



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0031479
(43) 공개일자 2021년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7003610
(22) 출원일자(국제) 2019년07월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년02월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/068796
(87) 국제공개번호 WO 2020/011966
국제공개일자 2020년01월16일
(30) 우선권주장
1811407.4 2018년07월12일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
에프-스타 베타 리미티드
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3에이티, 바브
라함 리서치 캠퍼스, 애드바 비920
(72) 발명자
투나 미리반
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3에이티, 애드바
비920 바브라함 리서치 캠퍼스, 씨/오 에프-스타
바이오테크놀로지 리미티드
가스파 미구엘
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3에이티, 애드바
비920 바브라함 리서치 캠퍼스, 씨/오 에프-스타
바이오테크놀로지 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자

(57) 요약

본 출원은 CD137 및 OX40 둘 다에 결합하고 이들 둘 다를 효능화할 수 있는 항체 분자에 관한 것이다. 항체 분자는 CD137에 대한 CDR-기반 결합 부위 및 항체 분자의 불변 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함한다. 본 발명의 항체 분자는, 예를 들면, 암 및 감염병과 같은 질환의 치료에 적용된다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/32 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

모로우 미셸

영국, 캠브리지 캠브리셔 씨비22 3에이티, 애드바
비920 바브라함 리서치 캠퍼스, 씨/오 에프-스타
바이오테크놀로지 리미티드

푼 에드문드

영국, 캠브리지 캠브리셔 씨비22 3에이티, 애드바
비920 바브라함 리서치 캠퍼스, 씨/오 에프-스타
바이오테크놀로지 리미티드

(30) 우선권주장

1818281.6 2018년11월09일 영국(GB)
1902598.0 2019년02월26일 영국(GB)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) CD137에 대한 상보성 결정 영역 (complementarity determining region; CDR)-기반 항원-결합 부위 (antigen-binding site); 및

(b) 항체 분자의 CH3 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하고;

여기서 CDR-기반 항원-결합 부위가

(i) 각각 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 [FS30-10-16];

(ii) 각각 서열 번호 1, 2, 16, 4, 5 및 6 [FS30-10-3];

(iii) 각각 서열 번호 1, 2, 21, 4, 5 및 6 [FS30-10-12];

(iv) 각각 서열 번호 25, 26, 27, 4, 5 및 28 [FS30-35-14]; 또는

(v) 각각 서열 번호 33, 34, 35, 4, 5 및 36 [FS30-5-37]에 제시된 CDR 1-6을 포함하고;

여기서 OX40 항원-결합 부위가 CH3 도메인의 AB, CD 및 EF 구조적 루프(structural loop)에 각각 위치한 제1 서열, 제2 서열 및 제3 서열을 포함하고, 여기서 제1, 제2 및 제3 서열이 각각 서열 번호 51, 52 및 53 [FS20-22-49]에 제시된 서열을 갖는, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

(i) 제1 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 14 내지 18에 위치하고;

(ii) 제2 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 45.1 내지 77에 위치하고/하거나;

(iii) 제3 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 93 내지 101에 위치하고;

여기서 아미노산 잔기 번호매김(amino acid residue numbering)이 IMGT 번호매김 체계(numbering scheme)에 따르는 항체 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체 분자가 서열 번호 54 [FS20-22-49]에 제시된 CH3 도메인 서열을 포함하는 항체 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가

(i) 각각 서열 번호 12 및 14 [FS30-10-16];

(ii) 각각 서열 번호 18 및 14 [FS30-10-3];

(iii) 각각 서열 번호 23 및 14 [FS30-10-12];

(iv) 각각 서열 번호 170 및 172 [FS30-35-14]; 또는

(v) 각각 서열 번호 40 및 42 [FS30-5-37]에 제시된 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 항체 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가 항체의 중쇄 및 경쇄:

(i) 각각 서열 번호 95 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-16;

(ii) 각각 번호 99 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-3;

- (iii) 각각 서열 번호 103 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-12;
- (iv) 각각 서열 번호 105 및 107에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-35-14; 또는
- (v) 각각 번호 109 및 111에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-5-37을 포함하는 항체 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가

- (i) 각각 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 [FS30-10-16]에 제시된 CDR 1-6;
- (ii) 각각 서열 번호 12 및 14 [FS30-10-16]에 제시된 VH 도메인 및 VL 도메인; 및/또는
- (iii) 각각 서열 번호 95 및 97 [FS20-22-49AA/FS30-10-16]에 제시된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 결합하는 항체 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 항체 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 동시에 결합할 수 있는 항체 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가 세포-표면 발현된 CD137의 존재하에서 면역 세포 상의 OX40을 활성화시킬 수 있고/있거나 항체 분자가 세포-표면 발현된 OX40의 존재하에서 면역 세포 상의 CD137을 활성화시킬 수 있는 항체 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 면역 세포 상의 OX40에 및 CD137에 대한 항체 분자의 결합이 면역 세포 상의 OX40의 클러스터링(clustering)을 유발하고/하거나 면역 세포 상의 CD137에 및 OX40에 대한 항체 분자의 결합이 면역 세포 상의 CD137의 클러스터링을 유발하는 항체 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 항체 분자가 하나 이상의 Fc γ 수용체에 대한 항체 분자의 CH2 도메인의 결합을 감소시키거나 폐지(abrogating)하도록 변형되는 항체 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 항체 분자를 암호화하는 핵산 분자 또는 분자들.

청구항 13

제12항에 따르는 핵산 분자 또는 분자들을 포함하는 벡터(vector) 또는 벡터들.

청구항 14

제12항에 따르는 핵산 분자(들) 또는 제13항에 따르는 벡터(들)를 포함하는 재조합 숙주 세포(recombinant host cell).

청구항 15

제14항의 재조합 숙주 세포를 항체 분자의 생산을 위한 조건하에서 배양함을 포함하여, 제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 항체 분자를 생산하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 항체 분자를 단리(isolate) 및/또는 정제함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 항체 분자 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 있어서, 개체(individual)에서 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항체 분자.

청구항 19

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따르는 치료적 유효량의 항체 분자를 개체에게 투여함을 포함하여, 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법.

청구항 20

항체 분자를 제2 치료제와 조합하여 개체에게 투여함을 포함하는, 제18항에 따라 암을 치료하는 방법 또는 제19항에 따라 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항체 분자.

청구항 21

제20항에 있어서, 제2 치료제가 PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 항체인 항체 분자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD137 및 OX40 둘 다에 결합하고 이들 둘 다를 효능화할 수 있는 항체 분자에 관한 것이다. 항체 분자는 CD137에 대한 CDR-기반 결합 부위, 및 항체 분자의 불변 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위(antigen-binding site)를 포함한다. 본 발명의 항체 분자는, 예를 들면, 암 및 감염성 질환과 같은 질환의 치료에 적용된다.

배경 기술

[0002] 포유류 면역계는 암과 같은 질환에 의해 때때로 방해받는 정교하게 균형잡힌 시스템이다. 체크포인트 수용체는 공동-자극 또는 공동-억제 효과를 발휘함으로써 질환에 대한 면역계의 반응에 중요한 역할을 하며, 이의 균형이 면역 반응의 운명을 결정한다 (Pardoll, 2012). 공동-억제체는 T 세포 증식을 억제하고 항염증성 사이토카인의 방출을 유도한다. 이들은 염증을 완화하고 과도한 면역 반응으로부터의 장기/조직 손상을 방지한다. 다른 한편으로, 공동-자극체는 보호 면역 반응의 발달을 촉진하기 위해 T 세포 클론 확장, 효과기 분화 및 생존을 촉진한다.

[0003] 한 가지 입증된 암 면역요법 접근법은 공동-억제 수용체의 기능을 차단하거나 공동-자극 수용체의 활성을 유도하는 항체로 이러한 체크포인트 수용체를 표적화함으로써 면역계가 종양 세포를 인식하고 죽이도록 촉발한다 (Pardoll, 2012). 공동-억제 수용체의 활성을 차단하는 항체는 양호한 임상 활성을 나타냈으며 현재 암 치료용으로 승인되었다 (Larkin et al., 2015).

[0004] 공동-자극 수용체의 활성을 유도하는 항체는 전임상 모델 시스템에서 큰 잠재능을 입증하였으며 (Moran et al., 2013; Schaer et al., 2014) 몇몇 제제가 현재 임상 시험중이다 (Mayes et al., 2018; Melero et al., 2013). 이들 항체는 이러한 공동-자극 수용체의 리간드를 모방하는 것을 목표로 하기 때문에 효능제 항체 (agonist antibody)라고도 한다.

[0005] 몇몇 T 세포 공동-자극 수용체는 세포 표면에서 발현되는 면역 및 비-면역 세포 기능 둘 다에 관여하는 단백질의 거대 패밀리에 속한다. TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이다 (Bremer, 2013). TNF 패밀리의 수용체와 이들의 동족 리간드 사이에 형성된 복합체의 구조 분석은 대부분의 경우에 삼량체 대 삼량체 화학량론이 있고 TNFR 패밀리의 리간드가 전형적으로 세포 표면에서 삼량체로서 발현됨을 나타낸다 (Wajant, 2015). TNFR 활성화를 위해 제안된 모델은 삼량체 리간드와의 상호작용이 단량체 수용체의 삼량체화를 유도하고 신호 전달을 개시한다는 것이다. 이것은 TNFR 패밀리의 구성원이 단량체로서 발현되고 리간드 상호작용 만이 수용체 삼량체의 형성을 유도한다고

예상한다. 이 모델은 최근에 의문이 제기되었으며 (Vanamee & Faustman, 2018) 리간드 상호작용의 부재하에서 이들 단량체를 고차 구조로 결합하는 것은 여전히 논쟁의 여지가 있다. 다중 수용체 복합체의 추가 클러스터링 (clustering)을 필요로 하는 사전-조립된 수용체 이량체 또는 심지어 비활성 삼량체의 존재는 리간드 슈퍼클러스터를 형성하고 TNF 수용체 슈퍼클러스터를 유도하여 보다 높은 수준의 수용체 활성화를 유도할 수 있는 이들의 막 결합된 형태와 비교하여 일부 가용성인 삼량체-단독 TNF 리간드의 낮은 활성을 설명한다 (Muller et al., 2008). 이 이론은 또한 TNFR-특이 항체가 전형적으로 효능제 활성이 없거나 낮으며 충분한 수용체 클러스터링 및 활성화를 유도하기 위해 항체-TNF 수용체 복합체의 이차 가교결합을 필요로 하여 TNF 리간드 슈퍼클러스터를 모방한다는 관찰과 일치한다 (Wajant, 2015).

[0006]

항체-TNF 수용체 복합체의 이차 가교결합은 단백질 A 또는 G 또는 TNF 수용체-특이 효능제 항체의 불변 도메인을 표적으로 하는 이차 항체와 같은 가교결합체에 의해 시험관내에서 달성될 수 있다 (Vanamee & Faustman, 2018; Wajant, 2015). 그러나, 생체내에서, 이러한 이차 가교결합은 대식세포, NK 세포 또는 B 세포와 같은 면역 세포의 표면에 존재하는 Fc 감마 수용체와의 상호작용을 필요로 한다. 항체와 Fc 감마 수용체의 상호작용은 4개의 인간 IgG 이소타입에 대해 상이한 발현 패턴과 친화성을 가진 6개의 Fc 감마 수용체가 인간에게 있기 때문에 복잡하다 (Bruhns et al., 2009). Fc 감마 수용체는 생체내에서 TNF 수용체 슈퍼패밀리 표적을 표적으로 하는 효능제 항체의 최적 항종양 활성에 필요한 것으로 나타났다 (Bulliard et al., 2013; Bulliard et al., 2014). 그러나, 수용체의 강력한 활성화를 유도하기 위한 Fc 감마 수용체 매개된 가교결합에 대한 TNFR 효능제 항체의 의존성은 몇 가지 이유로 인해 생체내에서 이들의 전체 활성을 제한할 가능성이 있다: 1) 항체 결합된 세포는 트랜스 Fc 감마 수용체 발현 세포와 상호작용해야하며 이러한 상호작용의 빈도가 TNFR-발현 세포의 활성화를 제한할 것이고; 2) 인간 IgG에 대한 Fc 감마 수용체의 친화성은 전형적으로 이의 표적에 대한 전형적인 치료 항체의 친화성에 비해 훨씬 낮고 (각각 마이크로몰 범위 대 나노몰 범위); 3) Fc 감마 수용체는 ADCC (항체-의존성 세포-매개된 세포독성) 및 ADCP (항체-의존성 세포 식균작용)와 같은 항체의 효과기 기능을 매개하며 이에 따라 효능제 항체가 활성화하려는 하는 바로 그 세포를 제거할 가능성이 있다 (Mayes et al., 2018).

[0007]

TNF 수용체 효능제와 가교결합하기 위해 동족 항원 중 하나를 사용하는 2가 이중특이 항체는 Fc 감마 수용체 매개된 가교결합에 대한 대안을 나타낸다. 항체 가교결합 효과는 동일한 세포에서, 시스로 또는 다른 세포에서, 트랜스 TNF 수용체 패밀리 구성원 및 다른 세포 표면 발현된 수용체와의 결합으로부터 야기될 것이다. 이러한 항체 가교결합 메커니즘은 제2 표적이 높은 수준으로 발현되는 한 TNF 수용체의 슈퍼클러스터링을 초래하여 TNF 리간드 슈퍼클러스터를 모방할 것이다. TNFR 효능제 항체 개발에 대한 이중특이 항체 접근법은 단일특이 효능제 항체에 대한 몇 가지 이론적 이점을 갖는다: 1) TNFR 효능작용은 이중특이 항체의 제2 특이성으로서 체크포인트 수용체 또는 종양 관련 항원과 같은 제2 항원을 표적으로 함으로써 종양 미세환경 및 말초의 특정 면역 세포에 지시될 수 있고; 2) 이중특이 항체의 가교결합 결합 도메인의 친화성은 Fc 감마 수용체에 대한 항체의 친화성보다 높게 설계될 수 있으며, 이에 따라 가교결합이 보다 효과적이게 만들고; 3) 항체 효과기 기능은 돌연변이를 사용하여 선택적으로 불능으로 될 수 있어, 활성화하려는 세포가 고갈되는 일이 없도록 보장하고; 4) 두 개의 개별 TNF 수용체의 효능작용은 단일 이중 효능제 분자에서 달성될 수 있어, 상이한 면역 세포의 활성화를 면역 반응의 더 강력한 자극으로 결합하고; 5) 공동-발현된 수용체를 표적화하면 두 세포가 함께 상호작용할 필요없이 시스로 단일 세포의 활성화를 야기할 수 있다.

[0008]

TNF 수용체 패밀리 구성원 중 몇 가지는 면역 세포에서 중복 발현 패턴을 갖는다. 구용적으로 OX40, CD137, GITR 및 CD27은 활성화된 T 세포에서 발현되며, OX40 및 CD137의 공동-발현은 실험적으로 검증되었다 (Ma et al., 2005).

[0009]

OX40은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 1형 및 2형 T 헬퍼 (Th1 및 Th2) 세포 및 조절 T (Treg) 세포를 포함한 활성화된 T 세포에서 주로 발현되며, 활성화된 자연 살해 (NK) 세포에서도 발현된다. 항원 제시 세포 (APC)에서 발현되는 OX40과 이의 리간드인 OX40 리간드 (OX40L)의 상호작용은 T 세포 클론 확장, 분화 및 생존을 증가시키고, 기억 T 세포의 생성을 향상시킨다 (Croft et al., 2009). OX40 자극은 T 세포 상에서 이들의 증식과 생존을 촉진하는 직접적인 효과를 갖거나 IL2 및 IFN γ 와 같은 염증성 사이토카인의 향상된 생산을 통해 간접적인 효과를 가질 수 있다. OX40 신호전달은 또한 Tregs의 기능을 조절할 수 있지만, 이들 세포에서 이들의 억제 활동을 폐지(abrogating)한다 (Takeda et al., 2004). 암에서 OX40은 두경부암, 흑색종 및 결장직장암을 가진 환자로부터의 종양 침윤 T 세포에서 발현되는 것으로 밝혀졌으며, 여기서 높은 수준의 OX40 양성 림프구는 더 나은 생존율과 상관성이 있다 (Petty et al., 2002; Vetto et al., 1997). 마우스에서 OX40 효능제 항체의 전임상 연구는 여러 동계 종양 모델에서 치료 효능을 입증했지만 단일요법으로서 OX40을 표적화하는 효과는 가변적이며 종양의 면역원성과 상관성이 있는 것으로 보인다 (Kjaergaard et al., 2000). 이것은 종양-특이 T 세포

상의 OX40 발현이 면역원성이 좋지 않은 종양에 의해 제공될 것 같지 않은 충분한 프라이밍을 필요로 한다는 견해와 일치한다. 특정 동계 모델에서 OX40 항체 OX86의 항종양 활성은 Fc 감마 수용체 의존적 방식으로 높은 수준의 OX40을 발현하는 종양내 Treg를 고갈시키는 능력으로부터 야기되는 것으로 밝혀졌다 (Bulliard et al., 2014).

[0010] OX40에 대한 효능제 항체는 현재 암에 대해 임상 시험중이며 대부분은 우수한 안전성 프로파일을 보이지만 임상 활성은 제한적이다 (Curti et al., 2013). 이들 항체에 대해 선택된 이소타입은 다양하지만 몇 가지 연구 약물은 Fc 감마 수용체 가능 인간 IgG1 항체이며, 이것은 가능하게는 작동 메커니즘으로서 Tregs를 고갈시키는 것을 목표로 한다. 이들 항체의 명확한 임상 활성의 부족은 OX40 효능제 항체와 PD1/PD-L1 또는 CTLA4 억제, 항-VEGF 요법 및 티로신 키나제 억제제 악시티닙 (axitinib)을 포함한 여러 다른 요법과의 조합 시도를 촉발하였다.

[0011] 이러한 Treg 고갈 메커니즘은 전임상 모델에서 매우 효과적인 것으로 입증되었으며 G1TR (Bulliard et al., 2014) 및 CTLA4 (Simpson et al., 2013)와 같은 Treg를 제거하기 위해 몇 가지 수용체를 표적화할 수 있다. 그러나, 인간에서 등가 수용체를 표적화하는 항체가 클리닉에서 동일한 수준의 항종양 효능을 갖지 않는 것으로 나타났다 (Glisson et al., 2016; Tran et al., 2017). 이에 대한 이유는 명확하지 않지만 마우스 동계 종양 모델 (Milas et al., 1987)과 비교하여 인간 종양에서 대식세포와 같은 Fc 감마 수용체 발현 세포의 보다 낮은 수준이 이 항체의 작용 메커니즘의 임상적 번역 가능성의 부족에 대한 설명의 일부일 수 있다. 다른 이유는 마우스 Tregs와 비교하여 인간 Tregs에서의 이러한 마커의 상이한 발현 수준일 수 있다 (Aspeslagh et al., 2016).

[0012] CD137은 또한 CD4+, CD8+, Th1, Th2 및 Tregs를 포함한 활성화된 T 세포에서 발현되지만, 이의 발현 프로파일은 또한 B 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T (NKT) 세포 및 수지상 세포 (DC)를 포함한다 (Bartkowiak & Curran, 2015). OX40의 경우와 같이, CD137과 이의 리간드의 상호작용은 T 세포 생존, 증식 및 세포독성 활성의 유도를 초래하는 세포내 신호전달 경로의 활성화를 유발한다. CD137 자극은 CD4+ T 세포와 비교할 때 CD8+ T 세포를 우선적으로 자극하고 염증성 사이토카인의 생산을 통해 이들의 증식, 생존 및 세포독성 효과기 기능을 야기하며 또한 기억 CD8+ T 세포의 분화 및 유지에 기여한다. CD137은 또한 종양-침윤 림프구 (TIL)의 종양-반응성 하위집합에서 특이적으로 발현되는 것으로 입증되었으며 (Weigel et al., 2016), 이것은 생체내 이의 효능적 관여 (agonistic engagement)와 임상 전달을 위한 TIL 선택에서의 이의 사용에 대한 근거의 일부를 제공한다. CD137 단일요법은 MC38, CT26 및 B 세포 림프종과 같은 몇 가지 전임상 면역원성 종양 모델에서 효과적이다. 그러나, 확립된 종양의 더욱 효과적인 치료를 위해, 화학요법, 사이토카인 및 기타 체크포인트 조절제와 같은 다른 제제와 조합된 CD137 관여가 종양 성장 감소에 있어 향상된 유익한 효과를 나타내었다 (Bartkowiak & Curran, 2015). 효능제 항체로 전임상 모델에서 CD137을 표적화하는 것은 골수성 세포에 의한 IL27 생산에 의존하는 증가된 CD8+ T 세포 축적으로부터 야기된 간 염증 및 트랜스아미나제 증가증 (transaminitis)과도 관련된다 (Bartkowiak et al., 2018).

[0013] CD137에 대한 효능제 항체는 현재 암에 대한 임상 시험중이지만, 마우스에서 이루어진 관찰과 비슷할 것 같은 용량-제한적 고-등급 간 염증에 의해 임상 진행이 느려졌다 (Sanchez-Paulete et al., 2016). 우렐루맵 (Urelumab) (BMS-663513)은 임상 시험에 들어간 최초의 CD137 효능제 항체였으며 1 mg/kg 이상의 용량에서 치명적인 간독성으로 인해 시험이 중단되기 전에 임상 활성 징후를 보였다 (Segal et al., 2017). 이것은 가교결합 없이 CD137을 활성화할 수 있는 인간 IgG4 항체이지만 (미국 제8,137,667 B2호), 슈퍼클러스터링-매개된 완전 수용체 활성화의 이론에 따라 예상되는 바와 같이 가교결합시 활성이 증가된다. 이와 달리, 10 mg/kg까지 시험했을 때 우토밀루맵 (utomilumab)(PF-05082566)에서는 용량-제한 독성이 관찰되지 않았다 (Tolcher et al., 2017). 이것은 인간 IgG2 항체이며, 가교결합시에만 CD137을 활성화할 수 있다 (미국 제8,337,850 B2호). 단일요법 및 방사선요법과 화학요법의 병용 둘 다 뿐만 아니라 기존 표적 요법 및 면역-종양 요법을 시험하는 추가 임상 시험이 두 항체 모두에 대해 진행중이다. 우렐루맵 (urelumab)에서 보여지는 간독성으로 인해, 이 항체는 매우 낮은 수준으로 투여되어야 했으며 임상 활성의 초기 징후는 아직 이 수준에서 관찰되지 않았다.

[0014] CD137 또는 OX40을 표적화하는 몇 가지 이중특이 분자가 여러 회사에 의해 개발 초기 단계에 있다. CD137 자극의 종양 표적화는 HER2- 및 EphA2-표적화 CD137 효능제 DART 분자를 사용하여 MacroGenics에 의해, FAPalpha-또는 CD20-표적화 CD137 리간드 융합 단백질질을 사용하여 Roche에 의해 및 HER2-표적화 CD137 효능제 안티칼린 분자를 사용하여 Pieris Pharmaceuticals에 의해 시험중이다. OX40 및 CTLA4 이중 표적화는 두 표적 모두의 높은 수준을 발현할 것으로 예상되는 종양내 Treg를 특이적으로 고갈시키기 위해 Aligator Biosciences에 의해

시험중이다.

[0015] 생체내 OX40 및 CD137의 공동-자극은 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다를 자극하고 항원-경험된 및 항원-경험되지 않은 방관자 CD4+ T 세포 둘 다의 세포독성 기능을 유도하는 것으로 나타났다 (Qui et al., 2011). 흥미롭게도, 이중 공동-자극은 이식된 CD4+ T 세포가 흑색종 동계 종양 모델 (B16-F10)을 접종한 면역 결핍 마우스에서 종양 성장을 감소시키도록 유도할 수 있었으며, 이것은 CD4+ T 세포의 종양제거 활성을 유도하는 이 치료법의 능력을 강조하였다 (Qui et al., 2011). OX40 효능제 (PF-04518600)와 CD137 효능제 (우토밀루맵 - PF-05082566)의 조합 효과를 연구하는 I상 용량 증량 임상 시험이 이 조합의 안전성을 평가하기 위해 현재 진행중이며 (NCT02315066), 동일한 TNFR 효능제와 아벨루맵 (avelumab)을 통한 PD-1 차단을 조합한 Ib/II상 임상 시험도 현재 진행중이다 (NCT02554812). 이들 연구는 이들의 효능작용을 위해 Fc 감마 수용체 가교결합을 필요로 하는 단순 단일특이 효능제 항체의 조합을 살펴볼 것이며, 따라서 이들 수용체를 조합하여 표적화하는 임상 활성을 과소평가할 수 있다.

[0016] OX40 및 CD137의 이중 공동-자극은 최근에 OX40 및 CD137에 대한 두 개의 기존 항체를 화학적으로 접합함으로써 이중특이 항체 접근법을 사용하여 마우스에서 시험되었다 (Ryan et al., 2018). OrthomAb이라고 불리는 분자는 시험관내에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증식 뿐만 아니라 염증성 사이토카인 IL-2 및 IFN γ 의 생산을 유도할 수 있었다. 생체내에서, OrthomAb는 또한 흑색종 동계 종양 모델 (B16-F10)의 종양 성장을 감소시킬 수 있었다. OrthomAb의 2가 이중특이 성질은 두 표적 모두에 관여될 때 분자의 효율적인 가교결합을 허용하여 OX40 및 CD137 수용체의 클러스터링 및 결과적으로 T 세포 활성화를 야기할 것으로 예측된다. 이러한 결과는 단일 분자에서 OX40 및 CD137을 표적화하는 이중특이 항체 접근법을 검증한다. OrthomAb 분자의 제조 공정은 수 차례의 크기 배제 단계에 의해 추가로 정제되어야 하는 원하는 항체 이량체 뿐만 아니라 다중 고차 화학종을 생성한다. 이 제조 공정은 표적의 특정 조합을 검증하기 위한 연구 도구 이외의 다른 어떤 것에도 이 접근법이 실행되게 하지 못할 것 같다. 게다가, 두 개의 큰 거대분자가 작은 화학적 링커에 의해 결합되어 있는 이러한 이중특이 항체의 구조는 생체내에서 불안정기 쉬우며 이를 해결하기 위한 약동학적 데이터는 나타나 있지 않았다. 불행하게도, OrthomAb의 생체내 항종양 효과는 단지 OX40 또는 CD137 효능제 항체 중의 어느 하나의 활성과 비교되었을 뿐이고 이들의 조합과 비교되지는 않았으므로, 이는 분자가 이의 이중특이성으로 인해 효과를 갖는지 또는 OX40 및 CD137에 대한 단일-체제 효능제 항체의 조합으로서 행동하는 OrthomAb로 인해 효과를 갖는지 불분명하게 만든다.

[0017] 따라서 단일 2가, 이중특이성 안정한 분자에 TNF 수용체 패밀리 구성원 OX40 및 CD137의 효능작용을 조합하기 위한 근거가 확립되고 OX40 및 CD137의 Fc 감마 수용체-비의존성 수퍼클러스터링을 수행하여 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다를 활성화시켜 효과적인 항종양 면역 반응을 일으킬 수 있는 가능성을 갖는다. OX40 또는 CD137 경로를 표적으로 하는 단일론 항체로 생성된 전임상 조합 데이터를 기반으로, 이 분자는 또한 환자에게 혜택을 제공하기 위해 치료 기준 암 요법의 효과를 향상시킬 수 있는 조합 파트너로서의 가능성을 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명자들은 CD137 및 OX40 둘 다에 결합하고 두 표적 모두에 결합될 때 OX40 및/또는 CD137의 클러스터링 및 신호전달을 유도할 수 있는 항체 분자가 예를 들면 종양 미세환경에서 면역 세포를 활성화시키는데 매우 효과적이라는 것을 인식하였다. 또한, 본 발명자들은 CD137의 활성화를 CD137 및 OX40이 공동-발현되는 위치로 제한하는 것이 알려진 항-CD137 효능제 분자와 관련된 독성을 유발하지 않으면서 면역 세포를 활성화하는데 매우 효과적이라는 것을 인식하였다. 이것은, 예를 들면, 암 및 기타 질환의 치료를 위한 면역요법에 유용할 것으로 예상된다.

[0019] 상기 배경 단락에 기술된 바와 같이, 각각 OX40 또는 CD137에의 OX40 리간드 또는 CD137 리간드의 초기 결합은 수용체 삼량체화에 이어 수용체 클러스터링, 활성화 및 후속적인 강력한 항종양 T 세포 활성의 개시를 유도하는 연쇄 사건을 개시하는 것으로 생각된다. 따라서, 치료제가 OX40 또는 CD137의 활성화를 효율적으로 달성하기 위해서는, 여러 수용체 단량체가 삼량체 리간드에 의한 브릿징을 모방하는 방식으로 함께 브릿징될 필요가 있을 것으로 예상된다.

[0020] 본 발명자들은 CD137에 대한 상보성 결정 영역 (complementarity determining region; CDR)-기반 항원-결합 부위 및 항체 분자의 불변 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자를 단리(isolate)하였다. 본 발명자들은 이러한 항체 분자는 두 표적이 공동-발현될 때 두 표적 모두에 동시에 결합할 수 있음을 보여 주

었다. 이러한 의미에서 공동-발현은 CD137 및 OX40이 동일한 세포, 예를 들면 면역 세포에서 발현되는 상황 및 CD137과 OX40이 다른 세포에서, 예를 들면 종양 미세환경에서 서로 인접하게 위치한 두 개의 상이한 면역 세포에서 발현되는 상황을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체 분자는 단일 세포에서 발현된 두 표적 모두에 시스로 결합할 수 있을 뿐만 아니라 상이한 세포에서 발현된 두 표적에 트랜스로 결합할 수 있는 것으로 믿어진다.

[0021] 본 발명자들은 추가로 CD137에 대한 CDR-기반 항원-결합 부위 및 항체 분자의 불변 도메인에 위치하는 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자가 두 표적 모두에 2가 결합할 수 있음을 보여 주었다. 구체적으로, 본 발명자들은 이러한 항체 분자가 OX40 및 CD137에 결합할 수 있고 생성된 복합체가 가교결합되고 질량분광 분석에 적용될 때 복합체의 19%가 2개의 OX40 모이어티와 2개의 CD137 모이어티를 포함하는 것으로 나타났으며, 이것이 항체 분자가 두 표적 모두에 2가 결합되었음을 입증한다는 것을 보여 주었다.

[0022] 또한, 본 발명자들은 이들 항체 분자가 두 표적 모두에 결합될 때 시험관내에서 OX40 및 CD137의 클러스터링 및 신호전달을 유도할 수 있음을 보여 주었다. 이러한 방식으로 작용함으로써, 이러한 항체 분자는 "이중 효능제"로 불리며, 즉 항체 분자는 OX40 및 CD137 둘 다에 대한 이중 결합에 의한 가교결합의 결과로서 수용체를 통한 신호전달을 유도할 수 있다.

[0023] 실시예에서 입증된 바와 같이, OX40은 CD4+ T 세포에서 우선적으로 발현되고 CD137은 CD8+ T 세포에서 우선적으로 발현된다. 본 발명자들은 항체 분자가 CD4+ T 세포에서 OX40의 효능작용을 유도할 수 있음을 입증하였다. 이러한 경우, 항체 분자는 CDR-기반 항원-결합 도메인을 통해 CD137에 결합하여 항체 분자를 가교결합시키고 OX40 항원-결합 도메인은 동시에 CD4+ T 세포에서 발현된 OX40에 결합하고 클러스터링하고 활성화할 수 있는 것으로 믿어진다. 유사하게, 본 발명자들은 항체 분자가 CD8+ T 세포에서 CD137의 효능작용을 유도할 수 있음을 입증하였다. 이러한 경우, 항체 분자는 OX40 항원-결합 도메인을 통해 OX40에 결합하여 항체 분자를 가교결합시키고 OX40 항원-결합 도메인은 동시에 CD8+ T 세포에서 발현된 CD137에 결합하고 클러스터링하고 활성화할 수 있는 것으로 믿어진다.

[0024] 게다가, 본 발명자들은 상기한 바와 같은 2개의 항원-결합 부위를 포함하고 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소 또는 폐지하도록 변형된 항체 분자가 CD137 및 OX40이 공동-발현될 때 수용체를 통한 신호전달을 유도할 수 있어 Fc γ 수용체에 의한 가교결합을 필요로 하지 않으면서 일어나는 효능작용을 나타낸다는 것을 보여 주었다. Fc γ 수용체-매개된 가교결합이 본 발명의 항체 분자의 활성화에 필요하지 않기 때문에, OX40 또는 CD137 수용체를 통한 신호전달은 종양 미세환경에서와 같이 두 표적이 모두 존재하는 부위에 국한될 것으로 예상된다. 따라서, 항체 분자는 두 개의 특정 표적 모두의 발현을 기반으로 하고 추가의 가교결합체를 필요로 하지 않으면서 효능작용을 자율적으로 유도할 수 있다.

[0025] 또한, Fc γ 수용체-결합이 ADCC에 필요하기 때문에, 이러한 Fc γ 수용체에 대한 결합의 감소는 또한 표적 면역 세포가 본 발명의 항체 분자에 의해 고갈되지 않도록, 감소된 ADCC를 초래할 것으로 예상된다. 본 발명자들은 항체 분자가 면역 반응을 촉진하기 위해 CD137 및/또는 OX40을 발현하는 면역 세포를 활성화하도록 설계되었기 때문에 이것이 중요하다고 간주하였다. 따라서 이러한 면역 세포의 고갈은 바람직하지 않다. 본 발명자들은 본원에 정의된 특성을 갖는 항체 분자가 면역 세포, 특히 CD137 및/또는 OX40을 발현하는 T 세포를 활성화하고 증식을 유도할 수 있음을 입증하였다.

[0026] 본 발명자들은 상기한 바와 같은 CD137 및 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자가 마우스에서 생체내 종양 성장을 억제할 수 있다는 것을 추가로 보여 주었다. 게다가, 항체 분자 중 하나가 CD137에 대한 CDR-기반 항원-결합 부위를 포함하고 다른 분자가 OX40에 대한 CDR-기반 항원-결합 부위를 포함하는 2개의 단일특이 항체 분자의 조합에 비해 이중특이 항체 분자에서 보다 효과적인 종양 성장 억제가 관찰되었으며, 이것은 OX40 및 CD137의 동시 관여 및 효능작용이 개선된 항종양 효능을 초래함을 입증하였다. 또한, 항체 분자는 CT26 마우스 종양 모델에서 종양 세포를 사용한 재유발시험 (re-challenge)에 대해 한 완전한 종양 퇴행 및 보호 면역 기억의 확립을 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 항체 분자는 인간 환자의 암 치료에 효능을 보일 것으로 예상된다. 따라서, 이러한 항체 분자는 ADCC 활성을 폐지하기 때문에, 이러한 유익한 T 세포 (기억 및 효과기 세포)를 현저하게 고갈시키지 않으면서 표적 면역 세포를 효능화함으로써 종양 성장을 억제할 것으로 예상된다.

[0027] 마우스의 생체내 연구에서 관찰된 바와 같이, 본원에 기술된 항체 분자에 의해 유도된 T 세포의 활성화 및 증식은 종양-국소화 효과가 아니라 전신 효과였다. 게다가, 말초 중심 기억 및 효과기 기억 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증식 및 활성화의 증가가 본 발명의 항체 분자를 투여한 시노물구스 원숭이의 예비 용량 범위 조사 연구에서 관찰되었다. 따라서, 종양 미세환경에서의 T 세포의 표적화 뿐만 아니라 OX40 및 CD 137을 발현하는 말초 기억 T

세포가 항체 분자에 의해 표적화되어 종양-반응성 T 세포의 확장을 유도하여 이들의 항종양 효과를 제공할 것으로 예상된다.

- [0028] 따라서, 실제 종양 자체의 부위 외에도, 종양에 의해 영향을 받는 해부학적 위치는 또한 종양-특이 면역 반응이 생성되는 신체의 다른 곳의 위치, 예를 들어 말초 림프절을 포함하는 것으로 간주될 수 있다.
- [0029] 상기 배경 부분에 설명된 바와 같이, CD137 효능제 분자의 임상 개발은 용량-제한적 고-등급 간 염증(우렐루맵) 또는 낮은 임상 효능(우토밀루맵)과 관련된 치료로 인해 적어도 부분적으로 저지되었다.
- [0030] 이론에 결부시키고자 함이 없이, 간에 존재하는 T 세포는 항-CD137 효능제 분자에 의해 활성화되어 간 염증을 유발할 수 있는 잠재능을 가질 수 있다고 생각된다. CD8+ T 세포는 패혈증/바이러스 감염 후 간 염증 및 세포자멸사(apoptosis)를 촉진하는 것으로 나타났다 (Wesche-Soldato et al., 2007). 마우스에서 항-CD137 효능제 항체 요법은 간으로의 CD137-의존성 T 세포 침윤을 초래하는 것으로 나타났다 (Dubrot J et al., 2010). 이러한 연구의 결과를 종합하면 우렐루맵과 같이 높은 활성을 갖는 항-CD137 효능제 항체가 간으로의 활성화된 CD8+ T 세포의 침윤을 유발하여 간 염증을 야기할 수 있음을 나타낸다. 이 효과를 관찰하기에는 우토밀루맵의 활성이 너무 낮을 수 있다. 대안적으로, 우렐루맵 치료로 관찰된 용량-제한적 간 독성은 이 항체에 의해 결합된 특정 에피토프 때문일 수 있다.
- [0031] 본 발명자들은 높은 친화도로, 즉 높은 결합력(avidity)으로 CD137에 결합할 것으로 예상되는 이량체 인간 CD137에 결합하는 항체 분자를 단리하기 위해 광범위한 선택 프로그램을 수행하였다. 사용된 선택 프로토콜의 관점에서, 항체 분자는 이량체 CD137에 대해 관찰된 친화도보다 낮은 친화도로 단량체 CD137에 결합할 것으로 예상된다.
- [0032] 본원에서 언급되는 '친화도'는 K_D 에 의해 측정되는 항체 분자와 이의 동족 항원 사이의 결합 상호작용의 강도를 지칭할 수 있다. 당해 분야 기술자에게 쉽게 자명한 바와 같이, 항체 분자가 항원과 다중 결합 상호작용을 형성할 수 있는 경우 (예를 들어, 항체 분자가 항원에 2가 결합할 수 있고, 임의로, 항원이 이량체인 경우) K_D 에 의해 측정되는 친화도는 또한 결합력에 의해 영향을 받을 수 있으며, 결합력은 항체-항원 복합체의 전반적인 강도를 지칭한다.
- [0033] T 세포와 같은 면역 세포에 의한 CD137의 발현은 활성화시 상향조절된다. 이론에 결부시키고자 함이 없이, 활성화된 면역 세포에서의 CD137의 높은 발현으로 인해, CD137은 이러한 세포의 표면에서 이량체, 삼량체 및 고차 다량체의 형태일 것으로 생각된다. 이와 달리, 나이브 T 세포와 같은 나이브 면역 세포는 이들의 세포 표면에서 낮거나 무시할 수 있는 수준의 CD137을 발현하며 따라서 존재하는 모든 CD137은 단량체 형태일 것 같다. 따라서, 높은 결합력으로 CD137에 결합하는 항체 분자는 나이브 면역 세포와 반대로 활성화된 T 세포와 같은 활성화된 면역 세포에 우선적으로 결합할 것으로 예상된다.
- [0034] 따라서, 상기에 비추어 볼 때, 본 발명의 항체 분자는 대체로 OX40과의 관여를 통한 가교결합의 부재하에서 CD137을 활성화할 수 없을 것으로 예상된다. 또한, 상기한 바와 같이, 본 발명자들은 OX40의 공동-발현이 거의 또는 전혀 없는 위치에서 CD137의 활성화를 피할 것이라는 기대로 Fc γ 수용체 매개된 가교결합이 감소되거나 폐지된 항체 분자를 개발하였다. Fc γ 수용체 결합의 불능은 항체 분자의 항종양 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이론에 결부시키고자 함이 없이, 이러한 항체 분자는 환자에게 투여될 때 감소된 독성을 보일 것으로 믿어진다. 이것은 CD137 활성화가 OX40 및 CD137이 CD137의 클러스터링 및 활성화를 유도하기에 충분한 수준으로 공동-발현되는 위치로 크게 제한되기 때문이라고 생각된다. 본 발명자들은 시노폴구스 원숭이의 예비 용량 범위 조사 연구에서, 본 발명의 항체 분자의 용량이 30 mg/kg까지 잘 견딘다는 것을 보여 주었다.
- [0035] 본 발명자들은 본 발명의 항체 분자가 가교결합의 부재하에서도 낮은 수준의 OX40 클러스터링 및 활성화를 유도할 수 있음을 보여 주었다. CD137 효능제 항체와 달리, OX40 효능제 항체는 클리닉에서 용량-제한적 독성(DLT)을 나타내지 않았으며, 따라서 가교결합의 부재하에서 OX40 효능제 활성화는 임상 치료에 문제를 나타낼 것으로 예상되지 않는다. 이와 달리, 치료할 상태에 따라, 가교결합의 부재하에서 항체 분자에 의한 낮은 수준의 OX40 효능제 활성이 유리할 수 있다. 이론에 결부시키고자 함이 없이, 이러한 특성을 가진 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자는 가교결합의 부재하에서 종양-반응성 T 세포의 제한된 활성화 및 확장을 유도하여, 종양 미세환경에서 가교결합된 Fcab 분자에 의해 더욱 활성화될 수 있는 더 큰 종양-반응성 T 세포의 풀을 야기함으로써 암 치료의 맥락에서 유용할 수 있다고 생각된다.
- [0036] Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소 또는 폐지하도록 변형된 본 발명의 항체 분자의 추가 이점은 이러한 항체 분자

가 OX40-발현 조절 T 세포 (Tregs)의 고갈에 의존하지 않는 항종양 활성을 갖는다는 점일 수 있다. Tregs는 말초에 위치하여 잠재적으로 보호할 수 있으며 면역계를 과도하게 자극함으로써 유발될 수 있는 자가면역의 영향을 줄일 수 있다 (Vignali DA et al., 2008). 따라서, Treg 고갈이 마우스 모델에서 종양 성장을 감소시키는데 상당한 영향을 미칠 수 있다고 가정되었다 (Bulliard et al., 2014; Simpson et al., 2013). 그러나, 인간 종양에서 Treg 고갈이 ADCC에 의해 달성될 수 있다는 제한된 증거가 있으며, Treg 고갈이 인간에서 발생하는 경우, 이것은 마우스 모델에서 관찰된 바와 같은 극적인 항종양 활성을 초래하지는 않는 것으로 보인다 (Powell et al., 2007; Nizar S et al., 2009; Glisson BS et al., 2016; Tran B et al., 2017). 따라서, 항체 분자가 Tregs를 현저하게 고갈시키지는 않지만 여전히 항종양 활성을 갖는다면, 이것은 항체 분자가 Fcγ 수용체-매개된 Treg 고갈과는 관계없이 항종양 활성을 가짐을 나타낼 수 있다.

[0037] 항체 분자는 인간 및 시노물구스 CD137과 인간 및 시노물구스 OX40 둘 다에 높은 친화도로 결합할 수 있는 것으로 추가로 나타났다. 이러한 교차-반응성은 항체 분자의 투여 및 안전성 시험이 전임상 개발 동안 시노물구스 원숭이에서 수행될 수 있게 하기 때문에 유리하다.

[0038] 본 발명자들에 의해 확인된 항체 분자의 추가의 특징은 CD137에 대한 항원-결합 부위와 OX40에 대한 항원-결합 부위가 둘 다 항체 구조 자체 내에 포함된다는 것이다. 특히, 항체 분자는 다른 단백질이 링커 또는 다른 수단을 통해 항체 분자에 융합되는 것을 필요로 하지 않아 이의 표적 둘 다에 2가 결합할 수 있는 분자를 야기한다. 이것은 다수의 장점을 갖는다. 구체적으로, 본 발명자들에 의해 확인된 항체 분자는 추가의 융합된 부분을 포함하지 않기 때문에 표준 항체의 생산에 사용되는 것과 유사한 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 구조는 또한 링커가 시간이 지남에 따라 분해되어 항체 분자의 이중 집단을 생성할 수 있기 때문에 개선된 항체 안정성을 야기할 것으로 예상된다. 단 하나의 단백질이 융합된 집단의 이러한 항체는 OX40 및 CD137 둘 다에 결합함으로써 가교결합의 결과로서 수용체를 통해 이중 효능제 및 신호로서 작용하지 못할 수 있다. 링커의 절단 또는 분해는 개체(individual)에게 치료제를 투여하기 전 또는 투여한 후에 (예를 들어, 개체의 효소적 절단 또는 생체내 pH를 통해) 발생하여, 개체에서 순환하는 동안 그 효과가 감소될 수 있다. 본 발명자들에 의해 확인된 항체 분자에는 링커가 없기 때문에, 항체 분자는 투여 전과 투여 후 둘 다에 동일한 수의 결합 부위를 유지할 것으로 예상된다. 게다가, 융합된 단백질 또는 링커 또는 둘 다의 도입은 분자가 개체에게 투여될 때 면역원성을 유도하여 치료제의 효과를 감소시킬 수 있기 때문에 본 발명자들에 의해 확인된 항체 분자의 구조는 또한 분자의 면역원성의 관점에서 바람직하다.

과제의 해결 수단

[0039] 따라서, 본 발명은 다음을 제공한다:

[0040] [1]

[0041] (a) CD137에 대한 상보성 결정 영역 (CDR)-기반 항원-결합 부위; 및

[0042] (b) 항체 분자의 CH3 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하고;

[0043] 여기서 CDR-기반 항원-결합 부위가

[0044] (i) 각각 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5 및 6 [FS30-10-16];

[0045] (ii) 각각 서열 번호 1, 2, 16, 4, 5 및 6 [FS30-10-3];

[0046] (iii) 각각 서열 번호 1, 2, 21, 4, 5 및 6 [FS30-10-12];

[0047] (iv) 각각 서열 번호 25, 26, 27, 4, 5 및 28 [FS30-35-14]; 또는

[0048] (v) 각각 서열 번호 33, 34, 35, 4, 5 및 36 [FS30-5-37]에 제시된 CDR 1-6을 포함하고;

[0049] 여기서 OX40 항원-결합 부위가 CH3 도메인의 AB, CD 및 EF 구조적 루프에 각각 위치한 제1 서열, 제2 서열 및 제3 서열을 포함하고, 여기서 제1, 제2 및 제3 서열이 각각 서열 번호 51, 52 및 53 [FS20-22-49]에 제시된 서열을 갖는, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자.

[0050] [2]

[0051] (a) CD137에 대한 상보성 결정 영역 (CDR)-기반 항원-결합 부위; 및

[0052] (b) 항체 분자의 CH3 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하고;

- [0053] 여기서 CDR-기반 항원-결합 부위가
- [0054] (i) 각각 번호 7, 8, 9, 10, 11 및 6 [FS30-10-16];
- [0055] (ii) 각각 서열 번호 7, 8, 17, 10, 11 및 6 [FS30-10-3];
- [0056] (iii) 각각 서열 번호 7, 8, 22, 10, 11 및 6 [FS30-10-12];
- [0057] (iv) 각각 서열 번호 29, 30, 31, 10, 11 및 28 [FS30-35-14]; 또는
- [0058] (v) 각각 서열 번호 37, 38, 39, 10, 11 및 36 [FS30-5-37]에 제시된 CDR 1-6을 포함하고;
- [0059] 여기서 OX40 항원-결합 부위가 CH3 도메인의 AB, CD 및 EF 구조적 루프에 각각 위치한 제1 서열, 제2 서열 및 제3 서열을 포함하고, 여기서 제1, 제2 및 제3 서열이 각각 서열 번호 51, 52 및 53 [FS20-22-49]에 제시된 서열을 갖는, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자.
- [0060] [3]
- [0061] (i) 제1 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 14 내지 18에 위치하고;
- [0062] (ii) 제2 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 45.1 내지 77에 위치하고/하거나;
- [0063] (iii) 제3 서열이 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 93 내지 101에 위치하고;
- [0064] 여기서 아미노산 잔기 번호매김(amino acid residue numbering)은 IMGT 번호매김 체계에 따르는, [1] 또는 [2]에 따르는 항체 분자.
- [0065] [4] 항체 분자가 서열 번호 54 [FS20-22-49]에 제시된 CH3 도메인 서열을 포함하는, [1] 내지 [3] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0066] [5] 항체 분자가 [1] 또는 [2]의 (i) 내지 (iv) 중의 어느 하나에 제시된 CDR 1-6을 포함하는, [1] 내지 [4] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0067] [6] 항체 분자가 [1] 또는 [2]의 (i) 내지 (iii) 중의 어느 하나에 제시된 CDR 1-6을 포함하는, [1] 내지 [5] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0068] [7] 항체 분자가 [1] 또는 [2]의 (i)에 제시된 CDR 1-6을 포함하는, [1] 내지 [6] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0069] [8] 항체 분자가 중쇄 가변 (VH) 도메인 및/또는 경쇄 가변 (VL) 도메인, 바람직하게는 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는, [1] 내지 [7] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0070] [9] 항체 분자가 면역글로불린 중쇄 및/또는 면역글로불린 경쇄, 바람직하게는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는, [1] 내지 [8] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0071] [10] 항체 분자가 VH 도메인 및/또는 VL 도메인, 바람직하게는
- [0072] (i) 각각 서열 번호 12 및 14 [FS30-10-16];
- [0073] (ii) 각각 서열 번호 18 및 14 [FS30-10-3];
- [0074] (iii) 각각 서열 번호 23 및 14 [FS30-10-12];
- [0075] (iv) 각각 서열 번호 170 및 172 [FS30-35-14];
- [0076] (v) 각각 서열 번호 40 및 42 [FS30-5-37]에 제시된 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는, [8] 또는 [9]에 따르는 항체 분자.
- [0077] [11] 항체 분자가 [10]의 (i) 내지 (iv) 중의 어느 하나에 제시된 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는, [10]에 따르는 항체 분자.
- [0078] [12] 항체 분자가 [10]의 (i) 내지 (iii) 중의 어느 하나에 제시된 VH 및 VL 도메인을 포함하는, [10] 또는 [11]에 따르는 항체 분자.
- [0079] [13] 항체 분자가 [10]의 (i)에 제시된 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는, [10] 내지 [12] 중의 어느 하나에

따르는 항체 분자.

- [0080] [14] 항체 분자가 인간 IgG1 분자인, [1] 내지 [13] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0081] [15] 항체 분자가 항체의 중쇄 및 경쇄:
- [0082] (i) 각각 서열 번호 95 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-16;
- [0083] (ii) 각각 번호 99 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-3;
- [0084] (iii) 각각 서열 번호 103 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-12;
- [0085] (iv) 각각 서열 번호 105 및 107에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-35-14; 또는
- [0086] (v) 각각 번호 109 및 111에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-5-37을 포함하는, [1] 내지 [14] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0087] [16] 항체 분자가 [15]의 (i) 내지 (iv) 중의 어느 하나에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함하는, [15]에 따르는 항체 분자.
- [0088] [17] 항체 분자가 [15]의 (i) 내지 (iii) 중의 어느 하나에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함하는, [15]에 따르는 항체 분자.
- [0089] [18] 항체 분자가 [15]의 (i)에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함하는, [15]에 따르는 항체 분자.
- [0090] [19] 항체 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 결합하는, [1] 내지 [18] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0091] [20] 인간 CD137이 서열 번호 127에 제시된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, [19]에 따르는 항체 분자.
- [0092] [21] 인간 OX40이 서열 번호 130에 제시된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, [19] 또는 [20]에 따르는 항체 분자.
- [0093] [22] 항체 분자가 시노몰구스 CD137 및 시노몰구스 OX40에 결합하는, [1] 내지 [21] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0094] [23] 시노몰구스 CD137이 서열 번호 129에 제시된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, [22]에 따르는 항체 분자.
- [0095] [24] 시노몰구스 OX40이 서열 번호 131에 제시된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, [23] 또는 [24]에 따르는 항체 분자.
- [0096] [25] 항체 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 결합하고, 항체 분자가 인간 CD137에 결합하는 친화도 (K_D)가 항체 분자가 인간 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 2배 이내인, [5] 내지 [7], [11] 내지 [13] 및 [16] 내지 [18] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0097] [26] 항체 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 동시에 결합할 수 있는, [19] 내지 [25] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0098] [27] 항체 분자가 세포-표면 발현된 CD137의 존재하에서 면역 세포 상의 OX40을 활성화할 수 있는, [1] 내지 [26] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0099] [28] 면역 세포 상의 OX40에 및 CD137에 대한 항체 분자의 결합이 면역 세포 상의 OX40의 클러스터링을 유발하는, [1] 내지 [27] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0100] [29] 항체 분자가 세포-표면 발현된 OX40의 존재하에서 면역 세포 상의 CD137을 활성화할 수 있는, [1] 내지 [28] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0101] [30] 면역 세포 상의 CD137에 및 OX40에 대한 항체 분자의 결합이 면역 세포 상의 CD137의 클러스터링을 유발하고, OX40이 동일한 면역 세포에서 또는 별도의 세포에서 발현되는, [1] 내지 [29] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0102] [31] 면역 세포가 T 세포인, [27] 내지 [30] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0103] [32] 항체 분자가 하나 이상의 Fc γ 수용체에 대한 항체 분자의 CH2 도메인의 결합을 감소시키거나 폐지하도록 변형되는, [1] 내지 [31] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.

- [0104] [33] 항체 분자가 하나 이상의 $Fc\gamma$ 수용체에 결합하지 않는, [1] 내지 [32] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0105] [34] $Fc\gamma$ 수용체가 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$, $Fc\gamma RIIb$ 및 $Fc\gamma RIII$ 으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, [32] 또는 [33]에 따르는 항체 분자.
- [0106] [35] 항체 분자가 T 세포의 증식을 유도할 수 있는, [1] 내지 [34] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자.
- [0107] [36] [1] 내지 [35] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자 및 생체활성 분자를 포함하는 집합체.
- [0108] [37] [1] 내지 [36] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자 및 검출 가능한 표지를 포함하는 집합체.
- [0109] [38] [1] 내지 [35] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자를 암호화하는 핵산 분자 또는 분자들.
- [0110] [39] 핵산 분자(들)가
- [0111] (i) 각각 서열 번호 96 및 98에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-16;
- [0112] (ii) 각각 서열 번호 100 및 102에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-3;
- [0113] (iii) 각각 서열 번호 104 및 102에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-12;
- [0114] (iv) 각각 서열 번호 106 및 108에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-35-14; 또는
- [0115] (v) 각각 서열 번호 110 및 112에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-5-37의 중쇄 핵산 서열 및/또는 경쇄 핵산 서열을 포함하는, [1] 내지 [4], [8] 내지 [10], [14] 내지 [15], 및 [19] 내지 [35] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자를 암호화하는 핵산 분자 또는 분자들.
- [0116] [40] [38] 내지 [39] 중의 어느 하나에 따르는 핵산 분자 또는 분자들을 포함하는 벡터(vector) 또는 벡터들.
- [0117] [41] [38] 내지 [39] 중의 어느 하나에 따르는 핵산 분자(들), 또는 [40]에 따르는 벡터(들)을 포함하는 재조합 숙주 세포(recombinant host cell).
- [0118] [42] [41]의 재조합 숙주 세포를 항체 분자의 생산을 위한 조건하에서 배양함을 포함하여, [1] 내지 [35] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자를 생산하는 방법.
- [0119] [43] 항체 분자를 단리 및/또는 정제함을 추가로 포함하는, [42]에 따르는 방법.
- [0120] [44] [1] 내지 [37] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자 또는 집합체 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0121] [45] 치료법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에서 사용하기 위한, [1] 내지 [37] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자 또는 집합체.
- [0122] [46] 개체에게 [1] 내지 [37] 중의 어느 하나에 따르는 치료적 유효량의 항체 분자 또는 집합체를 투여함을 포함하여, 개체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.
- [0123] [47] 항체 분자 또는 집합체가 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하는데 사용하기 위한 것인, [45]에 따르는 사용을 위한 항체 분자 또는 집합체.
- [0124] [48] 질환 또는 장애가 개체에서 암 또는 감염성 질환인, [46]의 방법.
- [0125] [49] 암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의, [1] 내지 [37] 중의 어느 하나에 따르는 항체 분자 또는 집합체의 용도.
- [0126] [50] 암이 고형암이고, 임의로 고형암이 흑색종, 방광암, 뇌암, 유방암, 난소암, 폐암, 대장암, 자궁경부암, 간암, 두경부암, 췌장암, 신장암 및 위암으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, [47]에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 집합체, [48]의 방법, 또는 [49]에 따르는 항체 분자 또는 집합체의 용도.
- [0127] [51] 감염성 질환이 지속성 바이러스 감염이고, 임의로 지속성 바이러스 감염이 인간 면역결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus) (HIV), 엡스타인-바 바이러스 (Epstein-Barr virus), 시토메갈로바이러스 (Cytomegalovirus), B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus), C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus), 수두 대상포진 바이러스 (Varicella Zoster virus)로 구성된 그룹으로부터 선택되는, [47]에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 집합체, [48]의 방법, 또는 [49]에 따르는 항체 분자 또는 집합체의 용도.

- [0128] [52] 감염성 질환이 지속성 박테리아 감염이고, 임의로 지속성 박테리아 감염이 스태필로코커스 아우레우스 (Staphylococcus aureus), 헤모필루스 인플루엔자 (Hemophilus influenza), 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 레프라에 (Mycobacterium leprae), 헬리코박터 파일로리 (Helicobacter pylori), 트레포네마 팔리둠 (Treponema pallidum), 엔테로코커스 파에칼리스 (Enterococcus faecalis), 또는 스트렙토코커스 뉴모니에 (Streptococcus pneumoniae)의 지속성 감염인, [47]에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 접합체, [48]의 방법, 또는 [49]에 따르는 항체 분자 또는 접합체의 용도.
- [0129] [53] 감염성 질환이 지속성 진균 감염이고, 임의로 지속성 진균 감염이 칸디다, 예를 들어, 칸디다 알비칸스 (Candida albicans), 크립토코커스 (Cryptococcus) (가티이 (gattii) 및 네오프 오르만스(neof ormans)), 탈라로마이세스 (Talaromyces) (Penicillium) marneffe, 마이크로스포룸 (Microsporium), 예를 들어 마이크로스포룸 아우도우이니 (Microsporium audouinii), 및 트리코피톤 톤수란스 (Trichophyton tonsurans)의 지속성 감염인, [47]에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 접합체, [48]의 방법, 또는 [49]에 따르는 항체 분자 또는 접합체의 용도.
- [0130] [54] 감염성 질환이 지속성 기생충 감염이고, 임의로 지속성 기생충 감염이 플라스모듐 팔시파룸 (Plasmodium falciparum)과 같은 플라스모듐 (Plasmodium), 또는 리슈마니아 도노바니 (Leishmania donovani)와 같은 리슈마니아 (Leishmania)의 지속성 감염인, [47]에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 접합체, [48]의 방법, 또는 [49]에 따르는 항체 분자 또는 접합체의 용도.
- [0131] [55] 치료가 항체 분자 또는 접합체를 제2 치료제와 조합하여 개체에게 투여함을 포함하는, [45], [47] 및 [50] 내지 [54] 중의 어느 하나에 따라 사용하기 위한 항체 분자 또는 접합체.
- [0132] [56] 방법이 치료적 유효량의 제2 치료제를 개체에게 투여함을 추가로 포함하는, [46], [48] 및 [50] 내지 [54]에 따르는 방법.
- [0133] [57] 방법이 항체 분자 또는 접합체를 PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 항체와 조합하여 개체에게 투여함을 포함하는, [47] 또는 [50]에 따라 개체에서 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항체 분자 또는 접합체.

도면의 간단한 설명

- [0134] **도 1**은 Fcab FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49, FS20-22-85, FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 및 FS20-31-115 뿐만 아니라 야생형 (WT) Fcab의 CH3 도메인의 서열의 정렬을 보여준다. AB, CD 및 EF 구조적 루프의 위치 뿐만 아니라 WT 서열과 비교하여 Fcab의 CH3 도메인에 존재하는 임의의 아미노산 치환, 결실 (물결표 "~"로 표시됨) 또는 삽입이 표시된다. IMGT, IMGT 엑손 (연속 번호매김), EU 및 Kabat 번호매김 시스템에 따른 잔기의 번호가 나타내어져 있다.

도 2는 가교결합의 존재 및 부재하에 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서 CD137 mAb 및 OX40/CD137 mAb²의 활성을 보여준다. **도 2a** 및 **b**는 가교결합 항체의 존재 (**도 2a**) 또는 부재 (**도 2b**) 하에 증가하는 농도의 항-CD137mAb의 존재하에서의 IL2 방출을 보여준다. G1AA/20H4.9는 가교결합 항체의 존재 및 부재하에서 활성을 보이는 반면 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16 항체의 활성은 가교결합 항체의 존재하에서만 관찰되었다. **도 2c** 및 **d**는 가교결합제의 존재 (**도 2c**) 또는 부재 (**도 2d**) 하에 항-인간 OX40 Fcab를 포함하는 mAb² 형식 (FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14)의 증가하는 농도의 항-CD137 FS30 mAb의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 대조군은 다음과 같이 포함되었다: 항-CD137 항체 G2/MOR7480.1 (양성 대조군); 항-OX40 mAb G1/11D4 및 mAb² FS20-22-49AA/4420 (음성 대조군); 항-FITC mAb G1/4420 (동형 음성 대조군). **도 2c**는 가교결합된 양성 대조군 mAb (G2/MOR7480.1) 및 항-CD137 FS30 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14)의 존재하에서는 마우스 IL-2 방출의 증가에 의해 입증된 바와 같이 D011.10-hCD137 세포의 활성화에 있어서 농도 의존적 증가가 있지만 음성 대조군 mAbs 및 mAb² (G1/4420, FS20-22-49AA/4420 및 G1/11D4)의 존재하에서는 그렇지 않음을 보여준다. **도 2d**는 가교결합의 부재하에서, 양성 대조군 G2/MOR7480.1, mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14, 및 음성 대조군 G1/4420, FS20-22-49AA/4420 및 G1/11D4는, 측정된 IL-2의 낮은 기저 수준에 의해 입증된 바와 같이, T 세포 활성화를

전혀 나타내지 않거나 약한 T 세포 활성화를 나타내었음을 보여준다.

도 3은 포도상 구균 장독소 A (SEA) 분석에서 CD 137 mAb, OX40 Fcab 및 OX40/CD137 mAb²의 활성을 보여준다. IL-2 방출은 표시된 mAb/mAb²의 존재하에서 및 가교결합제 (항-FITC mAb 및 OX40/FITC 모의 mAb² 대조군의 경우 FITC-텍스트란, 및 시험된 모든 다른 분자의 경우 항-인간 CH2 항체)의 존재 및 부재하에서 측정되었다. **도 3a**는 3.7 nM의 농도에서 mAbs G1/4420 (항-FITC; 동형 대조군), G1AA/MOR7480.1 (항-CD137), G1AA/FS30-10-16 (항-CD137), G1AA/20H4.9 (항-CD137), G1AA/11D4 (항-OX40), FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²) 및 FS20-22-49AA/4420와 G1AA/FS30-10-16 조합, 뿐만 아니라 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 결과는 OX40/CD137 mAb² 만이 동형 대조군에 비해 인공 가교결합제의 부재하에서 T 세포의 활성화를 증가시킨 반면 OX40-표적화 항체 G1AA/11D4와 FS20-22-49AA/4420 및 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9 만이 동형 대조군에 비해 인공 가교결합제의 존재하에서 증가된 T 세포 활성화를 나타냈으며, 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16은 인공 가교결합제의 존재하에서도 통계적으로 유의한 활성을 나타내지 않았음을 보여준다. **도 3b**는 인공 가교결합제 (항-인간 CH2 항체)의 존재 및 부재하에서 증가하는 농도의 OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 결과는 항-인간 CH2 항체의 부재하에서 OX40/CD137 mAb²에 의해 유도된 T 세포의 활성화가 이러한 인공 가교결합제의 존재하에서 시험한 경우에 필적하였음을 보여준다. **도 3c** 및 **d**는 인공 가교결합제 (항-FITC mAb 및 OX40/FITC 모의 mAb² 대조군의 경우 FITC-텍스트란, 및 시험된 모든 다른 분자의 경우 항-인간 CH2 항체)의 존재 (**도 3d**) 및 부재 (**도 3c**) 하에서 증가하는 농도의 mAb 및 mAb²의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 대조군은 다음과 같았다: G1/4420 (항-FITC), G1/11D4 (항-OX40), G2/MOR7480.1 (항-CD137), G1/11D4와 G2/MOR7480.1 조합, 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²). 결과는 OX40이 대조군 G1/11D4에 의해 둘 다 단독으로 결합된 경우 및 항-CD137 mAb G2/MOR7480.1 및 FS20-22-49AA/4420와 조합하여 이들이 가교결합되었을 때 투여되는 경우 T 세포의 활성화에 농도 의존적 증가가 있었음을 보여준다. OX40/CD137 mAb²는 인공 가교결합제의 존재 및 부재하에서 필적하는 활성을 가졌으며, 활성은 가교결합된 OX40 Fcab (FS20-22-49AA/4420 Xlink)의 활성과 유사하였다. 항-CD 137 대조군 항체 (G2/MOR7480.1)에서만 가교결합 유무에 관계없이 활성이 거의 나타나지 않았다.

도 4는 인간 pan-T 세포 활성화 분석에서 CD137 mAb, OX40 Fcab 및 OX40/CD137 mAb²의 활성을 보여준다. IL-2 방출은 표시된 mAb/mAb²의 존재하에서 및 가교결합제 (항-FITC mAb 및 OX40/FITC 모의 mAb² 대조군의 경우 FITC-텍스트란, 및 시험된 모든 다른 분자의 경우 항-인간 CH2 항체)의 존재 및 부재하에서 측정되었다. **도 4a**는 3.7 nM 농도의 mAb 및 mAb²의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 결과는 OX40/CD137 mAb² 만이 인공 가교결합제의 부재하에서 T 세포의 활성화를 증가시켰음을 보여준다. OX40-표적화 항체 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420 및 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9 만이 가교결합제의 존재하에서 증가된 T 세포 활성화를 나타내었다. 인공 가교결합제의 존재하에서도 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 대해 활성이 검출되지 않았으며, 이것은 도 3a에 보고된 바와 같은 SEA 분석의 결과를 확인시켜 준다. **도 4b**는 인공 가교결합제 (항-인간 CH2 항체)의 존재 및 부재하에서 증가하는 농도의 OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16에 의해 유도된 IL-2 방출을 보여준다. OX40/CD137 mAb²는 인공 가교결합제의 존재 및 부재하에서 필적하는 활성을 가졌다.

도 4c는 인공 가교결합제의 부재하에서 증가하는 농도의 OX40/CD137 mAb² 및 대조군의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여주는 반면 **도 4d**는 인공 가교결합제 (경우에 따라 FITC-텍스트란 또는 항-인간 CH2 항체)의 존재하에서 증가하는 농도의 단일-제제 대조군 G1/4420, G1/11D4, G2/MOR7480.1 및 FS20-22-49AA/4420의 존재하에서의 IL-2 방출을 보여준다. 결과는 OX40/CD137 mAb²가 인공 가교결합제의 부재하에서 나노몰-이하 또는 한자릿수 나노몰 활성을 가졌음을 보여준다. 예상대로, G1/4420 대조군은 가교결합제의 존재 여부에 관계없이 활성을 갖지 않았다. 가교결합제의 존재없이, 대조군 G1/11D4, FS20-22-49AA/4420, G2/MOR7480.1, 및 G1/11D4와 G2/MOR7480.1의 조합은 활성이 거의 또는 전혀 없었다. 항-인간 CH2 항체 또는 FITC-텍스트란에 의해 가교결합될 때, 단일-제제 항-OX40 및 항-CD 137 대조군은 T 세포의 활성화에서 농도 의존적 증가를 나타내어, 분석이 T 세포에서 OX40 또는 CD137 수용체를 통해 신호를 검출할 수 있음을 입증하였다.

도 5는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화 분석에서 인간 OX40/CD137 mAb²의 활성을 보여준다. **도 5a** 및 **b**는 표시된

바와 같이 증가하는 농도의 mAb 및 mAb²의 존재하에 CD4+ T 세포 활성화 분석에서의 IL-2 방출을 보여준다. mAb 및 mAb²는 인공 가교결합제 (항-FITC mAb 및 OX40/FITC 모의 mAb² 대조군의 경우 FITC-텍스트란, 및 시험된 모든 다른 분자의 경우 항-인간 CH2 항체)의 존재 (도 5b) 또는 부재 (도 5a) 하에서 시험되었다. 결과는 OX40/CD137 mAb²가 인공 가교결합제의 부재하에서 CD4+ T 세포를 활성화시킬 수 있었음을 보여준다. CD4+ T 세포는 가교결합된 항-OX40 대조군 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420 (단독으로 및 G1AA/FS30-10-16과 조합하여)에 의해 활성화되었지만 단일-제제 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 의해서는 활성화되지 않았다. 항-OX40 대조군 FS20-22-49AA/4420은 또한 가교결합되지 않았을 때 CD4+ T 세포의 존재하에서 낮은 수준의 활성을 보였으며, 이것은 항체의 가교결합시 크게 증가되었다. 따라서, FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 둘 다에 의해 공유된 항-OX40 Fcab는 항체가 인공 가교결합제 또는 CD137에의 Fab-결합에 의해 가교결합되었을 때 OX40의 효능작용을 통해 CD4+ T 세포를 활성화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 도 5c 및 d는 표시된 바와 같은 증가하는 농도의 mAb 및 mAb²의 존재하에서 CD8+ T 세포 활성화 분석에서의 IL-2 방출을 보여준다. mAb 및 mAb²는 인공 가교결합제 (자세한 내용은 도 5a 및 b의 범례를 참조함)의 존재 (도 5d) 또는 부재 (도 5c) 하에서 시험하였다. 결과는 OX40/CD137 mAb²가 인공 가교결합제의 부재하에서 CD8+ T 세포를 활성화시킬 수 있었음을 보여준다. CD8+ T 세포의 활성화는 인공 가교결합제의 존재하에서 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16 둘 다 (단독으로 및 FS20-22-49AA/4420과 조합하여)에 대해 뿐만 아니라 항-OX40 대조군 FS20-22-49AA/4420에 의해 관찰되었으며, 덜한 정도로 G1AA/11D4에 대해 관찰되었다. 따라서, G1AA/FS30-10-16 대조군 mAb 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 둘 다에 공통인 항-CD137 Fab 아암은 항체가 인공 가교결합제 또는 OX40에의 Fcab-결합에 의해 가교결합되었을 때 CD8+ T 세포에서 발현되는 CD137을 효능화시킬 수 있는 반면, FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 둘 다에 의해 공유된 항-OX40 Fcab는 항체가 인공 가교결합제 또는 CD137에의 Fab-결합에 의해 가교결합되었을 때 OX40의 효능작용을 통해 CD8+ T 세포를 활성화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 도 5e 및 f는 3.7 nM 농도의 mAb/mAb²의 존재하에서 및 인공 가교결합제 (자세한 내용은 도 5a 및 b의 범례를 참조함)의 존재 또는 부재하에서 각각 CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화 분석에서의 IL-2 방출을 보여준다. 도 5e는 OX40/CD137 mAb²가 인공 가교결합제의 부재하에서 CD4+ T 세포를 활성화시킬 수 있었음을 보여준다. CD4+ T 세포는 가교결합된 항-OX40 대조군 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420에 의해 활성화되었지만 단일-제제 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 의해서는 활성화되지 않았다. 항-OX40 대조군 FS20-22-49AA/4420은 또한 가교결합되지 않을 경우 낮은 수준의 활성을 보였으며, 이것은 항체의 가교결합시 크게 증가되었다. 따라서, FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 둘 다에 의해 공유된 항-OX40 Fcab는 항체가 인공 가교결합제 또는 CD137에의 Fab-결합에 의해 가교결합될 때 OX40의 효능작용을 통해 CD4+ T 세포를 활성화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 도 5f는 OX40/CD137 mAb²가 인공 가교결합제의 부재하에서 CD8+ T 세포를 활성화할 수 있었음을 보여준다. CD8+ T 세포의 활성화는 인공 가교결합제의 존재하에서 항-CD137 대조군 G1AA/20H4.9 및 G1AA/FS30-10-16 (단독으로 및 FS20-22-49AA/4420과 조합하여)에 대해 관찰되었지만, 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1에 대해 또는 가교결합된 항-OX40 대조군 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420에 대해서는 관찰되지 않았다. CD8+ T 세포의 활성화는 또한 인공 가교결합제의 부재하에서 항-CD137 대조군 G1AA/20H4.9에 대해 관찰되었다. 따라서, G1AA/FS30-10-16 대조군 mAb 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 둘 다에 공통인 항-CD137 Fab 아암은 항체가 인공 가교결합제 또는 OX40에의 Fcab-결합에 의해 가교결합되었을 때 CD8+ T 세포에서 발현된 CD137을 효능화할 수 있는 것으로 나타났다.

도 6은 CD4+ T 세포가 CD8+ T 세포보다 낮은 수준의 CD137 및 높은 수준의 OX40을 발현함을 보여준다. 그래프는 G1AA/MOR7480.1 또는 G1AA/11D4로 처리된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 기하 평균 형광 강도 (GMFI)를 보여준다. CD137에 대한 G1AA/MOR7480.1의 결합은 CD137 발현의 척도이고 OX40에 대한 G1AA/11D4의 결합은 OX40 발현의 척도이다.

