



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월12일

(11) 등록번호 10-1340699

(24) 등록일자 2013년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7012371

(22) 출원일자(국제) 2006년11월27일

심사청구일자 2011년10월26일

(85) 번역문제출일자 2008년05월23일

(65) 공개번호 10-2008-0080503

(43) 공개일자 2008년09월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/045522

(87) 국제공개번호 WO 2007/062245

국제공개일자 2007년05월31일

(30) 우선권주장

60/739,659 2005년11월25일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

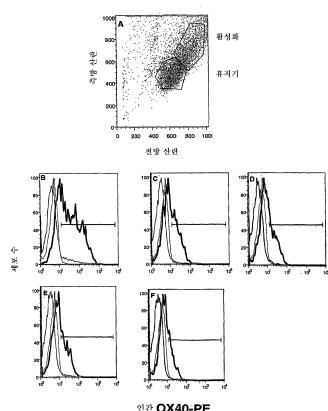
US20040136995 A1

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 인간 모노클로날 항체 인간 CD134 (OX40) 및 이의 제조 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 OX40 항체, 항-OX40 또는 항-OX40 항체라고 지칭될 수 있는, OX40 (CD134)에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. OX40에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 포유동물 (인간, 영장류 등), 인간화 및 키메라 항-OX40 항체를 포함한다. OX40에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 및 항체 하위서열 (단편)은 정제되고 단리된 항체 뿐만이 아니라 그의 제약 제제까지도 포함하며, 치료 방법, 스크리닝 방법 및 검출 방법을 비롯한 각종 방법에 유용하다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

요시다, 히또시

일본 370-1295 군마肯 다까사끼 미야하라쵸 3

크로프트, 마이클

미국 92128 캘리포니아주 샌디에고 월밍턴 로드

11878

특허청구의 범위

청구항 1

112V8, 112Y131 또는 112Y55로 표시되는 하이브리도마 세포주에 의해 생산되고, OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로서, 인간, 인간화 또는 키메라 항체를 포함하며, OX40 길항체 활성을 갖는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 2

OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중 제1항의 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합함으로써 제1항의 항체와 경쟁하는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 3

- (a) 서열 9의 성숙 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 10의 성숙 경쇄 가변 영역 서열;
- (b) 서열 44의 성숙 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 45의 성숙 경쇄 가변 영역 서열; 또는
- (c) 서열 46의 성숙 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 47의 성숙 경쇄 가변 영역 서열
을 포함하고,

OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로서, 인간, 인간화 또는 키메라 항체를 포함하며, OX40 길항체 활성을 갖는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 4

OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중 제3항의 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합함으로써 제3항의 항체와 경쟁하는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 5

- (a) 서열 9의 아미노산 위치 20 내지 141의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 10의 아미노산 위치 21 내지 129의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- (b) 서열 44의 아미노산 위치 20 내지 136의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 45의 아미노산 위치 21 내지 127의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- (c) 서열 46의 아미노산 위치 21 내지 136의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 47의 아미노산 위치 21 내지 127의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
을 포함하고,

OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로서, 인간, 인간화 또는 키메라 항체를 포함하며, OX40 길항체 활성을 갖는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 6

OX40 세포외 도메인의 아미노산 서열 중 제5항의 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합함으로써 제5항의 항체와 경쟁하는 단리되거나 정제된 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하위서열이 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, 단일 쇄 Fv (scFv), 디슬피드-연결된 Fv (sdFv) 및 V_L 또는 V_H로부터 선택된 것인 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, OX40이 인간 OX40인 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 0X40이 하기 서열을 포함하는 항체 또는 그의 하위서열.

MCVGARRLGRGPCAALLLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVC

RPCGPGFYNDVVSSKPKCPTWCNLRGSGERKQLCTATQDTVCRCAGTQPLDSYKPGVDCAPCP

PGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPIVQPTAEW

PRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTP

IQEEQADAHSTLAKI (서열 50).

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD 이소형인 항체 또는 그의 하위서열.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 하위서열, 및 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 자가면역 장애의 증상을 줄이거나 감소시키거나 방지하기 위한 제약 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

명세서

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2005년 11월 25일자로 출원한 출원 번호 제60/739,659호를 우선권 주장하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 도입

[0004] 면역계는 감염성 질환으로부터 신체를 보호하는 작용을 하는 복잡한 세포 유형들로 이루어진다. 이것은 외래 항원의 인식 및 자아를 비-자아와 구별하는 능력에 의존적이다. 일부 경우, 자아와 비-자아 사이의 경계가 무너지면, 자신의 고유 면역계에 의해 조직이 파괴된다. 이러한 자가면역 반응은 쇠약화 질환, 예를 들어 당뇨병, 다발성 경화증, 및 염증성 장 질환을 야기할 수 있다. 이를 자가면역 반응의 주요 매개자 중 하나가 T-림프구 또는 T-세포이다. 통상적으로, T-세포는 자가-항원에 허용적이지만, 여러 자가면역 장애에서는 이러한 허용이 상실되어 T-세포가 건강한 조직에 면역 반응을 일으킨다. 자가면역 T-세포의 제거 또는 이들의 활성화 또는 생존의 차단은 상기 질환 증상을 완화시킨다. 그러나, T-세포의 이러한 일반적인 고갈 또는 이들의 활성화 저해는 면역억제를 초래하여 환자가 감염원에 고도로 감수성이 된다. 효과기(effecter) T-세포를 특이적으로 표적화하고 오직 자가-반응성 T-세포만을 감소시킬 수 있는 새로운 요법이 필요하다.

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 OX40 세포와 도메인 (예를 들어 서열 50)의 아미노산 서열 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리되거나 정제된 항체를 제공한다. 항체는 포유동물 (예를 들어 영장류 또는 인간) OX40 서열 (예를 들어 서열 49)에 결합하는 인간, 인간화 및 키메라 항체를 포함한다. 항체는 또한 OX40 길항체 활성을 갖는 항체를 포함한다. 추가로, 항체는 OX40 효능제 활성을 갖는 항체를 포함한다.

[0007] 특별한 실시양태에서, 항체는 OX40 길항체 활성을 가지며, 사이토kin 또는 인터페론의 생성, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 생존 또는 증식, 항-세포자멸(anti-apoptotic) 또는 전-세포자멸(pro-apoptotic) 단백

질의 발현을 감소시키기도 하고 증가시키기도 한다. 특별한 비-제한적인 측면에서, 사이토킨은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, TNF- α , 인터페론- γ , 및 GM-CSF로부터 선택되고, 항-세포자멸 또는 전-세포자멸 단백질은 Bcl-xL, Bcl-2, Bad 및 Bim으로부터 선택된다.

[0008] 다른 특별한 실시양태에서, OX40 항체는 112F32 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7217), 112V8 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7219), 112Y55 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7220), 112Y131 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7218) 및 112Z5 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7216)로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된다. 추가의 실시양태에서, OX40 항체는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는 아미노산 서열에 결합하거나, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 1배 내지 5000배 이내이거나, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체보다 높거나 적거나, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 $KD 10^{-6} M$ 내지 약 $KD 10^{-13} M$ 이내이거나, 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 갖거나, OX40과의 결합에 대하여 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체와 경쟁하거나, ELISA 검정으로 측정시에 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 OX40에 결합하는 것을 억제 또는 저해하거나 (예를 들어 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 OX40에 결합하는 것을 50% 이상 억제함), 또는 112V8, 112Y55 및 Y131의 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하고 OX40 리간드 (OX40L)에 대한 OX40 결합을 억제하거나 저해한다 (예를 들어 85% 이상).

[0009] 추가로, 항체는 세포에서 발현된 OX40에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항체는 비-T-세포 (예를 들어 천연 킬러 세포, 과립구, 단핵구, B-세포), 또는 OX40으로 형질감염된 세포주 (예를 들어 CHO 세포, L929 세포 또는 HEK293 세포)에서 발현된 OX40에 특이적으로 결합한다. 특별한 측면에서, 항체는 활성화된 인간 T-세포에는 특이적으로 결합하지만 휴지기의 T-세포에는 특이적으로 결합하지 않는다.

[0010] 항체는 예를 들어 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 항체는 또한 예를 들어 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 불변 영역, 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 프레임워크 (framework, FR) 영역 항체 내부 또는 그 바깥쪽에서의 치환과 같은 변형된 형태 및 변이체 형태를 포함한다. 특별한 측면에서, 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 추가의 특별한 측면에서, 치환은 1개 내지 3개, 3개 내지 5개, 5개 내지 10개 또는 그보다 많은 아미노산 잔기의 아미노산 치환을 포함한다. 추가의 특별한 측면에서, 항체는 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 서열에 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그보다 높은 동일성을 갖는다.

[0011] 항체는 또한 예를 들어 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 하위서열을 포함한다. 특별한 측면에서, 하위서열은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, 단일 쇄 Fv (scFv), 디슬퍼드-연결된 Fv (sdFv) 및 V_L 또는 V_H로부터 선택된다.

[0012] 항체는 또한 이종 도메인을 포함한다. 특별한 측면에서, 이종 도메인은 태그, 검출한 표지 또는 세포독성체를 포함한다.

[0013] 변형된 및 변이체 항체, 예를 들어 치환, 하위서열 및 부가는 본원에 기재한 바와 같은 OX40 항체의 검출가능한 활성을 보유할 수 있다. 한 실시양태에서, 변형된 항체는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 검출가능한 활성을 보유한다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 항체는 T-세포 증식 또는 생존, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 조정하거나, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 고갈시킨다. 특별한 측면에서, 변형된 항체는 OX40 신호전달을 억제하거나, 또는 자가-항원 (예를 들어 수초 염기성 단백질, 수초 희돌기아교세포 당단백질, 단백지질(proteolipid) 단백질, 콜라겐, 윤활 관절 조직 항원, 인슐린, 글루탐산 데카르복실라제, 장 항원, 갑상선 항원, 히스톤 단백질, 근육 항원 및 피부 항원과 같은 자가-항원)에 특이적인 자가-반응성 T-세포의 수를 줄이거나 없앤다.

[0014] 항체는 또한 OX40에 대한 항체 L106의 결합과 경쟁하거나 경쟁하지 않는 항체를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항체는 ELISA 검정으로 측정시에 OX40에 대한 항체 L106의 결합을 억제하거나 저해하지 않는다.

- [0015] 항체는 OX40의 기능 또는 활성을 주는 항체를 추가로 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항체는 OX40에 대한 OX40 리간드의 결합을 억제 또는 저해하거나, 활성화된 T-세포에 대한 OX40 리간드의 결합을 억제 또는 저해하거나, OX40-매개 세포 신호전달을 조정 (예를 들어 억제 또는 저해)하거나, OX40-매개 세포 반응 또는 OX40-매개 세포 신호전달을 조정 (예를 들어 억제 또는 저해)한다. 특별한 측면에서, OX40-매개 세포 반응은 림프구 증식, 사이토kin 발현, 림프구 생존, NF- κ B의 활성화, PKB (Akt) 활성의 유지, 또는 서비빈(survivin)의 상향조절을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 항체는 천연 킬러 세포, 대식세포 또는 호중구에 의해 매개되는, EL4-인간 OX40 발현 세포 또는 활성화된 인간 T-세포의 용해를 유도하고, 예를 들어 10 μ g/mL의 항체로 유도된 특이적 세포 용해율(%)은 약 15% 내지 75%, 25% 내지 65%, 또는 30% 내지 60%, 또는 50% 내지 100%이다.
- [0016] 항체는 생체내 기능 또는 활성을 보유하는 항체를 추가로 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항체는 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델에서 이식편-대-숙주 질환의 증상을 줄이거나 감소시키거나 방지하거나, 또는 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델 (예를 들어 항-IL2R베타 쇄 항체를 투여하고 준치사량의 방사선조사를 실시한 후에 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 투여한 면역결핍 (SCID) 마우스)에서 이식편-대-숙주 질환의 완화 또는 퇴행을 야기한다. 특별한 측면에서, 이식편-대-숙주 질환의 증상은 체중 손실, 모발 손실, 피부 발진, 혈뇨, 복수증, 및 간, 장관, 폐, 피부에서의 염증성 세포 침윤, 또는 사망이다.
- [0017] 추가의 실시양태에서, 항체는 폐, 피부, 또는 장에서의 염증을 줄이거나 감소시키거나 방지하거나, 또는 자가면역 장애의 증상을 줄이거나 감소시키거나 방지한다. 특별한 측면에서, 항체는 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨병, 크론병, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 셀리아크병(celiac disease), 건선, 증식성 루푸스 신염, 육아종 근장애, 또는 다발성근염의 증상을 감소시키거나 방지한다.
- [0018] 항체는 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 이들의 임의의 이소형(isotype) 또는 하위부류를 포함한다. 특별한 측면에서, 항체는 IgG (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgA, IgM, IgE, 또는 IgD 이소형이다.
- [0019] 항체는 제약 조성물에 포함될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다.
- [0020] 항체는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 예를 들어 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 서열 또는 그의 하위서열을 코딩한다. 특별한 측면에서, 핵산 서열은 서열 3 내지 서열 6 및 서열 38 내지 서열 43의 서열, 또는 서열 3 내지 서열 6 및 서열 38 내지 서열 43과 동의성(degenerate)을 갖는 서열을 포함한다. 추가의 특별한 측면에서, 핵산은 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에서 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 부가되거나 결실된 아미노산 서열을 코딩한다. 추가의 특별한 측면에서, 핵산은 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에서 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 부가되거나 결실된 아미노산 서열을 코딩하고, 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 활성을 보유한다 (예를 들어 OX40 세포와 도메인의 에피토프에 대한 결합 친화도를 가짐). 추가의 특별한 측면에서, 핵산 서열은 발현 제어 서열 또는 벡터를 포함한다.
- [0021] 항체는 숙주 세포 및 단리된 세포에 의해 생성될 수 있다. 특별한 실시양태에서, 숙주 또는 단리된 세포는 하이브리도마 세포 또는 CHO 세포이다. 추가의 특별한 실시양태에서, 단리된 세포는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 갖는 항체를 발현한다.
- [0022] 본 발명은 키트를 제공한다. 특별한 실시양태에서, 키트는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체, 및 상기 항체를 처치할 필요가 있는 대상체에게 항체를 투여하기 위한 지침을 포함한다.
- [0023] 본 발명은 치료 및 치유 방법을 비롯한 생체내 방법을 제공한다. 특별한 실시양태에서, 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 또는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애의 증상을 치료할 필요가 있는 대상체에서 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 또는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애의 증상을 치료하는 방법은, 상기 대상체에서 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 또는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애의 증상을 치료하는데 유효한 항체 또는 제약 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 이러한 처치로 인해 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애와 관련이 있는 하나 이상의 해로운 증상 또는 신체적 예후(physical consequence)가 경감되거나 완화된다.

- [0024] 추가의 특별한 실시양태에서, 이식편-대-숙주 질환의 치료 방법은 이식편-대-숙주 질환을 치료할 필요가 있는 대상체에게 이식편-대-숙주 질환의 치료에 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 이러한 처치로 인해 이식편-대-숙주 질환과 관련이 있는 하나 이상의 해로운 증상 또는 신체적 예후 (예를 들어 체중 손실, 모발 손실, 피부 발진, 혈뇨, 복수증, 간, 장관, 폐에서의 염증성 세포 침윤 또는 사망)의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도가 줄어들거나 감소되거나 방지되거나, 이식편-대-숙주 질환이 완화 또는 퇴행되거나, 또는 이식편-대-숙주 질환이 방지된다. 추가의 측면에서, 이식편은 골수, 조혈 줄기 세포, 말초혈 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포를 포함할 수 있다.
- [0025] 추가의 특별한 실시양태에서, 이식 거부의 치료 방법은 이식 거부를 치료할 필요가 있는 대상체에게 이식 거부 치료에 효과적인 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 치료는 이식 거부와 관련이 있는 하나 이상의 해로운 증상 또는 신체적 예후 (예를 들어 이식물에 대한 면역 반응 또는 이식된 세포 또는 조직의 파괴)의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하거나, 이식 거부가 완화 또는 퇴행되거나, 또는 이식 거부가 방지된다. 추가의 측면에서, 이식은 신장, 심장, 폐, 피부, 간 또는 췌장 세포, 조직 또는 장기의 이식을 포함할 수 있다.
- [0026] 추가의 특별한 실시양태에서, 염증을 줄이거나 감소시키거나 방지하는 방법은 염증을 줄이거나 감소시키거나 방지하는 처치가 필요한 대상체에게 염증의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하는데 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 염증은 폐, 관절, 근육, 피부, 중추 또는 말초 신경계, 또는 장에 존재한다. 추가의 측면에서, 이러한 처치로 인해 염증과 관련이 있는 하나 이상의 해로운 증상 또는 신체적 예후의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도가 줄어든다.
- [0027] 추가의 특별한 실시양태에서, 자가면역 장애를 치료하는 방법은 자가면역 장애를 치료할 필요가 있는 대상체에게 자가면역 장애 증상의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하는데 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 자가면역 장애는 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨병, 크론병, 염증성 장 질환, 케양성 대장염, 셀리아크병, 건선, 증식성 루푸스 신염, 육아종 근장애, 또는 다발성근염을 포함한다. 추가의 측면에서, 이러한 처치로 인해 자가면역 장애와 관련이 있는 하나 이상의 해로운 증상 또는 신체적 예후의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도가 줄어들거나 감소되거나 방지된다.
- [0028] 생체내 실시할 때 치료 또는 치유시킬 수 있는 추가의 방법은 OX40 활성 또는 기능의 조정을 포함한다. 특별한 실시양태에서, OX40-매개 세포 반응을 억제하거나 저해하는 방법은 OX40-매개 세포 반응을 억제하거나 저해할 필요가 있는 대상체에게 OX40-매개 세포 반응 (예를 들어 림프구 증식, 사이토킨 발현, 또는 림프구 생존)의 억제 또는 저해에 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 활성화된 T-세포에 OX40 리간드가 결합하는 것을 억제하거나 차단하는 방법은 활성화된 T-세포에 OX40 리간드가 결합하는 것을 차단하거나 억제하거나 저해할 필요가 있는 대상체에게 활성화된 T-세포로의 OX40 리간드 결합을 억제하거나 저해하는데 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, OX40에 OX40 리간드가 결합하는 것을 차단하거나 억제하거나 저해할 필요가 있는 대상체에게 OX40으로의 OX40 리간드 결합을 억제하거나 저해하는데 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 추가의 특별한 실시양태에서, OX40-매개 세포 신호전달을 조정하는 방법은 OX40-매개 세포 신호전달을 조정할 필요가 있는 대상체에게 OX40-매개 세포 신호전달의 조정에 유효한 항체 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 추가의 특별한 실시양태에서, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 줄이는 방법은 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 줄일 필요가 있는 대상체에게 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 줄이기에 충분한 양의 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0029] 추가의 특별한 실시양태에서, 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델에서 혈액, 비장, 림프절, 장, 간, 폐 또는 피부 중의 활성화된 T-세포의 수를 감소시키는 방법은 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델에게 혈액, 비장, 림프절, 장, 간, 폐 또는 피부 중의 활성화된 T-세포의 수를 감소시키기에 충분한 양의 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0030] 추가의 특별한 실시양태에서, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포에 의해 야기되는 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 대상체에게 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 진행을 줄이거나 감소시키거나 방지하거나, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포를 고갈시키기에 충분한 양의 항체를 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 상기 질환 또는 장애는 이식편-대-숙주 질환, 염증 또는 자가면역 장애를 포함한다.
- [0031] 본 발명에 따라 치료가능한 대상체는 포유동물 (예를 들어 인간)을 포함한다. 특별한 실시양태에서, 대상체는

만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있거나, 이식편-대-숙주 질환에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있거나, 이식 거부에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있거나, 염증에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있거나, 또는 자가면역 장애에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있거나, OX40-매개 세포 반응에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있다.

[0032] OX40 항체의 투여 또는 전달을 포함하는 본 발명의 방법은 임의의 허용가능한 방법으로 실시될 수 있다. 특별한 실시양태에서, OX40 항체는 대상체에게 국부, 국소, 또는 전신 투여된다.

[0033] 본 발명은 또한 OX40 길항체 활성을 갖는 인간 OX40 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 인간 Fc 재조합 단백질 또는 활성화된 인간 T-세포와 접합된 인간 OX40 세포와 도메인을 인간 이뮤노글로불린을 발현할 수 있는 동물 (예를 들어 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 소)에게 투여하는 단계, 인간 OX40 항체의 발현에 대하여 상기 동물을 스크리닝하는 단계, 인간 OX40 항체를 생성하는 동물을 선별하는 단계, 선별된 동물로부터 항체를 단리하는 단계, 및 인간 OX40 항체가 OX40 길항체 활성을 갖는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

[0034] 본 발명은 OX40 리간드 (OX40L)에 대한 OX40 결합을 억제하거나 저해하는 인간 OX40 항체를 생성하는 방법을 추가로 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 인간 Fc 재조합 단백질 또는 활성화된 인간 T-세포와 접합된 인간 OX40 세포와 도메인을 인간 이뮤노글로불린을 발현할 수 있는 동물 (예를 들어 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 소)에게 투여하는 단계, 인간 OX40 항체의 발현에 대하여 상기 동물을 스크리닝하는 단계, 인간 OX40 항체를 생성하는 동물을 선별하는 단계, 선별된 동물로부터 항체를 단리하는 단계, 및 인간 OX40 항체가 OX40 리간드 (OX40L)에 대한 OX40 결합을 억제하거나 저해하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

[0035] 추가로, 본 발명은 OX40 항체를 발현하는 비-인간 트랜스제닉 동물을 제공한다. 다양한 실시양태에서, 발현된 OX40 항체는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체와 동일하거나, 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는, OX40 세포와 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 결합하거나, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 1배 내지 5000배 이내이거나, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 $KD 10^{-6} M$ 내지 약 $KD 10^{-12} M$ 이내이거나, 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 갖거나, 또는 OX40과의 결합에 대하여 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체와 경쟁한다.

발명의 상세한 설명

[0046] 본 발명은 적어도 부분적으로는 예를 들어 OX40 항체, 항-OX40 또는 항-OX40 항체라고 지칭될 수 있는, OX40 (CD134)에 특이적으로 결합하는 항체를 기초로 한다. OX40에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 포유동물 (인간, 영장류 등), 인간화 및 키메라 항-OX40 항체를 포함한다. OX40에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 및 항체 하위서열 (단편)은 정제되고 단리된 항체 뿐만이 아니라 그의 제약 제제까지도 포함한다.

[0047] OX40은 50 킬로달톤 (KDa) 당단백질이며, 종양 괴사 인자 수용체 상과 (TNFRSF)의 구성원이다. OX40의 리간드인 OX40L (TNFSF4, CD252이라고 지칭되기도 함)은 내피 세포, 활성화된 항원 제시 세포, 예컨대 대식세포, 수지상 세포, B-세포 및 천연 킬러 세포에서 발현된다고 보고된 바 있다. 이론에 얹매이고 싶지는 않지만, 항원 제시 세포상의 CD40과의 결합은, 지다당류 (LPS)가 할 수 있는 것과 같이 OX40L 발현을 증가시킨다. T-세포상에서의 OX40 발현은 T-세포 항원 수용체를 통한 신호전달 후에 유도될 수 있다. 예를 들어, OX40은 염증 부위에서 근래 활성화된 T-세포에서 발현된다. CD4 및 CD8 T-세포는 염증 상태에서 OX40을 상향조절할 수 있다.

[0048] OX40은 또한 CD134, TNFRSF4, ACT35 및 TXGP1L이라고 지칭되기도 한다. OX40은 OX40의 포유동물 (예를 들어 영장류, 인간) 형태를 포함한다. 따라서, 본 발명의 OX40 항체는 인간 OX40과 같은 포유동물 OX40 서열에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. OX40 서열, 예컨대 인간 OX40은 다형체 변이체를 포함한다. 전장 인간 OX40의 비-제한적인 예는 다음과 같다:

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG
 MVSRCRSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPKCPTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVC
 RCRAGTQPLDSYKPGVDACPCTPPGHFSPGDNQACKPWTNCLLAGKHTLQPASNSSD
 AICEDRDPPATQPQETQGPPARPTVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGL
 GLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

(서열 49).

[0049]

[0050] OX40 항체, 항-OX40 및 항-OX40 항체는 OX40에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 특이적 결합은 OX40에 존재하는 에피토프에 선택적인 결합이다. 특이적 결합은 당업계에 공지된 검정법 (예를 들어 면역침전, ELISA, 유동 세포계측, 웨스턴 블렛팅)을 이용하여 비-특이적 결합과 구별될 수 있다.

[0051]

OX40 항체는, 상기 항체가 특이적으로 결합하는 항원성 에피토프의 전체 또는 일부가 상이한 단백질에 존재하는 경우에는 이러한 상이한 단백질들에 결합할 수 있다. 따라서, OX40 에피토프의 서열 또는 구조적 상동성이 정도에 따라, OX40 항체는 OX40 에피토프와의 서열 또는 구조적 상동성이 높은 또 다른 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, OX40 항체는, 충분한 서열 또는 구조적 상동성을 갖는 에피토프가 상이한 단백질에 존재하는 경우에는 이러한 상이한 단백질들에 결합할 수 있다.

[0052]

본 발명의 OX40 항체는 단리된 항체 또는 정제된 항체를 포함한다. 따라서, 단리되거나 정제된 OX40 항체를 포함하는 본 발명의 항체는 인간을 포함하지 않는다.

[0053]

조성물의 수식어로 사용된 용어 "단리된"은 인간의 손으로 제조되거나, 또는 전형적으로는 1개 이상의 조작 단계 또는 공정에 의해서 천연 생체내 환경 중의 1종 이상의 다른 성분으로부터 분리된 조성물을 의미한다. 일반적으로, 이와 같이 분리된 조성물에는 자연계에서 정상적으로 회합되어 있는 1종 이상의 물질, 예를 들어 1종 이상의 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 세포막이 실질적으로 없다. 따라서, 단리된 조성물은 해당 조성물이 천연적으로 존재하는 유기체 세포 중의 다른 생물학적 성분으로부터 분리되거나, 또는 해당 조성물이 생성 (예를 들어 합성 방식으로 또는 세포 배양을 통해 생성됨)된 인공 배지로부터 분리된 것이다. 예를 들어, 단리된 OX40 항체는 해당 항체가 생성된 동물 (예를 들어 비-트랜스제닉 포유동물 또는 트랜스제닉 포유동물, 예컨대 설치류 (마우스) 또는 유제류 (소) 동물)로부터 수득될 수 있고, 다른 폴리펩티드 및 핵산으로부터 분리된다. 따라서, 상기 동물로부터 수득된 항체를 함유하는 혈청은 단리된 것으로 간주한다. 용어 "단리된"은 별법의 물리적 형태를 배제하지 않으며, 예를 들어 단리된 항체는 항체 하위서열, 키메라, 다량체, 또는 유도체화된 형태를 포함할 수 있다.

[0054]

조성물의 수식어로 사용된 용어 "정제된"은 자연계에서 전형적으로 회합되어 있는 물질 중 대부분 또는 실질적으로 전부가 없는 조성물을 지칭한다. 전형적으로, 정제된 항체는 항체 환경 중에 정상적으로 존재하는 성분들로부터 제거된 것이다. 따라서, 항체-생성 하이브리도마 세포 배양물로부터 분리된 항체 상등액은 정제된 것으로 간주한다. 따라서, 정제된 것이 절대적으로 순수할 필요는 없으며, 문맥에 따라 달라진다. 추가로, "정제된" 조성물은 1종 이상의 다른 분자와 조합될 수 있다. 따라서, 용어 "정제된"은 조성물의 조합을 배제하지 않는다. 순도는 예를 들어 UV 분광학, 크로마토그래피 (예를 들어 HPLC, 기상), 젤 전기영동 (예를 들어 은 또는 쿠마시 염색) 및 서열 분석 (펩티드 및 핵산)을 비롯한 임의의 적절한 방법으로 결정할 수 있다.

[0055]

"정제된" 단백질 및 핵산은 표준 정제 방법으로 생성된 단백질 및 핵산을 포함한다. 상기 용어는 또한 숙주 세포에서의 재조합 발현으로 생성된 단백질 및 핵산 뿐만이 아니라 화학적 합성으로 생성된 단백질 및 핵산까지도 포함한다. "정제된"은 오염물질의 수준이 인간 또는 비-인간 동물에게의 투여에 대하여 규제 당국, 예를 들어 미국 식품의약청(Food and Drug Administration, FDA)에 허용가능한 수준 미만인 조성물을 지칭하는 것일 수도 있다.

[0056]

본 발명의 OX40 항체는 OX40 세포의 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 예시적 OX40 항체는 교차-차단 검정으로 결정시에 OX40상의 3개의 "에피토프"에 특이적으로 결합한다. 예시적 비-제한적인 인간 OX40 세포의 도메인 서열은 다음과 같다:

MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND
 RCCHECRPGN GMVSRCRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR
 SGSERKQLCT-ATQDTV.CRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA
 CKPWTNCLLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPTIVQ
 PTEAWPRTSQ GPS (서열 50).

