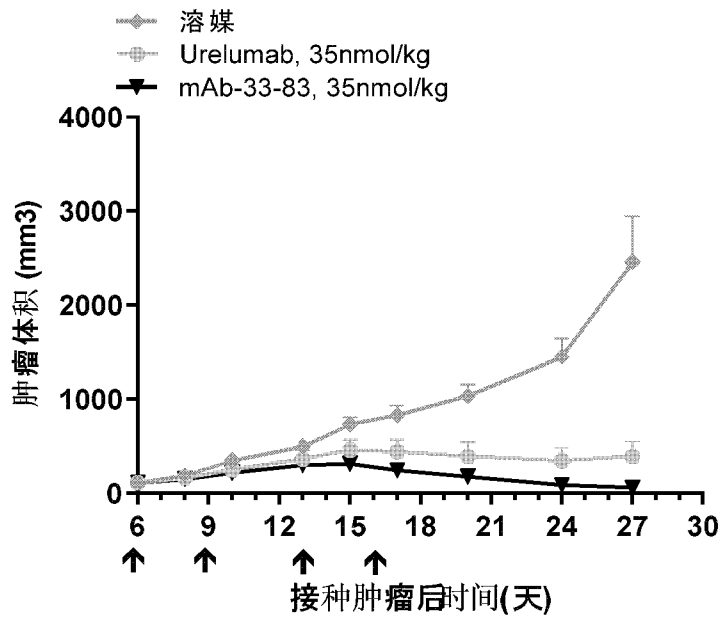


图 5

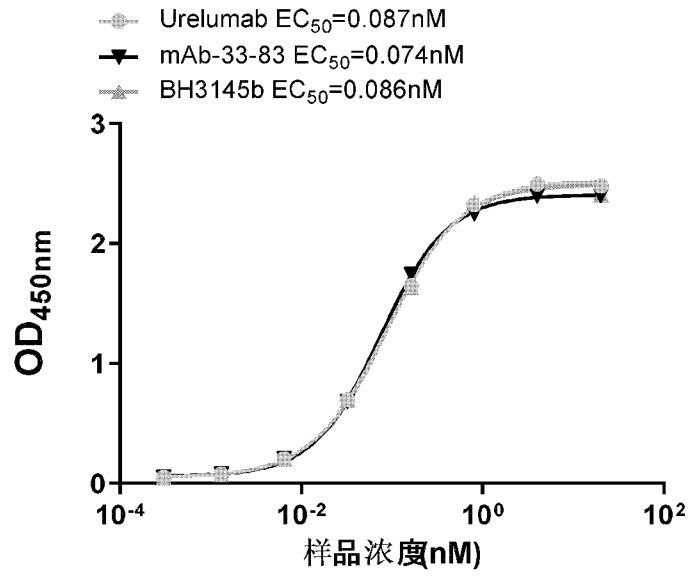


图 6

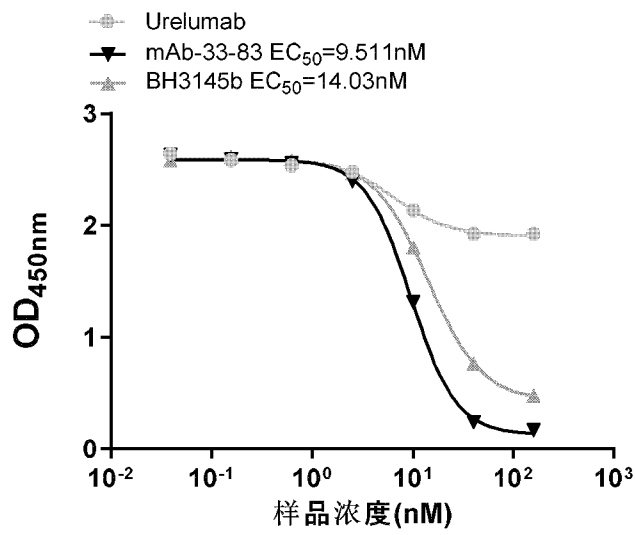


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61P; A61K; C12N		
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) CNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, STN, 读秀: SEQ ID Nos: 1-33, 4-1BB, CD137, 抗体, 单抗, 肿瘤, 癌症, CDR, 可变区, VH, VL, antibod+, cancer, tumor, carcinoma.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110357961 A (WUXI ZHIKANG HONGYI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 22 October 2019 (2019-10-22) claims 1-33	1-14
A	CN 111065652 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) 24 April 2020 (2020-04-24) entire document	1-14
A	US 2019352411 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 21 November 2019 (2019-11-21) entire document	1-14
A	周桓 等 (ZHOU, Huan et al.). "鼠抗人4-1BB单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定 (Preparation of Anti-Human 4-1BB Monoclonal Antibody and Characterization of Its Biological Activities)" <i>细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)</i> , Vol. 27, No. 9, 31 December 2011 (2011-12-31), pp. 993-996	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 March 2022		Date of mailing of the international search report 07 April 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/070627