도 7은 T 세포 활성화 분석에서 항-마우스 CD137 mAb 및 mAb²의 활성을 보여준다. 도 7a 및 b는 인공 가교결합제 (경우에 따라 항-인간 CH2 항체 또는 FITC-텍스트란)의 부재 (도 7a) 및 존재 (도 7b) 하에서 마우스 OX40 및 마우스 CD137 수용체 (FS20m-232-91AA/Lob12.3)에 결합하는 증가하는 농도의 mAb², 및 대조군 항체의 존재하

에서의 IL-2 방출을 보여준다. 대조군은 항체 G1/4420 (항-FITC), G1AA/OX86 (항-mOX40), G1AA/Lob12.3 (항-mCD137), G1AA/OX86와 G1AA/Lob12.3 조합, 및 FS20m-232-91AA/4420 (mOX40/FITC mock mAb²)이었다. 결과는, 가교결합체의 부재하에서, 대조군 G1AA/OX86, FS20m-232-91 AA/4420, G1 AA/Lob12.3, 및 G1AA/OX86과 G1AA/Lob12.3의 조합은 활성을 갖지 않았음을 보여준다. 항-인간 CH2 항체 또는 FITC-텍스트란에 의해 가교결합될 때, G1AA/OX86, FS20m-232-91 AA/4420, 및 G1AA/OX86 + G1AA/Lob12.3 대조군은 T 세포의 활성화에 있어 농도 의존적 증가를 나타내었다. 가교결합될 때 G1AA/Lob12.3 대조군에 대해 활성의 미미한 증가가 관찰되었다. OX40/CD137 mAb²는 인공 가교결합체의 존재 여부와 관계없이 양호한 활성을 나타내었다. 도 7c 및 d는 CD3-자극된 DO11.10-mCD137 세포에서 가교결합 항체 (클론 MK1A6)의 부재 (도 7c) 또는 존재 (도 7d) 하에서 상이한 항-마우스 CD137 항체 (G1AA/Lob12.3 및 G1AA/3H3)의 활성을 보여준다. G1AA/3H3의 활성은 가교결합 항체의 존재 및 부재하에서 관찰된 반면 G1AA/Lob12.3 항체의 활성은 가교결합 항체의 존재하에서만 관찰되었다. 따라서, G1AA/3H3 항체는 '가교결합-비의존적'이라고 하고 G1AA/Lob12.3 항체는 '가교결합-의존적'이라고 한다.

도 8은 100배 과량의 인간 OX40-표적화 모의 mAb² (FS20-22-49AA/4420), 항-인간 CD137 항체 (G1AA/FS30-10-16) 또는 이들의 조합의 존재하에서 인간 OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 활성을 시험하기 위한 경쟁 분석을 보여준다. 중복 데이터는 평균 플러스 또는 마이너스 표준 편차 (SD)로 표시된다. 통계 검정은 일원 ANOVA 및 Dunnett의 다중 비교 검정에 의해 수행되었다. 오차 막대 위의 별표는 동형 대조군 (G1/4420)-처리된 샘플과 비교하여 유의한 차이를 나타낸다 (***) p<0.0002). 결과는 OX40/CD137 mAb²의 활성은 OX40/CD137 mAb²가 항-OX40 및 항-CD137 항체의 부재하에 두 수용체 모두에 결합할 수 있을 때에 비해 OX40에 대한 결합을 위해 FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² 및 CD137에 대한 결합을 위해 G1AA/FS30-10-16 mAb 둘 다에 의해 경쟁할 때 크게 감소되었음을 보여준다. OX40-표적화 모의 mAb² FS20-22-49AA/4420과 항-CD137 mAb G1AA/FS30-10-16의 조합은 OX40/CD137 mAb²의 활성을 더욱 감소시켰다. 이러한 결과는 OX40/CD137 mAb²가 OX40 및 CD137의 클러스터링 및 효능작용을 통해 T 세포 활성화를 유도하기 위해서는 두 수용체에 대한 mAb²의 이중 결합이 필요함을 나타낸다.

도 9는 100배 과량의 OX40-표적화 모의 mAb² FS20m-232-91AA/4420, 항-CD137 mAb G1/Lob12.3 또는 음성 대조군 mAb G1AA/4420 (항-FITC)의 존재하에서 마우스 OX40/CD137 mAb² FS20m-232-91 AA/Lob12.3의 활성을 시험하기 위한 경쟁 분석을 보여준다. 결과는 mAb²의 활성이 mAb²가 항-OX40 및 항-CD137 항체의 부재하에서 두 수용체 모두에 결합할 수 있었을 때에 비해 CD137에 대한 결합을 위해 G1/Lob12.3 mAb에 의해 경쟁될 때 크게 감소되고 또한 OX40에 대한 결합을 위해 FS20m-232-91AA/4420 모의 mAb²에 의해 경쟁될 때 낮은 수준으로 감소되었음을 보여준다. 예상대로, 이러한 항-OX40 및 항-CD137 항체의 부재하에서와 같이 과량의 음성 대조군 mAb의 존재하에서 mAb²에 대해 유사한 수준의 활성이 관찰되었다. 이러한 결과는 mAb²가 OX40 및 CD137의 클러스터링 및 효능작용을 통한 T 세포 활성화를 유도하기 위해서는 두 수용체에 대한 mAb²의 이중 결합이 필요함을 나타낸다.

도 10은 CT26 동계 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 항-종양 활성을 보여준다. 도 10a에서, G1/OX86 (LALA 돌연변이가 없는 항-OX40 양성 대조군), G1/Lob12.3 (LALA 돌연변이가 없는 항-CD137 양성 대조군), G1/4420 (IgG 대조군), G1/OX86과 G1/Lob12.3 조합, 항-OX40 mAb G1AA/OX86과 항-CD137 mAb G1AA/Lob12.3의 조합 (둘 다 LALA 돌연변이를 가짐), FS20m-232-91/Lob12.3 (LALA 돌연변이가 없는 OX40/CD137 mAb²) 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (LALA 돌연변이가 있는 OX40/CD137 mAb²)으로 처리된 Balb/c 마우스의 평균 CT26 종양 용적 (평균의 플러스 또는 마이너스 표준 편차)이 표시된다. 결과는 LALA 돌연변이를 갖는 및 갖지 않는 OX40/CD137 mAb (각각 FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3)로의 처리가 항-OX40 항체 G1/OX86, 항-CD137 항체 G1/Lob12.3, 이들 두 개의 항체의 조합 (G1/OX86 + G1/Lob12.3), 및 LALA-함유 항-OX40 및 항-CD137 항체의 조합 (G1AA/OX86 + G1AA/Lob12.3)으로의 처리에 비해 종양 성장의 감소를 초래하였음을 보여준다. 도 10b는 3 mg/kg의 동형 대조군 (클론 G1AA/4420), mOX40/FITC 모의 mAb² (클론 FS20m-232-91AA/4420), 항-mCD137 mAb (클론 G1AA/Lob12.3), mOX40/FITC 모의 mAb²와 항-mCD137 mAb의 조합, 또는

mOX40/CD137 mAb² (클론 FS20m-232-91AA/Lob12.3)로 복강내 주사를 통해 처리된 개별 CT26 종양-보유 마우스의 (시간 경과에 따른) 종양 용적을 보여준다. 수평 파선은 y 축에서 0 mm³가 있는 경우를 나타낸다. 정량적으로, mOX40/CD137 mAb² 및 mOX40/FITC 모의 mAb²와 항-mCD137 mAb의 조합은 동물의 하위세트에서 CT26 종양 성장을 억제하였다. 도 10c는 도 10b에 개별적으로 나타난 CT26-종양 보유 마우스의 평균 종양 용적 (평균의 플러스 또는 마이너스 표준 편차)을 보여준다. mOX40/CD137 mAb²로 처리된 그룹은 동형 대조군에 비해 초기 종양 성장기를 지연시켰다 (10 내지 22일). 항-mCD137 mAb 및 mOX40/FITC 모의 mAb²는 단일 제제로서 또는 조합으로 초기 종양 성장물에 영향을 미치지 않았다. 도 10d는 도 10b 및 10c에 나타난 동일한 CT26 종양-보유 마우스의 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 생존 플롯을 보여준다. 생존 분석은 단일 제제로 또는 조합하여 항-mCD137 mAb 및 mOX40/FITC 모의 mAb²로의 처리는 그렇지 않지만 mOX40/CD137 mAb²로의 처리는 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 생존 증가를 야기하였음을 보여준다. (쌍별 비교는 로그 순위 (Mantel-Cox) 검정을 사용하여 수행하였다; **** p ≤ 0.0001, ns = 통계적으로 유의하지 않음.)

도 11은 B16-F10 동계 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 항-종양 활성을 보여준다. 마우스는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (OX40/CD137 mAb²) 또는 G1/4420 (IgG 대조군)으로 처리하였다. 평균 종양 용적 플러스 또는 마이너스 표준 오차 평균이 플롯팅된다. 결과는 OX40/CD137 mAb²가 G1/4420 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 B16-F10 동계 모델에서 종양 성장을 유의적으로 감소시킬 수 있었음을 보여준다.

도 12는 SEA 분석에서 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 조합된 OX40/CD137 mAb²의 활성을 보여준다. 시험된 mAb²는 FS20-22-49AA/FS30-10-16이었다. 대조군은 G1/4420 (항-FITC), G1AA/S1 (항-PD-L1; 도 12a), G1AA/5C4 (항-PD-1; 도 12b)이었으며, FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²의 존재 또는 부재하에서 시험되었다. 결과는 FS20-22-49AA/FS30-10-16이 존재할 때 T 세포의 활성화의 농도-의존적 증가를 보이며 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²에 G1AA/S1 또는 G1AA/5C4의 첨가가 mAb² 단독으로 처리된 T 세포에 비해 IL-2 방출 (최대 반응)을 증가시켰음을 보여준다. T 세포가 대조군 항체 단독으로 처리되었을 때 활성은 보이지 않았다. 그룹 G 1/4420 + FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 G1AA/S1 + FS20-22-49AA/FS30-10-16 (도 12a) 또는 G1/4420 + FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 G1AA/5C4 + FS20-22-49AA/FS30-10-16 (도 12b) 간의 통계 검정은 이원 ANOVA 및 Tukey 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였으며 별표는 p-값을 나타낸다 (* p < 0.032, ** p < 0.0021, *** p < 0.0002, **** p < 0.0001).

도 13은 단독으로 및 조합하여 시험된, CT26 마우스 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb² 및 PD-1 길항제의 항-종양 활성을 보여준다. (도 13a) 동형 대조군 항체의 조합 (G1AA/4420 및 mlgG1/4420), (도 13b) 항-마우스 PD-1 항체, (도 13c) 항-마우스 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²), 또는 (도 13d) 항-마우스 PD-1 항체와 항-마우스 OX40/CD137 mAb² FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²의 조합으로 처리된 CT26-종양 보유 마우스에서의 종양 용적이 표시된다. 세포 접종 60일 후, 연구 종료시 퇴행된 종양 (62.5 mm³ 이하의 종양 용적으로 정의됨)을 갖는 마우스의 비율이 각 처리군에 대해 표시된다. 결과는 항-PD-1 길항제 항체 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 조합이 완전한 종양 퇴행 반응을 가진, 15마리 중 7마리 (47%)의 가장 높은 동물 비율을 야기하였음을 보여준다 (도 13d). 항-PD-1 항체 (도 13b) 또는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (도 13c)의 단일 제제로 처리된 마우스는 연구 말기에 각각 0% 및 7% 종양 퇴행을 보였다. 도 13e는 도 13a-d에 대해 기술된 바와 같이 처리된 CT26-종양 보유 마우스의 카플란-마이어 생존 플롯을 보여준다. 생존 분석은 FS20m-232-91AA/Lob12.3과 항 PD-1 항체의 조합이 동형 대조군 항체에 비해 통계적으로 유의한 생존 이득을 초래함을 보여주었다 (로그 순위 (Mantel Cox) 검정, p < 0.0001). 동형 대조군 항체에 비해 단일 제제 처리에 대해 유의한 생존 차이는 관찰되지 않았다.

도 14는 CT26 동계 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 용량-의존적, 항-종양 활성을 보여준다. 도 14a는 10 mg/kg 동형 대조군 항체 (G1AA/4420), 또는 0.1, 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3로 복강내 (i.p.) 주사를 통해 처리된 CT26-종양 보유 마우스의 종양 용적을 보여준다. 세포 접종 67일 후, 연구 종료시 퇴행된 종양 (62.5 mm³ 이하의 종양 용적으로 정의됨)을 갖는 마우스의 비율이 각 처리군에 대해 표

시된다 (각 그래프의 오른쪽 상단 참조). 결과는 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3이 연구의 말기에 각각 동물의 4% (1/25), 4% (1/25), 8% (2/25) 및 4% (1/25)에서 종양 퇴행을 초래하였음을 보여준다. 동형 대조군 및 0.1 mg/kg FS20m-232-91AA/Lob12.3 그룹의 동물 중 어느 것에서도 종양 퇴행을 보이지 않았다. 도 14b는 도 14a에 대해 기술된 바와 같이 처리된 CT26-종양 보유 마우스의 카플란-마이어 생존 플롯을 보여준다. 생존 분석은 FS20m-232-91AA/Lob12.3이 시험된 모든 용량 수준에서 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 생존 이득을 초래함을 보여주었다. 1 및 3 mg/kg 그룹, 및 3 및 10 mg/kg 그룹의 비교는 생존에 있어 통계적 차이를 보이지 않았다. 쌍별 비교는 달리 나타나지 않는 한 로그-순위 (Mantel-Cox) 검정을 사용하여 각 그룹 및 10 mg/kg 동형 대조군 간에 수행되었다; * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.0005$, **** $p \leq 0.0001$, ns = 통계적으로 유의하지 않음.

도 15는 CT26 동계 종양 모델에서 상이한 항-CD137 Fab 클론을 함유하는 OX40/CD137 mAb² 항체의 항-종양 효능의 비교를 보여준다. 도 15a는 G1/4420 (IgG 대조군), FS20m-232-91AA/Lob12.3 (가교결합-의존적 CD137 효능제 클론 Lob12.3을 갖는 OX40/CD137 mAb²) 및 FS20m-232-91AA/3H3 (가교결합-비의존적 CD137 효능제 클론 3H3을 갖는 OX40/CD137 mAb²)로 처리된 BALB/c 마우스에서의 평균 CT26 종양 용적을 보여준다. 평균 종양 용적 플러스 또는 마이너스 평균의 표준 오차가 표시된다. 결과는 OX40/CD137 mAb² 항체 (FS20m-232-91AA/Lob12.3 또는 FS20m-232-91AA/3H3)로의 처리가 동형 대조군 항체 (G1/4420)로의 처리에 비해 종양 성장의 감소를 초래하였으며 FS20m-232-91AA/Lob12.3 또는 FS20m-232-91AA/3H3으로 처리된 마우스에서 감소 수준의 차이는 관찰되지 않았음을 보여준다. 도 15b는 도 15a에 대해 기술된 바와 같이 처리된 CT26-종양 보유 마우스의 카플란-마이어 생존 플롯을 보여준다. 생존 분석은 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3 또는 FS20m-232-91 AA/3H3)로의 처리가 동형 대조군 항체로의 처리에 비해 통계적으로 유의한 생존 이득을 초래하였지만 (로그 순위 (Mantel Cox) 검정; $p < 0.05$), OX40/CD137 mAb²로 처리된 마우스 간에 차이는 관찰되지 않았음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0135] 이하에서는 본 발명의 양태 및 구현예가 첨부된 도면을 참조하여 논의될 것이다. 추가 양태 및 구현예는 당업자에게 자명할 것이다. 이 텍스트에 언급된 모든 문서는 본원에 참고로 포함된다.
- [0136] 본 발명은 CD137 및 OX40 둘 다에 결합하는 항체 분자에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 항체 분자는 CD137에 대한 CDR-기반 항원 결합 부위 및 항체 분자의 불변 도메인에 위치한 및 OX40 항원 결합 부위를 포함한다. 용어 "CD137" 및 "OX40"은, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 인간 CD137 및 인간 OX40, 뮤린 CD137 및 뮤린 OX40, 및/또는 시노물구스 원숭이 CD137 및 시노물구스 원숭이 OX40을 지칭할 수 있다. 바람직하게는 용어 "CD137" 및 "OX40"은, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 인간 CD137 및 인간 OX40을 지칭한다.
- [0137] 용어 "항체 분자"는 천연 또는 일부 또는 전부 합성에 의해 생산된 면역글로불린을 기술한다. 항체 분자는 인간 또는 인간화 항체 분자, 바람직하게는 인간 항체 분자일 수 있다. 항체 분자는 바람직하게는 단클론 항체 분자이다. 항체의 예는 면역글로불린 G와 같은 면역글로불린 동형 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와 같은 이들의 동형 서브클래스 뿐만 아니라 이의 단편이다. 항체 분자는 다른 폴리펩티드 및/또는 혈청 성분에 결합할 수 있는 항체와 같은 오염 물질이 없다는 의미에서 단리될 수 있다.
- [0138] 따라서 본원에서 사용되는 용어 "항체 분자"는 항체 단편을 포함하며, 단 상기 단편은 CD137에 대한 CDR-기반 항원 결합 부위 및 불변 도메인에 위치한 OX40 항원 결합 부위를 포함한다. 따라서, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "항체 분자"는 "항체 분자 또는 이의 단편"과 같다.
- [0139] 단클론 항체 및 기타 항체를 취하고 재조합 DNA 기술을 사용하여 원래 항체의 특이성을 유지하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생산하는 것이 가능하다. 이러한 기술은 CDR, 또는 가변 영역, 및/또는 OX40 항원 결합 부위를 제공하는 불변 도메인 서열을 상이한 면역글로불린으로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 하나의 면역글로불린의 CDR을 다른 면역글로불린으로 도입하는 것은 예를 들면 제EP-A-184187호, 제GB 2188638A호 또는 제EP-A-239400호에 기술되어 있다. 관련 불변 도메인 서열에 대해 유사한 기술이 사용될 수 있다. 대안적으로, 항체 분자를 생산하는 하이브리도마 또는 다른 세포는 유전적 돌연변이 또는 기타 변화를 겪을 수 있으며, 이것은 생산된 항체의 결합 특이성을 변경하거나 변경하지 않을 수 있다.
- [0140] 항체는 다양한 방식으로 변형될 수 있기 때문에, 용어 "항체 분자"는 천연 또는 전부 또는 부분 합성적 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드를 포함하여 항체의 항체 단편, 유도체, 기능적 등가물 및 상

동체를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인 또는 증가물을 포함하는 키메라 분자가 포함된다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현은 제EP-A-0120694호 및 제EP-A-0125023호에 기술되어 있다.

- [0141] CDR 서열과 CH3 도메인 둘 다를 포함하는 항체 단편의 예는 CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디이다 (Hu et al., 1996).
- [0142] 본 발명의 항체 분자는 CD137 및 OX40에 결합한다. 이러한 맥락에서 결합은 특이 결합을 지칭할 수 있다. 용어 "특이적"은 항체 분자가 이의 특이 결합 파트너(들) (여기서는 CD137 및 OX40) 이외의 분자에 대해 어떠한 유의한 결합도 나타내지 않을 상황을 지칭할 수 있다. 용어 "특이적"은 또한 항체 분자가 에피토프를 지닌 다양한 항원에 결합할 수 있는 경우에 다수의 항원이 지니는 CD137 및 OX40 상의 에피토프와 같은 특정 에피토프에 항체 분자가 특이적인 경우에 적용 가능하다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 분자는 TNFRSF1A, TNFRSF1B, GITR, NGFR, CD40 및/또는 DR6에 결합하지 않거나, 이에 어떠한 유의한 결합을 보이지 않는다.
- [0143] 항체 및 이의 작제 및 사용을 위한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면, Holliger and Hudson 2005에 기술되어 있다. 단클론 항체 및 기타 항체를 취하고 재조합 DNA 기술을 사용하여 원래 항체의 특이성을 유지하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생산하는 것이 가능하다. 이러한 기술은 하나의 항체 분자의 CDR 또는 가변 영역을 다른 항체 분자에 도입하는 것을 포함할 수 있다 (제EP-A-184187호, 제GB 2188638A호 및 제EP-A-239400호).
- [0144] CDR-기반 항원-결합 부위는 항체 가변 영역의 항원-결합 부위이다. CDR-기반 항원-결합 부위는 3개의 경쇄 가변 도메인 (VL) CDR 또는 3개의 중쇄 가변 도메인 (VH) CDR과 같은 3개의 CDR에 의해 형성될 수 있다. 바람직하게는 CDR-기반 항원-결합 부위는 6개의 CDR, 즉 3개의 VL CDR과 3개의 VH CDR에 의해 형성된다. 항원의 결합에 대한 상이한 CDR의 기여는 상이한 항원 결합 부위에서 변할 수 있다.
- [0145] 항원-결합 부위의 3개의 VH 도메인 CDR은 면역글로불린 VH 도메인 내에 위치할 수 있고 3개의 VL 도메인 CDR은 면역글로불린 VL 도메인 내에 위치할 수 있다. 예를 들면, CDR-기반 항원-결합 부위는 항체 가변 영역에 위치할 수 있다.
- [0146] 항체 분자는 제1 항원에 대해 하나 또는 바람직하게는 하나 이상, 예를 들면 2개의 CDR-기반 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 따라서 항체 분자는 1개의 VH 및 1개의 VL 도메인을 포함할 수 있지만 예를 들면, 자연-발생 IgG 분자의 경우와 같이 바람직하게는 2개의 VH 및 2개의 VL 도메인, 즉 2개의 VH/VL 도메인 쌍을 포함한다.
- [0147] CDR-기반 항원-결합 부위는 3개 VH CDR 또는 3개 VL CDR, 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, 또는 FS30-35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 항체 FS30-10-16의 3개 VH CDR 및 3개 VL CDR을 포함할 수 있다.
- [0148] 이들 항체의 VH 및 VL 도메인 서열은 다음과 같이 제시된다:
- [0149] (i) 서열 번호 FS30-10-16에 대한 VH 및 VL 도메인 서열은 각각 서열 번호 12 및 14에 표시되고;
- [0150] (ii) 서열 번호 FS30-10-3에 대한 VH 및 VL 도메인 서열은 각각 서열 번호 18 및 14에 표시되고;
- [0151] (iii) 서열 번호 FS30-10-12에 대한 VH 및 VL 도메인 서열은 각각 서열 번호 23 및 14에 표시되고;
- [0152] (iv) 서열 번호 FS30-35-14에 대한 VH 및 VL 도메인 서열은 각각 서열 번호 170 및 172에 표시되고;
- [0153] (v) 서열 번호 FS30-5-37에 대한 VH 및 VL 도메인 서열은 각각 서열 번호 40 및 42에 표시된다.
- [0154] 당해 분야 기술자는 위에 제시된 항체의 VH 및 VL 도메인 서열로부터 CDR의 서열을 결정하는데 어려움이 없을 것이다. CDR 서열은, 예를 들면, Kabat (Kabat et al., 1991) 또는 국제 ImMunoGeneTics 정보 시스템 (IMGT) (Lefranc et al., 2015)에 따라 결정될 수 있다.
- [0155] IMGT 번호매김에 따른 항체 분자의 VH 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 항체 분자의 VH 도메인의 위치 27-38, 56-65, 및 105-117에 위치한 서열일 수 있다.
- [0156] Kabat 번호매김에 따른 항체 분자의 VH 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 VH 도메인의 위치 31-35, 50-65, 및 95-102에 위치한 서열일 수 있다.
- [0157] IMGT 번호매김에 따른 항체 분자의 VL 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 VL 도메인의 위치 27-38, 56-

65, 및 105-117에 위치한 서열일 수 있다.

- [0158] Kabat 번호매김에 따른 항체 분자의 VL 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 VL 도메인의 위치 24-34, 50-56, 및 89-97에 위치한 서열일 수 있다.
- [0159] 예를 들면, 항체 분자는 다음의 VH 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 포함할 수 있다:
- [0160] (i) 각각 서열 번호 1, 2 및 3 [FS30-10-16];
- [0161] (ii) 각각 서열 번호 1, 2 및 16 [FS30-10-3];
- [0162] (iii) 각각 서열 번호 1, 2 및 21 [FS30-10-12];
- [0163] (iv) 각각 서열 번호 25, 26 및 27 [FS30-35-14]; 또는
- [0164] (v) 각각 서열 번호 33, 34 및 35 [FS30-5-37],
- [0165] 여기서 CDR 서열은 ImMunoGeneTics (IMGT) 번호매김 체계에 따라 정의된다.
- [0166] 항체 분자는 다음의 VH 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 포함할 수 있다:
- [0167] (i) 각각 서열 번호 7, 8 및 9 [FS30-10-16];
- [0168] (ii) 각각 서열 번호 7, 8 및 17 [FS30-10-3];
- [0169] (iii) 각각 서열 번호 7, 8 및 22 [FS30-10-12];
- [0170] (iv) 각각 서열 번호 29, 30 및 31 [FS30-35-14]; 또는
- [0171] (v) 각각 서열 번호 37, 38 및 39 [FS30-5-37],
- [0172] 여기서 CDR 서열은 Kabat 번호매김 체계에 따라 정의된다.
- [0173] 예를 들면, 항체 분자는 다음의 VL 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 포함할 수 있다:
- [0174] (i) 각각 서열 번호 4, 5 및 6 [FS30-10-16];
- [0175] (ii) 각각 서열 번호 4, 5 및 6 [FS30-10-3];
- [0176] (iii) 각각 서열 번호 4, 5 및 6 [FS30-10-12];
- [0177] (iv) 각각 서열 번호 4, 5 및 28 [FS30-35-14]; 또는
- [0178] (v) 각각 서열 번호 4, 5 및 36 [FS30-5-37],
- [0179] 여기서 CDR 서열은 ImMunoGeneTics (IMGT) 번호매김 체계에 따라 정의된다.
- [0180] 예를 들면, 항체 분자는 다음의 VL 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열을 포함할 수 있다:
- [0181] (i) 각각 서열 번호 10, 11 및 6 [FS30-10-16];
- [0182] (ii) 각각 서열 번호 10, 11 및 6 [FS30-10-3];
- [0183] (iii) 각각 서열 번호 10, 11 및 6 [FS30-10-12];
- [0184] (iv) 각각 서열 번호 10, 11 및 28 [FS30-35-14]; 또는
- [0185] (v) 각각 서열 번호 10, 11 및 36 [FS30-5-37],
- [0186] 여기서 CDR 서열은 Kabat 번호매김 체계에 따라 정의된다.
- [0187] 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, 및 FS30-10-12의 VH 및 VL 서열은 IMGT 번호매김 체계에 따른 VH의 위치 109에 있는 잔기 (Kabat 번호매김 체계에 따른 VH의 잔기 97)를 제외하고는 동일하다. 따라서, 항체 분자는 항체 FS30-10-16의 VH 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 및/또는 VL 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, VH 도메인 서열 및/또는 VL 도메인 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 항체 분자는 임의로 IMGT 번호매김 체계에 따른 중쇄의 위치 109 (Kabat 번호매김 체계에 따른 중쇄의 잔기 97)에 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 상기 위치의 잔기는 바람직하게는 아스파라긴 (N), 트레오닌 (T) 및 류신 (L)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0188] CDR-기반 항원-결합 부위는 VH 또는 VL 도메인, 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-

35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, 또는 FS30-35-14, 보다 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, 또는 FS30-10-12, 가장 바람직하게는 항체 FS30-10-16의 VH 및 VL 도메인을 포함할 수 있다.

- [0189] 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 및 FS30-5-37의 VH 도메인은 각각 서열 번호 12, 18, 23, 170, 및 40에 제시된 서열을 가질 수 있다. 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 및 FS30-5-37의 VL 도메인은 각각 서열 번호 14, 14, 14, 172, 및 42에 제시된 서열을 가질 수 있다.
- [0190] 본 발명의 항체 분자는 항체 분자의 불변 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함한다. 불변 도메인은 CL, CH1, CH2, CH3, 또는 CH4 도메인일 수 있으며, 바람직하게는 불변 도메인은 CH1, CH2, 또는 CH3 도메인, 보다 바람직하게는 CH2 또는 CH3 도메인, 가장 바람직하게는 CH3 도메인이다.
- [0191] 불변 도메인의 아미노산 잔기 위치는 달리 명시하지 않는 한 ImMunoGeneTics (IMGT) 번호매김 체계에 따라 본원에서 번호매겨진다. IMGT 번호매김 체계은 문헌 [Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 29, 185-203 (2005)]에 기술되어 있다.
- [0192] OX40 항원-결합 부위는 각각 불변 도메인의 제1, 제2 및 제3 구조적 루프에 위치한 제1, 제2 및 제3 서열을 포함할 수 있다. 표적 항원에 대한 항원-결합 부위를 생성하기 위한 항체 불변 도메인 구조적 루프의 조작은 당해 분야에 알려져 있으며, 예를 들면, 문헌 [Wozniak-Knopp et al., 2010], 및 특허 공개 제W02006/072620호 및 제W02009/132876호에 기술되어 있다. 바람직하게는, 제1, 제2 및 제3 구조적 루프는 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 AB, CD, 및 EF 구조적 루프이다. CH3 도메인에서, AB, CD, 및 EF 구조적 루프는 각각 CH3 도메인의 잔기 11-18, 43-78 및 92-101에 위치한다. 새로운 항원-결합 부위를 생성하기 위한 항체 불변 도메인의 구조적 루프 서열의 변형은, 예를 들면, 제W02006/072620호 및 제W02009/132876호에 기술되어 있다.
- [0193] 바람직한 구현예에서, 항체 분자의 OX40 항원-결합 부위는 다음의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함한다:
- [0194] (i) 각각 서열 번호 51, 52 및 53에 제시된 FS20-22-49;
- [0195] (ii) 각각 서열 번호 51, 59 및 60에 제시된 FS20-22-38;
- [0196] (iii) 각각 서열 번호 51, 52 및 60에 제시된 FS20-22-41;
- [0197] (iv) 각각 서열 번호 51, 52 및 65에 제시된 FS20-22-47; 또는
- [0198] (v) 각각 서열 번호 51, 52 및 68에 제시된 FS20-22-85.
- [0199] OX40 항원-결합 부위는 FS20-22-49, FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, 및 FS20-22-85의 AB, CD 및 EF 구조적 루프를 포함할 수 있으며, 여기서 AB, CD 및 EF 구조적 루프는 각각 CH3 도메인의 잔기 11-18, 43-78 및 92-101에 위치한 잔기이고, FS20-22-49, FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, 또는 FS20-22-85의 CH3 도메인은 각각 서열 번호 54, 61, 63, 66, 및 69에 제시되어 있다.
- [0200] 보다 바람직한 구현예에서, 항체 분자의 OX40 항원-결합 부위는 각각 서열 번호 51, 52 및 53에 제시된 FS20-22-49의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함한다. 예를 들면, OX40 항원-결합 부위는 각각 서열 번호 56, 57 및 58에 제시된 FS20-22-49의 AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열을 포함할 수 있다.
- [0201] 항체 분자의 OX40 항원-결합 부위가 FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49, 또는 FS20-22-85의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함하는 경우, 제1, 제2 및 제3 서열은 바람직하게는 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 14 내지 18, 45.1 내지 77, 및 93 내지 101에 위치한다.
- [0202] OX40 항원-결합 부위가 FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49, 또는 FS20-22-85의 AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열을 포함하는 경우, AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열은 바람직하게는 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 11 내지 18, 43 내지 78, 및 92 내지 101에 위치한다.
- [0203] 항체 분자는 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 91에 류신 (L)을 추가로 포함할 수 있다. 특히, FS20-22-85의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함하는 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자는 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 91에 류신을 포함할 수 있다.
- [0204] 대안적인 구현예에서, 항체 분자의 OX40 항원-결합 부위는 다음의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함한다:
- [0205] (i) 각각 서열 번호 71, 72 및 73에 제시된 FS20-31-58;

- [0206] (ii) 각각 서열 번호 71, 72 및 76에 제시된 FS20-31-66;
- [0207] (iii) 각각 서열 번호 79, 80 및 81에 제시된 FS20-31-94;
- [0208] (iv) 각각 서열 번호 84, 85 및 76에 제시된 FS20-31-102;
- [0209] (v) 각각 서열 번호 84, 88 및 89에 제시된 FS20-31-108; 또는
- [0210] (vi) 각각 서열 번호 84, 92 및 89에 제시된 FS20-31-115.
- [0211] OX40 항원-결합 부위는 FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 또는 FS20-31-115의 AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 AB, CD 및 EF 구조적 루프는 각각 CH3 도메인의 잔기 11-18, 43-78 및 92-101에 위치한 서열이고 FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 또는 FS20-31-115의 CH3 도메인은 각각 서열 번호 54, 61, 63, 66, 및 69에 제시된다.
- [0212] 항체 분자의 OX40 항원-결합 부위가 FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 또는 FS20-31-115의 제1, 제2 및 제3 서열을 포함하는 경우, 제1, 제2 및 제3 서열은 바람직하게는 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 14 내지 18, 45.1 내지 77, 및 92 내지 101에 위치한다.
- [0213] OX40 항원-결합 부위가 FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 또는 FS20-31-115의 AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열을 포함하는 경우, AB, CD 및 EF 구조적 루프 서열은 바람직하게는 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 11 내지 18, 43 내지 78, 및 92 내지 101에 위치한다.
- [0214] IMGT 번호매김에 대한 대안으로서, 본원에 기술된 바와 같은 아미노산 서열, 치환, 결실 및 삽입의 위치를 포함한 불변 도메인에서의 아미노산 잔기 위치는 IMGT 엑손 번호매김 (연속 번호매김이라고도 함), EU 번호매김, 또는 Kabat 번호매김에 따라 번호매김될 수 있다. CH3 도메인의 잔기 위치의 IMGT 번호매김, IMGT 엑손 번호매김, EU 번호매김, 및 Kabat 번호매김 간의 일치는 도 1에 도시되어 있다.
- [0215] 따라서, 예를 들면, 본 출원이 지칭하는 경우에, 도 1에 도시된 바와 같이, 잔기 위치가 IMGT 번호매김 체계에 따라 번호매김되는 경우, 제1, 제2 및 제3 서열은 각각 항체 분자의 CH3 도메인의 위치 14 내지 18, 45.1 내지 77, 및 93 내지 101에 위치하고, 잔기 위치가 IMGT 엑손 번호매김 체계에 따라 번호매김되는 경우, 제1, 제2 및 제3 서열은 CH3 도메인의 위치 18 내지 22, 46 내지 50, 및 74 내지 82에 위치한다.
- [0216] 하나의 구현예에서, 항체 분자는 FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49, FS20-22-85, FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 또는 FS20-31-115의 CH3 도메인 서열을 갖거나 이들로 구성된 CH3 도메인을 포함하고, 여기서 FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49, FS20-22-85, FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108, 및 FS20-31-115의 CH3 도메인 서열은 각각 서열 번호 54, 61, 63, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 90, 및 93에 제시된다.
- [0217] 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 서열 번호 54에 제시된 FS20-22-49의 CH3 도메인 서열을 포함하거나, 갖거나, 이들로 구성된 CH3 도메인을 포함한다.
- [0218] 항체 분자의 CH3 도메인은 CH3 도메인 서열의 바로 C-말단에 추가의 리신 잔기 (K)를 임의로 포함할 수 있다.
- [0219] 또한, 본 발명의 항체 분자는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 분자의 CH2 도메인과 같은 면역글로불린 G 분자의 CH2 도메인을 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 항체 분자는 IgG1 분자의 CH2 도메인을 포함한다. CH2 도메인은 서열 번호 48에 제시된 서열을 가질 수 있다.
- [0220] 항체 분자의 CH2 도메인은 Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII과 같은 하나 이상의 Fc γ 수용체, 및/또는 보체에 대한 CH2 도메인의 결합을 감소시키거나 없애는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 본 발명자들은 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키거나 없애는 것이 항체 분자에 의해 매개되는 ADCC를 감소시키거나 제거할 것이라고 가정한다. 유사하게, 보체에 대한 결합을 감소시키거나 없애는 것은 항체 분자에 의해 매개되는 CDC를 감소시키거나 제거할 것으로 예상된다. 하나 이상의 Fc γ 수용체 및/또는 보체에 대한 CH2 도메인의 결합을 감소시키거나 없애기 위한 돌연변이는 당해 분야에 공지되어 있다 (Wang et al., 2018). 이러한 돌연변이는 문헌 [Bruhns et al., 2009 and Hezareh et al., 2001]에 기술된 "LALA 돌연변이"를 포함하며, 이것은 CH2 도메인의 IMGT 위치 1.3 및 1.2에 류신 잔기를 알라닌 (L1.3A 및 L1.2A)으로 치환함을 포함한다. 대안적으로, CH2 도메인의 IMGT 위치 84.4에서 아스파라긴 (N)을 알라닌, 글리신 또는 글루타민 (N84.4A, N84.4G 또는 N84.4Q)으로 돌연변이시킴으로써 보존된 N-연결 글리코실화 부위의 돌연변이를 통한 α -글리코실 항체의 생성은 또한 IgG1 효과기 기능을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Wang et al., 2018). 추가의 대안으로서, 보체 활성화

화 (C1q 결합) 및 ADCC는 CH2 도메인의 IMGT 위치 114에서 프롤린의 알라닌 또는 글리신 (P114A 또는 P114G)으로의 돌연변이를 통해 감소되는 것으로 알려져 있다 (Idusogie et al., 2000; Klein et al., 2016). 이러한 돌연변이는 또한 ADCC 또는 CDC 활성이 더욱 감소되거나 없는 항체 분자를 생성하기 위해 조합될 수 있다.

- [0221] 따라서, 항체 분자는 CH2 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 CH2 도메인은 다음을 포함한다:
- [0222] (i) 위치 1.3 및 1.2의 알라닌 잔기; 및/또는
- [0223] (ii) 위치 114의 알라닌 또는 글리신; 및/또는
- [0224] (iii) 위치 84.4의 알라닌, 글루타민 또는 글리신;
- [0225] 여기서 아미노산 잔기 번호매김은 IMGT 번호매김 체계에 따라 이루어진다.
- [0226] 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 CH2 도메인을 포함하고, 여기서 CH2 도메인은 다음을 포함한다:
- [0227] (i) 위치 1.3의 알라닌 잔기; 및
- [0228] (ii) 위치 1.2의 알라닌 잔기;
- [0229] 여기서 아미노산 잔기 번호매김은 IMGT 번호매김 체계에 따라 이루어진다.
- [0230] 예를 들면, CH2 도메인은 서열 번호 49에 제시된 서열을 가질 수 있다.
- [0231] 대안적인 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 CH2 도메인을 포함하고, 여기서 CH2 도메인은 다음을 포함한다:
- [0232] (i) 위치 1.3의 알라닌 잔기;
- [0233] (ii) 위치 1.2의 알라닌 잔기; 및
- [0234] (iii) 위치 114의 알라닌;
- [0235] 여기서 아미노산 잔기 번호매김은 IMGT 번호매김 체계에 따라 이루어진다.
- [0236] 예를 들면, CH2 도메인은 서열 번호 50에 제시된 서열을 가질 수 있다.
- [0237] 바람직한 구현예에서, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자는
- [0238] (a) CD137에 대한 CDR-기반 항원-결합 부위; 및
- [0239] (b) 항체 분자의 CH3 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하고;
- [0240] 여기서 CDR-기반 항원-결합 부위는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 FS30-10-16, FS30-10-3, 또는 FS30-10-12, 보다 바람직하게는 FS30-10-16 또는 FS30-10-3, 가장 바람직하게는 FS30-10-16의 3개 VH CDR 및 3개 VL CDR (CDR 1-6)을 포함하고;
- [0241] 여기서 OX40 항원-결합 부위는 각각 CH3 도메인의 AB, CD 및 EF 구조적 루프에 위치한 제1 서열, 제2 서열 및 제3 서열을 포함하고, 각각 제1, 제2 및 제3 서열은 각각 서열 번호 51, 52 및 53에 제시된 FS20-22-49의 서열을 갖는다.
- [0242] 추가의 바람직한 구현예에서, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자는
- [0243] (a) CD137에 대한 CDR-기반 항원-결합 부위; 및
- [0244] (b) 서열 번호 54 [FS20-22-49]에 제시된 서열을 포함하거나, 갖거나, 이들로 구성된 CH3 도메인을 포함하고;
- [0245] 여기서 CDR-기반 항원-결합 부위는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 FS30-10-16, FS30-10-3, 또는 FS30-10-12, 보다 바람직하게는 FS30-10-16 또는 FS30-10-3, 가장 바람직하게는 FS30-10-16의 3개 VH CDR 및 3개 VL CDR (CDR 1-6)을 포함한다.
- [0246] 추가의 바람직한 구현예에서, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자는
- [0247] (a) CD137에 대한 CDR-기반 항원 결합 부위를 포함하는 VH 도메인 및 VL 도메인; 및
- [0248] (b) 서열 번호 54 [FS20-22-49]에 제시된 서열을 포함하거나, 갖거나, 이들로 구성된 CH3 도메인을 포함하고;
- [0249] 여기서 VH 및 VL 도메인은 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 FS30-10-16, FS30-10-3, 또는 FS30-10-12, 보다 바람직하게는 FS30-10-16 또는 FS30-10-3, 가장 바람직하게

는 FS30-10-16의 VH 및 VL을 포함하거나, 갖거나, 이들로 구성된다.

- [0250] 추가의 바람직한 구현예에서, CD137 및 OX40에 결합하는 항체 분자는 다음의 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하거나, 갖거나, 이들로 구성된 중쇄를 포함한다:
- [0251] (i) 각각 서열 번호 95 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-16;
- [0252] (ii) 각각 서열 번호 99 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-3;
- [0253] (iii) 각각 서열 번호 103 및 97에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-10-12;
- [0254] (iv) 각각 서열 번호 105 및 107에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-35-14; 또는
- [0255] (v) 각각 서열 번호 109 및 111에 제시된 FS20-22-49AA/FS30-5-37;
- [0256] 여기서 항체 분자는 바람직하게는 (i) 내지 (iv)에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 보다 바람직하게는 (i) 내지 (iii)에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 가장 바람직하게는 (i)에 제시된 경쇄 및 중쇄를 포함한다.
- [0257] 본 발명의 항체 분자는 또한 본원에 개시된 변이체 제1, 제2 또는 제3 서열, AB, CD 또는 EF 구조적 루프 서열, CH3 도메인, CH2 도메인, CH2 및 CH3 도메인, CDR, VH 도메인, VL 도메인, 경쇄 및/또는 중쇄 서열을 포함할 수 있다. 적합한 변이체는 서열 변경 또는 돌연변이 및 스크리닝의 방법에 의해 수득될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 변이체 서열을 포함하는 항체 분자는 CD137 및 OX40에 대한 결합 특이성 및/또는 결합 친화도와 같은 항체 분자의 기능적 특징 중 하나 이상을 보유한다. 예를 들면, 하나 이상의 변이체 서열을 포함하는 항체 분자는 (모) 항체 분자와 동일한 친화도 또는 더 높은 친화도로 CD137 및/또는 OX40에 결합한다. 모 항체 분자는 변이체 항체 분자에 포함된 아미노산 치환(들), 결실(들) 및/또는 삽입(들)을 포함하지 않는 항체 분자이다.
- [0258] 예를 들면, 본 발명의 항체 분자는 본원에 개시된 구조적 루프, CH3 도메인, CH2 도메인, CH2 및 CH3 도메인, CDR, VH 도메인, VL 도메인, 경쇄 또는 중쇄 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9% 서열 동일성을 갖는 제1, 제2 또는 제3 서열, AB, CD 또는 EF 구조적 루프 서열, CH3 도메인, CH2 도메인, CH2 및 CH3 도메인, CDR, VH 도메인, VL 도메인, 경쇄 및/또는 중쇄 서열을 포함할 수 있다.
- [0259] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 분자는 서열 번호 54 [FS20-22-49]에 제시된 CH3 도메인 서열과 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9% 서열 동일성을 갖는 CH3 도메인 서열을 포함한다.
- [0260] 추가의 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 서열 번호 48 또는 49에 제시된 CH2 도메인 서열과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9% 서열 동일성을 갖는 CH2 도메인 서열을 갖거나 포함한다.
- [0261] 서열 동일성은 일반적으로 알고리즘 GAP를 참조하여 정의된다 (Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP는 Needleman 및 Wunsch 알고리즘을 사용하여 두 개의 완전한 서열을 정렬하여 매치의 수를 최대화하고 갭의 수를 최소화한다. 일반적으로, 디폴트 모수가 사용되며 갭 생성 패널티는 12이고 갭 확장 패널티는 4와 같다. GAP의 사용이 선호될 수 있지만 다른 알고리즘, 예를 들어, BLAST (Altschul 등(1990)의 방법 사용), FASTA (Pearson 및 Lipman (1988)의 방법 사용), 또는 Smith-Waterman 알고리즘 (Smith and Waterman, 1981), 또는 일반적으로 디폴트 모수를 사용하는 상기 Altschul 등 (1990)의 TBLASTN 프로그램이 사용될 수 있다. 특히, psi-Blast 알고리즘 (Altschul et al., 1997)이 사용될 수 있다.
- [0262] 본 발명의 항체 분자는 또한 본원에 개시된 제1, 제2 및 제3 서열, AB, CD 또는 EF 구조적 루프 서열, CH3 도메인, CH2 도메인, CH2 및 CH3 도메인, Fcab, CDR, VH 도메인, VL 도메인, 경쇄 또는 중쇄 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 변형 (아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 및/또는 삽입), 바람직하게는 20개 이하 변형, 15개 이하 변형, 10개 이하 변형, 5개 이하 변형, 4개 이하 변형, 3개 이하 변형, 2개 이하 변형, 또는 1개 변형을 갖는 제1, 제2 및 제3 서열, AB, CD or EF 구조적 루프 서열, CH3 도메인, CH2 도메인, CH2 및 CH3 도메인, CDR, VH 도메인, VL 도메인, 경쇄 및/또는 중쇄를 포함할 수 있다. 특히, 변형은 VH 및 VL 도메인 서열 이외의 항체 분자의 하나 이상의 프레임워크 영역에서 및/또는 CH3 도메인의 하나 이상의 프레임워크 영역에서 이루어

질 수 있다. 예를 들면, 변형은 제1, 제2 및 제3 서열로서, 또는 AB, CD 또는 EF 구조적 루프 서열로서 본원에 기술된 서열 이외의 CH3 도메인에서 이루어질 수 있다.

[0263] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 분자는 서열 번호 54, 61, 63, 66, 69, 74, 77, 82, 86, 90, 또는 93에 제시된 CH3 도메인 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 변형 (아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 및/또는 삽입), 바람직하게는 20개 이하 변형, 15개 이하 변형, 10개 이하 변형, 5개 이하 변형, 4개 이하 변형, 3개 이하 변형, 2개 이하 변형, 또는 1개의 변형을 갖는 CH3 도메인 서열을 포함할 수 있다.

[0264] 추가의 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 서열 번호 48 또는 49에 제시된 CH2 도메인 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 변형 (아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 및/또는 삽입), 바람직하게는 20개 이하 변형, 15개 이하 변형, 10개 이하 변형, 5개 이하 변형, 4개 이하 변형, 3개 이하 변형, 2개 이하 변형, 또는 1개의 변형을 가진 CH2 도메인 서열을 포함한다.

[0265] 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 바람직한 구현예에서, 치환은, 예를 들면, 하기 표에 따르는 보존적 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 중간 열에서 동일한 범주의 아미노산이 서로 치환되며, 즉, 예를 들면 비극성 아미노산이 다른 비극성 아미노산으로 치환된다. 일부 구현예에서, 맨 오른쪽 열의 같은 줄에 있는 아미노산이 서로 치환된다.

지방족	비극성	GAP
		ILV
	극성-비하전됨	CSTM
		NQ
	극성 - 하전됨	DE
		KR
방향족		HFWY

[0266]

[0267] 일부 구현예에서, 치환(들)은 기능적으로 보존적일 수 있다. 즉, 일부 구현예에서 치환은 등가의 비치환된 항체 분자에 비해 치환을 포함하는 항체 분자의 하나 이상의 기능적 특성 (예를 들면, 결합 친화도)에 영향을 미치지 않을 수 있다 (또는 실질적으로 영향을 미치지 않을 수 있다).

[0268] 항체 분자는 바람직하게는 인간 CD137 및 인간 OX40에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 인간 CD137 및 인간 OX40에 동시에 결합할 수 있으며, 여기서 인간 CD137 및 인간 OX40은 공동-발현된다. 이러한 의미에서 공동-발현은 CD137 및 OX40이 동일한 세포, 예를 들면 T 세포와 같은 면역 세포에서 발현되는 상황 및 CD137 및 OX40이 상이한 세포, 예를 들어 종양 미세환경에서 서로 인접하여 위치한 두 개의 상이한 면역 세포에서 발현되는 상황을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체 분자는 시스에서 단일 세포 상의 두 표적 모두에 결합할 수 있을 뿐만 아니라 트랜스에서 상이한 세포에서 발현된 두 표적에 결합할 수 있는 것으로 믿어진다.

[0269] 항체 분자는 바람직하게는 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 또는 0.3 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 이량체성 인간 CD137에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 0.3 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 인간 CD137에 결합한다. 항체 분자는 단량체성 CD137보다 높은 친화도로 이량체성 CD137에 결합할 수 있다. 인간 CD137은, 예를 들면, 서열 번호 127에 제시된 서열을 가질 수 있다.

[0270] 항체 분자는 바람직하게는 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 또는 0.3 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 이량체성 인간 OX40에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 0.3 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 인간 OX40에 결합한다. 항체 분자는 단량체성 OX40보다 높은 친화도로 이량체성 OX40에 결합할 수 있다. 인간 OX40은, 예를 들면, 서열 번호 130에 제시된 서열을 가질 수 있다.

[0271] 항체 분자는 바람직하게는 시노물구스 CD137 및 시노물구스 OX40에 결합한다. 시노물구스 CD137 및 OX40 뿐만 아니라 인간 CD137 및 OX40에의 결합은 인간에 투여하기 전에 효능 및 독성에 대해 시노물구스 원숭이에서 항체 분자를 시험할 수 있기 때문에 유익하다. 바람직하게는, 항체 분자는 시노물구스 CD137 및 시노물구스 OX40에 동시에 결합할 수 있으며, 여기서 시노물구스 CD137 및 시노물구스 OX40은 공동-발현된다.

[0272] 항체 분자는 바람직하게는 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 또는 0.3 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 이량체성 시노물구스 CD137에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 0.3 nM의 친화도 (K_D) 또는 보다 높은 친화도로 이량체성 시노물구스 CD137에 결합한다. 시노물구

스 CD137은, 예를 들면, 서열 번호 129에 제시된 서열을 가질 수 있다.

- [0273] 항체 분자는 바람직하게는 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2.5 nM, 2 nM, 1.5 nM, 또는 1 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 이량체성 시노물구스 OX40에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 1 nM의 친화도 (K_D)로 또는 보다 높은 친화도로 시노물구스 OX40에 결합한다. 시노물구스 OX40은, 예를 들면, 서열 번호 131에 제시된 서열을 가질 수 있다.
- [0274] 항체 분자는 바람직하게는 항체 분자가 이량체성 인간 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 또는 5배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 시노물구스 OX40에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 항체 분자가 이량체성 인간 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 5배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 시노물구스 OX40에 결합한다.
- [0275] 항체 분자는 바람직하게는 항체 분자가 이량체성 인간 CD137에 결합하는 친화도 (K_D)의 30배, 20배, 10배, 5배, 4배, 3배, 또는 2배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 시노물구스 CD137에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 항체 분자가 이량체성 인간 CD137에 결합하는 친화도 (K_D)의 2배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 시노물구스 CD137에 결합한다.
- [0276] 본 실시예에 기술된 바와 같이, 인간 및 시노물구스 항원에 대한 결합의 유사성은 시노물구스 원숭이 연구에서 mAb²의 행동이 인간에게 외삽될 수 있기를 기대하기 때문에 유리할 수 있다고 생각된다. 이것은 시노물구스 원숭이에서 항체 분자로 수행된 효능 및 독성 연구를 수행하는데 유익한 것으로 생각되며, 이것은 인간에서 항체 분자의 효능 및 독성을 예측할 수 있다.
- [0277] 항체 분자는 바람직하게는 항체 분자가 이량체성 인간 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 또는 5배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 인간 CD137에 결합한다. 바람직하게는, 항체 분자는 항체 분자가 이량체성 인간 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 2배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 인간 CD137에 결합한다.
- [0278] 항체 분자는 바람직하게는 항체 분자가 이량체성 시노물구스 OX40에 결합하는 친화도 (K_D)의 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 또는 5배 이내의 친화도 (K_D)로 이량체성 시노물구스 CD137에 결합한다.
- [0279] 본 실시예에 기술된 바와 같이, 두 표적, 즉 CD137 및 OX40의 결합에 대해 유사한 친화도를 갖는 항체 분자가 유리할 수 있는데, 이는 항체 분자가 두 표적 모두를 발현하는 세포에 더 잘 결합할 수 있기 때문이라고 생각된다.
- [0280] 인간 OX40, 인간 CD137, 시노물구스 OX40, 또는 시노물구스 CD137과 같은 동족 항원에 대한 항체 분자의 결합 친화도는 예를 들면 Biacore와 같은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 결정될 수 있다. 세포 표면에서 발현되는 OX40 및 CD137에 대한 항체 분자의 결합 친화도는 유세포 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0281] 항체 분자는 리간드 결합에 대해 다양한 활성을 갖는 것으로 나타났다. 예를 들면 항체 분자는 CD137에 대한 CD137L의 결합을 차단할 수 있거나, 차단할 수 없거나, 부분적으로 차단할 수 있다.
- [0282] 바람직하게는, 항체 분자는 CD137에 대한 CD137L의 결합을 차단할 수 있거나, 차단할 수 없거나, 부분적으로 차단할 수 있다. 보다 바람직하게는, 항체 분자는 CD137에 대한 CD137L의 결합을 부분적으로 차단할 수 있다.
- [0283] 바람직하게는, 항체 분자는 두 표적이 공동-발현될 때 OX40 및 CD137 둘 다에 대한 이중 결합에 의한 가교결합의 결과로서 OX40 및/또는 CD137의 신호전달을 유도할 수 있다. 이러한 방식으로 작용함으로써, 이러한 항체 분자를 "이중 효능제"라고 하며, 즉, 항체 분자는 OX40 및 CD137 둘 다에 대한 이중 결합에 의한 가교결합의 결과로서 수용체를 통한 신호전달을 유도할 수 있다. 따라서, 바람직하게는 항체 분자는 OX40과 CD137 둘 다가 공동-발현될 때 이중 효능작용을 유발할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 이중 효능제는 유리할 것으로 예상된다. 예를 들면, 이러한 이중 효능제는 다른 면역 세포의 활성화를 조합하고, 예를 들어 트랜스로 상이한 세포에서 두 표적에 결합하여 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 활성을 조합할 수 있기 때문에 면역 반응의 더 강한 자극을 유도할 수 있다고 믿어진다. 추가의 예로서, 이러한 이중 효능제는 시스로 두 표적 모두에 결합함으로써 두 세포가 함께 상호작용할 필요없이 두 표적 모두를 공동-발현하는 단일 세포의 활성화를 초래할 수 있다고 믿어진다.

- [0284] 보다 바람직하게는, 이중 효능제는 특정 표적 (OX40 및 CD137)과의 동시 관여에 의해 그리고 추가적인 가교결합, 예를 들어 가교결합제 또는 Fc γ 수용체의 필요없이 자율적으로 효능작용을 유도할 수 있어야 한다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 자율적 활성화는 두 표적이 공동-발현되는 위치로 제한되기 때문에 유리한 것으로 예상되며 따라서 OX40의 공동-발현이 거의 또는 전혀없는 위치에서 CD137의 활성화와 잠재적으로 관련된 독성을 감소시킬 것으로 예상된다.
- [0285] T 세포를 활성화하는 항체 분자의 능력은 T 세포 활성화 분석을 사용하여 측정될 수 있다. T 세포는 활성화시 IL-2를 방출한다. 따라서 T 세포 활성화 분석은 IL-2 방출을 측정하여 항체 분자에 의해 유도된 T 세포 활성화의 수준을 결정할 수 있다.
- [0286] 예를 들면, T 세포를 활성화하는 항체 분자의 능력은 T 세포 활성화 분석에서 T 세포에 의해 IL-2의 절반-최대 방출을 달성하는데 필요한 항체 분자의 농도를 측정함으로써 결정된다. 이를 아래에서 EC₅₀이라고 한다.
- [0287] 바람직한 구현예에서, 항체 분자는 T 세포 활성화 분석에서 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 EC₅₀의 50배, 40배, 30배, 20배, 10배, 또는 5배 이내인 T 세포 활성화 분석에서의 EC₅₀을 가지며, 여기서 FS20-22-49AA/FS30-10-16은 서열 번호 95의 중쇄 및 서열 번호 97의 경쇄로 구성된다.
- [0288] 예를 들면, 항체 분자는 가교결합될 때 T 세포 활성화 분석에서 30 nM 이하, 25 nM 이하, 20 nM 이하, 14 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1.5 nM, 1 nM 또는 0.5 nM 이하, 바람직하게는 1.5 nM 이하, 보다 바람직하게는 1 nM 이하의 EC₅₀을 가질 수 있다.
- [0289] 추가로, 또는 대안적으로, T 세포를 활성화하는 항체 분자의 능력은 항체 분자의 존재하에 T 세포 활성화 분석에서 T 세포에 의해 방출되는 IL-2의 최대 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0290] 바람직한 구현예에서, 항체 분자의 존재하에 T 세포 활성화 분석에서 T 세포에 의해 방출되는 IL-2의 최대 농도는 동일 분석에서 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 존재하에 T 세포에 의해 방출되는 IL-2의 최대 농도의 20% 또는 10% 이내이며, 여기서 FS20-22-49AA/FS30-10-16은 서열 번호 95의 중쇄 및 서열 번호 97의 경쇄로 구성된다.
- [0291] T 세포 활성화 분석은 바람직하게는 OX40 및 CD137을 공동-발현하는 T 세포를 포함한다. 바람직한 구현예에서, T 세포 활성화 분석은 CD137 및 OX40 이외의 항체 분자를 가교결합할 수 있는 임의의 제제를 포함하지 않는다.
- [0292] T 세포 활성화 분석은 본 실시예에 기술된 바와 같은 pan-T 세포 분석, CD4+ T 세포 분석, 또는 CD8+ T 세포 분석과 같은 본원에 기술된 바와 같은 T 세포 분석일 수 있다.
- [0293] 예를 들면, T 세포 활성화 분석은 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 분리된 T 세포에 기초한 IL-2 방출 분석일 수 있다. CD4+ T 세포 활성화 분석 또는 CD8+ T 세포 활성화 분석은 각각 인간 PBMC로부터 분리된 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포에 기초한 IL-2 방출 분석일 수 있다. 본 실시예에 설명된 바와 같이, CD4+ 및 CD8+ T 세포 분석 둘 다에서 T 세포를 활성화시킬 수 있는 항체 분자는 OX40 및 CD137 둘 다를 활성화시킬 수 있다 ('이중 효능제'라고도 함). 예를 들면, T 세포 활성화 분석은 백혈구 고갈 콘 (leucocyte depletion cones)으로부터 인간 PBMC를 분리함을 포함할 수 있다. PBMC를 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 본 실시예에 기술되어 있다. 그 후 T 세포를 PBMC로부터 분리할 수 있다. PBMC로부터 T 세포 (모든 T 세포, CD4+ T 세포, 또는 CD8+ T 세포)를 분리하는 방법은 당해 분야에 다시 알려져 있고 본 실시예에 기술되어 있다.
- [0294] 활성화 분석은 예를 들면 T 세포 배지와 같은 실험 배지에서 필요한 수의 T 세포를 준비함을 포함할 수 있다. 필요한 수의 T 세포는 1.0×10^6 개 세포/ml의 농도로 준비될 수 있다. 그 후 T 세포는 T 세포 활성화에 필요한 신호를 제공하는 적절한 T 세포 활성화 시약을 사용하여 자극할 수 있다. 예를 들면, T 세포 활성화 시약은 CD3 및 CD28을 포함하는 비드와 같은 CD3 및 CD28을 포함하는 시약일 수 있다. 분리된 T 세포를 T 세포 활성화 시약과 함께 밤새 배양하여 T 세포를 활성화할 수 있다. 그 후, 활성화된 T 세포는 T 세포 활성화 시약으로부터 T 세포를 분리하기 위해 세척할 수 있고 2.0×10^6 개 세포/ml와 같은 적절한 농도로 T 세포 배지에 재현탁할 수 있다. 그 후 활성화된 T 세포를 항-인간 CD3 항체로 코팅된 플레이트에 첨가할 수 있다.
- [0295] 각 시험 항체 분자의 적절한 희석액을 제조하여 웰에 첨가할 수 있다. 그 후 T 세포를 시험 항체와 함께 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양할 수 있다. 상청액을 수집하고 상청액 중의 IL-2의 농도를 결정하기 위해 분석할 수 있다. 용액 중의 IL-2의 농도를 결정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 본 실시예에 기술되어 있다. 인간 IL-2의 농도를 항체 분자의 로그 농도에 대해 플롯팅할 수 있다. 생성된 곡선은 로그 (효능제) 대 반응

방정식을 사용하여 피팅할 수 있다.

- [0296] 항체 분자를 생체활성 분자 또는 검출 가능한 표지에 접합시킬 수 있다. 이 경우, 항체 분자를 접합체라고 할 수 있다. 이러한 접합체는 본원에 기술된 바와 같은 질환의 치료에 적용된다.
- [0297] 예를 들면, 생체활성 분자는 사이토카인, 바람직하게는 인간 사이토카인과 같은 면역계 조절제일 수 있다. 예를 들면, 사이토카인은 T 세포 활성화 및/또는 증식을 자극하는 사이토카인일 수 있다. 항체 분자에 접합하기 위한 사이토카인의 예는 IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, GM-CSF 및 IFN-감마를 포함한다.
- [0298] 대안적으로, 생체활성 분자는 사이토카인의, 예를 들어 TGF-베타 또는 IL-6의 리간드 트랩과 같은 리간드 트랩일 수 있다.
- [0299] 대안적으로, 생체활성 분자는 치료학적 방사성 동위원소일 수 있다.
- [0300] 방사면역요법은 예를 들면 암 치료에 사용된다. 방사면역요법에 적합한 치료학적 방사성 동위원소는 당해 분야에 공지되어 있으며 이트륨-90, 요오드-131, 비스무트-213, 아스타틴-211, 루테튬 177, 레늄-188, 구리-67, 악티늄-225, 및 요오드-125 및 테르븀-161을 포함한다.
- [0301] 항체 분자에 접합될 수 있는 적합한 검출 가능한 표지는 당해 분야에 공지되어 있으며, 방사성 동위원소, 예를 들어 요오드-125, 요오드-131, 이트륨-90, 인듐-111 및 테크네튬-99; 형광 색소, 예를 들어 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린, Texas Red 및 시아닌 염료 유도체, 예를 들면, Cy7 및 Alexa750; 색원체성 염료, 예를 들어 디아미노벤지딘; 라텍스 비드; 효소 표지, 예를 들어 서양고추냉이 퍼옥시다제; 스펙트럼적으로 분리된 흡수 또는 방출 특성을 가진 인 또는 레이저 염료; 및 화학적 모이어티, 예를 들면, 바이오틴을 포함하며, 이는 특이적인 동족의 검출가능한 모이어티, 예컨대, 표지된 아비딘에 대한 결합을 통해 검출될 수 있다.
- [0302] 항체 분자는 디설파이드 또는 펩티드 결합과 같은 임의의 적합한 공유 또는 비공유 결합에 의해 생체활성 분자 또는 검출 가능한 표지에 접합될 수 있다. 생체활성 분자가 사이토카인인 경우, 사이토카인은 펩티드 링커에 의해 항체 분자에 결합될 수 있다. 적합한 펩티드 링커가 당해 분야에 공지되어 있으며 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 10 내지 25, 10 내지 20, 또는 10 내지 15개 아미노산 길이일 수 있다.
- [0303] 일부 구현예에서, 생체활성 분자는 절단 가능한 링커에 의해 항체 분자에 접합될 수 있다. 링커는 치료 부위에서 항체 분자로부터 생체활성 분자를 방출할 수 있게 한다. 링커는 아마이드 결합 (예를 들어, 펩티드 링커), 디설파이드 결합 또는 하이드라존을 포함할 수 있다. 예를 들면 펩티드 링커는 부위 특이적 프로테아제에 의해 절단될 수 있고, 디설파이드 결합은 사이토질의 환원 환경에 의해 절단될 수 있으며, 하이드라존은 산-매개 가수분해에 의해 절단될 수 있다.
- [0304] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 분자를 암호화하는 단리된 핵산 분자 또는 분자들을 제공한다. 당해 분야 기술자는 당해 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 이러한 핵산 분자를 제조하는데 어려움이 없을 것이다.
- [0305] 핵산 분자 또는 분자들은, 예를 들면, 각각 FS20-22-49, FS20-22-38, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-85, FS20-31-58, FS20-31-66, FS20-31-94, FS20-31-102, FS20-31-108 및 FS20-31-115의 CH3 도메인을 암호화하는 서열 번호 55 또는 113, 62, 64, 67, 70, 75, 78, 83, 87, 91, 또는 94에 제시된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 핵산 분자 또는 분자들은 서열 번호 55 또는 113에 제시된 서열을 포함할 수 있으며, 이들 서열 둘 다 FS20-22-49의 CH3 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자 또는 분자들은 FS20-22-49의 CH3 도메인을 암호화하는 서열 번호 113에 제시된 서열을 포함한다. 바람직하게는, 핵산 분자 또는 분자들은 FS20-22-49의 CH3 도메인을 암호화하는 서열 번호 55에 제시된 서열을 포함한다.
- [0306] 핵산 분자 또는 분자들은 VH 도메인 및/또는 VL 도메인, 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-35-14, 또는 FS30-5-37, 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, FS30-10-12, 또는 FS30-35-14, 보다 바람직하게는 항체 FS30-10-16, FS30-10-3, 또는 FS30-10-12, 가장 바람직하게는 항체 FS30-10-16의 VH 도메인 및 VL 도메인을 암호화할 수 있다. 이들 항체의 VH 및 VL 도메인 서열은 본원에 기술되어 있다.
- [0307] 예를 들면, 핵산 분자(들)는 다음을 포함할 수 있다:
- [0308] (i) 서열 번호 13에 제시된 항체 FS30-10-16의 VH 도메인 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 15에 제시된 항체 FS30-10-16의 VL 도메인 핵산 서열; 또는
- [0309] (ii) 서열 번호 19에 제시된 항체 FS30-10-3의 VH 도메인 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 20에 제시된 항체 FS30-10-3의 VL 도메인 핵산 서열;

- [0310] (iii) 서열 번호 24에 제시된 항체 FS30-10-12의 VH 도메인 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 20에 제시된 항체 FS30-10-12의 VL 도메인 핵산 서열;
- [0311] (iv) 서열 번호 171에 제시된 항체 FS30-35-14의 VH 도메인 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 32에 제시된 항체 FS30-35-14의 VL 도메인 핵산 서열; 또는
- [0312] (v) 서열 번호 41에 제시된 항체 FS30-5-37의 VH 도메인 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 43에 제시된 항체 FS30-5-37의 VL 도메인 핵산 서열.
- [0313] 핵산 분자 또는 분자들은 중쇄 및/또는 경쇄, 바람직하게는 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-35-14, 또는 FS20-22-49AA/FS30-5-37, 바람직하게는 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, 또는 FS20-22-49AA/FS30-35-14, 보다 바람직하게는 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-10-3 또는 FS20-22-49AA/FS30-10-12, 가장 바람직하게는 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 중쇄 및 경쇄를 암호화할 수 있다. 이들 항체의 VH 및 VL 도메인 서열은 본원에 기술되어 있다.
- [0314] 예를 들면, 핵산 분자(들)는 다음을 포함할 수 있다:
- [0315] (i) 서열 번호 96에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 중쇄 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 98에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 경쇄 핵산 서열; 또는
- [0316] (ii) 서열 번호 100에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-3의 중쇄 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 102에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-3의 경쇄 핵산 서열;
- [0317] (iii) 서열 번호 104에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-12의 중쇄 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 102에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-10-12의 경쇄 핵산 서열;
- [0318] (iv) 서열 번호 106에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-35-14의 중쇄 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 108에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-35-14의 경쇄 핵산 서열; 또는
- [0319] (v) 서열 번호 110에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-5-37의 중쇄 핵산 서열, 및/또는 서열 번호 112에 제시된 항체 FS20-22-49AA/FS30-5-37의 경쇄 핵산 서열.
- [0320] 핵산이 본 발명의 항체 분자의 VH 및 VL 도메인, 또는 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 경우, 2개의 도메인 또는쇄는 2개의 별도의 핵산 분자에서 암호화될 수 있다.
- [0321] 단리된 핵산 분자가 본 발명의 항체 분자를 발현하는데 사용될 수 있다. 핵산은 일반적으로 발현을 위한 재조합 벡터의 형태로 제공될 것이다. 따라서 본 발명의 또 다른 양태는 상기 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 프로모터 서열, 종결자 단편, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타 적절한 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하는 적합한 벡터가 선택되거나 작제될 수 있다. 바람직하게는, 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현을 유도하는 적절한 조절 서열을 함유한다. 벡터는 경우에 따라 플라스미드, 바이러스 예를 들어 파지 또는 파지미드일 수 있다.
- [0322] 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자 또는 벡터는 숙주 세포에 도입될 수 있다. 숙주 세포로 핵산 또는 벡터를 도입하는 기술은 당해 분야에 잘 확립되어 있으며 임의의 적합한 기술이 사용될 수 있다. 재조합 항체 분자의 생산에 적합한 다양한 숙주 세포가 당해 분야에 공지되어 있으며, 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 숙주 세포를 포함한다. 바람직한 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 CHO, NS0, 또는 HEK 세포, 예를 들면 HEK293 세포이다.
- [0323] 본 발명의 또 다른 양태는 숙주 세포에서 항체 분자를 암호화하는 핵산을 발현하는 단계 및 임의로 이렇게 생산된 항체 분자를 단리 및/또는 정제하는 단계를 포함하여 본 발명의 항체 분자를 생산하는 방법을 제공한다. 숙주 세포를 배양하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 상기 방법은 항체 분자를 단리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 재조합 항체 분자의 정제를 위한 기술은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 단백질 A 또는 단백질 L를 사용하는 HPLC, FPLC 또는 친화 크로마토그래피를 포함한다. 일부 구현예에서, 정제는 항체 분자 상의 친화성 태그를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법은 또한 항체 분자를 임의로 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 아래 기술된 바와 같은 다른 성분들을 사용하여 약제학적 조성물로 제형화하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 설명된 바와 같이, CD137 및 OX40은 둘 다 T 세포를 포함한 면역계의 세포 상에서 발현된다. 예를 들면, OX40은 활성화된 T 세포, 특히 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 1형 T 헬퍼 (Th1) 세포, 2형

T 헬퍼 (Th2) 세포 및 조절 T (Treg) 세포, 및 종양-침윤 T 세포, 뿐만 아니라 활성화된 자연 살해 (NK) 세포를 포함한 면역계의 세포 상에서 발현된다. CD137은 T 세포, 특히 CD8+ T 세포, B 세포, NK 세포 및 종양-침윤 림프구 (TIL)를 포함한 면역계의 세포 상에서 발현된다. CD137은 CD8+ T 세포보다 낮은 수준으로 CD4+ T 세포 상에서 발현되지만 (실시예 14 및 도 6 참조) 또한 CD4+ T 세포의 일부 하위세트의 증식 및 활성화를 유도하는데 관여하는 것으로 나타났다 (Wen et al., 2002).