[0057]

[0058]

펩티드 에피토프는 전형적으로 짧은 아미노산 서열, 예를 들어 약 5개 내지 15개 아미노산 길이이다. 에피토프를 동정하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들어 미국 특허 제4,708,871호에 기재되어 있다. 간략하게 설명하면, OX40 폴리펩티드에서 유래된 중첩되는 올리고펩티드 세트를 합성하여 편의 고상 어레이에 각 편마다 독특한 올리고펩티드로 결합시킬 수 있다. 상기 편 어레이에는 96웰 미량역가 플레이트를 포함할 수 있는데, 이것은 96종의 올리고펩티드를 동시에 검정할 수 있게 한다. 불연속 에피토프는, 막 지지체에 높은 밀도로 고정된 상이한 길이 (예를 들어 6-mer 내지 15-mer)의 고도로 중첩되는 펩티드 스캐닝을 이용하여 유사하게 동정할 수 있다. 높은 항체 농도가 사용되며, 결합은 간접적인 면역검출로 검출된다. 여러개의 결합 서열이 동정되고 개입(intervening) 서열로 분리되어 있지만 개개의 펩티드가 인식되지 않는 경우에는 불연속 에피토프가 동정되었다. 분리된 서열들은 표적 단백질의 표면에 연속적인 영역을 형성하고 형태적 에피토프를 나타낼 것으로 예상된다 [Reineke, et al. Protein Sci. 7:951 (1998)]. 별법으로, 에피토프 맵핑을 위한 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리 키트 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))가 시판되고 있다. 특정 항체가 결합하는 에피토프를 동정하기 위해서, 이러한 방법 및 다른 방법을 이용하여 연속적인 아미노산의 모든 가능한 서브세트에 대한 결합 친화도를 결정할 수 있다. 에피토프 길이의 펩티드 서열을 사용하여 동물을 면역화시켜서 상기 펩티드 서열에 결합하는 항체를 수득하는 경우, 에피토프는 이것으로부터 추론하여 동정할 수도 있다. 연속적인 에피토프는 또한 BEPIPOPE와 같은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 예측될 수도 있다 [Odorico et al., J. Mol. Recognit. 16:20 (2003)].

[0059]

본 발명의 항체는 임의의 항체 부류, 예를 들어 IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, 및 이들의 임의의 하위부류에 속하는 모노클로날 또는 폴리클로날 이뮤노글로불린 분자이다. IgG의 예시적 하위부류는 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄이다. "모노클로날" 항체는 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 비롯한 단일 클론을 기초로 하거나 그러한 단일 클론에서 수득된 것이거나 또는 그러한 단일 클론에서 유래된 항체를 지칭한다. 따라서, "모노클로날" 항체는 구조적으로 정의되는 것이지 그의 생성 방법으로 정의되는 것이 아니다.

[0060]

OX40에 특이적으로 결합하는 특별한 예시적 항체는 112F32 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7217), 112V8 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7219), 112Y55 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7220), 112Y131 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7218) 및 112Z5 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7216)로 표시되며, 이것들은 인간 모노클로날 항-인간 OX40 항체 (인간 OX40에 결합하는 인간 항체)이다. 본 발명의 예시적 OX40 항체 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5는 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열을 갖는다. 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5라는 표시는 상기 항체를 지칭하는 것일 수도 있고, 또는 OX40 항체를 생성하는 세포주 (예를 들어 하이브리도마, CHO 세포 또는 다른 숙주 세포)를 지칭하는 것일 수도 있다.

[0061]

본 발명의 예시적 인간 항-인간 OX40 항체는 다양한 형태의 가용성 재조합 인간 OX40 (OX40-hIgG1), 융합 단백질 (hOX40:hFc) 또는 OX40을 발현하는 활성화된 인간 T-세포로 면역화된 트랜스-염색체(trans-chromosomal) 마우스 (KM 마우스™)를 이용하여 생성되었다 (WO 02/43478, WO 02/092812, 및 [Ishida, et al., IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000)]). 예시적 항체는 특이적으로 표지된 활성화된 인간 T-세포에서 동정되었고, 휴지기의 T-세포에서는 동정되지 않았다. 예시적 항체는 인간 OX40으로 안정하게 형질감염된 세포주, EL4-OX40 및 CHO-OX40을 검출가능하게 염색하였지만 형질전환되지 않은 모 세포주는 그렇지 않았는데, 이는 항체가 인간 OX40에 특이적으로 결합한다는 것을 나타낸다. 예시적 항체는 또한 붉은털 원숭이(rhesus macaque) OX40 및 시노몰구스 원숭이(cynomolgus macaque) OX40에는 결합하지만, 뮤린(murine) OX40에는 검출 가능하게 결합하지 않았다.

[0062]

본 발명의 항체는 카파 또는 람다 경쇄 서열을 가질 수 있는데, 이것은 천연 항체에 존재하는 것과 같은 전장이거나, 이들의 혼합물 (즉, 카파 및 람다 쇄 서열의 융합체)이거나 이의 하위서열/단편이다. 천연 항체 분자는 2개의 카파 또는 2개의 람다 경쇄를 함유한다.

[0063]

본 발명의 OX40 항체는 또한 예를 들어 112F32 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7217), 112V8 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7219), 112Y131 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7218), 112Y55 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7220) 또는 112Z5 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7216)로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명의 OX40 항체는 예를 들어 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는 OX40 세포의 도메인에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 포함한다. 본 발명의 OX40 항체는 예를 들어 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해

생성된 항체의 결합 특이성을 갖는 항체를 추가로 포함한다. 전형적으로, 이러한 OX40 항체는 OX40에 대한 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5 항체 결합의 부분적 또는 완전한 차단, 감소 또는 억제를 나타낸다.

[0064] 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 OX40 항체 및 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5 항체의 결합 특이성을 갖는 항체는 경쟁 결합 검정으로 동정할 수 있다. 이러한 항체는 OX40에 대한 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5 항체의 결합과 경쟁하는 능력을 기초로 선별될 수 있다. 항체가 OX40에 대한 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5 항체의 결합과 경쟁하거나 OX40에 대한 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5 항체의 결합을 억제하거나 줄이거나 감소시키거나 저해하거나 차단하는 능력은 효소-연결 면역흡수 측정 검정 (ELISA)을 비롯한 당업계 공지의 각종 검정법으로 결정할 수 있다. 특별한 측면에서, 본 발명의 항체는 ELISA 검정으로 측정시에 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 OX40에 결합하는 것을 억제하거나 저해한다. 추가의 측면에서, 본 발명의 항체는 ELISA 검정으로 측정시에 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 OX40에 결합하는 것을 50% 이상 억제한다.

[0065] 본 발명의 OX40 항체는 OX40에 특이적으로 결합하고 마우스 항-인간 OX40 항체 L106 (베톤 디킨슨(Becton Dickinson), 카탈로그 번호 340420)이 OX40에 결합하는 것을 저해하거나 차단하지 않는 항체도 포함한다. 추가로, OX40에 특이적으로 결합하고 항체 L106이 OX40에 결합하는 것을 억제하거나 줄이거나 감소시키지 않는 OX40 항체도 포함한다. 항체 L106은 예를 들어 미국 특허 제6,277,962호, WO 95/12673 및 [Schlossman et al., eds. Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, Oxford: Oxford University Press (1995) pp 1157-60]에 기재되어 있다.

[0066] 본 발명의 OX40 항체는 OX40에 특이적으로 결합하며, OX40에 대한 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체보다 높거나 적은 항체를 포함한다. 예를 들어, OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 1배 내지 10,000배 (예를 들어 2배 내지 5배, 5배 내지 10배, 10배 내지 100배, 100배 내지 1000배 또는 1000배 내지 10,000배 더 높거나 더 낮은 친화도, 또는 이러한 값 내에 포함되거나 이러한 값을 포함하는 임의의 수치값 또는 범위) 이내인 항체가 제공된다. 따라서, 본 발명의 OX40 항체는 또한 OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체보다 높거나 적은 항체를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 본 발명의 OX40 항체는 OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 $KD 10^{-6} M$ 내지 약 $KD 10^{-13} M$ 이내, 또는 이러한 값 내에 포함되거나 이러한 값을 포함하는 임의의 수치값 또는 범위이다.

[0067] 결합 친화도는 결합 (K_a) 및 해리 (K_d) 속도로 결정할 수 있다. 평형 친화도 상수인 KD는 K_a/K_d 의 비율이다. 결합 (K_a) 및 해리 (K_d) 속도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 이용하여 결정할 수 있다 ([Rich and Myszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54 (2000)], [Englebienne, Analyst. 123:1599 (1998)]). 실시간 검출 및 결합 속도의 모니터링을 위한 기기 및 방법은 공지되어 있고 시판되고 있다 (BiaCore 2000 (스웨덴 옵살라 소재의 비아코어 아베(Biacore AB), 및 [Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335 (1999)]). KD 값은 OX40에 존재하는 결합 부위 중 절반 (50%)를 포화시키는데 필요한 OX40 항체 농도로 정의될 수 있다.

[0068] 본 발명의 OX40 항체는 초대 세포 단리물, 계대배양된 세포, 배양된 세포, 및 불멸화 세포에서 1종 이상의 세포에 존재하는 OX40에 생체내 결합할 수 있는 항체를 포함한다. OX40을 발현할 수 있는 비-제한적인 구체적 세포 유형은 활성화된 T-세포 및 기타 T-세포 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포) 및 비-T-세포를 포함한다. 비-T-세포의 예는 천연 킬러 (NK) 세포, 과립구 (호중구), 단핵구 및 B-세포를 포함한다. OX40을 천연적으로 발현하지는 않는 세포는 예를 들어 상기 세포를 OX40-코딩 핵산으로 형질감염시키거나 형질전환시켜서 OX40을 발현하도록 할 수 있다. OX40에 결합할 수 있는 OX40 항체는 OX40을 발현하거나 생성하는 1종 이상의 형질감염되거나 형질전환된 세포에 결합할 수 있다.

[0069] 본 발명의 항체는 OX40에 결합하고 OX40 기능 또는 활성을 생체내 또는 시험관내 (예를 들어 대상체에서) 조정하는 항체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조정하다" 및 그의 문법적 변형형태가 OX40 활성 또는 기능을 언급하며 사용된 경우, 이것은 OX40 활성 또는 기능이 검출가능하게 영향을 받거나 변경되거나 변화된 것을 의미한다. 따라서, OX40 활성 또는 기능을 조정하는 OX40 항체는 예를 들어 OX40과 OX40 리간드의 결

합, OX40-매개 신호전달, 또는 OX40-매개 또는 OX40-조정가능한 세포 반응, 또는 본원에 기재하거나 달리 공지되거나 알 수 있는 또 다른 OX40 활성 또는 기능을 포함할 수 있는 1종 이상의 OX40 활성 또는 기능에 검출가능하게 영향을 주거나 변경시키거나 변화시키는 항체이다.

[0070] 조정될 수 있는 각종 비-제한적인 OX40 활성 및 기능은 예를 들어 OX40-매개 신호전달 또는 OX40-매개 또는 OX40-조정가능한 세포 반응, 세포 증식 또는 분열 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포와 같은 램프구), 세포 생존 또는 세포자멸 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포와 같은 램프구), 사이토킨 (예를 들어 Th1, Th2 및 비-Th1/Th2 사이토킨) 및 인터페론의 발현 또는 생성, 항-세포자멸 또는 전-세포자멸 단백질의 발현 또는 생성, 및 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 및 그의 증상의 치료, 방지 또는 완화를 포함한다. 조정되는 구체적인 사이토킨으로는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, TNF- α , 인터페론- γ 및 GM-CSF (생체내 또는 시험관내) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 구체적인 항-세포자멸 또는 전-세포자멸 단백질 발현물로는 Bcl-xL, Bcl-2, Bad 및 Bim 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. OX40의 조정될 수 있는 다른 비-제한적인 활성 또는 기능은 예를 들어 NF- κ B의 활성화, PKB (Akt) 활성의 유지, 및 서비빈의 상향조절 등이 있다 ([Ambrosini et al., Nat. Med. 3:917 (1997)] 및 [Song et al., Immunity 22:621 (2005)]).

[0071] 따라서, 본원에 기재한 것과 같은 예시적 항체는 OX40-매개 신호전달 또는 유도된 세포 반응, 세포 증식 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포), 세포 생존 또는 세포자멸 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포), 사이토킨 (예를 들어 Th1, Th2 및 다른 비-Th1/Th2 사이토킨, 예를 들어 IL-17, IL-23 및 IL-26) 및 인터페론, 예컨대 Th1, Th2, 비-Th1/Th2, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, TNF- α , 인터페론- γ , 및 GM-CSF의 발현 또는 생성 (생체내 또는 시험관내), 항-세포자멸 또는 전-세포자멸 단백질 (예를 들어 Bcl-xL, Bcl-2, Bad 또는 Bim)의 발현, 및 장애, 질환, 병리 및 그의 증상의 치료, 방지 또는 완화 중 하나 이상을 조정하는 항체를 포함한다. 특별한 측면에서, 본 발명의 항체는 T-세포 증식 또는 생존을 조정하거나, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 조정하거나, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포를 고갈시킨다. 추가의 특별한 측면에서, 본 발명의 항체는 자가-항원 (예를 들어 수초 염기성 단백질 (MBP), 수초 희돌기아교세포 당단백질 (MOG), 단백지질 단백질 (PLP), 콜라겐, 윤활 관절 조직 항원, 인슐린, 글루탐산 데카르복실라제, 장 항원, 갑상선 항원, 히스톤 단백질, 근육 항원 또는 피부 항원)에 특이적인 자가-반응성 T-세포의 수를 줄이거나 없앤다.

[0072] OX40 항체를 언급하며 사용된 용어 "길항체" 및 그의 문법적 변형형태는 OX40 리간드에 대한 OX40 결합을 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 자연시키거나 저해하거나 차단하거나, 또는 OX40 활성 또는 기능을 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 자연시키거나 저해하거나 차단하는 OX40 항체를 의미한다. OX40 항체를 언급하며 사용된 용어 "효능제" 및 그의 문법적 변형형태는 OX40 리간드에 대한 OX40 결합을 자극하거나 증가시키거나 증진시키거나 촉진시키거나 유도하거나, 또는 OX40에 의해 유도된 활성 또는 기능을 자극하거나 증가시키거나 증진시키거나 촉진시키거나 유도하는 OX40 항체를 의미한다. 따라서, 본 발명의 OX40 항체는 길항체 및 효능제 항체를 포함한다.

[0073] 본 발명의 OX40 길항체 항체는 예를 들어 OX40의 1종 이상의 활성 또는 기능을 시험관내 또는 생체내 차단하거나 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 저해한다. 특별한 실시양태에서, 가용성 형태의 OX40 (CD134) 또는 활성화된 T-세포의 표면상에 발현된 OX40에 대한 OX40 리간드 (OX40L) 결합을 차단하거나 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 저해할 수 있는 OX40 항체가 제공된다. 추가의 실시양태에서, OX40 항체는 용해성 효과기 세포 (예를 들어 천연 킬러 세포, 대식세포 또는 호중구)의 존재하에 EL4-인간 OX40-발현 세포 또는 활성화된 인간 T-세포의 용해를 유도한다. 특별한 측면에서, 10 μ g/mL의 항체로 유도된 특이적 세포 용해율(%)은 약 15% 내지 75%, 25% 내지 65%, 또는 30% 내지 60%이고, 연구시의 백그라운드(background) 수준에 따라서 100%나 될 수도 있다. 추가로, 예시적 OX40 항체를 동종이계 공여자로부터의 PBMC와 동시배양된 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC)와 인큐베이션하면, 동종-반응성 CD4 및/또는 CD8 T-세포의 억제에 의해 세포 증식이 감소되었다.

[0074] 본 발명의 OX40 항체는 변형된 형태, 예컨대 치환 (예를 들어 아미노산 치환), 부가 및 결실 (예를 들어 하위서열 또는 단편)을 포함하며, 이것들을 "변이체"라 지칭할 수 있다. 이러한 변형된 항체 형태 및 변이체는 OX40에 대한 결합, 또는 OX40의 활성 또는 기능 (예를 들어 OX40 신호전달)의 조정과 같은, 기준 OX40 항체, 예를 들어 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5로 표시한 OX40 항체의 기능 또는 활성을 적어도 일부 보유한다. 따라서, 변형된 OX40 항체는 예를 들어 적어도 부분적인 OX40 결합 또는 1종 이상의 OX40 기능 또는 활성 (예를 들어 신호전달, 세포 반응 등)을 조정하는 능력을 보유할 수 있다.

- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변형" 및 그의 문법적 변형형태는 해당 조성이 기준 조성에서 달라진 것을 의미한다. 변형된 단백질, 핵산 및 다른 조성물은 기준이 되는 미변형 단백질, 핵산 또는 다른 조성물보다 높거나 적은 활성을 지닐 수도 있고, 또는 그와는 상이한 기능을 가질 수도 있다.
- [0076] 특별한 측면에서, 본 발명의 변형된 항체는 T-세포 증식 또는 생존을 조정하는 능력, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 조정하는 능력, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포를 고갈시키는 능력 중 하나 이상을 보유한다. 추가의 특별한 측면에서, 본 발명의 변형된 항체는 자가-항원에 특이적인 자가-반응성 T-세포 또는 자가-항원 (예를 들어 수초 염기성 단백질 (MBP), 수초 희돌기아교세포 당단백질 (MOG), 단백지질 단백질 (PLP), 콜라겐, 윤활 관절 조직 항원, 인슐린, 글루탐산 데카르복실라제, 장 항원, 갑상선 항원, 히스톤 단백질, 근육 항원 또는 피부 항원)에 특이적인 항체를 생성하는 B-세포의 수를 줄이거나 없애는 능력 중 하나 이상을 보유한다.
- [0077] 다양한 실시양태에서, 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 항체의 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열은 불변 영역, 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 프레임워크 (FR) 영역의 내부 또는 바깥쪽에 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 특별한 측면에서, 아미노산 치환은 불변 영역, 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 프레임워크 (FR) 영역의 내부 또는 바깥쪽에서의 보존적 치환이다. 추가의 다양한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 중쇄 또는 경쇄 서열, 서열 7 내지 서열 10 또는 서열 44 내지 서열 49와의 동일성이 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그보다 높거나, 또는 이러한 백분율 값 내에 포함되거나 이러한 백분율 값을 포함하는 임의의 수치값 또는 범위 내에 든다. 치환된 잔기의 전형적인 수는 1개 내지 3개, 3개 내지 5개, 5개 내지 10개 아미노산 잔기, 또는 이러한 값 내에 포함되거나 이러한 값을 포함하는 임의의 수치값 또는 범위, 또는 그보다 많은 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0078] 아미노산 치환을 포함하는 이러한 항체는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 따라서, 아미노산 치환을 포함하는 항체를 코딩하는 핵산 서열도 제공된다.
- [0079] 용어 "동일성" 또는 "동일한"은 2종 이상의 언급된 실체(entity)가 동일하다는 것을 의미한다. 따라서, 2종의 단백질 서열 (예를 들어 OX40 항체)이 동일하다면, 이것들은 적어도 언급된 영역 또는 부분에서는 동일한 아미노산 서열을 갖는다. "동일성 영역"은 2종 이상의 언급된 실체에서 동일한 부분을 지칭한다. 따라서, 2종의 단백질 서열은 이것들이 동일성을 공유하는 1개 이상의 서열 영역에서는 동일하다. "실질적인 동일성"은 문자가 구조적으로 또는 기능적으로 보존되어 기준 문자의 1종 이상의 기능 또는 활성의 적어도 부분적인 기능 또는 활성을 보유하거나 그럴 것으로 예측되거나, 또는 기준 문자 중 동일성을 공유하는 관련/상응하는 영역 또는 부분을 보유하거나 그럴 것으로 예측된다는 것을 의미한다. 따라서, 실질적인 동일성을 갖는 폴리펩티드 (예를 들어 OX40 항체)는 기준 폴리펩티드 (예를 들어 OX40 항체)의 적어도 부분적인 활성 또는 기능을 보유하거나 그럴 것으로 예측된다. 예를 들어, 특별한 실시양태에서, 미변형 OX40 항체의 적어도 부분적인 활성 또는 기능을 보유하는 1개 이상의 변형 (예를 들어 아미노산 치환, 결실 또는 부가)을 갖는 OX40 항체는 기준 OX40 항체에 실질적인 동일성을 갖는 것으로 간주된다.
- [0080] 구조적 및 기능적으로 관련된 단백질들 사이의 차이로 인해, 기능 또는 활성 보유에 필요한 서열 동일성의 정도는 상기 단백질, 상기 영역 및 상기 영역의 기능 또는 활성에 따라 달라진다. 단백질이 주어진 활성 또는 기능을 보유하는데에는 단지 30%에 불과한 아미노산 서열 동일성이 필요할 수 있지만, 전형적으로는 기준 서열에 대한 동일성이 그보다 높으며, 예를 들어 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%이다. 2종의 서열 사이의 동일성 정도는 당업계에 공지된 컴퓨터 프로그램 및 수학적-알고리즘을 이용하여 규명할 수 있다. 서열 동일성(%) (상동성(%))을 계산하는 이러한 알고리즘은 일반적으로 비교 영역에서의 서열 갭 및 미스매치를 고려한다. 예를 들어, BLAST (예를 들어 BLAST 2.0) 검색 알고리즘 (예를 들어 문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)] 참조. NCBI를 통해 공개적으로 입수 가능함)은 다음과 같은 예시적 검색 파라미터를 갖는다: 미스매치 -2, 갭 간격(gap open) 5, 갭 연장 2. 폴리펩티드 서열 비교의 경우, BLASTP 알고리즘은 전형적으로 스코어링 매트릭스, 예컨대 PAM100, PAM250, BLOSUM62 또는 BLOSUM50과 병용된다. FASTA (예를 들어 FASTA2 및 FASTA3) 및 SSEARCH 서열 비교 프로그램도 동일성의 정도를 정량하는데 사용된다 ([Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)], [Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000)] 및 [Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)]). 텔루니(Delaunay)-기재의 위상적 맵핑을 이용하여 단백질의 구조적 유사성을 정량하는 프로그램도 개발되어 있다 [Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)].

- [0081] "보존적 치환"은 1개의 아미노산을 생물학적, 화학적 또는 구조적으로 유사한 잔기로 대체하는 것이다. 생물학적으로 유사하다는 것은 생물학적 활성, 예를 들어 OX40 결합 활성을 파괴하지 않는 치환을 의미한다. 구조적으로 유사하다는 것은 알라닌, 글리신 및 세린과 같이 아미노산들이 유사한 길이 또는 유사한 크기의 측쇄를 갖는다는 것을 의미한다. 화학적 유사성은 잔기들이 동일한 전하를 갖거나 둘다 친수성이거나 둘다 소수성인 것을 의미한다. 특별한 예는 하나의 소수성 잔기, 예컨대 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌을 또 다른 소수성 잔기로 치환하는 것, 또는 예를 들어 아르기닌으로 리신을 치환하거나, 글루탐산으로 아스파르트산을 치환하거나, 글루타민으로 아스파라진을 치환하거나, 세린으로 트레오닌을 치환하는 식으로 하나의 극성 잔기를 또 다른 극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다.
- [0082] 변형된 항체는 또한 L-아미노산 (및 이들의 혼합물)을 치환한 1개 이상의 D-아미노산, 구조적 및 기능적 유사체, 예를 들어 합성 또는 비-천연 아미노산 또는 아미노산 유사체 및 유도체화된 형태를 갖는 펩티드모방체 (peptidomimetic)를 포함한다. 변형은 고리형 구조, 예를 들어 상기 분자의 아미노 말단과 카르복시 말단 사이의 말단-말단 아미드 결합 또는 분자내 또는 분자간 디솔피드 결합을 포함한다.
- [0083] 아미노산 변형의 추가의 비-제한적인 구체예는 OX40 하위서열 및 단편을 포함한다. 예시적 OX40 하위서열 및 단편은 본 발명의 예시적 OX40 항체가 결합하는 OX40 서열 일부를 포함한다. 예시적 OX40 하위서열 및 단편은 또한 면역원성 부분, 예를 들어 본 발명의 예시적 OX40 항체가 결합하는 서열을 포함하는 OX40 일부를 포함한다.
- [0084] 본 발명에 따라, OX40 항체, 미변형 또는 기준 OX40 항체의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 보유하는 OX40 항체 하위서열 또는 단편을 코딩하는 핵산이 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "하위서열" 또는 "단편"은 전장 분자의 일부를 의미한다. OX40 항체를 코딩하는 OX40 항체의 하위서열은 전장 OX40보다 아미노산이 1개 이상 적다 (예를 들어 아미노 또는 카르복시-말단으로부터 1개 이상의 내부 또는 말단 아미노산의 결실). OX40 항체의 하위서열은 전장 OX40 항체보다 아미노산이 1개 이상 적다. 핵산 하위서열은 전장 비교 핵산 서열보다 뉴클레오티드가 1개 이상 적다. 따라서, 하위서열은 전장 천연 OX40의 길이 이하의 임의의 길이일 수 있다.
- [0085] 본 발명의 OX40 항체 하위서열 및 단편은 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 본 발명의 OX40 항체 하위서열 및 단편은 또한 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fv, Fd, 단일 쇄 Fv (scFv), 디솔피드-연결된 Fv (sdFv), V_L 및 V_H 도메인 단편을 포함한다.
- [0086] OX40 항체 하위서열 및 단편은 전장 항체의 결합 친화도, 전장 항체의 결합 특이성, 또는 전장 항체의 1종 이상의 활성 또는 기능, 예를 들어 OX40 길항체 또는 효능제 항체의 기능 또는 활성을 가질 수 있다. 용어 "기능적 하위서열" 및 "기능적 단편"이 항체를 지칭할 경우, 이것은 전장 기준 항체의 1종 이상의 기능 또는 활성, 예를 들어 OX40 항체의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 보유하는 항체 부분을 의미한다. 예를 들어, OX40 또는 OX40의 단편에 결합하는 항체 하위서열 또는 단편은 기능적 하위서열로 간주된다.
- [0087] 항체 하위서열 및 단편은 조합될 수 있다. 예를 들어, V_L 또는 V_H 하위서열은 링커 서열에 의해 연결되어 V_L-V_H 키메라를 형성할 수 있다. 단일 쇄 Fv (scFv) 하위서열들의 조합은 링커 서열에 의해 연결되어 scFv-scFv 키메라를 형성할 수 있다. OX40 항체 하위서열 및 단편은 단일 쇄 항체 또는 가변 영역(들)을 단독으로 포함하거나 또는 다른 OX40 항체 하위서열의 전부 또는 일부와의 조합으로 포함한다.
- [0088] 항체 하위서열 및 단편은 항체의 단백질분해성 가수분해, 예를 들어 온전한 항체의 펩신 또는 파파인 소화에 의해 제조될 수 있다. 펩신을 사용한 효소적 절단으로 생성된 항체 하위서열 및 단편은 F(ab')₂로 표시되는 5 S 단편을 제공한다. 상기 단편을 티올 환원제로 추가 절단하여 3.5 S Fab' 1가 단편을 생성할 수 있다. 별법으로, 펩신을 사용한 효소적 절단으로 2개의 1가 Fab' 단편 및 Fc 단편이 바로 생성된다 (예를 들어 미국 특허 제 4,036,945호 및 동 제4,331,647호, 및 [Edelman et al., Methods Enzymol. 1:422 (1967)] 참조). 항체를 절단하는 다른 방법, 예를 들어 중쇄 분리에 의한 1가 경쇄-중쇄 단편의 형성, 단편의 추가 절단, 또는 다른 효소적 또는 화학적 방법이 이용될 수도 있다.
- [0089] 단백질 및 항체 뿐만이 아니라 그의 하위서열 및 단편은 유전적 방법으로 생성될 수 있다. 이러한 기술은, Cos 세포 또는 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 숙주 세포에서 단백질 또는 항체를 코딩하는 유전자의 전부 또는 일부를 발현시키는 것을 포함한다. 재조합 숙주 세포는 전장 서열 또는 하위서열, 예를 들어 scFv를 합성할 수 있다 (예를 들어 [Whitlow et al., In: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991)], [Bird et

al., *Science* 242:423 (1988)] 및 미국 특허 제4,946,778호 참조). 단일 쇄 Fv 및 항체는 미국 특허 제4,946,778호 및 동 제5,258,498호, [Huston et al., *Methods Enzymol.* 203:46 (1991)], [Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995 (1993)] 및 [Skerra et al., *Science* 240:1038 (1988)]에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0090] 변형된 형태는 유도체화된 서열, 예를 들어 유리 아미노기가 아민 히드로클로라이드, p-톨루엔 술포닐기, 카르보벤족시기를 형성하는 아미노산; 염, 메틸 및 에틸 에스테르로부터의 유리 카르복시기; O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성하는 유리 히드록실기 뿐만이 아니라 천연 아미노산 유도체, 예를 들어 프롤린에 대한 4-히드록시프롤린, 리신에 대한 5-히드록시리신, 세린에 대한 호모세린, 리신에 대한 오르니틴을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 방법 (예를 들어 PCR-기재의 부위-지정, 결실 및 삽입 돌연변이유발, 화학적 변형 및 돌연변이유발, 가교 등)을 이용하여 생성될 수 있다.