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	田晓静 等 (TIAN, Xiaojing et al.). "抗人4-1BB功能性单克隆抗体的研制及生物学特性研究 (Preparation of Anti-human 4-1BB Monoclonal Antibody and Analysis of Its Biological Functions)" <i>现代免疫学 (Current Immunology)</i> , Vol. 27, No. 3, 31 December 2007 (2007-12-31), pp. 202-206	1-14
A	LEE, U. H. et al. "Molecular cloning of agonistic and antagonistic monoclonal antibodies against human 4-1BB." <i>European Journal of Immunogenetics</i> , Vol. 29, 31 December 2002 (2002-12-31), pp. 449-452	1-14

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/070627

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110357961	A	22 October 2019	None			
CN	111065652	A	24 April 2020	US	2021363266	A1	25 November 2021
				JP	2021510533	A	30 April 2021
				CA	3089260	A1	25 July 2019
				WO	2019141268	A1	25 July 2019
				KR	20200113228	A	06 October 2020
				EP	3744734	A1	02 December 2020
				TW	201932491	A	16 August 2019
				AU	2019208793	A1	03 September 2020
				BR	112020014848	A2	08 December 2020
US	2019352411	A1	21 November 2019	CN	109963873	A	02 July 2019
				CA	3044339	A1	24 May 2018
				KR	20190086691	A	23 July 2019
				EP	3541844	A2	25 September 2019
				IL	266738	D0	31 July 2019
				US	2019352414	A1	21 November 2019
				US	10689454	B2	23 June 2020
				AU	2017360094	A1	20 June 2019
				WO	2018091740	A2	24 May 2018
				WO	2018091740	A3	28 June 2018
				GB	201619648	D0	04 January 2017
				MX	2019005911	A	08 July 2019
				JP	2020501531	A	23 January 2020
				BR	112019010265	A2	17 September 2019
				RU	2019116624	A	21 December 2020
				RU	2019116624	A3	29 January 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/070627