- [0324] OX40 활성화는 T 세포 활성화, T 세포 클론 확장, T 세포 분화 및 생존, 및 기억 T 세포의 생성을 향상시키는 역할을 하는 것으로 나타났다. CD 137 활성화는 CD8+ T 세포의 증식, 생존 및 세포독성 효과기 기능, 뿐만 아니라 CD8+ T 세포 분화 및 기억 CD8+ T 세포의 유지를 향상시키는 역할을 하는 것으로 나타났다. CD137의 활성화는 또한 NK 세포-매개된 ADCC, 뿐만 아니라 B 세포 증식, 생존 및 사이토카인 생산을 향상시키는 것으로 입증되었다.
- [0325] OX40 및 CD137의 면역 반응 강화 활성화에 비추어, OX40 및 CD137 효능제 분자를 암 치료의 맥락에서 조사하였으며 감염성 질환의 치료에도 적용될 것으로 예상된다.
- [0326] 따라서 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 특히 암 및 감염성 질환의 치료에서 치료적 응용에 유용할 수 있다.
- [0327] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 관련 양태는 다음을 제공한다;
- [0328] (i) 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기술된 항체 분자,
- [0329] (ii) 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 기술된 항체 분자,
- [0330] (iii) 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서의 본원에 기술된 항체 분자의 용도; 및
- [0331] (iv) 본원에 기술된 바와 같은 치료적 유효량의 항체 분자를 개체에게 투여함을 포함하여, 개체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.
- [0332] 개체는 환자, 바람직하게는 인간 환자일 수 있다.
- [0333] 치료는 일부 원하는 치료 효과, 예를 들면 상태 진행의 억제 또는 지연이 달성되는 임의의 치료 또는 치료법일 수 있으며, 진행률의 감소, 진행률의 중단, 상태의 개선, 상태의 치료 또는 완화 (부분적 또는 전염적), 상태의 하나 이상의 증상 및/또는 징후 예방, 개선, 지연, 완화 또는 정지 또는 치료의 부재하에서 예상되는 것 이상으로 개체 또는 환자의 생존 연장을 포함한다.
- [0334] 예방 조치 (즉, 예방)로서의 치료가 또한 포함된다. 예를 들면, 암과 같은 질환의 발생 또는 재발에 민감하거나 위험이 있는 개체가 본원에 기술된 바와 같이 치료될 수 있다. 이러한 치료는 개체에서 질환의 발생 또는 재발을 예방하거나 지연시킬 수 있다.
- [0335] 기술된 바와 같은 치료 방법은 항체 분자에 추가하여 개체에게 적어도 하나의 추가 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 따라서 본원에 기술된 항체 분자는 개체에게 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료와 조합하여 투여될 수 있다. 항체 분자가 다른 치료와 조합하여 개체에게 투여되는 경우, 추가 치료는 항체 분자의 투여와 동시에, 연속적으로 또는 별도로 개체에게 투여될 수 있다. 추가 치료가 항체 분자와 동시에 투여되는 경우, 항체 분자 및 추가 치료는 조합된 제제로서 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 추가 요법은 치료하고자 하는 질환에 대한 공지된 치료법 또는 치료제일 수 있다.
- [0336] 항체 분자는 단독으로 투여될 수 있지만, 항체 분자는 통상적으로 항체 분자에 추가하여 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있는 약제학적 조성물의 형태로 투여될 것이다. 따라서 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 항체 분자를 약제학적 조성물로 제형화하는 것을 포함하는 방법이 또한 제공된다.
- [0337] 약제학적 조성물은, 항체 분자에 추가하여, 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당해 분야의 당해 분야 기술자들에게 잘 알려진 다른 물질을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 대상체 (예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합당한 이익/위험 비에 상응하는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태에 관한 것이다. 각 담체, 부형제 등은 또한 제형의 다른 성분과 상용성이라는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 담체 또는 기타 물질의 정확한 특성은 주입, 주사 또는 아래에 논의

된 바와 같은 임의의 다른 적절한 경로 일 수 있는 투여 경로에 따라 좌우될 것이다.

- [0338] 예를 들어 주사에 의한 비경구, 예를 들면 피하 또는 정맥내 투여의 경우, 항체 분자를 포함하는 약제학적 조성물은 피로겐이 없고 적절한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 수 있다. 당해 분야의 관련 당해 분야 기술자들은, 예를 들면, 등장성 비히클, 예를 들어 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산 링거 주사액을 사용하여 적합한 용액을 잘 제조할 수 있다. 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌과 같은 항산화제; 방부제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 에틸 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3'-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 짝이온; 금속 복합체 (예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및 /또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함하여 필요에 따라 방부제, 안정제, 완충제, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 사용될 수 있다.
- [0339] 일부 구현예에서, 항체 분자는 투여 전 재구성을 위해 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 항체 분자는 개체에게 투여하기 전에 멸균수에서 재구성되고 염수와 혼합될 수 있다.
- [0340] 투여는 "치료적 유효량"으로 이루어질 수 있으며, 이것은 개체에게 이익을 보여주기에 충분하다. 투여되는 실제 양, 및 투여 속도와 시간-과정은 치료 대상의 성격과 중증도, 치료할 특정 개체, 개체의 임상 상태, 장애의 원인, 조성물의 전달 부위, 항체 분자의 유형, 투여 방법, 투여 일정 및 의료 종사자에게 알려진 기타 요인에 따라 좌우될 것이다. 치료의 처방, 예를 들어 투여량 등에 대한 결정은 일반의 및 다른 의사의 책임이며, 증상의 중증도 및/또는 치료중인 질환의 진행에 따라 좌우될 수 있다. 항체 분자의 적절한 용량은 당해 분야에 잘 알려져 있다 (Ledermann et al., 1991; Bagshawe et al., 1991). 투여되는 항체 분자에 적절한 것으로 본원에서 또는 문헌 [Physician's Desk Reference (2003)]에 나타난 특정 투여량이 사용될 수 있다. 항체 분자의 치료적 유효량 또는 적합한 용량은 동물 모델에서 시험관내 활성 및 생체내 활성을 비교함으로써 결정될 수 있다. 인간에게 마우스 및 기타 시험 동물의 유효량을 외삽하는 방법이 알려져 있다. 정확한 용량은 치료할 부위의 크기와 위치, 및 항체 분자의 정확한 특성을 포함한 다수의 요인에 따라 좌우될 것이다.
- [0341] 전형적인 항체 용량은 전신 적용의 경우 100 μ g 내지 1 g, 국소 적용의 경우 1 μ g 내지 1 mg의 범위이다. 초기 더 높은 부하량에 이어 1회 이상의 더 낮은 용량이 투여될 수 있다. 이것은 성인 개체의 단일 치료에 대한 용량이며, 어린이와 유아의 경우 비례하여 조정될 수 있고 분자량에 비례하여 다른 항체 형식에 대해서도 조정될 수 있다.
- [0342] 치료는 의사의 재량에 따라 매일, 매주 두 번, 매주 또는 매월 간격으로 반복될 수 있다. 개체에 대한 치료 일정은 항체 조성물의 약동학적 및 약력학적 특성, 투여 경로 및 치료될 상태의 특성에 따라 좌우될 수 있다.
- [0343] 치료는 주기적일 수 있으며, 투여 사이의 기간은 약 2주 이상, 예를 들어 약 3주 이상, 약 4주 이상, 약 한 달에 한 번 이상, 약 5주 이상 또는 약 6주 이상일 수 있다. 예를 들면, 치료는 2 내지 4주마다 또는 4 내지 8주마다 이루어질 수 있다. 적합한 제형 및 투여 경로는 위에 기술되어 있다.
- [0344] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0345] 암은 악성 암세포의 비정상적인 증식을 특징으로 할 수 있다. 유방암과 같은 특정 유형의 암이 언급되는 경우, 이것은 유방 조직과 같은 관련 조직의 악성 세포의 비정상적인 증식을 지칭한다. 유방에 위치하지만 난소 조직과 같은 다른 조직의 악성 세포의 비정상적인 증식의 결과인 이차 암은 본원에는 언급되는 유방암이 아니라 난소암이다.
- [0346] 암은 원발성 또는 이차성 암일 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것일 수 있으며, 여기서 암은 원발성 종양 및/또는 종양 전이이다.
- [0347] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암의 종양은 예를 들어 이들의 세포 표면 상에서 OX40 및/또는 CD137를 발현하는 TIL를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 종양은 OX40 및 CD137 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 TIL을 포함하는 것으로 결정되었을 수 있다. 세포 표면에서 항원의 발현을 결정하는 방

법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 유세포 분석을 포함한다.

- [0348] 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암은 백혈병, 예를 들어 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukaemia) (AML), 만성 골수성 백혈병 (chronic myeloid leukaemia) (CML), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukaemia) (ALL) 및 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocytic leukaemia) (CLL); 림프종, 예를 들어 호지킨 림프종 (Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin lymphoma) 및 다발성 골수종 (multiple myeloma); 및 고형 암, 예를 들어 육종 (예를 들어 연조직 육종), 피부암 (예를 들어 메르켈 세포 암종 (Merkel cell carcinoma)), 흑색종, 방광암 (예를 들어 방광 요로 상피 세포 암종 (bladder urothelial carcinoma)), 뇌암 (예를 들어 다형 교모세포종 (glioblastoma multiforme)), 유방암, 자궁/내막 암, 난소암 (예를 들어 난소 장액 낭선종 (ovarian serous cystadenoma)), 전립선암, 폐암 (예를 들어 비-소세포 폐 암종 (non-small cell lung carcinoma) (NSCLC), 예를 들어 폐 편평 세포 암종 (lung squamous cell carcinoma), 및 소세포 폐 암종 (small cell lung cancer) (SCLC)), 결직장암 (예를 들어 결직장 선암 (colorectal adenocarcinoma)), 자궁경부암 (예를 들어 자궁경부 편평 세포 암 (cervical squamous cell cancer) 및 자궁경부 선암 (endocervical adenocarcinoma)), 간암 (예를 들어 간세포 암종 (hepatocellular carcinoma)), 두경부암 (예를 들어 두경부 편평 세포 암종 (head and neck squamous-cell carcinoma)), 식도암 (예를 들어 식도 암종 (oesophageal carcinoma)), 췌장암, 신장암 (예를 들어 신세포 암 (renal cell cancer)), 부신암, 위암 (예를 들어 위 선암 (stomach adenocarcinoma)), 고환암 (예를 들어 고환 생식 세포 종양 (testicular germ cell tumours)), 담낭 및 담도의 암 (예를 들어 담관암 (cholangiocarcinoma)), 갑상선암, 흉선암, 골암, 및 대뇌 암으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0349] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암은 고형 암이다.
- [0350] 보다 바람직하게는, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암은 흑색종, 방광암, 뇌암, 유방암, 난소암, 폐암, 결직장암, 자궁경부암, 간암, 두경부암, 췌장암, 신장암 및 위암으로 구성된 그룹으로부터 선택된 고형 암이다.
- [0351] 추가의 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암은 PD-1, PD-L1 또는 CTLA4에 결합하는 항체와 같은 하나 이상의 체크-포인트 억제제로의 치료에 반응하는 암일 수 있다. 이러한 종양은 체크-포인트 억제제 요법에 반응하지 않는 종양보다 더 높은 TIL 수준 및/또는 더 높은 종양 돌연변이 부담을 갖는 것으로 생각된다. 이러한 종양을 따뜻한 종양 (warm tumor) 또는 뜨거운 종양 (hot tumor)이라고도 한다.
- [0352] 이러한 종양의 예는 두경부 편평 세포 암종 (head and neck squamous-cell carcinoma) (HNSCC), 흑색종 (melanoma), 폐암 (예를 들어 편평 폐암 (squamous lung cancer), 폐 선암 (lung adenocarcinoma), 비-소세포 폐암 (non-small cell lung carcinoma) [NSCLC] 또는 소세포 폐암 (small cell lung carcinoma) [SCLC]), 전립선암, 자궁경부암, 방광암, 유방암, 갑상선암, 신장암, 결직장암 (MSI 또는 MSS; 예를 들어, 결직장 선암종 (colorectal adenocarcinoma)), 식도암, 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma) (NHL), 위암, 자궁내막암, 췌장암, 난소암, 간세포 암종, 중피종 (mesothelioma) 및 요로 상피암 (urothelial cancer)을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 암은 위암이다. 암은 추가로 이전에 화학요법제 또는 방사선치료제로 치료된 적이 없는 암일 수 있으며, 즉 치료될 개체는 해당 암에 대해 화학요법제 또는 방사선치료제로 치료받지 않은 암 환자일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 개체에서 하나 이상의 면역-체크포인트 억제제에 반응하는 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이며, 여기서 상기 방법은 항체 분자를 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제하는 제제와 조합하여 환자를 치료하는 것을 포함한다.
- [0353] 대안적으로, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 암은 PD-1, PD-L1 또는 CTLA4에 결합하는 항체와 같은 하나 이상의 체크-포인트 억제제로의 치료에 반응하지 않는 췌장암 또는 전립선암과 같은 암일 수 있다. 이러한 종양을 차가운 종양 (cold tumour)이라고도 한다.
- [0354] 본 발명자들은 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체 단독으로의 치료에 반응하지 않는 종양이 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합된 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체로의 치료에 반응하였음을 보여주었다. 따라서, 본 발명의 항체 분자는 개체에서 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것일 수 있으며, 여기서 암은 하나 이상의 체크-포인트 억제제 단독으로의 처리에 반응하지 않거나 불응성이고, 상기 방법은 항체 분자를 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제하는 제제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 항체 분자를 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제하는 제제와 조합하여 개체에게 투여함을 포함하여, 개체에서 하나 이상의 체크-포인트 억제제 단독으로의 처리에 반응하지 않거나 불응성인 암을 치료하는 방법이 또한 고려된다.

- [0355] 이론에 결부시키고자 함이 없이, 하나 이상의 체크-포인트 억제제 단독, 화학요법, 방사선 요법, 면역자극제와 같은 면역치료제 또는 항종양 백신을 사용한 치료에 반응하지 않는 암의 치료는 암세포 사멸을 초래할 것이며, 이것이 차례로 종양의 TIL의 증가와 면역억제 수용체의 더 높은 발현을 초래하고, 이것이 차례로 암이 체크-포인트 억제제를 사용한 치료에 반응하게 만들고, 즉, 자가운 종양을 따뜻한 종양으로 바꿀 것으로 생각된다. 따라서, 본 발명의 항체 분자는 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것일 수 있으며, 여기서 암은 하나 이상의 체크-포인트 억제제 단독을 사용한 치료에 반응하지 않거나 불응성이고, 여기서 상기 방법은 항체 분자를 화학요법제, 방사선 치료제, 또는 면역자극제, 또는 항암 백신 및 임의로 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용을 억제하는 제제와 조합하여 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 항체 분자를 화학요법제, 방사선 치료제, 또는 면역자극제, 또는 항암 백신 및 임의로 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용을 억제하는 제제와 조합하여 개체에게 투여함을 포함하여, 개체에서 하나 이상의 체크-포인트 억제제 단독을 사용한 치료에 반응하지 않거나 불응성인 암을 치료하는 방법이 또한 고려된다. 바람직한 구현예에서, PD-1과 PD-L1 간의 상호작용을 억제하는 제제는 PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 항체이다.
- [0356] 암의 맥락에서, 치료는 완전한 암 완화를 포함한 암 성장 억제 및/또는 암 전이 억제 뿐만 아니라 암 재발 억제를 포함할 수 있다. 암 성장은 일반적으로 더 발달된 형태로의 암 내에서의 변화를 나타내는 다수의 지표 중 어느 하나를 나타낸다. 따라서, 암 성장 억제를 측정하기 위한 지표는 암세포 생존의 감소, 종양 용적 또는 형태의 감소 (예를 들면, 컴퓨터 단층 촬영 (CT), 초음파 검사 또는 기타 영상화 방법을 사용하여 결정됨), 종양 성장 지연, 종양 혈관구조의 파괴, 지연 과민 피부 검사의 성능 향상, 항암 면역 세포 또는 기타 항암 면역 반응의 활성 증가, 및 종양-특이 항원 수준의 감소를 포함한다. 개체에서 암성 종양에 대한 면역 반응을 활성화하거나 향상시키는 것은 개체의 암 성장, 특히 대상체에 이미 존재하는 암의 성장에 저항하는 능력을 개선하고/하거나 개체에서 암 성장 성향을 감소시킬 수 있다.
- [0357] 암 치료의 맥락에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 다른 항암 요법 또는 치료제, 예를 들어 해당 암의 치료에 적합하거나 잠재적으로 적합한 것으로 밝혀진 항암 요법 또는 치료제와 조합하여 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 항체 분자는 화학요법제, 방사선 요법, 방사성 핵종, 면역치료제, 항종양 백신, 종양용해성 바이러스, 입양 NK 세포 요법과 같은 입양 세포 전이 (ACT) 요법 또는 키메라 항원 수용체 (CAR) T-세포, 자가 TIL 또는 감마/델타 T 세포를 사용한 요법, 또는 호르몬 요법용 제제와 조합하여 개체에 투여될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 또한 보조제 (adjuvant) 또는 신보조제 (neoadjuvant), 예를 들어, 신보조 호르몬 요법, 항-혈관형성제, 예를 들어 항-VEGF 또는 항-VEGFR2 항체, 또는 세포독성제와 조합하여 개체에게 투여될 수 있다.
- [0358] 이론에 결부시키고자 함이 없이, 본원에 기술된 항체 분자는 항암 요법에서 보조제로서 작용할 수 있는 것으로 생각된다. 구용적으로, 화학요법 또는 방사선 요법과 조합하여 항체 분자를 개체에게 투여하는 것은, 예를 들면, 화학요법 또는 방사선 요법 단독으로 달성되는 것보다 암에 대한 더 큰 면역 반응을 유발할 것으로 생각된다.
- [0359] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 하나 이상의 화학요법제는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다: 타산, 세포독성 항생제, 티로신 키나제 억제제, PARP 억제제, B-Raf 효소 억제제, MEK 억제제, c-MET 억제제, VEGFR 억제제, PDGFR 억제제, 알킬화제, 백금 유사체, 뉴클레오시드 유사체, 항염산, 탈리도마이드 유도제, 항신생물성 화학요법제 및 기타. 타산은 도세탁셀, 파클리탁셀 및 nab-파클리탁셀을 포함하고; 세포독성 항생제는 악티노마이신, 블레오마이신 및 안트라사이클린, 예를 들어 독소루비신, 미톡산트론 및 발루비신을 포함하고; 티로신 키나제 억제제는 에를로티닙, 게피티닙, 악시티닙, PLX3397, 이마티닙, 코베미티닙 및 트라메티닙을 포함하고; PARP 억제제는 피라파립을 포함하고; B-Raf 효소 억제제는 베무라페닙 및 다브라페닙을 포함하고; 알킬화제는 다카르바진, 사이클로포스파미드 및 테모졸로미드를 포함하고; 백금 유사체는 카보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴을 포함하고; 뉴클레오시드 유사체는 아자시티딘, 카페시타빈, 플루다라빈, 플루오로우라실 및 젬시타빈을 포함하고; 항염산은 메토크렉세이트 및 페메트렉시드를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 다른 화학요법제는 데팩티닙, 엔티노스타트, 에리블린, 이리노테칸 및 빈블라스틴을 포함한다. 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 화학요법제는 플루오로피리미딘일 수 있다. 예를 들면, 치료하고자 하는 암이 HER2 음성인 경우, 예를 들어 HER2 음성 위암인 경우, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 백금, 백금 유사체 및 플루오로피리미딘과 조합하여 투여될 수 있다. 치료하고자 하는 암이 HER2 양성인 경우, 예를 들어 HER2 양성 위암인 경우, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 백금 또는 백금 유사체, 플루오로피리미딘 및 트라스투주맵과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0360] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 투여하기에 바람직한 치료제는 독소루비신, 미톡산트론, 사이클로포스파

미드, 시스플라틴, 및 옥살리플라틴이다.

- [0361] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 방사선 요법은 외부 빔 방사선 요법 또는 근접요법일 수 있다.
- [0362] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 투여하기 위한 방사성 핵종은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다: 이트륨-90, 요오드-131, 비스무트-213, 아스타틴-211, 루테튬 177, 레늄-188, 구리-67, 악티늄-225, 요오드-125 및 테르븀-161.
- [0363] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 면역치료제는 치료 항체 분자, 뉴클레오타이드, 사이토카인, 또는 사이토카인-기반 요법일 수 있다. 예를 들면, 치료 항체 분자는 면역 조절 분자, 예를 들어 억제성 체크포인트 분자 또는 면역 공동자극 분자, 선천 면역계의 수용체, 또는 종양 항원, 예를 들어 세포 표면 종양 항원 또는 가용성 종양 항원에 결합할 수 있다. 치료 항체 분자가 결합할 수 있는 면역 조절 세포의 예는 CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, 프로그램된 사멸-리간드 1 (PD-L1), 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1), CD47, CD73, CSF-1 R, KIR, CD40, HVEM, IL-10 및 CSF-1을 포함한다. 치료 항체 분자가 결합할 수 있는 선천 면역계의 수용체의 예는 TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, RIG-I-유사 수용체 (예를 들어 RIG-I 및 MDA-5), 및 STING을 포함한다. 치료 항체 분자가 결합할 수 있는 종양 항원의 예는 HER2, EGFR, CD20 및 TGF-베타를 포함한다.
- [0364] 본 발명자들은 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 조합된 본 발명의 항체 분자의 투여가 본 발명의 항체 분자 또는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체 단독으로의 치료에 비해 마우스 종양 모델에서 향상된 T 세포 활성화 및 종양 퇴행을 초래하였음을 보여 주었다. 이론에 결부시키고자 함이 없이, 이러한 결과는 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제와 조합된 본 발명의 항체 분자의 투여가 항-종양 효과를 향상시킬 뿐만 아니라 이러한 조합 투여가 PD-1 또는 PD-L1 항체 단일요법 후 불응성이거나 저항성이거나 재발된 종양의 치료에 적합할 수 있음을 시사한다.
- [0365] 따라서, 본 발명의 항체 분자는 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것일 수 있으며, 여기서 상기 방법은 항체 분자를 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 또한 개체에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한, PD1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제, 예를 들어 PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 항체 분자가 제공되며, 여기서 상기 방법은 본 발명의 항체와 조합하여 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 개체에서 암을 치료하는 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 항체 분자 및 치료적 유효량의 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제를 개체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0366] 바람직한 구현예에서, PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 제제는 PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 항체 분자이다. PD-1에 결합하는 항체는 당해 분야에 공지되어 있으며 니볼루맵 (5C4) 및 펌브롤리주맵을 포함한다. PD-L1에 결합하는 알려진 항체는 YW243.55.S1, 두르발루맵, 아테졸리주맵 및 아벨루맵을 포함한다. 본 발명의 항체 분자는 이러한 알려진 항-PD-1 또는 PD-L1 항체 중의 하나와, 또는 다른 항-PD-1 또는 PD-L1 항체와 투여하기 위한 것일 수 있다. PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 대체 항체의 제조는 일상적인 방법을 사용하는 당해 분야 기술자의 능력 내에 있다.
- [0367] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 핵산은 siRNA일 수 있다.
- [0368] 사이토카인 또는 사이토카인-기반 요법은 IL-2, 접합된 IL2의 전구약물, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-9, IL-15, IL-18, IL-21, 및 I형 인터페론으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0369] 암의 치료를 위한 항종양 백신은 둘 다 클리닉에서 구현되었으며 과학 문헌 (예를 들어 Rosenberg, 2000)에서 상세히 논의되었다. 이것은 주로 면역계가 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)의 유무에 관계없이 이들 세포를 백신화 방법으로 사용함으로써 자가 또는 동종 암세포에 의해 발현되는 다양한 세포 마커에 반응하도록 유도하는 전략을 포함한다. GM-CSF는 항원 제시에서 강한 반응을 일으키며 상기 전략과 함께 사용될 때 특히 잘 작동한다.
- [0370] 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 또한 암을 가진 개체, 특히 위암을 가진 개체에서 라무시루맵 및/또는 파클리탁셀; 이리노테칸 및 도세탁셀 또는 파클리탁셀; 또는 펌브롤리주맵과 조합하여 투여될 수 있다. 펌브롤리주맵과 조합된 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자로의 치료가 MSI-H 및/또는 dMMR 위암의 치료에 바람직하다.
- [0371] OX40 및 CD137의 면역 반응 강화 활성화에 비추어 볼 때, OX40 및 CD137 이중 효능제 분자는 감염성 질환의 치료

에 적용될 것으로 예상된다. 따라서, 또 다른 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 급성 또는 지속성 감염성 질환과 같은 감염성 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0372] 이론에 결부시키고자 함이 없이, OX40 및 CD137 효능제 분자는 호중구 및 단핵구와 같은 선천성 면역 세포의 신속한 침투 및 활성화를 유도함으로써 병원균에 의해 유발되는 급성 감염성 질환에 대한 면역 반응을 향상시켜 급성 감염성 질환을 책임지는 병원균의 제거를 촉진할 수 있다고 생각된다. 따라서, 추가의 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 급성 바이러스 질환과 같은 급성 감염성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 급성 감염성 질환은 리스테리아 (*Listeria*), 스트렙토코커스 뉴모니에 (*Streptococcus pneumoniae*) 또는 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 속의 박테리아와 같은 그람-양성 박테리아에 의한 감염에 의해 유발된 급성 박테리아 질환이다.

[0373] 감염성 질환은 통상적으로 면역계에 의해 제거되지만 일부 감염은 수개월 또는 수년과 같이 오랜 기간 동안 지속되며 면역계에 의해 비효과적으로 퇴치된다. 이러한 감염을 지속성 또는 만성 감염이라고도 한다.

[0374] 바람직하게는, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자는 지속성 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 감염, 바람직하게는 지속성 바이러스 또는 박테리아 감염과 같은 지속성 감염성 질환을 치료하는데 사용된다.

[0375] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 지속성 바이러스 감염은 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 수두 대상포진 바이러스의 지속성 감염이다.

[0376] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 지속성 박테리아 감염은 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 헤모필루스 인플루엔자 (*Hemophilus influenza*), 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*), 트레포네마 팔리둠 (*Treponema pallidum*), 엔테로코커스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 또는 스트렙토코커스 뉴모니에 (*Streptococcus pneumoniae*)의 지속성 감염이다.

[0377] CD137 효능작용은 그람 양성 박테리아에 의한 감염의 치료의 맥락에서 유익한 것으로 기술되었다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 지속성 박테리아 감염은 그람-양성 박테리아에 의한 지속성 감염이다. 보다 바람직한 구현예에서, 지속성 박테리아 감염은 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 엔테로코커스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 및 스트렙토코커스 뉴모니에 (*Streptococcus pneumoniae*)로 구성된 그룹으로부터 선택된 그람-양성 박테리아에 의한 지속성 감염이다.

[0378] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 지속성 진균 감염은 칸디다, 예를 들어 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 크립토코커스 (*Cryptococcus*) (가티이 및 네오프로만스), 탈라로마이세스 (*Talaromyces*) (페니실륨) 마르네페, 마이크로스포륨, 예를 들어 마이크로스포륨 오두이니 (*Microsporium audouinii*), 및 트리코피톤 톤수란스 (*Trichophyton tonsurans*)의 지속성 감염이다.

[0379] 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자를 사용하여 치료하고자 하는 지속성 기생충 감염은 플라스모듐 (*Plasmodium*), 예를 들어 플라스모듐 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 또는 리슈마니아 (*Leishmania*), 예를 들어 리슈마니아 도노바니 (*Leishmania donovani*)의 지속성 감염이다.

[0380] 지속성 감염성 질환의 치료의 맥락에서, 항체 분자는 해당 병원체의 치료에 적합하거나 적합할 것으로 예상되는 제2 요법 또는 치료제와 조합하여 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 항체 분자는 면역치료제와 조합하여 개체에게 투여될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 항체 분자와 조합하여 투여하기 위한 면역치료제는 치료 항체 분자일 수 있다. 예를 들면, 치료 항체 분자는 선천 면역계의 수용체에 결합할 수 있다. 치료 항체 분자가 결합할 수 있는 선천 면역계의 수용체의 예는 TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, RIG-I-유사 수용체 (예를 들어 RIG-I 및 MDA-5), 및 STING을 포함한다.

[0381] 항체 분자가 감염성 질환을 예방하기 위해 사용되는 경우, 항체 분자는 해당 병원체에 대한 백신과 조합하여 투여될 수 있다. 이론에 결부시키고자 함이 없이, 본원에 기술된 항체 분자는 백신 접종에서 보조제로서 작용할 수 있다고 생각된다. 구용적으로, 항체 분자를 백신과 조합하여 개체에 투여하면 백신 단독으로 달성되는 것보다 병원체에 대한 더 큰 면역 반응을 유발할 것으로 생각된다.

[0382] 지속성 감염성 질환의 치료의 맥락에서, 치료는 감염 제거, 개체의 병원성 부하 감소 및 감염 재발 방지를 포함

할 수 있다. 예를 들면, 치료는 지속성 감염의 하나 이상의 증상 및/또는 징후를 예방, 개선, 지연, 경감 또는 정지시키는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 치료는 감염성 질환 예방을 포함할 수 있다.

[0383] 특정 형태로 표현되거나 개시된 기능을 수행하기 위한 수단 또는 개시된 결과를 얻기 위한 방법 또는 공정의 관점에서 적절하게 표현된 기술한 설명, 또는 하기 청구 범위, 또는 첨부 도면에 개시된 특징은 별도로 또는 이러한 특징의 임의의 조합으로 본 발명을 이의 다양한 형태로 실현하기 위해 이용될 수 있다.

[0384] 본 발명이 기술한 예시적인 구현예와 관련하여 기술되었지만, 본 개시가 주어질 때 다수의 동등한 수정 및 변경이 당해 분야의 당해 분야 기술자들에게 명백할 것이다. 따라서, 상기 제시된 본 발명의 예시적인 구현예는 예시적인 것이며 제한하지 않는 것으로 간주된다. 기술된 구현예에 대한 다양한 변경이 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

[0385] 의심의 여지를 없애기 위해, 본원에 제공된 이론적 설명은 독자의 이해를 높이기 위한 목적으로 제공된다. 본 발명자들은 이러한 이론적 설명에 구속되기를 원하지 않는다.

[0386] 본원에서 사용된 모든 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되며 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0387] 뒤따르는 청구 범위를 포함하여 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(include)", 및 "포함하다(comprises)", "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 제외하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0388] 명세서 및 첨부된 청구 범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나(a, an)" 및 "그(the)"는 문맥상 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 것을 주지해야 한다. 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값 및/또는 "약" 다른 특정 값으로 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 다른 구현예는 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 선행사 "약"의 사용에 의해 근사치로 표현될 때, 특정 값이 또 다른 구현예를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 수치와 관련하여 용어 "약"은 선택적이며 예를 들면 +/- 10%를 의미한다.

[0389] 실시예

[0390] 본 발명자들은 인공 가교결합제 또는 Fcγ 수용체-매개 가교결합의 부재하에 OX40 및 CD137 둘 다를 효능화할 수 있고 압과 같은 질환에 대해 향상된 면역 반응을 생성할 수 있는 mAb²를 생성하는 것을 목표로 하였다. 이와 관련하여, mAb²는 CD137에 결합하는 CDR-기반 항원-결합 부위 및 항체 분자의 CH3 도메인에 위치한 OX40 항원-결합 부위를 포함하는 항체 분자이다.

[0391] 이러한 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 먼저 각각 인간과 마우스에서 OX40에 결합하고 T 세포 활성화를 유도할 수 있는 Fcab를 확인하기 위해 선택 및 친화성 성숙 방법을 사용하였다 (실시예 2 및 3 참조). 본 발명자들은 이후에 이들 Fcab로부터의 OX40 항원-결합 부위를 mAb² 형식으로 도입하였고, 이들 항-인간 OX40 "모의" mAb² 중 여러 개가 높은 친화도로 인간 및 시노물구스 OX40에 결합하고 가교결합될 때 T 세포를 활성화할 수 있음을 보여 주었다 (실시예 4 참조). 이들 중에서, 클론 FS20-22-49는 가교결합시 효능적 활성의 가장 높은 증가를 보였고 또한 가교결합의 존재하에 이의 효능적 활성화에 대해 가장 낮은 EC₅₀을 가졌으며 따라서 대상 mAb²의 개발을 위해 OX40 항원-결합 부위로서 진행시켰다.

[0392] CD137에 결합하고 이를 효능화할 수 있는 CDR-기반 항원 결합 부위를 개발하기 위해, 본 발명자들은 선택 방법을 사용하여 인간 CD137에 결합할 수 있고 가교결합될 때만 T 세포를 활성화할 수 있는 단클론 항체 (mAb)를 확인하였다 (실시예 5 참조). 이들 확인된 mAb로부터의 CDR을 FS20-22-49 OX40 항원 결합 부위를 포함하는 mAb²로 후속적으로 클로닝하였다. 다음의 mAb²를 생산하기 위해 이들 mAb²의 CDR을 서열 최적화하였다: FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-35-14 및 FS20-22-49AA/FS30-5-37 (실시예 6 참조). 이러한 mAb² 모두는 인간 CD137에 대해 높은 수준의 특이성을 가지고 T 세포 활성화 분석에서 가교결합될 때 CD137을 활성화할 수 있음이 입증되었다 (실시예 7 참조). 어떠한 mAb²도 가교결합의 부재하에서 CD137을 활성화하는 상당한 능력을 나타내지 않았다.

- [0393] 선택된 mAb²에서 FS20-22-49AA OX40 항원-결합 부위가 가교결합될 때 OX40에 결합하여 활성화할 수 있고, 별도로, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-10-16, FS30-35-14 및 FS30-5-37 CD137 CDR-기반 항원-결합 부위가 가교결합될 때 CD137에 결합하여 활성화할 수 있는 것으로 확인되었지만, 본 발명자들은 이러한 항원-결합 도메인을 함유하는 mAb²가 OX40 및 CD137 둘 다를 활성화할 수 있음 ('이중 효능작용'이라고도 함)을 입증하고자 하였다. 이러한 이중 효능제는 i) OX40에 결합하여 mAb²를 가교결합시키고, CD137에 결합하고, 클러스터링하고, 활성화(효능화)할 수 있고, ii) CD137에 결합하여 mAb²를 가교결합시키고, OX40에 결합하고, 클러스터링하고, 활성화(효능화)할 수 있었다. 중요하게도, 이중 효능제는 특정 표적(OX40 및 CD137)의 발현을 기반으로 하고 추가의 가교결합제에 대한 필요 없이도 효능작용을 자율적으로 유도할 수 있어야 한다.
- [0394] 본 발명자들은 시험된 mAb² 분자가 인간 CD137, 인간 OX40, 시노물구스 CD137 및 시노물구스 OX40에 결합할 수 있고 (실시예 8 참조) 시험된 mAb² 분자가 인간 CD137 및 인간 OX40에 동시에 결합할 수 있음을 입증하였다 (실시예 9 참조). 본 발명자들은 mAb²의 CH2 도메인에서 'LALA' 돌연변이가 Fc γ 수용체에 대한 이들의 결합을 감소시켰으며 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16이 ADCC 생물학적 분석에서 ADCC 활성화를 유도할 수 없었음을 보여 주었다 (실시예 10 참조). 본 발명자들은 또한 시험된 OX40/CD137 mAb² 분자가 세포-발현된 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137에 결합하고, 비특이적 결합은 관찰되지 않음을 보여주었다 (실시예 11 참조).
- [0395] 그후 본 발명자들은 이러한 LALA 돌연변이를 함유하는 시험된 mAb² 분자가 포도상 구균 장독소 A (SEA; 실시예 12 참조)를 사용한 T 세포 활성화 분석에서 인공 가교결합제의 부재하에 T-세포 활성화를 유도할 수 있음을 입증하였다. 본 발명자들은 또한 시험된 mAb² 분자가 pan-T 세포 활성화 분석에서 인공 가교결합제의 부재하에 T-세포 활성화를 유도할 수 있고 이러한 활성이 OX40 및 CD137 둘 다에 동시에 관여하는 mAb²에 의존한다는 것을 입증하였다 (실시예 13 및 16 참조). 본 발명자들은 추가로 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²가 가교결합제의 부재하에 각각 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 이들 수용체를 활성화할 수 있음을 확인하였다 (실시예 14 참조).
- [0396] 항-인간 OX40/CD137 mAb²가 마우스 단백질에 결합하지 않기 때문에, OX40/CD137 mAb²가 T-세포 매개된 항종양 반응을 일으킬 가능성을 시험하기 위해 LALA 돌연변이를 갖는 및 갖지 않는 (각각 FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3으로 표시됨) 마우스 OX40 및 마우스 CD137을 표적으로 하는 병렬 mAb²를 만들었다.
- [0397] 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 추가의 가교결합제없이 T 세포 활성화를 유도할 수 있으며 이러한 활성이 OX40 및 CD137 둘 다에 동시에 관여하는 mAb²에 의존한다는 것을 보여주었다 (실시예 15 및 16 참조).
- [0398] 본 발명자들은 FS20m-232-91 AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3 mAb²가 CT26 동계 종양 모델에서 생체내 항종양 효능을 가짐을 입증한다 (실시예 17 참조). 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 순환 T 세포에 영향을 미쳐, 활성화된 및 증식 T 세포의 빈도를 증가시킨다는 것을 추가로 입증하였다 (실시예 18 및 19 참조). 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 B16-F10 동계 종양 모델에서 생체내 항종양 효능을 가짐을 입증하였다 (실시예 20 참조).
- [0399] 본 발명자들은 mAb²의 분석적 특성화 및 예비 안정성 평가를 수행하였다 (실시예 21 참조). 시험된 5개의 mAb² 모두 양호한 분석 특성과 양호한 안정성을 나타내었다.
- [0400] 본 발명자들은 SEA를 사용한 T 세포 활성화 분석에서 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²와 항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체의 조합이 OX40/CD137 mAb² 단독에서 보여진 것보다 높은 시험관내 T 세포의 최대 활성의 증가를 초래할 수 있음을 입증하였다. 본 발명자들은 CT26 마우스 종양 모델에서 생체내 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²와 항-PD-1 항체의 조합으로의 치료가 단일 제제로의 치료에 비해 항종양 활성의 증가를 초래하여 생존 이득을 제공하고 증식 T 세포 및 NK 세포의 약력학적 조절을 향상시킬 수 있음을 추가로 보여주었다 (실시예 22 참조).

- [0401] 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 특정 용량 수준까지 CT26 동계 종양 모델에서 생체내 용량-의존적 항종양 활성을 가지며 이러한 활성이 더 높은 용량 수준에서 유지됨을 입증하였다. 본 발명자들은 또한 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 "완전 반응자" 마우스에서 보호 면역 기억의 확립을 유도하고 CT26 세포의 재접종으로부터 보호할 수 있음을 보여주었다 (**실시예 23** 참조). 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 순환 T 세포에 영향을 미치며, 다양한 용량 수준에서 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 증식 빈도를 상당히 증가시킨다는 것을 입증하였다 (**실시예 24** 참조). 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 활성화된 (CD69⁺) 및 증식하는 (Ki67⁺) CD8 T 세포의 빈도를 증가시킬 수 있고 CD4 T-세포 고갈이 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²에 의해 매개되는 이러한 말초 약력학적 반응에 해로운 영향을 미친다는 것을 추가로 보여주었다 (**실시예 25** 참조). 본 발명자들은 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²가 동등한 인간 분석에 비해 1차 시노물구스 원숭이 PBMC 분석에서 유사한 기능적 활성을 가졌고, mAb²가 시노물구스 원숭이에서 최대 30 mg/kg 용량에서 잘 견디며 시노물구스 원숭이에서 중추 기억 및 효과기 기억 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포와 NK 세포의 증식 및 활성화에 있어 약물-관련 증가를 유도할 수 있다는 것을 보여주었다 (**실시예 26** 참조).
- [0402] 본 발명자들은 또한, BALB/c 마우스에서 연구하였을 때, FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 가교결합-비의존적 CD137 효능제에 비해 간에서 T 세포 침윤 및 증식 수준의 중간 정도 및 일시적인 증가를 유도하여 상승되고 지속적인 간 T 세포 침윤, 증식 및 활성화를 유도함을 보여주었다 (**실시예 27** 참조). 마지막으로, CT26 동계 마우스 종양 모델에서, 본 발명자들은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²의 가교결합-비의존적 항-CD137 Lob12.3 클론에 비해 증가된 T 세포 수준 및 증식을 유도하는 가교결합-비의존적 Fab 클론의 능력에도 불구하고 가교결합-비의존적 항-CD137 Fab 클론과 쌍을 이루는 동일한 OX40 Fcab을 포함하는 OX40/CD137 mAb² 또는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²로 처리된 마우스 간에, 종양 성장 또는 생존에 차이가 없음을 보여주었다 (**실시예 28** 참조).
- [0403] 이러한 실험은 하기 실시예에서 보다 상세히 기술된다.
- [0404] 실시예 1 - 항원 선택 및 특성화
- [0405] OX40 및 CD137 둘 다에 결합하여 효능화할 수 있는 mAb²를 확인하는데 사용되는 선택 및 스크리닝 방법은 다양한 OX40 및 CD137 항원의 사용을 필요로 하였다. 이러한 항원의 생산은 아래에 보다 상세하게 기술된다.
- [0406] 1.1 OX40 항원
- [0407] 인간 및 마우스 OX40에 특이적인 Fcab의 선택 및 시노물구스 OX40과의 선택된 Fcab의 교차-반응성 시험에 사용된 OX40 항원은 사내에서 제조되거나 아래에 기술된 바와 같이 상업적 공급원으로부터 입수되었다.
- [0408] 1.1.1 재조합, 가용성 인간, 시노물구스 및 마우스 OX40 항원의 제조
- [0409] 재조합, 가용성, 이량체 OX40 항원을 제조하기 위해, OX40의 세포외 도메인을 마우스 Fc에 융합하여 항원의 용해도와 안정성을 개선시켰다. 구체적으로, 관련 OX40 (인간, 시노물구스 또는 마우스)의 세포외 도메인을 EcoRI-HF 및 BglII 제한 효소를 사용하여 pFUSE-mIgG2aFc2 벡터 (Invivogen cat no pfuse-mg2afc2)에 클로닝하여 C-말단에 마우스 IgG2a Fc 도메인을 갖는 항원을 생산하였다. 그 후 재조합 OX40 항원을 HEK293-6E 세포 (캐나다 국립 연구위원회)에서 일시적인 발현에 의해 생산하고, 생성된 항원이 단일 종이고 응집체를 포함하지 않았음을 보장하기 위해 mAb Select SuRe 단백질 A 컬럼 (GE Healthcare, 1 1003494)에 이어 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 사용하여 정제하였다.
- [0410] 재조합 OX40 항원의 비오틴화된 버전을 제조하기 위해, 제조업체의 프로토콜에 따라 EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin 키트 (Thermo Fisher Scientific, cat no 21331)를 사용하여 항원을 비오틴화하였다. 비오틴화된 OX40 항원은 결합 친화도 측정이 아닌 아래 기술된 선택 실험에 사용되었다. 비오틴화된 OX40 항원의 정제는 PD-10 탈염 컬럼 (GE Healthcare, 17-0851-01)에 이어 Amicon 30k 스핀 컬럼 (Millipore, UFC903024)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 두 단계로 수행하였다. 재조합 항원의 생물물리학적 특성은 응집체가 존재하지 않도록 보장하기 위한 SE-HPLC 분석과 분자 크기를 확인하기 위한 PAGE에 의해 특성화되었다. PAGE에 의한 크기 결정은 추정된 분자량이 단량체의 예측된 분자량의 두 배였기 때문에 가용성 항원이 이량체임을 나타내었다. 재조합 항원을 또한 겔-이동 분석으로 분석하였으며, 비오틴화의 정도가 90% 이상임을 보여주었다. ELISA 및 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 비오틴화된 재조합 인간 (hOX40-mFc), 마우스 (mOX40-mFc) 및 시노물구스

(cOX40-mFc) OX40 항원이 OX40-특이 항체 (인간 및 시노물구스 OX40에 대해 항체 11D4 [유럽 특허 제2242771호]; 시노물구스 OX40에 대해 다클론 양 항-인간 OX40 항체 [R&D Systems cat no AF3388]; 인간 OX40에 대해 항체 ACT35 [Biolegend cat no 35002] 및 마우스 OX40에 대해 항체 OX86 [Biolegend cat no 1 19408])에 의해 결합될 수 있음을 확인하였다. 이러한 항원은 아래 표 2에 열거되어 있다.

1.1.2 인간, 시노물구스 및 마우스 OX40을 발현하는 세포주의 제조

인간, 시노물구스 및 마우스 OX40 (서열에 대해서는 표 1 참조)을 SpeI-HF 및 NotI-HF 제한 효소를 사용하여 벡터 pLVX-EF1a-IRES-puro (Clontech, Cat. No 631253)에 클로닝하였다. 그후 벡터를 Lenti-X HTX 패키징 믹스 (Clontech 카탈로그 번호 631249)와 함께 Lenti-X 293T 세포주 (Clontech, Cat. No. 632180)로 형질전환하여 렌티바이러스를 생성하였다. 그후 렌티바이러스를 사용하여 D011.10 세포 (National Jewish Health)를 형질도입하였다. OX40을 과발현하는 세포는 세포를 5 µg/ml 퓨로마이신 (Life Technologies cat no A11 113803)과 함께 대략 2주 동안 배양한 다음 연속 희석에 의해 세포주 클로닝함으로써 선택되었다. 세포주에 의한 OX40의 발현은 형광 표지된 OX40-특이 항체를 사용하여 유세포 분석으로 시험하였다 (OX86; ACT35; 및 다클론 양 항-인간 OX40, 실시예 1.1.1 및 표 2에 기술된 바와 같음). 모든 세포가 유세포 분석에서 형질도입되지 않은 세포보다 적어도 10배 더 높은 형광 값을 나타내었던, 인간 (D011.10-hOX40), 마우스 (D011.10-mOX40) 또는 시노물구스 (D011.10-cOX40) OX40을 발현하는 세포주가 선택되었다. 이러한 세포주는 아래 표 2에 열거되어 있다.

표 1 :OX40 서열

관심 유전자	종	공급원	클론 ID (제품 번호)	Genbank 수탁 번호	서열 번호
OX40	인간	Thermo Fisher Scientific	MHS6278-202858046	BC105070	132
OX40	시노물구스	Gene synthesis	N/A	XP_005545179	134
OX40	마우스	Gene synthesis	N/A	NM_011659.2	133

1.1.3 상업적으로 이용 가능한 OX40 항원

몇 가지 상업적으로 이용 가능한 OX40 항원을 시험하였다.

재조합 His-태그된 인간 OX40 세포의 도메인은 SinoBiologicals (Cat #10481-H08H-50)로부터 입수하였다. 그러나, 이 항원의 SE-HPLC 분석은 항원의 50% 미만이 단량체성, 비-응집된 형태임을 보여주었다. 따라서, 이 항원은 후속 분석에 사용되지 않았다.

C-말단에 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 재조합 인간 OX40/인간 Fc (hOX40-hFc) 및 재조합 마우스 OX40/인간 Fc (mOX40-hFc)는 R&D Systems (hOX40-hFc: Cat # 3388-OX-050; mOX40-hFc: Cat # 1256-OX-050)으로부터 입수하였으며 사내 바이오틴화하였다. 이러한 가용성 항원의 생물물리학적 특성은 응집체가 존재하지 않도록 보장하기 위한 SE-HPLC 분석과 분자 크기를 확인하기 위한 PAGE에 의해 특성화되었다. PAGE에 의한 크기 결정은 추정된 분자량이 단량체성 항원에 대해 예측된 것의 두 배였기 때문에 가용성 항원이 이량체임을 나타내었다. 가용성 항원을 또한 겔-이동 분석으로 분석하였으며, 비오틴화의 정도가 90% 이상임을 보여주었다. ELISA 및 SPR을 사용하여 비오틴화된 재조합 인간 (hOX40-hFc) 및 마우스 (mOX40-hFc) OX40 항원이 OX40-특이 항체 (11D4; ACT35; 및 OX86, 아래 실시예 1.1.1 및 표 2에 기술된 바와 같음)에 의해 결합될 수 있음을 확인하였다.

표 2 : OX40 항원

항원 이름	공급원 (시판/ 사내 제조)	비오틴화된 버전 제조?	종	가용성/ 세포-발현된 항원	항원 형식	서열 번호/ 항원의 공급원
hOX40-mFc	사내 제조	예	인간	가용성	이량체성	135
mOX40-mFc	사내 제조	예	마우스	가용성	이량체성	136
cOX40-mFc	사내 제조	예	시노물구스	가용성	이량체성	137
DO11.10- hOX40	사내 제조	아니오	인간	세포-발현된	자연 형태	132
DO11.10- mOX40-	사내 제조	아니오	마우스	세포-발현된	자연 형태	133
DO11.10- cOX40	사내 제조	아니오	시노물구스	세포-발현된	자연 형태	134
hOX40-hFc	시판용	예	인간	가용성	이량체성	Cat no 3388- OX-050 (R&D Systems)
mOX40-hFc	시판용	예	마우스	가용성	이량체성	Cat no 1256- OX-050 (R&D Systems)

1.2 CD137 항원

인간 CD137에 특이적인 mAb의 선택 및 시노물구스 OX40과의 선택된 Fcab의 교차-반응성 검사에 사용된 CD137 항원은 사내에서 제조하거나 아래에 기술된 바와 같이 상업적 공급원으로부터 입수하였다.

1.2.1 재조합, 가용성 인간 및 시노물구스 CD137 항원의 제조

시험할 때 허용할 수 없는 수준의 응집체가 존재하기 때문에 몇 가지 상업적으로 이용 가능한 재조합 항원이 사용하기에 부적합한 것으로 밝혀졌으므로, 항-CD137 mAb의 선택, 스크리닝 및 추가 특성화에 사용하기 위해 다음의 재조합 이량체 및 단량체 항원 (표 3)을 사내에서 생산하였다.

표 3: 재조합 인간 및 시노물구스 CD137 항원

유형	명칭	종	가용성 또는 세포-발현된	비오틴화된 버전 제조?	항원 형식	서열 번호
재조합체	hCD137-mFc-Avi	인간	가용성	예	이량체	138 & 141
재조합체	hCD137-Avi-His	인간	가용성	예	단량체	158
재조합체	cCD137-mFc-Avi	시노물구스 원숭이	가용성	예	이량체	140 & 141

단량체 항원은 인간 CD137의 세포의 도메인을 암호화하는 DNA를 Avi 서열 및 6개의 C-말단 히스티딘 잔기와 함께 EcoRI-HF 및 BamHI-HF 제한 효소를 사용하여 변형된 pFUSE 벡터 (Invivogen cat no pfuse-mg2afc2)로 클로닝함으로써 생산하였다. 벡터를 HEK293-6E 세포로 형질감염시키고, 발현된 CD137을 항원이 단일 중이고 응집체를 함유하지 않았음을 보장하기 위해 HisTrap™ 엑셀 니켈 컬럼 (GE Healthcare, 17-3712-06) 및 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 사용하여 정제하였다.

이량체 항원을 생산하기 위해, Avi 서열과 함께 mIgG2a Fc 도메인과 융합된 인간 또는 시노물구스 (cyno) CD137의 세포의 도메인을 암호화하는 DNA 작제물을 변형된 pFUSE 벡터로 클로닝하고 HEK293-6E 세포로 형질감염시켰다. 재조합 CD137을 항원이 단일 중이며 응집체를 함유하지 않았음을 보장하기 위해 MabSelect SuRe™ 단백질 A 컬럼 (GE Healthcare, 11003494) 및 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 사용하여 정제하였다.

이량체성 및 단량체성 CD 137 항원의 비오틴화된 버전을 BirA 비오틴-비오틴 단백질 리가제 반응 키트 (Avidity LLC, BirA500)를 사용하여 제조하여 단일 비오틴 분자로 표지된 단량체성 CD137 항원과 두 개의 단량체 각각 당 하나인 두 개의 비오틴 분자로 표지된 이량체성 CD137 항원을 생산하였다. 구용적으로, 3 mg의 CD137 항원을 7.8 μ l BirA 효소 혼합물과 1:50의 효소 대 기질의 물 비로 혼합하였다. 그 후 제조업체의 권장사항 (142 μ l Biomix A, 142 μ l Biomix B, 142 μ l Biotin)에 따라 첨가제를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 배

양하였다. 비오틴화된 항원의 무결성을 유지하기 위해, 반응 혼합물을 Amicon 30 μ m 필터를 사용하여 즉시 DPBS로 완충액 교체하였다.

[0430] CD137 항원을 BirA 효소의 제거를 보장하기 위해 SEC에 의해 추가로 정제하고 고분자량 응집체가 없는 최종 고품질 단분산 단백질 제제를 생성하였다. 구용적으로, 동일한 생산 로트로부터의 항원을 함께 혼합하고 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC), SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 및 다중-각도 광 산란을 사용한 크기-배제 크로마토그래피 (SEC-MALS)에 의해 안정성과 순도를 분석하였다. 단백질의 완전한 비오틴화는 스트렙타비딘-이동 SDS-PAGE 겔에 의해 확인하였다. 재조합 인간 CD137 항원은 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 시험관내에서 항-인간 CD137 양성 대조군 항체, 20H4.9 (미국 특허 제7288638호)에 결합하고 유세포 분석에 의해 인간 CD137 리간드를 발현하는 D011.10 세포에 결합하는 것으로 확인되었다. 재조합 cyno CD137 항원은 유세포 분석에 의해 cyno CD137 리간드를 발현하는 D011.10 세포에 결합하는 것으로 확인되었다. 선택 프로토콜에 사용된 CD137 항원에 대해 가능한 한 높은 순도를 보장하기 위해, 존재하는 단백질 응집체의 백분율이 2%를 초과하지 않도록 항원의 철저한 단백질 특성화를 수행하였다.

[0431] 1.2.2 인간, 시노물구스 및 마우스 CD137을 발현하는 세포주의 제조

[0432] 선택된 항-CD137 mAb의 선택 및 추가 특성화 동안 항원을 이의 가장 자연적인 형태로 제시하기 위해 각각 'D011.10-hCD137' 및 'D011.10-cCD137' (표 4 참조)로 지정된 전장 인간 또는 cyno CD137을 발현하는 D011.10 세포 (National Jewish Health)를 생산하였다.

[0433] 항-마우스 OX40/CD137 mAb²가 세포-발현된 마우스 CD137에 결합하는지를 결정하기 위해, 'D011.10-mCD137'로 지정된 전장 마우스 CD137을 발현하는 D011.10 세포를 또한 생성하였다 (실시예 11.2 참조).

[0434] Lenti-X HTX 패키징 시스템 (Clontech, 631249)을 사용하여 인간, cyno 또는 마우스 CD137 수용체를 과발현하는 D011.10 세포를 생성하기 위해 렌티바이러스 형질도입이 사용되었다. 인간 CD137 (서열 번호 126), cyno CD137 (서열 번호 128) 또는 마우스 CD137 (서열 번호 164)를 암호화하는 cDNA를 함유하는 Lenti-X 발현 벡터 (pLVX) (Clontech, 631253)를 Lenti-X HTX 패키징 믹스로 Lenti-X 293T 세포주 (Clontech, 632180)에 공동-형질감염시켜 바이러스를 생성하였다. 그후 D011.10 세포주를 이러한 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다.

[0435] 이러한 세포 상의 인간, cyno 또는 마우스 CD137의 발현은 유세포 분석을 사용하여 세포에 대한 항-CD137 양성 대조군 항체 (각각 20H4.9, MOR7480.1 (특허 공개 제US 2012/0237498 A1호) 및 Lob12.3 (University of Southampton))의 결합에 의해 확인하였다.

[0436] 표 4: 세포 표면-발현된 인간 및 시노물구스 CD137 항원

유형	명칭	종	제시	서열 번호
세포	D011.10-hCD137	인간	세포 표면-발현됨	126
세포	D011.10-cCD137	시노물구스 원숭이	세포 표면-발현됨	128
세포	D011.10-mCD137	마우스	세포 표면-발현됨	164

[0437]

실시예 2 - 항-인간 OX40 Fcab의 선택 및 특성화

[0438]

2.1 항-인간 OX40 Fcab의 나이트 선택

[0439]

[0440] 나이트 파지 라이브러리로부터 인간 OX40에 특이적인 Fcab를 선택하기 위해 재조합 비오틴화된 가용성, 이량체성 인간 OX40 (hOX40-mFc; 표 2 참조) 및 세포-발현된 인간 OX40 (D01110-hOX40)을 항원으로서 사용하였다. 인간 OX40을 발현하는 세포를 선택된 Fcab이 세포 표면에서 자연적인 형태로 OX40에 결합할 수 있도록 보장하기 위해 선택 프로토콜의 일부에서 재조합 비오틴화된 가용성 이량체성 인간 OX40에 추가하여 사용하였다.

[0441] CH3 도메인에 부분적으로 무작위화된 AB 루프 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 14 내지 18) 및 EF 루프 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 92 내지 101)를 포함하는 CH3 도메인 (IMGT 번호매김 1.4-130)을 표시하는 6개의 나이트 파지 라이브러리를 작제하였다. 6개의 라이브러리 중 하나는 CH3 도메인의 EF 루프의 위치 101에 2개 또는 4개의 아미노산 (2개 또는 4개의 NNK 코돈으로 암호화됨)이 삽입된 클론을 추가로 포함하였다 (삽입된 잔기는 IMGT 번호매김 체계에 따라 101.1에서 101.4로 번호매겨진다).

[0442] 6개의 라이브러리 모두를 재조합 비오틴화된 가용성 이량체성 인간 OX40 (hOX40-mFc; 표 2 참조)을 사용하여 3차례의 선택 라운드에 적용하였다. 6개의 라이브러리 모두를 또한 첫 번째 선택 라운드에서 hOX40-mFc에 이어

세포-발현된 인간 OX40 (2개의 추가 선택 라운드에서 D01110-hOX40; 표 2 참조)를 사용한 추가 선택 캠페인에 적용하였다.

- [0443] 6개의 라이브러리로부터 3차례의 선택 라운드 후 확인된 2133개 클론을 인간 OX40에 대한 결합에 대해 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 이로 인해 32개의 고유한 양성 결합체가 확인되었으며, 이것을 HEK Expi293 세포 (ExpiFectamine 293 형질감염 키트 [Life Technologies, A14524]를 사용하여 Expi293F 세포 [Life technologies, A14527]로 형질감염된 pTT5 벡터 [National Research Council of Canada]로 클로닝된 Fcab)에서 서브-클로닝하고 가용성 Fcab (절단된 힌지 [서열 번호 101], CH2 및 CH3 도메인으로 구성됨)으로서 발현하였다.
- [0444] 32개의 고유한 Fcab를 세포-발현된 인간 OX40 (D011.10-hOX40)에 결합하는 능력에 대해 시험하였다. 스크리닝된 32개 Fcab 중 15개는 D011.10-hOX40에 대한 세포 결합을 보였으며 이러한 상호작용에 대한 EC_{50} 은 0.1 내지 62 nM 범위였다. D011.10-hOX40에 대한 결합을 보이는 15개의 Fcab를 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화를 시험하는 사내 인간 NF- κ B 리포터 분석을 사용하여 시험하였다. 15개의 Fcab 중 6개는 인간 NF- κ B 리포터 분석에서 항-인간 Fc 항체와 가교결합될 때 활성이 증가한 것으로 나타났으며, 이것은 이러한 Fcab이 OX40 신호전달을 활성화할 수 있음을 시사한다. FS20-22 및 FS20-31로 지정된 Fcab는 이 분석에서 높은 수준의 활성을 보였으며, Fcab이 항-인간 CH2 mAb (클론 MK1A6 (Jefferis et al., 1985 and Jefferis et al., 1992), 사내 제조됨)와 가교결합될 때 이들의 활성이 증가하였다. 이들을 친화성 성숙을 위해 선택하였다.
- [0445] 2.2 항-인간 OX40 Fcab의 친화성 성숙
- [0446] FS20-22 및 FS20-31에 대한 친화성 성숙 라이브러리는 시스테인을 제외한 아미노산의 등물 분포를 사용한 ELLA Biotech로부터의 무작위 프라이머를 사용하여 CH3 도메인의 AB 루프 (잔기 14 내지 18)에 5개의 잔기 또는 CD 루프 (잔기 45.1 내지 77)에 5개의 잔기를 무작위화함으로써 또는 CH3 도메인의 EF 루프의 일부 (CH3 도메인의 잔기 92 내지 94 및 97 내지 101)를 무작위화함으로써 생성하였다 (모든 잔기는 IMGT 번호매김 체계에 따라 번호매겨진다).
- [0447] 친화성 성숙의 출력으로부터의 1410개 Fcab를 인간 OX40에 대한 결합에 대해 ELISA에 의해 스크리닝하고, 상기 실시예 2.1에 기술된 바와 같이 204개의 고유한 양성 결합체를 확인하고, 서브-클로닝하고, HEK Expi293 세포에서 가용성 Fcab으로서 발현시켰다.
- [0448] hOX40-mFc에 결합될 때 가용성 Fcab의 오프-레이트 (off-rate)를 항-인간 CH2 mAb 클론 MK1A6을 사용하여 항-CH2 가교결합의 부재 및 존재하에 Biacore 3000 (GE Healthcare)을 사용하여 측정하였다 (실시예 2.1 참조). 관련 모 Fcab과 비교하여 개선된 오프-레이트를 갖는 Fcab를 세포-발현된 인간 OX40에 대한 결합 및 사내 인간 T 세포 활성화 분석에서의 활성에 대해 추가로 스크리닝하였다. 모든 Fcab는 세포-발현된 인간 OX40에 결합하였다. 인간 T 세포 활성화 분석에서 높은 수준의 활성을 보인, FS20-22 계통으로부터의 10개 Fcab 및 FS20-31 계통으로부터의 18개 Fcab를 아래 기술된 바와 같이 루프 서플링을 위해 선택하였다.
- [0449] FS20-22 계통의 경우, CD 루프 3개, EF 루프 6개, 및 모 AB 루프 또는 친화성 성숙된 AB 루프를 서플링하여 2개의 루프-서플링된 라이브러리를 생성하였다. FS20-31 계통의 경우, 4개의 AB 루프, 7개의 CD 루프 및 7개의 EF 루프를 함유하는 하나의 루프-서플링된 라이브러리를 생성하였다.
- [0450] 서플링된 서열을 상기 실시예 2.1에 기술된 바와 같이 HEK Expi293 세포에서 가용성 Fcab로서 발현하고 Octet QKe 시스템 (Pall ForteBio) 상의 Dip and Read™ 스트랩타비딘 바이오센서 (Pall ForteBio, 18-5050)를 사용하여 비오틴화된 hOX40-mFc 항원에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 모 Fcab에 비해 hOX40-mFc에 결합될 때 개선된 오프-레이트를 갖는 Fcab를 서열분석하여, FS20-22 계통으로부터 35개의 고유 Fcab 및 FS20-31 계통으로부터 62개를 생성하였다. 확인된 고유의 Fcab를 Biacore 3000 기기 (GE Healthcare)를 사용하여 항-인간 CH2 mAb 클론 MK1A6을 사용한 CH2 가교결합의 존재 및 부재하에 hOX40-mFc 항원에 대한 결합에 대해 시험하였다.
- [0451] FS20-22 계통의 경우, hOX40-mFc에 결합될 때 CH2 가교결합으로의 가장 느린 오프-레이트, hOX40-mFc에 결합될 때 비-가교결합된 및 CH2 가교결합된 오프-레이트 간의 오프-레이트 차이 및 상기와 같은 hOX40-mFc에 대한 결합의 강도를 기반으로 하여 모의 (4420 LALA) mAb² 형식에서의 발현 및 추가의 특성화를 위해 18개의 Fcab를 선택하였다. FS20-31 계통의 경우, CH2 가교결합으로 hOX40-mFc에 결합될 때 가장 느린 오프-레이트를 갖는 9개의 Fcab 및 CH2 가교결합 없이 hOX40-mFc에 결합될 때 가장 느린 오프-레이트를 갖는 9개의 Fcab를 모의 (4420 LALA) mAb² 형식에서의 발현 및 추가 특성화를 위해 선택하였다. 9개 Fcab의 이들 그룹 둘 다에 다수의 Fcab이

공통이기 때문에, CH2 가교결합의 부재하에 hOX40-mFc에 결합될 때 느린 오프-레이트를 보인 추가 Fcab을 FS20-31 계통으로부터 선택하여 모의 mAb² 형식에서의 발현 및 추가 특성화를 위한 이 계통으로부터의 총 Fcab 수를 18로 가져왔다. T 세포 활성화 분석으로부터의 데이터를 사용하여, 이 분석에서 높은 활성을 보였고 이에 따라 또한 모의 (4420 LALA) mAb² 형식에서 발현되고 추가로 특성화된 FS20-22 계통으로부터의 추가 6개의 Fcab 및 FS20-31 계통으로부터의 8개 Fcab를 확인하였다 (실시예 4 참조).

[0452] 실시예 3 - 항-마우스 OX40 Fcab의 선택 및 특성화

[0453] 3.1. 항-마우스 OX40 Fcab의 나이브 선택

[0454] CH3 도메인의 AB 루프 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 11-18) 및 EF 루프 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 92-101)에 무작위화를 함유하고 AB 루프의 (IMGT 번호매김 체계에 따라) 잔기 16과 17 사이에 5개-잔기 무작위 삽입을 포함하는 인간 IgG1의 CH1 내지 CH3 도메인을 표시하는 나이브 효모 라이브러리를 선택을 위해 사용하였다. 효모를 인간 IgG Fc 도메인 (mOX40-hFc; 표 2)에 융합된 비오틴화된 재조합 뮤린 OX40과 함께 배양하고 스트렙타비딘 코팅된 비드를 사용하여 MACS에 의해 분류하였다. 그 후 5배 물 과량의 hFc의 존재하에 감소하는 농도의 비오틴화된 mOX40-hFc를 사용하여 3 라운드의 FACS 선택을 수행하였다. 세포를 스트렙타비딘-알로피코시 아닌 (APC) (BD Bioscience, 349024) 또는 항-비오틴-APC (Miltenyi Biotec, 130-090-856)로 염색하고 FACSria (BD Bioscience) 세포 분류기를 사용하여 분류하였다. 풍부한 집단으로부터의 182개의 개별 Fcab을 항원 결합에 대해 스크리닝하고, 실시예 2.1에 앞서 기술된 바와 같이 2개의 고유한 양성 결합제를 서브클로닝하고 가용성 Fcab로서 발현시켰다. Fcab을 ELISA에 의해 mOX40-hFc에 대한 결합에 대해 특성화하고 사내 마우스 NF-kB 리포터 분석에서 활성에 대해 특성화하였다. 단 하나의 Fcab, FS20m-232만이 NF-kB 리포터 분석에서 활성이었으며 마우스 OX40을 발현하는 세포에 대한 결합을 나타내었으므로 이러한 Fcab을 친화성 성숙을 위해 선택하였다.

[0455] 3.2 mOX40 Fcab의 친화성 성숙

[0456] 3개의 파지 디스플레이 친화성 성숙 라이브러리는 시스템을 제외한 아미노산의 등물 분포를 사용하는 ELLA Biotech로부터의 무작위화된 프라이머를 사용하여 FS20m-232 Fcab의 AB 루프의 7개 잔기 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 15-16.5) (라이브러리 1), CD 루프의 6개 잔기 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 45.1-78) (라이브러리 2) 또는 EF 루프의 5개 잔기 (IMGT 번호매김 체계에 따른 잔기 92-94 및 97-98) (라이브러리 3)을 무작위화 함으로써 작제하였다. 스트렙타비딘-코팅된 (ThermoFisher Scientific, 11205D) 및 뉴트라비딘-코팅된 (ThermoFisher Scientific, 14203 및 A2666) Dynabead 상에 교대로 캡처된 재조합 비오틴화된 mOX40-mFc를 사용하여 친화성 성숙 라이브러리에서 3회 선택 라운드를 수행하였다. 50 nM (라운드 1)에서 10 nM (라운드 2)로, 1 nM (라운드 3)로 감소하는 항원 농도를 사용하여 고친화성 결합제를 확인하였다. 세 번째 선택 라운드로부터의 1655개 개별 파지를 mOX40-mFc에 대한 결합에 대해 파지 ELISA에 의해 스크리닝하고, 실시예 2.1에 기술된 바와 같이 HEK Expi293 세포에서 98개의 고유한 양성 결합제를 확인하고 서브클로닝하고 가용성 Fcab로서 발현시켰다. Fcab을 마우스 NF-kB 리포터 분석에서 세포 결합 및 활성에 대해 추가로 스크리닝하였다. 루프 서플링을 위해 가장 활성인 Fcab을 선택하였다.

[0457] 37개 EF 루프 (파지 ELISA에서 마우스 OX40에 가장 잘 결합된 것 및 WT 서열)로 서플링된 27개 CD 루프 (친화성 성숙으로부터 확인된 모든 26개의 고유한 서열 및 WT 서열)를 함유하는 루프-서플링된 라이브러리를 생성하였으며, 모든 서플링된 클론은 FS20m-232 Fcab의 AB 루프를 함유하였다. 상기한 바와 같이 HEK Expi293 세포에서 750개의 서플링된 서열을 (절단된 힌지를 함유하는) 가용성 Fcab로서 발현하였다. Fcab을 함유하는 HEK 상청액을 Octet QKe 시스템 (Pall ForteBio) 상의 Dip and Read™ 스트렙타비딘 바이오센서 (Pall ForteBio, 18-5050)를 사용하여 비오틴화된 mOX40-mFc (표 2)에 대한 Fcab의 결합을 측정함으로써 개선된 오프-레이트에 대해 스크리닝하였다. 11개의 고유한 AB 루프 무작위화 Fcab 및 60개의 고유한 EF 루프 무작위화 Fcab을 상기한 바와 같이 서브클로닝하고 HEK Expi293 세포에서 가용성 Fcab로서 발현시켰다. 이들 Fcab을 마우스 T 세포 활성화 분석에서 세포 결합 및 활성에 대해 가장 느린 오프-레이트를 갖는 43개의 서플링된 Fcab과 함께 추가로 스크리닝하였다. FS20m-232-91 Fcab은 비오틴화된 mOX40-mFc에 결합될 때 가장 느린 오프-레이트를 가졌고 항-인간 CH2 mAb 클론 MK1A6에 의해 가교결합되었을 때 마우스 T 세포 활성화 분석에서 가장 높은 활성을 가졌으며 따라서 후속 실험에 사용하기 위한 마우스 Fcab (대리물)로서 선택되었다.

[0458] 실시예 4 - mAb² 형식의 항-OX40 Fcab의 작제, 발현 및 특성화

[0459] 4.1 모의 mAb²의 작제 및 발현

[0460] 상기 확인된 항-인간 OX40 및 항-마우스 OX40 Fcab를 포함하는 "모의" mAb²를 mAb² 형식으로의 이들 Fcab의 특성을 가능하게 하기 위해 제조하였다. 이들 모의 mAb²는 항-FITC 및 항-HEL 항체의 CH3 도메인을 인간 IgG1의 변형되지 않은 CH3 도메인의 서열에 존재하는 XhoI 및 BamHI 부위 내의 항-OX40 Fcab의 CH3 도메인으로 대체함으로써 항-OX40 Fcab 및 인간 IgG1 골격 (자세한 내용에 대해서는 서열 번호 114, 서열 번호 115, 및 서열 번호 116 참조)의 항-FITC 항체 4420의 가변 영역 (Bedzyk et al., 1989 and Bedzyk et al., 1990) 또는 인간 IgG1 골격 (자세한 내용에 대해서는 서열 번호 117 및 서열 번호 118 참조)의 항-암탉 난백 리소자임 (HEL) 항체 D1.3의 가변 영역 (Braden et al., 1996)으로부터 제조하였다. 모의 mAb²는 항-FITC mAb 4420 (서열 번호 116) 또는 항-HEL mAb D1.3 (서열 번호 118)의 경쇄를 각각 포함하였으며, 중쇄의 CH2 도메인에 LALA 돌연변이를 함유하여 Fc-감마 수용체 상호작용 및 잠재적인 Fc-감마 수용체-유도된 가교결합을 감소시켰다. 모의 mAb² 및 이들 실시예에서 언급된 mAb²에서 LALA 돌연변이의 존재는 이들의 클론 명칭의 Fcab 부분 끝에 접미사 'AA'로 표시된다.

[0461] 모의 mAb²는 HEK293-6E 세포에서 일시적인 발현에 의해 생산하였고 mAb Select SuRe 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[0462] 4.2 세포-발현된 인간 및 시노물구스 OX40에 대한 모의 mAb² 형식의 항-인간 OX40 Fcab의 결합 친화도

[0463] 세포-발현된 인간 또는 시노물구스 OX40 (인간 [D011.10-hOX40] 또는 시노물구스 OX40 [D011.10-cOX40])을 발현하는 D011.10 세포; 표 2 참조)에 대한 결합에 대해 모의 (4420 LALA) mAb² 형식의 항-인간 OX40 Fcab의 친화도를 유세포 분석을 사용하여 측정하였다. 비특이 결합은 또한 유세포 분석에 의해 OX40을 발현하지 않는 HEK 세포에 대한 결합을 시험함으로써 평가하였다.

[0464] 모의 (4420 LALA) mAb² 및 대조군 mAb 희석물 (2 x 최종 농도)을 1 x DPBS (Gibco, 14190-094)에서 삼중으로 제조하였다. D011.10-hOX40 또는 D011.10-cOX40 또는 HEK 세포 현탁액을 PBS+2% BSA (Sigma, A7906)에서 제조하고 V-바닥 96-웰 플레이트에 50 μ l/웰로 4 x 10⁶개 세포/ml로 시딩하였다 (Costar, 3897). 50 μ l의 모의 (4420 LALA) mAb² 또는 대조군 mAb (항-인간 OX40 mAb, 11.D4) 희석물을 세포를 함유하는 웰에 첨가하고 (최종 용적 100 μ l) 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 세척한 다음 PBS+2% BSA에서 1:1000으로 희석된 100 μ l/웰의 2차 항체 (항-인간 Fc-488 항체, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098)를 첨가하고 암흑에서 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 세척하고 DAPI (Biotium, cat no 40043)를 함유하는 PBS 100 μ l에 1 μ g/ml로 재현탁시켰다. Canto II 유세포 분석기 (BD Bioscience)를 사용하여 플레이트를 판독하였다. 죽은 세포를 제외하고 FITC 채널 (488nm/530/30)의 형광을 측정하였다. 데이터를 GraphPad Prism 소프트웨어에서 로그 (효능제) 대 반응을 사용하여 피팅하였다.

[0465] 인간 IgG1 골격에서 및 중쇄 (G1AA/11D4; 서열 번호 173 및 175)의 CH2 도메인에 LALA 돌연변이를 함유하는 Fcab (모두 모의 [4420 LALA] mAb² 형식으로 시험됨) 및 양성-대조군 항-인간 OX40 mAb, 11D4는 다양한 친화도로 인간 OX40에 결합하였다. FS20-22 계통으로부터의 5개 클론 및 FS20-31 계통으로부터의 6개 클론을 세포-발현된 인간 및 시노물구스 OX40에 결합하는 능력에 대해 시험하였으며; 이러한 클론의 결합 친화도가 표 5에 제시되어 있다.