[0091] 단백질 (예를 들어 항체), 핵산, 및 다른 조성물의 변형된 형태는 부가 및 삽입을 포함한다. 예를 들어, 부가는 단백질 (예를 들어 항체), 핵산 또는 다른 조성물에 임의의 유형의 분자를 공유 또는 비-공유 부착시키는 것 일 수 있다. 전형적으로, 부가 및 삽입은 별개의 기능 또는 활성을 부여한다.

[0092] 부가 및 삽입은 융합 (키메라) 폴리펩티드 또는 핵산 서열을 포함하며, 이것은 기준이 되는 천연 (야생형) 서열에 정상적으로는 존재하지 않는 1종 이상의 분자가 공유 부착된 서열이다. 특별한 예는 다관능성 단백질 (예를 들어 다중특이적 항체)을 생성하는 또다른 단백질 (예를 들어 항체)의 아미노산 서열이다.

[0093] 본 발명이 항체는 또한 1종 이상의 추가의 도메인이 공유 연결되어 별개의 또는 상보적 기능 또는 활성을 부여하는 키메라 또는 융합체를 포함한다. 항체는 자연계에는 천연적으로 존재하지 않는 2개 이상의 아미노산 서열이 함께 연결된 키메라 또는 융합체를 포함한다.

[0094] 본 발명에 따라, OX40 항체, 및 이종 도메인을 포함하는 OX40 항체를 코딩하는 핵산이 제공된다. 이종 도메인은 아미노산 부가 또는 삽입일 수 있지만 아미노산 잔기로 제한되지 않는다. 따라서, 이종 도메인은 다양한 상이한 유형의 작거나 큰 임의의 기능적 부분들로 이루어질 수 있다. 이러한 부분으로는 핵산, 펩티드, 탄수화물, 지질 또는 작은 유기 화합물, 예컨대 약물, 금속 (금, 은) 등이 있다.

[0095] 이종 도메인의 비-제한적인 특별한 예로는 태그, 검출가능한 표지 및 세포독성제 등이 있다. 태그 및 검출가능한 표지의 구체예로는 T7-, His-, myc-, HA- 및 FLAG-태그; 효소 (양고추냉이 페옥시다제, 우레아제, 카탈라제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 클로르암페니콜 트랜스퍼라제); 효소 기질; 리간드 (예를 들어 바이오텐); 수용체 (아비딘); 방사선택종 (C^{14} , S^{35} , P^{32} , P^{33} , H^3 , I^{125} 및 I^{131}); 전자-밀집 시약; 에너지 전달 분자; 상자성 표지; 형광단 (플루오레세인, 로다민, 피코에르트린); 발색단; 화학발광제 (이미다졸, 루시페라제); 및 생체발광제 등이 있다. 세포독성제의 구체예로는 디프테리아, 독소, 콜레라 독소 및 리신 등이 있다.

[0096] 링커 서열은 단백질 (예를 들어 항체), 핵산, 또는 다른 조성물 사이에서 2개의 실체가 적어도 부분적으로는 별개의 기능 또는 활성이 유지되도록 부가물 또는 삽입물 (예를 들어 이종 도메인)로 삽입될 수 있다. 링커 서열은 유연한 구조, 도메인과 상호작용하거나 그러한 상호작용을 촉진시킬 수 있는 순차적인 2차 구조 또는 소수성 또는 대전된 특성을 형성하지 못한다는 것을 포함하는 하나 이상의 특성을 가질 수 있다. 유연한 단백질 영역에 전형적으로 존재하는 아미노산은 글리신, 아스파라진 및 세린을 포함한다. 중성에 가까운 다른 아미노산, 예컨대 트레오닌 및 알라닌도 링커 서열에 사용될 수 있다. 링커 서열의 길이는 다양할 수 있다 (예를 들어 미국 특허 제6,087,329호 참조). 링커는 화학적 가교제 및 접합제, 예컨대 술포-숙신이미딜 유도체 (술포-SMCC, 술포-SMPB), 디숙신이미딜 수베레이트 (DSS), 디숙신이미딜 글루타레이트 (DSG) 및 디숙신이미딜 타르트레이트 (DST)를 추가로 포함한다.

[0097] 부가의 추가 예는 글리코실화, 지방산, 지질, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 포르밀화, 유비퀴틴화, 및 보호기 또는 차단기에 의한 유도체화, 및 임의의 수많은 화학적 변형을 포함한다. 다른 순열(permutation) 및 가능성은 당업자에게 매우 명백할 것이고, 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주한다.

[0098] 이러한 변형된 서열은 세포 발현 또는 시험관내 번역을 통해 재조합 DNA 기술로 만들어질 수 있다. 폴리펩티드 및 핵산 서열은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 자동 펩티드 합성 장치 (예를 들어 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 참조)를 이용한 화학적 합성으로 제조될 수도 있다.

- [0099] 항체 생성에 적합한 OX40 단백질은 다양한 표준 단백질 정제 또는 재조합 발현 기술 중 임의의 것으로 생성될 수 있다. 예를 들어, OX40 서열은 표준 펩티드 합성 기술, 예컨대 고상 합성으로 생성될 수 있다. 단백질의 일부가 T7 태그 또는 폴리히스티딘 서열과 같은 아미노산 서열을 함유하여 발현되거나 합성된 단백질의 정제를 용이하게 할 수 있다. 단백질은 세포에서 발현되어 정제될 수 있다. 단백질은 재조합 방법에 의해 더 커다란 단백질 (예를 들어 융합체 또는 키메라)의 일부로 발현될 수 있다.
- [0100] 폴리클로날 및 모노클로날 항체의 생성 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, OX40 또는 그의 면역원성 단편을 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) 또는 난알부민 (예를 들어 BSA)과 같은 담체와 임의로 접합시키거나 프로인트(Freund's) 완전 또는 불완전 아쥬반트와 같은 아쥬반트와 혼합하고, 이것을 사용하여 동물을 면역화한다. 하이브리도마 기술을 이용하여, OX40에 반응하는 면역화된 동물로부터의 비장세포를 단리하여 골수종 세포와 융합시킬 수 있다. 하이브리도마에 의해 생성된 모노클로날 항체는 OX40 또는 그의 면역원성 단편과의 반응성에 대하여 스크리닝할 수 있다.
- [0101] 면역화될 수 있는 동물로는 영장류, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 소 또는 기니아피그 등이 있다. 초기 면역화 및 경우에 따른 임의의 이후 면역화는 정맥내, 복강내, 근육내 또는 피하 경로를 통해 수행될 수 있다. 추가로, 면역 반응을 증가시키기 위해서, 항원을 난알부민 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 티로글로불린 및 파상풍 톡소이드와 같은 또다른 단백질과 커플링시킬 수도 있고, 또는 프로인트 완전 또는 불완전 아쥬반트와 같은 아쥬반트와 혼합시킬 수도 있다. 초기 면역화 및 경우에 따른 임의의 이후 면역화는 복강내, 근육내, 안내(眼內), 또는 피하 경로를 통해 수행될 수 있다. 이후의 면역화에서는 OX40 제제의 농도가 동일할 수도 있고 상이할 수도 있으며, 규칙적이거나 불규칙한 간격으로 행해질 수도 있다.
- [0102] 동물은 인간 유전자좌를 포함하도록 유전자 변형된 것을 포함하며, 인간 항체 생성에 사용될 수 있다. 1종 이상의 인간 이谬노글로불린 유전자를 갖는 트랜스제닉 동물은 예를 들어 미국 특허 제5,939,598호, WO 02/43478 및 WO 02/092812에 기재되어 있다. 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여, 항원에 대하여 높은 반응자인 면역화된 마우스의 비장세포를 단리하여 골수종 세포와 융합할 수 있다. OX40에 결합하는 모노클로날 항체를 수득할 수 있다.
- [0103] 인간 폴리클로날 항체 및 인간 모노클로날 항체를 생성하는 추가의 방법이 기재되어 있다 (예를 들어 [Kuroiwa et al., Nat. Biotechnol. 20:889 (2002)], WO 98/24893, WO 92/01047, WO 96/34096, WO 96/33735, 미국 특허 제5,413,923호, 동 제5,625,126호, 동 제5,633,425호, 동 제5,569,825호, 동 제5,661,016호, 동 제5,545,806호, 동 제5,814,318호, 동 제5,885,793호, 동 제5,916,771호 및 동 제5,939,598호).
- [0104] 용어 "인간"이 항체를 언급하며 사용된 경우, 이것은 그 항체의 아미노산 서열이 완전 인간, 즉 인간 중쇄 및 인간 경쇄 가변 영역 및 인간 불변 영역임을 의미한다. 따라서, 아미노산 전부가 인간이거나 인간 항체에 존재하는 것이다. 비-인간인 항체는 비-인간 아미노산 잔기를 인간 항체에 존재하는 아미노산 잔기로 치환함으로써 완전 인간으로 만들 수 있다. 인간 항체에 존재하는 아미노산 잔기, CDR 영역 맵 및 인간 항체 컨센서스 (consensus) 잔기는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 [Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987)], [Chothia and Lesk (1987)] 참조). 22종의 공지된 인간 V_H III 서열에 대한 조사결과를 기초로 한 인간 V_H 아군 III의 컨센서스 서열, 및 30종의 공지된 인간 카파 I 서열에 대한 조사결과를 기초로 한 인간 V_L 카파-쇄 아군 I의 컨센서스 서열은 [Padlan Mol. Immunol. 31:169 (1994)] 및 [Padlan Mol. Immunol. 28:489 (1991)]에 기재되어 있다. 따라서, 인간 항체는 1개 이상의 아미노산 잔기가 임의의 다른 인간 항체에 존재하는 1개 이상의 아미노산으로 치환된 항체를 포함한다.
- [0105] OX40 항체는 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 CDR-이식 (EP 239,400, WO 91/09967, 미국 특허 제5,225,539호, 동 제5,530,101호 및 동 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing) (EP 592,106, EP 519,596, [Padlan, Molecular Immunol. 28:489 (1991)], [Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994)], [Roguska. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:969 (1994)]) 및 쇄 셔플링(shuffling) (미국 특허 제5,565,332호)으로 생성될 수 있는 인간화 항체를 포함한다. 인간 컨센서스 서열 ([Padlan, Mol. Immunol. 31:169 (1994)] 및 [Padlan, Mol. Immunol. 28:489 (1991)])은 인간화 항체를 생성하는데 이미 사용된 바 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)] 및 [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).
- [0106] 용어 "인간화"가 항체를 언급하며 사용된 경우, 이것은 항체의 아미노산 서열이 수용자 인간 이谬노글로불린 분

자 중에서 원하는 항원에 특이적으로 결합하는 1개 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)의 비-인간 아미노산 잔기 (예를 들어 마우스, 래트, 염소, 토끼 등), 및 CDR을 플랭킹 (flanking)하는 아미노산 잔기인 Fv 프레임워크 영역 (FR) 내의 1개 이상의 인간 아미노산 잔기를 갖는다는 것을 의미한다. "영장류화"된 것으로 지칭되는 항체는 임의의 인간 잔기에 추가하여 수용자 인간 이뮤노글로불린 분자 및 프레임워크 영역 아미노산 잔기가 임의의 영장류 아미노산 잔기 (예를 들어 유인원, 긴 팔 원숭이, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이)일 수 있다는 점을 제외하고는 "인간화"의 의미에 속한다. 이뮤노글로불린의 인간 FR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체될 수 있다. 따라서, CDR 또는 인간 프레임워크 영역의 잔기를 비-인간 CDR 또는 프레임워크 영역 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환하여, 예를 들어 항원 친화도 또는 특이성을 변경, 일반적으로는 개선시킬 수 있다. 인간화 항체는 인간 항체에도 존재하지 않고 공여자 CDR 또는 프레임워크 서열에도 존재하지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 항체 또는 공여자 비-인간 항체에는 존재하지 않는 특정 위치에서의 FR 치환은 그 위치에서 인간 항체의 결합 친화도 또는 특이성을 개선시킬 것이라고 예측될 수 있다. 예를 들어 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위해 CDR 및 프레임워크 잔기의 상호작용을 모델링하거나 특정 위치에서의 특이한 프레임워크 잔기를 확인하기 위해 서열을 비교하는 것과 같이 분자 모델링을 기초로 하는 항체 프레임워크 및 CDR 치환은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예를 들어 미국 특허 제5,585,089호 및 [Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)] 참조).

[0107] OX40 항체는 키메라 항체를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라" 및 그의 문법적 변형형태가 항체를 언급하며 사용된 경우, 이것은 항체의 아미노산 서열이 2종 이상의 상이한 종에서 유래되거나 2종 이상의 상이한 종에서 수득 또는 단리되거나 또는 2종 이상의 상이한 종을 기초로 하는 1개 이상의 부분을 함유한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체의 일부는 인간 (예를 들어 불변 영역)일 수 있고, 항체의 또 다른 부분은 비-인간 (예를 들어 뮤린 종쇄 또는 뮤린 경쇄 가변 영역)일 수 있다. 따라서, 키메라 항체의 예는 항체의 여러 부분들이 상이한 종 기원의 것인 항체이다. 인간화 또는 영장류화 항체와는 달리, 키메라 항체는 항체의 임의의 영역에 상이한 종의 서열을 가질 수 있다.

[0108] 키메라 항체의 생성 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 [Morrison, Science 229:1202 (1985)], [Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986)], [Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191 (1989)] 및 미국 특허 제5,807,715호, 동 제4,816,567호 및 동 제4,816,397호). 한 종의 항체로부터의 가변 도메인이 또 다른 종의 가변 도메인 대신 치환된 키메라 항체는 예를 들어 [Munro, Nature 312:597 (1984)], [Neuberger et al., Nature 312:604 (1984)], [Sharon et al., Nature 309:364 (1984)], [Morrison et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)], [Boulian et al., Nature 312:643 (1984)], [Capon et al., Nature 337:525 (1989)] 및 [Traunecker et al., Nature 339:68 (1989)]에 기재되어 있다.

[0109] OX40 항체는 또한 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술 또는 이들의 조합을 이용하여 생성될 수도 있다 (미국 특허 제4,902,614호, 동 제4,543,439호 및 동 제4,411,993호 참조). 또한, [Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980] 및 [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988] 참조).

[0110] 항체 방법에 추가로 이용될 수 있는 적합한 기술은 OX40-기재의 친화도 정제, 비-변성 겔 정제, HPLC 또는 RP-HPLC, 크기 배제, 프로테인 A(Protein A) 컬럼에서의 정제, 또는 이들 기술의 임의의 조합을 포함한다. OX40 항체 이소형은 ELISA 검정을 이용하여 결정될 수 있고, 예를 들어 인간 Ig는 마우스 Ig-흡착된 항-인간 Ig를 사용하여 동정할 수 있다.

[0111] 항체 생성에 적합한 OX40은 당업계에 공지된 각종 표준 단백질 정제 또는 재조합 발현 기술 중 임의의 것으로 생성할 수 있다. 면역 반응을 유발하는데 적합한 OX40의 형태는 OX40 하위서열, 예컨대 면역원성 단편을 포함한다. OX40의 추가의 형태는 OX40-발현 세포, OX40-함유 제제 또는 세포 추출물 또는 분획물, 부분적으로 정제된 OX40을 포함한다.

[0112] 본 발명에 따라, OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 발현하는 단리되거나 정제된 세포, 및 본 발명의 OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 코딩하는 핵산이 제공된다. 한 실시양태에서, 단리된 세포는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 갖는 항체를 발현한다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 세포는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 갖는 항체를 발현한다. 추가의 실시양태에서, 단리된 세포는 OX40 과의 결합에 대하여 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된

항체와 경쟁하는 항체를 발현한다. 추가의 실시양태에서, 단리된 세포는 OX40에 대한 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체보다 높거나 적은 항체를 발현한다. 특별한 측면에서, OX40에 대한 결합 친화도는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 1배 내지 5000배 이내이다. 추가의 특별한 측면에서, OX40에 대한 결합 친화도는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 $KD 10^{-6} M$ 내지 약 $KD 10^{-13} M$ 이내이다. 본 발명의 OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편, 및 OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 코딩하는 핵산을 발현하는 단리되거나 정제된 세포의 비-제한적인 구체에는 비장 세포, 하이브리도마 세포 및 CHO 세포를 포함한다. 단리되거나 정제된 세포는 초대 세포 단리물 (예를 들어 비장세포), 2차 또는 계대배양한 세포 단리물 또는 수립되거나 불멸화된 세포 배양물 (하이브리도마 또는 CHO 세포)로부터의 복수개의 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0113] 본 발명에 따라, OX40에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법이 추가로 제공된다. 한 실시양태에서, OX40 항체를 생성하는 방법은 인간 Fc 재조합 단백질과 임의로 접합된 인간 OX40, 그의 하위서열 또는 단편 (예를 들어 OX40 세포의 도메인)을 인간 이뮤노글로불린을 발현할 수 있는 동물 (예를 들어 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 소)에게 투여하는 단계, 인간 OX40 항체의 발현에 대하여 상기 동물을 스크리닝하는 단계, 인간 OX40 항체를 생성하는 동물을 선별하는 단계, 및 선별된 동물로부터 항체를 단리하는 단계를 포함한다. 한 측면에서, 상기 방법에서는 인간 OX40 항체가 OX40 길항제 또는 효능제 활성을 갖는지 여부를 결정한다.

[0114] 본 발명에 따라, OX40 리간드 (OX40L)에 대한 OX40 결합을 억제하거나 저해하는 인간 OX40 항체를 생성하는 방법이 추가로 제공된다. 한 실시양태에서, 인간 OX40 항체를 생성하는 방법은 인간 Fc 재조합 단백질과 임의로 접합된 OX40, 그의 하위서열 또는 단편 (예를 들어 OX40 세포의 도메인)을 인간 이뮤노글로불린을 발현할 수 있는 동물 (예를 들어 트랜스제닉 마우스 또는 트랜스제닉 소)에게 투여하는 단계, 인간 OX40 항체의 발현에 대하여 상기 동물을 스크리닝하는 단계, 인간 OX40 항체를 생성하는 동물을 선별하는 단계, 및 인간 OX40 항체를 생성하는 선별된 동물로부터 항체를 단리하는 단계를 포함한다. 한 측면에서, 상기 방법에서는 인간 OX40 항체가 OX40 리간드 (OX40L)에 대한 OX40 결합을 억제하거나 저해하는지 여부를 결정한다.

[0115] 본 발명에 따라, a) 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체와 동일하거나, b) 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체가 결합하는, OX40 세포의 도메인의 아미노산 서열 중의 에피토프에 결합하거나, c) OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 1배 내지 5000배 이내이거나, d) OX40 결합 친화도가 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 약 $KD 10^{-6} M$ 내지 약 $KD 10^{-12} M$ 이내이거나, e) 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 갖거나, 또는 f) OX40과의 결합에 대하여 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체와 경쟁하는 특징 중 하나 이상을 보유하는, OX40 항체를 발현하는 비-인간 트랜스제닉 동물이 제공된다.

[0116] 본 발명에 따라, OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 코딩하는 단리되거나 정제된 핵산도 제공된다. 다양한 실시양태에서, 핵산 서열은 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49에 나타낸 바와 같은 성숙 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 서열 또는 그의 하위서열을 코딩한다. 추가의 실시양태에서, 핵산 서열은 서열 3 내지 서열 6 및 서열 38 내지 서열 43, 및 그의 하위서열 중 임의의 것을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 핵산 서열은 서열 3 내지 서열 6 및 서열 38 내지 서열 43의 서열, 및 그의 하위서열 중 임의의 것에 동의성을 갖는 서열을 포함한다.

[0117] 핵산은 다양한 길이일 수 있다. 본 발명의 OX40 항체 또는 그의 하위서열을 코딩하는 핵산의 길이는 전형적으로 약 100개 뉴클레오티드 내지 600개 뉴클레오티드 범위, 또는 이러한 길이 내에 포함되거나 이러한 길이를 포함하는 임의의 수치값 또는 범위이거나, 100개 내지 150개, 150개 내지 200개, 200개 내지 250개, 250개 내지 300개, 300개 내지 350개, 350개 내지 400개, 400개 내지 450개, 450개 내지 500개, 500개 내지 550개, 또는 약 550개 내지 600개 뉴클레오티드 길이, 또는 이러한 길이 내에 포함되거나 이러한 길이를 포함하는 임의의 수치값 또는 범위 또는 값이다. 본 발명의 OX40 항체 또는 그의 하위서열을 코딩하는 핵산에 특이적으로 혼성화하는 핵산의 길이는 전형적으로 약 10개 내지 20개, 20개 내지 30개, 30개 내지 50개, 50개 내지 100개, 100개 내지 150개, 150개 내지 200개, 200개 내지 250개, 250개 내지 300개, 300개 내지 400개, 400개 내지 500개, 500개 내지 600개 뉴클레오티드 범위, 또는 이러한 길이 내에 포함되거나 이러한 길이를 포함하는 임의의 수치값 또는 범위이다.

- [0118] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 포스포에스테르 결합 또는 등가물을 통해 연결된 적어도 2개 이상의 리보핵산 또는 데옥시리보핵산 염기쌍 (뉴클레오티드)를 지칭한다. 핵산은 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 핵산은 단일, 이중 또는 삼중 나선의 고리형 또는 선형의 분자를 포함한다. 예시적 핵산으로는 RNA, DNA, cDNA, 게놈 핵산, 천연 및 비-천연 핵산, 예를 들어 합성 핵산 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 짧은 핵산 및 폴리뉴클레오티드 (예를 들어 10개 내지 20개, 20개 내지 30개, 30개 내지 50개, 50개 내지 100개 뉴클레오티드)는 통상적으로 단일-또는 이중-가닥 DNA의 "올리고뉴클레오티드" 또는 "프로브"라고 지칭된다.
- [0119] 서열 7 내지 서열 10 및 서열 44 내지 서열 49 중 임의의 것에 나타낸 바와 같은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에서 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환되거나 부가되거나 결실된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산이 제공된다. 한 실시양태에서, 치환되거나 부가되거나 결실된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열은 OX40 세포외 도메인의 에피토프에 대한 결합 친화도를 갖는다. 또다른 실시양태에서, 치환되거나 부가되거나 결실된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열은 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 활성, 예를 들어 OX40의 기능 또는 활성을 조정하는 활성을 갖는다.
- [0120] 본 발명은 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 전장 서열 또는 하위서열 또는 단편을 코딩하는 핵산 서열과 80% 내지 90% 이상 상보적이거나 상동성인, 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 OX40 항체의 전장 서열 또는 하위서열을 코딩하는 핵산에 혼성화하는 핵산을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 핵산 서열은 약 10개 내지 20개, 20개 내지 30개, 30개 내지 50개, 50개 내지 100개, 100개 내지 150개, 150개 내지 200개, 200개 내지 250개, 250개 내지 300개, 300개 내지 400개, 400개 내지 500개, 500개 내지 600개 뉴클레오티드의 길이, 또는 이러한 길이 내에 포함되거나 이러한 길이를 포함하는 임의의 수치값 또는 범위를 갖는다. 특별한 측면에서, 상기 핵산 서열은 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열, 또는 그의 일부 (예를 들어 CDR, FR 등)에 혼성화한다.
- [0121] 용어 "혼성화하다" 및 그의 문법적 변형형태는 핵산 서열들 사이의 결합을 지칭한다. 일반적으로, 혼성화 서열은 기준 (예를 들어 OX40 항체) 서열의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산과 약 50% 초과의 상동성을 가질 것이다. 혼성화 서열들 사이의 혼성화 영역은 전형적으로 적어도 약 12개 내지 15개의 뉴클레오티드, 15개 내지 20개의 뉴클레오티드, 20개 내지 30개의 뉴클레오티드, 30개 내지 50개의 뉴클레오티드, 50개 내지 100개의 뉴클레오티드, 100개 내지 200개, 300개 내지 400개의 뉴클레오티드 또는 그보다 많거나, 또는 이러한 길이 내에 포함되거나 이러한 길이를 포함하는 임의의 수치값 또는 범위이다.
- [0122] 핵산 서열은 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 치환, 부가 및 결실, 뿐만이 아니라 유도체화된 형태 및 융합/키메라 서열 (예를 들어 이종 도메인에 융합된 OX40 항체를 코딩함)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 유전자 코드의 동의성으로 인해서, 핵산은 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 및 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체를 코딩하는 핵산과 동의성을 갖는 서열 및 하위서열을 포함한다. 다른 예는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 또는 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 항체, 그의 하위서열 및 단편을 코딩하는 서열에 상보적인 핵산이다.
- [0123] 핵산은 다양한 표준 클로닝 및 화학적 합성 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 기술로는 항체-코딩 서열에 어닐링될 수 있는 프라이머 (예를 들어 동의성을 갖는 프라이머 혼합물)를 사용한 게놈 DNA 또는 cDNA 표적의 핵산 증폭, 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 핵산은 화학적 합성 (예를 들어 고상 포스포르아미디트 합성) 또는 유전자로부터의 전사에 의해 생성될 수도 있다. 이어서, 생성된 서열을 시험관내 번역할 수도 있고, 또는 플라스미드로 클로닝하여 증식시킨 후에 세포 (예를 들어 숙주 세포, 예컨대 효모 또는 박테리아, 진핵생물, 예컨대 동물 또는 포유동물 세포 또는 식물)에서 발현시킬 수도 있다.
- [0124] 본 발명에 따라, 벡터를 포함하는 본 발명의 핵산 서열이 추가로 제공된다. 한 실시양태에서, 벡터는 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특별한 실시양태에서, 벡터는 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 및 112Z5로 표시한 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 임의의 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0125] 벡터는 핵산의 삽입 또는 혼입으로 조작될 수 있는 비히클이다. 벡터는 플라스미드, 바이러스, 원핵 (박테리아) 및 진핵 (식물, 진균, 포유동물) 벡터를 포함한다. 벡터는 핵산의 시험관내 또는 생체내 발현에 사용될 수 있다. "발현 벡터"라고 지칭되는 이러한 벡터는 OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 코딩하는 핵산을 비롯한 핵산을 도입하고, 코딩된 단백질을 시험관내 (예를 들어 용액 중 또는 고상 중), 세포내 또는 대상체 중

에서 생체내 발현시키는데 유용하다.

[0126] 벡터는 핵산 조작에 사용될 수도 있다. 유전자 조작을 위해서는 "클로닝 벡터"를 사용하여 삽입된 핵산을 시험관내 (예를 들어 용액 중 또는 고상 중), 세포내 또는 대상체 중에서 생체내 전사시키거나 번역시킬 수 있다.

[0127] 벡터는 일반적으로 세포 내에서 시험관내 또는 생체내 증식하기 위한 복제 기점을 함유한다. 적절하다면, 발현제어 요소를 비롯하여 벡터 내에 존재하는 제어 요소를 포함시켜서 전사 및 번역을 용이하게 할 수 있다.

[0128] 벡터는 선별 마커를 포함할 수 있다. "선별 마커"는 해당 유전자를 함유하는 세포를 선별하도록 하는 유전자이다. "양성 선별"은 양성 선별에의 노출시에 선별 마커를 함유하는 세포를 선별하는 과정을 지칭한다. 약물 내성을 양성 선별 마커의 일례로, 상기 마커를 함유하는 세포는 해당 약물을 함유하는 배양 배지에서 생존할 것이고, 상기 마커가 없는 세포는 사멸할 것이다. 선별 마커로는 약물 내성 유전자, 예를 들어 G418에 대한 내성을 부여하는 neo, 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygr, 및 퓨로마이신에 대한 내성을 부여하는 puro 등이 있다. 다른 양성 선별 마커 유전자는 상기 마커를 함유하는 세포를 동정하거나 스크리닝하게 하는 유전자를 포함한다. 이들 유전자로는 특히 형광 단백질 (GFP 및 GFP-유사 발색단, 루시퍼라제)에 대한 유전자, lacZ 유전자, 알칼리성 포스파타제 유전자 및 표면 마커, 예컨대 CD8을 들 수 있다. "음성 선별"은 음성 선별 마커를 함유하는 세포가 적절한 음성 선별제에 노출시에 사멸되는 과정을 지칭한다. 예를 들어, 단순 허페스 바이러스-티미딘 키나제 (HSV-tk) 유전자를 함유하는 세포 [Wigler et al., Cell 11:223 (1977)]는 약물 간시클로비르 (GANC)에 민감하다. 유사하게, gpt 유전자는 세포가 6-티오크산틴에 민감하게 한다.