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(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. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61P; A61K; C12N</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>CNXTX, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, STN, 读秀:SEQ ID Nos: 1-33, 4-1BB, CD137, 抗体, 单抗, 肿瘤, 癌症, CDR, 可变区, VH, VL, antibod+, cancer, tumor, carcinoma.</p>																							
<p>C. 相关文件</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 110357961 A (无锡智康弘义生物科技有限公司) 2019年10月22日 (2019 - 10 - 22) 权利要求1-33</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111065652 A (江苏恒瑞医药股份有限公司) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019352411 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>周桓等. "鼠抗人4-1BB单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定" 细胞与分子免疫学杂志, 第27卷, 第9期, 2011年12月31日 (2011 - 12 - 31), 第993-996页</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>田晓静, 等. "抗人4-1BB功能性单克隆抗体的研制及生物学特性研究" 现代免疫学, 第27卷, 第3期, 2007年12月31日 (2007 - 12 - 31), 第202-206页</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LEE, U. H. 等. "Molecular cloning of agonistic and antagonistic monoclonal antibodies against human 4-1BB." European Journal of Immunogenetics, 第29卷, 2002年12月31日 (2002 - 12 - 31), 第449 - 452页</td> <td>1-14</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 110357961 A (无锡智康弘义生物科技有限公司) 2019年10月22日 (2019 - 10 - 22) 权利要求1-33	1-14	A	CN 111065652 A (江苏恒瑞医药股份有限公司) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 全文	1-14	A	US 2019352411 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 全文	1-14	A	周桓等. "鼠抗人4-1BB单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定" 细胞与分子免疫学杂志, 第27卷, 第9期, 2011年12月31日 (2011 - 12 - 31), 第993-996页	1-14	A	田晓静, 等. "抗人4-1BB功能性单克隆抗体的研制及生物学特性研究" 现代免疫学, 第27卷, 第3期, 2007年12月31日 (2007 - 12 - 31), 第202-206页	1-14	A	LEE, U. H. 等. "Molecular cloning of agonistic and antagonistic monoclonal antibodies against human 4-1BB." European Journal of Immunogenetics, 第29卷, 2002年12月31日 (2002 - 12 - 31), 第449 - 452页	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 110357961 A (无锡智康弘义生物科技有限公司) 2019年10月22日 (2019 - 10 - 22) 权利要求1-33	1-14																					
A	CN 111065652 A (江苏恒瑞医药股份有限公司) 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24) 全文	1-14																					
A	US 2019352411 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 全文	1-14																					
A	周桓等. "鼠抗人4-1BB单克隆抗体的研制及其生物学特性的鉴定" 细胞与分子免疫学杂志, 第27卷, 第9期, 2011年12月31日 (2011 - 12 - 31), 第993-996页	1-14																					
A	田晓静, 等. "抗人4-1BB功能性单克隆抗体的研制及生物学特性研究" 现代免疫学, 第27卷, 第3期, 2007年12月31日 (2007 - 12 - 31), 第202-206页	1-14																					
A	LEE, U. H. 等. "Molecular cloning of agonistic and antagonistic monoclonal antibodies against human 4-1BB." European Journal of Immunogenetics, 第29卷, 2002年12月31日 (2002 - 12 - 31), 第449 - 452页	1-14																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <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>"&" 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年3月22日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年4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>沈晶晶</p> <p>电话号码 86-(10)-53961944</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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/070627

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	110357961	A	2019年10月22日	无	
CN	111065652	A	2020年4月24日	US	2021363266 A1 2021年11月25日
				JP	2021510533 A 2021年4月30日
				CA	3089260 A1 2019年7月25日
				WO	2019141268 A1 2019年7月25日
				KR	20200113228 A 2020年10月6日
				EP	3744734 A1 2020年12月2日
				TW	201932491 A 2019年8月16日
				AU	2019208793 A1 2020年9月3日
				BR	112020014848 A2 2020年12月8日
US	2019352411	A1	2019年11月21日	CN	109963873 A 2019年7月2日
				CA	3044339 A1 2018年5月24日
				KR	20190086691 A 2019年7月23日
				EP	3541844 A2 2019年9月25日
				IL	266738 D0 2019年7月31日
				US	2019352414 A1 2019年11月21日
				US	10689454 B2 2020年6月23日
				AU	2017360094 A1 2019年6月20日
				WO	2018091740 A2 2018年5月24日
				WO	2018091740 A3 2018年6月28日
				GB	201619648 D0 2017年1月4日
				MX	2019005911 A 2019年7月8日
				JP	2020501531 A 2020年1月23日
				BR	112019010265 A2 2019年9月17日
				RU	2019116624 A 2020年12月21日
				RU	2019116624 A3 2021年1月29日