[0466] 표 5: 세포-발현된 인간 또는 시노물구스 OX40에 대한 모의 (4420 LALA) mAb² 형식의 항-OX40 Fcab의 결합 친화도

모의 (4420 LALA) mAb ² /mAb	DO11.10-hOX40 에 대한 결합 EC ₅₀ (nM)	DO11.10-cOX40 에 대한 결합 EC ₅₀ (nM)
FS20-22-38AA/4420	0.8315	0.5925
FS20-22-41AA/4420	0.2991	0.1821
FS20-22-47AA/4420	0.7655	0.5809
FS20-22-49AA/4420	0.7412	0.3197
FS20-22-85AA/4420	0.4486	1.058
FS20-31-58AA/4420	0.7466	1.454
FS20-31-66AA/4420	0.2677	2.038
FS20-31-94AA/4420	0.6132	3.52
FS20-31-102AA/4420	0.5366	0.3948
FS20-31-108AA/4420	0.6516	0.3716
FS20-31-115AA/4420	0.7853	1.235
G1AA/11D4	0.8143	0.2126

[0467]

[0468] 4.3 모의 mAb² 형식의 항-OX40 Fcab에 의한 시험관내 OX40의 활성화

[0469]

활성화된 T 세포는 이들의 세포 표면 상에 OX40을 발현한다. OX40에 대한 삼량체성 OX40 리간드의 결합은 수용체의 삼량체화를 초래한다. OX40 리간드가 항원-제시 세포의 세포 표면에서 클러스터로서 발현되기 때문에, OX40 리간드와 OX40 간의 상호작용은 OX40의 클러스터링을 초래하며, 이것이 OX40 신호전달 및 추가 T 세포 활성화에 필수적인 것으로 알려져 있다. OX40을 효능화하는 항체는 OX40 리간드의 이러한 클러스터링 활성을 모방해야 한다. 단일특이성 항-OX40 항체의 경우, Fc 감마 수용체가 항체의 Fc 도메인에 결합하여 이들을 가교결합하여 OX40 클러스터링을 초래한다.

[0470]

상기한 LALA 돌연변이-함유 모의 (4420) mAb² 형식의 항-인간 OX40 및 항-마우스 OX40 Fcab를 가교결합제의 존재하에 Fcab의 가교결합시 T 세포에서 발현된 OX40을 활성화하는 이들의 능력에 대해 T 세포 활성화 분석에서 시험하였다. 모의 (4420 LALA) mAb² 형식으로 항-인간 OX40 Fcab를 시험하기 위한 인간 T 세포 활성화 분석은 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터의 T 세포의 단리를 수반하였으며 T 세포 활성화의 마커인 IL-2의 방출에 대해 시험하였다. 분석은 **실시예 13**에서 후술되는 바와 유사한 방식으로 수행하였으며, 양성-대조군 항체 (11D4) 또는 모의 (4420 LALA) mAb² 형식의 Fcab를 가교결합하기 위해 각각 항-인간 CH2 mAb 클론 MK1A6 또는 FITC-텍스트란 (Sigma)의 사용을 수반하였다.

[0471]

Fab 표적 (FITC-텍스트란)에 의해 가교결합될 때 모의 (4420 LALA) mAb² 형식의 항-인간 OX40 Fcab는 T 세포 활성화 분석에서 광범위한 활성을 나타내었다. Fcab 모두는 항-CD3 항체의 존재하에서 T 세포를 공동-자극하고 인간 IL2의 생산을 유도하는 능력을 가졌다. FS20-22 및 FS20-31 계통으로부터의 Fcab는 가교결합 존재 및 부재 둘 다에서 활성을 나타내었다. 구용적으로, 이들 계통으로부터의 Fcab는 가교결합제의 부재하에서 활성을 가졌으며 활성은 가교결합시 상당히 증가되었다. 이러한 Fcab는 (인간 OX40 결합에 필적하는) 시노몰구스 OX40에 대한 높은 교차-반응성을 갖기 때문에, 이 중에서 독성 연구가 가능할 것이다. FS20-22 계통의 클론 중, FS20-22-41, FS20-22-47, FS20-22-49 및 FS20-22-85 클론은 가교결합될 때 이들의 효능작용 활성화에 대해 가장 낮은 EC₅₀ 값을 가졌으며 따라서 이러한 계통으로부터의 바람직한 클론이다. 이들 중에서, 클론 FS20-22-49는 가교결합시 효능제 활성의 가장 높은 증가를 나타내었고 또한 가교결합의 존재하에 효능제 활성화에 대해 가장 낮은 EC₅₀을 가졌으며 따라서 바람직한 클론이다.

[0472]

상기한 바와 같이, 본 발명자들은 추가의 가교결합제의 부재하에 OX40 및 CD137 둘 다를 효능화할 수 있는 mAb²를 생성하는 것을 목표로 하였다. 위의 실험은 FS20-22-49 Fcab이 추가 가교결합제의 존재하에 OX40을 활성화할 수 있음을 입증하였다. 추가 가교결합제를 필요로 하지 않는 이중 효능제를 생성하기 위해, 본 발명자들은 최종 OX40 및 CD137-표적화 mAb² 분자에서 이들 항체로부터의 CDR을 사용하려는 의도로 항-CD137 항체를 생성하기로 하였다.

[0473]

실시예 5 - 항-인간 CD137 항체의 선택 및 특성화

[0474]

CDR1, CDR2 및 CDR3 (MSM Technologies)에 무작위화를 갖는 인간 생식계의 Fab 도메인을 표시하는 합성 나이트 파지미드 라이브러리를 **실시예 1.2**에 기술된 제조법 및 세포 표면-발현된 CD137 항원과 함께 항-인간 CD137 mAb

의 나이브 선택을 위해 사용하였다.

- [0475] Fab 라이브러리를 스트랩타비딘 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, 11205D) 및 Dynabeads에 결합된 뉴트라비딘-결합 단백질 (Thermo Fisher Scientific, 31000)을 사용하여 세 개 라운드에서 선택하여 비오틴화된 인간 CD137-mFc-Avi 또는 인간 CD137-Avi-His에 결합된 파지를 분리하였다. 세포 표면-발현된 CD137에 대한 Fab 결합을 보장하기 위해, 재조합 CD137 항원을 사용하는 선택으로부터의 첫 번째 라운드 출력을 또한 D011.10-hCD137 세포를 사용하는 두 번의 추가 선택 라운드 및 D011.10-cCD137 세포를 사용하는 네 번째 라운드에 적용하였다.
- [0476] 라운드 3 및 4 출력으로부터의 약 2200개 클론을 인간 및 cyno CD137-mFc-Avi에 대한 결합에 대해 파지 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 비오틴화된 mFc는 음성 대조군으로 포함되었다. 양성 클론 (mFc에 대한 결합 신호보다 적어도 4배 높은 CD137 결합 신호를 갖는 클론)의 가변 영역을 서열분석하여 36개의 고유한 VH/VL 서열 조합을 확인하였다. 확인된 서열은 재조합 CD137 항원 및 세포 표면-발현된 CD137 항원을 사용한 두 가지 선택 모두로부터 기원하였으며, 몇 가지 클론이 두 선택 전략을 사용하여 분리되었다. 파지 ELISA에 기반하여, 36개 클론 중 22개는 시노물구스 원숭이 (cyno) 교차반응성이었지만, 파지 ELISA의 민감도가 약한 cyno 교차반응성 결합제를 검출하기에 충분하지 않았을 수 있기 때문에, 36개 클론 모두를 IgG1 분자로서의 재포맷을 위해 진행시켰다. 각 클론에 대해 VH 및 VL 도메인을 CH1, CH2 (각각 CH2 도메인 및 CH3 도메인, 또는 CL 도메인에 LALA 돌연변이를 가짐)를 함유하는 pTT5 발현 벡터 (캐나다 국립 연구위원회)에 개별적으로 클로닝하였다. 생성된 LALA 돌연변이 (AA)를 갖는 pTT5-FS30 VH 및 pTT5-FS30 VL 벡터를 HEK293-6E 세포로 일시적으로 공동형질감염시켰다. 28개 클론이 가용성 IgG1 분자로서 발현되었다. 이들을 mAb Select SuRe 단백질 A 컬럼으로 정제하고 추가 시험에 적용하였다.
- [0477] 항-CD137 mAb의 결합은 인간 및 cyno CD137-mFc-Avi를 사용하여 ELISA에서 분석하였다. 시험된 28개 클론 중, 10개는 인간 CD137-mFc-Avi에 대한 용량-의존적 결합을 나타내었고, 인간 OX40-mFc-Avi, mFc 또는 스트랩타비딘에는 결합하지 않았다. 이 그룹 내에서, 4개의 클론 FS30-5, FS30-10, FS30-15 및 FS30-16은 cyno CD137-mFc-Avi에 대해 교차-반응성이었다. 수득된 cyno 교차반응성 클론의 낮은 수로 인해, 추가 클론을 스크리닝하고 전술한 바와 같이 발현시켰다. 이것은 하나의 추가 cyno 교차반응성 결합제 FS30-35의 단리를 초래하였다.
- [0478] 항-인간 CD137 mAb FS30-5, FS30-10, FS30-15 및 FS30-16을 유세포 분석을 사용하여 인간 또는 시노물구스 CD137 (D011.10-hCD137 또는 D011.10-cCD137)을 발현하는 세포에 대한 결합에 대해 시험하였다. 비특이 결합은 또한 CD137 발현이 결여된 D011.10 세포 및 HEK293 세포에 대한 결합을 시험함으로써 평가하였다. 결합 친화도를 2개의 양성 대조군 mAb, MOR7480.1 (미국 특허 제2012/0237498호) 및 20H4.9 (미국 특허 제7288638호)와 비교하였으며, 이의 가변 도메인을 CH2 도메인에 LALA 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 형식 (G1AA 형식)으로 클로닝하고 발현시켰다.
- [0479] FS30-5, FS30-10, FS30-15 및 FS30-16 클론은 양성 대조군 mAb에 필적하는 0.15-0.57 nM 범위의 EC₅₀ 값으로 세포 표면-발현된 인간 및 cyno CD 137 수용체에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 결합의 특이성을 보여주는 모 D011.10 또는 HEK293 세포에 대한 결합은 관찰되지 않았다. cyno CD137에 대한 20H4.9 양성 대조군 항-CD137 항체의 결합은 이들 세포에서 관찰되지 않았다. 공개된 데이터 (미국 특허 제7288638호)는 IgG1 형식의 20H4.9가 PMA (Phorbol Myristate Acetate) 유도된 cyno PMBC에서 cyno CD137에 결합함을 보여준다. 본 발명자들의 손에서, G1AA 형식의 20H4.9는 재조합 cyno CD137에 결합하였지만 친화도는 인간 CD137보다 훨씬 낮았으며 (데이터는 표시되지 않음), 이것이 D011.10-cCD137 세포에 대한 항체에서 관찰된 결합의 결여를 설명할 수 있다.
- [0480] FS30 mAb의 생물물리학적 특성을 결정하기 위해, 이들을 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 적용하여 단량체 분획의 백분율을 분석하였다. 시험된 4개의 FS30 mAb 모두는 단일-피크 프로파일을 보였으며 >97% 단량체였다. 이러한 높은 수준의 단량체 단백질은 기능적 활성 시험을 진행할 수 있게 하였다.
- [0481] 그후 항-CD137 mAb의 기능적 활성을 1차 T 세포 활성화 분석에서 분석하였다. 생체내에서, 항-CD137 mAb는 Fc γ의 모집에 의해 효능작용을 유도하여 mAb와 CD137 수용체의 클러스터링을 유발하였다. 표면 CD137 수용체 분자를 클러스터링하는 mAb의 최대 능력을 모방하기 위해, 분석 전에 항-인간 CH2 항체 (클론 MK1A6, 사내 생산)를 사용하여 FS30 mAb를 가교결합하였다. T 세포 활성화를 가교결합되지 않은 mAb와 비교하였다. LALA 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 골격의 항-암탉 난백 리소자임 (HEL) 항체 D1.3 (G1AA/He1D1.3)이 음성 대조군으로 포함되었다.
- [0482] 가교결합된 경우, FS30-5, FS30-10, FS30-15 및 FS30-16 mAb는 T 세포 활성화 분석에서 강력한 활성을 보였으

며, EC₅₀ 값은 10 nM 미만이고 IL-2의 최대 수준 (E_{max})은 양성 대조군 항-CD137 mAb (항-CD137 MOR7480.1 mAb, 5637 hIL-2 pg/ml; 및 항-CD137 20H4.9 mAb, 10232 hIL-2 pg/ml)과 유사하였다. FS30-6 mAb의 E_{max} (1512 hIL-2 pg/ml)는 양성 대조군 및 다른 FS30 mAb보다 상당히 낮았으며, 이것은 T 세포 활성화의 보다 낮은 전체 수준을 나타낸다. 가교결합의 부재하에서 활성을 보인 양성 대조군 항-CD137 20H4.9 mAb (3174 pg/ml의 hIL-2 생산)와 달리, FS30 mAb는 활성을 나타내지 않았다 (측정된 IL-2의 배경 반응 수준에 의해 표시되는 바와 같이 가교결합되지 않은 경우).

[0483] 실시예 6 - 인간 OX40 및 인간 CD137을 표적으로 하는 mAb²의 작제 및 발현

[0484] 항-인간 CD137 Fab와 쌍을 이루는 항-인간 OX40 Fcab를 포함하는 mAb²를 제조하였다. 인간 OX40-표적화 Fcab FS20-22-49를 T 세포 분석에서 이의 보다 높은 활성 때문에 CD137-표적화 Fab와의 페어링을 위해 선택하였다 (실시예 4.3 참조).

[0485] 6.1 mAb² 형식의 mAb의 발현 및 특성화

[0486] FS30-5, FS30-10, FS30-15, FS30-16 또는 FS30-35 클론의 CDR을 포함하고 CH2 도메인에 LALA 돌연변이 및 CH3 도메인에 FS20-22-49 인간 OX40 수용체-결합 부위를 포함하는 IgG1 분자로 구성된 mAb² 분자를 제조하였다. 이러한 mAb² 분자는 항-인간 OX40 mAb², FS20-22-49AA/HeID1.3의 VH 도메인을 FS30 클론의 해당 VH 도메인으로 대체하고 생성된 VH를 FS30 mAb의 해당 경쇄로 공동-형질감염시킴으로써 생성하였다. IgG1 분자의 CH2 도메인에 서의 LALA 돌연변이가 생성된 mAb² 분자에서 유지되었다. 이러한 mAb² 분자를 FS20-22-49AA/FS30-5, FS20-22-49AA/FS30-10, FS20-22-49AA/FS30-15, FS20-22-49AA/FS30-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35라고 하였다. mAb²를 HEK293-6E 세포에서 일시적인 발현에 의해 생산하고 mAb Select SuRe 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[0487] CD137은 사이토카인 수용체의 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 (TNFRSF)에 속한다 (Moran et al., 2013). 5 개의 mAb² 분자의 항-CD137 Fab 결합 부위의 특이성을 분석하기 위해, 인간 CD137 및 5개의 밀접하게 관련된 인간 TNFRSF 구성원 (TNFRSF1 A, TNFRSF1 B, GITR, NGFR 및 CD40)에 대한 mAb²의 결합을 SPR을 사용하여 시험하였다. 목적은 mAb²가 1 μM 농도에서는 밀접하게 관련된 항원에 대한 결합을 보이지 않지만 1 nM 농도에서 CD137 수용체에 대한 결합을 보여줌으로써 1000배 특이성을 입증하는 것이었다.

[0488] FS20-22-49AA/FS30-5, FS20-22-49AA/FS30-10, FS20-22-49AA/FS30-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35 mAb²는 (1000배에 가까운) 높은 수준의 특이성을 보인 반면 FS20-22-49AA/FS30-15 mAb²는 시험된 모든 5개의 밀접하게-관련된 TNFRSF 구성원에 대해 특이-결합을 보이지 않았다. 이러한 클론에 의해 나타나는 비특이 결합은 동일한 농도에서 CD137 수용체에 대한 결합보다 평균 약 5-10배 더 낮았으며, 이것은 FS30-15 mAb가 CD137과 밀접하게 관련된 동일한 5개의 TNFRSF 구성원에 대한 결합에 대해 시험될 때 동일한 결합 프로파일을 보여 주었기 때문에 mAb² 분자의 Fab 결합 부위로 인한 것으로 결론지어졌다. 이러한 데이터에 기반하여, FS30-15 클론은 추가 선택 캠페인에서 생략하였다.

[0489] 6.2 항-CD137 mAb의 서열 최적화

[0490] FS30-5, FS30-10, FS30-16 및 FS30-35 항-CD137 mAb는 CD137에 대한 높은 친화성과 특이성, 및 T 세포 활성화 분석에서 활성을 보였지만, 이들은 CDR 루프 내에 하나 이상의 잠재적 번역후 변형 (PTM) 부위를 함유하였다. 결합 및 활성을 유지하거나 개선하면서 이들 부위에서 치환될 수 있는 아미노산 잔기를 확인하기 위한 시도로 이러한 클론을 추가로 조작하기로 결정하였다. 확인된 잠재적 PTM 부위는 VH CDR3의 메티오닌 잔기 (FS30-5의 Kabat 위치 M100D 및 M100H, FS30-10의 M97, FS30-16의 M100A, FS30-35의 M100F), VH CDR2의 잠재적 아스파르트레이트 이성체화 모티프 (FS30-16의 Kabat 위치 D54G55) 및 VL CDR3의 잠재적 탈아미드화 부위 (FS30-16의 Kabat 위치 Q90G91)를 포함하였다.

[0491] 모든 가능한 아미노산 치환을 허용하기 위해 메티오닌, 아스파르트레이트 또는 글리신 잔기를 암호화하는 부위에 동의 코돈 NNK를 함유하는 5개의 FS20-22-49AA/FS30 mAb² 클론을 주형 및 프라이머로서 사용하여 부위-지정 돌연변이유발을 수행하였다. 시스테인 잔기 및 새로운 잠재적 PTM 모티프를 생성할 수 있는 아미노산은 제외되었

다. 클론을 발현시키고 D011.10-hCD137 세포에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 모 mAb² 클론과 비교하여 10 nM에서 유사하거나 (2배 이내) 개선된 결합을 갖는 클론을 30-50ml 규모의 발현을 위해 선택하고, 단백질 A 컬럼에서 정제하고 D011.10-hCD137 세포 및 항-인간 CH2 항체 MK1A6을 가교결합제로서 사용하여 T 세포 활성화 분석에서 스크리닝하였다.

[0492] D011.10-hCD137 세포를 PBS에서 1회 세척하고 D011.10 세포 배지 (10% FBS (Life Technologies) 및 5 µg/ml 푸로마이신 (Life Technologies, A11 113803)을 갖는 RPMI 배지 (Life Technologies))에 1.0×10^6 개 세포/ml의 농도로 재현탁하였다. PBS에 희석한 0.1 µg/ml 항-마우스 CD3 항체를 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양함으로써 96-웰 평저 플레이트를 항-마우스 CD3 항체 (Thermo Fisher Scientific, clone 17A2)로 코팅한 다음 PBS로 2회 세척하였다. D011.10-hCD137 세포를 1×10^5 개 세포/웰로 플레이트에 첨가하였다. 각 시험 항체의 2 µM 희석물을 DPBS (Gibco)에서 제조하고 D011.10 세포 배지에서 1:10 (30 µl + 270 µl)으로 추가로 희석하여 200 nM 희석물을 수득하였다. MK1 A6 가교결합제를 가교결합시키고자 하는 시험 항체 샘플과 1:1 물 비로 웰에 첨가하였다. 96-웰 플레이트에서, 각 항체 또는 항체/가교결합제 혼합물의 연속 희석물을 제조하였다. 100 µl의 희석된 항체 또는 항체/가교결합제 혼합물을 플레이트 상에서 D011.10-hCD137 세포에 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양하였다. 상청액을 수집하고 제조업체의 지침에 따라 마우스 IL-2 ELISA 키트 (eBioscience or R&D Systems)로 분석하였다. 플레이트를 Gen5 소프트웨어, BioTek를 갖는 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 판독하였다. 450nm의 흡광도 값에서 630nm의 흡광도 값을 뺀다 (보정). 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4-모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 마우스 IL-2 (mIL-2)의 농도를 항체의 로그 농도에 대해 플롯팅하고 생성된 곡선을 GraphPad Prism에서 로그 (효능제) 대 반응 방정식을 사용하여 피팅하였다.

[0493] 각각의 클론에 대해, 세포-표면 CD137에 대한 결합을 유지하거나 개선시킨 제한된 수의 아미노산을 중쇄 CDR3에서 메티오닌 잔기의 치환에 대해 확인하였다. FS20-22-49AA/FS30-16 mAb² 클론은 3개의 잠재적 PTM 부위를 함유하였으며 이들 각각의 돌연변이가 결합 친화도의 작은 감소를 야기하였다. 이들이 하나의 분자로 조합되었을 때 감소된 결합은 부가적이었고 (데이터는 표시되지 않음), 그 결과, 이 클론은 더 이상 추구되지 않았다. 관련 모 클론과 비교하여 CD137에 대한 결합 및 기능적 활성을 개선시킨 돌연변이는 거의 발견되지 않았다. FS20-22-49AA/FS30-10 mAb² 클론으로부터 모두 유래된 3개의 돌연변이 mAb² 클론은 개선된 결합 친화도 및 기능적 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이들 mAb²는 모 FS20-22-49AA/FS30-10 mAb²의 위치 97에서 메티오닌 잔기를 치환하는 아스파라긴, 트레오닌 또는 류신 잔기를 함유하였으며 각각 FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16으로 지정되었다. FS20-22-49AA/FS30-35 모 mAb² 클론으로부터 유래된 돌연변이 클론에 대한 EC₅₀ 값은 모 클론에 비해 기능적 활성의 개선을 보이지 않았지만, 모 클론의 위치 100F에서 메티오닌 잔기를 치환하는 알라닌 잔기를 함유하는, FS20-22-49AA/FS30-35-14로 지정된 하나의 돌연변이 클론은 개선된 결합을 보였다. FS20-22-49AA/FS30-5 모 mAb² 클론의 경우, 위치 100D의 메티오닌 잔기와 위치 100H의 메티오닌 잔기가 동일한 분자에서 각각 이소류신 잔기 및 류신 잔기로 변경되어, FS20-22-49AA/FS30-5-37로 지정된 돌연변이 mAb² 클론을 초래하였다. FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-35-14 및 FS20-22-49AA/FS30-5-37을 추가 특성화를 위해 선택하였다.

[0494] 6.3 인간 CD137 리간드 차단 분석

[0495] CD137-CD137L 상호작용은 CD137 수용체의 활성화에 필요하다. 효능제 항-CD137 항체는 리간드 상호작용을 모방함으로써 CD137의 활성화를 유도하여 리간드 결합을 잠재적으로 차단하거나 리간드 결합을 방해하지 않으면서 수용체의 클러스터링 및 활성화를 유도할 수 있다. 항체가 잠재적으로 CD137L을 모방하는 경우, 수용체와 리간드의 상호작용을 차단할 수 있다. MOR7480.1은 리간드/수용체 상호작용을 차단하는 것(US 2012/0237498)으로 알려진 반면 20H4.9 항체는 CD137과 이의 리간드 사이의 상호작용을 차단하지 않는 것으로 이전에 보고된 바 있다 (미국 특허 제728638호).

[0496] 항-인간 CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14를 ELISA-기반 방법을 사용하여 CD137-CD137L 상호작용을 차단하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. IgG1 형식 (G1/11D4; 서열 번호 174 및 175)의 항-OX40 mAb 11D4 (유럽

특허 제2242771호)를 동형/음성 대조군으로서 사용하고; 항-OX40 Fcab 클론 FS20-22-49AA 및 항-FITC 항체 4420의 Fab 영역을 포함하는 mAb² FS20-22-49AA/4420을 OX40 결합에 대한 음성 대조군 mAb²로서 사용하며; 항-CD137 mAb G1/MOR7480.1 (서열 번호 119 및 120) 및 G1/20H4.9 (서열 번호 121 및 122)를 CD137 결합 및 리간드 차단 활성에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0497] 구용적으로, 재조합 인간 CD137-mFc-Avi 항원을 PBS에서 1 µg/ml의 농도로 Maxisorp 96-웰 플레이트 상에 4℃에서 밤새 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 PBST (PBS + 0.05% Tween20™)로 세척하고 교반하면서 실온에서 1시간 동안 PBS + 1% BSA (Sigma, A3059-500G)로 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 PBST로 다시 세척하였다. 각 시험 항체의 100 nM 희석물을 PBS + 1% BSA에서 제조하고 CD137-코팅된 플레이트에 첨가하고 교반하면서 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이러한 배양 후, 플레이트를 PBST로 세척한 다음 교반하면서 실온에서 1시간 동안 PBS에서 20 ng/ml CD137L-His (R&D Systems, 2295-4L-025/CF)와 함께 배양하였다. 그후 플레이트를 PBST로 세척한 다음 교반하면서 실온에서 1시간 동안 PBS에서 1:1000 희석으로 항-his 이차 항체 (R&D Systems, MAB050H)와 함께 배양하였다. 그후 플레이트를 PBST로 세척하고 양성 대조군 웰이 청색으로 변할 때까지 TMB 검출 시약 (Thermo Fisher Scientific, 002023)과 함께 배양한 다음 2N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 플레이트를 Gen5 소프트웨어, BioTek를 갖는 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 판독하였다. 450nm의 흡광도 값에서 630nm의 흡광도 값을 뺀다 (보정). 감산된 흡광도 값을 항체의 로그 농도에 대해 플롯팅하고 생성된 곡선을 GraphPad Prism의 로그 (억제제) 대 반응 방정식을 사용하여 피팅하였다. G1/11D4 및 G1/MOR7480.1 대조군 mAb를 각각 0 및 100 % 차단 값으로 설정함으로써 값을 정규화하였다. 데이터를 GraphPad Prism을 사용한 일원 ANOVA 검정 및 Holm-Sidak의 다중 비교 검정을 사용하여 분석하였다.

[0498] 시험된 5개의 항-인간 CD137 mAb² 클론에 대해 다양한 차단 활성이 관찰되었다. FS20-22-49AA/FS30-5-37은, 양성 대조군 항체와 같이, 수용체-리간드 상호작용의 완전한 억제를 나타내었다. FS30-10 계통의 항-CD137 mAb의 Fab 영역을 함유하는 모든 mAb² 클론 (즉, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16)은 CD137과 CD137L 간의 상호작용을 49-54%까지 억제하였으며 따라서 부분 차단제로 간주되었다. CD137과 CD137L 사이의 상호작용을 부분적으로만 차단함으로써, 이들 항체 중 하나가 결합되어 있어도 일부 CD137 신호전달이 여전히 이 메커니즘을 통해 발생할 수 있도록 이러한 mAb가 CD137L과 이의 수용체의 자연 상호작용을 완전히 억제하지 못할 수 있다. FS20-22-49AA/FS30-35-14 클론은, 음성 대조군 FS20-22-49AA/4420 mAb² 분자와 같이, 수용체-리간드 상호작용을 상당히 억제하는 능력이 부족하며 따라서 비-차단제로 간주되었다.

[0499] 요약하면, 이러한 ELISA-기반 분석의 결과는 시험된 항-CD137 mAb의 패널이 완전한 차단 활성, 부분적 차단 활성 및 차단 활성 없음을 포함한 다양한 리간드 차단 능력을 나타낸다는 것을 보여주었다. 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14 각각은 양성-대조군 항-CD137 mAb과는 상이한 차단 활성을 나타내었다. 다양한 리간드 차단 활성이 확인되었기 때문에, 각 항체의 기능적 활성을 시험하였다.

[0500] 클론 FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16을 세포-기반 방법을 사용하여 CD137-CD137L 상호작용을 차단하는 이들의 능력에 대해 추가로 시험하였다. 다양한 차단 활성이 관찰되었으며, FS20-22-49AA/FS30-5-37은, 이러한 분석에 사용된 양성 대조군 항체 (G1/MOR7480.1)와 같이, 수용체-리간드 상호작용의 완전한 억제를 보여주었다. FS30-10 계통의 항-CD137 mAb의 Fab 영역을 함유하는 모든 세 개의 mAb² 클론 (즉, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16)은 CD137과 CD137L 사이의 상호작용을 46-76%까지 억제하였으며 따라서 부분 차단제로 간주되었다. 따라서, 이 분석의 결과는 ELISA-기반 차단 분석의 결과와 유사하였으며 시험된 항-CD137 mAb의 패널은 완전 내지 부분 차단 활성에 이르는 다양한 리간드 차단 능력을 나타내었다. 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 각각은 양성-대조군 항체와는 상이한 차단 활성을 나타내었다.

[0501] 실시예 7 - 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서 mAb 및 mAb² 클론의 결합 특이성 및 기능적 활성

[0502] 7.1 mAb² 클론의 결합 특이성

[0503] CD137 및 OX40은 사이토카인 수용체의 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 (TNFRSF)에 속한다 (Moran et al., 2013). 5개의 mAb² 분자의 항-CD137 Fab 뿐만 아니라 OX40 Fcab 결합 부위의 특이성을 분석하기 위해, 인간

CD137, 인간 OX40 및 6개의 밀접하게 관련된 인간 TNFRSF 구성원에 대한 FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/FS30-35-14 및 FS20-22-49AA/FS30-5-37 mAb²의 결합을 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 검사하였다. 목적은 1 μ M 농도에서는 mAb²가 밀접하게 관련된 항원에 대한 결합은 보이지 않지만 1 nM 농도에서는 CD137 및 OX40 수용체에 대한 결합을 보여줌으로써 1000배 특이성을 입증하는 것이었다. 항-CD137 mAb MOR7480.1 및 항-OX40 mAb 11D4를 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0504] 간단히 말해서, CM5 칩 상의 플로우 셀을 대략 1000 RU의 인간 CD137-mFc-Avi (표 3), OX40-mFc (표 2), 재조합 인간 TNFRSF1A-Fc, 재조합 인간 TNFRSF1 B-Fc, 재조합 인간 GITR-Fc, 재조합 인간 NGFR-Fc, 재조합 인간 CD40-Fc 또는 재조합 인간 DR6-Fc로 고정하였다. 플로우 셀 1은 블랭크 고정을 위해 남겨 두었다. 5개의 mAb²를 1x HBS-EP 완충액 (GE Healthcare, 제품 코드 BR100188)에서 1 μ M 및 1 nM으로 희석하고, 칩 위로 3분 동안 유동시킨 다음 4분 동안 해리되도록 두었다. 재생을 위해 10 mM 글리신 pH 1.5의 30초 주입을 사용하였다. 양성 대조군 mAb를 각 항원의 코팅을 입증하기 위해 50-100 nM로 주입하였다. 결합 수준을 결합 단계의 말기에 결정하여 비교하였다.

[0505] 선택된 모든 mAb²는 각각 MOR7480.1 및 11D4 양성 대조군과 유사하거나 더 높은 인간 CD137 및 OX40 수용체에 대한 높은 수준의 특이성을 나타내었다.

[0506] 7.2 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서 CD137 효능성 항체의 기능적 활성

[0507] 상이한 항-CD137 효능성 항체의 활성을 이해하기 위해, D011.10-hCD137 세포를 사용한 T 세포 활성화 분석을 사용하였다. 항-CD137 효능성 항체 G1AA/MOR7480.1 (서열 번호: 125 및 120), G1AA/20H4.9 (서열 번호: 165 및 122) 및 G1AA/FS30-10-16 (서열 번호: 154 및 97) 뿐만 아니라 동형 음성 대조군으로서 IgG1 형식 (G1/4420; 서열 번호: 115 및 116)의 항-FITC 항체 4420을 시험하였다. 항체 분자를 가교결합 항-인간 CH2 항체 MK1A6의 존재 및 부재 둘 다에서 시험하였다 (실시예 2.1 참조). 마우스 IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

[0508] D011.10-hCD137 세포를 PBS에서 한 번 세척하고 1.0 x 10⁶개 세포/ml의 농도로 D011.10 세포 배지 (10% FBS (Life Technologies) 및 5 μ g/ml 푸로마이신 (Life Technologies, A11 113803)을 갖는 RPMI 배지 (Life Technologies))에 재현탁시켰다. 96-웰 평저 플레이트를 PBS에 희석된 0.1 μ g/ml 항-마우스 CD3 항체와 함께 2시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양함으로써 항-마우스 CD3 항체 (Thermo Fisher Scientific, clone 17A2)로 코팅한 다음 PBS로 2회 세척하였다. D011.10-hCD137 세포를 1 x 10⁵개 세포/웰로 플레이트에 첨가하였다. 각 시험 항체의 2 μ M 희석물을 DPBS (Gibco)에서 제조하고 D011.10 세포 배지에서 1:10 (30 μ l + 270 μ l)로 추가로 희석하여 200 nM 희석물을 수득하였다. MK1A6 가교결합제를 필요에 따라 시험 항체와 1:1 물 비로 웰에 첨가하였다. 96-웰 플레이트에서, 항체 또는 항체/가교결합 항체 혼합물의 연속 희석물을 제조하였다. 100 μ l의 희석된 항체 또는 항체/가교결합 항체 혼합물을 플레이트 상에 D011.10-hCD137 세포에 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양하였다. 상청액을 수집하고 제조업체의 지침에 따라 마우스 IL-2 ELISA 키트 (eBioscience or R&D Systems)로 분석하였다. 플레이트를 Gen5 소프트웨어, BioTek를 갖는 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 판독하였다. 450nm의 흡광도 값에서 630nm의 흡광도 값을 뺀다 (보정). 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4-모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 마우스 IL-2 (mIL-2)의 농도를 항체의 로그 농도에 대해 플롯팅하고 생성된 곡선을 GraphPad Prism에서 로그 (효능성) 대 반응 방정식을 사용하여 피팅하였다.

[0509] 분석의 결과가 도 2c 및 d에 나타내어져 있다. 항-CD137 항체는 이들의 활성을 위한 가교결합 항체에 대한 요건에 있어서 상이하였으며, 3개의 항-CD 137 항체 모두가 가교결합 항체의 존재하에 IL-2 생산에서 농도-의존적 증가를 보였지만 G1AA/20H4.9 항체만이 가교결합 항체의 부재하에서 활성을 보였다. 따라서, G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16은 가교결합 항체의 첨가를 필요로 하였으며, 즉 이들의 활성은 '가교결합-의존적'인 반면 G1AA/20H4.9는 가교결합 항체의 존재 및 부재 둘 다에서 활성을 보였으며, 즉 이의 활성은 '가교결합-비의존적'이었다.

[0510] 7.3 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서 mAb² 클론의 기능적 활성

[0511] 선택된 FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-

10-16 mAb² 클론의 기능적 활성을 D011.10-hCD137 세포를 사용한 T 세포 활성화 분석에서 시험하였다. IgG1 형식 (G1/4420; 서열 번호 115 및 116)의 항-FITC 항체 4420을 동형 음성 대조군으로서 사용하고; 항-OX40 mAb G1/11D4 (서열 번호 174 및 175) 및 mAb² 클론 FS20-22-49AA/4420 (서열 번호 123 및 116)을 음성 대조군으로서 사용하며; IgG1 (G1/MOR7480.1; 서열 번호 119 및 120) 및 IgG2 (G2/MOR7480.1; 서열 번호 124 및 120) 형식 둘다의 항-CD137 항체 MOR7480.1 (여기서, IgG2 형식은 항체가 임상 시험으로 시험된 형식이다 (Gopal et al., 2017; Tolcher et al., 2017))을 양성 대조군으로서 사용하였다. mAb 및 mAb² 분자를 항-인간 CH2 항체, MK1A6와 가교결합하였으며 (실시예 2.1 참조), 한 실험에서 가교되지 않은 mAb 및 mAb² 분자의 활성을 조사하였다. 마우스 IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다. 실험은 실시예 7.2에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0512] 가교결합된 경우, 선택된 5개 mAb² 클론 모두는 T 세포 활성화 분석에서 강력한 활성을 보였으며, 평균 EC₅₀ 값은 15 nM 미만이고 평균 E_{max} 값은 약 16000-20000 pg/ml IL-2 범위였다 (표 6 및 도 2a). 가교결합의 부재하에서 시험된 mAb² 클론의 활성은 관찰되지 않았다 (도 2b). MOR7480.1 양성 대조군 항체는 가교결합될 때에만 활성인 것으로 관찰되었다 (G1/MOR7480.1의 경우 3.3 nM의 EC₅₀ 및 12575 pg/ml의 E_{max}, G2/MOR7480.1의 경우 2.4 nM의 EC₅₀ 및 8547 pg/ml의 E_{max}). 가교결합된 항-OX40 mAb (G1/11D4)의 활성 부족과 가교결합되지 않은 항-OX40 Fcab-함유 mAb² 분자에 대해 관찰된 낮은 배경 신호의 조합은 이 분석의 결과가 CD137 활성만의 판독치이며, 이것은 높은 수준의 CD137 수용체 발현 및 D011.10 세포에 의한 검출 불가능한 수준의 OX40 수용체 발현 때문일 가능성이 높다는 것을 보여준다 (데이터는 표시되지 않음).

[0513] 표 6: 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서 mAb²의 활성

mAb/mAb ²	비가교-결합된 mAbs/mAb ² 의 활성 (n=1)		가교결합된 mAbs/mAb ² 의 활성 (n=2의 평균)	
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (mIL-2 pg/ml)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (mIL-2 pg/ml)
G1/4420	N/A	N/A	N/A	N/A
G1/11D4	N/A	N/A	N/A	N/A
G1/MOR7480.1	NM	NM	3.3	12575
G2/MOR7480.1	N/A	N/A	2.4	8547
FS20-22-49AA/4420	N/A	N/A	N/A	N/A
FS20-22-49AA/FS30-5-37	N/A	N/A	13.4	18129
FS20-22-49AA/FS30-10-3	N/A	N/A	6.1	17049
FS20-22-49AA/FS30-10-12	N/A	N/A	9.5	17183
FS20-22-49AA/FS30-10-16	N/A	N/A	4.7	16310
FS20-22-49AA/FS30-35-14	N/A	N/A	5.1	19837

[0514] N/A: 낮은 신호로는 의미있는 EC₅₀/E_{max} 결정을 할 수 없으므로 해당없음

[0515] NM: 측정 불가

[0516] 따라서, 항-인간 CD137 단클론 항체 FS30-5-37, FS30-10-3, FS30-10-12, FS30-10-16 및 FS30-35-14의 CDR을 포함하는 mAb²는 가교결합될 때 D011.10-hCD137 T 세포 활성화 분석에서 CD137을 활성화할 수 있는 강력한 활성을 나타내었다. 가교결합의 부재하에서 유의한 활성은 관찰되지 않았다. 이러한 mAb²는 항-인간 OX40 Fcab FS20-22-49로부터의 CH3 도메인을 함유하였으며, 이것은 또한 T 세포 분석에서 가교결합될 때 높은 활성을 나타내었다 (실시예 4.3 참조). LALA 돌연변이를 갖고 제조된 mAb²는 FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16로 지정되었다.

[0517] 이들 mAb²를 특정 표적의 발현에 기반하여 추가적인 가교결합제를 필요로 하지 않으면서 OX40 및 CD137 둘 다를 자율적으로 효능화시킬 수 있는 이중 효능제로서 작용할 수 있는지를 결정하기 위한 추가 분석을 위해 선택하였

[0518]

다.

[0519] 실시예 8 - 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137에 대한 mAb²의 결합 친화도

[0520] CD137 친화도 결정을 위해, Biacore CM5 칩 (GE Healthcare)을 제조업체의 조건에 따라 인간 항체 포획 키트 (GE Healthcare)를 사용하여 대략 4000 RU의 표면 밀도로 항-인간 Fc로 코팅하였다. 시험 항체의 샘플 (mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16, 항-CD137 양성 대조군 G1/MOR7480.1 및 항-hOX40 음성 대조군 G1/11D4)을 대략 80 RU로 포획하였다. 인간 또는 시노물구스 CD137 (hCD137-mFc-Avi 또는 cCD137-mFc-Avi)을 70 μ l/min의 유속으로 200 nM에서 시작하여 3배 희석 시리즈의 농도 범위로 유동시켰다. 결합 시간은 2분이고 해리 시간은 8분이었다. 실행 완충액은 HBS-EP (GE Healthcare BR100188)였다. 3M 염화마그네슘을 30 μ l/min의 유속으로 30초 동안 주입하여 플로우 셀을 재생하였다.

[0521] OX40 친화도 결정을 위해 Biacore CM5 칩을 제조업체의 조건에 따라 인간 Fab 포획 키트 (GE Healthcare 28958325)를 사용하여 대략 8000 RU의 표면 밀도로 항-인간 Fab로 코팅하였다. 시험 항체의 샘플 (FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb², G1/MOR7480.1 (음성 대조군) 및 G1/11D4 (양성 대조군))을 대략 80 RU로 포획한 다음 인간 또는 시노물구스 OX40 항원 (hOX40-mFc 또는 cOX40-mFc)을 70 μ l/min의 유속으로 200 nM에서 시작하는 3배 희석 시리즈의 농도 범위로 유동시켰다. 결합 시간은 2분이고 해리 시간은 8분이었다. 실행 완충액은 HBS-EP였다. pH 2.1의 글리신-HCl을 30 μ l/min의 유속으로 30초 동안 주입하여 플로우 셀을 재생하였다.

[0522] 데이터를 의도적으로 블랭크로 남겨진 (항체 결합 없음) 플로우 셀에 대한 이중 참조에 의해 분석하였다. 결합 동역학을 1:1 Langmuir 모델과 맞추어 결합 (k_a) 및 해리 (k_d) 속도를 생성하였다. 평형 결합 상수 (K_D)는 각 샘플에 대해 해리 속도를 결합 속도로 나누어 계산하였다. 데이터 분석은 BiaEvaluation 소프트웨어 버전 3.2로 수행하였다. 결과는 표 7에 나타내어져 있다.

[0523] 표 7 :SPR에 의해 결정되는 인간 및 시노물구스 CD137 및 OX40에 대한 mAb²의 결합 친화도

	CD137		OX40	
mAb /mAb ²	인간 K_D (nM)	시노물구스 K_D (nM)	인간 K_D (nM)	시노물구스 K_D (nM)
G1/MOR7480.1	0.127	NM	NB	NB
G1/11D4	NB	NB	0.0337	NM
FS20-22-49AA/FS30-5-37	3.85	6.42	0.385	1.63
FS20-22-49AA/FS30-10-3	0.342	0.318	0.285	1.11
FS20-22-49AA/FS30-10-12	0.255	7.24	0.37	1.02
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.17	0.15	0.214	0.861

[0524]

[0525] NB - 결합 검출 불가. NM - 측정 불가.

[0526] OX40/CD137 mAb²에 대한 결합 친화도는 이들 분자가 수용체 둘 다에 높은 친화도로 결합함을 보여준다. 인간 OX40에 대한 이들 분자의 친화도는 유사하며, 이것은 이들 분자가 모두 OX40 Fcab을 공유하기 때문으로 예상된다. 시노물구스 OX40에 대한 친화도는 인간 OX40의 5배 이내이다. 인간 CD137에 대한 친화도는 4-0.2 nM 범위이고, 항-CD137 Fab가 각 분자에서 상이하기 때문에 시노물구스 CD137에 대한 교차-반응성도 가변적이다. FS20-22-49AA/FS30-10-16은 인간 CD137에 대해 보다 높은 친화도를 가질 뿐만 아니라 시노물구스 CD137에 대해 유사한 친화도를 갖는다. 인간 및 cyno 항원에 대한 결합의 유사성은 시노물구스 원숭이 연구에서 mAb²의 행동이 인간에게 외삽될 수 있기를 희망하기 때문에 유리할 수 있다.

[0527] 또한, FS20-22-49AA/FS30-10-16은 인간 OX40 및 인간 CD137에 대해 유사한 친화도를 가지므로 mAb²가 이들이 공동-발현될 때 두 표적 모두에 동일하게 잘 결합할 것으로 예상된다.

[0528] OX40 및 CD137에 결합하고 표적 둘 다의 클러스터링 및 활성화를 동시에 유도하는 mAb²는 이중 효능제로서 작용할 것으로 예상된다. OX40 및 CD137 둘 다는 T 세포 상에 존재하는 것으로 알려져 있다 (Ma, et al., 2005). 이론에 결부시키고자 함이 없이, mAb²가 표적 둘 다를 발현하는 세포에 결합할 가능성이 더 높기 때문에, 표적

들 다에 대한 결합에 대해 유사한 친화도를 갖는 mAb²는 이중 효능제로서 유리할 수 있다고 생각된다. 다른 것 보다 유의적으로 더 높은 친화도로 하나의 표적을 우선적으로 결합하는 mAb²는 두 표적 모두를 발현하지 않는 세포에 우선적으로 결합할 수 있기 때문에 이중 효능제로서 작용할 수 없다.

[0529] 실시예 9 - OX40 및 CD137에 대한 mAb²의 동시 결합

[0530] 9.1 인간 OX40 및 인간 CD137에 대한 mAb²의 동시 결합

[0531] OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16이 OX40 및 CD137에 동시에 결합하는 능력을 Biacore 3000에서 SPR에 의해 시험하였다. G1/MOR7480.1을 대조군으로서 사용하였다. 제조업체의 지침에 따라, 비오틴화된 인간 CD137 (hCD137-mFc-Avi-Bio)을 HBS-EP 완충액에서 100 nM로 희석하고 약 1000 RU의 표면 밀도로 스트렙타비딘 (SA) 칩 (GE Healthcare BR100032) 상에 고정하고, 플로우 셀을 배경 공제를 위해 고정된 단백질없이 활성화 및 비활성화시켰다. HBS-EP 완충액에서 100 nM으로 희석된 항체를 100 nM의 인간 OX40 (hOX40-mFc) 또는 HBS-EP 완충액과 함께 30 µl/min의 유속으로 공동-주입하였다. 각 결합 단계에 대해, 3분 동안 해리가 이어졌다. 센서 칩은 30 µl/min의 유속으로 글리신 2.5 (GE Healthcare)의 15 µl 주입으로 각 사이클 후에 재생되었다. 시험된 모든 mAb²는 OX40 및 CD137에 동시에 결합할 수 있었다. 대조군 mAb, G1/MOR7480.1은 CD137에만 결합하였다.

[0532] 9.2 무린 OX40 및 무린 CD137에 대한 무린 수용체-표적화 mAb²의 동시 결합

[0533] 항-마우스 OX40 Fcab와 항-마우스 CD137 Fab를 포함하는 mAb²를 무린 OX40 및 무린 CD137에 동시에 결합하는 이들의 능력을 시험하기 위해 준비하였다. 마우스 OX40-표적화 Fcab FS20m-232-91을 T 세포 분석에서의 이의 보다 높은 활성 때문에 선택하였으며 인간 IgG1 동형 형식 (G1/Lob12.3; University of Southampton)의 항-마우스 CD137 항체 Lob12.3 (Taraban et al., 2002)의 Fab를 FS20m-232-91 Fcab과의 페어링을 위해 선택하였으며, 이것은 마우스 CD137-발현 세포에 대한 우수한 세포 결합을 보였고 시험관내 및 생체내 활성을 갖는 효능적 CD137 항체로서 문헌에서 널리 사용되기 때문이다. FS20m-232-91 CH3 도메인 및 항-마우스 CD137 항체 Lob12.3의 Fab 및 LALA 돌연변이를 함유하는 mAb²는 'FS20m-232-91AA/Lob12.3'으로 지정한 반면 LALA 돌연변이 없이 FS20m-232-91 CH3 도메인 및 항-마우스 CD137 항체 Lob12.3의 Fab를 함유하는 mAb²는 'FS20m-232-91/Lob12.3'으로 지정하였다.

[0534] 두 표적에 동시에 결합하는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²의 능력은 BIAcore 3000 기기 (GE Healthcare) 상에서 SPR에 의해 시험하였다. G1/Lob12.3을 양성 대조군으로서 사용하였다. 제조업체의 지침에 따라, 재조합 마우스 CD137 (mCD137-hFc; R&D Systems, cat. no. 937-4B-050)를 아세트산나트륨 pH 5.0 (GE Healthcare)에서 200 nM로 희석하고 대략 1000 RU의 표면 밀도로 Biacore CM5 칩 상에 고정하고, 플로우 셀을 배경 공제를 위해 고정된 단백질없이 활성화 및 비활성화시켰다. HBS-EP 완충액에서 100 nM으로 희석된, mAb² 및 양성 대조군을 100 nM의 인간 OX40 (mOX40-mFc) 또는 HBS-EP 완충액과 함께 30 µl/min의 유속으로 공동-주입하였다. 각 결합 단계에 대해 3분 동안 해리가 이어졌다. 센서 칩은 20 µl/min의 유속으로 pH 1.7의 수성 글리신-HCl의 30초 주입으로 각 사이클 후에 재생되었다. mAb²는 OX40 및 CD137에 동시에 결합할 수 있었다. G1/Lob12.3 mAb는 CD137에만 결합하였다.

[0535] 실시예 10 - Fcγ 수용체에 대한 mAb²의 결합

[0536] TNFR 패밀리를 구성원을 표적으로 하는 효능성 항체는 생체내 활성을 위해 표적의 클러스터링 및 활성화를 유도하기 위해 Fcγ 수용체를 통한 가교결합을 필요로 하는 것으로 문헌에서 알려져 있다 (Wajant, 2015). 그러나, 이것은 이중 효능제로 의도된 항체에 대해서는 바람직하지 않을 수 있다. 따라서 LALA 돌연변이의 삽입에 의해 Fcγ 수용체에 결합하는 mAb²의 능력을 감소시키기로 결정하였다.

[0537] 인간 IgG1 동형 항체는 Fcγ 수용체에 결합할 수 있다. 이것은 표적을 발현하는 세포가 Fcγ 수용체에 결합할 때 이의 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC)과 같은 효과기 기능을 유도하여 세포 용해를 초래할 수 있다. OX40/CD137 mAb²의 의도된 메커니즘은 OX40 및 CD137을 발현하는 세포를 사멸시키지 않고 활성화하기 때문에,

mAb²에 의해 유도된 ADCC의 감소가 바람직하다. 또한, OX40/CD137 mAb²는 이중 효능제로 기능하도록 의도되기 때문에, 이들의 의도된 작용 메커니즘은 동일한 세포에서 공동-발현되거나 상이한 세포에서 발현될 때 OX40 및 CD 137 둘 다에 이중 결합에 의한 가교결합의 결과로 수용체를 통해 신호를 보내는 것이며, 그래서 Fc γ 수용체를 통해 가교결합하는 능력은 기능을 위한 요건이 아니다.

[0538] 또한, CD137-표적화 항체는 임상에서 간 독성을 나타낸 것으로 알려져 있으며 (Segal et al., 2017) 독성 메커니즘은 알려지지 않았지만 항-CD137 항체의 Fc γ R-매개된 가교결합 및 간에서 또는 말초에서의 CD137-발현 세포의 활성화에 의존할 수 있다. Fc γ R-매개된 가교결합을 통해 CD137 효능작용을 방지하는 것은 이들 분자가 OX40 및 CD137에 대한 이중 결합을 통해서만 가교결합될 것이기 때문에 본 발명의 OX40/CD137 mAb²의 독성 위험을 감소시킬 수 있다.

[0539] SPR에 의한 결합은 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16에 LALA 돌연변이의 존재가 Fc γ 수용체, 구용적으로 hFc γ R1 (R&D Systems, cat. no. 1257-FC-050/CF), hFc γ R2a (R&D Systems, cat. no. 1330-CD-050/CF), hFc γ R2b (R&D Systems, cat. no. 1460-CD-050/CF) 및 hFc γ R3a (R&D Systems, cat. no. 4325-FC-050/CF)에 대한 결합 친화도를 감소시켰음을 확인하기 위해 사용되었다. hIgG1 동형 형식의 항-hOX40 mAb G1AA/11D4 및 G1/11D4 (각각 LALA 돌연변이 포함 및 제외) 및 항-CD137 mAb G1AA/20H4.9 및 G1/20H4.9 (각각 LALA 돌연변이 포함 및 제외), 및 hIgG4 동형 형식의 항-hCD137 mAb G4/20H4.9가 대조군 항체로서 사용되었다. 결합은 Biacore 3000 기기 (GE Healthcare)에서 시험하였다. 인간 OX40 (BPS Bioscience cat no 71310) 및 인간 CD137 (사내에서 제조됨) 비오티닌화된 his-태그 항원을 2 μ M 농도로 SA 칩 (GE Healthcare cat no BR100398) 상에 코팅하였다. 인간 OX40 및 인간 CD137은 별도의 플로우 셀에 코팅한 반면 또 다른 플로우 셀은 배경 공제를 위해 블랭크로 남겨 두었다. 재생 조건은 20 μ l/min 유속에서 pH 2.0의 12 μ l 수성 10 mM 글리신-HCl로 결정되었다. 항체 (표 8 참조) 및 인간 Fc γ R (표 8 참조)를 HBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v 계면활성제 P20, GE Healthcare, BR-1003-68)에서 100 nM (항체) 또는 500 nM (인간 Fc γ R)로 희석하고 20 μ l/min 유속으로 공동-주입하고 5분 동안 해리가 이어졌다.

[0540] 데이터 분석은 블랭크 플로우 셀을 기준으로 하고 항체 결합 후 곡선을 정렬함으로써 BiaEvaluation 소프트웨어 버전 3.2 RC1로 수행하였다. OX40 및 CD137 수용체에 결합하는 항체의 효과를 정규화하기 위해 항체의 결합 단계의 말기의 절대 반응으로부터 Fc γ R의 결합 단계의 말기의 절대 반응을 공제함으로써 결합 단계의 말기에 결합 반응에 대한 값을 생성하였다.

[0541] 이러한 Fc γ R에 대한 결합이 완전히 제거되지 않은 상태에서 Fc γ R1 결합의 오프-레이트를 증가시키는데 있어서의 LALA 돌연변이의 효과를 입증하기 위해 Fc γ R1의 해리 단계의 말기의 결합 반응에 대한 값을 측정하였다. 이들은 Fc γ R의 해리 단계의 말기의 절대 반응으로부터 Fc γ R의 결합 단계의 말기의 절대 반응을 공제함으로써 생성하였다. 항-CD137 항체에 대한 값은 CD137-his 항원으로 코팅된 플로우 셀로부터 취하고, 항-OX40 항체에 대한 값은 OX40-his 항원으로 코팅된 플로우 셀로부터 취하고, OX40/CD137 mAb²에 대해서는 OX40-his 항원으로 코팅된 플로우 셀 및 CD137-his 항원으로 코팅된 플로우 셀 둘 다로부터 취하였다. 결과는 표 8에 나타내어져 있다.

[0542] 표 8 : SPR에 의한 인간 Fc γ 수용체에 대한 항체의 결합 반응

mAb/mAb ²	칩 상의 항원	Fc γ R 결합 단계 말기의 결합 반응 (RU) (온 레이트)				Fc γ R의 해리 단계 말기의 결합 반응의 감소 (RU)
		Fc γ RIIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	Fc γ RI	
G1/11D4	OX40-his	123	89.7	142.7	370.3	46.4
G1AA/11D4	OX40-his	64.5	60.9	67.3	292.3	202.6
G1/20H4.9	CD137-his	224.8	158.5	297.4	741	-16.3
G1AA/20H4.9	CD137-his	97.5	95.4	129.4	504.6	380.6
G4/20H4.9	CD137-his	156	163.9	113.1	693.3	57.1
FS20-22-49AA/FS30-10-16	OX40-his	37.4	34.3	31.4	237.5	234.8
FS20-22-49AA/FS30-10-16	CD137-his	10.9	9	17.3	245.8	367.3

[0543]

- [0544] LALA 돌연변이가 없는 mAb² 및 대조군 항체는 모두 IgG1 및 IgG4 형식으로 예상대로 Fc γ 수용체 각각에 결합하였다. LALA 돌연변이를 함유하는 IgG1 형식의 mAb² 및 대조군 항체는 LALA 돌연변이를 갖지 않는 IgG1 형식의 대조군 항체 및 IgG4 형식의 대조군 항체에 비해 Fc γ RI를 제외한 시험된 Fc γ 수용체 각각에 대해 결합 단계(온-레이트)의 말기에 유의적으로 감소된 결합을 나타내었다. hIgG1 LALA-함유 항체에 대한 고친화성 Fc γ 수용체, Fc γ RI의 온 레이트 결합은 비-LALA-함유 IgG1 항체에 비해 단지 미미하게 감소하여, 돌연변이 도입에 의해 유의적으로 변하지 않았다. 그러나, Fc γ RI의 해리 단계의 말기에서 결합 반응의 보다 큰 감소에 의해 나타나는 바와 같이, Fc γ RI에 대한 오프-레이트는 LALA가 없는 항체보다 LALA 돌연변이를 함유하는 항체에서 더 빨랐다(비-LALA 함유 항체의 경우 60 RU 미만에 비해 LALA 함유 항체 각각에 대해 200 RU 이상).
- [0545] 전반적으로, LALA 돌연변이를 함유하는 OX40/CD137 mAb²는 야생형 인간 IgG1과 비교할 때 다른 LALA-함유 hIgG1 항체와 유사한 방식으로 IgG4 대조군 항체보다 낮은 수준으로 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시켰다. Fc γ 수용체-결합은 ADCC 활성을 위해 필요하기 때문에, LALA 돌연변이에 의해 유발된 Fc γ 수용체에 대한 결합의 이러한 감소는 또한 표적 세포가 mAb² 결합에 의해 고갈되지 않도록 감소된 ADCC를 초래할 것으로 예상된다. 이것은 OX40/CD137 mAb²가 효능성 항체이기 때문에 중요한 것으로 간주되며, 따라서 이것이 mAb²가 자극하려는 세포이기 때문에 표적 세포의 고갈이 바람직하지 않다.
- [0546] Fc γ RIIIa는 자연 살해(NK) 세포와 같은 면역 효과기 세포에서 발현되며, ADCC를 매개하는데 중요한 것으로 나타났다(Chan et al., 2015). SPR 데이터에 의해 확인되는 바와 같은 Fc γ RIIIa에 대한 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²의 감소된 결합이 ADCC 경로의 낮거나 무시할 정도의 활성화로 번역되는지 여부를 결정하기 위해, Fc γ RIIIa를 발현하는 조작된 Jurkat 세포를 효과기 세포로서 사용하고 인간 OX40 또는 인간 CD137을 과발현하는 Raji 세포를 표적 세포로서 사용하여 ADCC 생물학적 검정을 수행하였다. mAb²는 분석에 사용된 음성 및 양성 대조군에 대해 관찰된 반응과 비교하여 OX40-발현 또는 CD137-발현 Raji 세포에서 ADCC 활성화를 유도하지 않는 것으로 관찰되었다.
- [0547] 다른 효능성 항체는 항체의 Fc γ 수용체-가교결합에 의존하여 고차 구조를 생성하여(Stewart et al., 2014; Wajant, 2015), 세포 표면 상의 수용체의 클러스터링 및 활성화를 초래하여 이들의 효능적 활성을 발휘하는 것으로 알려져 있다. Fc γ -매개된 가교결합이 본 발명의 mAb²의 활성화에 필요하지 않기 때문에, 세포의 효능작용은 두 표적이 모두 존재하는 부위에 국한될 것이다. OX40/CD137 mAb²에서 LALA 돌연변이가 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키기 때문에, CD137-결합만을 통한 Fc γ 수용체 가교결합-유도된 활성화가 가능할 것으로 예상되지 않는다. 결과적으로, mAb²는 OX40의 발현의 부재하에서 CD137-발현 세포를 활성화할 가능성이 낮다. 인간에서 CD137을 표적화하는 것과 관련된 알려진 간 독성 위험이 있기 때문에(예를 들면, 우렐루맵(BMS-663513)으로의 치료에서 알 수 있는 바와 같이(Segal et al., 2017)), OX40이 또한 발현되는 곳에서만 CD137이 활성화되기 때문에 LALA 돌연변이를 포함하는 mAb²의 Fc γ 수용체-유도된 가교결합의 가능성의 감소가 mAb²로 의 치료시 발생하는 이러한 간 독성의 가능성을 감소시키기를 희망한다. CD137-유도된 간 독성의 현재 이론은 CD137을 발현하는 골수성 세포가 CD137 효능제로 처리된 마우스에서 보이는 간 염증의 원인이 되는 세포 유형임을 나타낸다(Bartkowiak, et al., 2018).
- [0548] 대식세포는 잠재적으로 CD137 표적화 항체의 가교결합을 매개할 수 있는 Fc γ RI를 발현하는 것으로 알려져 있지만, 이들 세포는 OX40을 발현하는 것으로는 알려져 있지 않다. 따라서, LALA 돌연변이를 함유하는 본 발명의 mAb²는 이론상으로는 CD137을 발현하지만 OX40을 발현하지 않는 간 대식세포를 활성화할 수 없어야 한다. 이것은 활성을 위해 Fc γ 수용체 가교결합을 필요로 하는 CD137 효능제 또는 활성을 위해 가교결합을 필요로 하지 않는 CD137 효능제와 비교할 때 본 발명의 OX40/CD137 mAb²의 간 독성 위험을 감소시키는 것으로 간주된다. OX40의 경우, CD137 결합의 부재하에서 OX40의 일부 활성화로 이어질 수 있는 Fc γ RI의 일부 잔류 활성이 가교결합의 부재하에서 관찰되었지만, 용량-제한 독성이 OX40 효능제를 사용한 임상 연구에서 현재까지 보고되지 않았기 때문에 이것은 위험으로 간주되지 않는다.
- [0549] 실시예 11 - OX40 또는 CD137을 발현하는 세포에 대한 mAb²의 결합

[0550] 11.1. 인간 또는 시노물구스 OX40 또는 CD137을 발현하는 세포에 대한 mAb²의 결합

[0551] 세포-발현된 인간 또는 시노물구스 OX40 및 CD137에 대한 mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12 및 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 결합 친화도는 유세포 분석을 사용하여 결정하였다. 이러한 mAb² 항체 및 대조군 항체 G1/4420 (FITC), G1/11D4 (OX40), G1/MOR7480.1 (CD137) 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²) (모두 IgG1 동형 형식)의 희석물 (2 x 최종 농도)을 1 x DPBS (Gibco, 14190-094)에서 제조하였다. D011.10-hOX40, D011.10-COX40, D011.10-hCD137, D011.10-cCD137 또는 HEK 세포 현탁액을 PBS+2% BSA (Sigma, A7906)에서 제조하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (Costar, 3897)에서 50 µl/웰로 4 x 10⁶ 개 세포/ml로 시딩하였다. 50 µl의 항체 희석물을 세포를 함유하는 웰에 첨가하고 (최종 용적 100 µl) 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 세척한 다음 PBS+2% BSA에서 1:1000으로 희석한 100 µl/웰의 이차 항체 (항-인간 Fc-488 항체, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098)를 첨가하고 암흑에서 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 세척하고 DAPI를 함유하는 PBS (Biotium, cat no 40043) 100 µl에 1 µg/ml로 재현탁시켰다. 플레이트를 Canto II 유세포 분석기 (BD Bioscience)를 사용하여 분석하고 데이터를 FlowJo를 사용하여 분석하였다. 죽은 세포를 UV (405nm/450/50) 채널에서의 이들의 보다 높은 형광에 의해 식별하고 분석에서 제외시켰다. FITC 채널 (488nm/530/30)의 기하 평균 형광 강도 (GMFI)를 항체 결합의 척도로서 사용하였다. GMFI 데이터를 GraphPad Prism 소프트웨어에서 로그 (효능제) 대 반응 (3 모수)을 사용하여 피팅하여 EC₅₀ 값을 생성하였다.

[0552] 표 9 : 유세포 분석에 의해 결정되는 인간 또는 시노물구스 OX40 또는 CD137을 발현하는 D011.10 세포에 대한 항-OX40/CD137 mAb²의 결합 친화도

	인간 OX40	시노물구스 OX40	인간 CD137	시노물구스 CD137	HEK
mAb	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
G1/4420	NB	NB	NB	NB	NB
G1/11D4	0.1248	0.09408	NB	NB	NB
G1/MOR7480.1	NB	NB	0.07682	0.06119	NB
FS20-22-49AA/4420	0.1619	0.3262	NB	NB	NB
FS20-22-49AA/FS30-5-37	0.2007	0.3552	0.2578	0.1105	NB
FS20-22-49AA/FS30-10-3	0.175	0.394	0.1197	0.0682	NB
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.1566	0.3798	0.1291	0.08027	NB
FS20-22-49AA/FS30-10-12	0.1517	0.3684	0.2899	0.1074	NB

[0553]

[0554] NB: 관찰된 결합 없음.

[0555] 결과는 시험된 OX40/CD137 mAb²가 D011.10 세포에서 발현된 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137에 결합함을 확인시켜 준다. mAb² 및 양성 대조군 (항-인간 OX40 mAb, G1/11D4, 인간 IgG1 골격에서; 및 항-인간 CD137 mAb G1/MOR7480.1, 인간 IgG1 골격에서)은 다양한 친화도로 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137 둘 다에 결합하였다 (표 9 참조). 시험된 항체 중의 어느 것에 대해 이 세포주와는 결합이 검출되지 않았기 때문에, HEK 세포주의 표면에 발현된 다른 단백질과의 교차-반응성은 관찰되지 않았다. 따라서, OX40/CD137 mAb²는 인간 OX40 및 인간 CD137에 특이적으로 결합하였으며, 비특이 결합은 관찰되지 않았다.

[0556] 11.2 인간 또는 시노물구스 OX40 또는 CD137을 발현하는 세포에 대한 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 및 이의 구성 요소의 결합

[0557] 세포-발현된 인간 또는 시노물구스 OX40 및 CD137에 대한 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 이의 구성 요소, 즉 OX40 Fcab (OX40/FITC 모의 mAb² 형식, FS20-22-49AA/4420) 및 CD137 Fab (IgG1 형식; FS30-010-016)의 친화도를 비교하기 위해, 실시예 11.1에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하였다. 그러나, 이러한 실험에서, 비특이 결합을 분석하기 위해 HEK 세포를 사용하는 대신, 형질도입되지 않은 D011.10 세포를 사용하였다. G1/4420 항-

FITC 항체를 대조군으로서 사용하였다. 계산된 EC_{50} 값의 신뢰도를 증가시키기 위해 실험을 3회 반복하였다. 시험된 분자에 대한 평균 EC_{50} 값이 표 10에 나타내어져 있다.

표 10 : 유세포 분석에 의해 결정되는 인간 또는 시노물구스 OX40 또는 CD137을 발현하는 D011.10 세포에 대한 항-OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 이의 구성 요소의 결합 친화도.

	인간 OX40	시노물구스 OX40	인간 CD137	시노물구스 CD137	비-형질도입된 D011.10
mAb	EC_{50} Avg \pm SD (nM)	EC_{50} Avg \pm SD (nM)	EC_{50} Avg \pm SD (nM)	EC_{50} Avg \pm SD (nM)	EC_{50} Avg \pm SD (nM)
G1/4420	NB	NB	NB	NB	NB
FS20-22- 49AA/4420	0.23 \pm 0.02	0.55 \pm 0.14	NB	NB	NB
G1/FS30-10-16	NB	NB	0.10 \pm 0.05	0.09 \pm 0.01	NB
FS20-22- 49AA/FS30-10-16	0.22 \pm 0.01	0.71 \pm 0.21	0.11 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	NB

Avg: 평균; SD: 표준 편차; NB: 관찰된 결합 없음.

결과는 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)가 D011.10 세포에 발현되는 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137에 나노몰 미만의 친화도로 결합하고, OX40 mAb²의 Fcab 성분이 OX40/CD137 mAb²에 필적하는 친화도로 인간 및 시노물구스 OX40에 결합하며, mAb²의 CD137 Fab 성분이 OX40/CD137 mAb²에 필적하는 친화도로 인간 및 시노물구스 CD137에 결합함을 확인시켜 준다. 형질도입되지 않은 D011.10 세포에 대한 비특이 결합은 OX40/CD137 mAb², 이의 구성 요소 또는 동형 대조군 항체 (G1/4420)에 대해 관찰되지 않았다. 결과는 세포-발현된 시노물구스 OX40에 대한 FS20-22-49AA/FS30-10-16 OX40/CD137 mAb² 및 FS20-22-49AA OX40 Fcab의 친화도가 이전에 관찰된 것보다 (더 낮은 EC_{50} 값에 의해 나타내어지는 바와 같이) 더 크며 (실시예 11.1 및 표 9) SPR에 의해 결정된 친화도 결과와 유사하다 (실시예 8 및 표 7)는 것을 나타낸다. 표 10에 자세히 기술된 평균 EC_{50} 값은 세 번의 독립적인 실험의 산물이기 때문에, 이들은 D011.10 세포에서 발현된 인간 및 시노물구스 OX40 및 CD137에 대한 시험된 분자의 친화도를 더 잘 나타낸다.

11.3 마우스 OX40 또는 CD137을 발현하는 세포에 대한 mAb²의 결합

세포-발현된 마우스 OX40 및 CD137에 대한 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²의 결합 친화도를 유세포 분석을 사용하여 결정하였다. FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 대조군 항체 G1/4420 (FITC), G1/Lob12.3 (CD137), G1/OX86 (OX40) 및 FS20m-232-91AA/HEL D1.3 (OX40/HEL 모의 mAb²)의 희석물 (2 x 최종 농도)을 1 x DPBS (Gibco, 14190-094)에서 제조하였다. D011.10-mOX40, D011.10-mCD137, 또는 HEK 세포 현탁액을 PBS+2% BSA (Sigma, A7906)에서 제조하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (Costar, 3897)에서 50 μ l/웰로 4 x 10⁶개 세포/ml로 시딩하였다. 50 μ l의 항체 희석물을 세포를 함유하는 웰에 첨가하고 (최종 용적 100 μ l) 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 세척한 다음 PBS+2% BSA에서 1:1000으로 희석한 100 μ l/웰의 이차 항체 (항-인간 Fc-488 항체, Jackson ImmunoResearch, 109-546-098)를 첨가하고 암흑에서 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 세척하고 DAPI를 함유하는 PBS (Biotium, cat no 40043) 100 μ l에 1 μ g/ml로 재현탁시켰다. 플레이트를 Canto II 유세포 분석기 (BD Bioscience)를 사용하여 분석하고 데이터를 FlowJo를 사용하여 분석하였다. 죽은 세포를 UV (405nm/450/50) 채널에서의 이들의 보다 높은 형광에 의해 식별하고 분석에서 제외시켰다. FITC 채널 (488nm/530/30)의 기하 평균 형광 강도 (GMFI)를 항체 결합의 척도로 사용하였다. GMFI 데이터를 GraphPad Prism 소프트웨어에서 로그 (효능제) 대 반응 (3 모수)을 사용하여 피팅하여 EC_{50} 값을 생성하였다. 결과가 표 11에 나타내어져 있다.

[표 11]

유세포 분석에 의해 결정되는 마우스 OX40 또는 CD137을 발현하는 D011.10 세포에 대한 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 결합 친화도.

	마우스 OX40	마우스 CD137
mAb	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
G1/4420	NB	NB
G1/Lob12.3	NB	0.1206
G1/OX86	0.5381	NB
FS20m-232-91AA/HEL D1.3	0.2677	NB
FS20m-232-91AA/Lob12.3	0.159	0.118

[0566]

[0567]

NB: 관찰된 결합 없음.

[0568]

결과는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 D011.10 세포에서 발현된 마우스 OX40 및 CD137에 결합함을 확인시켜 준다. mAb² 및 양성-대조군 (항-마우스 OX40 mAb, OX86, 인간 IgG1 골격에서; 및 항-마우스 CD137 mAb Lob12.3, 인간 IgG1 골격에서)은 다양한 친화도로 마우스 OX40 및/또는 CD137에 결합하였다 (표 11 참조). 시험된 항체 중의 어느 것에 대해 이 세포주와는 결합이 검출되지 않았기 때문에, HEK 세포주의 표면에 발현된 다른 단백질과의 교차-반응성은 관찰되지 않았다.

[0569]

따라서, 항-마우스 OX40/CD137 mAb²는 마우스 OX40 및 마우스 CD137에 특이적으로 결합하였으며, 비특이 결합은 관찰되지 않았다.

[0570]

실시예 12 - 포도상 구균 장독소 A (SEA) 분석에서 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 OX40/CD137 mAb²의 활성

[0571]

종양 침윤 림프구 상의 OX40 발현은 이들 두 분자가 종종 활성화된 T 세포에서 공동-발현되기 때문에 CD137의 발현을 동반할 가능성이 있다 (Ma et al., 2005). 이들 2개의 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 mAb²에 의해 OX40 및 CD137을 효능화하는 것은 예비-활성화된 T 세포에 의한 염증성 사이토카인의 증식 및 생산을 유도할 수 있다.

[0572]

완전히 활성화되기 위해, T 세포는 두 가지 신호를 필요로 하며, 첫 번째 신호는 항원 특이적이고 항원 제시 세포 (APC)의 막에 펩티드 항원을 표시하는 MHC (주요 조직적합성 복합체) 분자와 상호작용하는 T-세포 수용체를 통해 제공되고, 두 번째 항원-비특이적 신호-공동자극 신호-는 APC의 막에 발현된 공동자극 분자와 T 세포 사이의 상호작용에 의해 제공된다.

[0573]

OX40/CD137 mAb²의 활성을 시험하기 위해, 포도상 구균 장독소 A (SEA) 초항원을 첫 번째 신호로 사용하는 T 세포 활성화 분석을 확립하였다. SEA는 APC 표면의 MHC 클래스 II 분자와 T 세포의 TCR을 가교결합하여 T 세포 활성화를 위한 첫 번째 신호를 제공한다. 완전한 활성화를 위해, T 세포는 또한 경우에 따라 가교결합된 대조군 분자 또는 mAb²에 의해 두 번째 공동자극 신호를 받아야 한다. 이 분석은 혈액으로부터 분리된 PBMC로 수행되며 분리된 T 세포로 수행된 분석에 비해 생체내에서 발생할 것으로 예상되는 사항을 더 면밀히 나타내야 한다.