[0129] 바이러스 벡터는 레트로바이러스 (감염성의 분열 및 또한 비-분열 세포의 경우에는 렌티바이러스), 포미(foamy) 바이러스 (미국 특허 제5,624,820호, 동 제5,693,508호, 동 제5,665,577호, 동 제6,013,516호 및 동 제5,674,703호, WO 92/05266 및 WO 92/14829), 아데노바이러스 (미국 특허 제5,700,470호, 동 제5,731,172호 및 동 제5,928,944호), 아데노-관련 바이러스 (AAV) (미국 특허 제5,604,090호), 단순 허페스 바이러스 벡터 (미국 특허 제5,501,979호), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 기재의 벡터 (미국 특허 제5,561,063호), 레오바이러스, 로타바이러스 계놈, 시미안 바이러스 40 (SV40) 또는 유두종 바이러스 ([Cone et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349 (1984)], [Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982], [Sarver et al., Mol. Cell. Biol. 1:486 (1981)]), 미국 특허 제5,719,054호)를 기재로 하는 벡터를 포함한다. 아데노바이러스는 서서히 복제 중이고/하거나 분화가 끝나가는 세포를 효율적으로 감염시키고, 서서히 복제 중이고/하거나 분화가 끝나가는 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 발현에 유용한 추가의 바이러스 벡터는 파르보바이러스, 노르워크 바이러스, 코로나바이러스, 파라믹소- 및 랍도바이러스, 토파바이러스 (예를 들어 신드비스 바이러스 및 셀리키 산림 바이러스) 및 수포성 구내염 바이러스 (VSV)를 포함한다.

[0130] 핵산을 포함하는 벡터는 상기 핵산이 발현 제어 요소에 작동가능하게 연결된 경우에 발현될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 언급된 요소들 사이에서 이것들이 의도된 방식으로 작동하게 하는 물리적이거나 기능적인 관계를 지칭한다. 따라서, 발현 제어 요소에 "작동가능하게 연결된" 핵산은 상기 제어 요소가 핵산 전사 및 적절하다면 전사체의 번역을 조정한다는 것을 의미한다.

[0131] "발현 제어 요소" 또는 "발현 제어 서열"은 작동가능하게 연결된 핵산의 발현에 영향을 주는 폴리뉴클레오티드이다. 프로모터 및 인핸서는 발현 제어 요소 및 서열의 비-제한적인 특별한 예이다. "프로모터"는 하류 (3' 방향) 핵산 서열의 전사를 개시할 수 있는 시스-작용(cis-acting) DNA 조절 영역이다. 프로모터 서열은 전사 개시를 용이하게 하는 뉴클레오티드를 포함한다. 인핸서 역시 핵산 발현을 조절하지만, 이것이 작동가능하게 연결된 핵산의 전사 출발 부위로부터 멀어져 기능할 수 있다. 인핸서는 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단 뿐만 아니라 핵산 내 (예를 들어 인트론 또는 코딩 서열)에 위치한 경우에도 기능한다. 추가의 발현 제어 요소는 리더 서열 및 융합 파트너 서열, 다중유전자 또는 폴리시스트론 메세지 생성을 위한 내부 리보솜 결합 부위 (IRES) 요소, 인트론을 위한 스플라이싱 신호, mRNA가 프레임에 맞게(in-frame) 번역되도록 하는 정확한 유전자 리딩 프레임의 유지, 관심 전사체의 적당한 폴리아데닐화를 제공하는 폴리아데닐화 신호, 및 정지 코돈을 포함한다.

[0132] 발현 제어 요소는 작동가능하게 연결된 핵산의 전사가 신호 또는 자극 없이 일어나는 "구성적(constitutive)" 요소를 포함한다. 신호 또는 자극에 대한 반응으로 발현에 영향을 주는 발현 제어 요소는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시키거나 감소시키며, "조절가능"하다. 신호 또는 자극에 대한 반응으로 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시키는 조절가능한 요소는 "유도가능한 요소"라고 지칭된다. 신호 또는 자극에 대한 반응으로 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 감소시키는 조절가능한 요소는 "억제가능한 요소"라고 지칭된다 (즉, 상기 신호가 발현을 감소시키며, 이 신호가 제거되거나 없어지면 발현이 증가됨).

- [0133] 박테리아 발현을 위한 구성적 프로모터는 T7 뿐만이 아니라 유도가능한 프로모터, 예컨대 박테리오파지 λ의 pL, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac 하이브리드 프로모터)를 포함한다. 곤충 세포 시스템에서는 구성적 또는 유도가능한 프로모터 (예를 들어 엑디손)가 사용될 수 있다. 효모에서는 구성적 프로모터가 예를 들어 ADH 또는 LEU2 및 유도가능한 프로모터, 예컨대 GAL을 포함한다 (예를 들어 [Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ch. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988], [Grant et al, In: Methods in Enzymology. 153:516-544 (1987), eds. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y.], [Glover, DNA Cloning. Vol. II, Ch. 3, IRL Press, Wash., D.C., 1986], [Bitter, In: Methods in Enzymology, 152:673-684 (1987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y.] 및 [Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II (1982)] 참조).
- [0134] 포유동물 발현에는 바이러스 또는 다른 기원의 구성적 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, CMV, SV40, 또는 바이러스 장쇄 말단 반복부 (LTR) 등 또는 포유동물 세포 계놈에서 유래된 유도가능한 프로모터 (예를 들어 메탈로티오네인 IIA 프로모터, 열 충격 프로모터, 스테로이드/갑상선 호르몬/레티노산 반응 요소) 또는 포유동물 바이러스에서 유래된 유도가능한 프로모터 (예를 들어 아데노바이러스 후기 프로모터, 마우스 유선암 바이러스 LTR)가 사용된다.
- [0135] 발현 제어 요소는 "조직-특이적 발현 제어 요소"라고 지칭되는, 특정 조직 또는 세포 유형에서 활성인 요소를 포함한다. 조직-특이적 발현 제어 요소는 전형적으로 특정 세포 또는 조직 유형에서 더욱 활성인데, 이는 이것들이 다른 세포 또는 조직 유형에 비해 상기한 특정 세포 또는 조직 유형에서 활성인 전사 활성자 단백질, 또는 다른 전사 조절자에 의해 인식되기 때문이다. 이러한 발현 제어 요소의 비-제한적인 특별한 예는 헥스키나제 II, COX-2, 알파-태아단백질, 암성배아(carcinoembryonic) 항원, DE3/MUC1, 전립선 특이적 항원, C-erB2/neu, 글루코스-의존적 인슐린친화성(insulinotropic) 폴리펩ти드 (GIP), 텔로머라제 역전사효소 및 저산소증-반응성 프로모터와 같은 프로모터이다.
- [0136] 본 발명에 따라, 본 발명의 OX40 핵산 또는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포가 제공된다. 숙주 세포는 원핵 및 진핵 세포, 예컨대 박테리아, 진균 (효모), 식물, 곤충, 및 동물 (예를 들어 영장류 및 인간을 비롯한 포유동물) 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 형질전환된 세포의 비-제한적인 예는 재조합 박테리오파지 핵산, 플라스미드 핵산 또는 코스미드 핵산 발현 벡터로 형질전환된 박테리아, 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV), 담배 모자이크 바이러스 (TMV))로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어 Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포, 및 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어 레트로바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스)로 감염된 동물 세포, 또는 안정적인 발현을 위해 조작되어 형질전환된 동물 세포를 포함한다. OX40 항체, 그의 하위서열 및 단편을 발현하는 포유동물 숙주 세포의 비-제한적인 예는 CHO 세포를 포함한다. 숙주 세포는 초대 세포 단리물, 2차 또는 계대배양하여 단리한 세포 또는 수립되거나 불멸화된 세포 배양물로부터의 복수개의 세포 또는 세포 집단일 수 있다.
- [0137] 용어 "형질전환" 또는 "형질감염"이 세포 (예를 들어 숙주 세포) 또는 유기체를 언급하며 사용된 경우, 이것은 외인성 분자, 예를 들어 단백질 또는 핵산 (예를 들어 트랜스진(transgene))을 세포로 혼입시킨 후의 세포 내 유전적 변화를 의미한다. 따라서, "형질감염된" 또는 "형질전환된" 세포는 예를 들어 재조합 DNA 기술 등을 통해 인간의 손으로 외인성 분자가 도입된 세포 또는 그의 자손이다.
- [0138] 핵산 또는 단백질은 세포 및 그의 자손에서 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염되거나 형질전환 (발현)될 수 있다. 세포(들)은 증식될 수 있고, 도입된 단백질을 발현시키거나 핵산을 전사시킬 수 있다. 형질감염되거나 형질전환된 세포의 자손은 모 세포와 동일할 수는 없는데, 이는 복제 동안에 발생하는 돌연변이가 존재할 수 있기 때문이다.
- [0139] 전형적으로, 세포 형질감염 또는 형질전환에는 벡터를 이용한다. 벡터는 바이러스 입자 또는 소포 내에 포함될 수 있고, 상기 입자 또는 소포 표면에 표적 세포 리간드 또는 수용체에 결합하는 단백질을 포함시키면 특정 세포 유형에 임의로 표적화될 수 있다. 따라서, 시험관내, 생체외 또는 생체내 형질감염 또는 형질전환을 위한 세포를 표적화하도록 바이러스 입자 또는 소포 자체, 또는 바이러스 표면상의 단백질이 제조될 수 있다. 따라서, 세포, 조직 또는 장기로의 시험관내, 생체내 및 생체외 전달하는 바이러스 및 비-바이러스 벡터 수단이 포함된다.
- [0140] 표적 세포 (예를 들어 숙주 세포)로의 핵산 도입은 삼투압 충격 (예를 들어 인산칼슘), 전기천공, 미세주입, 세

포 융합 등과 같은 당업계 공지의 방법으로 수행될 수도 있다. 핵산 및 폴리펩티드의 시험관내, 생체외 및 생체내 도입도 다른 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 중합체 물질, 예컨대 폴리에스테르, 폴리아민산, 히드로겔, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌-비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 프로타민 슬레이트, 또는 락티드/글리콜리드 공중합체, 폴리락ти드/글리콜리드 공중합체, 또는 에틸렌비닐아세테이트 공중합체가 사용된다. 핵산은 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐, 또는 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 각각을 이용하여 제조된 마이크로캡슐 또는 콜로이드 시스템 중에 포획될 수 있다. 콜로이드상 분산 시스템은 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 지질-기재의 시스템, 예컨대 수중유 액체, 미셀, 혼합 미셀, 및 리포좀을 포함한다.

[0141] 각종 조성물을 세포로 도입하기 위한 리포좀은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 포스파티딜콜린, 포스파티딜 세린, 리포페틴 및 DOTAP를 포함한다 (예를 들어 미국 특허 제4,844,904호, 동 제5,000,959호, 동 제4,863,740호 및 동 제4,975,282호, 및 미국 매릴랜드주 가이터스버그 소재의 GIBCO-BRL). 유전자 요법에 유용한 피페라진 기재의 양친매성 양이온성 지질도 공지되어 있다 (예를 들어 미국 특허 제5,861,397호 참조). 양이온성 지질 시스템도 공지되어 있다 (예를 들어 미국 특허 제5,459,127호 참조). 중합체 물질, 마이크로캡슐 및 콜로이드상 분산 시스템, 예컨대 리포좀을 본원에서는 통칭하여 "소포"라고 지칭한다.

[0142] 본 발명의 OX40 항체는 임상 및 진단 방법을 비롯하여 치료, 치유 및 진단 용도에 유용하다. 예를 들어, 인간 PBMC가 방사선조사된 중증 합병형 면역결핍 (Severe Combined ImmunoDeficient, SCID) 마우스로 전달된 급성 및 만성 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 마우스 모델에서, 인간 항-인간 OX40 길항체 항체는 질병의 발병 이전 또는 이후에 투여될 때 인간 T-세포 수 및 질환 병리를 감소시켰다. 따라서, 본 발명의 OX40 항체는 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델에서 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 증상을 줄이거나 감소시키거나 방지할 수 있고, 급성 또는 만성 이종이식 숙주 질환 모델 (예를 들어 면역결핍 (SCID) 마우스)에서 이식편-대-숙주 질환을 완화 또는 퇴행시킬 수 있다. 본 발명의 항체는 천연 킬러 세포에 의한 OX40-발현 세포의 용해를 유도할 수도 있다. 어떠한 이론에도 얹매이고 싶지는 않지만, OX40-발현 세포의 용해는 항체-의존성 세포내 세포독성 (ADCC)으로 인한 것일 수 있다.

[0143] 따라서, 본 발명의 OX40 항체는 OX40 활성 또는 기능의 조정에 순응하거나 그에 유리하게 반응할 수 있는 장애 및 질환의 치료법 또는 요법에 유용하다. 따라서, OX40 길항체 항체는 OX40 활성 또는 기능을 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 저해하거나 차단하는 것에 순응하거나 그에 유리하게 반응할 것 같은 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 및 그의 증상을 치료하는데 사용될 수 있고, OX40 효능제 항체는 OX40 활성 또는 기능을 자극하거나 증가시키거나 증진시키거나 촉진시키거나 유도하는 것에 순응하거나 그에 유리하게 반응할 것 같은 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 및 그의 증상을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0144] 본 발명에 따라, 바람직하지 않거나 비정상적인 면역 반응과 관련이 있는 장애, 질환, 상태, 병리 및 해로운 증상 또는 비정상을 치료하는 방법이 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "바람직하지 않은 면역 반응" 또는 "비정상적인 면역 반응"은 원하는 또는 생리적으로 정상적인 것보다 과하거나 또는 그에 미치지 못하는 임의의 면역 반응, 활성 또는 기능을 지칭한다. 바람직하지 않은 면역 반응, 기능 또는 활성은 정상적인 반응, 기능 또는 활성일 수 있다. 따라서, 정상적인 면역 반응은 이것이 바람직하지 않은 한은 비정상적인 것으로 간주되지는 않을 지라도 이러한 용어의 의미에 포함된다. 바람직하지 않은 면역 반응, 기능 또는 활성은 비정상적인 반응, 기능 또는 활성일 수도 있다. 비정상적인(abnormal, aberrant) 면역 반응, 기능 또는 활성은 정상적인 것에서 벗어난 것이다. 바람직하지 않고 비정상적인 면역 반응은 만성 또는 급성의 체액성 면역 반응이거나 세포-매개 면역 반응이거나 이들의 조합일 수 있다.

[0145] 바람직하지 않거나 비정상적인 면역 반응의 예는 자가면역 장애 또는 질환 (예를 들어 자가면역) 등의 사례에서와 같은 과반응성 면역 반응이다. 바람직하지 않거나 비정상적인 면역 반응의 또 다른 예는 임의의 조직 또는 장기에서 급성 또는 만성 염증을 야기하는 면역 반응이다. 바람직하지 않거나 비정상적인 면역 반응의 또 다른 예는 세포, 조직 또는 장기의 파괴를 야기하는 면역 반응, 예컨대 이식 거부, 이식편-대-숙주 질환 (GVHD), 자가면역 장애 또는 질환, 또는 염증이다. 바람직하지 않거나 비정상적인 면역 반응의 또 다른 예는 면역 반응이 저반응성인 경우, 예컨대 항원에 대한 반응이 원하는 것보다 적어서 예를 들어 허용이 발생하는 경우이다.

[0146] 따라서, 바람직하지 않고 비정상적인 면역 반응은 장애 또는 질환에 따른 생리적 상태, 병리 및 해로운 증상 또는 비정상을 특징으로 하는 만성 및 급성 면역 장애 및 질환을 포함한다. 본 발명이 적용되는 면역 장애 및 질환의 비-제한적인 특별한 예는 이식편-대-숙주 질환 (GVHD), 이식 거부, 자가면역 장애 및 염증을 포함한다.

[0147] 본 발명에 따라, 적어도 부분적으로는 OX40 항체가 OX40 활성 또는 기능을 조정하는 능력을 기초로 하는 생체내

치료 및 치유 방법이 제공된다. 특별한 치료 방법의 실시양태에서, 본 발명의 OX40 항체를 사용한 치료법 또는 요법에 순응하거나 그에 반응할 수 있는 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 및 증상의 예는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애를 포함한다. 추가의 치료 방법 실시양태에서, 본 발명의 OX40 항체를 사용한 치료법 또는 요법에 순응하는 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 및 증상을 예를 들어 염증, 이식 거부, 이식편-대-숙주 질환 (GVHD), 자가면역 장애 또는 질환, 예컨대 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨병 (예를 들어 인슐린-의존성 진성 당뇨병, IDDM, 제I형 당뇨병), 크론병 (CD), 염증성 장 질환 (IBD), 궤양성 대장염 (UC), 셀리아크병, 건선, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 증식성 루푸스 신염, 육아종 근장애, 다발성근염, 및 예를 들어 바람직하지 않거나 비정상적인 OX40-매개 세포 반응을 포함한다.

[0148] 따라서, 본 발명은 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편이 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, 이식 거부, 이식편-대-숙주 질환 (GVHD), 또는 자가면역 장애, 예컨대 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨병 (예를 들어 인슐린-의존성 진성 당뇨병, IDDM, 제I형 당뇨병), 크론병 (CD), 염증성 장 질환 (IBD), 궤양성 대장염 (UC), 셀리아크병, 건선, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 증식성 루푸스 신염, 육아종 근장애, 다발성근염, 또는 바람직하지 않거나 비정상적인 OX40-매개 세포 반응을 줄이고 감소시키고 억제하고 저해하고 차단시키거나, 기도 반응항진/과민증 (예를 들어 천식, 알러지성 천식)에서의 폐 염증 및 다른 조직 및 장기에서의 염증을 치료하고 줄이고 감소시키고 억제하고 방지하고 차단하는데 사용되는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 치료가능한 이식편-대-숙주 질환의 증상의 비-제한적인 구체예는 체중 손실, 모발 손실, 피부 발진, 혈뇨, 복수증, 및 간, 장관, 폐, 피에서의 염증성 세포 침윤, 및 사망이다.

[0149] OX40 항체는 또한 폐, 관절, 근육, 피부, 중추 또는 말초 신경계 또는 장에 존재하는 염증을 줄이고 감소시키고 억제하고 방지하고 차단하는데 유용하다. OX40 항체는 감염원 (예를 들어 박테리아, 바이러스 또는 기생충 감염원)에 대한 대상체의 반응으로 인한 염증을 줄이고 감소시키고 억제하고 방지하고 차단하는데에도 유용하다.

[0150] OX40 항체를 사용한 치료법 또는 요법에 순응하는 추가의 상태로는 예를 들어 골관절염, 건선성 관절염, 뇌척수염, 중증 근무력증, 자가면역 갑상선염, 아토피성 피부염, 습진성 피부염, 건선, 쇼그렌 증후군, 아프타성 궤양, 홍채염, 결막염, 각결막염, 피부 홍반성 루푸스, 경피증, 질염, 직장염, 나병 결절 홍반, 자가면역 포도막염, 알러지성 뇌척수염, 급성 괴사성 출혈 뇌장애, 특발성 양측성 진행형 감각신경 난청, 재생불량성 빈혈, 진정 적혈구계 빈혈, 특발성 혈소판감소증 (ITP), 다발연골염, 베게너 육아종증, 만성 활성 간염, 스티븐스-존슨 증후군, 특발성 스프루우, 편평 태선, 그레이브스병, 유육종증, 원발성 담즙성 간경변, 후포도막염, 간질성 폐 섬유증, 하시모토 갑상선염, 자가면역 다분비선 증후군, 면역-매개 불임증, 자가면역 애디슨병, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 포진상 피부염, 자가면역 탈모, 백반증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성자반병, 악성 빈혈, 길랑-바레 증후군, 강직 인간 증후군, 급성 류마티스성 열, 교감성 안염, 굿파스튜어 증후군, 전신적 괴사성 맥관염, 항-인지질 증후군, 천식 (예를 들어 알러지성 천식) 및 알러지 등이 있다.

[0151] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이식하다", "이식" 및 그의 문법적 변형형태는 신체 일부의 세포, 조직 또는 장기를 신체의 또다른 부분으로, 또는 한 개체 또는 동물로부터 또다른 개체 또는 동물로 옮기는 것(grafting, implanting, transplanting)을 의미한다. 따라서, 이식된 세포, 조직 또는 장기는 동종이식편일 수도 있고 이 종이식편일 수도 있다. 예시적 이식 세포는 골수, 조혈 줄기 세포, 말초혈 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포, 동종이계 또는 비-동종이계 세포, 및 신경 세포를 포함한다. 예시적 이식 조직은 피부, 혈관, 눈 및 골수를 포함한다. 예시적 이식 장기는 신장, 심장, 폐, 췌장 및 간을 포함한다. 상기 용어는 또한 예를 들어 한 대상체 (예를 들어 인간 또는 동물)로부터 형질전환된 세포, 조직 및 장기를 꺼내거나 얻은 후에 그 대상체에게 다른 대상체 (예를 들어 인간 또는 동물)로부터의 이식편을 주는 생체외 유전자 요법 등에 의해 유전자 변형된 세포, 조직 및 장기를 포함한다.

[0152] 본 발명에 따라 치료가능한 염증은 OX40에 의해 매개되거나 OX40 항체를 사용하여 OX40을 조정하여 치료하는 것에 순응하는 염증 반응을 포함하며, 이로써 세포 증식, 생존, 사망, 또는 림프구 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포)의 활성 등 중 하나 이상을 조정할 수 있다. 상기 방법 (예를 들어 치료법)은 염증의 발병, 빈도, 중증도, 진행 또는 지속기간을 줄일 수 있다. 염증의 예시적 증상으로는 종창, 통증, 발진, 두통, 열, 구역, 골격 관절 경직, 또는 조직 또는 세포 손상 중 하나 이상을 들 수 있다.

[0153] 염증은 여러 세포, 조직 또는 장기, 또는 단일 세포 유형, 조직 유형 또는 장기에 직접 또는 간접적으로 세포, 조직 또는 장기 손상을 야기할 수 있다. 손상이 일어날 수 있는 예시적 조직 및 장기로는 표피 또는 점막 조직, 창자, 장, 췌장, 흉선, 간, 신장, 비장, 피부, 또는 골격 관절 (예를 들어 무릎, 발목, 엉덩이, 어깨, 손

목, 손가락, 발가락 또는 팔꿈치) 등이 있다. 본 발명에 따른 치료는 조직 손상의 진행 또는 악화를 줄이거나 억제하거나 방지할 수도 있고, 또는 손상된 장기 또는 조직, 예를 들어 피부, 점막, 간을 재생시킬 수도 있다.

[0154] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료하는", "치료" 및 그의 문법적 변형형태는 환자에서 생리적 효과 또는 결과를 얻고자 개개의 대상체 또는 환자에게 행해지는 프로토콜, 투약법, 과정 또는 치유법을 의미한다. 따라서, 본 발명의 방법은 무엇보다도 주어진 대상체의 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 또는 증상에 측정 가능한 개선 또는 유익한 효과를 제공하는 치료 및 치유 방법을 포함한다. 측정가능한 개선 또는 유익한 효과는 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 또는 증상에 있어서의 임의의 객관적이거나 주관적인 일시적, 일시적 또는 장기 개선이거나, 또는 상기 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 또는 상태와 관련이 있거나 그에 의해 야기되는 해로운 증상의 발병, 중증도, 지속기간 또는 빈도의 감소이다. 본 발명의 방법은 즉시 효과가 있을 필요는 없으며, 약간의 지연이 있을 수 있지만 시간에 따라 주어진 대상체에서 실제 개선 또는 유익한 효과, 안정화 또는 완화가 일어날 것이다.

[0155] 본 발명에 따른 치료 방법의 만족스러운 임상적 종점은 예를 들어 상기 장애, 질환, 병리 또는 상태와 관련이 있는 병리, 해로운 증상 또는 합병증 중 하나 이상의 중증도, 지속기간 또는 빈도가 감소되거나 줄어드는 것이 점차 증가되거나 부분적인 경우, 또는 상기 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 또는 증상 (예를 들어 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, GVHD, 이식 거부, 염증, 또는 자가면역 장애)의 생리적, 병리적, 생화학적 또는 세포 내 증세 또는 특징 중 하나 이상이 억제되거나 줄어들거나 방지되거나 역전되는 경우에 달성된다. 따라서, 치유 이점 또는 개선은 상기 장애, 질환, 생리적 상태, 병리 또는 증상 (예를 들어 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, GVHD, 이식 거부, 염증, 또는 자가면역 장애)과 관련이 있거나 그로 인해 야기되는 대다수의 또는 모든 병리, 해로운 증상 또는 합병증의 치유 또는 제거일 필요가 없을 수 있다. 따라서, 치유 이점 또는 개선이 상기 장애, 질환, 생리적 상태, 또는 병리 (예를 들어 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, GVHD, 이식 거부, 염증, 또는 자가면역 장애)와 관련이 있거나 그로 인해 야기되는 임의의 또는 모든 병리, 해로운 증상 또는 합병증을 완전 치유시킬 필요는 없다. 예를 들어, 단지 수일, 수주, 또는 수개월 동안일지라도, 또는 상기 질환, 장애, 병리 또는 상태 (예를 들어 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, GVHD, 이식 거부, 염증, 또는 자가면역 장애)와 관련이 있거나 그로 인해 야기되는 병리, 해로운 증상 또는 합병증 중 하나 이상이 유지되더라도, 상기 장애, 질환, 생리적 상태, 또는 병리 (예를 들어 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, GVHD, 이식 거부, 염증, 또는 자가면역 장애)와 관련이 있거나 그로 인해 야기되는 병리, 해로운 증상 또는 합병증을 부분적으로 줄이거나 감소시키거나 억제시키거나, 또는 안정화시키거나, 또는 그의 진행이나 악화를 느려지게 하는 것이 만족스러운 임상적 결과이다.

[0156] 다양한 특별한 실시양태에서, 상기 치료 방법은 만성 또는 급성 면역 장애 또는 질환과 관련이 있는 해로운 (신체적) 증상 또는 예후 중 하나 이상을 경감시키거나 완화시키는 것을 포함한다. 다양한 추가의 특별한 실시양태에서, 상기 치료 방법은 이식편-대-숙주 질환 (예를 들어 체중 손실, 모발 손실, 피부 발진, 혈뇨, 복수증, 간, 장관, 폐에서의 염증성 세포 침윤 및 사망)과 관련이 있는 해로운 증상 또는 신체적 예후 중 하나 이상의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하는 것을 포함하거나, 이식편-대-숙주 질환을 완화 또는 퇴행시키거나, 또는 이식편-대-숙주 질환을 방지한다. 다양한 추가의 특별한 실시양태에서, 상기 치료 방법은 이식물 또는 이식편 거부 (예를 들어 이식물 또는 이식편에 대한 면역 반응 또는 이식물 또는 이식편 세포 파괴)와 관련이 있는 해로운 증상 또는 신체적 예후 중 하나 이상의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하는 것을 포함하거나, 이식물 또는 이식편 거부를 완화 또는 퇴행시키거나, 또는 이식물 또는 이식편 거부를 방지한다. 다양한 추가의 특별한 실시양태에서, 상기 치료 방법은 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 당뇨병 (예를 들어 인슐린-의존성 진성 당뇨병, IDDM, 제I형 당뇨병), 크론병 (CD), 염증성 장 질환 (IBD), 궤양성 대장염 (UC), 셀리아크병, 건선, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 증식성 루푸스 신염, 육아종 근장애, 다발성근염, 또는 바람직하지 않거나 비정상적인 OX40-매개 세포 반응과 관련이 있는 해로운 증상 또는 신체적 예후 중 하나 이상의 발병, 빈도, 지속기간 또는 중증도를 줄이거나 감소시키거나 방지하는 것을 포함한다. 추가의 다양한 특별한 실시양태에서, 상기 치료 방법은 자가-반응성 세포 또는 항-자가 단백질 항체를 생성하는 세포의 수 또는 증식을 줄이고, 자가-반응성 세포 또는 항-자가 단백질 항체를 생성하는 세포의 수, 증식 또는 생존의 증가를 억제하거나 방지하는 것을 포함한다.

[0157] 면역 장애 또는 질환의 경우에, 측정가능한 개선 또는 유익한 효과는 럼프구 (예를 들어 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포)의 수, 증식 또는 활성을 생리적으로 정상적인 기저 수준으로 조정하는 것을 포함하고, 이것은 성공적인 치료 결과로 간주된다. 면역 장애 또는 면역 질환에 대한 측정가능한 개선 또는 유익한 효과의 추

가 예는 면역 장애 또는 질환에 의해 야기되거나 그와 관련이 있는 조직병리적 변화에 있어서의 개선이다. 예를 들어, 골격 관절 침윤 또는 조직 파괴, 또는 혀장, 흉선, 신장, 간, 비장, 표피 (피부) 또는 점막 조직, 창자 또는 장 침윤 또는 조직 파괴를 추가로 방지하거나 줄이는 것을 들 수 있다.

[0158] 본 발명에 따라, 활성화된 T-세포 또는 OX40에 대한 OX40 리간드 (OX40L)의 결합을 시험관내 또는 생체내 차단하거나 억제하거나 저해하거나 줄이거나 감소시키는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 활성화된 T-세포를 활성화된 T-세포에 OX40 리간드가 결합하는 것을 억제하거나 저해하는데 유효한 OX40 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 OX40을 OX40에 OX40 리간드가 결합하는 것을 억제하거나 저해하는데 유효한 OX40 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 상기 방법은 활성화된 T-세포에 OX40 리간드 (OX40L)가 결합하는 것을 차단하거나 줄이거나 감소시키거나 억제하거나 저해할 필요가 있는 대상체에게 임의로는 OX40 제약 조성물을 사용하여 수행된다.

[0159] 본 발명에 따라, OX40-매개 세포 신호전달을 시험관내 또는 생체내 조정하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 OX40-매개 세포 신호전달을 조정할 필요가 있는 대상체에게 OX40-매개 세포 신호전달을 조정하는데 유효한 OX40 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0160] 본 발명에 따라, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 시험관내 또는 생체내 줄이는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 줄일 필요가 있는 대상체에게 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포의 수를 줄이기에 충분한 양의 OX40 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0161] 본 발명에 따라, 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 치료 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 진행을 줄이거나 감소시키거나 방지하거나, 또는 활성화, 효과기, 기억 또는 조절 T-세포를 고갈시키기기에 충분한 양의 OX40 항체를 투여하는 것을 포함한다. 특별한 측면에서, 상기 질환 또는 장애는 이식 편-대-숙주 질환, 염증 또는 자가면역 장애를 포함한다.

[0162] 본 발명에 따라, 대상체에서 혈액, 비장, 림프절, 장, 간, 폐 또는 피부 등의 활성화된 T-세포의 수를 감소시키는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에게 혈액, 비장, 림프절, 장, 간, 폐 또는 피부 등의 활성화된 T-세포의 수를 감소시키기기에 충분한 양의 OX40 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 혈액, 비장, 림프절, 장, 간, 폐 또는 피부 등의 활성화된 T-세포의 수를 감소시키는 방법은 급성 또는 만성 이종 이식 숙주 질환 모델에서 수행된다.

[0163] 본 발명의 조성물 및 방법은 원하는 효과를 제공하는 임의의 다른 치료법 또는 요법과 병행될 수 있다. 특히, 상보적 또는 상승작용적 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 치료법 및 요법이 적용될 수 있다. 예시적 치료법 및 요법은 면역 억제제 또는 면역 억제 약물의 사용을 포함한다. 이러한 면역 억제 치료법 및 요법은 본 발명의 임의의 다른 방법, 예를 들어 치료법 또는 요법 이전에 수행될 수도 있고, 또는 실질적으로는 그와 동시에 수행될 수도 있다.

[0164] 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법이 임의의 치유법, 치료 프로토콜 또는 조성물, 예컨대 본원에 기재하거나 당업계에 공지된 면역 억제 프로토콜, 면역 억제 제 또는 면역 억제 약물의 사용과 병행되는 조합 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편 및 면역 억제 치료제, 면역 억제제 또는 면역 억제 약물을 투여하는 것을 포함한다. 상기 면역 억제 치료제, 면역 억제제 또는 면역 억제 약물은 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 대상체에게 투여하기 전에 수행될 수도 있고, 또는 실질적으로는 그와 동시에 수행될 수도 있으며, 또는 그 후에 수행될 수도 있다.

[0165] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 억제" 또는 그의 문법적 변형형태가 치료법, 요법, 작용제 또는 약물을 언급하며 사용된 경우, 이것은 상기 치료법, 요법, 작용제 또는 약물이 체액성 또는 세포-매개 면역 반응을 감소시키거나 줄이거나 억제하거나 방지한다는 것을 의미한다. 이러한 요법은 면역 반응을 일반적으로 또는 전신적으로 억제할 수도 있고, 또는 면역 반응을 특정 영역 또는 위치에서 억제할 수도 있다.

[0166] 면역 억제제 및 면역 억제 약물의 비-제한적인 구체적 부류로는 알킬화제, 항-대사물질, 식물 추출물, 식물 알칼로이드, 니트로소우레아, 호르몬 (스테로이드, 예컨대 글루코코르티코이드), 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드 유사체 등이 있다. 면역 억제 약물의 구체예로는 시클로포스포아미드, 아자티오프린, 시클로스포린 A, 타크롤리무스 (FK506), 라파마이신, 메토트렉세이트, FTY720, cox-2 억제제 및 인터류킨 (예를 들어 IL-12) 등이 있다.

- [0167] 폴리클로날 및 모노클로날 항체는 면역 억제 치료제 또는 요법제의 특별한 예이다. 면역 억제 항체의 예로는 인플릭시맙 (레미케이드(Remicade)[®]), 리툭산(Rituxan)[®], 아트감(Atgam)[®], 및 티모글로불린(Thymoglobuline)[®], 크세나팍스(Xenapax)[®], 시뮬렉트(Simulect)[®], 휴미라(Humira)[®], 랍티바(Raptiva)[®], 티사브리(Tysabri)[®], 및 오르토클론(Orthoclone)[®] (OKT3) 등이 있다.
- [0168] 또한, 본 발명의 방법은 무엇보다도 또 다른 치료 프로토콜 또는 치유법, 과정 또는 치유법에 대한 필요성 또는 그의 사용을 줄이는 방법을 포함한다. 예를 들어, 염증, GVHD 또는 자가면역 장애의 경우, 주어진 대상체에서 면역 억제 치료제 또는 요법제 사용의 빈도가 적어지거나 면역 억제 치료제 또는 요법제의 투여량이 줄어들거나 면역 억제 치료제 또는 요법제가 필요없게 된다면, 본 발명의 방법은 치유 이점을 갖는 것이다.
- [0169] 따라서, 본 발명에 따라, 면역 억제 치료법 또는 요법의 필요성 또는 그의 사용을 줄이는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 OX40 항체, 그의 단편 또는 하위서열을 면역 억제 요법을 받고 있거나 면역 억제 요법을 받은 적이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 측면에서, 상기 방법은 OX40 항체, 그의 단편 또는 하위서열을 염증, GVHD 또는 자가면역 장애의 면역 억제 치료법 또는 요법의 투여량, 빈도 또는 지속기간을 줄이거나 또는 그 필요성을 없애는데 유효한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 면역 억제 치료제 또는 요법제를 투여하기 전에 수행될 수도 있고, 또는 실질적으로는 그와 동시에 수행될 수도 있으며, 그 후에 수행될 수도 있다.
- [0170] 치유 이점 또는 개선의 달성을 원하는 치료법 또는 요법에 있어서 투여량 또는 "유효량 (또는 유효한 양)" 또는 "충분량 (또는 충분한 양)"은 예를 들어 표적 질환, 장애, 병리와 관련이 있거나 그로 인해 야기되는 병리, 해로운 증상 또는 합병증 중 하나, 일부 또는 모두에 있어서 측정가능하거나 검출가능한 정도로의 임의의 객관적이거나 주관적인 경감 또는 완화를 포함한다. 표적 질환, 장애, 병리 또는 해로운 증상 또는 합병증의 진행 또는 악화를 방지하거나 억제하거나 지연시키는 것 역시 만족스러운 결과이다. 충분량 또는 유효량은 일군의 대상체 또는 일반적 집단에 있어서가 아니라 특정 대상체에서의 만족감 또는 효과를 의미한다. 따라서, "유효량" 또는 "충분량"은 주어진 대상체에게 치유 이점을 제공하기에 부족함이 없을 것이다.
- [0171] 충분량 또는 유효량은 반드시 단일 투여로 제공되어야 하는 것이 아닐 수 있고, 단독으로 투여되거나 또 다른 치료법, 프로토콜 또는 치유법과 병행 투여되어야 하는 것이 아닐 수 있다. 예를 들어, 상기 양은 대상체의 필요, 치료될 장애, 질환 또는 상태의 정도, 또는 치료 부작용에 따라 비례하여 증가될 수 있다. 또한, 충분량 또는 유효량은 제2의 치료법, 프로토콜 또는 치유법 없이 단일 또는 다중 투여로 제공되는 경우에 반드시 충분하거나 효과적일 필요는 없는데, 이는 그러한 투여보다 과도하거나 그보다 부족한 추가의 투여량, 양 또는 지속 기간 또는 추가의 치료법, 프로토콜 또는 치유법을 포함시켜서 주어진 대상체에 효과적이거나 충분하도록 할 수 있기 때문이다. 유효하거나 충분하다고 여겨지는 양은 또한 또 다른 치료법, 치유법 또는 프로토콜의 이용을 감소시키는 양을 포함한다.
- [0172] 예시적 비-제한적인 양 (투여량)은 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 범위, 및 이러한 범위 내에 포함되는 임의의 수치값 또는 범위 또는 값이다. 예를 들어, 0.01 mg/kg 내지 500 mg/kg 및 이러한 범위 내에 포함되는 임의의 수치값 또는 범위 또는 값의 더 많거나 더 적은 양 (투여량)이 투여될 수 있다. 추가의 예시적 비-제한적인 양 (투여량)은 약 0.5 mg/kg 내지 50 mg/kg, 1.0 mg/kg 내지 25 mg/kg, 1.0 mg/kg 내지 10 mg/kg의 범위, 및 이러한 범위 내에 포함되는 임의의 수치값 또는 범위 또는 값이다.
- [0173] 본 발명의 방법은 임의의 투여 또는 전달 방식 또는 임의의 경로를 통해 전신, 국소 및 국부 투여 또는 전달되어 실시될 수 있다. 예시적 투여 및 전달 경로는 정맥내, 동맥내, 피내, 근육내, 피하, 흉막내, 경피 (국소), 경점막(transmucosal), 두개내, 척수내, 안내, 직장, 경구 (소화관(alimentary)) 및 점막을 포함한다.
- [0174] 본 발명의 방법은 1일, 1주, 1개월 또는 1년 마다 1회 이상 (예를 들어 1회 내지 10회, 1회 내지 5회 또는 1회 내지 3회) 실시될 수 있다. 당업자는 투여를 지연시키거나 중단시키는 것이 적절한 경우를 알 것이다. 비-제한적인 투여 스케줄은 1주 당 1회 내지 7회로 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 15주, 20주 또는 그보다 긴 기간, 및 이러한 범위 내에 포함되는 임의의 수치값 또는 범위 또는 값이다.
- [0175] 물론, 임의의 치료법 또는 요법에 전형적인 바와 같이, 상이한 대상체는 치료에 상이한 반응을 나타낼 것이고, 일부는 특정 치료 프로토콜, 투약법 또는 과정에 반응하지 않거나 부적절하게 반응할 수 있다. 따라서, 유효량 또는 충분량은 적어도 부분적으로는 치료될 질환, 장애, 병리 (예를 들어 염증, GVHD, 이식 거부, 또는 자가면역 장애, 및 진행된다면 후기 또는 초기 단계), 원하는 치료 효과 뿐만이 아니라 개별 대상체 (예를 들어 대상

체에서의 생체이용률, 성별, 연령 등), 및 부분적으로는 유전적 및 후성(後成)적 변이성 (예를 들어 약물유전학)을 기초로 하는 치료법 또는 요법에 대한 대상체의 반응에 따라 달라질 것이다. 추가로, 치료받은 모든 대상체 또는 환자가 특정 치료 또는 치유 방법, 프로토콜, 투약법, 과정 또는 치유법에 반응할 수는 없기 때문에, 상기 치료 또는 치유 방법은 각각의 모든 대상체 또는 환자에서 또는 그러한 치료를 받은 해당 집단에서 특정한 측정가능한 개선 또는 유익한 효과, 임상적 종점 또는 원하는 결과를 달성할 필요는 없다. 따라서, 해당 대상체 또는 환자, 또는 집단은 본 발명의 치료 또는 치유 방법에 반응하지 않거나 부적절한 반응을 나타낼 수도 있고, 또는 바람직하지 않은 반응, 예컨대 부작용을 나타낼 수도 있다.

[0176] 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 구별없이 사용되며 동물, 전형적으로는 포유동물, 예컨대 인간, 비-인간 영장류 (고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이, 긴 팔 원숭이), 애완 동물 (개 및 고양이), 농장 및 목축 동물 (말, 소, 염소, 양, 돼지), 실험실 및 실험용 동물 (마우스, 래트, 토끼, 기니아피그)을 지칭한다. 대상체는 생체내 효능 연구용의 질환 모델 동물 (예를 들어 마우스, 래트 및 비-인간 영장류) (예를 들어 GVHD 동물 모델)을 포함한다. 인간 대상체는 소아, 예를 들어 신생아, 영아, 유아 및 10대, 1세와 5세 사이, 5세와 10세 사이, 및 10세와 18세 사이, 18세와 60세 사이 연령의 성인, 및 노인, 예를 들어 60세와 65세 사이, 65세와 70세 사이, 및 70세와 100세 사이 연령의 노인을 포함한다.

[0177] 대상체는 치료가 필요한, 즉 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 사용한 치료법 또는 요법에 순응하거나 그에 반응할 수 있는 질환, 장애, 병리 또는 그의 증상이 있는 포유동물 (예를 들어 인간)을 포함한다. 대상체는 만성 또는 급성 면역 장애 또는 질환, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환 또는 OX40-매개 세포 반응이 있는 대상체 또는 그러한 위험이 있는 대상체를 포함한다. 대상체는 또한 만성 또는 급성 면역 장애 또는 질환, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환 또는 OX40-매개 세포 반응 중 하나 이상에 대한 후보이거나 그에 대한 치료를 받은 적이 있는 대상체를 포함한다. 세포, 조직 또는 장기 이식물 또는 이식편, 예컨대 신장, 심장, 폐, 피부, 눈 혈관, 간 또는 췌장 이식, 또는 골수, 조혈 줄기 세포, 말초혈 줄기 세포 또는 제대혈 줄기 세포 (동종이계 또는 비-동종이계 세포), 신경 세포에 대한 후보이거나 그러한 처치를 받은 적이 있는 대상체는 OX40 항체를 사용한 치료법에 대한 후보이다.

[0178] 상기 대상체는 그러한 치료를 보장하는 실험적 또는 임상적 진단으로 인해 면역 억제 치료법 또는 요법이 필요한 대상체, 면역 억제 치료법 또는 요법을 받고 있는 (예를 들어 이식으로 인함) 대상체, 및 면역 억제 치료법 또는 요법을 받은 적이 있는 대상체를 추가로 포함하며, 재발 (relapse 또는 recurrence)의 위험이 있다. 이러한 위험이 있는 대상체는 그에 대한 가족력 또는 유전적 소인을 가진 대상체, 또는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환 또는 OX40-매개 세포 반응을 이미 앓아본 적이 있는 대상체를 포함한다. 이러한 위험이 있는 대상체는 예컨대 자가-반응성 T-세포 또는 항-자가 단백질 항체를 사용한 스크리닝을 통해 확인할 수 있다. 예를 들어, 류마티스성 인자를 발현하는 대상체는 류마티스성 관절염의 위험이 있다. MBP, MOG 또는 PLP에 대한 항체를 발현하는 대상체는 다발성 경화증의 위험이 있다.

[0179] 따라서, 이러한 위험이 있는 대상체는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환, 또는 OX40-매개 세포 반응이 발병하거나, 또는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환, 또는 OX40-매개 세포 반응이 재발될 가능성을 억제하거나 줄이기 위한 처치를 받을 수 있다. 이러한 처치의 결과는 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환, 또는 OX40-매개 세포 반응의 발병 위험을 줄이는 것일 수 있다.

[0180] 본 발명의 항체, 핵산, 및 다른 조성물 및 방법은 제약 제제에 포함되거나 제약 제제를 이용할 수 있다. 이러한 제약 제제는 대상체의 치료 또는 대상체에게 생체내 국부, 국소 또는 전신 또는 생체외 투여 또는 전달하는데 유용하다.

[0181] 제약 제제는 "제약상 허용가능"하고 "생리적으로 허용가능"한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다. 용어 "제약상 허용가능"하고 "생리적으로 허용가능"하다는 것은, 제약 투여와 상용성의 용매 (수성 또는 비-수성), 용액, 애밀전, 분산 매질, 코팅제, 등장화제 및 흡수 촉진제 또는 지연제를 포함한다. 이러한 제제는 액제; 애밀전제, 혼탁액제, 시럽제 또는 엘릭시르제, 또는 고체 형태 제제; 정제 (코팅되거나 코팅되지 않음. 급속 방출형, 지연 방출형, 지속 방출형, 또는 맥동성 방출형), 캡슐제 (경질 또는 연질. 급속 방출형, 지연 방출형, 지속 방출형, 또는 맥동성 방출형), 산제, 과립제, 결정, 또는 마이크로비드 내에 함유될 수 있다. 보충 화합물 (예를 들어 보존제, 항-박테리아제, 항-바이러스제 및 항-진균제)도 제제에 혼입될 수 있다.

[0182] 제약 제제는 특정한 국부, 국소 또는 전신 투여 또는 전달 경로로 상용가능하게 제조될 수 있다. 따라서, 제약 제제는 특정 경로에 의한 투여에 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다. 본 발명의 조성물에 대한 투여

경로의 비-제한적인 구체예로는 비경구, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 피내, 근육내, 피하, 흉막내, 경피 (국소), 경점막, 두개내, 척수내, 안내, 직장, 경구 (소화관), 점막 투여용 제제, 및 치료 방법 또는 투여 프로토콜에 적합한 임의의 다른 제제 등이 있다.

[0183] 비경구용으로 사용되는 용액제 또는 혼탁액제는 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 염수 용액, 정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항-박테리아제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 퀼레이팅제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스를 포함할 수 있다. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨을 사용하여 조정할 수 있다.

[0184] 주사용 제약 제제는 주사가능한 멸균 용액 또는 분산액의 즉각 투여용(extemporaneous) 제제를 위한 멸균 수성 용액 (수용성) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우에 적합한 담체는 생리적 염수, 정균 수, 크레모포르(Cremophor) EL™ (미국 뉴저지주 파르시파니 소재의 바스프(BASF)) 또는 인산염 완충 염수 (PBS)를 포함한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제를 사용하고, 분산액의 경우에는 필요한 입도를 유지하고, 계면활성제를 사용하여 유지될 수 있다. 항-박테리아제 및 항-진균제는 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살을 포함한다. 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시킬 수 있다. 흡수를 자연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴을 포함시키면 주사가능한 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다.

[0185] 주사가능한 멸균 제제는 활성 조성물을 상기 성분들 중 하나 또는 이들의 조합을 함유하는 적절한 용매 중에 필요한 양만큼 혼입시켜 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액제는 기본 분산 매질 및 임의의 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 조성물을 혼입시켜 제조된다. 주사가능한 멸균 용액제 제조를 위한 멸균 산제의 경우에 있어서의 제조 방법은 예를 들어 활성 성분 및 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 미리 제조해 두었던 이들의 용액으로부터 생성하는 진공 건조 및 동결 건조 등을 포함한다.

[0186] 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과될 장벽에 적절한 침투제가 상기 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여용으로는 디터전트(detergent), 담즙산염, 및 푸지드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비측(鼻側) 분무기, 흡입 장치 (예를 들어 흡인기) 또는 좌제의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물을 연고제, 고약(salve), 젤제, 크림제 또는 패치제로 제제화된다.

[0187] 제약 제제는 신체로부터 신속하게 제거되지 않도록 보호하는 담체, 예를 들어 제어 방출제 또는 시간 지연 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 스테아레이트를 사용하여 제조될 수 있다. 제제는 국부, 국소 또는 전신 전달 또는 제어 또는 지속 방출을 달성하기 위해서 제조 용품, 예를 들어 이식물 및 미세캡슐화 전달 시스템을 이용하여 전달될 수도 있다.

[0188] 생분해성의 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리산무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 상기 물질은 알자 코포레이션(Alza Corporation) (미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)로부터 구입할 수도 있다. 리포좀 혼탁액제 (항체 또는 바이러스 외피 단백질을 사용하여 세포 또는 조직으로 표적화된 리포좀을 포함함)가 제약상 허용가능한 담체로 사용될 수도 있다. 이것들은 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같은 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0189] 투여에 적절한 추가의 제약 제제는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 [Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000)], [Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999)], [Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000)] 및 [Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technicon Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)] 참조).

[0190] OX40 항체, 핵산, 치료제, 요법제, 작용제, 약물 및 제약 제제를 포함하는 본 발명에 따라 사용되는 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해서 투여량 단위 형태로 패키지될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "투여량 단위 형태"는 단위 투여량 치치에 적합한, 물리적으로 구별되는 단위를 지칭하며, 각 단위는 원하

는 치료 또는 치유 (예를 들어 유익한) 효과가 나타나도록 계산된 소정량의 조성물을 담체, 부형제, 희석제, 또는 비히클과 함께 함유한다. 단위 투여량 형태는 사용되는 특정 조성물, 달성을 효과, 및 치료받을 대상체의 약동학 및 약물유전학을 포함하지만 반드시 이에 제한되는 것은 아닌 각종 요인에 따라 달라질 것이다.

[0191] 본 발명은 적합한 패키지 물질에 패키지된 OX40 항체, 핵산, 작용제, 약물 및 제약 제제를 임의로는 키트 성분 사용과 관련한 지침, 예를 들어 본 발명의 방법을 수행하기 위한 지침과 함께 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 키트는 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편 및 OX40을 검출하기 위한 지침을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 상기 키트는 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편, 및 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 사용하여 치료할 필요가 있는 필요한 대상체 (예를 들어 치료법 또는 요법에 순응하거나 그에 반응할 수 있는 질환, 장애, 병리 또는 상태의 대상체)를 치료하기 위한 지침을 포함한다. 한 측면에서, 상기 지침은 만성 또는 급성 면역 질환 또는 장애, 염증, GVHD, 이식 거부, 염증, 자가면역 질환 또는 OX40-매개 세포 반응의 치료를 위한 것이다. 추가의 측면에서, 상기 키트는 면역 억제 치료제, 요법제 또는 작용제를 포함한다.

[0192] 용어 "패키지 물질"은 키트 성분들을 성분들을 보유하는 물리적 구조물을 지칭한다. 패키지 물질은 성분들을 멀균 상태로 유지할 수 있으며, 이러한 목적에 통상적으로 사용되는 물질 (예를 들어 종이, 골판지, 유리, 플라스틱, 호일, 앰플 등)로 제조될 수 있다. 표지 또는 패키지 삽입물은 예를 들어 본 발명의 진단 또는 치료 방법에 관한 적절한 지침서(written instructions)를 포함할 수 있다. 따라서, 상기 지침은 본원에 기재한 본 발명의 임의의 방법을 실시하기 위한 지침을 포함한다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 상기 키트는 본 발명의 방법을 용액 중에서 시험관내, 생체내, 또는 생체외 실시하기 위한 지침을 포함하는 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 한 측면에서, 상기 지침은 본 발명의 치료 또는 치유 방법에서 OX40 항체, 그의 하위서열 또는 단편을 대상체에게 국부, 국소 또는 전신 투여하거나 전달하는 것을 포함한다.

[0193] 지침은 발생할 수 있는 만족스러운 임상적 종점 또는 임의의 해로운 증상 또는 합병증의 징후에 대한 교시를 추가로 포함할 수 있다. 지침은 보관 정보, 유효 기간, 또는 인간 대상체에서의 사용에 관해 규제 당국, 예컨대 미국 식품의약청이 요구하는 임의의 정보를 추가로 포함할 수 있다.

[0194] 지침은 예를 들어 키트 내에 들어 있는 종이 또는 판지, 키트 또는 패키지 물질에 고정되어 있거나 키트 성분을 함유하는 바이알 또는 튜브에 부착된 표지에 "인쇄"되어 있을 수 있다. 지침은 오디오 또는 비디오 매체를 포함할 수 있고, 컴퓨터 판독가능한 매체, 예를 들어 디스크 (플로피 디스크 또는 하드 디스크), 광학 CD, 예를 들어 CD- 또는 DVD-ROM/RAM, 자기 테이프, 전기 저장 매체, 예를 들어 RAM 및 ROM 및 이들의 하이브리드, 예를 들어 자기/광학 저장 매체에 추가로 포함될 수 있다.

[0195] 본 발명의 키트는 완충제, 보존제, 또는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 활성 검정을 위한 대조군 성분, 예를 들어 대조군 샘플 또는 표준물을 포함할 수도 있다. 키트의 각 성분은 개개의 용기에 들어 있거나 혼합물로 들어 있을 수 있고, 여러 용기 모두가 단일 또는 다중 패키지에 들어 있을 수 있다.

[0196] 본 발명에 따라서, OX40를 스크리닝하고 검출하고 동정하는 세포-무함유 (예를 들어 용액 중, 고상 중) 및 세포-기재의 (예를 들어 시험관내 또는 생체내) 방법이 추가로 제공된다. 상기 방법은 용액 중에서, 생물학적 물질 또는 샘플을 사용한 시험관내 및 예를 들어 동물로부터의 세포 (예를 들어 림프구) 샘플을 사용한 생체내로 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 항체 OX40의 결합을 허용하는 조건하에 생물학적 물질 또는 샘플을 OX40에 결합하는 항체와 접촉시키는 단계, 및 OX40에 대한 상기 항체의 결합을 검정하는 단계를 포함한다. OX40에 대한 상기 항체의 결합은 OX40의 존재를 검출한다. 한 측면에서, OX40은 세포 또는 조직에 존재한다. 또다른 측면에서, 상기 생물학적 물질 또는 샘플은 포유동물 대상체로부터 수득한 것이다.

[0197] 용어 "접촉"이 조성물, 예컨대 단백질 (예컨대 OX40 항체), 물질, 샘플, 또는 치료를 언급하며 사용된 경우, 이것은 조성물 (예컨대 OX40 항체)과 다른 언급된 실체 사이의 직접적이거나 간접적인 상호작용을 의미한다. 직접적인 상호작용의 특별한 예는 결합이다. 간접적인 상호작용의 특별한 예는 조성물이 중간 매개 분자에 작용하고, 이후에 이것이 상기 언급된 실체에 작용하는 경우이다. 따라서, 예를 들어 세포 (예컨대 림프구)를 OX40 항체와 접촉시키는 단계는 상기 항체가 세포에 결합 (예컨대 OX40과의 결합을 통해 결합)하도록 하거나 상기 항체가 세포에 작용할 중간 매개체에 작용하게 하는 것을 포함한다.

[0198] 용어 "검정" 및 "측정" 및 그의 문법적 변형형태는 본원에서 구별없이 사용되며, 정성적 측정 또는 정량적 측정을 지칭하거나 정성적 측정과 정량적 측정 둘다를 지칭한다. 상기 용어가 결합을 언급하며 사용된 경우, 본원에 기재되고 당업계에 공지되어 있는 여러가지 방법을 비롯하여 결합의 상대적 양, 친화도 또는 특이성을 평가

하는 임의의 수단이 고려된다. 예를 들어, OX40에 대한 OX40 항체 결합은 ELISA 검정으로 검정되거나 측정될 수 있다.

[0199] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용한 모든 기술적이고 학술적인 용어는 본 발명과 관련이 있는 당업계의 숙련가가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명을 실시하거나 시험하는데에는 본원에 기재한 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 본원에 기재되어 있다.

[0200] 모든 간행물, 특히문현, 진뱅크(Genbank) 관리 번호 및 본원에서 인용한 기타 참고문현은 그 전문이 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다.

[0201] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 명백하게 달리 명시되지 않는 한은 복수형의 언급을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "항체"라는 언급은 복수개의 항체를 포함하고, "치료법 또는 요법"이라는 언급은 여러회의 순차적이거나 동시에 행해지는 치료들 또는 요법들을 포함할 수 있는 식이다.

[0202] 본원에서 사용된 바와 같이, 모든 수치 값 또는 수치 범위는 명백하게 달리 명시되지 않는 한은 그러한 범위 내에 속하거나 그러한 범위를 포함하는 온전한 정수 및 그러한 범위 내에 속하거나 그러한 범위를 포함하는 값 또는 정수의 분수를 포함한다. 따라서, 예를 들어 90% 내지 100%의 범위에 대한 언급은 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 등 뿐만이 아니라 91.1%, 91.2%, 91.3%, 91.4%, 91.5% 등, 92.1%, 92.2%, 92.3%, 92.4%, 92.5% 등을 포함하는 식이다. 또다른 예에서, 1배 내지 5,000배의 범위에 대한 언급은 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배 등 뿐만이 아니라 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배 등, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배, 2.5배 등을 포함하는 식이다.

[0203] 일반적으로, 본 발명은 수많은 실시양태를 기재하기 위해서 단정적인 어구를 사용하여 본원에 개시되어 있다. 본 발명은 또한 구체적으로 예컨대 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 절차, 검정 또는 분석 등과 같은 특별한 대상이 전체적으로 또는 부분적으로 제외되는 실시양태를 포함한다. 따라서, 본 발명이 일반적으로 본원에서 본 발명이 포함하지 않는 것과 관련하여 기술되어 있지는 않더라도, 본 발명에 특별히 포함되지 않는 측면도 개시되어 있다.

[0204] 본 발명의 수많은 실시양태를 기재하였다. 그러나, 본 발명의 사상과 범위에서 벗어나지 않고도 여러가지 변형이 가해질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 하기하는 실시예는 예시하고자 하는 것이지, 청구의 범위에 기재한 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것이 아니다.

실시예

실시예 1

[0206] 본 실시예는 여러가지 재료 및 방법을 기재한다.