[0574]

SEA-자극 분석을 사용하여, 인공 가교결합체의 존재 또는 부재하에 상이한 OX40 및 CD137 효능제 항체, 및 OX40/CD137 mAb² 항체의 활성을 확립하고, 상이한 OX40/CD137 mAb² 클론을 비교하고, 10명의 PBMC 기증자 그룹에서 OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16에 대한 대표적인 EC₅₀ 값을 확립하였다.

[0575]

12.1 SEA-자극된 PBMC에 대한 OX40 및 CD137 효능제 항체의 활성

[0576]

상이한 OX40 및 CD137 효능제 항체에 대한 SEA 분석의 민감도를 확립하기 위해, 표 12에 열거된 mAb² 항체 (FS22-20-49AA/FS30-10-16) 및 대조군 항체를 분석에서 이들의 활성에 대해 시험하였다. G1/4420 (항-FITC), G1AA/MOR7480.1 (항-CD 137), G1AA/FS30-10-16 (항-CD137), G1AA/20H4.9 (항-CD137), G1AA/11D4 (항-OX40), 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²)을 대조군으로서 사용하였다. IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

[0577] 표 12: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	FITC-텍스트란	115	116
G1AA/MOR7480.1	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	125	120
G1AA/FS30-10-16	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	154	97
G1AA/20H4.9	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	165	122
G1AA/11D4	hOX40	없음	hlgG1	아니오	a-hCH2	173	175
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hlgG1	예	FITC-텍스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	95	97

[0578]

[0579]

혈소판 기증의 부산물인 백혈구 고갈 콘 (NHS 혈액 및 이식 서비스)으로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 요약하면, 백혈구 콘 내용물을 PBS로 수세하고 Ficoll 구배 (GE Lifesciences cat no 17144002)에 오버레이하였다. Ficoll 구배를 통과하지 않는 세포의 원심분리 및 회수에 의해 PBMC를 분리하였다. PBMC를 PBS로 추가로 세척하고 남은 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 10 ml 적혈구 용해 완충액 (eBioscience)의 첨가를 통해 용해시켰다. PBMC를 계수하고 T 세포 배지 (10% FBS (Life Technologies), 1x 페니실린 스트렙토마이신 (Life Technologies), 피루브산나트륨 (Gibco), 10mM Hepes (Gibco), 2mM L-글루타민 (Gibco) 및 50 μ M 2-머캅토에탄올 (Gibco)을 갖는 RPMI 배지 (Life Technologies))에서 2.0×10^6 개 세포/ml로 재현탁시켰다. 이후 SEA (Sigma cat no S9399)를 200 ng/ml로 PBMC에 첨가하고 세포를 2×10^5 개 세포/웰 (100 μ l/웰)로 플레이트에 첨가하였다.

[0580]

각 시험 항체 (자세한 설명에 대해서는 표 12 참조)의 2 μ M 희석물을 DPBS (Gibco)에서 제조하고 T 세포 배지에서 1:10 (30 μ l + 270 μ l)으로 추가로 희석하여 200 nM 희석물을 수득하였다. 인공 가교결합제 (항-인간 CH2 항체 (클론 MK1A6, 사내에서 제조됨) 또는 FITC-텍스트란(Sigma) (표 12 참조)을 필요한 경우 시험 항체와 1:1 몰 비로 웰에 첨가하였다. 96-웰 플레이트에서, 시험 항체의 연속 희석물을 제조하고 100 μ l의 희석된 항체 혼합물을 플레이트 상의 활성화된 T 세포에 첨가하였다.

[0581]

세포를 37°C, 5% CO₂에서 120시간 동안 배양하였다. 상청액을 수집하고 제조업체의 지침에 따라 인간 IL-2 ELISA 키트 (eBioscience or R&D Systems)를 사용하여 IL-2 방출을 측정하였다. 플레이트를 Gen5 소프트웨어, BioTek를 갖는 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 판독하였다. 450nm의 흡광도 값에서 630nm의 흡광도 값을 뺀다 (보정). 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4-모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 인간 IL-2 (hIL-2)의 농도를 시험 항체의 로그 농도에 대해 플롯팅하고 생성된 곡선을 GraphPad Prism에서 로그 (효능제) 대 반응 방정식을 사용하여 피팅하였다. 표 13은 인공 가교결합제로의 가교결합의 존재 또는 부재하에 SEA 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 도 3a는 SEA 분석에서 단일 농도 (3.7 nM)에서 시험된 항체에 의해 유도된 IL-2 방출 수준을 보여준다. 이들 항체가 가장 높은 수준의 IL-2 생산을 유도하는 농도를 이 분석을 위해 선택하였다. 통계 분석은 이원 ANOVA 및 Tukey의 다중 비교 검정에 의해 수행하였다. 오차 막대 위의 별표는 동형 대조군 (G1/4420)-처리된 샘플과 비교하여 유의한 차이를 나타낸다 (* p<0.032, ** p<0.0021, *** p<0.0002, **** p<0.0001). 도 3b는 SEA 분석에서 인공 가교결합제의 존재 또는 부재하에 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)에 의해 유도된 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.

[0582] 표 13: OX40 및 CD137 효능제 항체 및 mAb²를 사용한 SEA 분석

mAbs/mAb ²	가교결합되지 않음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/20H4.9	NAD	NAD	NAD	NAD	0.3062	0.1224 to 0.7376	4324	3904 to 4762
G1AA/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD	0.07163	0.01113 to 0.2910	4269	3693 to 4864
FS20-22-49AA/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	0.3364	0.1377 to 0.7743	8719	7943 to 9532
FS20-22-49AA/4420 + G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	0.3793	0.1665 to 0.8578	7644	6964 to 8358
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.2548	0.1050 to 0.6082	8931	8028 to 9877	0.1877	0.06915 to 0.4945	9930	8920 to 10990

[0583]

[0584] NAD = 검출된 활성 없음.

[0585] 결과는 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16) 만이 인공 가교결합제의 부재하에서 IL-2 수준을 증가시킬 수 있었으며 인공 가교결합제의 첨가가 EC₅₀ 또는 최대 반응의 양태에서 OX40/CD137 mAb²의 활성을 증가시키지 못했음을 보여준다. OX40-표적화 항체 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420와 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9의 활성은 인공 가교결합제의 존재하에서만 관찰되었으며, 인공 가교결합제의 존재하에서조차 동형 대조군에 비해 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 대해 통계적으로 유의한 활성이 검출되지 않았다. G1AA/11D4 항체는 이의 현저히 낮은 EC₅₀ 값에 의해 표시된 바와 같이 G1AA/20H4.9 항체보다 더 큰 효능을 갖는 것으로 관찰되었지만, 항-OX40 항체 G1AA/11D4는 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16보다 더 높은 IL-2 수준 및 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9에 필적하는 IL-2 수준을 유도하였다. 이러한 결과는 이 SEA 분석이 CD137 효능작용보다 OX40 효능작용에 더 민감하다는 것을 나타낸다. 이것은 아마도 OX40이 CD4+ T 세포에서 우선적으로 발현되고 CD 137이 CD8+ T 세포에서 우선적으로 발현되는 것과 관련이 있을 수 있고 (Croft, 2014 및 도 6에 표시된 내부 데이터), 전형적으로 인간 PBMC에는 CD8+ T 세포보다 CD4+ T 세포가 더 많기 때문이다.

[0586] 12.2 SEA-자극된 PBMC에 대한 상이한 OX40/CD137 mAb² 클론의 활성

[0587] 5개의 상이한 OX40/CD137 mAb² 클론을 SEA 분석에서 이의 활성에 대해 시험하였다. 분석에 사용된 mAb² 및 대조군 항체에 대한 자세한 설명은 표 14에 제공된다. G1/4420 (항-FITC), G1/11D4 (항-OX40), G2/MOR7480.1 (항-CD137), G1/11D4 + G2/MOR7480.1 조합, 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC mock mAb²)을 대조군으로서 사용하였다. 분석은 실시예 12.1에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0588] 표 14: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	FITC-텍스트란	115	116
G1/11D4	hOX40	없음	hlgG1	아니오	a-hCH2	174	175
G2/MOR7480.1	hCD137	없음	hlgG2	아니오	a-hCH2	124	120
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hlgG1	예	FITC-텍스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-5-37	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	109	111
FS20-22-49AA/FS30-10-3	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	99	97
FS20-22-49AA/FS30-10-12	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	103	97
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	95	97
FS20-22-49AA/FS30-35-14	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	105	107

[0589]

[0590] 표 15는 인공 가교결합제로의 가교결합의 존재 또는 부재하에 SEA 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 도 3c 및 d는 SEA 분석에 대한 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.

[0591] 표 15: OX40 및 CD137을 표적으로 하는 mAb²를 사용한 SEA 분석

mAbs/mAb ²	가교결합되지 않음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD	0.13	0.01 to 0.77	6614.00	4743 내지 8561
G2/MOR7480.1*	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1/11D4 + G2/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD	0.11	NAD 내지 0.79	9451.00	6633 내지 12384
FS20-22-49AA/4420	8.53	0.83내지 58.93	808.70	328.7 내지1602	0.31	0.15 내지 0.68	28603.00	24885 내지 32460
FS20-22-49AA/FS30-5-37	0.51	0.26내지 0.97	29242.00	26131 내지 32465	0.50	0.26 내지 0.91	30748.00	27773 내지 33822
FS20-22-49AA/FS30-10-3	0.29	0.15 내지 0.55	34945.00	31391 내지 38616	0.38	0.20 내지 0.69	33919.00	30775 내지 37170
FS20-22-49AA/FS30-10-12	1.36	0.73 내지 2.65	24912.00	22201 내지 27799	2.33	1.25 내지 4.58	23721.00	21156 내지 26587
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.14	0.077 내지0.25	35115.00	32213 내지 38074	0.10	0.06 내지 0.18	33761.00	31415 내지 36145
FS20-22-49AA/FS30-35-14	0.09	0.021 내지0.30	32363.00	27164 내지 37691	0.14	0.07 내지 0.30	32212.00	28906 내지 35597

[0592]

[0593] NAD = 검출된 활성 없음

[0594] 도 3c 및 d와 표 15는 예상대로 비-가교결합된 또는 가교결합된 항 -FITC 항체 G1/4420 또는 비-가교결합된 항-OX40 항체 (G1/11D4 단독 또는 G2/MOR7480.1과 조합하여)에서는 IL-2 생산이 관찰되지 않았음을 보여준다. IL-2는 OX40이 항-OX40 양성 대조군 항체의 결합에 의해 활성화되었을 때지만 인공 가교결합제가 존재할 때만 T 세포에 의해 생성되었다 (G1/11D4 단독의 경우 0.13 nM의 EC₅₀, G2/MOR7480.1과 조합될 경우 0.11 nM의 EC₅₀). 모의 mAb² 형식 (4420 LALA) FS20-22-49AA/4420의 OX40-표적화 Fcab은 이 분석에서 가교결합의 부재하에 일부

효능적 활성 (8.53 nM의 EC_{50})을 보였지만, FITC-텍스트란에 대한 Fab 아암의 결합에 의해 가교결합될 때, IL-2의 증가된 생산에 의해 나타내어지는 바와 같이 EC_{50} 의 감소 (0.31 nM) 및 생산된 IL-2의 최대 양 (최대 반응)에 의해 입증된 바와 같이 증가된 활성을 가졌다.

[0595] 가교결합된 CD137-표적화 항체 G2/MOR7480.1 단독으로는 활성이 관찰되지 않았고, 가교결합될 때 OX40-표적화 항체 G1/11D4 및 CD137-표적화 항체 G2/MOR7480.1의 조합의 활성은 가교결합된 OX40-표적화 항체 G1/11D4 단독과 유사하였다.

[0596] 이러한 SEA T 세포 활성화 분석에서, 5개 OX40/CD137 mAb² 클론 (표 15 참조)의 활성은 인공 가교결합제의 존재 여부와 관계없이 비슷하였다. 인공 가교결합제의 존재하에 OX40/CD137 mAb²의 활성은 가교결합된 FS20-22-49AA/4420 모의 mAb²와도 비슷하였다. 이러한 SEA 분석의 결과는 OX40/CD137 mAb²가 mAb²의 항-CD137 Fab 아암의 결합에 의해 제공되는 가교결합의 결과로 인공 가교결합제를 필요로 하지 않으면서 OX40을 통해 신호를 보낼 수 있음을 보여준다.

[0597] 이 분석에서 가교결합된 CD137-표적화 항체 G2/MOR7480.1에 대해 활성이 검출되지 않았지만, CD137은 mAb²의 가교결합이 발생할 수 있도록 하는 수준으로 T 세포에서 발현된 것으로 예상된다. 이 발현은 CD137에 결합될 때 5개의 mAb² 클론 각각이 또한 OX40에 결합할 수 있고 비-가교결합된 FS20-22-49AA/4420 모의 mAb²에 의해 유도된 낮은 수준의 활성보다 훨씬 더 높은 수준으로 이의 활성화를 유도할 수 있는 수준에 있다고 가정된다.

[0598] 인공 가교결합제의 부재하에서 OX40/CD137 mAb²로 관찰된 T 세포 활성화는 또한 이들 분자가 OX40과 CD137 둘 다 생체내에서 발현되는 경우 T 세포를 활성화할 수 있음을 시사한다.

[0599] 12.3 10명의 PBMC 기증자로부터의 SEA-자극된 PBMC에 대한 OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 활성

[0600] OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16을 이의 활성에 대한 정확한 EC_{20} , EC_{30} 및 EC_{50} 값을 확립하기 위해 10명의 상이한 기증자로부터의 PBMC로 SEA 분석에서 시험하였다. 분석은 인공 가교결합제의 부재하에서 **실시예 12.1**에 기술된 바와 같이 수행하였다. 평균값 + 또는 - 표준 편차 (SD)는 각 기증자에 대한 원시 데이터로부터 계산하였다. EC_{50} 값을 계산하기 위해, 원시 데이터를 로지스틱 함수 (4 모수: 상단, 하단, 언덕 경사 및 EC_{50})에 피팅하였다:

$$y(\log c) = \text{하단} + \frac{\text{상단} - \text{하단}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log c) \cdot \text{언덕 기울기}}}$$

[0601]

[0602] y 축은 측정된 반응 (IL-2 수준)을 $\log_{10}(c)$ 의 함수로서 보여주며, 여기서 c는 시험 제품의 농도를 나타낸다.

[0603] 적합치로부터의 각 모수 추정치는 해당 추정치의 정밀도를 나타내는 표준 오차를 갖는다. 주어진 실험을 위한 상이한 기증자 및/또는 기술적 복제가 (예를 들면, 각 경우에 데이터의 품질에 따라) 상이한 모수 추정치 및 상이한 수준의 정밀도를 제공할 것이기 때문에, 각 기증자 및/또는 기술적 복제의 모수가 가중 평균에 포함되었다. 가중치는 모수 정규성의 가정하에 모수의 표준 오차 제곱의 역으로 정의되었다.

[0604] 추가로, $\log_{10}(EC_{20})$ 및 $\log_{10}(EC_{30})$ 값은 데이터를 유사한 방정식에 피팅하여 계산하였다:

$$y(\log c) = \text{하단} + \frac{\text{상단} - \text{하단}}{1 + 4 \cdot 10^{(\log EC_{20} - \log c) \cdot \text{언덕 기울기}}}$$

$$y(\log c) = \text{하단} + \frac{\text{상단} - \text{하단}}{1 + (7/3) \cdot 10^{(\log EC_{30} - \log c) \cdot \text{언덕 기울기}}}$$

[0605]

[0606] 모든 로지스틱 피팅은 GraphPad Prism을 사용하여 수행하였으며, 가중 평균화는 Microsoft Excel을 사용하여 이루어졌다. 가중 평균에 사용되는 공식 및 가중 평균의 표준 오차는 아래에 제공된다:

$$\bar{x} = \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i}$$

$$SEM = SD \sqrt{\frac{\sum w_i^2}{(\sum w_i)^2}}$$

[0607]

[0608] 가중 표준 편차는 다음과 같이 추정되었다:

$$SD = \sqrt{\frac{N \sum w_i (x_i - \bar{x})^2}{(N-1) \sum w_i}}$$

[0609]

[0610] SEA 분석에서 OX40/CD137 mAb²에 대해 관찰된 IL-2 방출에 대한 EC₂₀, EC₃₀ 및 EC₅₀ 값이 표 16에 나타내어져 있다.

[0611] 표 16: SEA 분석에서 OX40/CD137 mAb²에 대한 EC₂₀, EC₃₀ 및 EC₅₀ 값

	EC ₅₀ (nM)	EC ₃₀ (nM)	EC ₂₀ (nM)
기증자 1	0.21	0.09	0.05
기증자 2	0.38	0.14	0.08
기증자 3	0.34	0.18	0.12
기증자 4	0.36	0.18	0.11
기증자 5	0.30	0.11	0.06
기증자 6	0.41	0.17	0.10
기증자 7	0.44	0.21	0.13
기증자 8	0.29	0.15	0.10
기증자 9	0.17	0.10	0.07
기증자 10	0.04	0.02	0.02
가중 평균	0.32	0.14	0.09
95% Conf. Int.	0.25-0.41	0.11-0.18	0.07-0.12

[0612]

[0613] 이러한 결과는 OX40/CD137 mAb²가 상이한 기증자로부터의 PBMC와 필적하는 활성을 가짐을 보여준다.

[0614] 실시예 13 - pan-T 세포 활성화 분석에서 인간 OX40/CD137 mAb²의 활성

[0615] 실시예 12에 기술된 SEA T 세포 활성화 분석은 T 세포를 자극하기 위해 PBMC 및 초항원 SEA를 사용하였다. 단리된 T 세포에 대한 OX40 및 CD137 효능제의 효과를 평가하기 위해, T 세포 활성화 분석을 확립하였다. 이 분석에서, T 세포를 단리하고 플라스틱 표면 상에 고정된 항-CD3 항체를 사용하여 자극하였다. 고정된 항-CD3 항체는 T 세포의 TCR을 클러스터링할 수 있어, T 세포 활성화에 필요한 첫 번째 신호를 제공하고 시험 분자가 두 번째 신호를 제공하였다.

[0616] T 세포-자극 분석을 사용하여, 가교결합제의 존재 또는 부재하에 상이한 OX40 및 CD137 효능제 항체 및 OX40/CD137 mAb² 항체의 활성을 확립하고, 상이한 OX40/CD137 mAb² 클론을 비교하고, 9명의 PBMC 기증자 그룹에서 OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16에 대한 대표적인 EC₅₀ 값을 확립하였다.

[0617] 13.1 pan-T 세포 활성화 분석에서 OX40 및 CD137 효능제 항체의 활성

[0618] 상이한 OX40 및 CD137 효능제 항체에 대한 T 세포 활성화 분석의 민감도를 확립하기 위해, 표 17에 열거된 mAb² 항체 (FS20-22-49AA/FS30-10-16) 및 대조군 항체를 분석에서 이들의 활성에 대해 시험하였다. G1/4420 (항-FITC), G1AA/MOR7480.1 (항-CD137), G1AA/FS30-10-16 (항-CD137), G1AA/20H4.9 (항-CD137), G1AA/11D4 (항-

OX40), 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²)을 대조군으로서 사용하였다. IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

표 17: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	FITC-텍스트란	115	116
G1AA/MOR7480.1	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	125	120
G1AA/FS30-10-16	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	154	97
G1AA/20H4.9	hCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	165	122
G1AA/11D4	hOX40	없음	hlgG1	아니오	a-hCH2	173	175
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hlgG1	예	FITC-텍스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hlgG1	예	a-hCH2	95	97

인간 PBMC를 **실시예 12.1**에 기술된 바와 같이 단리하였다. 그후 제조업체의 지침에 따라 Pan T 세포 단리 키트 II (Miltenyi Biotec Ltd)를 사용하여 PBMC로부터 T 세포를 단리하였다.

인간 T-활성제 CD3/CD28 Dynabeads (Life technologiesl 1452D)를 보텍싱에 의해 재현탁시켰다. 비드를 T 세포 배지 (10% FBS (Life Technologies), 1x 페니실린 스트렙토마이신 (Life Technologies), 피루브산나트륨 (Gibco), 10mM Hepes (Gibco), 2mM L-글루타민 (Gibco) 및 50 μM 2-머캅토에탄올 (Gibco)을 갖는 RPMI 배지 (Life Technologies))로 2회 세척하였다.

T 세포 배지에서 1.0×10^6 개 세포/ml 농도의 필요한 수의 T 세포를 세척된 인간 T-활성제 CD3/CD28 Dynabeads 로 T-25 플라스크 (Sigma)에서 2:1 세포 대 비드 비율로 자극하고 37°C, 5% CO₂에서 밤새 배양하여 T 세포를 활성화시켰다. 활성화된 T 세포를 Dynabeads로부터 세척하고 2.0×10^6 개 세포/ml 농도로 T 세포 배지에 재현탁시켰다. 96-웰 평저 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 PBS에 희석된 2.5 μg/ml 항-인간 CD3 항체 (R&D Systems 클론 UHCT 1)와 함께 배양을 통해 항-인간 CD3 항체로 코팅한 다음 PBS로 2회 세척하였다. 활성화된 T 세포를 2×10^5 개 세포/웰로 플레이트에 첨가하였다.

각 시험 항체 (자세한 설명에 대해서는 **표 17** 참조)의 2 μM 희석물을 제조하고 **실시예 12.1**에서 상기 기술된 바와 같이 필요에 따라 가교결합제 (항-인간 CH2 항체 (클론 MK1A6, 사내 제조됨) 또는 FITC-텍스트란(Sigma) (**표 17** 참조))와 1:1 물 비로 웰에 첨가하였다. 96-웰 플레이트에서, 시험 항체의 연속 희석물을 제조하고 100 μl의 희석된 항체 혼합물을 플레이트 상의 활성화된 T 세포에 첨가하였다.

T 세포를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양하였다. 그후 상청액을 수집하고, IL-2 방출을 측정하고 데이터를 **실시예 12.1**에 기술된 바와 같이 제조하였다. **표 18**은 가교결합제로의 가교결합의 존재 또는 부재하에 T 세포 활성화 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. **도 4a**는 T 세포 활성화 분석에서 단일 농도 (3.7 nM)의 시험된 항체에 의해 유도된 IL-2 방출의 수준을 보여준다. 이들 항체가 가장 높은 수준의 IL-2 생산을 유도한 농도를 이 분석을 위해 선택하였다. 통계 분석은 이원 ANOVA 및 Tukey의 다중 비교 검정에 의해 이루어졌다. 오차 막대 위의 별표는 동형 대조군 (G1/4420)-처리된 샘플과 비교하여 유의한 차이를 나타낸다 (* p<0.032, ** p<0.0021, *** p<0.0002, **** p<0.0001). **도 4b**는 T 세포 활성화 분석에서 가교결합제의 존재 또는 부재하에 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)에 의해 유도된 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.

표 18: OX40 및 CD137 효능제 항체 및 mAb²를 사용한 T 세포 활성화 분석

mAbs/mAb ²	가교결합되지 않음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/20H4.9	NAD	NAD	NAD	NAD	0.234	0.04154 to 1.057	5303	4068 to 6620
G1AA/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD	0.1301	0.01642 to 0.6356	4130	3266 to 5037
FS20-22-49AA/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	0.278	0.1611 to 0.4790	12450	11440 to 13488
FS20-22-49AA/4420 + G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	0.1746	0.05500 to 0.5209	15001	12556 to 17552
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.09306	0.03231 to 0.2430	16927	14533 to 19389	0.07916	0.01737 to 0.2851	14434	11757 to 17202

NAD - 검출된 활성 없음.

결과는 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)만이 인공 가교결합제의 부재하에 IL-2 수준을 증가시킬 수 있었고 인공 가교결합제의 첨가가 EC₅₀ 또는 최대 반응 양태에서 OX40/CD137 mAb²의 활성을 증가시키지 않았음을 보여준다. OX40-표적화 항체 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420와 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9의 활성은 인공 가교결합제의 존재하에서만 관찰되었으며, 인공 가교결합제의 존재하에서조차 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 대해 활성이 검출되지 않았다. OX40 효능제 항체 FS20-22-49AA/4420은 모든 세 개의 CD137 효능제 항체보다 더 높은 IL-2 수준을 유도하였다. 항-OX40 항체 G1AA/11D4는 항-CD137 항체 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16보다 더 높은 IL-2 수준, 및 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9에 필적하는 IL-2 수준을 유도하였지만, G1AA/11D4 항체는 이의 보다 낮은 EC₅₀ 값에 의해 표시되는 바와 같이 G1AA/20H4.9 항체보다 더 큰 효능을 갖는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 T 세포 활성화 분석이 CD137 효능작용보다 OX40 효능작용에 더 민감하다는 것을 나타낸다. **실시예 12.1**에서 추측되는 바와 같이, 이것은 아마도 OX40이 CD4+ T 세포에서 우선적으로 발현되고 CD137이 CD8+ T 세포에서 우선적으로 발현되는 것과 관련이 있을 수 있고 (Croft, 2014 및 도 6에 표시된 내부 데이터), 전형적으로 인간 PBMC에는 CD8+ T 세포보다 CD4+ T 세포가 더 많기 때문이다.

13.2 pan-T 세포 활성화 분석에서 OX40 및 CD137 효능제 항체의 활성의 다중 사이토카인 분석

T 세포 활성화 분석에 대한 OX40 및 CD137 자극의 효과를 더 잘 이해하기 위해, 다중 사이토카인의 수준을 분석하였다. 항체 및 mAb² 항체 (FS20-22-49AA/FS30-10-16) 및 표 19에 열거된 대조군 항체를 사용하였다. 대조군 항체 G1/4420 (항-FITC), G1AA/FS30-10-16 (항-CD137) 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²)를 인공 가교결합제의 존재하에서 실험하고 OX40/CD137 mAb²를 인공 가교결합제의 부재하에서 시험하였다. 모든 항체는 단일 농도 (10 nM)로 사용하였다. 분석은 **실시예 13.1**에 기술된 바와 같이 수행하였다.

표 19: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hIgG1	아니오	FITC-텍스트란	115	116
G1AA/FS30-10-16	hCD137	없음	hIgG1	예	a-hCH2	154	97
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hIgG1	예	FITC-텍스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hIgG1	예	없음	95	97

그런 다음 배양 후 수집된 상청액 중의 사이토카인 IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-13, TNF α , IFN γ 및 IL-10의 수준을 제조업체의 지침에 따라 전염증성 V-plex 키트 (MSD, K15049D-1)를 사용하여 결정하였다. 결과는

OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16) 및 가교결합된 OX40-표적화 항체 (FS20-22-49AA/4420)가 IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-13 및 TNF α 사이토카인 방출을 증가시키고 T 세포에 의한 IL-10 방출을 감소시켰음을 보여주었다. 항-CD137 항체 (G1AA/FS30-10-16)에 대해서는 활성이 검출되지 않았다.

13.3 pan-T 세포 활성화 분석에서 상이한 OX40/CD137 mAb² 클론의 활성

이 분석에서 시험된 분자 및, 해당하는 경우, 이들의 각각의 가교결합제에 대한 세부사항은 아래 표 20에 제공된다. G1/4420 (항-FITC), G1/11D4 (항-OX40), G2/MOR7480.1 (항-CD137), G1/11D4 + G2/MOR7480.1 조합, 및 FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²)을 대조군으로서 사용하였다. 모든 분자는 인공 가교결합제의 부재하에서 시험하였다. 단일-제제 대조군 G1/4420, G1/11D4, G2/MOR7480.1 및 FS20-22-49AA/4420을 추가로 인공 가교결합제의 존재하에서 시험하였다. 분석은 실시예 13.1에 기술된 바와 같이 수행하였다.

표 20: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	FITC-덱스트란	115	116
G1/11D4	hOX40	없음	hlgG1	아니오	항-hCH2	174	175
G2/MOR7480.1	hCD137	없음	hlgG2	아니오	항-hCH2	124	120
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hlgG1	예	FITC-덱스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-5-37	hCD137	hOX40	hlgG1	예	n/a	109	111
FS20-22-49AA/FS30-10-3	hCD137	hOX40	hlgG1	예	n/a	99	97
FS20-22-49AA/FS30-10-12	hCD137	hOX40	hlgG1	예	n/a	103	97
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hlgG1	예	n/a	95	97
FS20-22-49AA/FS30-35-14	hCD137	hOX40	hlgG1	예	n/a	105	107

표 21은 가교결합의 부재하에서 T 세포 활성화 분석에서 시험된 모든 분자에 대해 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 표 22는 가교결합제의 존재하에서 추가로 실험된 단일-제제 대조군 G1/4420, G1/11D4, G2/MOR7480.1 및 FS20-22-49AA/4420에 대해 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 도 4c 및 d는 T 세포 활성화 분석에 대한 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.

표 21: 가교결합제의 부재하에서 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 mAb²를 사용한 T 세포 활성화 분석

	가교결합제 없음			
mAbs/mAb ²	EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD
G1/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD
G2/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD
G1/11D4 + G2/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD
FS20-22-49AA/4420	5.02	0.2478 내지 2583	1508	926.2 내지 26580
FS20-22-49AA/FS30-5-37	1.201	0.1358 내지 15.06	3663	2817 내지 4979
FS20-22-49AA/FS30-10-3	0.2905	0.01754 내지 3.867	4219	3204 내지 5408
FS20-22-49AA/FS30-10-12	0.845	0.01871 내지 85.72	3939	2388 내지 7001
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.2019	0.0108 내지 3.071	3873	3012 내지 4897
FS20-22-49AA/FS30-35-14	0.2285	ND 내지 14.77	4379	2915 내지 6181

[0642] NAD = 검출된 활성 없음

[0643] ND = 결정 불가

[0644] 표 22: 가교결합제의 존재하에서의 단일-제제 대조군

mAbs/mAb ²	가교결합제 있음			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD
G1/11D4	0.05132	ND 내지 0.3545	6375	5385 내지 7400
G2/MOR7480.1	2.38	1.231 내지 4.754	2306	2090 내지 2545
FS20-22-49AA/4420	0.06129	0.01408 내지 0.1939	5806	5242 내지 6386

[0645]

[0646] NAD = 검출된 활성 없음

[0647] ND = 결정 불가

[0648] 표 21 및 도 4c는 비-가교결합된 OX40/CD137 mAb²가 활성 (0.2019 내지 1.201 nM 범위의 EC₅₀ 값)을 가졌고 따라서 두 표적 모두에 결합할 수 있어 이들 중 하나 또는 둘 다의 클러스터링을 야기하여 T 세포 활성화를 유도할 수 있음을 보여준다. 예상대로 비-가교결합된 또는 가교결합된 항-FITC 항체 G1/4420 또는 비-가교결합된 항-OX40 항체 (G1/11D4 단독 또는 G2/MOR7480.1과 조합하여)에서는 IL-2 생산이 관찰되지 않았다. IL-2는 OX40 수용체가 가교결합제의 존재하에 항-OX40 양성 대조군 항체에 의해 표적화되었을 때 T 세포에 의해 생성되었다 (G1/11D4 단독의 경우 0.05 nM의 EC₅₀, G2/MOR7480.1와 조합할 때 0.02 nM의 EC₅₀).

[0649] 모의 mAb² 형식 (4420 LALA) FS20-22-49AA/4420의 OX40-표적화 Fcab는 SEA 분석에서 알 수 있는 바와 같이 가교결합제의 부재하에서 약간의 효능적 활성을 가졌으며 (5.02 nM의 EC₅₀ 및 1508 pg/ml hIL-2의 최대 반응), 이 활성은 모의 mAb²가 FITC-텍스트란에 대한 이의 Fab 아암의 결합에 의해 가교결합되었을 때 더욱 향상되었다.

[0650] 비-가교결합된 항-CD137 항체 G2/MOR7480.1 단독에서는 활성이 관찰되지 않았지만, 가교결합될 경우, T 세포 활성화를 유도할 수 있었으며, 이것은 SEA T 세포 활성화 분석 (실시예 12)과 달리, 이 분석이 상기 확인된 OX40 신호전달 뿐만 아니라 항-CD137 클론에 의한 CD137 신호전달을 측정할 수 있음을 나타낸다. 인공 가교결합제의 부재 또는 존재하에서 활성이 검출되지 않았던, 실시예 13.1에서 IgG1 형식 (G1AA/MOR7480.1)의 동일한 항-CD137 클론에 비해 이러한 가교결합된 항체에 대해 관찰된 활성의 차이는 일부 기증자가 다른 기증자보다 CD137 자극에 더 잘 반응할 수 있는 T-세포 기증자 가변성에 의해 설명될 수 있다.

[0651] 실시예 7.1에 기술된 D011.10-hCD137 세포를 사용한 인간 CD137 T 세포 활성화 분석에서, 시험 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14) 및 G2/MOR7480.1 대조군은 IL-2 생산을 강력하게 유도하였다. 따라서 OX40/CD137 mAb²의 항-CD137 Fab 아암은 또한 T 세포-발현된 CD137을 효능화하여 본 실시예의 1차 T 세포 활성화 분석에서 검출 가능한 IL-2 신호를 생성할 수 있다고 가정된다.

[0652] 13.4 9명의 PBMC 기증자로부터의 T 세포를 사용한 pan-T 세포 활성화 분석에서 OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16의 활성

[0653] OX40/CD137 mAb² 클론 FS20-22-49AA/FS30-10-16을 9명의 상이한 기증자로부터의 PBMC를 사용한 T 세포 활성화 분석에서 시험하여 이의 활성에 대해 정확한 EC₂₀, EC₃₀ 및 EC₅₀ 값을 확립하였다. 분석은 인공 가교결합제의 부재하에서 실시예 13.1에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0654] 평균 값 + 또는 - 표준 편차 (SD)는 각 기증자에 대해 실시예 12.3에 기술된 바와 같은 원시 데이터로부터 계산하였다. T 세포 분석에서 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)에 대해 관찰된 IL-2 방출에 대한 EC₂₀,

EC₃₀ 및 EC₅₀ 값을 또한 실시예 12.3에 기술된 바와 같이 계산하였으며 표 23에 나타내어져 있다.

표 23: T 세포 활성화 분석에서 OX40/CD137 mAb²의 EC₂₀, EC₃₀ 및 EC₅₀ 값

	EC ₅₀ (nM)	EC ₃₀ (nM)	EC ₂₀ (nM)
기증자 1	0.170	0.203	0.280
기증자 2	0.067	0.103	0.153
기증자 3	0.167	0.158	0.193
기증자 4	0.251	0.226	0.223
기증자 5	0.175	0.182	0.222
기증자 6	0.116	0.177	0.264
기증자 7	0.114	0.297	0.467
기증자 8	0.121	0.283	0.448
기증자 9	0.199	0.174	0.194
가중 평균	0.179	0.067	0.040
95% Conf. Int.	0.154-0.208	0.049-0.090	0.026-0.061

이러한 결과는 OX40/CD137 mAb²가 상이한 기증자로부터의 T 세포에 대해 필적하는 활성을 가짐을 보여준다.

실시예 14 - CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화 분석에서 인간 OX40/CD137 mAb²의 활성

T 세포는 면역계에서의 이들의 기능에 따라 CD4+ 및 CD8+ T 세포로 세분화될 수 있다. CD4+ T 세포는 T 헬퍼 세포라고 하며 면역 반응을 조절하는 사이토카인을 생산하고 CD8+ T 세포는 T 살해 세포라고 하며 표적 세포를 직접 제거한다. OX40의 발현은 CD4+ T 세포에서 CD137 발현보다 높은 것으로 관찰되었으며, 반대로 CD137의 발현은 CD8+ T 세포에서 OX40 발현보다 높은 것으로 나타났다 (Croft, 2014 및 도 6 참조). 이러한 발현 수준의 차이에도 불구하고, CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다는 두 수용체를 공동-발현한다 (Ma et al., 2005).

이러한 두 T 세포 집단에서 OX40/CD137 mAb²의 활성을 추가로 조사하기 위해, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 아래 표 24에 열거된 분자의 능력을 시험하기 위해 분리하여 별도의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화 분석에서 각 T 세포 집단을 활성화하였다. 이러한 분석에서, OX40과 CD137의 공동-발현을 이용하여 OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16의 가교결합을 결정하였다. G1/4420 (항-FITC), G1AA/11D4 (항-OX40), G1AA/MOR7480.1 (항-CD137) G1AA/FS30-10-16 (항-CD137), FS20-22-49AA/4420 (OX40/FITC 모의 mAb²), 및 FS20-22-49AA/4420 + G1AA/FS30-10-16 조합을 대조군으로서 사용하였다. IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

표 24: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb/mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열번호	경쇄 서열번호
G1/4420	FITC	없음	hIgG1	아니오	FITC-맥스트란	115	116
G1AA/11D4	hOX40	없음	hIgG1	예	항-hCH2	173	175
G1AA/MOR7480.1	hCD137	없음	hIgG1	예	항-hCH2	125	120
G1AA/FS30-10-16	hCD137	없음	hIgG1	예	항-hCH2	154	97
G1AA/20H4.9	hCD137	없음	hIgG1	예	항-hCH2	165	122
FS20-22-49AA/4420	FITC	hOX40	hIgG1	예	FITC-맥스트란	123	116
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hIgG1	예	항-hCH2	95	97

인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 분리하기 위해, PBMC를 먼저 실시예 13.1에 기술된 바와 같이 분리하였다. 그후 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제조업체의 지침에 따라 각각 CD4+ T 세포 분리 키트 (human) (Miltenyi Biotec, 130-096-533) 및 CD8+ T 세포 분리 키트 (human) (Miltenyi Biotec, 130-096-495)를 사용하여 PBMC로부터 별도로 분리하였다.

CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 실시예 13.1에 기술된 바와 같이 인간 T-활성제 CD3/CD28 Dynabeads를 사용하여 T 세포 배지에서 1.0 x 10⁶ 개 세포/ml의 농도로 필요한 양을 밤새 활성화시켰다.

- [0665] 활성화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 Dynabeads로부터 세척하고 2.0×10^6 개 세포/ml의 농도로 T 세포 배지에 재현탁시켰다. 96-웰 평저 플레이트를 37℃, 5% CO₂에서 2시간 동안 PBS에 희석시킨 2.5 μg/ml (CD4+ T 세포 활성화 분석의 경우) 또는 10 μg/ml (CD8+ T 세포 활성화 분석의 경우) 항-인간 CD3 항체 (R&D Systems, 클론 UHCT1)와 함께 배양을 통해 항-인간 CD3 항체로 코팅한 다음 PBS로 2회 세척하였다. 그후 활성화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 2×10^5 개 세포/웰로 각 플레이트에 첨가하였다.
- [0666] 각 시험 항체 (자세한 설명에 대해서는 표 24 참조)의 2 μM 희석물을 제조하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 필요에 따라 가교결합제 (항-인간 CH2 항체 또는 FITC-텍스트란(Sigma) (표 24 참조))와 1:1 몰 비로 웰에 첨가하였다. 96-웰 플레이트에서, 시험 항체의 연속 희석물을 제조하고 100 μl의 희석된 항체 혼합물을 각 플레이트 상의 활성화된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포에 첨가하였다.
- [0667] T 세포를 37℃, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양하였다. 상청액을 수집하고, IL-2 방출을 측정하고 데이터를 실시예 12.1에 기술된 바와 같이 제조하였다. 표 25는 가교결합제로의 가교결합의 존재 또는 부재하에 별도의 T 세포 활성화 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 도 5a 내지 c는 각각 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 활성화 분석에 대한 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.
- [0668] 상청액을 수집한 후, T 세포를 PBS에서 세척하고 4℃에서 1시간 동안 PBS에서 1:1000으로 희석시킨 Alexa Fluor 488-표지된 항-인간 Fc 이차 항체 (Jackson ImmunoResearch, cat. no. 109-546-098)로 염색하였다. 그후 세포를 PBS로 한 번 세척하고 DAPI (Biotium, cat. no. 89139-054)를 갖는 100 μl/웰 PBS에 1 μg/ml로 재현탁시켰다. 그후, 세포를 BD FACSCanto II 유세포 분석기 (BD Biosciences)에서 분석하였다. 도 6은 G1AA/MOR7480.1 또는 G1AA/11D4로 처리된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 488 채널에서의 기하 평균 형광 강도를 보여준다.

[0669] 표 25: 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 mAb²를 사용한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화 분석

	CD4+ T 세포							
	가교결합되지 않음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
mAbs/mAb ²	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD	0.0813	0.01883 내지 0.2796	8817	7129 내지 10561
G1AA/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
FS20-22-49AA/4420	0.5641	0.06536 내지 ND	2242	1578 내지 +무한대	0.1553	0.06145 내지 0.3765	18872	16200 내지 21634
FS20-22-49AA/4420 + G1AA/FS30-10-16	22.54	1.881 내지 162.8	3820	2403 내지 8413	0.181	0.08648 내지 0.3728	18895	16953 내지 20903
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.1131	0.04802 내지 0.2529	16232	14326 내지 18191	0.08334	0.03012 내지 0.2113	16232	14031 내지 18494
	CD8+ T 세포							
	가교결합되지 않음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
mAbs/mAb ²	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/11D4	NAD	NAD	NAD	NAD	0.09964	0.004042 내지 1.04	387.6	306.3 내지 474.2
G1AA/MOR7480.1	NAD	NAD	NAD	NAD	1.011	0.2837 내지 3.658	1066	849.8 내지 1308
G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	3.875	2.547 내지 5.943	2560	2344 내지 2796
FS20-22-49AA/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	0.268	0.1418 내지 0.5024	1663	1510 내지 1821
FS20-22-49AA/4420 + G1AA/FS30-10-16	NAD	NAD	NAD	NAD	0.4312	0.1721 내지 1.081	2534	2185 내지 2905
FS20-22-49AA/FS30-10-16	0.1183	0.06831 내지 0.2032	4915	4592 내지 5246	1.98	0.3441 내지 8.779	7397	6071 내지 9139

NAD = 검출된 활성 없음

ND = 결정 불가

표 25 및 도 5b는 CD4+ T 세포가 가교결합된 항-OX40 대조군 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420 (단독으로 및 G1AA/FS30-10-16과 조합하여 둘 다)에 의해 활성화될 수 있지만 단일-제제 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16에 의해서는 활성화될 수 없음을 보여준다. 도 5c는 CD8+ T 세포가, 다른 한편으로, 가교결합될 때 항-CD137 대조군 G1AA/MOR7480.1 및 G1AA/FS30-10-16 둘 다에 의해서 뿐만 아니라 가교결합된 항-OX40 대조군 G1AA/11D4 및 FS20-22-49AA/4420에 의해 활성화되었지만, 단일-제제 항-CD137 대조군 G1AA/FS30-10-16에 대한 반응의 수준은 단일-제제 항-OX40 대조군 둘 다보다 더 컸다는 것을 보여준다. SEA 분석 (실시예 12.2) 및 인간 pan-T 세포 활성화 분석 (실시예 13.3)에서 관찰된 바와 같이, 모의 mAb² 형식 (FS20-22-49AA/4420)의 OX40 Fcab는 CD4+ T 세포의 존재하에 가교결합의 부재하에서 약간의 활성을 보였으며 이 활성은 항체가 가교결합될 때 증가하였다. OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)는 이전의 결과 (실시예 12 및 13 참조)로부터 예상되는 바와 같이 가교결합의 부재하에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다의 존재하에서 활성을 나타내었다.

- [0674] 도 6은 CD4⁺ T 세포가 CD8⁺ T 세포보다 더 낮은 수준의 CD137 및 더 높은 수준의 OX40을 발현한다는 것을 보여준다. CD137에 대한 G1AA/MOR7480.1의 결합은 CD137 발현의 척도이고 OX40에 대한 G1AA/11D4의 결합은 OX40 발현의 척도이다.
- [0675] 단리된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 사용한 이러한 T 세포 분석은 위에 기술된 바와 동일한 프로토콜을 따르되 상이한 PBMC 기증자로부터 단리된 T 세포를 사용하여 항-CD137 항체 G1AA/20H4.9를 첨가하여 반복하였다 (표 24 참조). 도 5a 내지 d에 나타난 결과와 일치하게, 도 5e 및 5f는 CD8⁺ T 세포는 CD137 효능작용에 더 잘 반응하고 CD4⁺ T 세포는 OX40 효능작용에 더 잘 반응함을 보여준다. 항-OX40 항체 (모의 mAb² 형식 FS20-22-49AA/4420의 G1AA/11D4 및 항-OX40 Fcab)는 가교결합될 때 CD4⁺ T 세포를 활성화시켰지만 CD8⁺ T 세포를 활성화시키지는 못했으며, CD137 항체 (G1AA/20H4.9 및 G1AA/FS30-10-16)는 가교결합될 때 CD8⁺ T 세포를 활성화시켰지만 CD4⁺ T 세포를 활성화시키지는 못했다. G1AA/20H4.9 항체는 또한 실시예 7.1에 기술된 D011.10-hCD137 세포 분석에서 수득된 결과와 유사하게 가교결합 항체의 부재하에서 CD8⁺ T 세포를 활성화시켰다. 이러한 반복 실험에서 G1AA/MOR7480.1 항체는 가교결합될 때 CD8⁺ T 세포를 활성화시키지 않았다. 일부 PBMC 기증자는 다른 기증자보다 CD137 공동-자극에 더 민감할 수 있으며 이 실험에서 수득된 다른 결과는 이러한 자연적인 변화의 결과일 수 있다.
- [0676] 이러한 데이터는 CD4⁺ T 세포가 CD8⁺ T 세포보다 OX40 효능작용을 통한 활성화에 더 민감하고, 반대로 CD8⁺ T 세포가 CD4⁺ T 세포보다 CD137 효능작용을 통한 활성화에 더 민감하다는 것을 나타낸다. 이것은 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포에서 OX40 및 CD137 수용체의 발현 수준의 보고된 차이와 상관성이 있으며, 전자는 CD137보다 높은 수준의 OX40을 발현하고 후자는 OX40보다 높은 수준의 CD137을 발현한다. Fab 아암이 OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16에 존재하는 가교결합된 항-CD137 대조군 항체 G1AA/FS30-10-16의 CD8⁺ T 세포 존재하에서의 활성화는 mAb²가 OX40에 대한 이의 Fcab의 결합에 의해 가교결합될 때 CD137 수용체를 활성화하는 능력을 가짐을 입증한다.
- [0677] 게다가, OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16에 또한 존재하는 모의 mAb² 형식 (FS20-22-49AA/4420)의 가교결합된 항-OX40 Fcab의 CD4⁺ T 세포의 존재하에서의 활성화는 mAb²가 CD137에 대한 이의 Fab 아암의 결합에 의해 가교결합될 때 OX40 수용체를 활성화하는 능력을 가짐을 보여준다. 따라서 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²는 OX40의 효능작용을 통해 CD4⁺ T 세포를 활성화시키고 CD137 및 더 적은 정도로 OX40의 효능작용을 통해 CD8⁺ T 세포를 활성화시킴으로써 이중 효능제로서 기능할 수 있는 잠재능을 갖는다고 결론지을 수 있다. mAb²에 의한 OX40의 활성화는 이의 Fcab를 통해 일어나며, 이의 Fab 아암을 통해 CD137에 결합될 때 mAb²의 가교결합에 의해 증가하는 반면, CD137의 활성화는 CD137에 대한 이의 Fab 아암의 결합과 이의 Fcab를 통해 OX40에 결합될 때 mAb²의 가교결합을 통해 일어난다.
- [0678] 실시예 15 - T세포 활성화 분석에서 마우스 OX40/CD137 mAb² 및 항-마우스 CD137 항체의 활성화
- [0679] 항-인간 OX40/CD137 mAb²는 마우스 단백질에 결합하지 않기 때문에, T-세포 매개된 항-종양 반응을 일으키는 OX40/CD137 mAb²의 가능성을 시험하기 위해 마우스 OX40 및 마우스 CD 137을 표적으로 하는 병렬 시약을 제조하였다 (실시예 8.2 참조).
- [0680] 15.1 pan-T 세포 활성화 분석에서 마우스 OX40/CD137 mAb²의 활성화
- [0681] 이러한 두 개의 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 마우스 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)가 예비-활성화된 T 세포에 의한 염증성 사이토카인의 생산을 유도할 수 있는지 시험하기 위해, 마우스 T 세포 활성화 분석을 확립하였다. 항체 G1/4420 (항-FITC), G1AA/OX86 (항-mOX40), G1AA/Lob12.30 (항-mCD137), G1AA/OX86과 G1AA/Lob12.3 조합, 및 FS20m-232-91AA/4420 (mOX40/FITC 모의 mAb²)을 대조군으로서 사용하고 (자세한 설명에 대해서는 표 26 참조) IL-2 생산을 T 세포 자극의 척도로서 사용하였다.

[0682] 표 26: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	가교결합제	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	FITC 텍스트란	115	116
G1AA/OX86	mOX40	없음	hlgG1	예	a-hCH2	155	156
G1AA/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	예	a-hCH2	사우샘프턴 대학	
FS20m-232-91AA/4420	FITC	mOX40	hlgG1	예	FITC 텍스트란	157	116
FS20m-232-91AA/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	예	a-hCH2	실시예 9.2에 상기 기술된 생성	

[0683]

[0684] T 세포를 단리하기 위해, 4-8주령 암컷 Balb/C 마우스 (Charles River)로부터 비장을 수집하였다. 마우스를 인도적으로 안락사시키고 비장을 해부에 의해 단리하였다. 5 ml 플라스틱 시린지 내부를 사용하여 70 µm 세포 여과기 (Corning)를 통해 비장을 밀어넣어 비장세포를 단리하였다. 세포 여과기를 1 ml Dulbecco의 인산염 완충 염수 (DPBS) (Gibco)로 10회 세척하고 용출액을 50ml 튜브에 수집하였다. 용출액에 존재하는 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 10 ml 적혈구 용해 완충액 (eBioscience)의 첨가를 통해 용해시켰다. 제조업체의 지침에 따라 Pan T 세포 단리 키트 II (마우스) (Miltenyi Biotec Ltd)를 사용하여 용출액에 존재하는 비장세포로부터 T 세포를 단리한 다음 실시예 13.1에 기술된 인간 T 세포 활성화 분석과 본질적으로 동일한 프로토콜로 활성화시키고 사용하되, 대신에 T 세포의 활성을 위해 마우스 T-활성제 CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies), 플레이트의 코팅을 위해 항-마우스 CD3 항체 (Biolegend 클론 145-2C11), 및 IL-2 방출의 측정을 위해 마우스 IL-2 ELISA 키트 (eBioscience or R&D systems)를 사용하였다.

[0685] 표 27은 시험된 mAb² 및 mAb의 존재하에 T 세포 활성화 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응을 보여준다. 도 7a 및 b는 T 세포 활성화 분석에 대한 IL-2 방출의 대표적인 플롯을 보여준다.

[0686] 표 27: 공동-발현된 수용체를 표적으로 하는 mAb²를 사용한 T 세포 활성화 분석

mAbs/mAb ²	가교결합 없음				가교결합			
	EC ₅₀ (nM)		최대 반응		EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(mIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.	(nM)	95% Conf. Int.	(mIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/OX86	NAD	NAD	NAD	NAD	2.413	1.730 to 3.365	14544	13647 to 15441
G1AA/Lob12.3	NAD	NAD	NAD	NAD	1.179	0.001061 to 1309	373.6	139.3 to 607.8
G1AA/OX86 + G1AA/Lob12.3	NAD	NAD	NAD	NAD	1.722	0.9596 to 3.090	12834	11531 to 14138
FS20m-232-91AA/4420	NAD	NAD	NAD	NAD	0.2568	0.1181 to 0.5585	14672	13279 to 16065
FS20m-232-91AA/Lob12.3	0.1141	0.01023 to 1.273	8750	6614 to 10885	0.1011	0.04358 to 0.2346	13563	12485 to 14640

[0687]

[0688] NAD = 검출된 활성 없음

[0689] 표 27 및 도 7b는 OX40 수용체가 표적화되고 항-OX40 항체가 가교결합될 때 T 세포의 활성화가 증가함을 보여준다. 예상대로 가교결합된 또는 비-가교결합된 항-FITC 항체 G1/4420 또는 비-가교결합된 항-OX40 항체 (G1AA/OX86 단독 또는 G1AA/Lob12.3과 조합하여)에서는 T 세포 활성화가 관찰되지 않았다. IL-2는 가교결합제의 존재하에 OX40 수용체가 항-OX40 항체 G1AA/OX86에 의해 표적화되었을 때 T 세포에 의해 생성되었다 (G1AA/OX86 단독의 경우 2.41 nM의 EC₅₀, 및 G1AA/Lob12.3와 조합할 때 1.72 nM의 EC₅₀).

[0690] 모의 mAb² 형식 (FS20m-232-91 AA/4420)의 OX40-표적화 Fcab는 가교결합의 부재하에서는 효능적 활성을 갖지 않았지만 FITC-텍스트란에 대한 Fab 아암의 결합에 의해 가교결합될 때 강력한 T 세포 활성화를 보여주었다.

OX40-표적화 Fcab가 항-CD137 Fab (Lob12.3)와 쌍을 이룰 경우, mAb²는 임의의 추가의 가교결합체의 부재하에서 T 세포 활성을 보였다. 이것은 mAb²가 동일한 세포 표면 상에 공동-발현된 수용체에 결합함으로써 가교결합됨을 나타낸다.

[0691] 한계 활성은 가교결합된 CD137-표적화 항체 G1AA/Lob12.3 단독에서 관찰되었으며, 가교결합될 때 OX40-표적화 항체 G1AA/OX86과 CD137-표적화 항체 G1AA/Lob12.3의 조합의 활성은 가교결합된 OX40-표적화 항체 G1AA/OX86 단독의 활성에 필적하며, 이것은 분석이 Lob12.3에 의한 CD137의 효능작용의 검출에 대해 낮은 민감도를 가짐을 나타낸다. 이것은 가교결합된 항-CD137 대조군 G2/MOR7480.1에 대해 더 강한 CD137-특이 신호 (IL-2 방출의 최대 반응)가 관찰된 **실시예 13.3**에 기술된 인간 T 세포 분석과 대조적이다. 항-마우스 CD137 및 항-인간 CD137 대조군 항체에 대해 보여진 기능적 활성의 이러한 차이는 이들이 각각의 CD137 표적에 대해 상이한 친화성을 갖는 것과 관련이 있을 수 있다. 이것은 또한 세포의 공급원 (인간 PBMC 대 마우스 비장세포) 또는 마우스 대 인간 시스템의 표적 생물학 간의 미묘한 차이를 반영할 수 있다.

[0692] 이러한 데이터는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 OX40/CD137 mAb²가 두 수용체 모두를 동시에 관여함으로써 추가의 가교결합체 없이 T 세포 활성화를 유도할 수 있음을 보여준다.

[0693] 항-인간 OX40/CD137 mAb² 분자는 마우스 교차-반응성이 아니고 항-마우스 OX40/CD137 mAb²는 병렬 시험관내 실험 시스템에서 인간에 기능적으로 필적하기 때문에, 항-마우스 분자는 OX40/CD137 mAb²가 생체내에서 항종양 면역력을 유도할 가능성을 추론하는데 적합한 대리물로 간주된다.

[0694] 15.2 마우스 CD137 T 세포 활성화 분석에서 항-마우스 CD137 항체의 활성

[0695] **실시예 15.1**의 pan-T 세포 분석에서 마우스 OX40/CD137 mAb²의 항-CD137 Fab 클론 (Lob12.3)의 활성이 거의 또는 전혀 검출되지 않았기 때문에, 상이한 항-CD137 효능제 항체의 활성을 이해하기 위해, D011.10-mCD137 세포를 사용한 T 세포 활성화 분석을 수행하였다. 항-CD137 효능제 항체 G1AA/Lob12.3 (**표 26** 참조) 및 G1AA/3H3 (서열 번호: 166 및 167) 뿐만 아니라 동형 음성 대조군으로서의 IgG1 형식 (G1/4420; 서열 번호 115 및 116)의 항-FITC 항체 4420을 시험하였다. mAb 분자를 가교결합 항-인간 CH2 항체, MK1A6 (**실시예 2.1** 참조)의 존재 및 부재하에 시험하였다. 마우스 IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

[0696] 분석은 **실시예 6.2**에 기술된 바와 같이 수행하되 D011 10-hCD137 세포 대신에 D011.10-mCD137 세포를 사용하였다. 플레이트를 Gen5 소프트웨어 (BioTek)를 갖는 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 판독하였다. 450nm의 흡광도 값에서 630nm의 흡광도 값을 뺀다 (보정). 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4 모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 마우스 IL-2 (mIL-2)의 농도를 항체의 로그 농도에 대해 플롯팅하고 생성된 곡선을 GraphPad Prism에서 로그 (효능제) 대 반응 방정식을 사용하여 피팅하였다.

[0697] 결과는 **도 7c** 및 **d**에 도시되어 있다. 항-CD137 항체는 활성을 유도하기 위한 가교결합 항체에 대한 요건에 있어서 상이하였다. G1AA/Lob12.3은 활성을 위해 가교결합 항체의 첨가를 필요로 하는 것으로 관찰되고, 즉 이의 활성을 위해 가교결합-의존적인 반면 G1AA/3H3은 가교결합 항체의 존재 및 부재 둘 다에서 활성을 보였으므로 가교결합-비의존적 활성을 가졌다.

[0698] 실시예 16 - OX40 및 CD137의 이중 관여가 OX40/CD137 mAb²의 활성을 위해 필요하다

[0699] 16.1 인간 OX40/CD137 mAb²

[0700] OX40/CD137-표적화 mAb²는 SEA 분석(**실시예 12**), 인간 pan-T 세포 분석 (**실시예 13**) 및 T 세포가 OX40 및 CD137을 공동-발현하는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포 분석 (**실시예 14**)에서 추가 가교결합체의 부재하에서 활성을 나타내었다. 이 활성이 OX40/CD137 mAb²가 두 수용체에 동시에 결합하는 것을 필요로 하는지 시험하기 위해, T 세포 경쟁 분석을 수행하여 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16이 100배 과량의 OX40-표적화 FS20-22-49AA/4420 모의 mAb², 항-CD137 mAb G1AA/FS30-10-16, FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² + G1AA/FS30-10-16 mAb의 조합, 또는 동형 대조군 mAb G1/4420의 존재하에서 단리된 T 세포를 활성화시키는 능력을 평가하였다. IL-2 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

[0701] T 세포를 **실시예 13**에 기술된 바와 같이 단리하였다. 그후 **실시예 13**에 기술된 바와 같이 단리된 T 세포를 활

성화시키고 플레이트를 항-CD3 항체로 코팅하였다. 활성화된 T 세포를 2 nM OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)로 보충하고 2 x 10⁵개/웰로 100 μl로 플레이트에 첨가하였다. 따라서 OX40/CD137 mAb²의 최종 농도는 1 nM이었다.

[0702] 각 시험 항체의 2 μM 희석물을 DPBS (Gibco)에서 제조하고 T 세포 배지에서 1:10 (30 μl + 270 μl)으로 추가로 희석하여 200 nM 희석물을 수득하고 100 μl의 각 희석된 항체를 플레이트 상의 활성화된 T 세포에 첨가하였다.

[0703] T 세포를 배양하고, 상청액을 수집하고 **실시예 13**에 기술된 바와 같이 IL-2 방출을 측정하였다. 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4-모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지를 사용하는 일원 ANOVA 검정 및 Dunnett의 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였다.

[0704] **도 8**은 경쟁 분석에 대한 IL-2 방출을 보여준다. mAb²의 활성화는 mAb²가 항-OX40 및 항-CD137 항체의 부재하에서 두 수용체 모두에 결합할 수 있는 경우에 비해 OX40에 대한 결합을 위해 FS20-22-49AA/4420 모의 mAb² 및 CD137에 대한 결합을 위해 G1AA/FS30-10-16 mAb 둘 다에 의해 경쟁했을 때 크게 감소하였다. OX40-표적화 모의 mAb² FS20-22-49AA/4420과 항-CD137 mAb G1AA/FS30-10-16의 조합은 OX40/CD137 mAb²의 활성을 더욱 감소시켰다. 이러한 결과는 mAb²가 OX40 및 CD137의 클러스터링 및 효능작용을 통해 T 세포 활성화를 유도하기 위해서는, 두 수용체 모두에 대한 mAb²의 이중 결합이 필요하다는 것을 나타낸다.

[0705] 16.2 마우스 OX40/CD137 mAb²

[0706] 마우스 OX40/CD137-표적화 mAb²는 T 세포가 두 수용체를 공동-발현하는 T 세포 분석에서 추가의 가교결합제의 부재하에서 활성을 보인다. 이 활성이 OX40/CD137 mAb²가 두 수용체에 동시에 결합하는 것을 필요로 하는지를 시험하기 위해, 경쟁 분석을 수행하여 FS20m-232-91 AA/Lob12.3 mAb²가 100배 과량의 OX40-표적화 모의 mAb² FS20m-232-91AA/4420, 항-CD137 mAb G1/Lob12.3 또는 음성 대조군 mAb G1AA/4420 (FITC)의 존재하에서 단리된 T 세포를 활성화시키는 능력을 평가하였다. T 세포를 **실시예 15.1**에 기술된 바와 같이 단리하였다. 그후, **실시예 13.1** (인간 pan-T 세포 활성화 분석)에 기술된 바와 같이 단리된 T 세포를 활성화시키고 플레이트를 항-CD3 항체로 코팅시키되, 대신에 T 세포의 활성화를 위해 마우스 T-활성제 CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies)를 사용하고 플레이트의 코팅을 위해 항-마우스 CD3 항체 (Biolegend 클론 145-2C11)를 사용하였다. 활성화된 T 세포를 2 nM OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)로 보충하고 2 x 10⁵개 세포/웰로 플레이트에 첨가하였다.

[0707] 각 시험 항체의 2 μM 희석물을 DPBS (Gibco)에서 제조하고 T 세포 배지에서 1:10 (30 μl + 270 μl)으로 추가로 희석하여 200 nM 희석물을 수득하고 100 μl의 각 희석된 항체를 플레이트 상의 활성화된 T 세포에 첨가하였다.

[0708] T 세포를 배양하고, 상청액을 수집하고 **실시예 12.1**에 기술된 바와 같이 IL-2 방출을 측정하되, 대신에 IL-2 방출의 측정을 위해 마우스 IL-2 ELISA 키트 (eBioscience 또는 R&D systems)를 사용하였다. 사이토카인 농도 계산을 위한 표준 곡선은 4-모수 로지스틱 곡선 맞춤 (Gen5 Software, BioTek)에 기반하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지를 사용하는 일원 ANOVA 검정 및 Dunnett의 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였다. **도 9**는 경쟁 분석에 대한 IL-2 방출의 대표적인 플롯을 보여준다.

[0709] **도 9**는 OX40 또는 CD137 결합에 대해 경쟁하는 항체가 과량으로 도입될 때 OX40/CD137 mAb²에 의해 유도된 IL-2 생산량의 감소가 있음을 보여준다. 사용된 경쟁 항체는 동일한 에피토프가 표적화되도록 보장하기 위해 mAb² 구성 요소 (모의 (4420) mAb² 형식의 Fcab 및 Fcab가 없는 Fab)이었다. 이러한 경쟁 항체의 첨가는 OX40/CD137 mAb²에 의해 유도된 IL-2 방출의 양을 감소시켰으며, 이것은 이 분자가 이의 활성을 위해 이중 결합을 필요로 한다는 것을 나타낸다. 이것은 OX40/CD137 mAb² 활성이 OX40과 CD137을 동시에 관여시키는 것에 의존하여 두 수용체를 클러스터링하고 효능작용한다는 것을 보여준다.

[0710] 실시예 17 - CT26 동계 종양 모델에서 OX40/CD137 mAb²의 활성

[0711] 17.1 LALA 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 OX40/CD137 mAb²의 항-종양 활성의 비교

[0712] CT26 Balb/c 동계 마우스 결직장 종양 모델을 사용하여 생체내에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 항-종양 활성을 시험하였다. CT26 종양 모델은 OX40 및 CD137 효능제 항체 둘 다에 민감한 것으로 이전에 나타났으며 (Sadun et al., 2008), CT26 종양으로부터 단리된 종양 침윤 림프구 (TIL)는 OX40 및 CD137 둘 다를 발현할 것으로 예상된다. 시험된 항체는 표 28에 자세히 설명되어 있다.

[0713] 표 28: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	115	116
G1/OX86	mOX40	없음	hlgG1	아니오	159	156
G1AA/OX86	mOX40	없음	hlgG1	예	155	156
G1/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	아니오	사우샘프턴 대학	
G1AA/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	예	사우샘프턴 대학	
FS20m-232-91/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	아니오	실시예 9.2에 상기 기술된 생성	
FS20m-232-91AA/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	예		

[0714]

[0715] LALA 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 mAb² (각각 FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3)가 종양 성장을 억제하는 능력을 동형 대조군 mAb G1/4420 (항-FITC), 단일-체제 mAb G1/OX86 (LALA 돌연변이가 없는 항-OX40 대조군) 또는 G1/Lob12.3 (LALA 돌연변이가 없는 항-CD137 대조군), G1/OX86 + G1/Lob12.3의 조합, 또는 G1AA/OX86 (LALA 돌연변이를 갖는 항-OX40 mAb) + G1AA/Lob12.3 (LALA 돌연변이를 갖는 항-CD137 mAb)의 조합과 비교하였다.

[0716] 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작 전에 1주일 동안 적응시켰다. 모든 동물은 마이크로 칩을 사용하고 고유 식별자를 제공받았다. 각 코호트는 12마리의 마우스를 가졌다. CT26 결장 암종 세포주 (ATCC, CRL-2638)를 확장하고, Banking한 다음 IMPACT I 프로토콜을 사용하여 병원체에 대해 IDEXX BioResearch에 의해 사전-스크리닝하였으며 병원체가 없는 것으로 나타났다. CT26 세포 (대략 3×10^6 개)를 -150°C 저장고에서 해동하고 T175 조직 배양 플라스크에서 10% FCS (Gibco, 10270-106)를 갖는 20 ml DMEM (Gibco, 61965-026)에 첨가하였다. 마우스를 이소플루란 (Abbott Laboratories)을 사용하여 마취시켰으며 각 동물은 종양을 생성하기 위해 왼쪽 옆구리에 피하 주사된 1×10^6 개의 세포를 제공받았다. 종양 세포 접종 후 10일째에, 종양을 측정하고 마우스를 종양 용적에 기준하여 연구 코호트로 무작위화하였다. 이 시점에서 종양을 갖지 않는 마우스는 연구에서 제거하였다.

[0717] 주사 전 24시간 이내에, 항체를 SEC-HPLC 프로파일링으로 분석하고 불순물을 확인하였다. 항체를 PBS에서 0.1 mg/ml의 최종 농도로 희석하고, 200 μ l/마우스를 복강내 (IP) 주사하여 20 g 마우스에 대해 1 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 종양 접종 후 13일, 15일 및 17일 (2일마다 3회 투여)에 주사를 수행하였다. 동물은 일주일에 세 번 마취하에 건강 검진을 받았으며, 그 시간 동안 종양을 정확하게 측정하였다. 종양 용적 측정은 종양의 가장 긴 축과 가장 짧은 축을 결정하기 위해 캘리퍼스로 수행하였다. 다음 공식을 사용하여 종양 용적을 계산하였다:

[0718] $L \times (S^2)/2$

[0719] (여기서 L = 가장 긴 축; S = 가장 짧은 축)

[0720] 시험은 영국 동물 (과학 절차) 법 및 EU 지침 EU86/609에 따라 종양 용적이 인도적 종점에 도달한 27일에 중단하였다.

[0721] 통계 검정을 위해 종양 용적을 혼합 모델을 사용하여 로그 스케일에서 분석한다. 관심있는 각 치료 쌍에 별도의 모델을 피팅하였다. 모델은 다음과 같다:

- [0722] $\log_{10}(\text{용적}) = A + B \times (\text{일} - \text{출발 일}) + \varepsilon$
- [0723] A 및 B는 각각 절편 및 기울기이고; 이들은 마우스마다 상이하며, 그룹에 대한 고정 효과와 동물에 대한 랜덤 효과를 포함한다:
- [0724] $A = A_0 + A_1T + \varepsilon_A$
- [0725] $B = B_0 + B_1T + \varepsilon_B$
- [0726] T는 한 그룹에서 값이 0이고 다른 그룹에서 1인 처리군을 나타내는 더미 변수이다. 랜덤 효과는 정규 분포로 분포된다:
- [0727] $\varepsilon_A \sim N(0, \sigma_A), \quad \varepsilon_B \sim N(0, \sigma_B)$
- [0728] 여기서 σ_A 및 σ_B 는 각각 절편과 기울기에서의 동물간 변동성의 표준 편차이다. 동물내 변동성도 표준 편차 σ 로 정규 분포된다:
- [0729] $\varepsilon \sim N(0, \sigma)$
- [0730] 각 처리 쌍에 대해, 위의 모델을 데이터에 피팅하였다. A_1 과 B_1 에 대해, 0으로부터의 차이에 대한 (양측) p-값을 계산하였다; 0.05 미만의 p-값은 처리군 간의 차이에 대한 통계적으로 유의한 증거이다.
- [0731] 결과는 도 10a에 도시되어 있다. 평균 CT26 종양 용적 + 또는 - 표준 오차 평균이 플롯팅된다. 결과는 LALA 돌연변이를 갖는 및 갖지 않는 OX40/CD137 mAb² (각각 FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3)로의 처리가 항-OX40 대조군 (G1/OX86), 항-CD137 대조군 (G1/Lob12.3), 이들 두 항체의 조합 (G1/OX86 + G1/Lob12.3), 또는 LALA-함유 항-OX40과 항-CD137 항체의 조합 (G1AA/OX86+ G1AA/Lob12.3)으로의 처리에 비해 종양 성장 감소를 야기하였음을 보여준다.
- [0732] 결과는 대조군 항체 (G1/4420)에 비해 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20-232-91/Lob12.3)의 항-종양 효과가 통계적으로 유의하다는 것을 보여준다. OX40- 및 CD137-표적화 항원의 조합 (G1/OX86 + G1/Lob12.3, 또는 G1AA/OX86 + G1AA/Lob12.3)의 활성화는 종양 성장을 유의적으로 억제하지 않았으며 단일-제제 대조군 (G1/OX86 또는 G1/Lob12.3)도 마찬가지였다.
- [0733] OX40/CD137 mAb²의 인간 IgG1 골격의 Fc 영역에서 LALA 돌연변이의 도입은 OX40- 또는 CD137-발현 세포의 ADCC 및 ADCP 및 이들 수용체를 발현하는 세포에서 OX40 또는 CD137에 결합될 때 mAb²의 Fc γ 수용체-매개된 가교결합을 방지할 것으로 예상된다. 따라서, FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²의 활성화는 Fc-매개된 효과기 기능 또는 Fc γ 수용체-매개된 가교결합을 통해서가 아니라 수용체 중 하나 또는 둘 다를 통한 신호전달을 야기하는 OX40 및 CD137의 공동-결합을 통해 유도되는 것으로 믿어진다. 후속적으로, 이것은 OX40- 및 CD137-발현 T 세포의 활성화를 야기하여 궁극적으로 T-세포 매개된 항종양 활성을 초래할 것으로 예상된다.
- [0734] 이러한 결과는 OX40/CD137 mAb² 항체가 OX40 및 CD137 발현 TIL을 포함할 것으로 예상되는 종양에 대해 생체내 항-종양 효능을 가짐을 입증하며, 이것은 OX40/CD137 mAb²에 의한 OX40 및 CD137의 이중특이 결합에 의해 매개된 OX40 및 CD137의 생체내 활성화가 종양 성장을 제어하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0735] 상기 배경 부분에 기술된 바와 같이, 간 독성은 CD137 효능제 항체를 사용하는 클리닉에서 관찰되었다 (Segal et al., 2017). 이러한 독성 효과의 메커니즘은 완전히 결정되지 않았지만 전임상 모델의 연구에서 CD137 효능제 항체에 대한 반응으로 IL-27을 생성하는 CD137-발현 골수성 세포의 역할을 강조하였다 (Bartkowiak et al., 2018). 이러한 간 독성 메커니즘에서 Fc γ 수용체의 역할은 연구되지 않았지만 관찰된 독성에 대한 가능한 설명은 골수성 세포에서 CD137과 Fc γ 수용체의 공동-발현이 이들 세포에서 CD137 효능제 항체의 가교결합을 초래하여 염증성 사이토카인의 생산을 유발할 수 있다는 것이다. 따라서 분자의 Fc γ 수용체-가교결합이 종양 미세환경 또는 말초로부터 떨어진 위치에서 OX40의 부재하에 CD137을 발현하는 세포의 임의의 활성화를 야기할 수 있는 경우에 본 발명의 OX40/CD137 이중 효능제 항체 분자에 LALA 돌연변이를 포함시키는 것이 바람직한 것으로 간주되었다. 따라서, 두 표적 모두를 동시에 관여함으로써 OX40과 CD137 둘 다를 발현하는 T 세포를 자극하지만 분자에서 LALA 돌연변이의 존재로 인해 OX40의 부재하에 Fc γ 수용체-매개된 가교결합을 통해 CD137-발현 세

포를 활성화하지 않는 이중 효능제 항체 분자를 조합함으로써, 본 발명의 항체 분자는 클리닉에서 감소된 독성 가능성을 가질 것으로 생각된다.