[0207] 항원 준비: 트리(Tri) 시약 (미국 캘리포니아주 칼스베드 소재의 인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corp.))을 사용하여 피토헤마글루티닌 (PHA, 미국 캔자스주 레넥사 소재의 레멜(Reme1))으로 2일 동안 활성화시킨 인간 말초혈 단핵 세포로부터 RNA를 단리하였다. 인간 OX40의 세포외 도메인을 코딩하는 서열을 역전사 폴리머라제 연쇄 반응으로 증폭시켰다. 증폭된 생성물을 서열분석하고, 인간 OX40의 공개된 서열 (WO 95/12673, 서열 1)과 동일한 것임을 확인하였다. 상기 생성물을 pfastbac-hFc 바콜로바이러스 공여자 플라스미드에 프레임에 맞게 서브클로닝하였다. 상기 벡터는 pfastbac 플라스미드 (인비트로젠 코포레이션) 및 인간 IgG1 ("hIgG1")의 Fc 부분으로부터 생성되었다. pV11392.fc 벡터로부터 hIgG1 서열을 잘라내었다. 인간 OX40:hIgG1 융합 단백질 (hOX40:hFc)을 코딩하는 재조합 바콜로바이러스를 생성하였다. 단백질 생성을 위해서 트리코플루시아 니 (*Trichoplusia ni*) High-Five BTI-TN-5b1-4 ("Tn5") 곤충 세포 (인비트로젠 코포레이션)를 hOX40:hFc 재조합 바콜로바이러스로 감염시켰다. 진핵 세포에서의 발현을 위해, 전장 OX40 서열을 증폭시켜서 pCDNA3.1 벡터 (인비트로젠 코포레이션)로 클로닝하였다. EL-4 (ATCC TIB-39) 및 CHO-K1 (ATCC CCL-61) 세포를 리포팩트아민 2000 (인비트로젠 코포레이션)으로 형질감염시키고, 하이그로마이신 B (미국 캘리포니아주 피츠버그 소재의 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)) 또는 제네티신 (인비트로젠 코포레이션)을 각각 사용하여 안정적인 형질감염체를 선별하였다. hOX40:hFc를 글루타르알데히드 커플링을 이용하여 난알부민에 접합시켰다. hOX40:hFc 1 mg을 인산염 완충 염수 (PBS) 1 mL 중 난알부민 (미국 일리노이주 록크포드 소재의 피어스(Pierce)) 0.5 mg과 혼합하였다. 1% EM 등급의 글루타르알데히드 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마(Sigma)) 50 μL를

서서히 첨가하고, 5분 동안 완만하게 전탕시키며 용액을 혼합하였다. 실온에서 3시간 후에 1 M 에탄올아민 (pH 7) 50 μ l를 첨가하고, 상기 용액을 2시간 넘게 인큐베이션시킨 후에 NAP10 컬럼 (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 아머삼 바이오사이언시스(Amersham Biosciences))에서 인산염 완충 염수로 완충제 교환을 실시하였다.

[0208] 인간 OX40:인간 IgG1 융합 단백질의 뉴클레오티드 서열: 개시 코돈 (ATG)부터 인간 OX40 세포의 도메인을 지나 인간 Fc 서열의 말단까지 (밑줄) - 서열 1:

ATGTGCGTGC GGGCTCGGCG GCTGGGCCGC GGGCCGTGTG CGGCTCTGCT CCTCCTGGGC	60
CTGGGGCTGA CCACCGTGAC GGGGCTCAC TGTGTCGGGG ACACCTACCC CAGCAACGAC	120
CGGTGCTGCC ACGAGTGCAG GCCAGGCAAC GGGATGGTGA GCGCCTGCAG CGCGTCCCAG	180
AACACGGTGT GCCGTCGGT CGGGCCGGC TTCTACAACG ACGTGGTCAG CTCCAAGCCG	240
TGCAAGCCCT GCACGTGGTG TAACCTCAGA ACTGGGACTG AGCGGAAGCA GCTGTGCACG	300
GCCACACAGG ACACAGTCTG CCGCTGCCGG GCGGGCACCC AGCCCCCTGGA CAGCTACAAG	360
CCTGGAGTTG ACTGTGCCCC CTGCCCTCCA GGGCACTTCT CCCCAGGCGA CAACCAGGCC	420
TGCAAGCCCT GGACCAACTG CACCTTGCT GGGAAAGCACA CCCTGCAGCC GGCCAGCAAT	480
AGCTCGGACG CAATCTGTGA GGACAGGGAC CCCCCAGCCA CGCAGCCCCA GGAGAGCCAG	540
GGCCCCCGG CCAGGCCAT CACTGTCCAG CCCACTGAAG CCTGGCCAG AACCTCACAG	600
GGACCCCTCCA <u>GATCTTGTGA CAAA</u> ACTCAC <u>ACATGCCAC CGTGC</u> CCAGC <u>ACCTGA</u> ACTC	660
<u>CTGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAA</u> ACCCA <u>AGGACACCT CATGATCTCC</u>	720
<u>CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGA</u> CC ACCAAGACCC TGAGGTCAAG	780

[0209]

<u>TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG</u>	840
<u>CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GT</u> CCCTCACCG <u>TCCTGCACCA GGACTGGCTG</u>	900
<u>AATGGCAAGG AGTACAAC</u> TG <u>CAAGGTCTCC AACAAACCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA</u>	960
<u>ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCC</u> CT <u>CCCCCATCC</u>	1020
<u>CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC</u>	1080
<u>AGGGACATCG CGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG</u>	1140
<u>CCTCCCGTC TGGACTCCGA CGGCTCTTC TICCTCTACA GCAAGCTCAC CCTGGACAAG</u>	1200
<u>AGCAGGGGGC AGCAGGGGAA CGTCTCTCA TGCTCCGTGA TGCA</u> TGAGGC TCTGCACAAAC	1260
<u>CACTACACGC AGAAGACCC</u> CT <u>CCCTGTCT CCGGGTAAAT GA</u>	1320

[0210]

인간 IgG1의 Fc 부분 (밑줄)에 융합된 인간 OX40-세포의 도메인의 아미노산 서열 - 서열 2:

MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDYPSND-RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
NTVCRPCPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCR CR AGTQPLDSYK	120
PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPOETQ	180
<u>GPPARPIVQ PTEAWPRTSQ GPSRSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS</u>	240
<u>RTPEVTCVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE OYNSTYRVVS VLTVLHODWL</u>	300
<u>NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISAKKGOPR EPOVYTLPPS RDELTKNOVSLTCLVKGFYP</u>	360
<u>SDIAVEWSN GOOPENNYKTT PPVLDSDGSE FLYSKLTVDK SRWOOGNVFS CSVMHEALHN</u>	420
<u>HYTOKSLSLS PGK</u>	433

[0212]

[0213] 마우스: 인간 이谬노글로불린 영역을 코딩하는 인간 염색체 단편을 보유하는 인간 트랜스-염색체 KM 마우스TM (WO 02/43478, WO 02/092812, [Ishida, et al., IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000)],

[Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002)])를 일본 소재의 기린 브류웨리 컴파니 리미티드(Kirin Brewery Co., Ltd.)로부터 구하여 알러지 앤드 이뮤노로지(Allergy and Immunology)의 라졸라 연구소에 있는 동물 실험실에 가두었다. 인간 항체 생성 기술에 대한 개요는 문헌 [Lonberg, et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995)]에 기재되어 있다. 내인성 이뮤노글로불린을 발현하지 않는 1종 이상의 인간 이뮤노글로불린 유전자 (카파 또는 람다)를 갖는 트랜스제닉 동물을 예를 들어 미국 특허 제5,939,598호에 기재되어 있다. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체를 생성하는 추가의 방법도 기재되어 있다 (예를 들어 WO 98/24893, WO 92/01047, WO 96/34096, WO 96/33735, 미국 특허 제5,413,923호, 동 제5,625,126호, 동 제5,633,425호, 동 제5,569,825호, 동 제5,661,016호, 동 제5,545,806호, 동 제5,814,318호, 동 제5,885,793호, 동 제5,916,771호 및 동 제5,939,598호). 인간 이뮤노글로불린 유전자를 보유하는 소인 TC 소의 개발은 문헌 [Kuroiwa, et al., Nat Biotechnol. 20(9):889-94 (2002)], [Kuroiwa, et al., Nat Genet 36(7):775-80 (2004)]에 기재되어 있다.

[0214]

면역화: hOX40:hFc 재조합 단백질을 동일 부피의 완전 프로인트 아쥬반트 (CFA, 시그마)와 혼합하고 에멀젼을 제조하였다. 마우스를 단백질 10 µg 내지 25 µg으로 복강내 면역화하고, 불완전 프로인트 아쥬반트 (IFA, 시그마) 중에 에멀젼화한 단백질 5 µg 내지 10 µg으로 2주 간격으로 2회 내지 4회 부스팅으로 복강내 부스팅하였다. 융합 5일 전에는 가용성 hOX40:hFc 5 µg 내지 10 µg을 아쥬반트 없이 마지막으로 복강내 주사하였다. 또 다른 군의 마우스를 80°C에서 10분 동안 PBS 중에서 인큐베이션하여 열 변성시킨 후에 RIBI 아쥬반트 (시그마)와 1:1로 혼합한 hOX40:hFc로 면역화하였다. 마우스를 상기한 바와 같이 면역화하였다. 3번째 군의 마우스를 난알부민에 접합된 hOX40:hFc로 면역화하였다. 마우스는 hOX40:hFc-OVA를 단독으로 30 µg 사용하거나 또는 RIBI 중 hOX40:hFc와의 혼합물 (각각 10 µg 및 20 µg)을 사용하여 프라이밍하였다. 전자의 경우에는 RIBI 중 hOX40:hFc-OVA 30 µg을 부스팅한 후에 2주 간격으로 RIBI 중 hOX40:hFc 10 µg을 투여하였다. 5주 후에는 PBS 중 hOX40:hFc-OVA 20 µg으로 최종 부스팅하였다. 후자의 2회 부스팅은 RIBI 중 hOX40:hFc-OVA 5 µg + hOX40:hFc 10 µg의 2주 간격 투여로 이루어졌고, 최종 부스팅은 PBS 중 hOX40:hFc 10 µg이었다. 모든 주사는 복강내 주사였다. 마지막 군의 마우스는 2일 동안 PHA (1 µg/mL) 및 재조합 인간 인터류킨 2 (IL2, 10 ng/mL, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 비디 파르밍겐(BD Pharmingen))로 자극시킨 CD4+ 인간 T-세포로 면역화하였다. 주사 전에 세포에 세슘원으로부터의 25 Gy의 방사선조사를 실시하고, RIBI 아쥬반트 중에 1:1로 희석하였다.

[0215]

하이브리도마 생성: 혈청 중에 항-OX40 IgG 특이적 항체 역가가 가장 높은 마우스를 선별하여 모노클로날 항체 생성에 사용하였다. 비장을 꺼내어 단일 세포 혼탁액을 50% 폴리에틸렌 글리콜 (미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재의 베링거 만하임(Boehringer Mannheim))을 사용하여 골수종 세포주 (SP2/0-Ag14) (미국 메릴랜드주 록크빌 소재의 ATCC)에 3:1의 비율로 융합시켰다. 융합체를 96웰 편평 바닥 플레이트에 최적의 밀도로 플레이팅하고, 완전 DMEM-10 배지 (10% 소 태아 혈청 (FBS, 인비트로젠 코포레이션)을 함유하는 둘레코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Engle's Medium)), 1% 비-필수 아미노산, 2 mM L-글루타민, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 슬酩이트 (모두가 미국 메릴랜드주 워커스빌 소재의 바이오휘태커(BioWhittaker)), HAT 보충물 (시그마), 및 10% 하이브리도마 클로닝 인자 (HCF, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 바이오바리스 (Biovaris)) 중에서 10% CO₂의 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 4개의 융합체로부터의 대략 4000개 웰을 인간 카파-함유 OX40 특이적 항체에 대하여 ELISA로 스크리닝하였다. 인간 항-인간 OX40 IgG 항체를 유동 세포계 측 분석으로 확인하였다. 양성 웰을 증식시키고 3회 내지 4회의 제한 희석 클로닝을 실시하여 모노클로날 항체를 수득하였다.

[0216]

항체 및 단백질 정제: 항체 정제를 위해서, 하이브리도마를 2 L 롤러병에서 병 1개 당 350 mL 내지 1 L로 배양하거나 IgG 함량이 매우 낮은(ultra low IgG) 소 태아 혈청 (인비트로젠 코포레이션)이 보충된 하이브리도마-SFM 배지 (인비트로젠 코포레이션)를 함유하는 1 L 인테그라(Integra) 시스템 (미국 메릴랜드주 이잔스빌 소재의 인테그라 바이오사이언스, 인크.(INTEGRA Bioscience, Inc.))에서 배양하였다. Tn5 세포 1 L를 4일 동안 감염시켜서 인간 OX40:hFc 재조합 단백질을 생성하였다. 재조합 프로테인 A-세파로스(Sepharose) 패스트 플로우(Fast Flow) 젤 (아머샴 바이오사이언시스)을 사용하여 인간 모노클로날 항체 및 OX40:hFc를 배양 배지로부터 정제하였다. 울트라셋테(Ultrasette) 접면 유동(tangential flow) 시스템 (미국 뉴욕주 이스트 힐즈 소재의 팔코포레이션(Pall Corp.))을 사용하여, 롤러병에서 생성된 조건화 배지를 우선 농축시켰다. 상기 조건화 배지를 0.22 µm 진공 필터 장치 (미국 메릴랜드주 베드포드 소재의 밀리포어(Millipore))로 여과하고, 배지 중의 인간 항체량에 적절한 크기의 프로테인 A-세파로스 패스트 플로우 컬럼 (아머샴 바이오사이언시스)에 로딩하였다. 컬럼을 20배 컬럼 부피의 PBS로 철저하게 세척하고, 0.1 M Gly-HCl, pH 3.6, 0.15 M NaCl로 항체를 용출시켜 1

M Tris-HCl, pH 8.0으로 중화시켰다. 분획물들을 SDS-PAGE로 분석하고, 양성 분획물을 모아서 원심분리형 농축기 (비바스핀(Vivaspin), 50,000 MWCO, 독일 게팅겐 소재의 사르토리우스(Sartorius))로 농축시켰다. 세파덱스(Sephadex) G-25 탈염 컬럼 (NAP, 아머샴 바이오사이언시스)을 사용하여 PBS, pH 7.4로의 완충제 교환을 실시하였다. 마지막으로, 항체를 0.22 μm 공극 직경의 시린지 필터로 멀균 여과하고, 항체 농도를 로우리(Lowry) 방법으로 결정하였다. 별열인자 함량을 리볼러스 아메보사이트 라이세이트(Limulus Amebocyte Lysate, "LAL") 검정 (미국 메릴랜드주 팔마우스 소재의 어소시에이트스 오브 카페 코드(Associates of Cape Cod))으로 결정하였다. 본 검정의 검출 한계는 0.06 EU/mg이었다. 상기 시험이 음성인 경우에는 샘플에 내독소가 없는 것으로 간주하였다.

[0217] 인간 IgG 정량화 ELISA: 상등액 및 정제된 스톡(stock) 중에 존재하는 인간 항체의 양을 결정하기 위해서 하기 하는 프로토콜을 이용하였다. 염소 항-인간 Fc γ 특이적 항체 (미국 펜실바니아주 웨스트 그로브 소재의 잭슨 이뮤노리씨치 케버리토리즈(Jackson Immunoresearch Laboratories))를 사용하여 탄산염 완충제 중에서 96웰 플레이트 (덴마크 소재의 넌크(Nunc))를 0.5 μg/웰로 1시간 동안 37°C에서 코팅하였다. 이어서, 상기 플레이트를 수퍼블럭(Superblock) (미국 일리노이주 록크포드 소재의 피어스)로 30분 동안 차단시킨 후에 샘플을 플레이트에 첨가하였다. 전체 인간 IgG (시그마) 또는 정제된 인간 IgG1 또는 IgG4 (기린 브류웨리 컴파니 리미티드)를 사용하여 표준 곡선을 작성하였다. 플레이트를 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하여 PBS/1% BSA/0.1% 트윈 20(Tween 20) (시그마) 중에서 세척하고, 결합된 항체를 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP, 잭슨 이뮤노리씨치)에 접합된 염소 항-인간 Fc γ 특이적 항체로 1시간 동안 37°C에서 검출하였다. TMB 기질 (시그마)을 10분 동안 첨가하고, H₂SO₄ (미국 펜실바니아주 피츠버그 소재의 랩캡 잉크.(LabChem Inc.))로 반응을 중단시켰다. 마이크로플레이트 판독기로 450 nm에서의 광학 밀도 (OD)를 측정하였다.

[0218] OX40 특이적 항체 검출 ELISA: 항체 역가, 특이성, 및 하이브리도마에 의한 생성을 ELISA로 측정하였다. 간략하게 설명하면, 96웰 편평 바닥 플레이트를 탄산염 완충제 (pH 9.4) 중 5 μg/mL의 hOX40:hFc 50 μl로 4°C에서 밤새 코팅하거나 37°C에서 1시간 동안 코팅하였다. PBS/0.1% 트윈 20으로 2회 세척한 후, 플레이트를 PBS/1% BSA/0.1% 트윈 20을 사용하여 37°C에서 1시간 동안 차단시켰다. 혈청, 상등액, 또는 정제된 항체를 차단 완충제 중에서 희석하여 웰에 가하고, 플레이트를 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.1% 트윈 20으로 4회 세척하고, 퍼옥시다제 접합된 양의 항-인간 카파 검출 항체 (영국 베밍햄 소재의 더 바인딩 사이트(The Binding Site))를 1:2000의 희석률로 첨가하였다. 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션한 후에 상기 플레이트를 세척하고, TMB (시그마) 기질을 첨가하여 10분 내지 30분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. H₂SO₄ (랩캡)로 반응을 중단시키고, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서의 광학 밀도를 측정하였다.

[0219] 유동 세포계측: 항체 역가, 특이성, 및 상대적인 결합 친화도는 인간 OX40 안정적인 CHO-K1 형질감염체 또는 3일 동안 PHA와 IL2로 활성화시킨 인간 PBMC를 사용한 유동 세포계측 분석으로 결정하였다. 세포를 PBS + 2% FBS + 0.1% NaN₃ + 10 mM EDTA의 염색 완충제 중에 1회 세척한 후에 혈청, 상등액, 또는 정제된 항체 중에 50 μl의 부피로 재현탁하였다. 세포를 항체와 함께 냉장에서 20분 동안 인큐베이션한 후에 염색 완충제 중에 2회 세척하고, 이후에는 항-인간 IgG-피코에리트린 표지된 2차 항체 중에 재현탁하였다. 2종의 상이한 항체를 사용하였다: (1) 염소 항-인간 IgG (미국 알라바마주 베밍햄 소재의 써던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트스 (Southern Biotechnology Associates)) 또는 (2) 마우스 항-인간 IgG (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 비디 파르밍겐). 냉장에서 20분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 1회 세척하고 1% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시켰다. 마지막 세척 후에는 세포를 염색 완충제 중에 재현탁하고, FACScan 또는 FACSCalibur 유동 세포계측기 (미국 캘리포니아주 팔로 alto 소재의 벡톤 디킨슨 바이오사이언시스(Becton Dickinson Biosciences))를 사용하여 샘플을 얻어서, 셀퀘스트(Cellquest) (벡톤 디킨슨 바이오사이언시스) 또는 플로우 조(Flow Jo) (미국 캘리포니아주 산 카를로스 소재의 트리스타 인크.(TreeStar, Inc.)) 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. 또한, 활성화된 T-세포를 마우스 항-인간 OX40 항체 L106 (벡톤 디킨슨)으로 염색하여 피코에리트린에 직접 접합시키거나 이것의 결합을 항-마우스 IgG-PE (써던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트스)로 검출하였다.

[0220] OX40L 차단 검정: 항-인간 OX40 항체가 가용성 OX40에 대한 OX40L 결합을 차단할 수 있는지 여부를 결정하기 위해서 ELISA 및 유동 세포계측 프로토콜을 둘다 이용하였다. ELISA에서는 96웰 넌크 편평 바닥 플레이트를 탄산염 완충제 (pH 9.4) 중 2 μg/mL 재조합 가용성 hOX40:hFc로 1시간 동안 37°C에서 코팅하였다. 상기 플레이트를 PBS/0.1% 트윈 20으로 세척하고, 상기 웰에 수퍼블럭 (피어스)을 첨가하여 비-특이적 결합을 차단하였다. 시험 항체를 PBS/트윈 20 중에 1 μg/mL로 희석하여 상기 플레이트에 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 항-OX40 항체를 세척해 내지 않은 채로 FLAG 태그가 부착된 재조합 가용성 인간 OX40L (미국 캘리포니아주

샌 디에고 소재의 알렉시스 바이오케미칼스(Alexis Biochemicals))을 적절한 웰에 첨가하였다. 1시간 동안 인큐베이션한 후, 상기 플레이트를 세척하고, 항-FLAG-페옥시다제 접합된 항체 (시그마)를 상기 웰에 1시간 동안 37°C에서 첨가하였다. TMB 기질을 첨가하고, 10분 후에는 H₂SO₄로 반응을 중단시키고 마이크로플레이트 판독기로 결과를 450 nm에서 판독하였다. 유동 세포계측 검정에서, 인간 CD4 + T-세포를 정제하고 PHA + IL2로 2일 동안 활성화시켰다. 세포를 세척하고 염색 완충제 중에 재현탁한 후에 0.005 µg/mL에서 50 µg/mL로 증가하는 양의 인간 항-인간 OX40 항체와 함께 20분 동안 빙상에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 상기 세포에 가용성 재조합 OX40L-FLAG를 첨가하였다. 세포를 세척하여 PE (시그마)에 접합된 항-FLAG와 함께 인큐베이션시켰다. 다시 세척한 후, 1% 파라포름알데히드로 세포를 고정시켜서 FACScan 또는 FACSCalibur에서 분석하였다. OD 또는 양성 백분율(%)을 사용하여, 억제율(%) = 100 - ((샘플/최대 결합) × 100)의 식에 따라 억제율(%)을 결정하였다.

[0221]

항-OX40 항체 교차-차단 검정: 항체가 인간 OX40과 동일한 "에피토프"에 결합하는지 여부를 결정하기 위해서 ELISA 프로토콜을 이용하였다. 넌크 96웰 편평 바닥 ELISA 플레이트를 탄산염 완충제 중 2 µg/mL 인간 항-인간 OX40 항체로 1시간 동안 37°C에서 코팅하였다. 플레이트를 세척한 후에 PBS/1% BSA/트윈 20으로 차단하였다. 이어서, 2 내지 20 µg/mL의 인간 항-인간 OX40 항체 및 마우스 항-인간-OX40 항체 L106 (미국 캘리포니아주 산조세 소재의 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)), 클론 315 (일본 도쿄 소재의 니찌레이 바이오사이언시스(Nichirei Biosciences)) 또는 ACT35 (비디 파르밍겐)를 2 µg/mL 재조합 인간 OX40:mFc 융합 단백질 (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 알렉시스 코포레이션(Alexis Corporation))과 30분 동안 실온에서 예비-인큐베이션시켰다. 항체-OX40:mFc 단백질의 조합물을 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 3회의 세척 후에, 결합된 OX40:mFc를 페옥시다제 접합된 양의 항-마우스 Ig (아머샴 바이오사이언시스)로 검출하였다. ELISA를 상기한 바와 같이 완료하였다. 각 샘플의 OD를 사용하여, 억제율(%) = 100 - ((샘플/최대 결합) × 100)의 식에 따라 억제율(%)을 결정하였다. 이들 인간 항-인간 OX40 항체가 마우스 항-인간 OX40 항체를 차단하는지 여부를 결정하기 위해서, 상기 ELISA의 변형 형태를 수행하였다. 상기 방법은 플레이트를 마우스 항-인간 OX40 항체로 코팅하고, 112V8, 112F32, 112Y131 및 112Z5를 인간 OX40:hFc 단백질과 예비-인큐베이션시킨 점을 제외하고는 동일하였다. 코팅된 항체에 대한 OX40 단백질의 결합은 양의 항-인간 IgG-양고추냉이 페옥시다제 2차 항체 (아머샴 바이오사이언시스)를 사용하여 검출하였다.

[0222]

항체가 서로를 교차차단하는지 여부를 결정하기 위해서 유동 세포계측 검정도 이용하였다. 인간 CD4 T-세포를 하기하는 바와 같이 말초혈 단핵 세포로부터 정제하고, 1 µg/mL 피토헤마글루터닌 (미국 캔자스주 레넥사 소재의 레벨) 및 10 ng/mL 재조합 인간 인터류킨 2 (비디 파르밍겐)로 2일 내지 3일 동안 활성화시켰다. 세포를 세척하고 10 µg/mL의 시험 항체로 30분 동안 빙상에서 2% 송아지 태아 혈청 및 0.1% 아지드화나트륨이 보충된 PBS 중에서 표지하였다. 세척 없이 바이오티닐화 버전의 동일 항체를 상기 웰에 10 µg/mL로 첨가하고, 세포를 30분 더 빙상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 완충제 첨가로 세포를 세척하고, 1200 RPM으로 3분 동안 4°C에서 회전시켰다. 바이오티닐화 항체의 결합을 20분 동안 스트렙타비딘-피코에리트린 (SA-PE, 비디 파르밍겐)과의 인큐베이션으로 검출한 후에 기재한 바와 같이 다시 세척하였다. 세포를 1% 파라포름알데히드 중에 10분 동안 고정시켰다. 마지막 세척 후에는 세포를 염색 완충제 중에 재현탁하고, FACSCalibur 유동 세포계측기 (미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 벡톤 디킨슨 바이오사이언시스)를 사용하여 샘플을 얻었다. 셀퀘스트 (벡톤 디킨슨 바이오사이언시스) 또는 플로우 조 (미국 캘리포니아주 산 카를로스 소재의 트리스타 인크.) 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. 시험한 항체는 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131, 112Z5, 항-DNP (인간 IgG1 음성 대조군), 마우스 항-인간 OX40 항체, 클론 L106 클론 315, 및 클론 ACT35를 포함하였다. 100 - (시험 항체의 기하평균/Max 기하 평균)×100의 식에 따라 억제율(%)을 결정하였다. 항체를 그 자체의 결합 억제 뿐만이 아니라 서로의 결합 억제에 대하여도 시험하였다.

[0223]

전혈로부터 인간 PBMC의 정제: 스크립스 그린 호스피탈(Scripps Green Hospital) (미국 캘리포니아주 라 콜라 소재)의 통상적인 혈액 제공 프로그램에 따라 18세와 50세 사이 연령의 건강한 공여자로부터 전혈을 수거하였다. 헤파린을 첨가하여 혈액응고를 방지하였다. 인종, 민족 또는 성별 어느 것도 명시하지 않았다. 혈액을 PBS 중에 희석한 후에 피콜-플라크 플러스(Ficoll-Plaque Plus) (아머샴 바이오사이언시스)로 깔았다. 1800 RPM에서 계속 원심분리하여 단핵 세포를 혈청 및 혈소판으로부터 분리하였다. PBMC를 함유하는 계면을 수거하여 PBS로 2회 세척하였다.

[0224]

CD4+ T-세포의 정제: 밀테니이 바이오테크.(Miltenyi Biotec.) (미국 캘리포니아주 아우번 소재)의 음성 단리 키트를 사용하여 인간 CD4+ T-세포를 정제하였다. PBMC를 CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 및 CD56에 특이적인 합텐 접합된 항체 혼합물로 15분 동안 4°C에서 PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA 중에서 표지하였다. 2회 세척한 후에

세포를 항-합텐 자성 비드 (MACS 비드) 중에 재현탁하고, 세포를 4°C에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 세척하고 미리 세척해서 자석 내에 삽입해 둔 LS/VS+ 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 완충제로 3회 세척하였다. 상기 컬럼의 유출물(flow through)에는 "미접촉(untouched)" CD4+ 세포가 함유되어 있었다. 순도는 형광색소 (비디 파르밍겐)에 직접 접합된 인간 CD3과 인간 CD4에 특이적인 항체를 사용한 유동 세포계측 분석으로 확인하였다. 별법으로, CD4+ 세포를 CD4 마이크로비드 (밀테니이 바이오테크)로 양성 선별하였다. 상기 절차는, 컬럼을 자석에서 빼내어 상기 컬럼에 플런저로 완충제 5 mL로 가압하여 컬럼에 부착된 세포를 용출 시켰다는 점을 제외하고는 상기한 바와 유사하였다.

[0225] 혼합 림프구 반응 검정: 2명의 공여자로부터의 PBMC를 정제하고, 각 공여자로부터의 1×10^5 개 세포를 96웰 U자 바닥 플레이트에 인간 항-인간 OX40 항체 또는 음성 대조군 인간 IgG4 (항-인간 혈청 알부민, 기린 브류웨리 컴파니 리미티드)의 존재 또는 부재하에 가하였다 [Ukyo, et al., Immunology 109(2):226 (2003)]. 항체를 연구에 따라 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 시험하였다. 다수의 공여자 쌍을 시험하였다. 사용된 배지는 10% 인간 AB 혈청 (미국 캘리포니아주 이르빈 소재의 엠피 바이오메디칼(MP Biomedical)), 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민, 및 2-메르캅토에탄올이 보충된 RPMI-1640이었다. 제6일에는 마지막 18시간의 배양 동안에 1 μCi 삼중수소화된 티미딘 ($^3\text{HTdR}$)을 각 웰에 가하였다. 세포를 용해하여 유리 필터 매트로 옮기고, 섬광 계수기 (핀란드 터르쿠 소재의 월락(Wallac))로 계수하였다.