- [0736] 본 발명의 항체 분자에 LALA 돌연변이를 포함시키는 추가의 이유는 분자가 종양 성장을 억제하기 위해 활성화되도록 의도되는 OX40- 및 CD137-발현 세포의 Fc γ 수용체-매개된 사멸을 피하는 역할을 한다는 것이다. 특정 전임상 종양 모델에서 OX40 효능제 항체의 작용 메커니즘은 종양 미세환경에서 Fc γ 수용체-매개된 Tregs 고갈을 통해서인 것으로 기술되었으며, 이러한 분자에서 Fc γ 수용체 기능-불능화 돌연변이의 도입은 항-종양 활성을 손상시켰다 (Bulliard et al., 2014). LALA 돌연변이의 효과는 Treg 세포의 고갈의 부족을 수반하는 본 발명의 항체 분자에 의해 활성화되도록 의도된 유익한 면역 세포의 보존일 수 있지만, 전임상 종양 모델에서 알 수 있는 바와 같이 동일한 종양 Treg 고갈 메커니즘을 일으키도록 설계된 OX40-표적화 인간 IgG1 항체는 종양 성장을 제어하는 동일한 능력을 나타내지 않았음을 주지한다 (Glisson et al., 2016). Tregs를 고갈시키도록 설계된 다른 분자들도 높은 수준의 임상 활성을 나타내지 않았다 (Powell et al., 2007; Tran et al., 2017). 동계 마우스 종양 모델에서 보이는 Treg 고갈 효과의 임상적 번역 가능성의 이러한 결여는 종양 미세환경에서 더 낮은 수준의 Fc γ 수용체-발현 세포 (Milas et al., 1987), 인간과 마우스 사이의 Treg 생물학의 차이 (Liu et al., 2016) 또는 기타 알려지지 않은 요인 (Stewart et al., 2014)으로 인한 것일 수 있다.
- [0737] 놀랍게도, FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²에 LALA 돌연변이를 포함시키는 것은 CT26 모델에서 이의 항-종양 활성을 손상시키지 않았으며, 이는 이것이 Fc γ 수용체-발현 세포와의 상호작용에 의존하지 않는 Fc γ 수용체-비의존적 작용 메커니즘을 가짐을 나타낸다. **실시예 19**에 기술된 "작용 메커니즘" 연구에서 LALA 돌연변이-함유 mAb²에 의한 종양 Treg의 관찰 가능한 고갈의 부족 및 혈액에서 강한 T 세포 증식의 유도는 본원에 기술된 바와 같이 OX40/CD137 이중 효능제 mAb²의 Fc γ 수용체-비의존적 작용 메커니즘에 대한 추가의 뒷받침을 제공한다. 활성을 위해 Fc γ 수용체-상호작용에 의존하는 항체에서 보여지는 불량한 임상 활성을 감안할 때, 본 발명의 항체 분자의 Fc γ 수용체-비의존적 작용 메커니즘은 클리닉에서 더 큰 효능을 초래할 것으로 예상된다.
- [0738] 17.2 OX40/CD137 mAb² 및 이의 구성 Fcab 및 Fab 요소의 항종양 활성의 비교
- [0739] 마우스 pan-T 세포 활성화 분석 (**실시예 15**)에서, 마우스 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)는 CD137 및 OX40 수용체 둘 다를 동시에 관여함으로써 (**실시예 16.2**) 단일특이성 대조군 항체 G1AA/Lob12.3 (항-mCD137 mAb) 및 FS20m-232-91AA/4420 (mOX40/FITC 모의 mAb²)와 달리 추가의 가교결합체의 부재하에서 시험관내 활성을 나타내었다. pan-T 세포 활성화 분석 이후에, FS20m-232-91 AA/Lob12.3의 항-종양 활성을 CT26 종양 모델에서 이의 구성 요소, 즉, 모의 (항-FITC) mAb² 형식 (FS20m-232-91 AA/4420)의 FS20m-232-91 AA Fcab 및 Fcab가 없는 단일특이성 항-마우스 CD137 mAb (G1AA/Lob12.3) 단일 제제로서 또는 조합하여, 또는 동형 대조군 (G1AA/4420)과 비교하였다.
- [0740] **실시예 17.1**에 기술된 바와 동일한 방법에 따라, CT26 종양을 BALB/c 암컷 마우스에 피하로 확립하였다. CT26 세포-접종 후 10일에, 종양-보유 마우스를 그룹당 25마리 마우스의 연구 코호트로 무작위화하고 항체 치료를 제공하였다.
- [0741] 항체를 PBS에서 0.3 mg/ml의 최종 농도로 희석하고, 200 μ l 용적을 각 마우스에 복강내 주사하여 20 g 마우스에 대해 3 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다 (각 항체 60 μ g의 고정 용량). 주사는 종양 접종 후 10일에 시작하여 총 3회 용량에 대해 2일에 한 번 (Q2D) 수행하였다. 종양 용적은 앞서 기술한 바와 같이 캘리퍼 측정에 의해 결정하였다. 이 연구는 세포 접종 후 64일에 종료하였으며, 종양 용적 및 상태를 기반으로 인도적 종점에 도달했을 때 동물은 연구를 중단하였다.
- [0742] 개별 동물에 대한 시간에 따른 종양 용적 데이터가 **도 10b**에 도시되어 있으며, **도 10c**에 나타난 평균 결과는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 동형 대조군 항체 (G1AA/4420)에 비해 초기 CT26 종양 성장률 (10일 내지 22일 사이)을 억제하였음을 시사한다. 항-마우스 CD137 mAb, 마우스 OX40/FITC 모의 mAb² 또는 이들의 조합으로 처리된 코호트에서는 명백한 종양 성장 억제가 관찰되지 않았다.
- [0743] 이전에 기술된 동일한 혼합 모델 방법에 따라, (세포 접종 후, **표 29**) 22일까지 종양 용적 데이터의 분석은 FS20m-232-91AA/Lob12.3이 동형 대조군에 비해 평균 종양 성장률에서 통계적으로 유의한 ($p = 0.003$) 감소를 초래하였음을 보여주었다. 비교하자면, 항-마우스 CD137 mAb, 마우스 OX40/FITC 모의 mAb² 또는 이들의 조합으로

의 처리는 동형 대조군에 비해 유의적으로 상이한 종양 성장률을 초래하지 않았다. 혼합 모델 방법을 사용한 전체 연구 기간 (64일)에 걸친 종양 성장률의 비교는 동형 대조군에 비해 모든 처리군에서 종양 성장률의 통계적으로 유의한 감소를 나타내었다 (분석은 표시되지 않음).

표 29: 혼합 효과 모델 분석을 사용한 평균 CT26 종양 성장률의 쌍별 비교

A vs. B 쌍별 비교		평균 Log (TGR) [하위, 상위 95% CI]		P-값	비고
A	B	A	B		
동형 대조군	FS20m-232-91AA/4420	0.310 [0.279, 0.340]	0.291 [0.244, 0.339]	> 0.05	ns
동형 대조군	G1AA/Lob12.3	0.310 [0.279, 0.340]	0.281 [0.235, 0.327]	> 0.05	ns
동형 대조군	FS20m-232-91AA/4420 + G1AA/Lob12.3	0.310 [0.279, 0.340]	0.277 [0.237, 0.316]	> 0.05	ns
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3	0.310 [0.279, 0.340]	0.205 [0.164, 0.247]	0.003	***

ns = 통계적으로 유의하지 않음; TGR = 종양 성장률; CI = 신뢰 구간

주의: 초기 종양 성장률을 비교하기 위해, 접종 후 첫 22일 동안의 종양 용적 데이터를 혼합 효과 모델에 사용하였다. 각 쌍별 비교를 위해, p-값을 계산하는데 관련된 그룹 중 적어도 하나는 50% 이상의 유의적으로 비-로그 정규 분포된 종양 성장률을 포함한다.

생존 분석은 FS20m-232-91AA/Lob12.3이 로그 순위 (Mantel-Cox) 검정 ($p \leq 0.0001$)를 사용하여 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 생존 개선을 야기하였음을 보여주었다 (도 10d). 항-마우스 CD137 mAb, 마우스 OX40/FITC 모의 mAb² 또는 이들의 조합을 제공받은 종양-보유 마우스는 동형 대조군에 비해 생존에 있어 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

결론적으로, 결과는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 이의 구성 Fcab 및 Fab 요소의 조합 또는 구성 요소 단독에 대해 더 크고 동등하지 않은 항-종양 활성을 가졌음을 입증한다.

실시예 18 - CT26 동계 종양 모델에서 OX40/CD137 mAb²의 약력학적 반응

18.1 OX40/CD137 mAb²와 항-OX40 및 항-CD137 대조군 mAb의 약력학적 반응의 비교

OX40/CD137 대리 mAb²의 약력학적 반응을 CT26 동계 종양을 갖는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 시간 경과에 따라 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb², 동형 대조군 (G1/4420), 단일-제제 항-마우스 OX40 대조군 (G1/OX86), 단일-제제 항-마우스 CD137 대조군 (G1/Lob12.3) 또는 이들 항-OX40 및 항-CD137 대조군의 조합 (G1/OX86 plus G1/Lob12.3)을 접종한 CT26-보유 마우스로부터 혈액 샘플을 채취하고 T 세포 활성화 및 증식 마커에 대해 유세포 분석법으로 분석하였다.

실시예 17에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작을 위해 준비하고 CT26 결장 암종 세포주 (ATCC, CRL-2638)를 접종하였다. 종양 세포 접종 후 10일째에, 종양을 측정하고 종양 용적을 기준으로 마우스를 그룹당 10마리의 마우스의 연구 코호트로 무작위화하였다. 이 시점에서 종양을 갖지 않는 임의의 마우스는 연구에서 제거하였다.

항체를 이전에 기술된 바와 같이 분석하고 불순물을 확인하며, PBS에서 0.1 mg/ml의 최종 농도로 희석하고, 200 μ l/마우스를 주사하여, 20마리 마우스에 대해 1 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 항체는 종양 접종 후 10, 12 및 14일에 복강내 (IP) 주사에 의해 마우스에 투여하였다.

혈액을 투여 1시간 전 10일째, 11일째 (첫 번째 투여 후 24시간), 15일째 (세 번째 투여 후 24시간) 꼬리 정맥으로부터, 및 심장 천자에 의해 17일째 및 24일째 EDTA-함유 튜브에 수집하였다. 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 용해 완충액 (eBioscience cat no 00-4300-54)에서 2회 용해시켰다. 세포를 Fc 블럭 (eBioscience cat no 14-0161-86, 1:100으로)의 존재하에 염색제 1 (CD4-E450 (클론 GK1.5), Ki67-FITC (클론 SolA15), Foxp3-PE (클론 FJK-16s), CD69-PECy5 (클론 H1.2F3), CD3-PECy7 (클론 145-2C11), CD8-APC (클론 53-6.7), 고정 가능한 생존성 염료 780, 모두 eBioscience에서 공급; 및 CD45-V500 (클론 30-F11),

BD Bioscience에 의해 공급) 또는 염색제 2 (CD49b-E450 (클론 DX5), F4/80-PE (클론 6F12), CD69-PECy5 (클론 H1.2F3), CD19-PECy7 (클론 1D3), CD3-APC (클론 145-2C11), 및 고정 가능한 생존성 염료 780, 모두 eBioscience에 의해 공급; CD45-V500 (클론 30-F11), BD Bioscience에 의해 공급; 및 항-hFc-488 (다클론성), Jackson ImmunoResearch에 의해 공급)를 사용하여 유세포 분석을 위해 염색하였다. 그 후 세포를 PBS로 한 번 세척하고 염색제 2로 염색된 샘플을 200 μ l PBS에 재현탁시키고 FACS Canto II에서 실행하였다. 염색제 1로 염색된 샘플에 대해, 세포를 초기에 100 μ l의 항체 혼합물 1 (Ki67 및 FoxP3 항체를 제외한 모두)로 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 그 후 세포를 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience cat no 00-5523-00)로 투과시켰다. 간단히 말해서, 200 μ l의 고정 용액을 각 웰에 첨가하고 4°C의 암흑에서 밤새 방치하였다. 그 후 세포를 200 μ l 투과 완충액으로 세척하였다. 그 후 세포를 다시 회전시키고 Fc 블럭의 존재하에 Ki67 및 Foxp3 항체를 갖는 100 μ l 투과 완충액에 재현탁시키고 (모두 1:100 희석) 4°C의 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 한 번 세척하고 200 μ l PBS에 재현탁시켰다. 그 후 세포를 BD FACS Cantoll 세포분석기에서 분석하였다. 데이터는 FlowJoX, Excell 및 GraphPad Prism으로 분석하였다. 총 T 세포 뿐만 아니라 CD4⁺ 및 CD8⁺ 소집단에 대한 시간 경과에 따라 관찰된 T 세포 활성화 및 증식을 측정하였다.

[0756] 이 실험은 OX40/CD137 mAb²가 순환 T 세포에 영향을 미쳐, 모든 대조물-처리군에 비해 활성화된 T 세포 (CD45+ CD3+ CD69+) 및 CD4⁺ T 세포 (CD45+ CD3+ CD4⁺ CD69+) 및 증식 T (CD45+ CD3+ Ki67+), CD4⁺ T 세포 (CD45+ CD3+ CD4⁺ K267+) 및 CD8⁺ T 세포 (CD45+ CD3+ CD8⁺ K267+)의 빈도를 증가시키고, 또한 항-OX40 대조군 또는 항-CD137 대조군 단독으로 처리, 또는 동형 대조군에 비해 활성화된 CD8⁺ T 세포 (CD45+ CD3+ CD8⁺ CD69+)의 빈도를 증가시키는 것을 보여주었다. 활성화된 CD8⁺ T 세포 (CD45+ CD3+ CD8⁺ CD69+)의 빈도에 있어서의 유사한 증가는 항-OX40 및 항-CD137 대조군 mAb의 조합으로 처리된 대조군에 대해 관찰되었다. 이러한 결과는 OX40/CD137 mAb²가 또한 T 세포의 증식에 관여하는 사이토카인으로도 알려져 있는 IL-2의 생산에 의해 측정되는 바와 같이 T 세포의 활성화 증가를 나타내었다는 관찰된 시험관내 결과와 일치한다.

[0757] 18.2 OX40/CD137 mAb² 및 이의 구성 Fcab 및 Fab 요소의 약력학적 반응의 비교

[0758] 마우스 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)의 말초 약력학적 반응을 CT26 종양 모델에서 이의 구성 요소, 구용적으로 단일 제제 또는 조합한 모의 (4420) mAb² 형식 (FS20m-232-91AA/4420)의 FS20m-232-91AA Fcab 및 Fcab (G1AA/Lob12.3)를 갖지 않는 단일특이성 항-마우스 CD137 mAb, 또는 동형 대조군 (G1 AA/4420)과 비교하였다.

[0759] **실시예 17.2**에 기술된 동일한 연구에서, CT26 세포-접종 후 16일에, 혈액 샘플을 그룹당 10마리 마우스의 꼬리 정맥에서 채취하여 EDTA-함유 튜브에 수집하였다. **실시예 18.1**에 기술된 동일한 방법에 따라, 적혈구를 용해시키고, 남은 세포를 생존성 염료로 염색한 다음 Fc 블럭의 존재하에 항-Ki67 및 항-Foxp3 항체를 제외하고 **실시예 22.2.2** (항-마우스 CD4 클론 GK1.5 (BD Bioscience, catalogue no. 563790)가 항-CD4 클론 RM4-5 대신에 이 연구에 사용되는 것을 제외하고는)에 열거된 시약으로 표면 염색하였다. 그 후 세포를 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience)로 밤새 투과시켰다. 그 후 세포를 항-Ki67 및 항-Foxp3 항체로 세포내 염색하였다. 세척 후, 세포를 BD Fortessa 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. 데이터 분석은 FlowJo, Excel 및 Graph Pad Prism 7 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0760] FS20m-232-91AA/Lob12.3은 동형 대조군 처리에 비해 혈액에서 Ki67⁺ CD4⁺ 효과기 (총 CD4⁺ Foxp3⁻ 세포의 %로서) 및 Ki67⁺ CD8⁺ 말초 T-세포 (총 CD8⁺ 세포의 %로서)의 비율을 상당히 증가시키는 것으로 관찰되었다. 항-마우스 CD137 mAb 및 FS20m-232-91 AA/4420 모의 mAb²는, 단일 제제로서 또는 조합하여, 동형 대조군-처리된 마우스에 비해 증식 Ki67⁺ CD4⁺ 효과기 및 Ki67⁺ CD8⁺ T-세포의 수준의 상당한 증가를 또한 유도할 수 있었다. 그러나, FS20m-232-91AA/Lob12.3을 투여한 후 Ki67⁺ CD8⁺ 증식 T-세포 수준의 증가는 항-마우스 CD137 mAb 단독, FS20m-232-91AA/4420 모의 mAb² 단독 또는 이들의 조합에 대해 관찰된 것보다 상당히 더 컸다.

[0761] 결론적으로, 이러한 발견은 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 이의 구성 Fcab 및 Fab 요소의 조합, 또는 구성 요소 단독에 비해 Ki67⁺ CD8⁺ 증식 T 세포의 빈도 증가와 관련하여 향상된 말초 약력학적 반응을 유도할 수 있었음

을 입증한다.

[0762] 실시예 19 - CT26 동계 종양 모델에서 OX40/CD137 mAb²의 작용 메카니즘

[0763] CT26 동계 종양 모델을 사용하여 생체내 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 항종양 활성의 작용 메카니즘 (MOA)을 결정하였다. CT26 동계 종양 모델은 OX40 및 CD137 효능제 항체 둘 다에 민감한 것으로 이전에 나타났으며 (Sadun et al., 2008), CT26 종양으로부터 단리된 종양 침윤 림프구 (TIL)는 OX40 및 CD137 둘 다를 발현할 것으로 예상된다. 시험된 항체는 표 30에 상세하게 기술되어 있다.

[0764] 표 30: 사용된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	115	116
G1/OX86	mOX40	없음	hlgG1	아니오	159	156
G1/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	아니오	사우스샘프턴 대학	
G1AA/OX86	mOX40	없음	hlgG1	예	155	156
G1AA/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	예	실시예 9.2에 상기 기술된 생성	
FS20m-232-91/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	아니오		
FS20m-232-91AA/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	예		

[0765]

[0766] LALA 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 mAb² (각각 FS20m-232-91AA/Lob12.3 및 FS20m-232-91/Lob12.3)가 혈액 및 종양에서 T 세포를 활성화시키고 증식을 유도하는 능력을 동형 대조군 mAb G1/4420 (항-FITC), 단일-제제 mAb G1/OX86 (LALA 돌연변이를 갖지 않는 항-OX40 대조군) 또는 G1/Lob12.3 (LALA 돌연변이를 갖지 않는 항-CD137 대조군), G1/OX86 + G1/Lob12.3의 조합, 또는 G1AA/OX86 (LALA 돌연변이를 갖는 항-OX40 mAb) + G1AA/Lob12.3 (LALA 돌연변이를 갖는 항-CD137 mAb)의 조합과 비교하였다.

[0767] 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작 전 일주일 동안 휴식시켰다. 모든 동물은 마이크로 칩을 사용하고 고유 식별자를 제공받았다. 각 코호트는 5마리의 마우스를 가졌다. CT26 결장 암종 세포주 (ATCC, CRL-2638)를 초기에 확장하고, 저장한 다음 IMPACT I 프로토콜을 사용하여 병원체에 대해 IDEXX BioResearch에 의해 사전-스크리닝하였으며 병원체가 없는 것으로 나타났다. CT26 세포 (대략 3×10^6 개)를 -150°C 저장고에서 해동하고 T175 조직 배양 플라스크에서 10% FCS (Gibco, 10270-106)를 갖는 20 ml DMEM (Gibco, 61965-026)에 첨가하였다. 마우스를 이소플루란 (Abbott Laboratories)을 사용하여 마취시켰으며 각 동물은 왼쪽 옆구리에 피하 주사된 1×10^6 개의 세포를 제공받았다. 종양 세포 접종 후 10일째에, 마우스를 건강에 대해 모니터링하고, 종양을 캘리퍼스를 사용하여 측정하고 마우스를 종양 용적에 기준하여 연구 코호트로 무작위화하였다. 이 시점에서 종양을 갖지 않는 마우스는 연구에서 제거하였다.

[0768] 주사된 항체를 주사 24시간 이내에 SEC-HPLC 프로파일링에 의해 분석하고 불순물을 확인하였다. 항체를 PBS에서 0.1 mg/ml의 최종 농도로 희석하고 200 μl /마우스를 주사하여, 20 g 마우스에 대해 1 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 항체를 종양 접종 후 10, 12 및 14일에 복강내 (IP) 주사에 의해 마우스에 투여하였다. 종양 용적 측정은 종양의 가장 긴 축과 가장 짧은 축을 결정하기 위해 캘리퍼스로 일주일에 세 번 수행하였다. 세 번째 투여 후 7일 (종양 접종 후 21일)에 마우스를 안락사시키고, 종양을 절개하여 분리하고, 심장 천자에 의해 혈액을 수집하였다.

[0769] 제조업체의 지침에 따라 종양 분해 키트, 마우스 (Miltenyi 130-096-730)를 사용하여 종양을 분해하였다. 간단히 말해서, 종양 당 2.35 ml RPMI 1640, 100 μl 효소 D, 50 μl 효소 R 및 12.5 μl 효소 A를 첨가하여 효소 혼합물을 제조하고 각 종양을 부드러운 MACS C 튜브에 배치하고 해당 튜브를 Gentle MACS 분해기에 배치하고 m_TDK_1 프로그램을 실행한 다음 37°C 에서 1시간 동안 진탕시키면서 (200rpm) 배양하였다. 생성된 세포 현탁액을 70 μM 세포 여과기 (Corning cat no 352350)를 사용하여 여과하고, 원심분리 (1500rpm에서 10분)하고, PBS에서 1회 세척하고 5 ml PBS에 재현탁시켰다.

[0770] 혈액을 심장 천자에 의해 EDTA 함유 튜브에 수집하였다. 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따

라 적혈구 용해 완충액 (eBioscience cat no 00-4300-54)에서 두 번 용해시켰다.

- [0771] 종양 및 혈액으로부터 분리된 세포를 다음의 항체 패널 및 시약 (염색제 1)을 사용하여 유세포 분석을 위해 염색하였다: CD4-E450 (클론 GK1.1), Ki67-FITC (클론 SolA15), Foxp3-PE (FJK-16s), CD69-PECy5 (클론 H1.2F3), CD3-PECy7 (클론 145-2C11), CD8-APC (클론 53-6.7), 고정 가능한 생존성 염료 780, 및 Fc 블럭 (클론 93), 모두 eBioscience에 의해 공급; 및 CD45-V500 (클론 30-F11), BD Bioscience에 의해 공급. 세포를 PBS에 세척한 다음 100 μ l의 항체 혼합물 1 (Ki67 및 FoxP3 항체를 제외한 모두)과 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척한 다음 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience cat no 00-5523-00)로 투과시켰다. 간단히 말해서, 200 μ l 고정 용액을 각 웰에 첨가하고 4°C의 암흑에서 밤새 방치하였다. 그 후 세포를 200 μ l 투과 완충액에서 세척하였다. 그 후 세포를 다시 회전시키고 Fc 블럭의 존재하에 Ki67 및 Foxp3 항체를 갖는 100 μ l 투과 완충액에 재현탁시키고 (모두 1:100 희석) 4°C의 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 한 번 세척하고 200 μ l PBS에 재현탁시켰다. 그 후 세포를 BD FACS Cantoll 세포분석기에서 분석하였다.
- [0772] 데이터는 FlowJoX, Excel 및 GraphPad Prism으로 분석하였다. 그룹을 비교하기 위한 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지를 사용한 모든 쌍의 일원 ANOVA에 이은 Tukey의 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였다.
- [0773] OX40/CD137 mAb² 또는 대조군으로의 처리 후 CT26 세포를 접종받은 마우스의 혈액 또는 종양에서 T 세포 (CD45+CD3+), 증식 T 세포 (CD45+ CD3+ Ki67+) 및 T 조절 세포 (CD45+ CD3+ CD4+ FoxP3+)의 빈도를 결정하였다. FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²는 동형 대조군 (G1/4420)에 비해 증식 T 세포의 통계적으로 유의한 증가 뿐만 아니라 혈중 Treg의 증가를 나타내었다. 종양에서 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²가 T 세포의 빈도를 증가시키는 경향이 있었다.
- [0774] 동형 대조군으로의 처리에 비해 항-CD137 항체 G1/Lob12.3 및 이러한 항-CD137 항체와 항-OX40 항체 G1/OX86의 조합으로 처리된 마우스의 종양에서 Treg 수준이 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그러나, LALA-돌연변이가 항-OX40 및 항-CD137 항체에 도입되었을 때, 이들 항체의 조합 (G1AA/OX86 + G1AA/Lob12.3)으로의 처리가 종양에서 Treg의 수준을 더 이상 감소시키지 못했다. LALA 돌연변이를 함유하는 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)는 Treg의 수준을 감소시키지 않았지만 LALA 돌연변이가 없는 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91/Lob12.3)의 야생형 인간 IgG1 버전은 종양에서 Treg의 수준의 통계적으로 유의한 감소를 보였다.
- [0775] 이러한 데이터는 인간 IgG1에의 LALA 돌연변이의 도입은 Tregs를 고갈시키는 OX40/CD137 mAb²의 능력을 폐지하고, 따라서 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)의 인간 IgG1 LALA 변이체로 관찰된 항종양 활성은 Treg 고갈과 무관하다는 것을 입증한다. 게다가, FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²는 평가된 시점에서 말초에 T 세포 증식을 유도하는 것으로 관찰되었으며, 항종양 면역 반응을 유도하는 T 세포 풀을 확장시킬 것으로 예상된다. 이러한 데이터는 인간 IgG1 LALA-함유 OX40/CD137 mAb²가 종양에서 만연할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 mAb²와 Fc γ 와의 관여의 부재하에 암에서 항-종양 활성화에 대한 가능성을 가짐을 시사한다.
- [0776] 실시예 20 - B16-F10 동계 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 활성화
- [0777] B16-F10 동계 종양 모델을 사용하여 생체내에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)의 항종양 활성을 시험하였다. 항체 G1/4420을 연구에서 대조군으로서 사용하였다. B16-F10 동계 종양 모델은 OX40 또는 CD137 효능제 항체에 민감한 것으로 이전에 나타났다 (Hirschhorn-Cymerman et al., 2009; Wilcox et al., 2002). 그러나, B16-F10 종양으로부터 분리된 종양 침윤 림프구 (TIL)는 OX40 및 CD137 둘 다를 발현할 것으로 예상된다.
- [0778] 대략 20 g 체중의 8-10주령의 C57BL/6 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작 전 1주일 동안 적응시켰다. 모든 동물은 마이크로 칩을 사용하고 고유 식별자를 제공받았다. 각 코호트는 10마리의 마우스를 가졌다. B16-F10 결장 암종 세포주 (ATCC cat. no. CRL-6475)를 초기에 확장하고, 저장한 다음 IMPACT I 프로토콜을 사용하여 병원체에 대해 IDEXX BioResearch에 의해 사전-스크리닝하였으며 병원체가 없는 것으로 나타났다.
- [0779] B16-F10 세포를 -150°C 저장고에서 해동하고 T175 조직 배양 플라스크에서 10% FCS (Gibco, 10270-106)를 갖는

20 ml DMEM (Gibco, 61965-026)에 첨가하였다. 각 동물은 왼쪽 옆구리에 피하 주사된 1×10^6 개의 세포를 제공 받았다. 종양 세포 접종 후 7-8일째에, 이 시점에서 종양을 갖지 않는 마우스는 연구에서 제거하였다. 항체를 200 μ l/마우스의 용적으로 PBS 중의 0.1 mg/ml의 최종 농도로 주사하기 전에 이전에 기술된 바와 같이 분석하고 불순물을 확인하여 20 g 마우스에 대해 1 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 각 마우스는 종양 접종 후 8, 10 및 12일에 복강내 (IP) 주사에 의해 항체를 제공받았다. 캘리퍼스 (실시예 17에 기술된 바와 같음)를 사용하여 측정함으로써 종양 용적을 결정하고 해당 일에 예정된 임의의 투여를 수행하였다.

[0780] 종양 용적 및 상태에 따라 인도적 종점에 도달했을 때 마우스를 희생시켰다. 종양 성장의 통계 분석은 실시예 17에 기술된 혼합 모델 통계 분석을 사용하여 수행하였다. 연구 결과는 도 11에 나타내어져 있다.

[0781] OX40/CD137 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)는 대조군 항체 (G1/4420)로 주사된 대조군 동물에 비해 유의적인 항 종양 활성을 보였다. 이 모델은 이전에 OX40 또는 CD137 자극에 둔감한 것으로 나타났기 때문에 이것은 놀랍다 (Hirschhorn-Cymerman et al., 2009; Wilcox et al., 2002). 중요한 것은, OX40/CD137 mAb²에 대해 관찰된 활성이 LALA 돌연변이의 존재하에서 있었으며 따라서 종양 Treg 고갈에 의존하지 않았다는 것이다. 이것은 OX40/CD137 mAb²의 MOA가 다양한 동계 종양 모델, 심지어 B16-F10과 같이 면역 침윤물 수준이 보다 낮은 모델에서도 항종양 활성을 초래한다는 것을 나타낸다.

[0782] 실시예 21 - OX40/CD137 mAb²의 분석적 특성화 및 예비 안정성 평가

[0783] 21.1 mAb²의 발현, 정제 및 분석적 특성화

[0784] mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14를 실험실 규모로 생산하고, SE-HPLC 및 SDS-PAGE를 사용하는 표준 분석 방법에 의해 특성화하였다.

[0785] mAb²를 암호화하는 DNA 서열을 HEK293-6E (National Research Council Canada)에서 일시적으로 발현시켰다. 5 일 후, 세포 배양액을 수확하고 AKTExpress 기기를 사용하여 MabSelect 단백질-A 사전-패키징된 컬럼 (모두 GE Healthcare)에서 정제하였다. 컬럼의 평형화를 50mM Tris-HCl, 250mM NaCl pH 7.0에서 수행한 다음 수확된 세포 배양액을 부하하였다. 그 후 수지를 pH 7.0에서 50mM Tris-HCl, 250mM NaCl을 사용하여 세척한 다음 3.5의 pH에서 완충액을 사용하여 mAb²를 용출시켰다. mAb²를 PD-10 탈염 컬럼을 사용하여 사전-제형화 완충액으로 완충액 교체하였다 (GE Healthcare, product no. 17085101).

[0786] 20 mM 인산나트륨, 200 mM 염화나트륨, pH 6.8을 이동상으로 사용하여 TSK-GEL SUPERSW3000 4.6 mm ID x 30.0 cm 컬럼 (Tosoh Bioscience)이 장착된 Agilent 1100 Series HPLC 시스템 (Agilent)에서 SE-HPLC를 수행하였다. Chemstation 소프트웨어 (Agilent)를 사용하여 단량체 백분율의 정량화를 수행하였다. SE-HPLC 분석의 결과는 표 31에 요약되어 있다.

[0787] 표 31. SE-HPLC에 의한 분석적 특성화

mAb ²	SE-HPLC에 의한 단량체 %
FS20-22-49AA/FS30-5-37	98.4%
FS20-22-49AA/FS30-10-3	97.4%
FS20-22-49AA/FS30-10-12	95.9%
FS20-22-49AA/FS30-10-16	97.5%
FS20-22-49AA/FS30-35-14	97.3%

[0788]

[0789] SDS-PAGE 분석은 필수적으로 제조업체의 지침에 따라 NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris 단백질 겔 및 1 x MOPS 분리 완충액 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 수행하였다. 비-환원 SDS-PAGE를 위해, 샘플을 변성 단계 이전에 알킬화제, N-에틸말레이미드 (Sigma-Aldrich) 시약에 노출시켰으며, 변성 혼합물에서 2-머캅토에탄올을 생략하였다. 단백질 밴드는 Coomassie InstantBlue (Expedeon)에 의해 시각화하였다.

[0790] 모든 5개의 mAb²는 SE-HPLC에 의해 측정했을 때 95% 이상의 단량체 순도를 갖는 단백질 A 정제 후 유리한 분석

적 특성화 매개변수를 나타냈다. SDS-PAGE 분석은 재조합 IgG1에 전형적인 단백질 밴드 패턴을 나타냈다. 따라서, 비-환원 조건하에서는 단일 밴드가 예상 분자량에 해당하는 영역으로 이동하고, 환원 조건에서는 두 밴드가 각각 중쇄 및 경쇄에 해당하는 51 kDa 및 28 kDa 분자량 마커에 가깝게 이동하였다. 단편화는 관찰되지 않았다 (데이터는 표시되지 않음).

21.2 OX40/CD137 mAb²의 예비 안정성 평가

mAb² FS20-22-49AA/FS30-5-37, FS20-22-49AA/FS30-10-3, FS20-22-49AA/FS30-10-12, FS20-22-49AA/FS30-10-16 및 FS20-22-49AA/FS30-35-14의 안정성의 예비 평가를 수행하였다. 예비 안정성 평가에 들어가기 전에, mAb²를 사전-제형화 완충액으로 평형화된 Superdex HiLoad 26/600 200 pg 컬럼 (GE Healthcare)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 추가로 정제하였다. 안정성 샘플을 5°C에서 저장하고 2주 및 4주 후 SE-HPLC 및 모세관 전기영동 나트륨 도데실 설페이트 (CE-SDS)를 사용한 표준 분석 방법에 의해 분석하였다.

20 mM 인산나트륨, 200 mM 염화나트륨, pH 6.8을 이동상으로 사용하여 TSK-GEL SUPERSW3000 4.6 mm ID x 30.0 cm 컬럼 (Tosoh Bioscience)이 장착된 Agilent 1100 Series HPLC 시스템 (Agilent)에서 SE-HPLC를 수행하였다. 데이터 획득 및 단량체 함량의 정량은 Chemstation 소프트웨어 (Agilent)를 사용하여 수행하였다. 결과는 표 32에 요약되어 있다.

5°C에서 4주간 저장한 후, 시험된 모든 mAb²에 대해 SE-HPLC에 의해 결정된 바와 같은 단량체 함량은 출발 물질 (T=0)과 비슷하게 ($\pm 0.9\%$ 이내) 유지되었다. 따라서, 시험된 모든 mAb²는 유리한 안정성 프로파일을 나타냈다.

표 32: SE-HPLC에 의한 안정성 분석

mAb ²	% 단량체 T=0	% 단량체 T= 5°C에서 2주	% 단량체 T= 5°C에서 4주
FS20-22-49AA/ FS30-5-37	100.0	99.2	99.1
FS20-22-49AA/FS30-10-3	100.0	100.0	99.9
FS20-22-49AA/FS30-10-12	100.0	100.0	100.0
FS20-22-49AA/FS30-10-16	100.0	100.0	100.0
FS20-22-49AA/FS30-35-14	99.5	99.2	99.3

CE-SDS 분석은 제조업체의 권장사항에 따라 2100 Bioanalyzer 모세관 전기영동 시스템 (Agilent)에서 수행하였다. 환원 CE-SDS를 위해, DTT를 첨가하고 샘플을 70°C에서 5분간 변성시켰다. 중쇄 및 경쇄 물질의 데이터 획득 및 백분율 정량화는 2100 Expert 소프트웨어 (Agilent)를 사용하여 수행하였다. 순도 백분율은 중쇄 물질의 백분율과 경쇄 물질의 백분율의 합으로 계산되었다. 분석 결과는 표 33에 요약되어 있다.

환원 조건하에서 CE-SDS에 의한 중쇄 물질과 경쇄 물질의 백분율의 합으로서 결정된 시험된 모든 mAb²의 순도는 출발 물질과 비슷하게 ($\pm 1.0\%$ 이내) 유지되었다. 따라서, 다시, 시험된 모든 mAb²는 유리한 안정성을 나타내었다.

표 33. CE-SDS에 의한 안정성 분석

mAb ²	% 순도 T=0	% 순도 T=5°C에서 2주	% 순도 T= 5°C에서 4주
FS20-22-49AA/ FS30-5-37	99.6	99.7	99.1
FS20-22-49AA/FS30-10-3	99.5	99.6	99.5
FS20-22-49AA/FS30-10-12	98.8	99.2	99.5
FS20-22-49AA/FS30-10-16	99.5	99.1	98.5
FS20-22-49AA/FS30-35-14	99.6	99.0	100.0

실시예 22 - 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 조합한 OX40/CD137 mAb²의 활성

항원 제시 세포 (예를 들어 수지상 세포, 대식세포, B 세포), 종양 세포 및 종양 미세 환경의 세포에서의 PD-L1 발현은 PD-1 상호작용을 통해 T 세포의 활성화, 증식, 및 효과기 및 세포독성 기능을 억제하는 것으로 알려져

있다. PD-1 또는 PD-L1에 대한 단클론 항체를 사용하여 이러한 상호작용을 차단하면 여러 유형의 암을 가진 환자에서 증가된 생존율을 초래하는 것으로 나타났다.

[0804] 그러나, 일부 종양에서, 항-PD-L1 및 항-PD-1 항체는 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는다. 본 발명자들은 OX40/CD137 mAb²와 항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체의 조합을 시험관내 및 생체내 연구에서 시험하여 조합의 사용이 OX40/CD137 mAb², 항-PD-L1 항체 또는 항-PD-1 항체 단독 사용과 비교하여 개선된 효과를 초래할 수 있는지를 알아보았다.

[0805] 22.1 포도상 구균 장독소 A (SEA) 분석에서 PD-1 또는 PD-L1 차단제와 조합된 OX40/CD137 mAb²의 활성화

[0806] OX40/CD137 mAb²의 활성을 상기 실시예 12에 기술된 바와 같이 첫 번째 신호로서 포도상 구균 장독소 A (SEA) 초항원을 사용하여 T 세포 활성화 분석에서 시험하였다. PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용의 차단과 조합하여 T 세포 자극 활성화에 대한 OX40/CD137 mAb²의 효과를 시험하기 위해, SEA 분석에서 PD-1 또는 PD-L1 차단 항체를 OX40/CD137 mAb²와 조합하였다.

[0807] SEA 분석에서 사용된 항체 및 mAb²가 아래 표 34에 열거되어 있다. G1/4420 (항-FITC)을 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²와 조합하여, G1AA/S1 (항-PD-L1), G1AA/5C4 (항-PD-1)을 단독으로 또는 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²와 조합하여 시험하였다. 인터류킨-2 (IL-2) 생산을 T 세포 활성화의 척도로서 사용하였다.

[0808] 표 34: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab결합	Fcab결합	동형	LALA 돌연변이	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	115	116
FS20-22-49AA/FS30-10-16	hCD137	hOX40	hlgG1	예	95	14
G1AA/S1	PD-L1	없음	hlgG1	예	162	163
G1AA/5C4	PD-1	없음	hlgG1	예	160	161

[0809]

[0810] 5C4 및 YW243.55.S1 (S1) 항체의 가변 도메인 서열은 또한 각각 미국 제8,008,449 B2호 및 미국 제 2013/0045202 A1호에 개시되어 있다.

[0811] PBMC를 단리하고 SEA 분석을 본질적으로 상기 실시예 12.1에 기술된 바와 같이 수행하였다. G1/4420을 동형 대조군으로서 사용하였으며 가교결합제는 이 분석에 사용하지 않았다.

[0812] 항-PD-L1 (G1AA/S1) 또는 항-PD-1 항체 (G1AA/5C4)와 조합된 OX40/CD137 mAb² (FS20-22-49AA/FS30-10-16)의 활성을 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² + 동형 대조군 (G1/4420)의 활성화 또는 PD-L1 항체 (G1AA/S1), 또는 PD-1 항체 (G1AA/5C4), 또는 동형 대조군 (G1/4420) 단독의 활성화와 비교하였다. SEA 분석에서 관찰된 IL-2 방출의 EC₅₀ 값 및 최대 반응은 표 35에 나타내어져 있다. 도 12a 및 b는 SEA 분석에 대한 IL-2 방출의 플롯을 보여준다.

[0813] 표 35: PD-1 또는 PD-L1 사이의 상호작용을 차단하는 항체와 조합하여 OX40 및 CD137을 표적으로 하는 mAb²를 사용한 SEA 분석

mAbs/mAb ²	EC ₅₀ (nM)		최대 반응	
	(nM)	95% Conf. Int.	(hIL-2 pg/ml)	95% Conf. Int.
G1/4420	NAD	NAD	NAD	NAD
FS20-22-49AA/FS30-10-16 + G1/4420	0.1483	0.04556 to 0.4517	2741	2394 to 3103
G1AA/5C4	NAD	NAD	NAD	NAD
G1AA/S1	NAD	NAD	NAD	NAD
FS20-22-49AA/FS30-10-16 + G1AA/5C4	0.5939	0.1964 to 1.732	5326	4599 to 6116
FS20-22-49AA/FS30-10-16 + G1AA/S1	0.2399	0.1478 to 0.3970	5325	5022 to 5640

NAD = 검출된 활성 없음

예상대로, 동형 대조군 (G1/4420)에서는 활성이 관찰되지 않았다. 마찬가지로, PD-1과 PD-L1 단독 사이의 상호 작용 차단은 이 분석에서 활성을 갖지 않았다. 그러나, OX40 및 CD137 수용체의 자극 (OX40/CD137 mAb²에 의한)과 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용의 차단 (항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체에 의한)의 조합은 최대 IL-2 생산에 의해 측정되는 바와 같은 T 세포의 최대 활성을 OX40/CD137 mAb² 단독에서 보여지는 것 이상으로 증가시켰다. OX40/CD137 mAb²가 항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체와 조합되었을 때 보여지는 T 세포의 최대 활성의 증가는 유사하였다.

22.2 CT26 마우스 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb² 및 PD-1 길항제의 투여의 항종양 활성 및 약력학적 반응

CT26 마우스 종양 모델을 사용하여 단일 제제에 비해 FS20m-232-91AA/Lob12.3과 PD-1 길항제 항체 (클론 RMP1-14 마우스 IgG1)의 조합의 항종양 활성 및 약력학적 반응을 확립하였다.

22.2.1 항종양 활성의 평가

실시예 17에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작을 위해 준비하고 CT26 결장 암종 세포주를 접종하였다. 종양 세포 접종 후 10일째에, 종양을 측정하고, 종양을 갖지 않는 마우스는 연구에서 제거하고, 남은 마우스를 그룹당 15마리 동물로 하여 4개의 처리군 (표 36)으로 무작위화하였다. 동물에게 PBS에서 다음을 복강내 주사하였다: (1) 1 mg/kg의 G1AA/4420 및 10 mg/kg의 mIgG1/4420 동형 (Absolute Antibodies, 클론 4420, Catalogue number Ab00102-1.1) 대조 항체의 조합, (2) 10 mg/kg의 항-마우스 PD-1 항체 (Absolute Antibodies, 클론 RMP1-14 마우스 IgG1, Catalogue number Ab00813-1.1), (3) 1 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb², 또는 (4) 10 mg/kg 항-마우스 PD-1 항체 및 1 mg/kg FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb². 동물은 종양 접종 후 10일째에 시작하여 총 3회 용량에 대해 2일마다 1회 G1AA/4420 또는 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 복강내 (IP) 주사를 받았다. mIgG1/4420 또는 항-마우스 PD-1 항체를 종양 접종 후 10일째에 시작하여 총 4회 용량에 대해 4일마다 1회 투여하였다. 종양 용적은 캘리퍼 측정에 의해 결정하였다 (실시예 17에 기술된 바와 같음). 연구는 종양 세포 접종 후 60일에 종료하였으며, 종양 용적 및 상태에 기반하여 인도적 종점에 도달했을 때 동물은 연구를 중단하였다. 처리군, 시험된 분자, 투여량 및 투여 일정은 표 36에 요약되어 있다.

표 36. 시험된 처리군 및 분자의 요약

그룹	그룹명	투여된 mAb 및/또는 mAb ²	용량 (mg/kg)	투여 일정
1	동형 대조군	G1AA/4420, mIgG1/4420	1, 10	Q2D, Q4D
2	항-PD-1	항-마우스 PD-1 mIgG1 (RMP1-14)	10	Q4D
3	FS20m-232-91AA/Lob12.3	FS20m-232-91AA/Lob12.3	1	Q2D
4	FS20m-232-91AA/Lob12.3 + 항-PD-1	FS20m-232-91AA/Lob12.3, 항-마우스 PD-1 mIgG1	1, 10	Q2D, Q4D

- [0823] 도 13a-d에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 길항제 항체와 1 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 조합은 연구 종료 시 완전한 종양 퇴행 반응 ($\leq 62.5 \text{ mm}^3$ 의 종양 용적으로서 정의됨)을 갖는 동물이 15마리 중 7마리 (47%)로 가장 높은 비율을 야기하였다 (도 13d). 동형 대조군 항체 (도 13a), 단일 제제 항-PD-1 항체 (도 13b), 및 1 mg/kg FS20m-232-91AA/Lob12.3 (도 13c)은 연구의 말기에 각각 0%, 0% 및 7% 종양 퇴행을 보였다.
- [0824] 생존 분석은 FS20m-232-91AA/Lob12.3과 항-PD-1 항체의 조합이 동형 대조군 항체에 비해 통계적으로 유의한 생존 이득을 초래함을 나타내었다 (로그-순위 (Mantel Cox) 검정, $p < 0.0001$) (도 13e). 동형 대조군 항체와 비교하여 단일 제제 처리 간에 유의한 생존 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 이 모델에서 길항제를 사용한 PD-1/PD-L1 억제 경로의 차단 및 항-OX40/CD137 mAb²를 사용한 OX40 및 CD137의 이중 효능작용이 단일 제제에 비해 항-종양 활성을 증가시키고 생존 이득을 제공할 수 있었음을 입증한다.
- [0825] 22.2.2 말초 약력학적 반응의 평가
- [0826] 실시예 22.2.1에 기술된 연구에서, 항-PD-1 길항제가 FS20m-232-91AA/Lob12.3에 대한 약력학적 반응을 조절하는 능력을 또한 실험하고 단일-제제 처리와 비교하였다. 투여 개시 후 6일 (종양 세포 접종 후 16일)에, 혈액을 처리군 1, 2, 3 및 5로부터의 무작위로 선택된 6마리의 CT26 종양-보유 마우스의 꼬리 정맥으로부터 EDTA-함유 튜브로 수집하였다 (표 36). 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 용해 완충액 (Miltenyi Biotech, #130-094-183)에서 2회 용해시켰다. 세포를 Fc 블럭 (eBioscience cat no 14-0161-86, 1:50으로)의 존재하에 시약 CD4-BUV395 (클론 RM4-5), CD8-BUV737 (클론 53-6.7), CD44-BV510 (클론 IM7), 및 CD3e-BV786 (클론 145-2C11), 모두 BD Bioscience에 의해 공급; CD69-FITC (클론 H1.2F3), NKp46-PE (클론 29A1.4), PD-1-APC (클론 J43), CD45-Alexa700 (클론 30-F11), 및 고정 가능한 생존성 염료 780, 모두 eBioscience에 의해 공급; 및 Biolegend에 의해 공급된 CD62L-BV421 (클론 MEL-14)로 4°C에서 30분 동안 유세포 분석을 위해 염색하였다. 그 후 세포를 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience cat no 00-5523-00)로 밤새 투과시켰다. 세포를 Ki67 및 Foxp3 항체 (Ki67-PE-Cy7 (클론 SolA15) 및 Foxp3-PerCP-Cy5.5 (클론 FJK-16s), 둘 다 eBioscience에 의해 공급)를 갖는 100 μl 투과 완충액에 재현탁시키고 암흑에서 실온에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 2회 세척하고 PBS + 0.5% BSA에 재현탁시켰다. 그 후 세포를 BD Fortessa 유세포 분석기로 분석하였다. 데이터 분석은 FlowJo, Excel 및 Graph Pad Prism 7 소프트웨어로 수행하였다.
- [0827] 증식 Ki67+ CD4+ T-세포 (총 CD45+ CD3+ CD4+), Ki67+ CD8+ T-세포 (총 CD45+ CD3+ CD8+) 및 Ki67+ NKp46+ NK 세포 (총 CD45+ CD3-NKp46+)의 빈도를 상기한 바와 같이 유세포 분석법에 의해 결정하였다. 동형 대조군에 비해, FS20m-232-91AA/Lob12.3은 이전 결과를 확인시켜주는 (실시예 18) 증식 Ki67+ CD4+ 및 Ki67+ CD8+ T-세포, 및 증식 Ki67+ NK 세포의 통계적으로 유의한 증가를 유도하였다 (쌍대 비교 Mann-Whitney 비모수 검정; 세 가지 면역 세포 집단 모두에 대해 $p \leq 0.005$). 단일 제제 항-PD-1 길항제 항체는 동형 대조군에 비해 세 가지 면역 세포 집단에 대해 주목할 만한 효과를 가지지 않았다. 1 mg/kg FS20m-232-91AA/Lob12.3와 항-PD-1 항체의 조합은 단일 제제 또는 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 보다 높은 수준의 증식 Ki67+ CD4+ T-세포, Ki67+ CD8+ T-세포 및 Ki67+ NKp46+ NK 세포를 초래하였다 ($p \leq 0.05$ 인 FS20m-232-91AA/Lob12.3 단독과 비교하여 증식 Ki67+ CD4+ T-세포 수준에 대한 조합의 효과를 제외하고는 모든 통계적으로 유의한 비교에 대해 $p \leq 0.005$).
- [0828] 말초 혈액 PD-1 발현 T-세포 (CD4+ 및 CD8+ T 세포) 및 NK 세포에 대한 단일 제제 항-PD-1 항체, mAb² FS20m-232-91AA/Lob12.3, 및 항-PD-1 항체와 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 조합의 효과를 또한 상기한 바와 같이 유세포 분석법에 의해 결정하였다. 단일 제제 항-PD-1 항체 및 FS20m-232-91 AA/Lob12.3은 항-PD-1 단독에 비해 FS20m-232-91AA/Lob12.3 처리 후 PD-1+ 세포의 보다 더 높은 빈도 중간값으로 동형 대조군에 비해 PD-1-발현 CD4+ 및 CD8+ T-세포의 비율을 증가시켰다. FS20m-232-91AA/Lob12.3 단독은 동형 대조군에 비해 PD-1+ NK 세포의 빈도를 증가시켰다. 조합은 단일 제제 또는 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 보다 높은 수준의 PD-1-발현 CD4+ 및 CD8+ T-세포(NK 세포는 제외)를 초래하였다 (쌍별 비교 Mann-Whitney 비모수 검정; $p \leq 0.05$ 인 FS20m-232-91AA/Lob12.3 단독과 비교하여 PD-1-발현 CD4+ T 세포의 빈도에 대한 조합의 효과를 제외하고는 모든 통계적으로 유의한 비교에 대해 $p \leq 0.005$).
- [0829] 항종양 활성의 평가로부터의 결과와 일치하게, 길항제를 사용한 PD-1/PD-L1 억제 경로의 동시 차단 및 항-OX40/CD137 mAb²를 사용한 OX40 및 CD137의 이중 효능작용은 증식 T 세포 및 NK 세포의 약동학적 조절을 향상시

켜 항종양 면역을 유도하기 위해 조합 접근법을 활용하는 것을 지원한다.

[0830] 결론적으로, PD-1/PD-L1 축을 차단하면서 또한 OX40 및 CD137을 효능화하는 것은 PD-1/PD-L1 단독 차단을 능가하는 증가된 효과를 초래한다. 특히, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 항-OX40/CD137 mAb²의 조합은 항체 중 하나 단독의 반응을 능가하는 개선된 효과를 초래하였다. **실시예 22.1**에 기술된 SEA 분석에서, 시험된 항-PD-1 또는 PD-L1 항체 중 어느 것도 0.1474 nM의 EC₅₀을 갖는 항-OX40/CD137 mAb²에 비해 활성을 갖지 않았다. 그러나, 항-OX40/CD137 mAb²를 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체와 조합하여 시험하였을 때, EC₅₀ 값은 각각 0.2373 nM 및 0.5961 nM이었다. 게다가, 조합에 의해 생산된 IL-2의 최대 반응은 항-OX40/CD137 mAb² 단독의 두 배 이상이었다. 이러한 시험관내 데이터는 항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체로 활성이 관찰되지 않는 시스템에서 이들 항체 중 어느 하나를 항-OX40/CD137 mAb²와 조합하면 활성이 크게 개선된다는 것을 입증한다.

[0831] 이러한 시험관내 활성은 **실시예 22.2**에 기술된 바와 같이 CT26 종양 모델에서 단독 또는 항-PD-1 항체와 조합한 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 생체내 시험에 의해 추가로 뒷받침되었다. 이러한 연구의 결과는 OX40/CD137 mAb² 또는 항-PD-1 항체 단독 (종양이 없는 동물이 없는 경우)와 비교하여 항-PD-1 항체와 OX40/CD137 mAb²의 조합으로 처리된 그룹으로부터의 연구 말기에 더 많은 수의 동물이 종양이 없음을 보여주었다. 또한, 통계적으로 유의한 생존 이득이 또한 관찰되었고 (**도 13e**) 증식 T 세포 및 NK 세포의 약력학적 조절은 mAb² 또는 항-PD-1 항체 단독에 비해 조합으로의 처리에 의해 향상되었다.

[0832] 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체에 대한 시험관내 또는 생체내 연구에서 활성이 관찰되지 않았지만 OX40/CD137 mAb²를 투여했을 때 유의적인 개선이 관찰되었기 때문에, 이것은 이러한 항체와 조합된 OX40/CD137 mAb²가 향상된 항종양 효능을 초래할 뿐만 아니라 이러한 조합이 반응하지 않거나, 예를 들면 불응성이거나 저항성이거나 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체 단일요법 후 재발된 종양의 치료에 적합할 수 있다는 것을 나타낼 수 있다.

[0833] 실시예 23 - CT26 동계 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 용량-의존적 항종양 활성 및 CT26 종양 세포를 사용한 재유발시험에 대한 보호 면역 기억의 확립

[0834] CT26 동계 마우스 결직장 종양 모델에서 OX40/CD137 대리 mAb²의 용량과 항종양 활성 사이의 관계를 평가하기 위해 0.1 내지 10 mg/kg의 5가지 상이한 용량 수준을 평가하였다.

[0835] 실시예 17에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)에게 각 동물의 왼쪽 옆구리에 CT26 결장 암종 세포를 피하 주사하였다. 종양 세포 접종 후 10일에, 종양을 측정하고 종양이 확립되지 않은 동물은 연구에서 제거하였다. 남은 마우스를 그룹당 25마리 동물로 하여 6개의 처리군으로 무작위화하였다.

[0836] 동형 대조군 항체 (G1AA/4420) 및 OX40/CD137 대리 mAb² (FS20m-232-91 AA/Lob12.3)를 주사 전에 여과하고 PBS에 희석한다. 각 동물에게 투여당 200 μ l 용적의 희석된 항체를 복강내 투여하여, 20 g 마우스에 대해 투여당 10 mg/kg의 G1AA/4420 또는 0.1, 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 최종 용량을 제공하였다. 주사는 종양 접종 후 10일에 시작하여 총 3회 용량에 대해 2일에 한 번 (Q2D) 수행하였다. 종양 용적은 **실시예 17**에 기술된 바와 같이 캘리퍼 측정에 의해 결정하였다. 연구는 세포 접종 후 67일에 종료하였으며, 종양 용적 및 상태를 기반으로 인도적 종점에 도달했을 때 동물은 연구를 중단하였다.

[0837] 상이한 용량 수준의 G1AA/4420 또는 FS20m-232-91 AA/Lob12.3로 처리된 개별 동물에 대한 시간 경과에 따른 종양 용적이 **도 14a**에 도시되어 있다. 0.3, 1, 3 또는 10 mg/kg 용량 수준의 FS20m-232-91AA/Lob12.3은 각각 그룹당 동물의 4% (1/25), 4% (1/25), 8% (2/25) 및 4% (1/25)에서 완전한 종양 퇴행 (60일째에 $\leq 62.5 \text{ mm}^3$ 으로 정의됨)을 야기하였다. 동형 대조군 및 0.1 mg/kg 대리 mAb² 그룹의 동물 중 어느 것도 완전한 종양 퇴행을 경험하지 못했다.

[0838] FS20m-232-91AA/Lob12.3- 및 G1AA/4420-처리된 그룹 간의 평균 종양 성장물의 쌍별 비교는 **실시예 17**에 기술된 바와 같이 혼합 모델 통계학적 분석을 사용하여 수행하였으며, 동형 대조군과 비교했을 때 시험된 모든 용량 수준 (0.1, 0.3, 1, 3 및 10 mg/kg)에 걸쳐 통계적으로 유의한 차이 ($p < 0.01$)가 관찰되었다 (**표 37**). FS20m-

232-91AA/Lob12.3은 0.1 내지 3 mg/kg으로 투여했을 때 용량-의존적 방식으로 평균 종양 성장률 (TGR)을 감소시켰다 (각각 0.255529 내지 0.156767의 평균 로그 (TGR)). 3 mg/kg FS20m-232-91AA/Lob12.3에 대한 평균 TGR은 1 mg/kg 용량 수준에 대한 것과 통계적으로 차이가 없었다 ($p = 0.18$). 그러나, 용량 수준을 10 mg/kg로 증가시키면 3 mg/kg 용량 그룹에 비해 더 빠른 TGR을 야기하였다 ($p < 0.001$).

표 37: 혼합 모델 통계학적 분석을 사용한 평균 CT26 종양 성장률의 쌍별 비교

A vs. B 쌍별 비교		평균 Log (TGR) [하위, 상위 CI]		P-값	비교	A > 또는 ≈ 또는 < B (평균 Log(TGR))
A	B	A	B			
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3 0.1 mg/kg	0.314856 [0.288207, 0.339504]	0.255529 [0.227356, 0.283703]	3.63E-04	****	A > B
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3 0.3 mg/kg	0.313856 [0.288207, 0.339504]	0.252407 [0.215534, 0.289281]	2.24E-07	****	A > B
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3 1 mg/kg	0.313856 [0.288207, 0.339504]	0.219461 [0.186503, 0.252419]	1.94E-07	****	A > B
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3 3 mg/kg	0.313856 [0.288207, 0.339504]	0.156767 [0.120418, 0.193116]	2.23E-14	****	A > B
동형 대조군	FS20m-232-91AA/Lob12.3 10 mg/kg	0.313856 [0.288207, 0.339504]	0.197003 [0.155898, 0.238107]	7.50E-21	****	A > B
FS20m-232-91AA/Lob12.3 1 mg/kg	FS20m-232-91AA/Lob12.3 3 mg/kg	0.219461 [0.186503, 0.252419]	0.156767 [0.120418, 0.193116]	1.83E-01	ns	A ≈ B
FS20m-232-91AA/Lob12.3 3 mg/kg	FS20m-232-91AA/Lob12.3 10 mg/kg	0.156767 [0.120418, 0.193116]	0.197003 [0.155898, 0.238107]	4.72E-07	****	A < B

약어: ns = 통계적으로 유의하지 않음; TGR = 종양 성장률

주의: 각각의 쌍별 비교를 위해, p-값을 계산하는데 관련되는 그룹들 중의 적어도 하나는 50% 이상의 유의하게 비로그 정규 분포된 종양성장률을 포함한다

생존 분석은 모든 용량 수준에서 시험된 FS20m-232-91AA/Lob12.3이 로그-순위 (Mantel-Cox) 검정을 사용하여 동형 대조군에 비해 통계적으로 유의한 생존 이득을 초래하였음을 보여주었다 (도 14b). 1 mg/kg과 3 mg/kg 그룹의 비교는 생존에 있어서 통계적 차이를 보이지 않았다.

결론적으로, 도 14a, b 및 표 37에 나타난 종양 용적 및 생존 데이터는 OX40/CD137 대리 mAb²가 CT26 마우스 종양 모델에서 생체내 항종양 활성을 유도할 수 있다는 실시예 17의 발견을 뒷받침한다. 게다가, 관찰된 항종양 활성은 0.1 mg/kg에서 1 mg/kg까지 용량-의존적으로 증가하였으며 시험된 보다 높은 용량 수준 (3 mg/kg 및 10 mg/kg)에서 유지되었다.

OX40/CD137 대리 mAb²가 CT26 종양 세포에 대해 보호 면역 기억을 유도할 수 있는지 시험하기 위해, 상기한 본 실시예의 용량-범위 연구로부터 완전한 종양 퇴행을 경험한 동물 (완전 반응자)에게 첫 번째 세포 접종 후 84일에 1×10^5 개 CT26 세포를 피하에 재접종하였다. 처리-경험이 없는 비-종양 보유 BALB/c 마우스에게도 대조군으로서 CT26 세포를 접종하였다. 종양 용적을 상기한 바와 같이 모니터링하였다. 이 연구는 첫 번째 세포 접종 후 137일에 종료하였으며, 종양 용적 및 상태에 기반하여 인도적 종점에 도달했을 때 동물은 연구를 중단하였다. 연구의 말기에, 대조군의 마우스의 0% (0/4)가 생존한 것과는 달리 완전 반응자 동물의 100% (4/4)가 생존하였다. 이러한 결과는 마우스의 하위집합에서 OX40/CD137 대리 mAb²가 완전한 종양 퇴행 및 CT26 세포를 사용한 재유발시험에 대한 보호 면역 기억의 확립을 유도할 수 있음을 보여준다.

- [0846] 실시예 24 - CT26 마우스 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 용량-의존적 약력학적 반응
- [0847] OX40/CD137 대리 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)의 용량 수준, 투여 빈도 및 말초 약력학적 반응 간의 관계를 CT26 동계 마우스 결장직 종양 모델을 사용하여 평가하였다. 1, 3, 10 또는 30 mg/kg의 상이한 용량 수준에서의 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 단일 복강내 (i.p.) 주사, 또는 2일에 한 번 (Q2D) 제공된 1 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 3번의 i.p. 주사를 비교하였다. FS20m-232-91AA/Lob12.3의 약력학적 반응, 구용적으로 순환 T 세포에 대한 대리 mAb²의 효과를 실시예 18에 기술된 바와 같이 혈액에서 면역 세포 하위세트의 유세포 분석법 분석에 의해 평가하였다.
- [0848] 실시예 17에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)에게 각 동물의 왼쪽 옆구리에 CT26 결장 암종 세포를 피하 주사하였다. 종양 세포 접종 후 10일에, 종양을 측정하고 종양이 확립되지 않은 동물은 연구에서 제거하였다. 남은 마우스를 그룹당 6마리 동물로 하여 6개의 처리군으로 무작위화하였다.
- [0849] 동형 대조군 항체 (G1AA/4420) 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3을 주사 전에 여과하고 희석하였다. 각 동물에게 투여당 200 μ l 용적의 희석된 항체를 복강내 투여하여, 20 g 마우스에 대해 투여당 30 mg/kg의 G1AA/4420 또는 1, 3, 10 또는 30 mg/kg의 FS20m-232-91AA/Lob12.3의 최종 용량을 제공하였다. 동물은 종양 접종 후 10일에 시작하여 2일에 한 번 (Q2D) 제공된 G1AA/4420 (30 mg/kg) 또는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (1, 3, 10 또는 30 mg/kg) 또는 총 3회 용량의 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (용량당 1 mg/kg)의 단일 i.p. 주사를 제공받았다. 종양 용적은 실시예 17에 기술된 바와 같이 캘리퍼 측정에 의해 결정하였다. 투여 시작으로부터 6일 (세포 접종 후 16일) 후에 동물은 연구를 중단하였다.
- [0850] 혈액을 심장 천자에 의해 EDTA-함유 튜브에 수집하였다. 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 용해 완충액 (Miltenyi Biotech, #130-094-183)에서 두 번 용해시켰다. 세포를 Fc 블럭 (eBioscience, cat. no. 14-0161-86)의 존재하에 시약 CD4-BUV395 (클론 RM4-5), CD8-BUV737 (클론 53-6.7), CD44-BV510 (클론 IM7), 및 CD3e-BV786 (클론 145-2C11), 모두 BD Bioscience에 의해 공급); CD69-FITC (클론 H1.2F3), Nkp46-PE (클론 29A1.4), CD45-Alexa700, 및 고정 가능한 생존성 염료 780, 모두 eBioscience에 의해 공급; 및 Biolegend에 의해 공급된 CD62L-BV421 (클론 MEL-14)로 유세포 분석을 위해 염색하였다. 그후 세포를 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience, cat no 00-5523-00)로 밤새 투과시켰다. 세포를 항-Gzmb, 항-Ki67 및 항-Foxp3 항체 (Biolegend에 의해 공급된 Gzmb-AF647 (클론 GB1 1), 및 둘 다 eBioscience에 의해 공급된 Ki67-PE-Cy7 (클론 SolA15) 및 Foxp3-PerCP-Cy5.5 (클론 FJK-16s))를 갖는 100 μ l 투과 완충액에 재현탁시키고 실온에서 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그후 세포를 투과 완충액으로 2회 세척하고 PBS + 0.5% BSA에 재현탁시켰다. 그후 세포를 BD Fortessa 유세포 분석기에서 분석하였다. 데이터 분석은 FlowJo, Excel 및 Graph Pad Prism 7 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.
- [0851] 첫 번째 용량을 투여한지 6일 후 말초 혈액에서 Ki67+ CD8+ (총 CD8+) 및 Ki67+ CD4+ (총 CD4+) 증식 T 세포의 빈도를 유세포 분석법 분석에 의해 결정하였다. Ki67+ CD4+ 증식 T 세포의 빈도의 통계적으로 유의한 증가가 동형 대조군에 비해 1 및 10 mg/kg 단일 용량의 FS20m-232-91AA/Lob12.3에서 관찰되었다. Ki67+ CD8+ 증식 T 세포의 빈도에 있어서의 통계적으로 유의한 증가는 동형 대조군에 비해 1, 3 및 10 mg/kg 단일 용량의 FS20m-232-91AA/Lob12.3에서 관찰되었다.
- [0852] Ki67+ CD8+ 증식 T 세포는 1 mg/kg 단일-용량 수준에서 가장 높은 경향이 있는 반면 Ki67+ CD4+ 증식 T 세포는 1 및 10 mg/kg 용량 수준에서 가장 높은 경향이 있었다. 용량 수준을 30 mg/kg로 증가시키는 것이 동형 대조군에 비해 Ki67+ CD8+ 및 Ki67+ CD4+ T 세포에 유의적인 효과를 초래하지 않았다. 중요하게도, 어떠한 용량 수준에서도 명백한 임상 관찰이나 체중 감소는 관찰되지 않았다.
- [0853] 다중 투여 그룹 (1 mg/kg Q2D 3회 용량의 FS20m-232-91AA/Lob12.3) 및 1 mg/kg 단일-용량 그룹의 비교는 Ki67+ CD8+ 및 Ki67+ CD4+ T-세포 수준에서 통계적 유의성을 보이지 않았다 (비-쌍별 Mann-Whitney 검정, 각각 $p = 0.4848$ 및 $p = 0.0931$). 이 데이터는 다중 투여가, 이 연구에서 평가된 적어도 6일 기간 내에, 말초 Ki67+ 약동학적 조절에 추가 효과를 제공하지 않았음을 시사한다.
- [0854] 실시예 18의 결과와 일치하게, 이 실험은 shows that OX40/CD137 대리 mAb²가 순환 T 세포에 영향을 미쳐, 1 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량 수준의 증식 (Ki67+) CD8+ T 세포 및 1 mg/kg 및 10 mg/kg의 용량 수준의 증식 (Ki67+) CD4+ T 세포의 빈도를 유의적으로 증가시킴을 보여준다.

- [0855] 실시예 25 - CT26 마우스 종양 모델에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 약력학적 반응에 대한 CD4 T-세포 고갈의 효과
- [0856] CD137- 및 OX40-표적화 공동자극 항체의 조합은 마우스에서 포도상 구균 장독소 A 투여 후 이들 두 제제 중의 어느 것 단독에 비해 특정 CD8+ T 세포 클론 확장을 상승적으로 향상시키는 것으로 이전에 나타났다 (Lee et al., 2004). 기계론적으로, Lee 등은 CD4 T 세포가 향상된 특정 CD8+ T-세포 반응을 유도하는 역할을 한다는 것을 입증하였다. CT26 마우스 종양 모델 및 마우스 CD4 T 세포-고갈 항체를 사용하여 숙주 CD4 T 세포가 OX40/CD137 대리 mAb²를 사용한 처리에 반응하여 말초 CD8+ T 세포의 활성화 및 증식에 필요한지 또는 이에 기여하는지를 시험하였다.
- [0857] 실시예 17에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)에게 각 동물의 왼쪽 옆구리에 CT26 결장 암종 세포를 피하 주사하였다. 동물을 시점당 그룹당 5마리 동물로 하여 7일째에 처리군으로 무작위화하였다.
- [0858] 항체를 이전에 기술된 바와 같이 분석하고 불순물을 확인하였다. 동형 대조군 항체 (G1/4420) 및 OX40/CD137 대리 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)를 PBS에서 0.1 mg/ml의 최종 농도로 희석하였다. 항-마우스 CD4 항체 (GK1.5; BioXCell, cat. no. BE0003-1)를 PBS에서 1 mg/ml의 최종 농도로 희석하였다. 각 동물은 투여당 200 μ l 용적의 희석된 항체를 제공받아, 20 g 마우스에 대해 1 mg/kg (G1/4420 또는 FS20m-232-91AA/Lob12.3) 또는 10 mg/kg (GK1.5)의 최종 용량을 제공하였다. G1/4420 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3을 세포 접종 후 10, 12 및 14일에 복강내 (i.p.) 주사를 통해 동물에게 투여하였다. GK1.5의 I.p. 주사는 8, 9, 11, 13 및 15일에 제공하였다.
- [0859] 세포 접종 후 16일에 동물은 연구를 중단하였으며 유세포 분석을 위해 조직을 수집하였다. 혈액을 심장 천자에 의해 EDTA-함유 튜브에 수집하였다. 실시예 19에 기술된 바와 동일한 프로토콜에 따라, 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 용해 완충액 (Miltenyi Biotech, #130-094-183)에서 두 번 용해시키고, 종양을 제조업체의 지침에 따라 종양 분해 키트, 마우스 (Miltenyi 130-096-730) 및 gentleMACS 분해기 (Miltenyi Biotech)를 사용하여 분해하였다. 생성된 종양 세포 현탁액을 70 μ m 세포 여과기 (Corning, cat. no. 352350)를 사용하여 여과하고, 세척하고 PBS에 재현탁하였다. 70 μ m 세포 여과기 (Corning)를 통해 비장을 밀어넣고, 적혈구 용해 완충액 (Milteny Biotech)에서 배양에 의해 적혈구를 용해시키고, 남은 비장세포를 세척하고 이들을 PBS에 재현탁함으로써 비장으로부터의 세포 현탁액을 제조하였다.
- [0860] 세포를 먼저 Fc 블럭 (eBioscience, cat. no. 14-0161-86)의 존재하에 시약 CD4-E450 (클론 GK1.5), CD69-PE-Cy5 (클론 H1.2F3), CD3-PE-Cy7 (클론 145-2C1 1), CD8-APC (클론 53-6.7), 및 고정 가능한 생존성 염료 780, 모두 eBioscience에 의해 공급; 및 BD Bioscience에 의해 공급된 CD45-V500 (클론 30-F11)으로 염색하였다. 그 후 세포를 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience, cat. no. 00-5523-00)로 투과시켰다. 세포를 Fc 블럭의 존재하에 항-Ki67 및 항-Foxp3 항체 (Ki67-FITC (클론 SolA15) 및 Foxp3-PE (클론 FJK-16s), 둘 다 eBioscience에 공급)를 갖는 100 μ l 투과 완충액에 재현탁하고 (모두 1:100) 4°C의 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 한 번 세척하고 200 μ l PBS에 재현탁시켰다. 세포를 BD FACSCanto II 세포분석기에서 분석하였다. 데이터 분석은 FlowJo, Excel 및 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 처리군 간의 쌍별 비교는 GraphPad Prism 소프트웨어 내에서 양측 Mann-Whitney 검정을 사용하여 수행하였다.
- [0861] FS20m-232-91AA/Lob12.3 단독으로의 처리는 동형 대조군-처리된 동물에 비해 혈액 및 비장에서 활성화된 CD69+ 및 증식 Ki67+ CD8+ T 세포 및 종양에서 증식 Ki67+ CD8+ T 세포의 비율의 통계적으로 유의한 증가를 유도하였다.
- [0862] FS20m-232-91AA/Lob12.3을 CD4+ T 세포-고갈 항체 GK1.5와 조합하는 것도 동형 대조군에 비해 혈액에서 증식 Ki67+ CD8+ T 세포의 통계적으로 유의한 증가를 야기하였지만, 이러한 증가는 FS20m-232-91AA/Lob12.3 단일 제제-처리된 동물에서 관찰된 것보다 유의적으로 더 낮았다. FS20m-232-91AA/Lob12.3 + CD4+ T 세포-고갈 항체 GK1.5로의 처리와 비교하여 FS20m-232-91AA/Lob12.3 단독으로의 처리 후 비장 및 종양 조직에서 증식 CD8+ T 세포의 수준에 있어서의 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- [0863] 동형 대조군 그룹과 FS20m-232-91AA/Lob12.3 + CD4-고갈 그룹 사이에 관찰된 통계적으로 유의한 차이가 없었기 때문에 혈액에서 활성화된 CD69+ CD8+ T 세포의 FS20m-232-91AA/Lob12.3-유도된 증가는 GK1.5 항체에 의해 억

제되었다 (각각 총 CD8 T 그룹의 중간값 1.6% 및 2.33%). FS20m-232-91AA/Lob12.3 단일 제제 그룹과 FS20m-232-91AA/Lob12.3 + CD4-고갈 그룹의 비교는 활성화된 CD8+ T 세포의 빈도가 비장에서 (고갈의 존재 및 부재에서 각각 29.3% 대 6.45% 빈도 중간값), 및 종양에서 (고갈의 존재 및 부재에서 각각 86.4% 대 66.5% 빈도 중간값) 유의적으로 감소되었음을 보여주었다.

[0864] **실시예 18**에 기술된 이전의 발견과 일치하게, OX40/CD137 대리 mAb²는 활성화된 (CD69+) 및 증식 (Ki67+) CD8 T 세포의 빈도를 증가시켰으며, 본 연구의 결과는 CD4+ T-세포 고갈이 이러한 OX40/CD137 mAb²-매개된 말초 약력학적 반응에 불리한 영향을 미쳤다는 것을 보여준다. 더욱이, 데이터는 생체내 항-OX40/CD137 mAb² 활성을 매개하는데 있어서의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 잠재적인 상호작용을 시사하며, CD4+ T 세포가 항-OX40/CD137 mAb²를 사용한 생체내 CD8+ T-세포 면역의 최적의 공동-자극을 위해 필요할 수 있음을 시사한다.

[0865] 실시예 26 - 시노물구스 원숭이 세포-기반 분석에서 OX40/CD137 mAb²의 기능적 활성 및 시노물구스 원숭이에서 OX40/CD137 mAb²에 대한 약력학적 반응 및 내약성

[0866] 26.1 시노물구스 원숭이 세포-기반 분석에서 OX40/CD137 mAb²의 기능적 활성

[0867] **실시예 13**에 기술된 1차 T 세포 분석과 유사하지만 단리된 활성화된 T 세포 대신 PBMC를 사용하는 1차 PBMC 분석을 내인성으로 발현된 인간 및 시노물구스 원숭이 수용체에 대한 항-인간 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²의 상대적 효능을 확립하기 위해 수행하였다. 간단히 말해서, 시노물구스 원숭이 또는 인간 PBMC를 단리하고 3일 (시노물구스 원숭이) 또는 4일 (인간) 동안 증가하는 농도의 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb² 또는 동형 대조군의 존재하에 코팅된 항-CD3 항체로 자극하였으며, IL-2 방출이 T-세포 활성화의 척도로서 작용하였다.

[0868] 시노물구스 원숭이 PBMC에 대한 mAb²의 기능적 활성 (평균 EC₅₀ = 0.28 ± 0.15 nM)은 동등한 인간 분석에서 관찰된 활성 (평균 EC₅₀ = 0.26 ± 0.1 nM; IL-2)과 유사한 것으로 관찰되었다. 따라서 시노물구스 원숭이가 mAb²에 대한 독성 연구를 위한 약리학적으로 관련된 종인 것으로 간주된다.

[0869] 26.2 시노물구스 원숭이에서 OX40/CD137 mAb²에 대한 내약성 및 약력학적 반응

[0870] 시노물구스 원숭이에서 항-인간 OX40/CD137 mAb² FS20-22-49AA/FS30-10-16의 내약성을 평가하고 주요 백혈구 집단의 비율에 있어서의 잠재적인 약력학적 변화 뿐만 아니라 FS20-22-49AA/FS30-10-16에 대한 반응으로 특정 T-세포 하위세트의 증식 및 활성화 유도를 평가하기 위해 예비 용량 범위 조사 연구를 수행하였다. 간단히 말해서, FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²를 단일 용량으로서 또는 반복 용량 투여로서 정맥내 주입을 통해 시노물구스 원숭이에 투여하였다. 연구 기간에 걸쳐 내약성의 평가를 위해 체중, 음식 섭취, 임상 관찰, 혈액학 및 혈액화학과 같은 표준 독성 매개변수를 평가하였다.

[0871] FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²는 임상 화학 및 조직병리학 결과에 의해 결정된 바와 같이 매주 투여되는 최대 30 mg/kg까지 잘 견디었다.

[0872] CT26 동계 마우스 종양 모델에서 순환 T 세포에 대한 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 효과를 평가하기 위한 연구 (**실시예 18**)의 결과와 일치하게, 세포 증식 및 활성화에 있어서의 약물-관련 증가가 중심 기억 및 효과기 기억 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서, 및 또한 NK 세포에서 관찰되었으며, 이것은 Ki67 및 어느 정도는 CD69의 발현 증가에 의해 측정되었다.

[0873] 이러한 결과를 종합하면 항-인간 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²가 시노물구스 원숭이에서 강력한 생체내 약력학적 활성을 가지며 최대 30mg/kg까지 잘 견딜 수 있음을 강력하게 나타낸다. 게다가, 본 연구에서 생성된 약력학적 데이터는 **실시예 18**에 기술된 마우스 약동학적 연구에서 OX40/CD137 대리 mAb²에 대해 관찰된 데이터와 일치하며, 인간 암 환자에서 FS20-22-49AA/FS30-10-16 mAb²와 같은 OX40 및 CD137에 결합하는 mAb²의 예상된 항종양 효능 및 내약성에 대한 추가 증거를 제공한다.

[0874] 실시예 27 - BALB/c 마우스에서 OX40/CD137 mAb²의 간 약리학

[0875] CD137 효능제 항체는 마우스 전임상 모델에서 증가된 간 T 세포 침윤을 유도하는 것으로 나타났으며, 하나의 CD137 효능제 항체는 클리닉에서 1 mg/kg 이상의 용량에서 간 독성을 유도하였다 (Dubrot et al., 2010; Segal et al., 2017). 따라서 CD137 효능제 항체와 비교하여 증가된 간 T 세포 침윤이 있는지 알아보기 위해 BALB/c 마우스에서 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 효과를 연구하였다. 혈액 및 비장 조직을 대조군으로서 사용하고 T 세포 수준 뿐만 아니라 T 세포 증식 및 활성화를 연구하였다. 시험된 항체의 세부사항은 표 38에 제시되어 있다.

[0876] 표 38: 시험된 항체 및 mAb²의 세부사항

mAb /mAb ²	Fab 결합	Fcab 결합	동형	LALA 돌연변이	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
G1/4420	FITC	없음	hlgG1	아니오	115	116
G1/OX86	mOX40	없음	hlgG1	아니오	159	156
G1/Lob12.3	mCD137	없음	hlgG1	아니오	사우샘프턴 대학	
G1/3H3	mCD137	없음	hlgG1	아니오		
FS20m-232-91AA/Lob12.3	mCD137	mOX40	hlgG1	예	실시예 9.2에 상기 기술된 생성	

[0877]

[0878] 혈액, 비장 및 간에서 T 세포를 증가, 활성화 및 유도하는 mAb² (FS20m-232-91AA/Lob12.3)의 능력을 단일-체제 mAb (G1/OX86, G1/Lob12.3, G1/3H3 및 G1/4420) 및 조합 (G1/OX86 및 G1/Lob12.3) 대조군과 비교하였다. 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작 전에 1주일 동안 휴식시켰다. 모든 동물은 마이크로 칩을 사용하고 고유 식별자를 제공받았다. 각 코호트는 6마리의 마우스를 가졌다.

[0879] 주사 전 24시간 이내에, 항체를 SEC-HPLC 프로파일링으로 분석하고 불순물을 확인하였다. 항체를 PBS에서 1 mg/ml의 최종 농도로 희석하고, 200 µl/마우스를 복강내 (IP) 주사하여, 20 g 마우스에 대해 10 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 주사는 연구의 0, 2 및 4일에 (2일마다 한 번 용량) 수행하였다. 3차 투여 후 7일 및 14일에, 그룹당 3 마리의 마우스를 안락사시키고, 비장과 간을 절개에 의해 분리하고 혈액을 심장 천자에 의해 수집하였다.

[0880] 간 및 비장은 제조업체의 지침에 따라 Miltenyi 분해 키트, (간 - Miltenyi, 130-105-807; 비장 - Miltenyi, 130-095-926)을 사용하여 분해하였다. 생성된 세포 현탁액을 70 M 세포 여과기 (Corning, cat no 352350)를 사용하여 여과하고, 원심분리 (1500 rpm에서 10분)하고, PBS에서 한 번 세척하고 5 ml PBS에 재현탁하였다.

[0881] 혈액을 심장 천자에 의해 EDTA-함유 튜브에 수집하였다. 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 용해 완충액 (eBioscience, catalogue no. 00-4300-54)에서 두 번 용해시켰다.

[0882] 종양 및 혈액으로부터 분리된 세포를 실시예 19에 상세하게 기술된 항체 패널 및 시약을 사용하여 유세포 분석을 위해 염색하였다 (염색제 1). 세포를 PBS에서 세척한 다음 100 µl의 항체 혼합물 1 (Ki67 및 FoxP3 항체를 제외한 모두)과 함께 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척한 다음 고정하고 제조업체의 지침에 따라 eBioscience Foxp3 염색 키트 (eBioscience, catalogue no. 00-5523-00)를 사용하여 투과시켰다. 간단히 말해서, 200 µl 고정 용액을 각 웰에 첨가하고 4°C의 암흑에서 밤새 방치하였다. 그 후 세포를 200 µl 투과 완충액에서 세척하였다. 그 후 세포를 다시 회전시키고 Fc 블럭의 존재하에 Ki67 및 Foxp3 항체를 갖는 100 µl 투과 완충액에 재현탁시키고 (모두 1:100 희석) 4°C의 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 한 번 세척하고 200 µl PBS에 재현탁시켰다. 그 후 세포를 BD FACSCantoII 유세포 분석기에서 분석하였다.

[0883] 데이터는 FlowJoX, Excell 및 GraphPad Prism 소프트웨어로 분석하였다. 그룹을 비교하기 위한 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지를 사용한 모든 쌍의 일원 ANOVA에 이은 Tukey의 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였다. 데이터는 모 집단의 백분율로서 표현하였다.

[0884] 결과는 가교결합-비의존적 CD137 효능제 항체 (G1/3H3)가 7일 및 14일 둘 다에서 간, 비장 및 혈액에서 증가된 T 세포 수준을 유도하였으며, 이러한 T 세포는 동형 대조군 항체 (G1/4420)에 비해 증가된 수준의 증식 및 활성화를 나타냄을 보여주었다. 가교결합-의존적 CD137 효능제 항체 (G1/Lob12.3)는 간, 비장 또는 혈액에서 T 세포 수준, 증식 또는 활성화에 유의적인 증가를 나타내지 않았다. OX40 효능제 항체 (G1/OX86)는 어떠한 조직에서도 증가된 T 세포 수준을 유도하지 않았지만 연구 7일째에 간, 비장 및 혈액에서 증가된 T 세포 증식 수준을

보였으며, 이것은 14일까지 동형 대조군 수준으로 되돌아갔다. OX40과 가교결합-의존적 CD137 효능제 항체 (G1/OX86 및 G1/Lob12.3)의 조합은 7일째 간 T 세포 침윤 수준 증가, 7일째 간에서 및 7일 및 14일에 비장 (유의하지 않음) 및 혈액에서 증가된 T 세포 증식, 및 14일에 간 및 혈액에서 및 7일 및 14일에 비장에서 증가된 T 세포 활성화를 보였다. OX40/CD137 mAb²는 7일에 간 T 세포 침윤 수준 (유의하지 않음) 및 혈액 T 세포 수준의 증가를 보였으며, 이것은 14일까지 동형 대조군 수준으로 되돌아갔고, 7일째에 간 (유의하지 않음), 비장 및 혈액에서 증가된 T 세포 증식을 보였으며, 이것 또한 14일까지 동형 대조군 수준으로 되돌아갔다. 이러한 결과는 가교결합-비의존적 CD137 효능제 (G1/3H3) 만이 간에서, 및 또한 비장 및 혈액에서 증가되고 지속적인 T 세포 침윤, 증식 및 활성화를 유도하였음을 나타내며, 본 발명의 OX40/CD137-표적화 항체 분자가 가교결합-비의존적 CD137 효능제 분자보다 더 낮은 간독성 위험을 가질 수 있음을 시사한다. 이러한 결과는 클론 3H3에 의해 유도된 가교결합-비의존적 CD137 효능작용과 본 연구에서 이러한 가교결합-비의존적 클론에 대해 관찰된 증가된 간 T 세포 염증 사이의 연관 가능성을 증가시킨다.

[0885] 실시예 28 - CT26 동계 종양 모델에서 상이한 항-CD137 Fab 클론을 함유하는 OX40/CD137 mAb² 항체의 비교

[0886] 실시예 27에서, 가교결합-비의존적 CD137 효능제 항체 (G1/3H3)는 BALB/c 마우스에서 상승되고 지속적인 T 세포 침윤, 증식 및 활성화 수준을 유도하는 것으로 관찰되었다. 이러한 증가된 활성이 OX40/CD137 mAb²의 맥락에서 유의한 항종양 활성을 갖는지 여부를 시험하기 위해, CT26 동계 종양 모델을 사용하여 생체내에서 두 개의 상이한 항-마우스 OX40/CD137 mAb²의 활성을 비교하였으며, 하나는 CD137 효능제가 가교결합-의존적 클론 Lob1.23이고 다른 하나는 CD137 효능제가 가교결합-비의존적 클론 3H3이다. CT26 동계 종양 모델은 OX40 및 CD137 효능제 항체 둘 다에 민감한 것으로 이전에 나타났으며, CT26 종양으로부터 단리된 종양 침윤 림프구 (TIL)는 OX40 및 CD137 둘 다를 발현한다.

[0887] 28.1 CT26 동계 종양 모델에서 상이한 항-CD137 Fab 클론을 함유하는 OX40/CD137 mAb² 항체의 항종양 활성

[0888] 두 개의 상이한 OX40/CD137 mAb², FS20m-232-91AA/3H3 (서열 번호: 169 및 167) 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3 (표 38 참조)의 항종양 활성을 CT26 동계 마우스 종양 모델에서 생체내에서 결정하고 동형 대조군 항체 (G1/4420; 표 38 참조)의 활성과 비교하였다. 또한, 두 가지 OX40/CD137 mAb²에 의해 혈액에서 유도된 T 세포 증식 및 활성화의 수준을 분석하고 동형 대조군 항체에 의해 유도된 것과 비교하였다. 대략 20 g 체중의 8-10주령 BALB/c 암컷 마우스 (Charles River)를 연구 시작 전에 1주일 동안 휴식시켰다. 모든 동물은 마이크로 칩을 사용하고 고유 식별자를 제공받았다. 각 코호트는 10마리의 마우스를 가졌다. CT26 결장 암종 세포주 (ATCC, CRL-2638)를 초기에 확장하고, 저장한 다음 IMPACT I 프로토콜을 사용하여 병원체에 대해 IDEXX Bioresearch에 의해 사전-스크리닝하였으며 병원체가 없는 것으로 나타났다. CT26 세포 (대략 3-5x10⁶개)를 150°C 저장고에서 해동하고 T175 조직 배양 플라스크에서 10% FCS (Gibco, 10270-106)를 갖는 20 ml DMEM (Gibco, 61965-026)에 첨가하였다. 마우스를 이소플루란 (Abbott Laboratories)을 사용하여 마취시켰으며 각 동물은 왼쪽 옆구리에 피하 주사된 1 x 10⁶개의 세포를 제공받았다. 종양 세포 접종 후 10일째에, 마우스를 건강 및 종양 성장에 대해 모니터링하고, 연구 코호트로 분류하여 무작위화하였다. 이 시점에서 종양을 갖지 않는 마우스는 연구에서 제거하였다.

[0889] 주사 전 24시간 이내에, 항체를 SEC-HPLC 프로파일링으로 분석하고 불순물을 확인하였다. 항체를 PBS에서 0.1 mg/ml의 최종 농도로 희석하고, 200 µl/마우스를 복강내 (IP) 주사하여, 20 g 마우스에 대해 1 mg/kg의 최종 용량을 제공하였다. 주사는 종양 접종 후 10, 12 및 14일에 (2일마다 한 번 용량) 수행하였다. 동물을 맹검 방식으로 일주일에 세 번 마취하에 건강검진하였으며, 그 시간 동안 종양을 정확하게 측정하였다. 종양 용적은 캘리퍼 측정 (실시예 17에 기술된 바와 같음)에 의해 결정하였다. 연구는 종양 세포 접종 후 35일에 종료하였으며 종양 용적 및 상태에 기반하여 인도적 종점에 도달했을 때 동물은 연구를 중단하였다. 처리군, 시험된 분자, 용량 및 투여 일정은 표 39에 요약되어 있다. 21일째의 종양 용적을 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 이원 ANOVA 및 Tukey의 다중 비교 검정에 의해 통계적으로 검정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 로그 순위 검정 (Mantel-Cox)에 의해 생존의 통계 검정을 수행하였다.

[0890] 표 39: 처리군 및 시험된 분자의 요약

그룹	그룹명	투여된 mAb 및/또는 mAb ²	용량 (mg/kg)	투여 일정
1	동형 대조군	G1/4420	1	Q2D
3	FS20m-232-91AA/Lob12.3	FS20m-232-91AA/Lob12.3	1	Q2D
4	FS20m-232-91AA/3H3	FS20m-232-91AA/3H3	1	Q2D

[0891]

[0892] 도 15a 및 15b에 도시된 바와 같이, 2개의 OX40/CD137 mAb² 항체 중의 어느 하나를 사용한 처리는 동형 대조군 항체를 사용한 처리에 비해 종양 성장을 지연시키고 생존을 증가시켰다. 각각 FS20m-232-91AA/3H3 mAb² 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²로 처리된 마우스 간에 종양 성장 또는 생존의 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 데이터는 실시예 27에 기술된 바와 같이 가교결합-비의존적 CD137 효능제 (G1/3H3)에 대해 관찰된 증가된 T 세포 활성화 및 증식에도 불구하고, 항-CD137 Fab 클론이 가교결합-의존적 클론 Lob12.3 (FS20m-232-91AA/Lob12.3)인 OX40/CD137 mAb²에 비해 항-CD137 Fab 클론이 가교결합-비의존적 클론 3H3 (FS20m-232-91AA/3H3)인 OX40/CD137 mAb²의 항종양 활성이 증가되지 않음을 시사한다.

[0893] 28.2 CT26 동계 종양 모델에서 상이한 항-CD137 Fab 클론을 함유하는 OX40/CD137 mAb²의 말초 약력학적 반응의 평가

[0894] 실시예 28.1에 기술된 연구의 연장에서, 3차 용량의 투여 5일 후 (즉, 종양 접종 후 19일), 혈액을 5마리 마우스의 꼬리 정맥으로부터 EDTA 함유 튜브로 수집하였다. 응고되지 않은 혈액의 적혈구를 제조업체의 지침에 따라 적혈구 세포 용해 완충액 (eBioscience, catalogue no. 00-4300-54)에서 두 번 용해시켰다.

[0895] 혈액으로부터 단리된 세포를 실시예 19에 상세하게 기술된 항체 패널 및 시약을 사용하여 유세포 분석을 위해 염색하였다 (염색제 1). 세포를 PBS에서 세척한 다음 100 μ l의 항체 혼합물 1 (Ki67 및 FoxP3 항체를 제외한 모두)과 함께 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척한 다음 고정하고 제조업체의 지침에 따라 Foxp3 염색 키트 (eBioscience, cat no 00-5523-00)로 투과시켰다. 간단히 말해서, 200 μ l 고정 용액을 각 웰에 첨가하고 4°C의 암흑에서 밤새 방치하였다. 그 후 세포를 200 μ l 투과 완충액에서 세척하였다. 그 후 세포를 다시 회전시키고 Fc 블럭의 존재하에 Ki67 및 Foxp3 항체를 갖는 100 μ l 투과 완충액에 재현탁시키고 (모두 1:100 희석) 4°C의 암흑에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포를 투과 완충액으로 한 번 세척하고 200 μ l PBS에 재현탁시켰다. 그 후 세포를 BD FACSCanto11 유세포 분석기에서 분석하였다.

[0896] 데이터는 FlowJoX, Excel 및 GraphPad Prism 소프트웨어로 분석하였다. 그룹을 비교하기 위한 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지를 사용한 모든 쌍의 일원 ANOVA에 이은 Tukey의 다중 비교 검정을 사용하여 수행하였다.

[0897] FS20m-232-91AA/3H3은 동형 대조군 항체 (G1/4420) 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3 둘 다에 비해 혈액 T 세포 수준에 있어서 통계적으로 유의한 증가를 유도하였다. FS20m-232-91AA/3H3에 의해 유도된 이러한 증가된 T 세포 수준은 G1/4420 동형 대조군 및 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²에 대해 관찰된 이러한 세포 유형의 상대 백분율에 비해 CD4+ T 세포의 상대적 백분율의 통계적으로 유의한 감소 및 CD8+ T 세포의 상대적 백분율의 통계적으로 유의한 증가를 수반하였다. 두 가지 OX40/CD137 mAb² 항체 모두는 또한 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증식을 유도하였지만 FS20m-232-91AA/3H3에 의해 유도된 수준이 FS20m-232-91AA/Lob12.3 mAb²에 의해 유도된 수준보다 유의적으로 높았다. FS20m-232-91AA/3H3mAb²는 동형 대조군에 비해 증가된 수준의 활성화된 CD4+ T 세포를 유도하였다. 동형 대조군-처리된 코호트에 비해 FS20m-232-91AA/Lob12.3 또는 FS20m-232-91AA/3H3으로 처리된 마우스에서 활성화된 T 세포 및 활성화된 CD8+ T 세포의 수준의 변화는 FS20m-232-91AA/Lob12.3으로 처리된 마우스에서 활성화된 CD4+ T 세포의 수준의 변화가 그러하듯이 대단하지 않으며 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 결과는 가교결합-비의존적 CD137 효능제 클론 3H3이 OX40/CD137 mAb²의 맥락에서 활성이며, OX40/CD137 mAb²의 맥락에서 가교결합-의존적 CD137 효능제 클론 Lob12.3에 비해 증가된 T 세포 수준 및 증식을 유도할 수 있으며, 따라서 실시예 27에 기술된 BALB/c 마우스 연구에서 관찰된 바와 같이 단클론 항체 (mAb)로서 클론 3H3에 의해 유도된 증가된 T 세포 수준 및 증식과 일치한다는 것을 나타낸다.

[0898] 항종양 활성 데이터와 함께, 이러한 결과는 OX40/CD137 mAb²의 맥락에서 가교결합-비의존적 CD137 효능제에 의해 유도된 증가된 T 세포 수준 및 증식의 항종양 반응의 양태에서 추가적인 이점이 없음을 시사한다. 이러한 결과는, 클론 3H3에 의해 유도된 가교결합-비의존적 CD137 효능작용에 대해 증가된 간 T 세포 염증이 관찰되었다는 **실시예 27**의 결과와 함께, OX40/CD137 mAb²를 사용하면, OX40에 대한 결함에 의존적인 CD137 효능작용이 암과 싸우기 위해 면역계를 자극하는 안전하고 효과적인 방법을 제공할 수 있음을 시사한다.

[0899] **서열 목록**

FS30-10-16 mAb의 CDR 아미노산 서열 (IMGT)

VH CDR1 - GFTFSSYD (서열 번호 1)
 VH CDR2 - IDPTGSKT (서열 번호 2)
 VH CDR3 - ARDLLVYGFYD (서열 번호 3)
 VL CDR1 - QSVSSSY (서열 번호 4)
 VL CDR2 - GAS (서열 번호 5)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

FS30-10-16 mAb의 CDR 아미노산 서열 (Kabat)

VH CDR1 - SYDMS (서열 번호 7)
 VH CDR2 - DIDPTGSKTDYADSVKG (서열 번호 8)
 VH CDR3 - DLLVYGFYD (서열 번호 9)
 VL CDR1 - RASQSVSSSYLA (서열 번호 10)
 VL CDR2 - GASSRAT (서열 번호 11)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

FS30-10-16 mAb의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 12)

CDRs IMGT numbering (진한 이탤릭체), CDRs Kabat numbering (밑줄친 이탤릭체)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYDMS**WVRQAPGKGLEWVS**DIDPTGSKTDYADSVK**
GRFTISRDNSKNTLYQMNSLR**AEDTAVYYCARDLLVYGFYD**WGQGLTVTVSS

FS30-10-16 mAb의 중쇄 가변 도메인의 펩타이드 서열 (서열 번호 13)

GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGATTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTT
 GTGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGACATGTCTGGGTCGACAGGCTCCTGGCAA
 AGGACTGGAATGGGTGTCCGACATCGACCCACCGGCTCTAAGACCGACTACGCCGATTCTGTG
 AAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACTCCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACTCCC
 TGAGAGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGAGATCTGCTGGTGTACGGCTTCGACTA
 TTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTGCTCT

FS30-10-16 mAb의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 14)

CDRs IMGT numbering (진한 이탤릭체), CDRs Kabat numbering (밑줄친 이탤릭체)
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQOKPGQAPRLLI**YGASSRAT**GIPDRFSGSG
 SGTDFLTISRLEPEDFAVYY**CCQQSYSPVT**FGQGTKVEIK

FS30-10-16 mAb의 경쇄 가변 도메인의 펩타이드 서열 (서열 번호 15)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCAGAGAGCTACCCGTG
 CCTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGCTCCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA
 GGCTCCCCGGCTGTTGATCTACGGCGCTTCTTAGAGCCACAGGCATCCCTGACCGGTTCTCC
 GGATCTGGCTCTGGCACCGATTTACCCCTGACCATCTCTCGGCTGGAACCCGAGGATTCGCCG
 TGTACTACTGCCAGCAGTCTACAGCTACCCCGTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT
 CAAG

FS30-10-3 mAb의 CDR 아미노산 서열 (IMGT)

VH CDR1 - GFTFSSYD (서열 번호 1)
 VH CDR2 - IDPTGSKT (서열 번호 2)
 VH CDR3 - ARDLNVYGFYD (서열 번호 16)
 VL CDR1 - QSVSSSY (서열 번호 4)
 VL CDR2 - GAS (서열 번호 5)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

[0900]

FS30-10-3 mAb 의 CDR 아미노산 서열 (Kabat)

VH CDR1 - SYDMS (서열 번호 7)
 VH CDR2 - DIDPTGSKTDYADSVKG (서열 번호 8)
 VH CDR3 - DLNVYGFY (서열 번호 17)
 VL CDR1 - RASQSVSSSYLA (서열 번호 10)
 VL CDR2 - GASSRAT (서열 번호 11)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

FS30-10-3 mAb 의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 18)

CDRs IMGT 넘버링 (진한 이탤릭체), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 이탤릭체)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG**FTFSYDMSWVRQAPGKLEWVS****DIDPTGSKTDYADSVK**
GRFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYC**ARDLNVYGFY**WGQGLTVTVSS

FS30-10-3 mAb 의 중쇄 가변 도메인의 펩산 서열 (서열 번호 19)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
 TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
 AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
 GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAATCAC
 TGCGTGCCGAAGATACGCCCGTGATTACTGTGCGAGAGACCTCAATGTGTACGGGTTCGACTA
 CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT

FS30-10-3 mAb 의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 14)

CDRs IMGT 넘버링 (진한 이탤릭체), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 이탤릭체)
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSG
 SGTDFLTISRLEPEDFAVYYC**QQSYSPVT**FGQGTKVEIK

FS30-10-3 mAb 의 경쇄 가변 도메인의 펩산 서열 (서열 번호 20)

GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
 CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGCCA
 GGCCCCGCGTCTGCTGATTTACGGTGCATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
 GGTAGTGTTCTGGGACGGACTTCACTCTGACAATCTCACGCCGGAACCGGAGGATTTTTCGGG
 TGTATTACTGCCAGCAATCTTATCTTATCTGTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATC
 AAA

FS30-10-12 mAb 의 CDR 아미노산 서열 (IMGT)

VH CDR1 - GFTFSSYD (서열 번호 1)
 VH CDR2 - IDPTGSKT (서열 번호 2)
 VH CDR3 - ARDLTVYGFY (서열 번호 21)
 VL CDR1 - QSVSSSY (서열 번호 4)
 VL CDR2 - GAS (서열 번호 5)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

FS30-10-12 mAb 의 CDR 아미노산 서열 (Kabat)

VH CDR1 - SYDMS (서열 번호 7)
 VH CDR2 - DIDPTGSKTDYADSVKG (서열 번호 8)
 VH CDR3 - DLTVYGFY (서열 번호 22)
 VL CDR1 - RASQSVSSSYLA (서열 번호 10)
 VL CDR2 - GASSRAT (서열 번호 11)
 VL CDR3 - QQSYSPVT (서열 번호 6)

[0901]

FS30-10-12 mAb 의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 23)
 CDRs IMGT 넘버링 (진한 이탤릭체), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 이탤릭체)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKGLEWVSDIDPTGSKTDYADSVK
QRFITSRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARDLTVYGFYWGQGLTVTVSS

FS30-10-12 mAb 의 중쇄 가변 도메인의 펩타이드 서열 (서열 번호 24)
 GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
 TGC GCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
 AAGGTCTGGAATGGGTTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
 GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACAC
 TGC GTGCCGAAGATACGGCCGTATTACTGTGCGAGAGACCTACGGTGTACGGGTTCTGACTA
 CTGGGGCCAGGGAACCTGTGTCACCGTCTCGAGT

FS30-10-12 mAb 의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 14)
 CDRs IMGT 넘버링 (진한 이탤릭체), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 이탤릭체)
 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFGSGS
 SGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQSYSYPVTFGGGTKVEIK

FS30-10-12 mAb 의 경쇄 가변 도메인의 펩타이드 서열 (서열 번호 20)
 GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCAGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
 CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAACCGGGCCA
 GGCCCGCGTCTGCTGATTTACGGTGCATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
 GGTAGTGGTCTGGGACGGACTTCACTCTGACAATCTCACGCCTGGAACCGGAGGATTTTGGCG
 TGATTACTGCCAGCAATCTTATCTTATCTGTACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTGGAATC
 AAA

FS30-35-14 mAb 의 CDR 아미노산 서열 (IMGT)
 VH CDR1 - GFTFSAYN (서열 번호 25)
 VH CDR2 - ISPYGGAT (서열 번호 26)
 VH CDR3 - ARNLYELSAYSYGADY (서열 번호 27)
 VL CDR1 - QSVSSSY (서열 번호 4)
 VL CDR2 - GAS (서열 번호 5)
 VL CDR3 - QQYYYSSPIT (서열 번호 28)

FS30-35-14 mAb 의 CDR 아미노산 서열 (Kabat)
 VH CDR1 - AYNIIH (서열 번호 29)
 VH CDR2 - DISPYGGATNYADSVKG (서열 번호 30)
 VH CDR3 - NLYELSAYSYGADY (서열 번호 31)
 VL CDR1 - RASQSVSSSYLA (서열 번호 10)
 VL CDR2 - GASSRAT (서열 번호 11)
 VL CDR3 - QQYYYSSPIT (서열 번호 28)

FS30-35-14 mAb 의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 170)
 CDRs IMGT 넘버링 (진한 이탤릭체), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 이탤릭체)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNIHWVRQAPGKGLEWVSDISPYGGATNYADSVKG
RFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARNLYELSAYSYGADYWGQGLTVTVSS

[0902]

FS30-35-14 mAb의 중쇄 가변 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 171)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGAGT
TGC CGCGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTGCCCTATAATATCCATTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTTCTCCGTATGGTGGCGCGACCAACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACTCAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAACCTCTACGAGTTGAGCGCTTACTC
TTACGGGCGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGTCG

FS30-35-14 mAb의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 172)

CDRs IMGT numbering (진한 아미노산), CDRs Kabat numbering (말줄인 아미노산)

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYSSPITFGQGTKVEIK

FS30-35-14 mAb의 경쇄 가변 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 32)

GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGCCA
GGCCCCGCGTCTGCTGATTACGGTGCAATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
GGTAGTGGTCTGGGACGGACTTCACTCTGACAATCTACGCCCTGGAACCGGAGGATTTGCGG
TGATTACTGCCAGCAATATTATTCTTCTCCTATCACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA
ATCAAA

FS30-5-37 mAb의 CDR 아미노산 서열 (IMGT)

VH CDR1 - GTFSSYA (서열 번호 33)

VH CDR2 - ISGSGGST (서열 번호 34)

VH CDR3 - ARSYDKYWGSSISGLDY (서열 번호 35)

VL CDR1 - QSVSSSY (서열 번호 4)

VL CDR2 - GAS (서열 번호 5)

VL CDR3 - QQYSSYPVT (서열 번호 36)

FS30-5-37 mAb의 CDR 아미노산 서열 (Kabat)

VH CDR1 - SYAMS (서열 번호 37)

VH CDR2 - AISGSGGSTYYADSVKG (서열 번호 38)

VH CDR3 - SYDKYWGSSISGLDY (서열 번호 39)

VL CDR1 - RASQSVSSSYLA (서열 번호 10)

VL CDR2 - GASSRAT (서열 번호 11)

VL CDR3 - QQYSSYPVT (서열 번호 36)

FS30-5-37 mAb의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 40)

CDRs IMGT numbering (진한 아미노산), CDRs Kabat numbering (말줄인 아미노산)

EVOLLESGGGLVQPGGSLRLNCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMSRLRAEDTAVYYCARSYDKYWGSSISGLDYWGQGLTVTVSS

FS30-5-37 mAb의 중쇄 가변 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 41)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGAATT
GCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGTCAGGCGCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGCGATTAGCGGTAGTGCGGTAGCACGTACTATGCGGATAGCG
TGAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACTCA
CTGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGATTACTGTGCGAGATCTTACGACAAATACTGGGGTTCTT
CTATTTACTCTGCTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0903]

FS30-5-37 mAb의 경쇄 기변 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 42)
 CDRs IMGT 넘버링 (진한 아열릭제), CDRs Kabat 넘버링 (밑줄친 아열릭제)
 EVLTQSPGTLSPGERATLSCRA**SSQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSG
 SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYYSYPVT**FGQGTKVEIK

FS30-5-37 mAb의 경쇄 기변 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 43)
 GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
 CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAACCGGGCCA
 GGCCCCGCGTCTGCTGATTACGGTGATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
 GGTAGTGGTTCTGGGACGGA**CTTCACT**CTGACAATCTCACGCTGGAACCGGAGGATTTGCGG
 TGTATTACTGCCAGCAATATTATTCTTATTATCCTGTACAGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA
 ATCAAA

WT CH3 도메인 구조 루프의 아미노산 서열
 WT AB 루프 - RDELTKNQ (서열 번호 44)
 WT CD 루프 - SNGQPENNY (서열 번호 45)
 WT EF 루프 - DKSRWQQGNV (서열 번호 46)

WT CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 47)
 AB, CD 및 EF 루프는 밑줄친어짐
 GOPREPVYTLPPSR**DELTKNQ**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**SNGQPENNY**KTTTPVLDSDGSFFLY
 SKLTVD**DKSRWQQGNV**FSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

CH2 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 48)
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

LALA 돌연변이를 갖는 CH2 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 49)
 LALA 돌연변이 밑줄친어짐
 APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

LALA 돌연변이 및 P114A 돌연변이를 갖는 CH2 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 50)
 LALA 돌연변이 밑줄친어짐; P1 14A 돌연변이 진하게 밑줄친어짐
 APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAK

Fcab FS20-22-49 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열
 FS20-22-49 제 1 서열 - YWDQE (서열 번호 51)
 FS20-22-49 제 2 서열 - DEQFA (서열 번호 52)
 FS20-22-49 제 3 서열 - QYRWNPADY (서열 번호 53)

Fcab FS20-22-49 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 54)
 제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄친어짐
 GOPREPVYTLPPSR**DEYWDQE**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES**NGDEQFA**YKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVD**QYRWNPADY**FSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

Fcab FS20-22-49 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 55)
 GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCCTCCAAGCCGGGACGAGTACTGGGATCAA
 GAGGTGTCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA

[0904]

GCAATGGCGACGAGCAGTTTCGCCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT
CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAGTACAGATGGAACCCCGCGACTACTTCTCTTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGC

Fcab FS20-22-49 CH3 도메인 AB, CD 및 EF 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-22-49 AB 루프 - RDEYWDQE (서열 번호 56)

FS20-22-49 CD 루프 - SNGDEQFAY (서열 번호 57)

FS20-22-49 EF 루프 - DQYRWNPADY (서열 번호 58)

Fcab FS20-22-38 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-22-38 제 1 서열 - YWDQE (서열 번호 51)

FS20-22-38 제 2 서열 - AEKYQ (서열 번호 59)

FS20-22-38 제 3 서열 - QYRWNP GDY (서열 번호 60)

Fcab FS20-22-38 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 61)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 말줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGAEKYQYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDQYRWNP GDYFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-22-38 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 62)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGCAGAAAAATACCAAGTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAACCCAGGCGACTATTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS20-22-41 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-22-41 제 1 서열 - YWDQE (서열 번호 51)

FS20-22-41 제 2 서열 - DEQFA (서열 번호 52)

FS20-22-41 제 3 서열 - QYRWNP GDY (서열 번호 60)

Fcab FS20-22-41 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 63)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 말줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDQYRWNP GDYFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-22-41 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 64)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAACCCAGGCGACTATTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGA

Fcab FS20-22-47 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-22-47 제 1 서열 - YWDQE (서열 번호 51)

FS20-22-47 제 2 서열 - DEQFA (서열 번호 52)

FS20-22-47 제 3 서열 - QYRWSP GDY (서열 번호 65)

Fcab FS20-22-47 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 66)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 말줄그여짐

[0905]

GQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFA⁶⁷YKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDQYRWSPGDYFSCVMHEALHNHYTKSLSPG

Fcab FS20-22-47 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 67)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGATGAACAGTTTCGCATACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAGTCCGGGTGATTATTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCGGA

Fcab FS20-22-85 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-22-85 제 1 서열 - YWDQE (서열 번호 51)

FS20-22-85 제 2 서열 - DEQFA (서열 번호 52)

FS20-22-85 제 3 서열 - QYRWNPDD (서열 번호 68)

Fcab FS20-22-85 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 69)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFA⁶⁸YKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTLDQYRWNPDD⁶⁹FSCVMHEALHNHYTKSLSPG

Fcab FS20-22-85 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 70)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGATGAACAGTTTCGCATACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCTTGGATCAGTATAGGTGGAATCCGTTTGATGATTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCGGA

Fcab FS20-31-58 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-58 제 1 서열 - YYSGE (서열 번호 71)

FS20-31-58 제 2 서열 - QPEND (서열 번호 72)

FS20-31-58 제 3 서열 - PYWRWGPRT (서열 번호 73)

아미노산 서열 of Fcab FS20-31-58 CH3 도메인 (서열 번호 74)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEYYSGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEND⁷⁴YKTTTPVLDSDGSFFL
SKLTVPYWRWGPRT⁷⁵FSCVMHEALHNHYTKSLSPG

Fcab FS20-31-58 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 75)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTACTCTGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGAGAACGACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTTATTGGAGGTGGGGTAGTCCGCGTACTTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCTTGTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS20-31-66 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-66 제 1 서열 - YYSGE (서열 번호 71)

FS20-31-66 제 2 서열 - QPEND (서열 번호 72)

FS20-31-66 제 3 서열 - PYWRWGPRT (서열 번호 76)

[0906]

Fcab FS20-31-66 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 77)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여장

GQPREPQVYTLPPSRDEYYSGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENDYKTTTPVLDSGSSFFLY
SKLTVPYWRWGVPRTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-31-66 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 78)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTACTCTGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACGACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGATTGGAGGTGGGGTGTTCGCGTACTTTCTCATG
CTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS20-31-94 Fcab CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-94 제 1 서열 - WEHGE (서열 번호 79)

FS20-31-94 제 2 서열 - IREHD (서열 번호 80)

FS20-31-94 제 3 서열 - PYWRWGGPGT (서열 번호 81)

Fcab FS20-31-94 Fcab CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 82)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여장

GQPREPQVYTLPPSRDEWEHGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIREHDYKTTTPVLDSGSSFFLY
SKLTVPYWRWGGPGTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-31-94 Fcab CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 83)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGTGGGAACATGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGATCAGAGAACATGATTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCATATTGGAGGTGGGGCGGCCAGGCACCTTCTCATG
CTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCTCCCGGA

Fcab FS20-31-102 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-102 제 1 서열 - WASGE (서열 번호 84)

FS20-31-102 제 2 서열 - QPEVD (서열 번호 85)

FS20-31-102 제 3 서열 - PYWRWGVPR (서열 번호 76)

Fcab FS20-31-102 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 86)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여장

GQPREPQVYTLPPSRDEWASGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEVDYKTTTPVLDSGSSFFLY
YSKLTVPYWRWGVPRTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-31-102 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 87)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGTGGGCATCTGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCAGAAAGTTGATTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGATTGGAGGTGGGGTGTTCGCGTACTTTCTCATG
CTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS20-31-108 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-108 제 1 서열 - WASGE (서열 번호 84)

FS20-31-108 제 2 서열 - EKEID (서열 번호 88)

FS20-31-108 제 3 서열 - PYWRWGAART (서열 번호 89)

[0907]

Fcab FS20-31-108 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 90)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEWASGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGEKEIDYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVPYWRWGAKRTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-31-108 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 91)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTGGGCATCTGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGAAAAAGAAATCGATTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATTGGAGGTGGGGTGCTAAGCGTACTTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS20-31-1 15 CH3 도메인 구조 루프 서열의 아미노산 서열

FS20-31-1 15 제 1 서열 - WASGE (서열 번호 84)

FS20-31-1 15 제 2 서열 - EQEFD (서열 번호 92)

FS20-31-1 15 제 3 서열 - PYWRWGAKRT (서열 번호 89)

Fcab FS20-31-1 15 CH3 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 93)

제 1, 제 2 및 제 3 서열 밑줄그여짐

GQPREPQVYTLPPSRDEWASGEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGEQEFDYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPYWRWGAKRTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Fcab FS20-31-1 15 CH3 도메인의 핵산 서열 (서열 번호 94)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTGGGCATCTGGT
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGAACAGGAATTCGATTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATTGGAGGTGGGGTGCTAAGCGTACTTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGCCCTGTGCCCCGGA

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-10-16 의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 95)

가변 도메인 (이탈라제), LALA 돌연변이 (전하계 밑줄그여짐)

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKLEWVSDIDPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYQMNSLRADTAIVYYCARDLLVYGFYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDDQYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-10-16 의 중쇄의 핵산 서열 (서열 번호 96)

GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGATTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTT
GTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGACATGCTCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA
AGGACTGGAATGGGTGTCGACATCGACCCACCGGCTCTAAGACCGACTACGCCGATTCTGTG
AAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACCTCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACCTCC
TGAGAGCCGAGGACACCGCGGTGACTACTGTGCCAGAGATCTGCTGGGTACGGCTTCGACTA
TTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCCT
CTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT

[0908]

ACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAACCTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGCACACCTT
CCAGCAGTGTGACGCTCTCGGCTGTACTCTGTCTCTGTGCTGACCGTGCCTTCCAGCT
CTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCAAGCCTTCCACACCAAGGTGGACAA
GAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCAGAACT
GCTGGCGGCCCCCTCCGTGTTTCTGTCCCTCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCTCGGA
CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTACGAGGACCCAGAAAGTGAAGTTCAATTG
GTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTC
CACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTA
CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGTCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCTTCCAGCCGGGACGAGTACTGGGATCAA
GAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA
GCAATGGCGACGAGCAGTTCCCTACAAGACAACCCCTCTGTGTGAGTCCGACGGCTCATT
CTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACCAAGTACAGATGGAACCCCGCCGACTACTTCTTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACAGAAAGTCCCTGTCTGTCCCTGGC

FS30-10-16의 경색의 야미노산 서열 (서열 번호 97)

가변 도메인 (이탈락체)

EIVLTQSPGTLSSLRGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLPEDFAYVYQQSYSPVTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

FS30-10-16의 경색의 핵산 서열 (서열 번호 98)

GAGATCGTGTGACCCAGTCTCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCTACCTGT
CCTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA
GGCTCCCGGCTGTTGATCTACGGCGCTTCTTAGAGCCACAGGCATCCCTGACCGGTTCTCC
GGATCTGGCTCTGGCACCGATTTCACCTGACCATCTCTCGGCTGGAACCCGAGGATTTCGCCG
TGTACTACTGCCAGCAGTCTACAGCTACCCCGTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT
CAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATTTCCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAG
CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGCGTCAACGAGCAGGACAGCA
AGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACAGGGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA
GGGGCGAGTGC

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-10-3의 중쇄의 야미노산 서열 (서열 번호 99)

가변 도메인 (이탈락체), LALA 돌연변이 (진하게 밑줄그어짐)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKLEWVSDIDPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARDLVYGFYWGQGLTVTSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAFKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDQYRWNPADYFSCSVMHLEAHNHYTKSLSLSPG

FS20-22-49AA/FS30-10-3 LALA 돌연변이를 갖는 중쇄의 핵산 서열 (서열 번호 100)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGTTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA

[0909]

AAGGCTCGGAATGGGTTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGACCTCAATGTGTACGGGTTGCGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACTAAGGGCCCGTGGTGTCC
GCTGGCCCCATCGTCCAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCCTGTGAAGGA
TTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGTCATACT
TTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGAC
AAGAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCGCGAA
GCTGCCCGGTGGTCTTCGGTGTCTCTCCCGCCCAAGCCGAAGGATACCTGATGATCTCAC
GGACCCCGGAAGTACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGTGAATTC
ATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA
ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGA
GTACAAGTGCAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCC
AAGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTGGGAC
CAGGAAGTCAGCCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCTGCTGATTATTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTGTCTCTGTGCGCCG
GA

FS30-10-3의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 97)

가변 도메인 (이탈릭체)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYQQSYSPVTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

FS30-10-3의 경쇄의 핵산 서열 (서열 번호 102)

GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTAGCAGTAGTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGCCA
GGCCCCGCGTCTGCTGATTTACGGTGCATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
GGTAGTGTTCTGGGACGGAAGTCACTCTGACAATCTACGCCCTGGAACCGGAGGATTTTGGCG
TGTATTACTGCCAGCAATCTTATTCTTATCCTGTACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATC
AAACGTACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTATTTTCCGCCATCCGACGAGCAGCTCAAGTCCG
GCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAATTCTACCCTCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAA
GGTGCAGCAATGCCCTGCAGTCCGGAAGTCCGAGGAAAGCGTGAAGTGAACAGGACTCCAAGGA
CTCCACCTATTCACTGTCCTCGACTCTGACCCGTGAGCAAGGCGGATTACGAAAAGCACAAAGTGT
ACGCATGCGAAGTGACCCACCAGGGTCTTTCGTCCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGAGGAGA
GTGT

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-10-12의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 103)

가변 도메인 (이탈릭체), LALA 돌연변이 (진하게 밑줄 그어짐)

>

EVOLLESGGGLVOPGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSDIPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARDLTVYGF~~FDY~~WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKV~~DKK~~VEPKSCDKHTCP~~PC~~PAPE~~AA~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

[0910]

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVQDYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-10-12의 종래의 핵산 서열 (서열 번호 104)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGTTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACTCAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGACCTCACGGTGTACGGGTTGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCGTGGTCACCGTCTCGAGTGTAGCACTAAGGGCCCGTGGTGTTCCTC
GCTGGCCCCATCGTCCAGAGCACATCAGGGGTACCGCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGA
TTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACT
TTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCAACGCTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGAC
AAGAAGTTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAA
GCTGCCGGTGGTCTTCGGTGTCTCTCCCGCCCAAGCGAAGGATACCTGATGATCTCAC
GGACCCCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGTGAAATTCA
ATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA
ACTCTACCTACGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGA
GTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGCGCTGCTGCCCAATTGAGAAAACTATCTCGAAAGCC
AAGGACAGCCCTCAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGTACTGGGAC
CAGGAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGATCAGTATAGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGCTCCGTGCGCCG
GA

FS30-10-12의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 97)

가변 도메인 (아미노산)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSYSPVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

FS30-10-12의 경쇄의 핵산 서열 (서열 번호 102)

GAAATGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGCCA
GGCCCCGCGTCTGCTGATTTACGGTGCATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTCC
GGTAGTGGTTCTGGGACGACTTCACTCTGACAATCTCACGCTGGAACCGGAGGATTTTCCGG
TGATTACTGCCAGCAATCTTATTCTATCTGTACAGTTCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAAATC
AAACGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATTTTCCGCCATCCGACGAGCAGCTCAAGTCCG
GCACCGCTCCGTTGCTGCTGCTCAACAACCTTCTACCTCGCGAAGCTAAGTCCAGTGGAA
GGTCGACAATGCCCTGCAGTCCGGAACCTCGCAGGAAAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGA
CTCCACCTATTCACTGTCTGACTGTGACCTGAGCAAGGCGGATTACGAAAAGCACAAAGTGT
ACGCATGCGAAGTGACCCACAGGGTCTTTCGTCCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGAGGAGA
GTGT

[0911]

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-35-14의 종래의 아미노산 서열 (서열 번호 105)
가변 도메인 (이델릭체), LALA 돌연변이 (진하게 밑줄그여짐)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNIHWVRQAPGKGLEWVSDISPYGGATNYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLYELSAYSYGADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTT
PPVLDSDGSGFLYSKLTVDQYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-35-14의 종래의 핵산 서열 (서열 번호 106)
GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGTGGTTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGCGCTTTACCTTCAGTGCCTATAATATCCATTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTTCTCCGTATGGTGGCGCGACCAACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAACCTCTACGAGTTGAGCGCTTACTC
TTACGGGGCGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGTGGCTAGCACTAAGGG
CCCGTCCGTGTTCCCGCTGGCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGTACCGCCGCCCTGGG
CTGCGCTGTGAAGGATTACTTTCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACC
TCCGGAGTGCACTATTTCCCGGCTGTGCTTCACTCCTGCGCTGACTCATTGCTCTCCGTGGT
CACCGTCCCTTCGCTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGA
ACACCAAGGTGCAAGAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTT
GCCAGCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCGCTGTTCTCTTCCGCGCCAAGCCGAAGGATA
CCCTGATGATCTCACGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACC
CGGAAGTGAAATCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCAACGCCAAGACCAAGCCACG
GGAAGAACAGTACAACCTTACCTACCGCTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGG
CTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAAGTGTCACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAA
CTATCTCGAAAGCCAAGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGG
ATGAGTACTGGGACCGAGGAAGTCAGCCTGACCTGCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCAAGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCCT
GCTGATTATTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTT
GTCCCTGTGCGCCGGA

FS30-35-14의 종래의 아미노산 서열 (서열 번호 107)
가변 도메인 (이델릭체)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYYYSPIITFGQGTKEIRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

FS30-35-14의 종래의 핵산 서열 (서열 번호 108)
GAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGCCA
GGCCCGCGCTGCTGATTACGGTGCATCCAGCCGTGCCACCGGCATTCCAGATCGTTTTTCC
GGTAGTGGTTCTGGGACGGACTTCACTCTGACAACTCTACGCCTGGAACCGGAGGATTTTGGCG
TGATTACTGCCAGCAATATTATTATTCTTCTCTATCACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAA
ATCAAACTACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCAATTTTCCGCCATCCGACGAGCAGCTCAAGTC

[0912]

CGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCCTGCTCAACAACCTTCTACCCTCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGG
AAGGTCGACAATGCCCTGCAGTCCGGAACCTCGCAGGAAAGCGTGAACAGGACTCCAAG
GACTCCACCTATTCTACTGCTCCTCGACTCTGACCCCTGAGCAAGCGCGATTACGAAAAGCACAAAG
TGACCGCATGCGAAGTGACCCACAGGGTCTTTCTGTCCTCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGAGG
AGAGTGT

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-5-37 의 종체의 아미노산 서열 (서열 번호 109)
가변 도메인 (이델릭체), LALA 돌연변이 (진하게 밑줄그어짐)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLNCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYQMNSLRRAEDTAVYYCARSDYKYWGSSYYGLDYWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLTGTQYICNVNHPKSNKTVDKKVEPKSCDKTHSTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
EVTQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQF
AYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDQYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

LALA 돌연변이를 갖는 FS20-22-49AA/FS30-5-37 의 종체의 핵산 서열 (서열 번호 110)
GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGAATT
GCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCACTAGCTATGCCATGAGCTGGGTGCGTCAAGGCCCGGGGCA
AAGGTCCTGGAATGGGTAGCGCGATTAGCGGTAGTGGCGGTAGCAGCTACTATGCGGATAGCG
TGAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACAGCTGTACCTGCAGATGAACCTA
CTGCGTGCCGAAGATACGGCGGTGATTACTGTGCGAGATCTTACGACAAATCTGGGGTTCTT
CTATTTACTCTGGCTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCAC
TAAGGGCCCGTCCGGTGTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGC
CCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCC
CTGACCTCCGGAGTGCATATTTCCCGGCTGTGCTTCACTCCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTC
CGTGGTCACCGTCCCTTCGTCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGAATGTCAACCATAAAGC
CCTCGAACACCAAGGTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCC
CGCCTTGCCAGCCCCGAAGCTGCCGGTGTCTTCGGTGTCTCTCCCGCCCAAGCCGA
AGGATACCTGTATGATCTCACGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGACGTGTCCACG
AGGACCCCGGAAGTGAATTCATTTGATACGTGGATGGAGTGGAGTGACACACGCCAAGACCAA
GCCACGGGAAGAAGTACAACCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA
GACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAGTGTCACAAGGCGCTGCCTGCCCAATT
GAGAAAATCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCAT
CCCGGATGAGTACTGGGACCAAGGAGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGATGAACAGTTCCGATACAAGACCAAGCCTC
CCGTGCTGGAATCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTG
GAATCCTGCTGATTATTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGA
AGAGCTTGTCCCTGTGCCCCGA

FS30-5-37 의 종체의 아미노산 서열 (서열 번호 111)
가변 도메인 (이델릭체)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYQQYYSYPVTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

[0913]

FS30-5-37의 결핵의 백신 서열 (서열 번호 112)

GAATTTGTGCTGACCCAGTCTCCGGGCACGTTATCTCTGAGCCCTGGTGAGCGCGCCACTCTGT
CATGCCGGGCTTCTCAAAGTGTAGCAGTAGCTACCTGGCGTGGTATCAGCAAAACCGGGCCA
GGCCCCGCGTCTGCTGATTTACGGTGATCCAGCCGTGCCACCGGCAATCCAGATCGTTTTTCC
GGTAGTGGTTCTGGGACGACTTCACTCTGACAATCTCACGCTGGAACCGGAGGATTTTGGCG
TGATTTACTGCCAGCAATATTATTCTTATCTCTGTACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA
ATCAAACGTACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATTTTCCGCCATCCGACGAGCAGCTCAAGTC
CGGCACCGCTCCGTGGTCTGCTCAACAATTCTACCTCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGG
AAGGTCGCAATGCCCTGCAGTCCGGAACTCGCAGGAAAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAG
GACTCCACCTATTCACTGTCTCCTGACTCTGACCTGAGCAAGCGGATTACGAAAAGCACAAG
TGACGCATGCGAAGTGACCCACCAGGCTTTCTGTCCTCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGAGG
AGAGTGT

Fcαb FS20-22-49 CH3 도메인의 대체 백신 서열 (서열 번호 113)

GGACAGCCTCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGCGTCTCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGCTCTGTCGCCCGGA

LALA 돌연변이를 포함하는 항-FITC mAb G1A/4420의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 114)

CDR의 위치는 밑줄표기됨. LALA 돌연변이의 위치는 진하게 표시됨.
EVKLDETGGLVQGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWVRSPEKGLEWVAQIRNKPNYETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA 돌연변이가 없는 항-FITC mAb G1/4420의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 115)

CDR의 위치는 밑줄표기됨.
EVKLDETGGLVQGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWVRSPEKGLEWVAQIRNKPNYETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4420 mAb의 결핵의 아미노산 서열 (서열 번호 116)

VL 도메인 (이탈릭체)
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLRKPGQSPKVLIVKVSNNRFGVPRDF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0914]

LALA 돌연변이를 갖는 G1AA/HeD1.3 항체의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 117)
 QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKS
 RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

경쇄의 아미노산 서열 of HeD1.3 mAb (서열 번호 118)

VL 도메인 (이탈릭체)
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVSPSRFSGSGS
 GTQYSLKINSLOPEDFGSYQCQHFWSPTPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

G1/MOR748Q.1의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 119)

VH 도메인 (이탈릭체)
 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWIWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYPSPFQ
 GOVTISADKSISTAYLOWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1/MOR748Q.1, G1AA/MOR748Q.1 및 G2/MOR748Q.1 mAb의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 120)

VL 도메인 (이탈릭체)
 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSPGIPERFSGSNSG
 NTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV
 CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG
 STVEKTVAPTECS

G1/20H4.9의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 121)

VH 도메인 (이탈릭체)
 QVQLQQWAGAGLLKPSSETLSLTCVAVYGGFSFGYYWSWIRQSPEKGLEWIGIEINHGYYVTYNPSLESR
 VTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 DSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1/20H4.9 및 G1AA/20H4.9 mAb의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 122)

VL 도메인 (이탈릭체)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
 TDFLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTVKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL

[0915]

LNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

FS20-22-49AA4420 (LALA 돌연변이를 갖는)의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 123)

VH 도메인 (이탈릭체); LALA 돌연변이 (진하게 밑줄그어짐)

EVKLDETGGGLVOPGRPMKLSVAGSFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYYSDS
VKGRFTISRDDSSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVQDYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

G2/MOR748Q.1의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 124)

VH 도메인 (이탈릭체)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWIWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQ
GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPCSR
STSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTC
NVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISK
TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

G1AA/MOR748Q.1의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 125)

VH 도메인 (이탈릭체) LALA (진하게 밑줄그어짐)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWIWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQ
GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

인간 CD137의 아미노산 서열 (서열 번호 126)

세포외 도메인 (이탈릭체); 막관통 및 세포내 도메인 (진하게)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPNPSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCT
PGFHCLGAGCSMCQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER
DVVCGSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQMSFFLALTSTALLFLLFLTLRFSVVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

인간 CD137 세포외 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 127)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPNPSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCT
PGFHCLGAGCSMCQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER
DVVCGSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQ

서노물구스 CD137의 아미노산 서열 (서열 번호 128)

세포외 도메인 (이탈릭체); 막관통 및 세포내 도메인 (진하게)

[0916]

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPNPSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKESSTSNAECDICIS
GYHCLGAECMSCEQDCKQQLTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD
VVGCPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ
QPFMRPVQTTQEEDGCSRCRFPPEEEGGCEL

시노물구스 CD137 세포의 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 129)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPNPSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKESSTSNAECDICIS
GYHCLGAECMSCEQDCKQQLTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD
VVGCPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ

인간 0X40 세포의 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 130)

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKCPCTWCNLRSG
SERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQ
ASNSSDAICEDRDPPATQPETQGPAPRPTVQPTAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRA

시노물구스 0X40 세포의 도메인의 아미노산 서열 (서열 번호 131)

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKCPCTWCNLRSG
SERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQ
ASNSSDAICEDRDPPPTQPETQGPAPRPTVQPTAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPA

D011.10-hOX4Q 및 인간 0X40 수용체의 아미노산 서열 (서열 번호 132)

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKCPCTWCNLRSG
HRSGSELKQNCPTQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQ
ASNSSDAICEDRDPPATQPETQGPAPRPTVQPTAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLV
LGLLGLPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

D011.10-mOX4Q 및 마우스 0X40 수용체의 아미노산 서열 (서열 번호 133)

VTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECPQGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCN
HRSGSELKQNCPTQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLS
GKQTRHPASDSLDVCEDRSLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPTSELSPPTLVTEGPFAV
LLGLGLLAPLTVLLALYLLKAWRLPNTPKPCWGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI

D011.10-cOX4Q 및 시노물구스 원숭이 0X40 수용체의 아미노산 서열 (서열 번호 134)

KLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKCPCTWCNLRSG
GSERKQPCCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQ
PASNSSDAICEDRDPPPTQPETQGPAPRPTVQPTAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPAVAAILGLGL
ALGLLGLPLAMLLALLLRDQRLPPDAKAPGGGSFRTPIQEEQADAHSAKAI

인간 0X40-mFc의 아미노산 서열 (서열 번호 135)

IL-2 리더 서열 (말줄그머짐), 0X40 세포의 도메인 (이탈락체), 마우스 IgG2a Fc 도메인 (진하계)
MYRMOLLSCIALSLAVTNSLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKCPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPETQGPAPRPTVQPTAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSED
DPDVQISWFWNNVEHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERT
ISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVHGLEHNNHTTKSFSRTPGK

[0917]

마우스 QX40-mFc의 아미노산 서열 (서열 번호 136)

IL-2 리더 서열 (밑줄그어짐), OX40 세포외 도메인 (이탈릭체), 마우스 IgG2a Fc 도메인 (진하게)
 MYRMQLLSIALSLALVTNSVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCET
 GFYNEAVNYDTCKQCTQCNRHSGSELQKNCPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDVPCPPG
 HFSPGNNAQCKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLATLLWETQRTFRPTTVQSTTVWPR
 TSELPSPPTLVTEGPAGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD
 VSEDDPDVQISWFWVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA
 PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV
 LDSGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHHHTTKSFSRTPGK

cyno QX40-mFc의 아미노산 서열 (서열 번호 137)

IL-2 리더 서열 (밑줄그어짐), OX40 세포외 도메인 (이탈릭체), 마우스 IgG2a Fc 도메인 (진하게)
 MYRMQLLSIALSLALVTNSLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRNRSQNTVCRPCGPGFYN
 DVVSAKPKACTWCNLRSGSERKQPCATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGPHFSPGDN
 QACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSDAICEDRDPPPTQPOETQGPPARPTTVQPTAWPRTSQRPST
 RPVEVPRGPAVAAGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSE
 DDPDVQISWFWVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA
 PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD
 SSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHHHTTKSFSRTPGK

CD137-mFc-Avi 재조합 항원에 사용하기 위한 인간 CD137 서열의 아미노산 서열 (서열 번호 138)

SLQDPCSNCPAGTFCNDRNRQICSPCPNSFSSAGGORTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECD
 CTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGLTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKE
 RDVVCGPSADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQ

CD137-mFc-Avi 및 CD137-Avi-His 재조합 항원에 사용하기 위한 시노물구스 CD137 서열의 아미노산 서열 (서열 번호 139)

SLQDLCSNCPAGTFCNDRNRQICSPCPNSFSSAGGORTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECD
 CISGYHCLGAECMSCEQDCKQGLTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER
 DVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ

CD137-mFc-Avi 재조합 항원에 사용하기 위한 마우스 CD137 서열의 아미노산 서열 (서열 번호 140)

AVQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNICRVCAGYFRKKFCSSSTHNAECEC
 IEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEK
 DVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSQVL

CD137-mFc-Avi 재조합 항원에 사용하기 위한 mFc-Avi의 아미노산 서열 (서열 번호 141)
 마우스 Fc 도메인 (이탈릭체) Avi 태그 (진하게)

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWVNNVEV
 HTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
 PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDSGSYFMYSKLRVEKKNW
 VERNYSYSCSVVHEGLHHHTTKSFSRTPGKGGLNDIFEAKIEWHE

[0918]

폴단원 Fcab 항체 영역의 아미노산 서열 (서열 번호 101)
TCPPCP

Fcab FS20-22-49 CH3 도메인의 대체 핵산 서열 (서열 번호 143)
GGACAGCCTCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGTACTGGGACCAG
GAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGATCAGTATAGGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGCCCTGTGCGCCGGA

FS20-22-49/FS30-5-37 종래 AA (LALA 없음) (서열 번호 144)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLNCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARSYDKYWGSSYISGLDYWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFA
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDQYRWNPADYFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPG

FS20-22-49/FS30-5-37 종래 DNA (LALA 없음) (서열 번호 145)
GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGTGGTCTCTCGCTCTGAATT
GCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGCTATGCCATGAGCTGGTGCGCTCAGGCGCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGCGATTAGCGGTAGTGGCGGTAGCACGCTACTATCGGATAGCG
TGAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGGACAAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACCTCA
CTGCGTGCGCAAGATACGGCCGTGATTACTGTGCGAGATCTTACGACAAATACTGGGGTTCTT
CTATTACTCTGGCTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGCTCTCGAGTGTAGCAC
TAAGGGCCCGTGGTCTTCCGCTGGCCCATCGTCCAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGC
CCTGGGCTGCGCTTGTAAGGATTACTTTCCGAGCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCC
CTGACCTCCGGAGTGCATCTTTCCGCGCTGTGCTTCACTCTCTGGCTGTACTATTGTCTC
CGTGGTCAACCGTCCCTTCTGCTCTCCGCGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCTAAGC
CCTCGAACACCAAGGTGACAAAGGTGAGCGCAAGTCTGCGGACAAAGACTCACACTTGGC
CGCCTTGCCCAAGCCCGGAAGTCTGGGTGGTCTTCTGCTTCTTCCGCCCCAAGCCGA
AGGATACCTGTATGATCTCACGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGACGTGTCCACG
AGGACCCGGAAGTGAATTCATTGGTACGTGGATGAGTGAAGTGACAACGCCAAGACCAA
GCCACGGGAAGAAGTACAACCTTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA
GACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCGTGCCTCAATT
GAGAAAATATCTCGAAAGCCAGGGACAGCCTCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCAT
CCCCGGATGAGTACTGGGACCAAGGAGTACAGCTGACCTGCTGCTGCTCAAAGGCTTCTATCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGATCAGTATAGGTG
GAATCCTGCTGATTATTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGA
AGAGCTGTCCCTGTGCGCCGGA

FS20-22-49/FS30-10-3 종래 AA (LALA 없음) (서열 번호 146)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKLEWVSDIDPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARDLNVYGFQYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

[0919]

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDPYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

FS20-22-49/FS30-10-3 종쇄 DNA (LALA 없음) (서열 번호 147)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCTCAATGTGTACGGGTTCGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGTAGCTAGCACTAAGGGCCCGTGGGTGTTCCC
GCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTAAGGA
TTACTTTCCCGAGCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACT
TTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAGCCCTCGAACACCAAGGTCGAC
AAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTCCCGCCTTCCCGAGCCCGGAA
CTGCTGGGTGGTCTTCGGTGTCTCTCCCGCCCAAGCCGAAGGATACCTGATGATCTCAC
GGACCCCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGTGAAATTCA
ATTGGTAGCTGGATGGAGTGGAGTGCAACAGCCAAAGCAAGCCAGGGAAGAACAGTACA
ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGA
GTACAAGTGCAAGTGCCAAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCC
AAGGGACAGCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCGGGATGAGTACTGGGAC
CAGGAAGTCAGCCTGACCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGG
GATGACAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCGCCG
GA

FS20-22-49/FS30-10-12 종쇄 AA (LALA 없음) (서열 번호 148)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKGLEWVSDIDPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYQMNSLRADTAVYYCARDLTVYGFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDPYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

FS20-22-49/FS30-10-12 종쇄 DNA (LALA 없음) (서열 번호 149)

GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCTCACGGTGTACGGGTTCGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGTGTAGCTAGCACTAAGGGCCCGTGGGTGTTCCC
GCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTAAGGA
TTACTTTCCCGAGCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACT
TTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAGCCCTCGAACACCAAGGTCGAC
AAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTCCCGCCTTCCCGAGCCCGGAA
CTGCTGGGTGGTCTTCGGTGTCTCTCCCGCCCAAGCCGAAGGATACCTGATGATCTCAC
GGACCCCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGACGTGTCCACGAGGACCCGGAAGTGAAATTCA

[0920]

ATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACA
ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGA
GTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCCTGCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCC
AAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGATGAGTACTGGGAC
CAGGAAGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTGCCCCG
GA

FS20-22-49/FS30-10-16 종쇄 AA (LALA 없음) (서열 번호 150)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYDMSWVRQAPGKLEWVSDIPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAIVYICARDLLVYGFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDQYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG

FS20-22-49/FS30-10-16 종쇄 DNA (LALA 없음) (서열 번호 151)

GAAGTGCACCTGCTGGAGTCCGGTGGTGTCTGGTACAGCCGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTAGTTACGATATGAGCTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTTAGCGATATTGATCCGACTGGTAGCAAGACCGACTATGCGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACCTCTTGGTGACGGGTTCGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTCACCGTCTCGAGTGTAGCACTAAGGGCCCGTCCGTGTTCCC
GCTGGCCCCATCTGCAAGAGCACATCAGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGGAAGGA
TTACTTTCCGAGCCCGTACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACT
TTCCCGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGAC
AAGAAGGTGAGCCGAAGTCTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCAGCCCCGGAA
CTGCTGGGTGGTCTCTCGGTTCCTCTCCCGCCCAAGCCGAAGGATACCTGATGATCTCAC
GGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGCCACGAGGACCCGGAAGTGAAATTC
ATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAAGTACA
ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGA
GTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCCTGCCCAATTGAGAAAATATCTCGAAAGCC
AAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGATGAGTACTGGGAC
CAGGAAGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGGATGAACAGTTCGCATACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCCTGCTGATTATTTCTCA
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCTGTGCCCCG
GA

FS20-22-49/FS30-35-14 종쇄 AA (LALA 없음) (서열 번호 152)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNIHWVRQAPGKLEWVSDISPYGGATNYADSVKG
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAIVYICARNLYELSAISYGADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA

[0921]

LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEYWDQEVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGDEQFAYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVQYRWNPADYFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

FS20-22-49/FS30-35-14 종래 DNA (LALA 없음) (서열 번호 153)
GAAGTGCAACTGCTGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGAGT
TGCGCGGCCAGTGGCTTTACCTTCAGTGCCTATAATATCCATTGGGTGCGTCAGGCTCCGGGCA
AAGGTCTGGAATGGGTAGCGATATTTCTCCGTATGGTGGCGCGACCAACTATCGGGATAGCGT
GAAAGGCCGTTTTACCATTTCTCGCGACAACAGCAAGAACACGCTGTACCTGCAGATGAACACAC
TGCGTGCCGAAGATACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAAACCTCTACGAGTTGAGCGCTTACTC
TTACGGGGCGGACTACTGGGGCCAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCTGCGGCTAGCACTAAGGG
CCCGTCCGTTTCCCGTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGG
CTGCCTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACC
TCCGAGTGCATATTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGCGCTGTACTATTGTCTCCCTGGT
CACCGTCCCTCTGCTCCCTGGGCAACAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATTAAGCCCTCGA
ACACCAAGGTGCGACAAGAAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTT
GCCAGCCCCGGAAGTGTGGGTGGTCTTCCGTGTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGATA
CCCTGATGATCTCAGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACC
CGGAAGTGAAATTCGAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGACACACGCAAGACCAAGCCACG
GGAAGAACAGTACAACCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACTGG
CTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGCAACAAAGCGCTGCTGCCCAATTGAGAAAA
CTATCTGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGG
ATGAGTACTGGGACAGGAAGTACGCTGACCTGCCTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGATGAACAGTTGCGATACAAAGACCACGCTCCCGTGT
GGAATCCGACGCGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCAGTATAGGTGGAATCCT
GCTGATTATTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTT
GTCCCTGTGCGCCCGGA

G1AA/FS30-10-16 mAb 의 종래의 아미노산 서열 (LALA 가짐) (서열 번호 154)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMSWVRQAPGKGLEWVSDIPTGSKTDYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLLVYGFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

G1AA/FS30-10-16 mAb 의 종래의 아미노산 서열 (서열 번호 97)
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSYSPVTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

G1AA/OX86 mAb (LALA 가짐)의 종래의 아미노산 서열 (서열 번호 155)
QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGDYYNSVLKS
RLSISRDTSKNQVFLKMNSLQDDTAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGVMTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

[0922]

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

G1/OX86 및 G1 AA/OX86 mAb 의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 156)
DIVMTQGALPNPVPSPGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLNWFLQRPQGSPQLLTYWMSTRASGVSDR
FSGSGSGTYFTLKISRVEAEDGAVYYCQVREYPTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FS20m-232-91AA/4420 (LALA 가자)의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 157)
EVKLDETGGLVQPGRPMLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLEWVAQIRNKPYNYETYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOT
YICNVNHPKNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELDFPMYYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGEPLWDYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVWRDRWEDGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

FS20m-232-91AA/4420 의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 116)
DVVMTQTLPLSPVSLGDAQISCRSSQSLVHNSNGNTYLRWYKQPGQSPKVIYKVSNRFSGVPDFR
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCQSSTHVPWTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

인간 CD137-Avi-His 의 아미노산 서열 (서열 번호 158)
세포 외 도메인 CD137 (진하계); Avi tag (아미노산); His 태그 (말줄그여짐)
SLQDPCSNCPAGTFCNNRNRQICSPCPNNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTNSAECD
CTPGFHCGLGAGCSMCEQDCKQGGELTKKGCKDCCFGTNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT
KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSGGGGLNDIFEAQKIEWHEHHHHH

G1/OX86 mAb (LALA 없음)의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 159)
QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGDIIYNSVLKS
RLSISRDTSKNQVFLKMNSLQDDTAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

항-PD-1 mAb G1AA/5C4 의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 160)
가변 도메인 (진하계)
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSV
KGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

항-PD-1 mAb G1AA/5C4 의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 161)

[0923]

가변 도메인 (진하게)

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSG
SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC**

항-PD-L1 mAb G1AA/S1의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 162)

가변 도메인 (진하게)

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

항-PD-L1 mAb G1AA/S1의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 163)

가변 도메인 (진하게)

**DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLFTPTTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC**

마우스 CD137의 아미노산 서열 (서열 번호 164)

세포외 도메인 (이탈릭체); 막관통 및 세포내 도메인 (진하게)

**VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIE
GFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTENDONGTGVCRPWNTCSLDGRSVLKTGTTEK
DVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLOVLTFLALTSALLLALIFITLLFVSLKWIRKKFPHIFKQ
PFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYEL**

G1AA/20H4.9 mAb의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 165)

VH 도메인 (이탈릭체)

**QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIQSPKGLEWIGIEINHGGYVYTNPSLESR
VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

G1AA/3H3 mAb의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 166)

VH 도메인 (이탈릭체)

**EMQLVESGGGLVQPGSRMKLSCAGSGFTLSDYGVAVWRQAPKKGLEWVAYISYAGGTTYRESVK
GRFTISRDNALSTLYLQMDSLRSEDATYYCTIDGYGGYSGSHWYFDWGPMTMTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

[0924]

G1AA/3H3 및 G1/3H3 mAbs 및 FS20m-232-91AA/3H3 mAb²의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 167)

VL 도메인 (이탈릭체)

DIQMTQSPSLLSASVGDRTVLTNCRTSQNVYKNLAWYQQQLGEAPKLLIYNANSLQAGIPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDVATYFCQQYYSGNTFGAGTNLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

G1/3H3 mAb의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 168)

VH 도메인 (이탈릭체)

EMQLVESGGGLVQPGSRMKLSCAGSGFTLSDYGVAVWRQAPKKGLEWVAYISYAGGTTYRESVK
GRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDATYYCTIDGYGGYSGSHWYDFWGPMTMTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FS20m-232-91AA/3H3 (LALA 가짜)의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 169)

VH 도메인 (이탈릭체)

EMQLVESGGGLVQPGSRMKLSCAGSGFTLSDYGVAVWRQAPKKGLEWVAYISYAGGTTYRESVK
GRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDATYYCTIDGYGGYSGSHWYDFWGPMTMTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELFDPMYYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGEP
LWDYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

환-QX40 mAb G1AA/11D4의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 173)

VH 도메인 (이탈릭체)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIDYADSVKG
RFTISRDNASTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELRFYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPDIFPNGLNYKTTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTPYPSWLMGTRFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

환-QX40 mAb G1/11D4의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 174)

VH 도메인 (이탈릭체)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIDYADSVKG
RFTISRDNASTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELRFYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPDIFPNGLNYKTTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTPYPSWLMGTRFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

환-QX40 mAbs G1AA/11D4 및 G1/11D4의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 번호 175)

VL 도메인 (이탈릭체)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

[0925]

[0926]

참고문헌

[0927] 본 명세서에 언급된 모든 문서는 전문이 본원에 참고로 포함된다.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-10 (1990).