[0226] 급성 이식편-대-숙주 질환 생체내 모델: 5주 내지 10주령의 중증 합병형 면역결핍 (SCID) 수컷 마우스에게 래트 항-마우스 IL2 수용체 β 쇄 항체 (TM β 1, [Tanaka, et al., J Exp Med 178(3):1103-7 (1993)]) 20 μg 를 주사하여 내인성 천연 킬러 세포를 고갈시켰다. 다음날, 상기 마우스에게 세슘원을 사용하여 2.5 Gy의 방사선조사를 실시하였다. 4시간 후에는 상기 마우스에게 PBS 중 총 1000만개의 인간 PBMC를 복강내 주사로 투여한 직후에 인간 항-인간 OX40 또는 음성 대조군 hIgG1 (항-디-니트로-페놀 (항-DNP), 기린 브류웨리 컴파니 리미티드) 항체를 PBS 100 μl 중 2 μg , 20 μg , 100 μg , 또는 200 μg 으로 정맥내 주사하였다. 별법으로, 항체 처치를 제3일 또는 제6일까지 지연시켜서 항-OX40 항체의 치유 능력을 시험하였다. 마우스를 3일 내지 4일마다 청량하고, 매주 항-IL2R β 항체를 투여하였다. 제12일에는 마우스를 죽이고 육안 병리에 대해 평가하였다. 비장을 꺼내어 유동 세포계측 분석을 실시하였고, 간과장을 꺼내어 조직학 분석을 수행하였으며, 혈청을 수거하여 인간 사이토킨 및 항체 분석을 행하였다 [Watanabe, et al., Clin. Immunol. 120:247 (2006)].

[0227] 만성 이식편-대-숙주 질환 생체내 모델: 급성 이종 GVHD 모델 [Watanabe, et al., Clin. Immunol. 120:247 (2006)]로부터 만성 GVHD 모델을 유도하였다. 질환은 양성 선별된 인간 CD4 T-세포를 상기한 것과 동일하게 준비된 SCID 마우스에게 전달하여 유도되었다. 마우스에게는 1백만개의 양성 선별된 CD4 T-세포를 복강내 주사로 제0일에 투여하고, 제0일부터 출발하여 항-OX40 또는 대조군 항체 2 μg , 20 μg 또는 100 μg 을 정맥내 주사로 매주 투여하였다. 제30일에는 질환이 명백하였고, 제48일에 마우스를 평가하였다. 비장 및 림프절을 꺼내어 유동 세포계측을 실시하였고, 피부 및 폐를 꺼내어 조직학 분석을 수행하였으며, 혈청을 수거하여 인간 사이토킨 분석을 행하였다

[0228] 인간 사이토킨 분석: 멀티플렉스 기술을 제조업체 (미국 캘리포니아주 헤르클레스 소재의 바이오-래드 래버ATORYS(Bio-Rad Laboratories))의 지침에 따라 행하여, 마우스 혈청 중 8종의 인간 사이토킨 패널을 결정하였다.

[0229] 인간 천연 킬러 세포의 정제: 인간 천연 킬러 ("NK") 세포를 밀테니이 바이오테크 (미국 캘리포니아주 아우번 소재)의 음성-단리 키트로 정제하였다. PBMC를 T-세포, B-세포, 줄기 세포, 수지상 세포, 단핵구, 과립구, 및 적혈구계 세포에 특이적인 바이오틴 접합된 항체 혼합물로 15분 동안 4°C에서 PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA 중에 표지하였다. 이후에는 항-바이오틴 자성 비드 ("MACS 비드")를 첨가하였다. 상기 세포를 4°C에서 15분 동안 인큐베이션한 후에 미리 세척하여 자석에 삽입해 둔 LS/VS+ 컬럼에 적용시켰다. 컬럼을 완충제로 3회 세척하였다. 상기 컬럼의 유출물에는 "미접촉" CD56+ NK 세포가 함유되어 있었다. 순도는 형광색소 (비디 파르밍겐)에 직접 접합된 인간 CD56과 인간 CD3에 특이적인 항체를 사용한 유동 세포계측 분석으로 확인하였다.

[0230] 항체-의존성 세포 세포독성 검정 (ADCC): 인간 PBMC로부터 NK 세포를 정제하고, 10% 인간 AB 혈청 (미국 캘리포니아주 이르빈 소재의 엠피 바이오메디칼), 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민 및 2-메르캅토에탄올이 보충된 RPMI-1640 중에서 48시간 동안 20 ng/mL 재조합 인간 인터류킨 2 (비디 파르밍겐)와 함께 배양하였다. 이들 세포를 사이토톡스(Cytotox) 96 비-방사성 세포독성 검정 (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가 코포레이션(Promega Corp.))에서의 효과기 세포로 사용하였다. 표적 세포는 모 또는 인간 OX40 형질감염된 EL-4 세포였다. 5000개의 표적 세포를 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-인간 OX40 항체 또는 대조군 항체와 함께 30분

동안 빙상에서 둑근 바닥 96웰 조직 배양 플레이트에서 인큐베이션시켰다. 20배의 효과기 NK 세포를 상기 웰에 100 μ l의 최종 부피로 가하고, 상기 플레이트를 200×g에서 3분 동안 회전시킨 후에 37°C, 5% CO₂로 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 250×g에서 5분 동안 회전시키고, 상등액 50 μ l를 ELISA 플레이트로 옮겼다. 상기 플레이트에 검정 완충제를 50 μ l 부피로 첨가하였다. 30분 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 웰에 정지 용액 50 μ l를 가하고, 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 필요한 대조군은 표적 세포 단독 (자발적), 마지막 45분의 인큐베이션 동안에 용해 완충제를 처치한 표적 세포 단독 (최대), 효과기 세포 단독, 및 용해 완충제를 첨가하거나 (부피 보정) 첨가하지 않은 배지만을 단독으로 함유하는 웰을 포함하였다. 특이적 용해율 (%)은 모든 웰에서 배지 백그라운드를 빼고 부피 보정 값을 최대 표적 값에서 뺀 후에 하기 식을 이용하여 결정된다: 세포독성률(%) = ((실험값 - 자발적 효과기 - 자발적 표적)/(최대 표적 - 자발적 표적))×100.

[0231]

인간 항-OX40 항체 유전자의 단리: 배양된 하이브리도마 세포 (112V8 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7219))는 112V8 항체 (IgG4)를 생성하며, 상기 세포를 원심분리로 수거하였다. RNeasy 키트 (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 큐아젠 인크.(QIAGEN Inc.))를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 이들 세포로부터 전체 RNA를 정제하였다. SMART RACE™ cDNA 증폭 키트 (미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 클론테크 컴파니 리미티드(Clontech Co., Ltd.)를 사용하여 전체 하이브리도마 세포 RNA로부터 이뮤노글로불린 유전자의 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 클로닝하였다. 간략하게 설명하면, 제1 가닥 cDNA를 역전사효소를 사용하여 RNA 2 μ g으로부터 제조하였다. 상기 cDNA를 폴리머라제 연쇄 반응 ("PCR")의 주형으로 사용하여 중쇄 및 경쇄 (각각 "HV" 및 "LV")의 가변 영역 및 일부 불변 영역을 증폭시켰다. 증폭된 서열은 또한 리더 서열도 함유하였다. 반응물은 다음과 같았다: 2.5 U Pfu 울트라(Ultra) DNA 폴리머라제 (미국 캘리포니아주 라 졸라 소재의 스트라타진(Stratagene)), 0.2 μ M 3' 프라이머 (중쇄의 경우 IgG1p, 경쇄의 경우 hk5, 표 1), 5' 말단을 위한 1× 유니버설(Universal) 프라이머 혼합물 A (UMP 프라이머 혼합물 A는 SMART RACE 키트에 포함되어 있음), 200 μ M dNTP 혼합물, 1 mM MgCl₂, Pfu 울트라 완충제 (최종 농도는 1×), 및 cDNA 주형.

[0232]

열주기적용(thermocycling) 프로그램은 94°C×30초, 72°C×3분의 5회 주기였다. 94°C×30초, 70°C×30초, 72°C×3분의 5회 주기. 94°C×30초, 68°C×30초, 72°C×3분 및 이후 72°C×7분의 연장 25회 주기. 증폭된 DNA 단편을 아가로스 젤 전기영동으로 수거하고 QIAquick 젤 추출 키트 (독일 소재의 큐아젠 컴파니 리미티드(Qiagen Co., Ltd.))로 정제하였다. HV 및 LV의 정제된 DNA 단편을 Zero Blunt TOPO PCR 클로닝 키트 (인비트로젠 코포레이션)를 사용하여 pCR4 Blunt-TOPO 벡터로 통합시키고, 각 구축물 플라스미드로 이. 콜라이를 형질전환시킨 후에 클로닝하였다. 구축물 플라스미드 중 각 삽입물 (HV 및 LV)의 뉴클레오티드 서열은 특이적 프라이머 (M13F, M13R, 표 1)를 사용하여 분석하였다. HV 및 LV로부터 얻은 서열을 기초로 하여, VH (V8H38, V8H39) 및 VL (V8L42, V8L43)을 증폭시키도록 올리고뉴클레오티드 프라이머를 디자인하였다 (표 1).

[0233]

112V8 VH 및 VL을 IgG1 발현 벡터로 클로닝하였다. 간략하게 설명하면, PCR로 HV의 가변 영역을 증폭시키기 위해서 5'-SalI 및 3'-NheI 제한 효소 인식 부위를 함유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 디자인하였다. 주형으로서의 pTopoV8VH 미니프렙(miniprep) DNA, 프라이머로서의 V8H38 및 V8H39 (표 1) 및 Pfu 울트라 DNA 폴리머라제를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생성물을 NheI 및 SalI으로 소화시킨 후에, 410 bp의 단편을 NheI 및 SalI로 미리 소화시켜 둔 IgG1 발현 벡터 (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 아이텍 파마슈티칼스(IDEA Pharmaceuticals), N5KG1-Val Lark (N5KG1의 변형된 벡터, 미국 특허 제6,001,358호)) (8.9 킬로베이스의 DNA 단편)에 서브클로닝하였다. HV의 가변 영역의 존재를 제한 소화로 분석하였다.

[0234]

제2 단계로서, LV를 N5KG1-Val Lark-VH 벡터로 다음과 같이 삽입하였다: DNA 벡터를 2종의 DNA 제한 효소, BglIII 및 BsiWI으로 소화시켰다. 9.1 kb DNA 단편을 단리하였다. 중쇄 구축물과 유사하게, 5' BglIII 및 3' BsiWI에 대한 인식 부위가 함유되도록 LV의 PCR 프라이머 세트를 디자인하였다. 이들 프라이머, V8L42 및 V8L43을 사용하여 pTopoV8VL 미니프렙 플라스미드 DNA로부터 VL을 증폭시켰다. PCR 생성물을 BglIII 및 BsiWI로 소화시켜 아가로스 젤 전기영동 및 젤 정제로 단리하였다. V8VL을 함유하는 상기 단편을 상기 제조된 9.1 kb 벡터에 T4 DNA 리가제로 라이제이션시켜 Top10 세포 (인비트로젠 코포레이션)의 형질전환에 사용하였다. 양성 이. 콜라이 형질전환체를 선별하였다. 상기 발현 벡터 pG1K112V8을 정제하여, 112V8LV 및 112V8HV 영역 둘다의 존재를 제한 분석으로 확인하였다.

[0235]

112Y55 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7220), 112Y131 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7218) 및 112Z5 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7216) HV 및 LV 가변 영역을 동일한 프로토콜로 단리하여 서열분석하였다. 특이적 HV 및 LV의 증폭에 사용된 프라이머는 표 1에 기재하였다.

[0236]

항체의 하위부류가 2차 효과기 기능, 예컨대 보체 활성화 또는 Fc 수용체 (FcR) 결합 및 항체-의존성 세포 세포

독성 (ADCC)을 부분적으로 결정한다 ([Huber, et al., Nature 229(5284):419-20 (1971)], [Brunhouse, et al., Mol Immunol 16(11):907-17 (1979)]). 특별한 용도에 최적인 유형의 항체를 확인할 때에는 항체의 효과기 기능을 고려할 수 있다. 예를 들어, hIgG1 항체는 비교적 긴 반감기를 가지며 보체를 고정시키는데 매우 효과적이고, 이것들은 FcRI과 FcRII 둘다에 결합한다. 반대로, 인간 IgG4 항체는 더 짧은 반감기를 가지며 보체를 고정시키지 않고 FcR에 대한 친화도가 더 낮다. IgG4의 Fc 영역에서 세린 228을 프롤린으로 대체하면 (S228P), hIgG4에서 관찰되던 이질성이 줄어들고 혈청 반감기가 연장된다 ([Kabat, et al., Sequences of proteins of immunological interest 5th Edition (1991)], [Angal, et al., Mol Immunol 30(1):105-8 (1993)]). 루이신 235를 글루탐산으로 대체한 제2의 돌연변이 (L235E)는 잔류 FcR 결합 및 보체 결합 활성을 없앤다 [Alegre, et al., J Immunol 148(11):3461-8 (1992)]. 이로써 생성되는, 2가지 돌연변이를 모두 갖는 항체를 IgG4PE라고 지칭한다. hIgG4 아미노산의 번호매김은 문헌 [Kabat, et al., Sequences of proteins of immunological interest 5th Edition (1991)]에서 유래된 것이다.

[0237] 재조합 112V8 IgG4PE를 발현하는 백터는 pG1K112V8을 NheI 및 BglII로 소화시켜 12V8VH 및 112V8VL을 함유하는 단편을 유리시켜서 생성하였다. 이것을 동일한 효소로 절단한 IgG4PE 발현 백터 (pN5KG4PE-Lark, 아이텍 파마슈티칼스, 미국 특허 제6,001,358호)로 라이제이션시켰다. 이로써 생성되는 플라스미드, pG4PEK112V8을 제한소화로 확인하였다.

[0238] 112F32 하이브리도마 (2005년 11월 17일자로 기탁된 ATCC PTA-7217)의 RNA를 사용하여 재조합 112F32G1 및 112F32G4 항체를 생성하기 위한 백터를 동일한 방식으로 생성하였고, RACE 반응에서 중쇄 및 경쇄 유전자의 증폭에 사용된 3' 프라이머는 각각 HH-2 및 HK-2였다. 112F32HV의 증폭은 H725' 및 M2H3'를 사용하여 수행되었다. 112F32LV 증폭 프라이머는 F32K5' 및 K5D3'이었다 (표 1). IgG4 발현 백터 pN5KG4는 아이텍 파마슈티칼스 (미국 특허 제6,001,358호)에서 입수하였다. 이로써 생성된 백터인 pKLG1/F32K3H 및 pKLG4/F32K3H를 제한 효소 소화 및 서열분석으로 확인하였다.

[0239] 112F32 HV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 3:

ATGGAGTGGG GGCGTGCTG GGTTTCCTT GTTGTATT TAGAAGGTGT CCAGTGTGGG	60
GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC	120
TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCACTAGC TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA	180
GGGAAGGGG TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA CTAGTACCAT ATACTATGCA	240
GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGTATCTG	300
CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACCG CCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGGAGTGTAT	360
CACAATGGCT GGTCTTCCT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTACTCAC CGTCTCCTCA	420

[0240] 112F32 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 4:

ATGGACATGA GGGCCTCGC TCAGCTCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGTT CCCAGGTGCC	60
.AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAAACAGA	120
GTCACCATTA CTTGTCGGGC GAGTCAGGAT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG	180
AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTGCA AAGTGGGTC	240
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATITCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG	300
CAGCCTGAAG ATTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC CCTCACCTTC	360
<u>GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGA.</u>	390

[0243] 112V8 HV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 5:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCAG	60
ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTA GTGAAGCCCA AACAGACCC CACGCTGA	120
TGGACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAAATGG GTGTGGGCTG GATCCGTAG	180
CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGCCCTGCA GTCATTATT GGATGATCA TCAACTCTAC	240
AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCAC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC	300
CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACAGACGA	360
GGGGCCTTCC AGCACTGGGG CCAGGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC TTCCACCAA	419
GGGC	423

[0244]

[0245] 112V8 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 6:

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGA	60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	120
CTCTCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA	180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCAC TGGCATCCCA	240
GACAGGTICA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTAA TTACTGTCAAGTATGATA GCTCGCTCAC TTTCGGCGGA	360
GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGAACT	387

[0246]

[0247] 112F32 HV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 7:

MEWGPCWVFL VVILEGVQCG VQLVESGGGL VQPQGSRLS CAASGFTFSS YSMNWVRQAP	60
GKGLEWVSYI SSSSTIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRDEDT AVYYCARGVY	120

[0248]

HNGWSFFDYW QQGTLLTVSS	140
-----------------------	-----

[0249]

112F32 카파 LV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 8:

MDMRVL AQQLL GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SSLSASVG NR VTTTCRASQD ISSWLAWYQQ	60
KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTSSL QPEDFATYYC QQYNSYPLTF	120

[0250]

QQGTRLEIKR	130
------------	-----

[0251]

112V8 HV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 9:

MDTLCSTLLL LTIPS WVLSQ ITLKESGPTL VKPKQT LTLCT FSGFSLST SGMGVGWRQ	60
PPGKALEWLA VIYWDDHQLY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDFVD TATYYCAHRR	120

[0252]

GAFQHWGQGT LTVSSASTK G	141
------------------------	-----

[0253]

112V8 LV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 10:

METPAQ QLLFL LLLWL PDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK	60
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSLTFGG	120

[0254]

GTKVEIKRT	129
-----------	-----

표 1

합성된 DNA 프라이머 (서열 11 내지 서열 37)

번호	명칭	서열 5'→3'	길이
11	RACEUPSS'	CTAATACGACTCACTATAAGGGC	22-mer
12	IgG1p	TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31-mer
13	HK5	AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC	30-mer
14	M13F	GTAAAACGACGCCAGTG	18-mer
15	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-mer
16	V8H38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-mer
17	V8H39	AGAGAGAGAGGTGACCACTGGACACACACTTGCTCCACG	41-mer
18	V8L42	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTC	42-mer
19	V8L43	AGAGAGAGAGCGTACGTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mer
20	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCAACGCTG	25-mer
21	HK-2	GTTGAAGCTCTTGTGACGGGGAGC	26-mer
22	F725'	ACCGTGTGACTGGATTCCAAGGCATTCCAC	32-mer
23	M2H3'	GGTQCTAGCTGAGGAGACGGTGAC	24-mer
24	F32K5'	AATCAAGATCTGTCAAGGACACA	22-mer
25	K52D3'	TATCCCCTACGTTAACCTCCAGTCGTGTC	30-mer
26	Y131HF	AGAGAGAGAGGTGACCACTGGACACACTTGTCCACG	41-mer
27	Y131HR	AGAGAGAGA GGCTAGCTG AAGAGA CGGTGA CCATTGT	37-mer
28	Y131LF5	AGAGAGAGA GGTCGACCACTGG AAACCCCA CGCAGCTT	41-mer
29	Y131LR	AGAGAGAGA CGGTACGTTTGA TTT CCA CCTTGGTCCCTTG	40-mer
30	Y55HF	AGAGAGAGAGGTGACCACTGGACACACTTGTCCACG	41-mer
31	Y55HR	AGAGAGAGAGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCAATTGT	37-mer
32	Y55LF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTC	42-mer
33	Y55LR	AGAGAGAGAGCTACGTTGATTTCACCTTGGTCCCTG	40-mer
34	ZSHF	AGA GAGAGAGGTGACCACTGGACATGATTACGCCAAGC	41-mer
35	ZSHR	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAAGGGT	37-mer
36	ZSLF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAAGCCCCAGCTCAGCTTC	42-mer
37	ZSLR	AGAGAGAGAGCGTACGTTAACCTCCAGTCGTGTCCTTG	40-mer

[0255]

[0256]

112Y55 HV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 38:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCCCAG

60

ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCCT CACGCTGTCC
120IGCACCTTCT CTGGGTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGCTG GATCCGTAG
180CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA ATGGCTTGCA CTCATTCAATT GGGATGATGC TGAGCGCTAC
240AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC
300CTTACAATGA CCAACATGGAA CCTTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACACCCGG
360

GGGGCTTTG ATATCTGGGG CCAACGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA

408

[0257]

[0258]

112Y55 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 39:

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGGCCATC
120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAACAGAAA
180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATTAA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA
240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG
300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTAA TTACTGTCAG CAGTATGATA GCTCACGGAC GTTCGGCCAG.
360
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A
381

[0259]

[0260]

112Y131 HV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 40:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCAG
60
ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCCT CACGCTGACC
120
TGACACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTAG
180
CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA CTCATTTATT GGGATGATCA TAGCCCCTAC
240
AGCCCACATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAAA CCAGGTGGTC
300
CTTACAATGAA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACCCACCCGG
360
GGGGCTTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA
408

[0261]

[0262]

112Y131 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 41:

ATGGAAGCCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
60
GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGGCCACC
120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GGGTGTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT
180
GCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
240
ACGTTCACTG GCAGTGGGCC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAAGACCT
300
GAAGATTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCATCCGAC GTTCGGCCAA
360
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCATC
381

[0263]

[0264]

112Z5 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 42:

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTAAC GGCCGCCAGT
60
GTGCTGGAAT TCGCCCTTCT AATACGACTC ACTATAGGGC AAGCAGTGGT ATCAACGCAG
120
AGTACGGGG GAGGCTTGGT ACAGCCTGGC AGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAAGCCTCT
180
GGATTCAACCC TTGATGATTA TGGCATGCAC TGGTCCCGC AAGCTCCAGG GAAGGGCCTG
240
GAGTGGGTCT CAGGTATTAG TTGGAATAGT GATAGTATAG GCTATGTGGA CTCTGTGAAG
300
GCCCGATTCA CCATCTCCAG AGACAACGCC AAGAACTCCC TGTATCTGCA AATGAACAGT
360
CTGAGAGTTG AGGACACGGC CTTGTATTAC TGTGTAAAAG ATATTAGTGG CTGGTACAGC
420
TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT CA

[0265]

[0266]

112Z5 LV cDNA의 뉴클레오티드 서열 (개시 코돈 (ATG)부터 가변 영역의 말단까지) - 서열 43:

ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCAGA TACCACCCGA
60
GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCITGT CTCCAGGGGA AAGAGGCCACC
120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT
180
GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
240
AGGTTCACTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
300
GAAGATTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCGGATCAC CTTGGCCAA
360
GGGACACGAC TGGAGATTAA A

[0267]

[0268]

112Y55 HV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 44:

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTLS CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ
60
PPGKALEWLA LIHWDDAERY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDLVD TATYYCAHTR
120

[0269]

GAFDIWGQGT MVTVSS
136

[0270]

112Y55 LV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 45:

METPAQLLFL LLLWLDPDTG EIVLTQSPGT LSLSPGERA LSCRASQSVS SSFLAWYQQK
60
PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSRTFGQ
120
GTKVEIK

[0271]

[0272] 112Y131 HV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 46:

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKGSGPTL VKPTQTLT CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ
60

PPGKALEWLA LIYWDDHSPY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCARTR
120

GAFDIWGQGT MVTIVSS

136

[0273]

[0274] 112Y131 LV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 47:

MEAPPAQLLFL LLLWLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVS SYLAWYQQKP
60

GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGPGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPITFGQ
120

GTKVEIK

127

[0275]

[0276] 112Z5 HV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 48:

MTMITPSLVP SSDPLVTAAS VLEFALLIRL TIGQAVVSTQ STGGGLVQPG RSLRLSCAAS
60

GFTLDDYGMH WVRQAPGKGL EWVSGISWNS DSIGYVDSVK GRFTISRDNA KNSLYLQMNS
120

LRVEDTALYY CVKDISHWYS FDYWGQGTLV TVSS

154

[0277]

[0278] 112Z5 LV cDNA의 아미노산 서열 (리더 서열 (굵은 글씨) 및 가변 영역) - 서열 49:

MEAPPAQLLFL LLLWLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP
60

GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPITFGQ
120

GTRLEIK

127

[0279]

[0280] CHO 세포로부터 재조합 인간 항-OX40 항체의 생성: 재조합 항체의 생성을 위해서, 항-OX40 항체를 함유하는 개개의 항체 벡터를 차이니스 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary) 세포의 숙주 세포 dhfr-결함 균주 (CHO 세포, ATCC #CRL-9096)에 전기천공시키고, 형질감염된 세포의 상등액에서 재조합 항체를 단리하였다. 간략하게 설명하면, 10 µg의 정제된 DNA 발현 벡터를 DNA 제한 효소인 NruI으로 선형화하고, 상기 DNA를 사용하여 바이오-래드 전기천공기 (0.8 kV, 25 µF)로 3×10^6 개의 CHO 세포를 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를, DNA 벡터를 함유하는 CHO 세포의 선별을 위해 폐니실린/스트렙토마이신 (바이오휘태커), HT (시그마) 및 제네티신 (인비트로젠 코포레이션)이 보충되고 글루타민 (미국 캔자스주 레넥사 소재의 제이알에이치 바이오사이언스(JRH Bioscience))을 함유하는 EX-CELL 325 PF CHO 혈청-무함유 배지가 들어 있는 96웰 배양 플레이트에 접종하였다. 여러 안정한 형질감염체 세포주의 선별 후, 인간 IgG를 많이 생성하는 것을 ELISA로 확인하고 재조합 항체의 제조에 사용하였다.

[0281]

실시예 2

[0282] 본 실시예는 인간 OX40에 대한 인간 모노클로날 항체의 여러가지 특징을 기재한다.

[0283] KM 마우스™을 CFA/BFA 중 가용성 재조합 hOX40:hFc, RIBI 중 hOX40:hFC + hOX40:hFc-ova 접합체, RIBI 중 열변성 hOX40:hFc, 또는 RIBI 중 방사선조사된 활성화된 인간 T-세포로 면역화하였다. 여러 마리의 마우스가 인간 IgG OX40 특이적 역가의 범위를 갖는 항-인간 OX40 특이적 항체를 생성하였다. 가장 높은 반응자의 비장세포를 골수종 세포와 융합시켜서 인간 항-인간 OX40을 생성하는 하이브리도마를 수득하였다. 재조합 가용성 hOX40:hFc 및 CHO-OX40 형질감염체 각각을 사용한 ELISA 및 유동 세포계측 둘다를 이용하여 항-OX40 항체의 생

성을 결정하였다. 양성 하이브리도마를 제한 희석으로 클로닝하여 모노클로날 하이브리도마를 수득하였다 (표 2).

표 2

항체 생성에 사용된 항원

항체	항원
112F32	hOX40:hFc
112V8	활성화된 인간 T-세포
112Y55	hOX40:hFc + hOX40:hFc- 난알부민
112Y131	hOX40:hFc + hOX40:hFc- 난알부민
112Z5	열 변성 hOX40:hFc

[0284]

[0285] 몇가지 항체를, 인간 OX40에 대한 상대적인 결합 친화도, 인간 OX40 리간드 결합의 시험관내 차단 능력, 서로에 대한 교차-차단, 시험관내 증식 차단, 생체내 염증 차단 능력, 및 ADCC 매개 능력에 대하여 추가로 특징규명하였다 (표 3).

[0286]

112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 및 112Z5 모두가 활성화된 인간 T-세포에는 특이적으로 결합하였지만, 허지기의 인간 T-세포에는 특이적으로 결합하지 않았다 (도 1). 3일 동안 활성화시킨 인간 T-세포를 여러가지 농도의 인간 항-인간 OX40 항체로 표지하고, 항-인간 IgG-PE로 검출하였다. 이들 인간 항-인간 OX40 항체의 결합은 포화가능하였다. 각 항체의 최대 결합은, 활성화된 인간 T-세포를 표지하는데 필요한 항체의 양을 역가측정하여 결정하였다 (도 2). 소정 범위의 상대적인 결합 친화도가 얻어졌다 (KD 및 BMAX, 표 3). 정제된 마우스 항-인간 OX40 항체 L106의 결합도 측정하였고, 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5 모두가 활성화된 T-세포에 대하여 L106보다 더 높은 BMAX를 나타냈다.

표 3

인간 항-인간 OX40 모노클로날 항체의 특징

항체	원래의 하위부류	에피토프	활성화된 T-세포의 표지		ELISA에 의한 OX40L 차단 IC ₅₀ (μ g/mL)	T- 세포상에서 FACS에 의한 OX40L 차단 IC ₅₀ (μ g/mL)	시험관내 효능	생체내 효능	ADCC 10 μ g/mL 에서의 용해율 (%)@
			KD μ M	BMAX 기하 평균					
112F32	IgG4	A	0.013	103.5	0.650	ni*	+^	IgG1 +^ IgG4 +	IgG1 37% IgG4 NT
112V8	IgG4	B	0.036	180.8	0.051	0.62	+	IgG1 + IgG4 +	IgG1 55.6% IgG4 18%
112Y55	IgG1	B	0.014	161.8	0.073	0.90	+	+	54.2%
112Y131	IgG4	B	0.025	170.7	0.069	0.91	+	+	18%
112Z5	IgG1	C	0.011	118.2	0.081	14.65	+	+	35%
L106	마우스 IgG1	L	0.001	52.0	0.982	60.91	NT	NT	NT

[0287]

[0288] *: ni: 50 μ g/mL에서 억제하지 않음.