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-402 (1997).

Aspeshlagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria JC, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur. J. Cancer* 52, 50-66 (2016).

Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniow P, Rogers GT, Burke PJ, Melton R. Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4, 915-22 (1991).

Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB agonists: multi-potent potentiators of tumor immunity. *Front. Oncol.* 5, 117 (2015).

Bartkowiak T, Jaiswal AR, Ager CR, Chin R, Chen C-H, Budhani P, Ai M, Reilley MJ, Sebastian MM, Hong DS, Curran MA. Activation of 4-1BB on liver myeloid cells triggers hepatitis via an interleukin-27 dependent pathway. *Clin. Cancer Res.* 24(5), 1138-51 (2018).

Bedzyk WD, Johnson LS, Riordan GS, Voss EW Jr. Comparison of variable region primary structures within an anti-fluorescein idiotypic family. *J. Biol. Chem.* 264(3), 1565-69 (1989).

Bedzyk WD, Weidner KM, Denzin LK, Johnson LS, Hardman KD, Pantoliano MW, Asel ED, Voss EW Jr. Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody. *J. Biol. Chem.* 265(30), 18615-20 (1990).

Braden BC, Fields BA, Ysem X, Goldbaum FA, Dall'Acqua W, Schwarz FP, Poljak RJ, Mariuzza RA. Crystal structure of the complex of the variable domain of antibody D1.3 and turkey egg white lysozyme: a novel conformational change in antibody CD3-L3 selects for antigen. *J. Mol. Biol.* 257(5), 889-94 (1996).

Bremer E. Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy. *ISRN Oncol.* 2013, 1-25 (2013).

Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daéron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16), 3716-25 (2009).

Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, Wilson DS, Dranoff G, Brogdon JL. Activating Fcγ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J. Exp. Med.* 210(9), 1685-93 (2013).

Bulliard Y, Jolicoeur R, Zhang J, Dranoff G, Wilson NS, Brogdon JL. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγRs, leading to antitumor efficacy. *Immunol. Cell Biol.* 92(6), 475-80 (2014).

Chan RC, Ong EZ, Mok DZ, Ooi EE. Fc receptors and their influence on efficacy of therapeutic antibodies for treatment of viral diseases. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 13(11), 1351-60 (2015).

Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* 229(1), 173-91 (2009).

Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function – unanswered questions and future directions. *Semin. Immunol.* 26(3), 183-90 (2014).

[0928]

- Curti BD, Kovacs-Rowe M, Morris N, Walker E, Chisholm L, Floyd K, Walker J, Gonzalez I, Meeuwse T, Fox BA, Moudgil T, Miller W, Haley D, Coffey T, Fisher B, Delanty-Miller L, Rymarchyk N, Kelly T, Crocenzi T, Bernstein E, Sanborn R, Urba WJ, Weinberg AD. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* 73(24), 7189-98 (2013).
- Dubrot J, Milheiro F, Alfaro C, Palazón A, Martínez-Forero I, Pérez-Gracia JL, Morales-Kastresana A, Romero-Trejo JL, Ochoa MC, Hervás-Stubbs S, Prieto J, Jure-Kunkel M, Chen L, Melero I. Treatment with anti-CD137 mAbs cause intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol. Immunother.* 59(8), 1223-33 (2010).
- Glisson BS, Leidner R, Ferris RL, Powderly J, Rizvi N, Norton JD, Burton J, Lanasa MC, Patel SP. Phase 1 study of MEDI0562, a humanized OX40 agonist monoclonal antibody (mAb), in adult patients (pts) with advanced solid tumours. *Ann. Oncol.* 27(suppl_6), 1052PD (2016).
- Gopal A, Levy R, Houot R, Patel S, Hatake K, Popplewell L, Chen Y, Davis C, Huang B, Cesari R, Thall A, Woolfson A, Bartlett N. A phase I study of utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 agonist, in combination with rituximab in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol.* 35, 260 (2017).
- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G, Ling NR, Lowe J, Walker MR, Phillips DJ, Aloisio CH, Wells TW. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 1, 223-52 (1985).
- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, Phillips DJ, Vluga A, Harada S, Radl J. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 31(2), 143-68 (1992).
- Hezareh M, Hessel AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75(24), 12161-8 (2001).
- Hirschhorn-Cymerman D, Rizzuto GA, Merghoub T, Cohen AD, Avogadri F, Lesokhin AM, Weinberg AD, Wolchok JD, Houghton AN. OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 206(5), 1103-16 (2009).
- Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23(9), 1126-36 (2005).
- Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 56(13), 3055-61 (1996).
- Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.* 164(8), 4178-84 (2000).
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services (1991).
- Kjaergaard J, Tanaka J, Kim JA, Rothchild K, Weinberg A, Shu S. Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res.* 60(19), 5514-21 (2000).
- Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *MAbs* 8(6), 1010-20 (2016).

[0929]

- Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD. A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response. *Int. J. Cancer* 47(5), 659-64 (1991).
- Lee SJ, Myers L, Muralimohan G, Dari J, Qiao Y, Li Z, Mittler RS, Vella AT. 4-1BB and OX40 dual costimulation synergistically stimulate primary specific CD8 T cells for robust effector function. *J. Immunol.* 173(5), 3002-12 (2004).
- Lefranc MP, Pommié C, Kaas Q, Duprat E, Bosc N, Guiraudou D, Jean C, Ruiz M, Da Piédade I, Rouard M, Foulquier E, Thouvenin V, Lefranc G. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29(3), 185-203 (2005).
- Lefranc MP, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles A, Paysan-Lafosse T, Hadi-Saljoqi S, Sasorith S, Lefranc G, Kossida S. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue), D413-22 (2015).
- Liu C, Workman CJ, Vignali DA. Targeting regulatory T cells in tumors. *FEBS J.* 283(14), 2731-48 (2016).
- Ma BY, Mikolajczak SA, Danesh A, Hosiawa KA, Cameron CM, Takaori-Kondo A, Uchiyama T, Kelvin DJ, Ochi A. The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells. *Blood* 106(6), 2002-10 (2005).
- Mayes PA, Hance KW, Hoos A. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 509-27 (2018).
- Melero I, Hirschhorn-Cymerman D, Morales-Kastresana A, Sanmamed MF, Wolchok JD. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin. Cancer Res.* 19(5), 1044-53 (2013).
- Milas L, Wike J, Hunter N, Volpe J, Basic I. Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability. *Cancer Res.* 47(4), 1069-75 (1987).
- Miller L, Rymarchyk N, Kelly T, Crocenzi T, Bernstein E, Sanborn R, Urba WJ, Weinberg AD. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* 73(24), 7189-98 (2013).
- Moran AE, Kovacsics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 25(2), 230-7 (2013).
- Müller N, Wyzgol A, Münkler S, Pfizenmaier K, Wajant H. Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J.* 275(9), 2296-304 (2008).
- Nizar S, Copier J, Meyer B, Bodman-Smith M, Galustian C, Kumar D, Dalgleish A. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Br. J. Cancer* 100(11), 1697-703 (2009).
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12(4), 252-264 (2012).
- Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(8), 2444-8 (1988).
- Petty JK, He K, Corless CL, Vetto JT, Weinberg AD. Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *Am. J. Surg.* 183(5), 512-8 (2002).

[0930]

- Powell DJ Jr, de Vries CR, Allen T, Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. Inability to mediate prolonged reduction of regulatory T cells after transfer of autologous CD25-depleted PBMC and interleukin-2 after lymphodepleting chemotherapy. *J. Immunother.* 30(4), 438-47 (2007).
- Qui HZ, Hagymasi AT, Bandyopadhyay S, St Rose M-C, Ramanarasimhaiah R, Menoret A, Mittler RS, Gordon SM, Reiner SL, Vella AT, Adler AJ. CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation. *J. Immunol.* 187(7), 3555-64 (2011).
- Rosenberg S. Development of Cancer Vaccines. ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000).
- Ryan JM, Mittal P, Menoret A, Svedova J, Wasser JS, Adler AJ, Vella AT. A novel biologic platform elicits profound T cell costimulatory activity and antitumor immunity in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 67(4), 605-13 (2018).
- Sadun RE, Hsu WE, Zhang N, Nien YC, Bergfeld SA, Sabzevari H, Lutsiak ME, Khawli L, Hu P, Epstein AL. Fc-mOX40L fusion protein produces complete remission and enhanced survival in 2 murine tumour models. *J. Immunother.* 31(3), 235-45 (2008).
- Sanchez-Paulete AR, Labiano S, Rodriguez-Ruiz ME, Azpilikueta A, Etxeberria I, Bolaños E, Lang V, Rodriguez M, Aznar MA, Jure-Kunkel M, Melero I. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 46(3), 513-22 (2016).
- Schaer DA, Hirschhorn-Cymerman D, Wolchok JD. Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* 2, 7 (2014).
- Segal NH, Logan TF, Hodi FS, McDermott D, Melero I, Hamid O, Schmidt H, Robert C, Chiarion-Sileni V, Ascierto PA, Maio M, Urba WJ, Gangadhar TC, Suryawanshi S, Neely J, Jure-Kunkel M, Krishnan S, Kohrt H, Sznol M, Levy R. Results from an integrated safety analysis of urelumab, an agonist anti-CD137 monoclonal antibody. *Clin. Cancer Res.* 23(8), 1929-36 (2017).
- Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210(9), 1695-710 (2013).
- Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147(1), 195-7 (1981).
- Stewart R, Hammond SA, Oberst M, Wilkinson RW. The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J. Immunother. Cancer* 2(29) (2014).
- Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K, Ishii N. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J. Immunol.* 172(6), 3580-9 (2004).
- Taraban VY, Rowley TF, O'Brien L, Chan HT, Haswell LE, Green MH, Tutt AL, Glennie MJ, Al-Shamkhani A. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur. J. Immunol.* 32(12), 3617-27 (2002).
- Tolcher AW, Sznol M, Hu-Lieskova S, Papadopoulos K P, Patnaik A, Rasco DW, Di Gravio D, Huang B, Gambhire D, Chen Y, Thall AD, Pathan N, Schmidt EV, Chow LQM. Phase Ib study of utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 agonist, in combination with pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 23(18), 5349-57 (2017).
- Tran B, Carvajal RD, Marabelle A, Patel SP, LoRusso P, Ramussen E, Juan G, Upreti VV, Ngarmchamnarnrith G, Schöffski P. Dose escalation results from a first-in-human, phase 1 study of the glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR) agonist AMG 228 in patients (Pts) with advanced solid tumours. *J. Clin. Oncol.* 35(15_suppl), 2521 (2017).
- Vanamee ES, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci. Signal.* 11(511), 1-12 (2018).
- Vetto JT, Lum S, Morris A, Sicotte M, Davis J, Lemon M, Weinberg A. Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *Am. J. Surg.* 174(3), 258-65 (1997).
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8(7), 523-32 (2008).
- Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ.* 22(11), 1727-41 (2015).
- Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9(1), 63-73 (2018).
- Weigelin B, Bolaños E, Rodriguez-Ruiz ME, Martinez-Forero I, Friedl P, Melero I. Anti-CD137 monoclonal antibodies and adoptive T cell therapy: a perfect marriage? *Cancer Immunol. Immunother.* 65(5), 493-7 (2016).
- Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J. Immunol.* 168(10), 4897-906 (2002).
- Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, Salazar-Mather TP, Ayala CA, Ayala A. CD8+ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. *Am. J. Pathol.* 171(1), 87-96 (2007).
- Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, Johnson AJ, Tamada K, Chapoval AI, Strome SE, Pease LR, Chen L. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J. Clin. Invest.* 109(5), 651-9 (2002).
- Wozniak-Knopp G, Bartl S, Bauer A, Mostageer M, Woisetschlager M, Antes B, Etti K, Kainer M, Weberhofer G, Wiederkum S, Himmler G, Mudde GC, Rüker F. Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 23(4), 289-97 (2010).

도면 1b

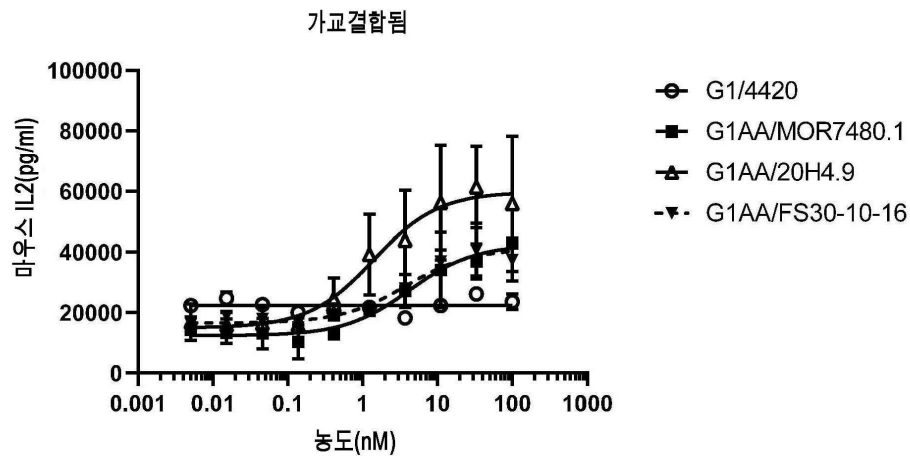
[illegible]

도면1c

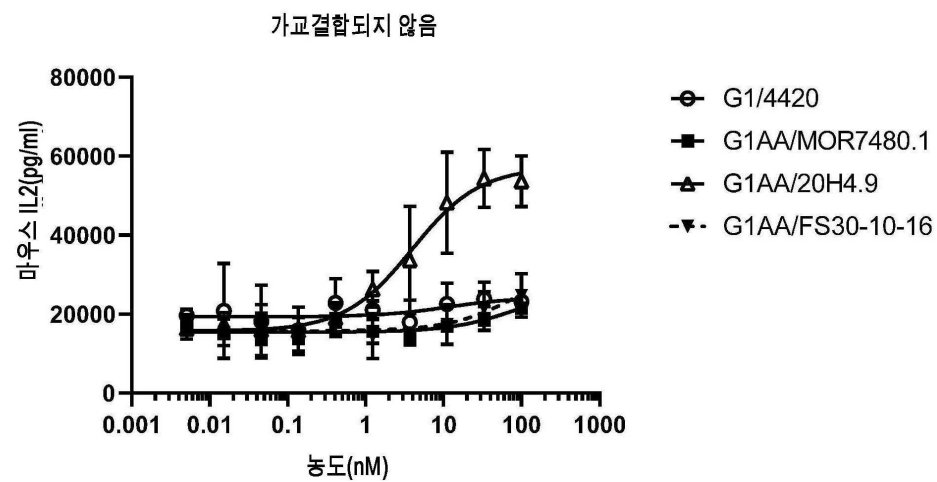
IMGT	92	413	73	444	445	414	74	93	94	95	96	97	98	99	100	101	101.1	101.2	101.3	101.4	102	423	83	454	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	470	439	99	119	120	440	100	471	S	L	S	L	472	441	101	121	122	442	102	473	S	L	S	L	474	443	103	123	124	444	104	475	S	P	G	476	445	105	125	129	CHS106	446	477	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														

도면2ab

A

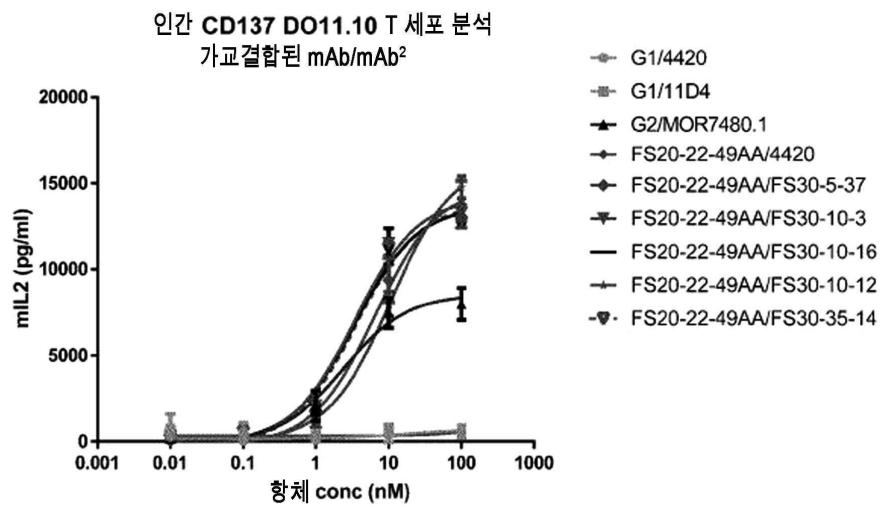


B

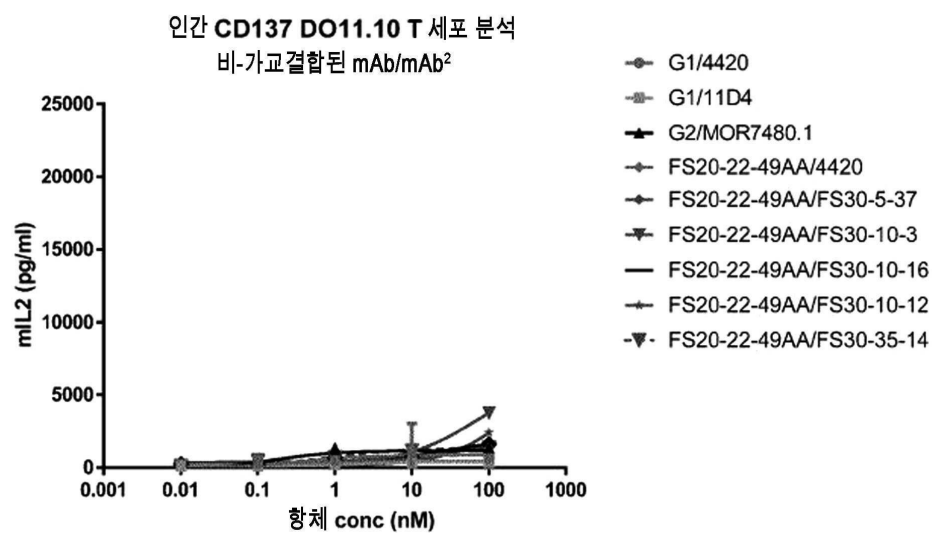


도면2cd

C

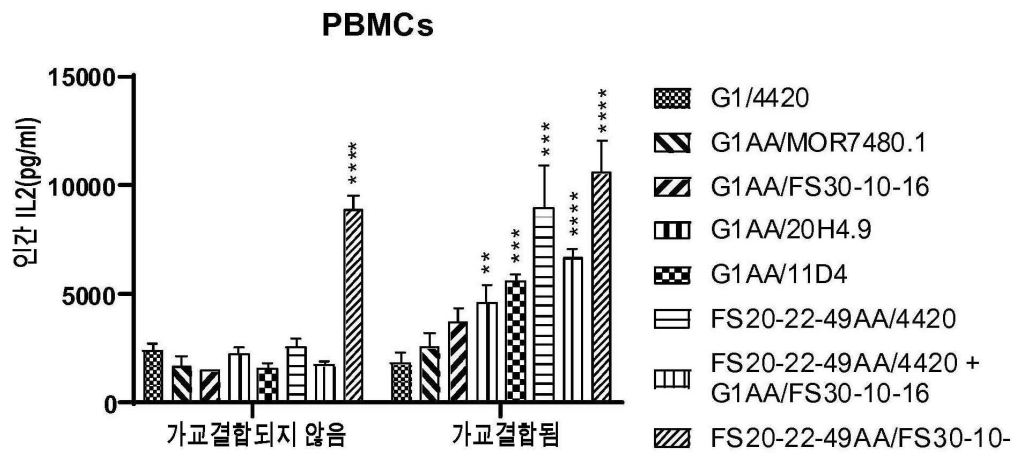


D

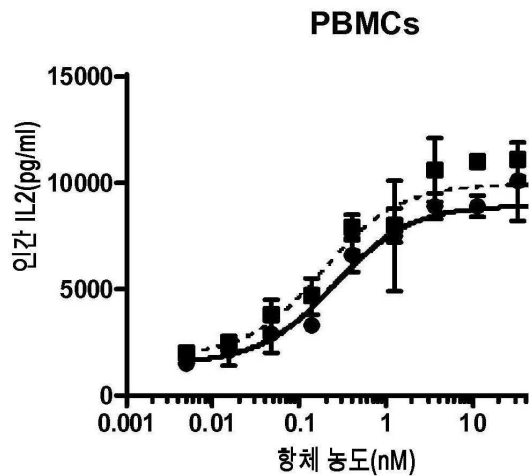


도면3ab

A

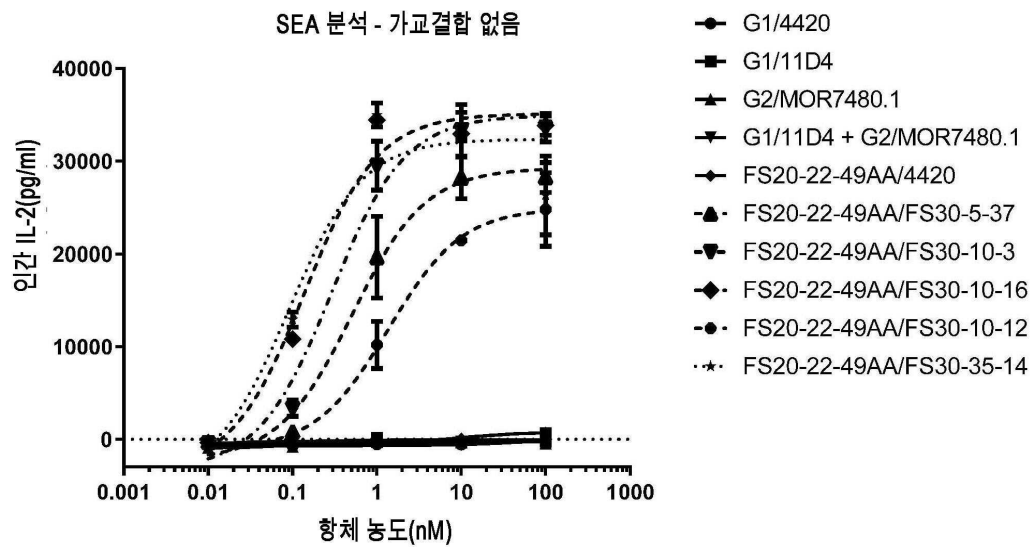


B

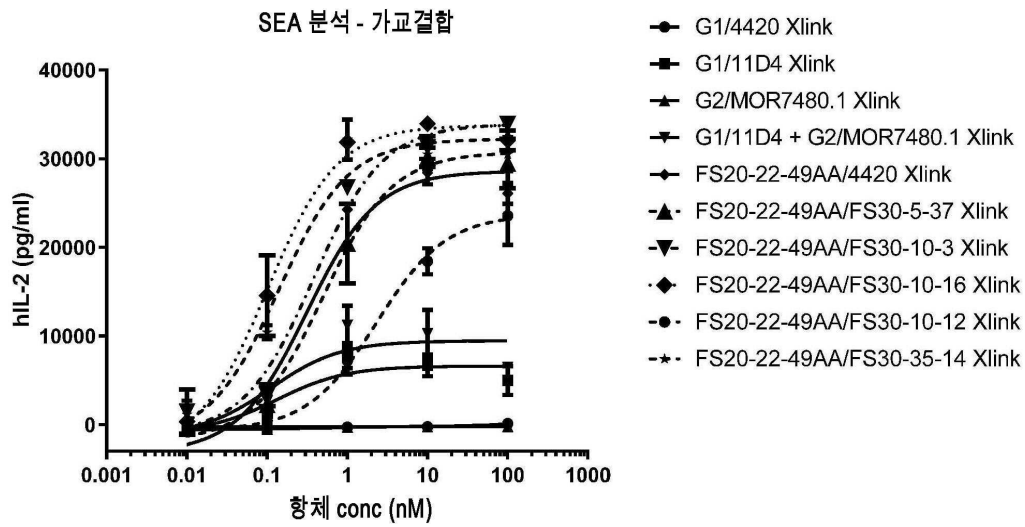


도면3cd

C

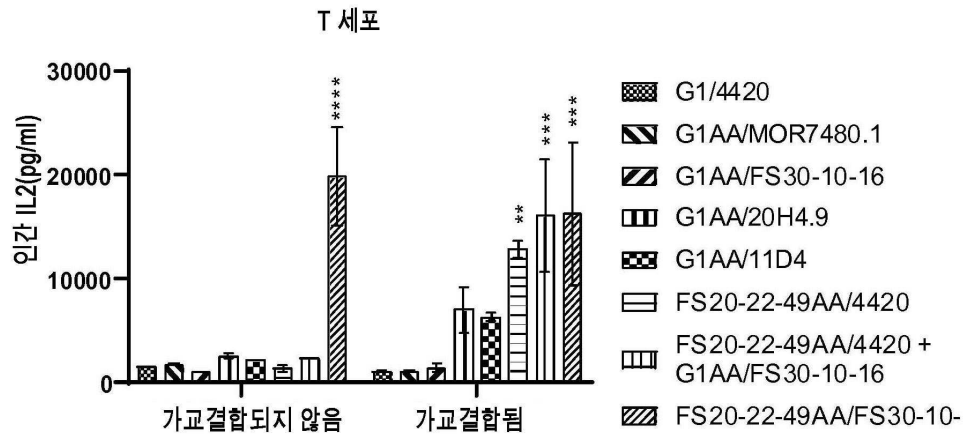


D

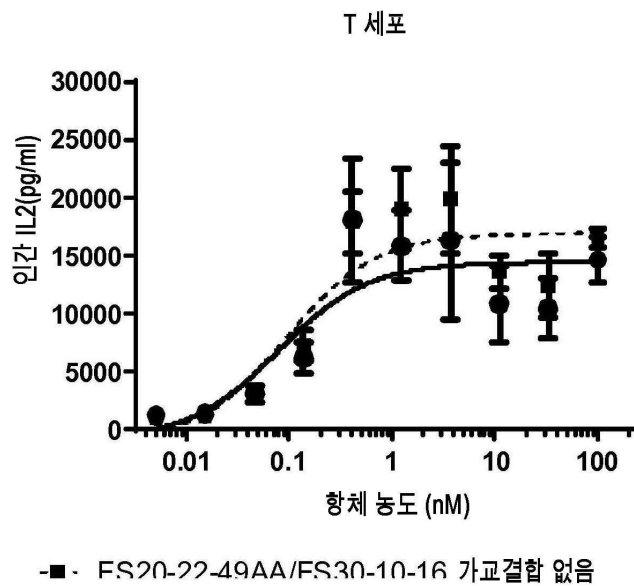


도면4ab

A

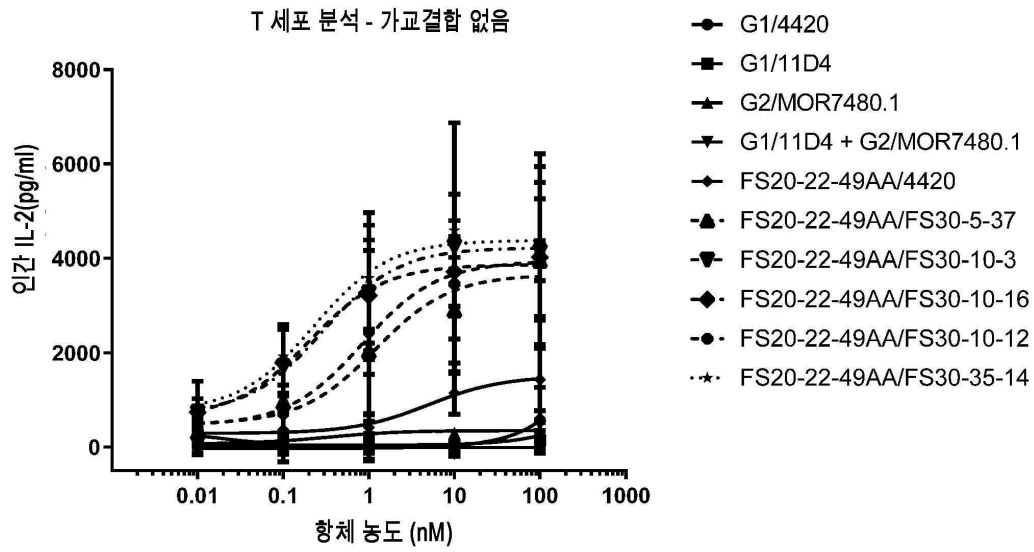


B

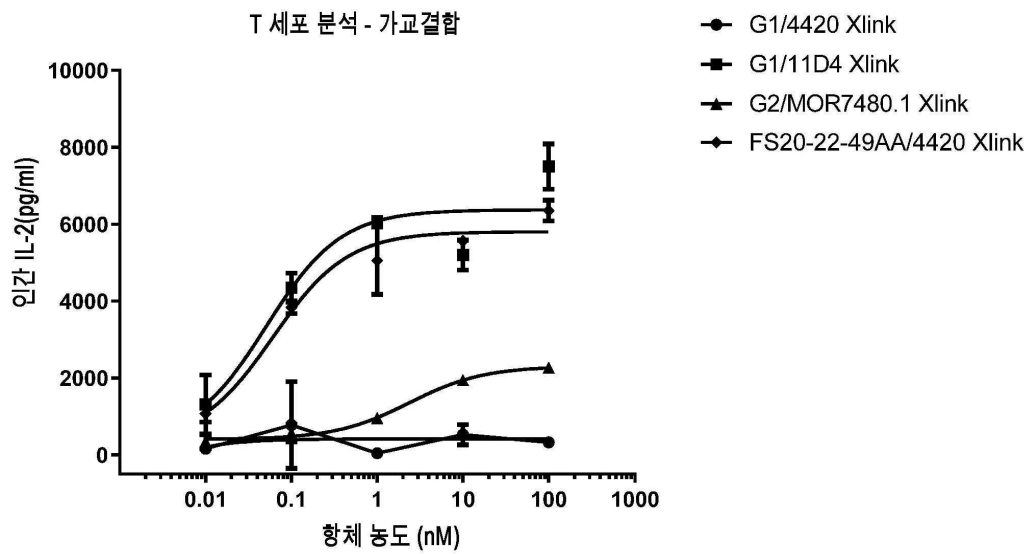


도면4cd

C

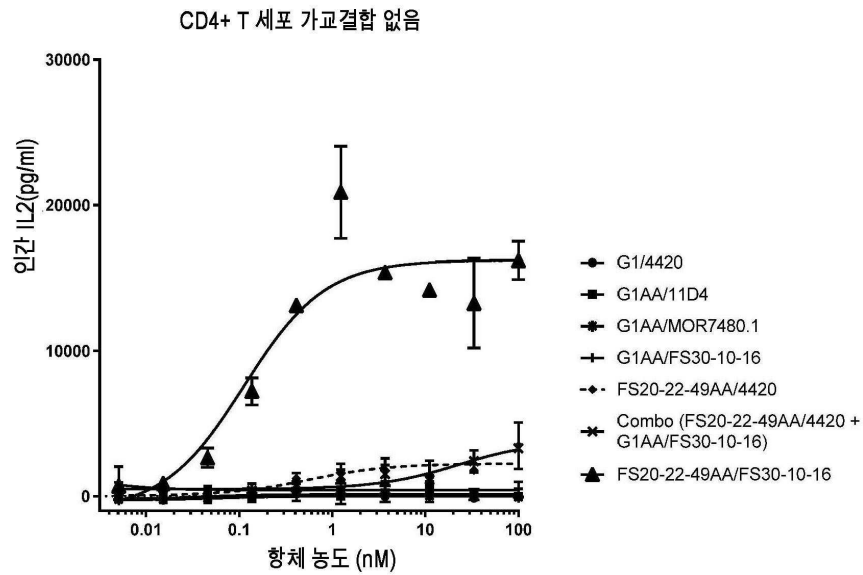


D

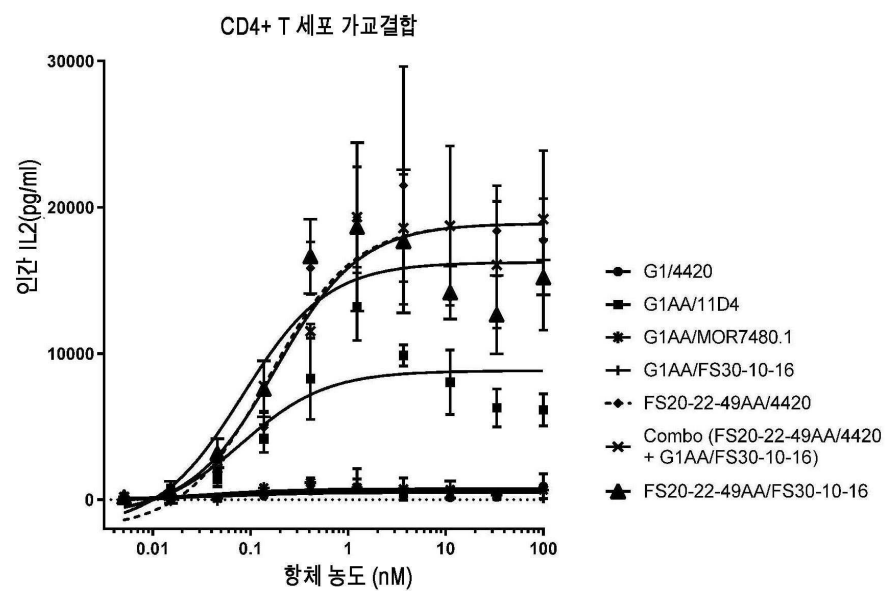


도면5ab

A

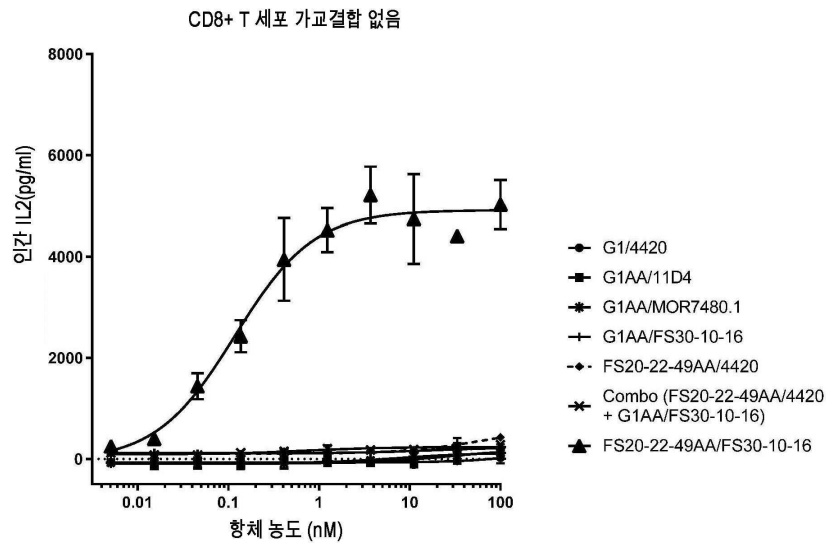


B

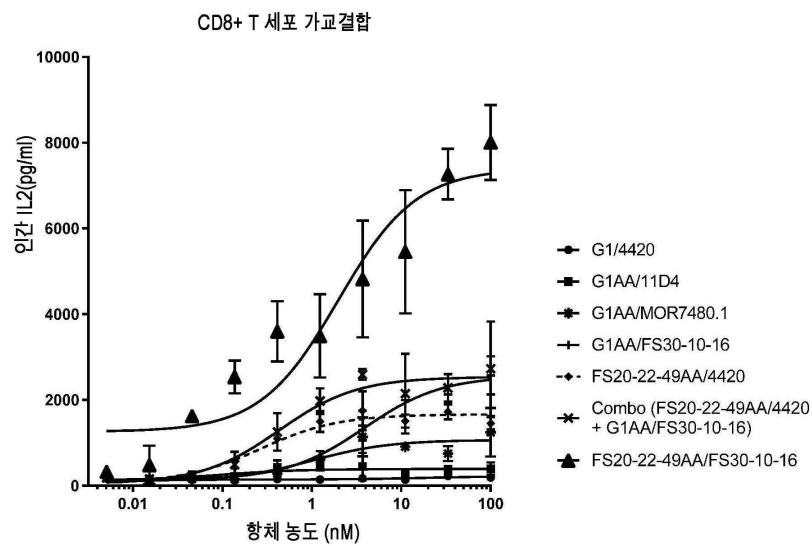


도면5cd

C

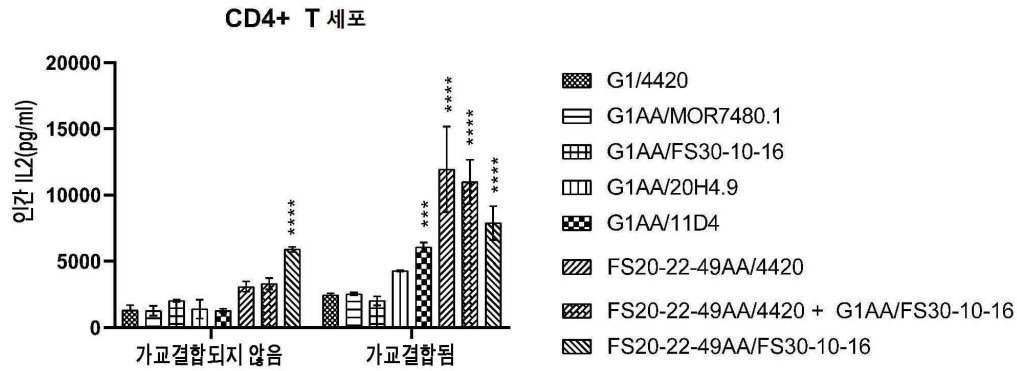


D

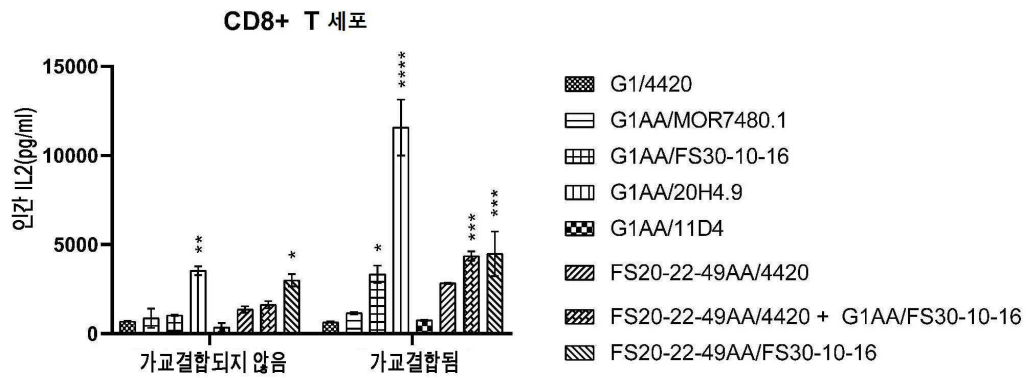


도면5ef

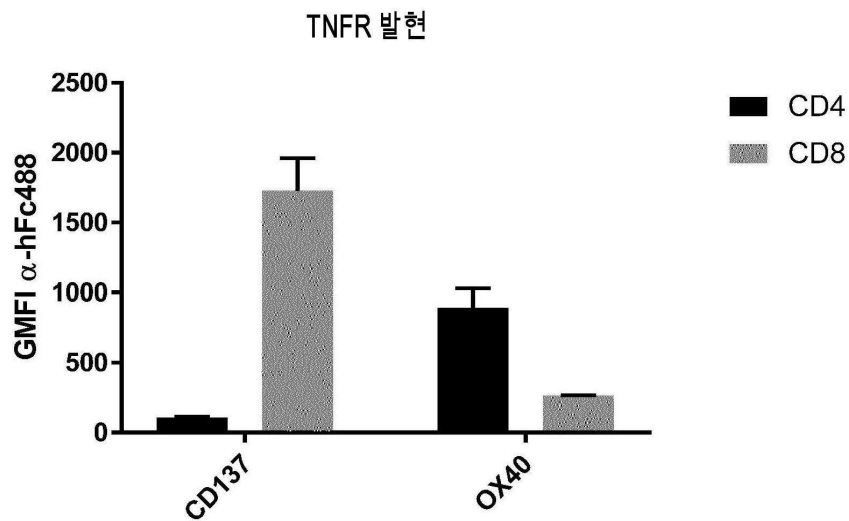
E



F

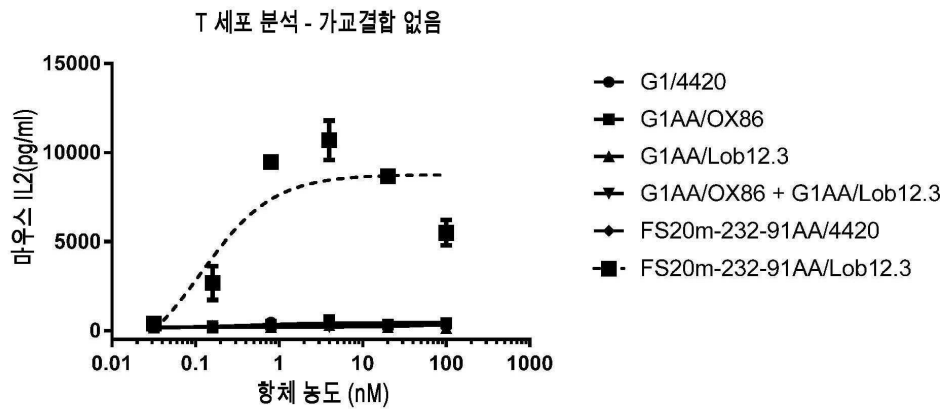


도면6

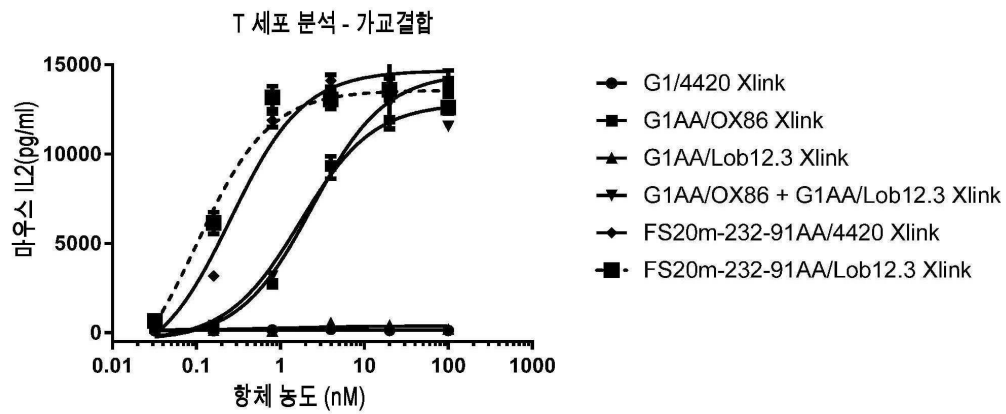


도면7ab

A

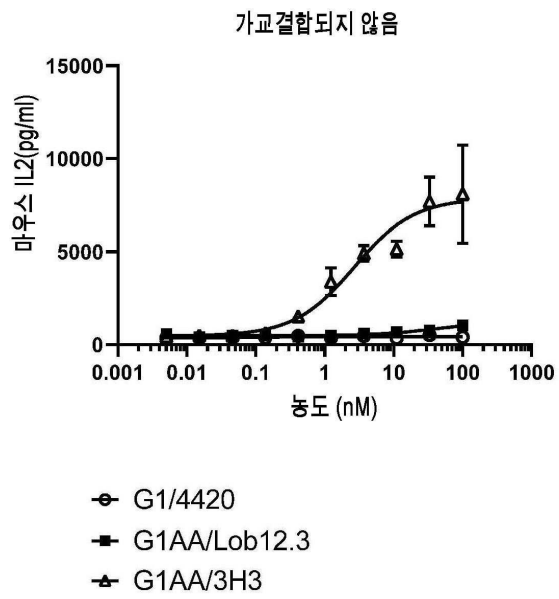


B

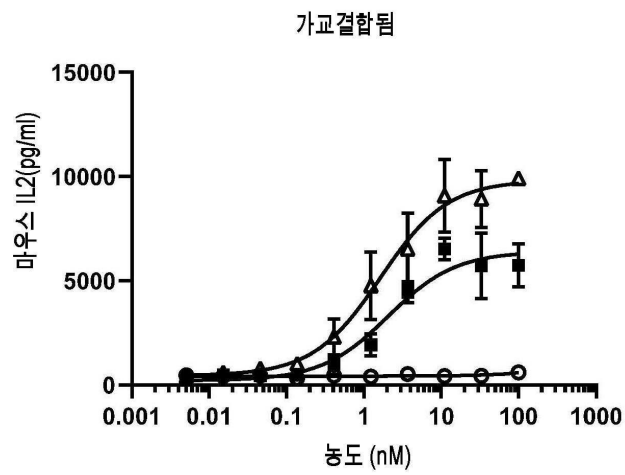


도면7cd

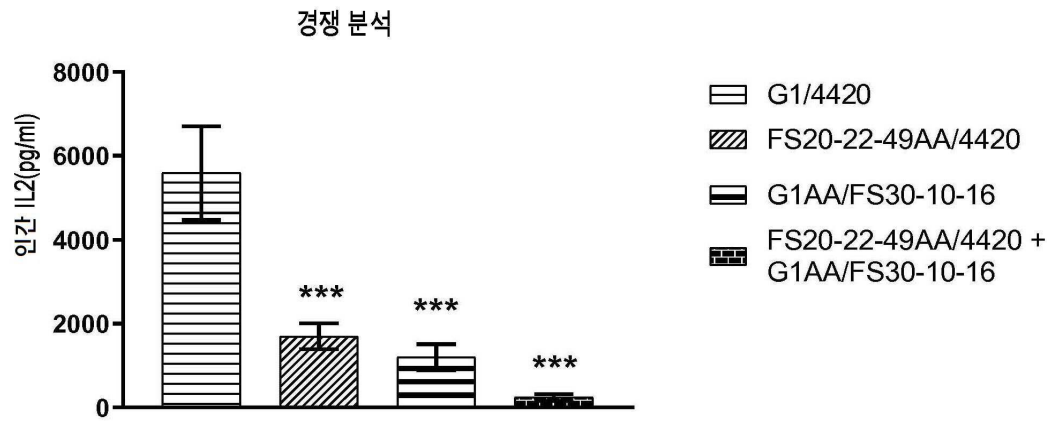
C



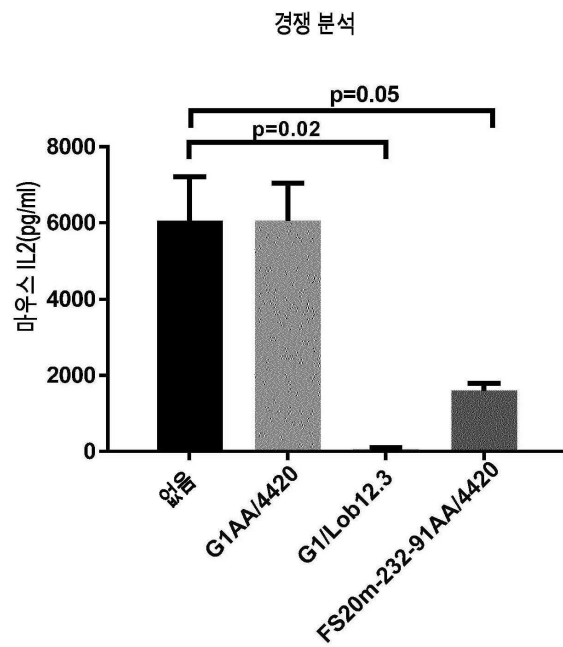
D



도면8

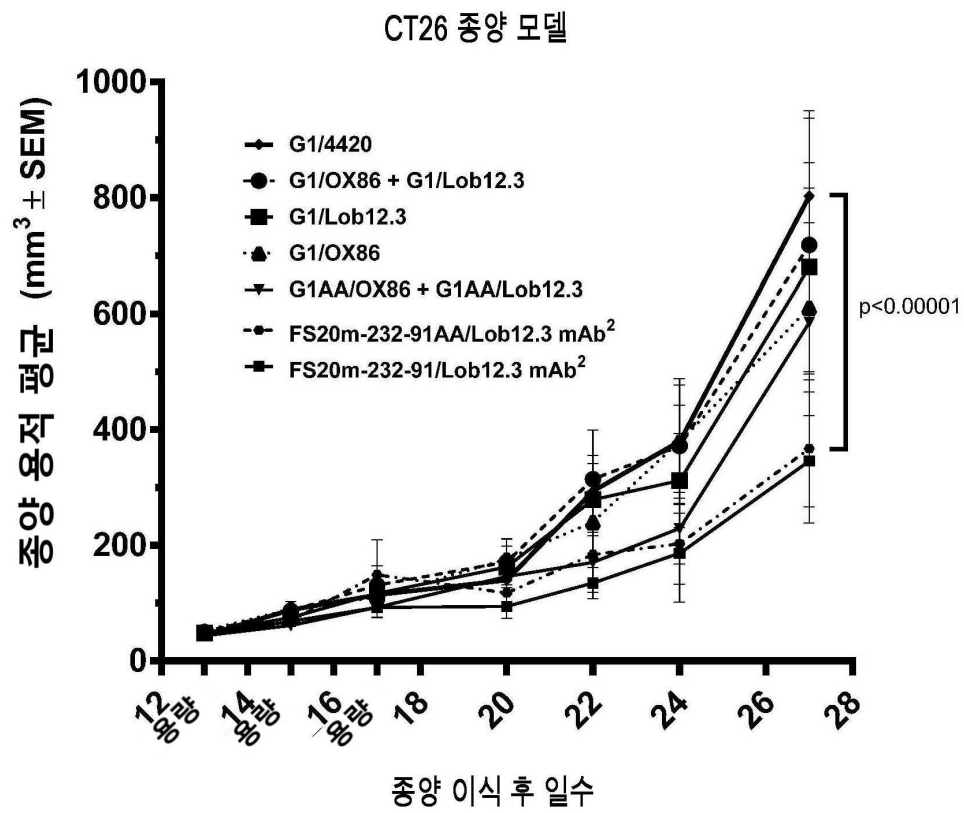


도면9

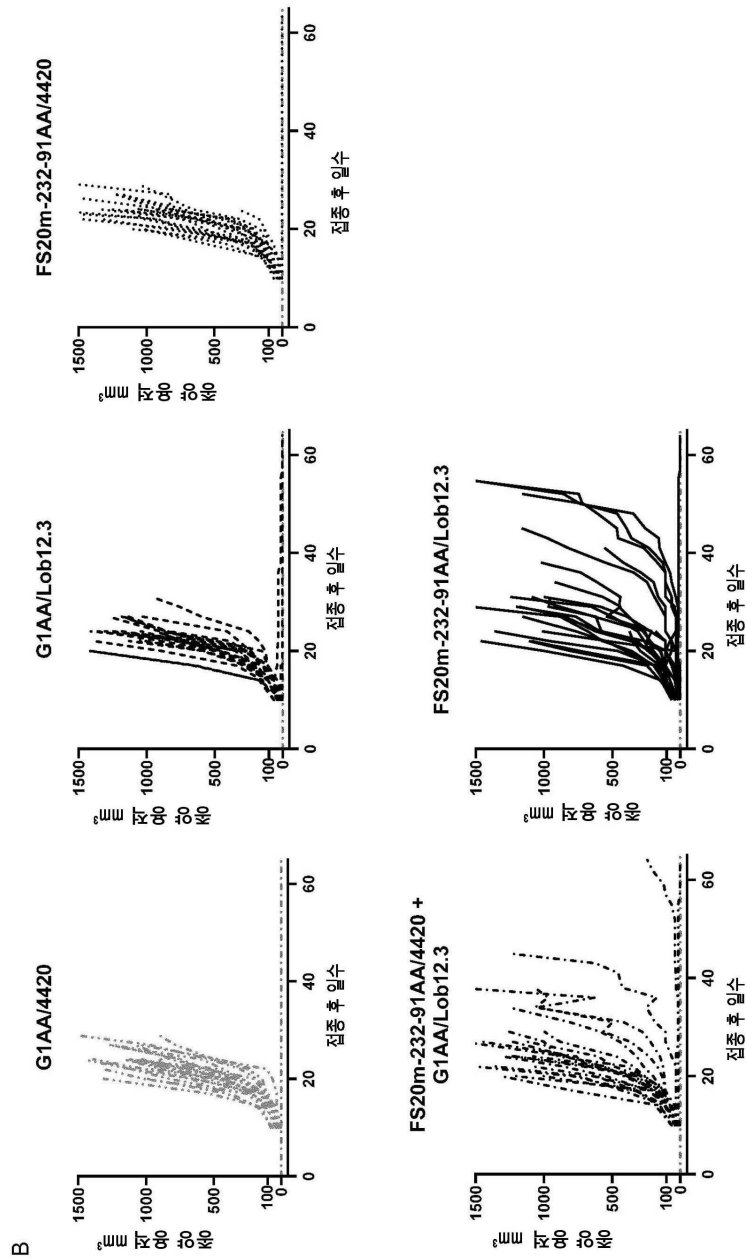


도면10a

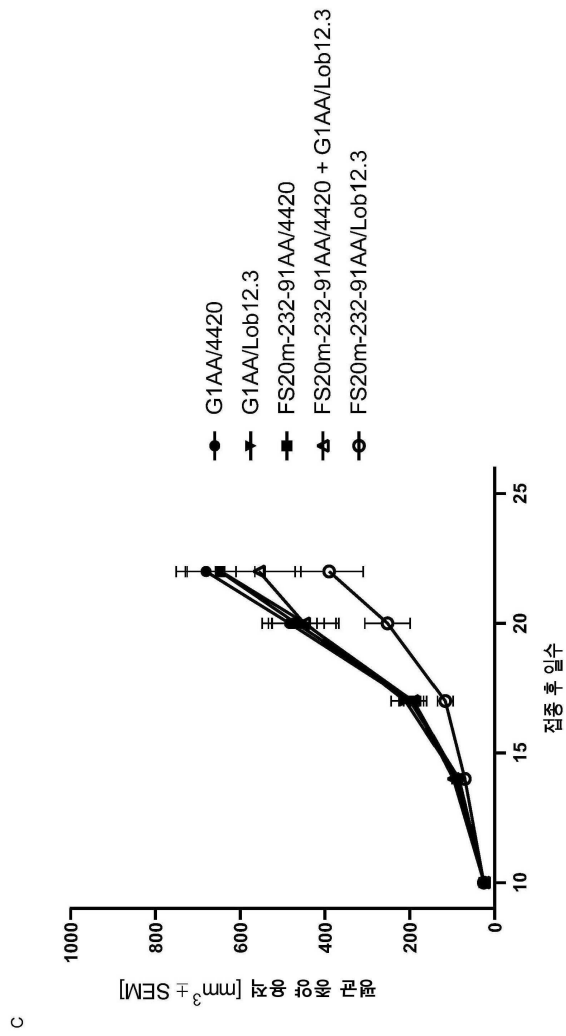
A



도면10b

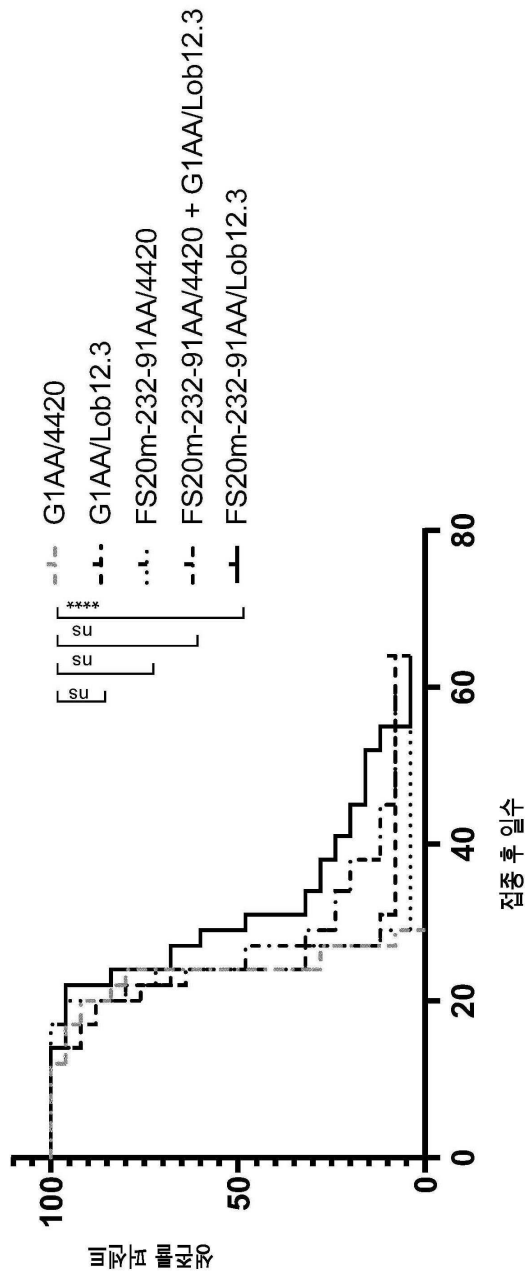


도면10c

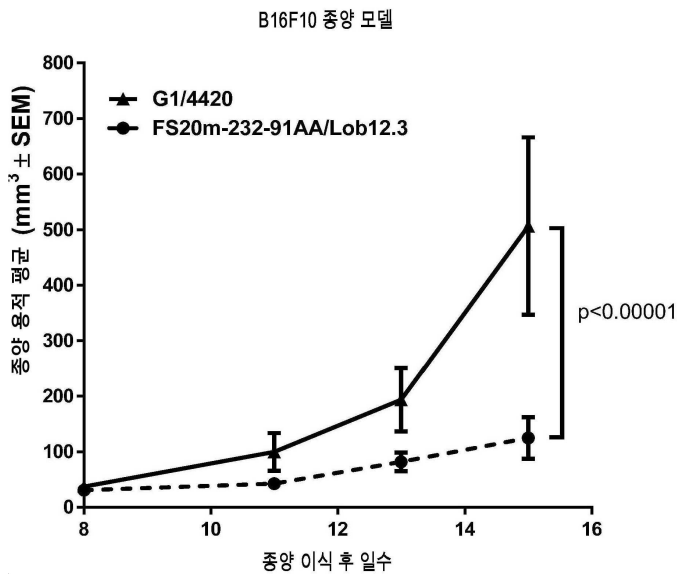


도면10d

D



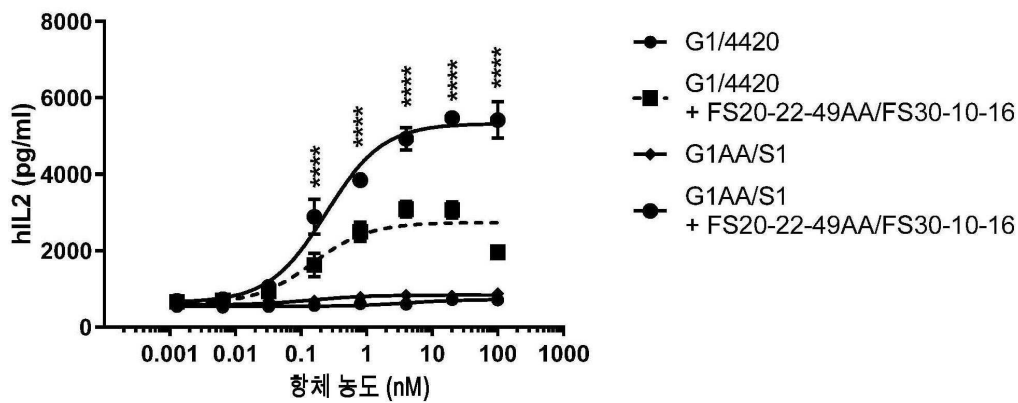
도면11



도면12

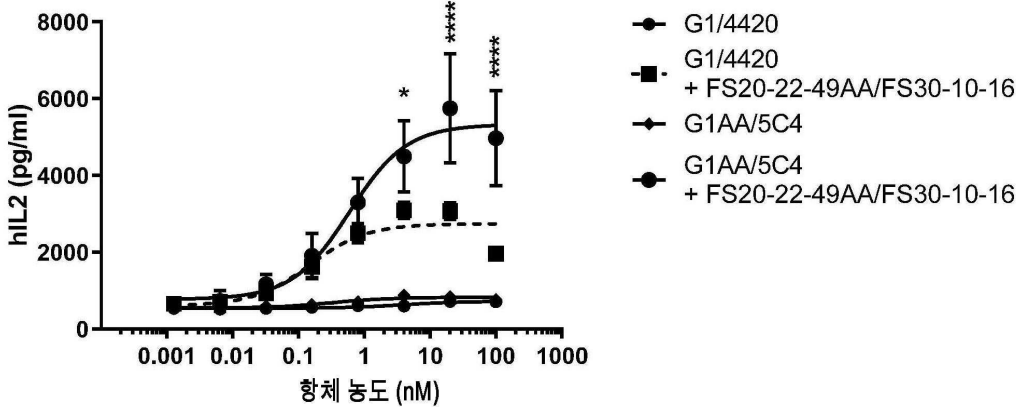
A

OX40/CD137 mAb² + PD-L1 차단제

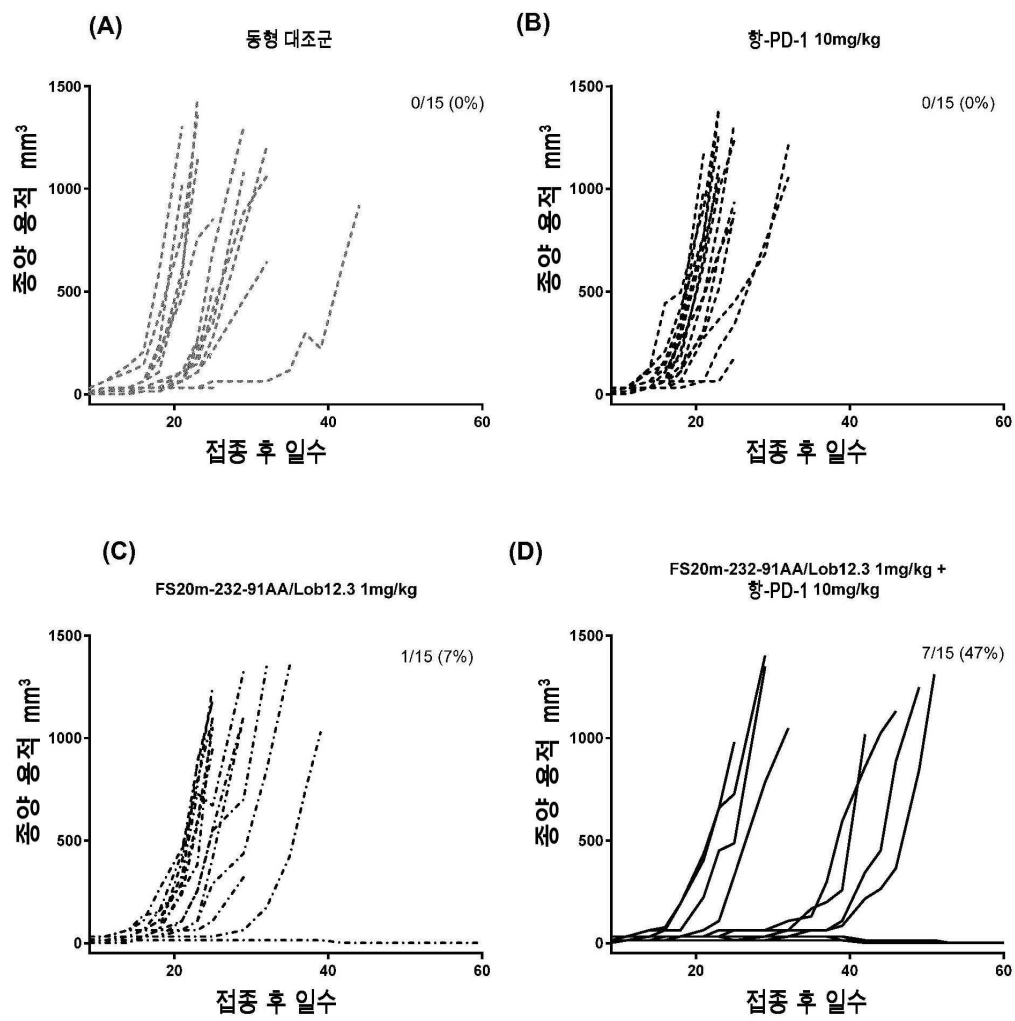


B

OX40/CD137 mAb² + PD-L1 차단제

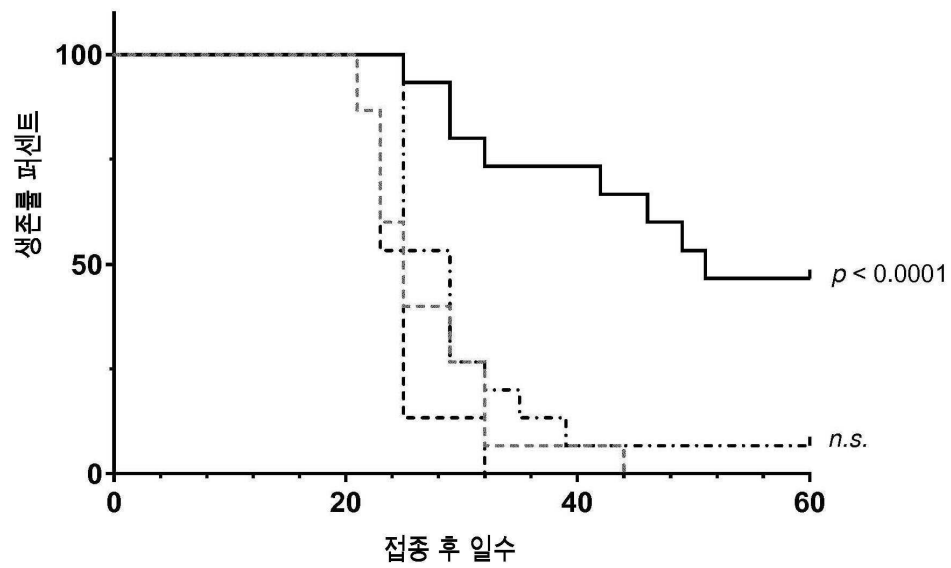


도면13a



도면13b

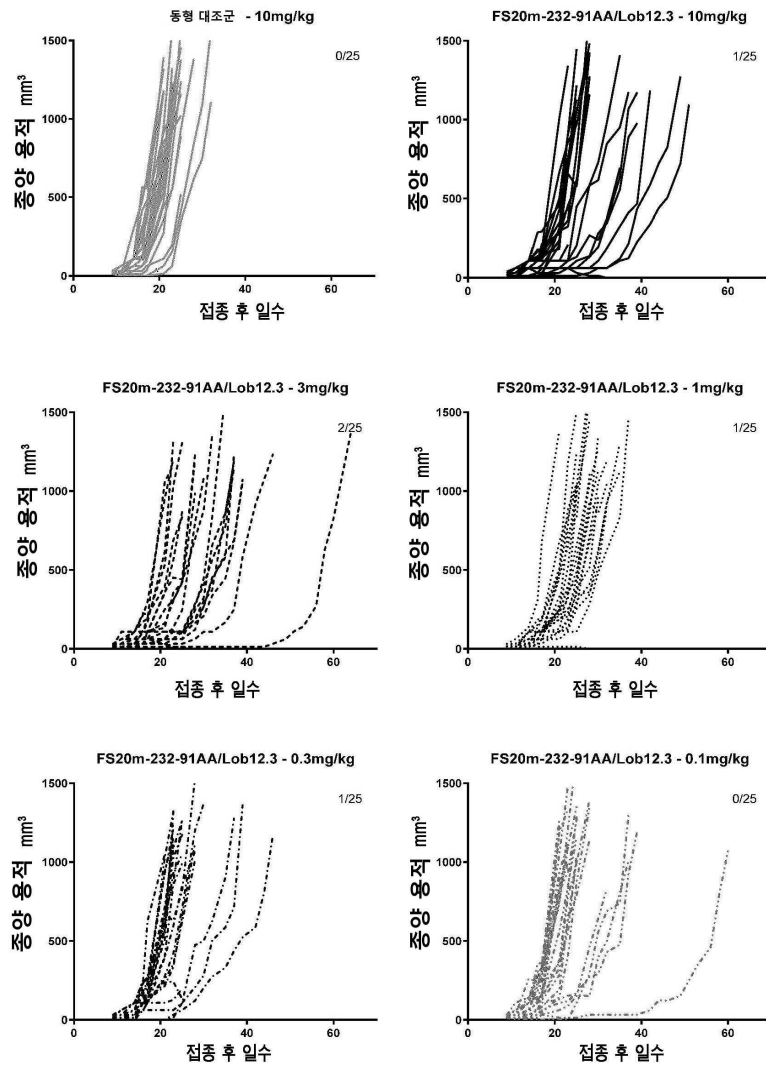
E



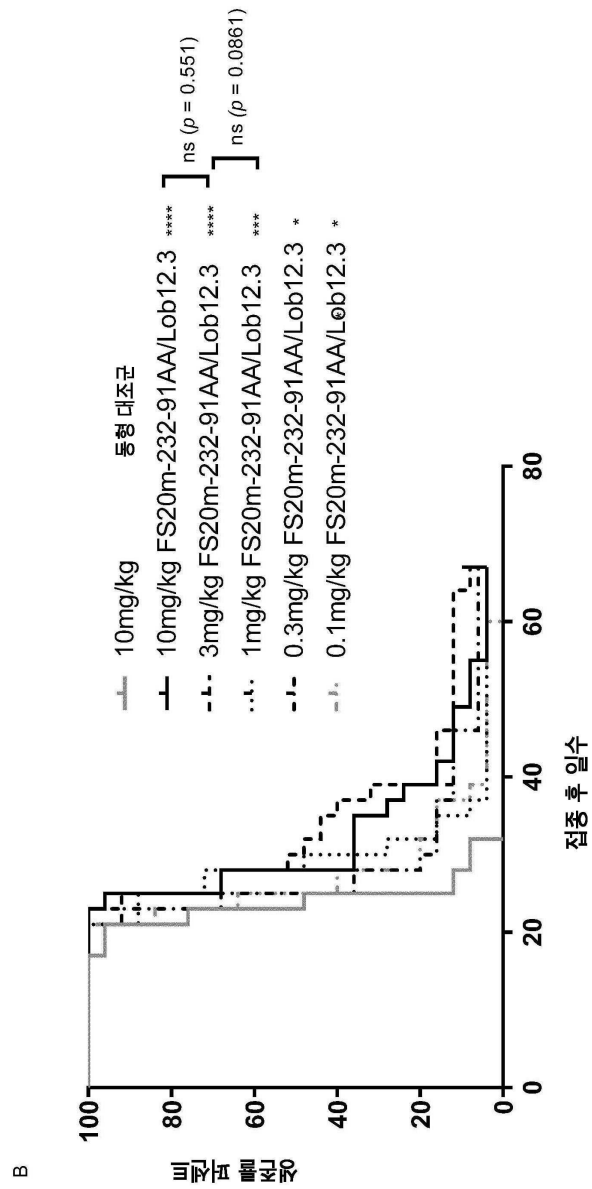
- - 동형 대조군
- - 항-PD-1 10mg/kg
- · FS20m-232-91AA/Lob12.3 1mg/kg
- 항-PD-1 10mg/kg + FS20m-232-91AA/Lob12.3 1mg/kg

도면14a

A



도면14b



도면15