[0289] ^: +: 시험관내 증식 또는 생체내 질환을 억제함. 정량하지 않음.

[0290]

#: NT: 시험하지 않음

[0291] @: 10 μ g/mL의 무관한 항체를 사용한 용해율(%)이 14%였음.

- [0292] OX40 항체를 ELISA로 분석하여 가용성 OX40에 대한 결합에 관하여 서로 경쟁하는지 여부를 결정하였다. 개개의 인간 항체로 96웰 플레이트의 웰을 코팅하였다. hOX40:mFc를 가용성 항-OX40 항체(차단 항체)와 예비-인큐베이션시킨 후에 상기 코팅된 웰에 첨가하였다. 코팅된 항체에 대한 hOX40:mFc의 결합을 항-마우스 IgG-HRP로 검출하였다. (100 - (OD 샘플/OD 최대 결합 샘플))×100의 식에 따라 억제율(%)을 결정하였다(도 3A).
- [0293] 추가로, 마우스 항체(L106, 315, ACT35 또는 마우스 IgG)로 96웰 플레이트의 웰을 코팅하고, hOX40:hFc를 차단 항체와 함께 예비-인큐베이션시켰다. hOX40:hFc의 결합은 양의 항-인간 IgG-HRP로 검출하였다(도 3B).
- [0294] 이들 인간 항-인간 OX40 항체에 대한 3종의 "에피토프"군이 동정된 바 있다. 112V8, 112Y55 및 112Y131 모두가 서로 교차차단하지만, 112F32 및 112Z5 각각은 독특한 결합 부위를 갖는다. 112V8, 112Y131 및 112Y55는 112Z5의 결합을 일부 감소시키지만 반대의 경우는 아니고, 112Z5만이 스스로를 차단시킨다. 이는 112Z5가 112V8, 112Y55 및 112Y131과는 다른 에피토프를 인식하고, 결합에서의 임의의 감소는 입체 장애로 인한 것일 수 있음을 시사한다. 이들 인간 항-OX40 항체는 OX40에 대한 L106, 315 또는 ACT35 결합을 차단하지 않으며(도 3A 및 도 3B), L106은 스스로 및 ACT35를 차단하지만 112V8 및 112Y131의 결합을 OX40에 결합하지 않는 대조군 항체(실선)에 비해 10% 만큼 감소시키는 것에 불과하다. 이것은 본원에 기재한 항체가 L106과는 다른 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. 물론 315는 112V8 및 112Y131의 결합을 감소시켰지만, 이들 항체 112V8 및 112Y131이 315 결합을 차단하지 못했기 때문에 이것들은 상이한 에피토프에 결합하는 것이 틀림없다.
- [0295] 또한, 유동 세포계측 검정을 이용하여, 활성화된 인간 T-세포상에서 표면 발현된 OX40에 상기 항체가 결합하는 것을 차단하는 능력에 대하여 평가하였다. 활성화된 T-세포를 차단 항체로 염색한 후에 바이오티닐화 항-OX40 항체를 첨가하였다. 추가로, 활성화된 인간 T-세포를 마우스 항-인간 OX40 항체로 표지하여 OX40 결합을 차단하였다. 이들 세포에 대한 바이오티닐화 항-OX40 항체의 결합을 SA-PE로 검출하였다. 세포를 유동 세포계측으로 분석하였다. 양성 SA-PE 염색의 기하 평균을 이용하여 동일한 식, 즉 (100 - (OD 샘플/OD 최대 결합 샘플))×100에 따라 억제율(%)을 계산하였다. 이러한 데이터(도 4A 및 도 4B)는 ELISA 분석과 상관관계가 있다.
- [0296] 인간 항-인간 OX40 항체에 의해 3종의 에피토프가 인식되는데, 하나는 112F32에 의해 인식되고, 두번째는 112Z5에 의해 인식되며, 세번째는 112V8 및 112Y131에 의해 인식된다. ELISA 데이터를 사용한 경우와 같이, 112Z5만이 스스로를 차단하지만, 이것의 결합은 112V8 및 112Y131에 의해 감소되었다. 112V8 및 112Y131의 L106 차단의 경우에도 마찬가지이다. L106이 세포에 먼저 결합된다면, 112V8 및 112Y131은 인간 OX40에 여전히 효율적으로 결합할 수 있다. 그러나, 112V8 및 112Y131은 L106 결합을 억제하였다. 이러한 데이터를 취합할 때, 상기 항체는 L106가 결합하는 것에 입체적 장애를 주지만 동일한 에피토프를 인식하지는 않는다는 것을 시사한다. 112F32 및 112Z5는 L106 결합을 차단하지 않는다. ACT35는 112F32, 112V8, 112Y131 또는 112Z5의 결합을 억제하지 않았지만, 물론 315는 112V8 및 112Y131의 결합을 50% 감소시켰다. 살아있는 세포에 대한 항체의 결합 및 검출은 표면 분자의 내재화를 유도할 수 있어서, 개개의 항체의 결합 수준은 상기 항체의 결합 차단에 의해서가 아니라 OX40이 전체적으로 보다 적게 표면 발현되기 때문에 감소될 수 있다. 더 높은 친화도의 항체는 더 낮은 친화도의 항체보다 더 많은 내재화를 야기할 수 있다. 이것으로, ELISA와 유동 세포계측 데이터 사이의 차이 뿐만 아니라 어떤 항체가 차단에 사용되는지에 따른 결과의 차이까지도 설명될 수 있다.
- [0297] 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 및 112Z5가 hOX40:hFc 융합 단백질 코팅물에 대한 가용성 hOX40L 결합을 차단하는 능력을 ELISA 프로토콜을 이용하여 시험하였다(도 5A, 표 3). 플레이트를 hOX40:hFc로 코팅하고, 비-특이적 부위를 차단한 후에 항-OX40 항체가 결합하도록 하였다. 세척 없이 OX40L-FLAG를 상기 웰에 첨가하였다. 결합된 리간드는 항-FLAG-HRP 2차 항체로 검출하였다. (100 - (OD 샘플/OD 최대 OX40L 결합))×100의 식에 따라 억제율(%)을 결정하였다. 112V8, 112Y55 및 112Y131은 hOX40:hFc에 대한 가용성 OX40L의 결합을 85% 저해하였다. 112F32는 hOX40:hFc에 대한 가용성 hOX40L의 결합을 대략 70% 저해하였고, 112Z5는 최대 결합의 67%를 차단하였다. 이러한 데이터는 이들 인간 항-인간 OX40 항체가 OX40 중 리간드 결합에 관여하는 부분에 결합한다는 것을 시사한다.
- [0298] 유동 세포계측 기재의 검정을 이용하여 OX40을 발현하는 활성화된 인간 T-세포에 대한 가용성 OX40L 결합의 차단을 모니터링한 경우에는 약간 상이한 결과가 얻어졌다(도 5B). 활성화된 인간 T-세포를 항-OX40 항체로 표지한 후에 가용성 flag 태그가 부착된-인간 OX40L로 표지하였다. OX40L의 결합을 항-FLAG-PE 항체로 검출하였다. 억제율(%)은 동일한 식, 즉 (100 - (OD 샘플/최대 결합))×100에 따라 결정하였다. 본 연구에서, 112F32는 OX40L 결합을 저해하지 못했고, 112Z5에 의한 차단은 반면에 다른 항체, 112V8, 112Y55, 및 112Y131은 유사한 차단 능력을 계속 보유하고 있었다. 이러한 결과의 차이는 OX40에 대한 112F32 및 112Z5의 친화도에

따른 것일 수 있다. 또한, 이것은 가용성 OX40:mFc 융합 단백질의 이량체화와는 반대로 세포 표면상에서 OX40 단백질이 삼량체화되기 때문일 수도 있다.

[0299] 별법으로, 활성화된 T-세포의 표면에서 발현된 OX40은 4-1BB와의 복합체로 존재할 수도 있고 [Ma, et al., Blood 106(6):2002-10 (2005)], 또는 112F32를 저해하거나 112Z5 결합은 감소시키지만 OX40에 대한 OX40L 결합은 차단하지 않는 BTLA와 유사한 억제 분자일 수도 있다 ([Cheung, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 102(37):13218-23 (2005)], [Compaan, et al., J Biol Chem 280(47):39533-6 (2005)], [Croft, Trends Immunol 26(6):292-4 (2005)], [Gonzalez, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 102(4):1116-21 (2005)], [Sedy, et al., Nat Immunol 6(1):90-8 (2005)]). 마지막 3가지 가능성은 개개의 항체에 의해 결합된 특이적인 에피토프에 초점을 맞춘 것일 수 있다. 마우스 항-인간 OX40 항체인 L106에 의해 인식되는 에피토프는 OX40 리간드 및 OX40의 형태(confirmation)에 따라 달라질 수 있는데, L106은 재조합 OX40 단백질에 대한 OX40L 결합을 95% 차단하지만 활성화된 T-세포에 대한 결합은 단지 60%만을 차단하기 때문이다. 이러한 데이터는 OX40에 여러개의 에피토프가 있으며, 이들 중 일부는 OX40L 결합을 완벽하게 방해하지만 다른 것들은 상기 상호 작용을 단지 부분적으로만 차단함을 나타낸다. 상이한 에피토프에 대한 이들 항체의 결합은 독특한 기능적 결과를 가질 수도 있고 갖지 않을 수도 있다.

[0300] 어떠한 방법에 의한 리간드 결합의 차단이든 간에 이것이 주어진 항체에 의해 OX40 신호전달이 방해받을 것을 반드시 나타내는 것은 아니다. 인간 항-인간 OX40 항체가 OX40을 통한 신호전달을 저해할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해서, 동종이계 공여자로부터의 전체 PBMC를 사용하여 2원 혼합 림프구 배양을 세팅하였다. 동종이계 공여자로부터의 말초혈 단핵 세포를 96웰 U자 바닥 플레이트에서 7일 동안 다양한 농도의 항-OX40 항체 또는 대조군 항체의 존재 또는 부재하에서 3별로 동시 배양하였다. 웰마다 1×10^5 개 세포/공여자를 첨가하였다. 마지막 18시간의 배양 동안에는 상기 플레이트를 $1 \mu\text{Ci}/\text{웰} {^3}\text{HTdR}$ 로 펄싱(pulse)하였다. 세포를 수확하고 섬광계수기에서 계수하였다. 증식은 대조군 또는 항-OX40 항체의 존재 또는 부재하여 측정하였다 (도 6). 112V8 (도 6A), 112Y55 및 112Z5 (도 6B), 및 112Y55, 112Y131 및 112F32 (도 6C)는 모두가 동종이계 세포에 의해 유도된 증식의 양을 투여량-의존적 방식으로 감소시킬 수 있었지만, 항-인간 혈청 알부민인 음성 대조군 hIgG4는 증식에 아무런 영향을 주지 않았다 (도 6A). 여러회의 연구를 수행하였고, 반응의 크기인 혼입된 최대 CPM은 각 검정에 사용된 공여자 PBMC의 조합에 따라 달라졌다. 혼합 림프구 배양에서는 CD4 및 CD8 T-세포 모두가 동종이계 항원에 반응하였다. 인간 항-인간 OX40 항체에 의한 증식성 반응에서의 감소는 CD4 및 CD8 T-세포 둘다의 직접적인 억제로 인한 것일 수 있다.

실시예 3

[0302] 본 실시예는 인간 OX40의 선형 웨티드를 사용하여 인간 항-인간 OX40 항체의 에피토프를 맵핑하는 것을 기재한다.

[0303] 인간 OX40의 세포의 도메인 내의 3종의 웨티드 (표 4)를 선택하여, 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5에 의해 인식되는 에피토프(들)의 맵핑을 시작하였다.

표 4

인간 OX4Q 웨티드

		항체				
웨티드 명칭	웨티드 서열	112F32	112V8	112Y55	112Y131	112Z5
112A	RPAGPGFYNDVVSSKPC	-	-	-	-	-
112B	RAGTQPLDSYKPGVDC	-	-	-	-	-
112C	LAGKHTLQPASNSSDAIC	-	-	-	-	-

[0304]

[0305] 웨티드는 에이 앤드 에이 랩, 엘엘씨(A & A Lab, LLC)가 제조한 것이었고 말레이미드 링커를 사용하여 제조업체 (피어스)의 지침에 따라 키홀 립펫 헤모시아닌 ("KLH")에 접합시켰다. 상기 웨티드를 탄산염 완충제 중 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용하여 96웰 막시소르프(Maxisorp) ELISA 플레이트 (넉크)를 4°C 에서 밤새 코팅시켰다. 상기 플레이트를 PBS/0.1% 트윈 20으로 세척한 후에 카제인(Casein) 완충제 (피어스)로 3시간 동안 실온에서 차단시켰다. 후보 항체를 PBS/0.1% 트윈 20 중의 10% 카제인에 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석시켜 첨가하였다. 나머지 ELISA는 OX40 특

이적 항체 검출 ELISA에 대하여 기재한 바와 같이 수행하였다.

- [0306] 인간 항-인간 OX40 항체 중 어느 것도 이들 인간 OX40 펩티드와 검출가능하게 반응하지 않았으며, 펩티드로 면역화한 마우스의 혈청은 적절한 펩티드와 결합하였다. 이러한 결과는, 이용된 검정 조건하에서는 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5가 인간 OX40 세포의 서열로부터의 이들 짧은 선형 에피토프에 검출가능하게 결합하지 않는다는 것을 나타낸다. 이러한 데이터는 이들 서열이 보다 긴 펩티드 서열에 포함되는 경우에 인간 항-인간 OX40 항체에 의해 인식되는 것을 제외하지 않는다.
- [0307] **실시예 4**
- [0308] 본 실시예는 인간 항-인간 OX40 모노클로날 항체의 생체내 기능적 분석을 기재한다.
- [0309] 급성 이종 이식편-대-숙주 질환 (XGVHD) 모델을 사용하여 112V8G1 인간 항-인간 OX40 항체의 생체내 치유 능력을 시험하였다 [Watanabe, et al., Clin Immunol 120:247-259 (2006)]. 상기 모델에서, 인간 말초혈 단핵 세포를 중증 합병형 면역결핍 (SCID) 마우스로 옮겼다. 옮기기 전에, 마우스에 항-IL2R β 쇄 항체를 처리하여 내인성 뮤린 천연 킬러 세포를 고갈시킨 후에 이것들에 준치사량의 방사선조사를 실시하여 인간 세포가 장관으로 이동되도록 하였다. 인간 T-세포가 증식하고 이식편-대-숙주 유사 질환을 유도하여, 체중 손실, 혈뇨, 복수증, 간 및 장관에서의 염증성 세포 침윤, 및 결국에는 사망을 야기하였다. 상기 질환은 주로 인간 T-세포에 의해 매개되며, 정제된 T-세포의 전달이 유사한 증상을 유도하는 것과 마찬가지이다.
- [0310] SCID 마우스에게 상기한 것에 112V8G1을 추가하여 처리하거나 또는 인간 IgG1 이소형 대조군 (항-DNP) 재조합 항체를 제0일에 투여하여 OX40 차단의 예방 가능성을 시험하였다. 상기 마우스에게는 100 μ g, 20 μ g 또는 2 μ g의 112V8G1 항체 또는 100 μ g의 항-DNP를 제0일에 정맥내 주사로 투여하였다. 3일 내지 4일마다 체중을 측정하였다. 제12일에 마우스를 죽여서, 질환의 증상에 대하여 분석하고 비장을 수거하여 유동 세포계측 분석을 실시하였다. 제12일에 관찰된 육안 병리를 설사 (0 내지 1), 장 및 복강에서의 출혈, 및 복막염 (각각 0 내지 5)으로 스코어링했고, 여기서 수치가 높을수록 질환이 보다 중증임을 나타낸다. 모든 질환 증상의 합을 이용하여 총 육안 병리 스코어를 결정하였다. 대조군 항체를 투여한 마우스는 모두가 XGVHD의 증상을 나타냈고, 112V8G1을 투여한 마우스보다 병리 스코어가 더 높았다. 112V8G1의 모든 시험 투여량은 이들 증상을 줄이거나 방지하였다 (도 7A).
- [0311] 비장 분석은 이러한 관찰과 일치하였다. 비장의 단일 세포 혼탁액을 인간 T-세포의 존재에 대하여 유동 세포계측으로 분석하였다. 인간 T-세포는 대조군 항체를 처리한 마우스의 비장에 존재하였지만, 112V8G1 처리 동물 중 인간 T-세포의 수가 대조군 동물에서의 T-세포 수보다 유의하게 더 적었다 (도 7B). 추가로, 혈청 중의 염증성 인간 사이토킨 (인터페론-감마, 종양 괴사 인자, 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자)을 멀티플렉스 기술로 측정하였다. 112V8G1 처리 동물에서의 염증성 인간 사이토킨은 대조군에 비해 줄어 있었다. 가장 커다란 영향은 인터페론 감마의 수준에 대한 것이었다 (도 7C). 동종이계 골수 이식 환자의 말초혈에서 OX40+ T-세포가 나타난 것은 만성 GVHD의 발병과 상관관계가 있었다 ([Gadisseur, et al., Bone Marrow Transplant 23(10):1013-7 (1999)], [Kotani, et al., Blood 98(10):3162-4 (2001)], [Sanchez, et al., Br J Haematol 126(5):697-703 (2004)]).
- [0312] 만성 GVHD의 치료시 OX40 차단의 효능을 평가하기 위해서 만성 이종 GVHD의 동물 모델 시스템을 수립하였다. 상기 모델은 전체 PBMC가 아니라 100만개의 정제된 CD4+ 세포를 SCID 마우스에게 주사하였다는 점을 제외하고는 급성 이종 GVHD 모델과 유사하였다. 방사선조사의 투여량도 2.12 Gy로 줄여서, 장 손상의 수준을 감소시켰다. 질환의 첫번째 증거는 모발 손실과 체중 손실, 및 이후의 사망이며, 이는 부분적으로는 폐로의 T-세포 침윤에 의한 것이다. 질환 증상은 제30일 정도에 명확해졌다. 5마리 마우스 군 각각에 1주 당 100 μ g, 20 μ g, 또는 2 μ g씩의 112V8G1 재조합 항체를 5주 동안 처리하거나, 또는 1주 당 100 μ g씩의 항-DNP hIgG1 대조군 항체를 5주 동안 처리하였다. 제7주에 살아있는 마우스를 분석하였다. 육안 병리 스코어를 모발 손실, 출혈, 및 복막염 (각각 0 내지 5) 및 설사 (0 내지 1)의 정도로 결정하였다.
- [0313] 관찰된 주요 병리는 모발 손실이었고, 112V8G1의 3가지 투여량 모두는 이러한 질환 증상을 대조군 처리된 마우스에 비해 감소시켰다 (도 8A). 이러한 관찰은 112V8G1 처리된 마우스의 비장에서 CD4 T-세포의 전달 후 제48일에 인간 T-세포가 감소하는 것과 일치하였다 (도 8B). 상기 모델에서, 대조군 동물에서는 인간 T-세포가 림프절로 이동하는 것이 쉽게 검출되지만, 항-OX40 처리 동물에서는 유의하게 줄어들거나 발견되지 않았다 (도 8C). 20 μ g 또는 100 μ g의 112V8G1로 처리한 동물에서는 림프절이 발견되지 않았음에 주목한다.
- [0314] 추가로, 급성 모델과는 달리, OX40 양성 세포는 대조군 처리된 마우스의 비장 및 림프절에서 쉽게 검출될 수 있

고, OX40+ 세포의 수는 112V8G1 처치 동물에서 줄어들었다 (도 8B 및 도 8C). 염증성 사이토킨은 인간 CD4 T-세포를 투여한 마우스의 혈청에서 검출되었고, 검출된 사이토킨의 양은 대조군 인간 IgG1에 비해 112V8G1 항-인간 OX40으로 처치한 마우스에서 줄어들었다. 이러한 질환 모델에서 생성되는 사이토킨으로는 인터류킨 2, 인터류킨 4, 인터류킨 6, 인터류킨 8, 인터류킨 10, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자, 인터페론 감마 및 종양 피사-인자 알파 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 인터류킨 6을 제외한 모든 사이토킨은 112V8G1 처치로 유의하게 줄어들었고, 이는 고갈 및/또는 차단에 의한 OX40 신호전달 억제의 소염 활성을 입증한다.

[0315] 112V8G4PE를 급성 XGVHD 모델에서 예방 요법으로 연구하였다. 상기 항체는 고갈시키는 활성을 나타내지 않았는데, 이는 보체를 고정시키거나 Fc 수용체를 결합하는 능력이 없기 때문이고, 따라서 질환의 방지는 OX40 신호전달의 차단 또는 OX40의 하향조정에 의존한다. 제0일에, 112V8G4PE 200 µg, 20 µg, 또는 2 µg의 단일 주사를 군당 5마리 마우스에게 투여하였다. 대조군 처치된 마우스에게는 제0일, 제3일 또는 제6일에 항-DNP 인간 IgG4 항체 200 µg를 투여하였다. 제12일에는 육안 병리 및 비장 중의 인간 T-세포 수에 대하여 마우스를 분석하였다 (도 9A 및 도 9B, 표 5). 제12일의 육안 병리를 설사, 복막 출혈 또는 복수, 및 장 출혈에 대하여 0 내지 3의 점수로 스코어링하였고, 병리가 관찰되지 않은 경우를 0으로 하고 중증도의 질환을 나타내는 경우를 3으로 하였다. 112V8G4PE 200 µg 및 20 µg 모두가 명백한 병리 발병을 방지하였지만, 2 µg의 투여량으로는 질환을 방지하기에 충분치 못하였다. 육안 병리의 정도는 제12일에 비장 중 인간 T-세포의 수와 상관관계가 있었다. 대조군 처치 동물과 비교할 때, 112V8G4PE 200 µg 또는 20 µg은 비장 중 인간 T-세포의 축적을 유의하게 감소시켰지만, 2 µg의 투여량은 효과가 없었다. 112V8G4PE (도 9A 및 9B) 및 112V8G1 (도 7)의 역가측정시에 관찰된 차이는 112V8G4PE 항체의 고갈시키는 활성을 결핍으로 인한 것일 수 있다.

[0316] OX40 신호전달 차단의 치유 효능을 시험하기 위해서, 112V8G4PE의 투여를 제3일 또는 제6일까지 지연시켰다. 인간 PBMC의 전달 후 제3일 또는 제6일에 마우스에게 200 µg의 112V8G4PE 또는 대조군 인간 IgG4 항체를 처치하였다. 제14일에는 육안 병리를 평가하였다. OX40 신호전달의 차단은, 대조군 항체 처치 동물에서 관찰된 질환의 수준에 비하여 112V8G4PE 항-인간 OX40 항체를 제3일 또는 제6일에 투여한 경우에 질환을 완화시켰다 (도 9C). 항-OX40 처치된 마우스의 비장 중 인간 T-세포의 수 역시 대조군 처치된 마우스에 비해 유의하게 감소되었다. 112V8G1 역시 제6일에 투여되는 경우에 질환을 감소시켰다. 이러한 데이터는 질환 병리를 감소시키기 위한 치유 접근법으로서 OX40 특이적 항체에 의한 OX40 차단의 효능을 입증한다.

[0317] 이식편-대-숙주 질환의 급성 및 만성 이종 모델 둘다에서 인간 항-인간 OX40 항체인 112V8은 대조군 처치 동물에 비해 질환 병리, 염증성 사이토킨의 생성, 및 비장 및 림프절 중 인간 T-세포의 수를 유의하게 감소시켰다. 이러한 데이터는 OX40 양성 세포를 직접 표적화하는 것이 T-세포-매개 질환의 방지 (예방) 및 완화 (치유)에 적합한 요법임을 입증한다. 112F32, 112Y55, 112Y131 및 112Z5를 사용한 한쪽 모델 또는 양쪽 모델 둘다에서 유사한 결과가 얻어졌다 (표 3).

[0318] 급성 GVHD 모델에서, CD4 및 CD8 인간 T-세포 모두가 질환에 필요하다. CD4 T-세포는 유도에 필요하며, CD8 T-세포는 대개의 발병을 매개한다. 상기한 인간 항-인간 OX40 항체 중 하나를 투여하여 질환이 방지되고 완화되는 것은 CD4 및 CD8 T-세포 둘다의 직접적인 길항작용으로 인한 것일 수도 있고, 또는 CD4 T-세포를 직접 차단하여 CD4의 도움을 줄임으로써 CD8 T-세포에 간접적인 영향을 미치기 때문일 수도 있다. 또한, OX40 항체는 조절 T-세포의 생성을 촉진시키거나 그 수를 증가시킬 수 있다. 어떠한 이론에도 얹매이고 싶지는 않지만, 이러한 메카니즘 중 하나 또는 모두가 질환의 완화를 매개할 수 있다는 것이 가능하다.

[0319] 어떠한 이론에도 얹매이고 싶지는 않지만, 이들 항-인간 OX40 항체의 잠재적인 작용 메카니즘은 천연 킬러 세포 또는 호중구 효과기 세포에 의한 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 유도하는 것이다. 이러한 과정은 활성화된 T-세포에서 발현된 OX40에 결합된 항-OX40 항체에 효과기 세포에 의해 발현된 Fc 수용체가 결합하는 능력에 의존적이다. 이뮤노글로불린이 Fc 수용체에 결합하는 능력은 항체의 하위부류 및 Fc 수용체의 유형에 의해 결정된다. 인간 IgG1 항체는 천연 킬러 세포 및 호중구상의 Fc 수용체에 결합하지만, 인간 IgG4 항체는 그렇지 않다 ([Huber, et al., Nature 229(5284):419-20 (1971)], [Brunhouse, et al., Mol Immunol 16(11):907-17 (1979)]). 인간 항-인간 OX40 항체 112F32 (IgG1), 112V8 (IgG1 및 IgG4PE), 112Y55 (IgG1), 112Y131 (IgG4) 및 112Z5 (IgG1)를, 인간 천연 킬러 세포에 의한 OX40 발현 표적 세포의 ADCC 매개 능력에 대하여 시험하였다.

[0320] 인간 항-인간 OX40 항체, 및 20개 효과기 세포:1개 표적 세포의 비율의 인간 천연 킬러 세포와 4시간 인큐베이션시킨 후에, 비-방사성 세포독성 검정을 이용하여 표적 세포의 특이적 용해율(%)을 결정하였다 (도 10). EL4-인간 OX40 표적 세포를 0.001 µg/mL 내지 10 µg/mL의 항-OX40 또는 음성 대조군 항체로 표지한 후에 인간 천연 킬러 세포와 인큐베이션시켰다. 표적 세포의 용해는 비-방사성 세포독성 검정에서 락토스 데히드로게나제

의 방출로 결정하였다. 특이적 용해율(%)은 방법에서 기재한 바와 같이 결정하였다. 인간 IgG1 항-인간 OX40 항체는 EL4-인간 OX40 표적 세포의 ADCC를 투여량-의존적 방식으로 유도하였다. 인간 IgG4 항-OX40 항체 및 대조군 인간 IgG1 항체는 표적 세포의 특이적 용해를 유도하지 않았다. 에피토프 군 B의 항체 (112V8 및 112Y5 5)가 둘다 군 A의 항체 (112F32) 및 군 C의 항체 (112Z5)보다 ADCC 활성이 더 높기 때문에, ADCC 활성의 수준은 상대적인 결합 친화도 및 에피토프 군과 상관관계가 있다.

[0321] 본원에 기재한 분석 결과는 소정 범위의 결합 친화도를 갖는 3종의 상이한 에피토프의 항체를 확인하고, OX40 리간드 결합을 차단하고 T-세포 매개 염증 반응을 방지하거나 완화시키는데 있어서의 이의 효능을 입증한다. 이를 인간 항-인간 OX40 항체 (112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 및 112Z5)가 증식, 질환 진행 및 염증성 사이토킨 생성을 감소시키는 능력은, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선, 크론병, 이식편-대-숙주 질환, 및 이식 거부를 포함하지만 이에 제한되지 않는 T-세포 매개 염증성 또는 자가면역 질환 치료를 위한 접근법으로서 OX40의 직접적인 차단 가능성을 입증한다. 항-OX40 항체의 고갈시키는 활성은 증식의 감소 또는 질환 완화에 필요하지 않으며, 이는 T-세포 고갈로 인한 잠재적인 해로운 효과를 감소시킬 수 있다.

참고문헌

- Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." *J Exp Med* **191**(2): 375-80.
- Al-Shamkhani, A., S. Mallett, et al. (1997). "Affinity and kinetics of the interaction between soluble trimeric OX40 ligand, a member of the tumor necrosis factor superfamily, and its receptor OX40 on activated T cells." *J Biol Chem* **272**(8): 5275-82.
- Alegre, M. L., A. M. Collins, et al. (1992). "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody." *J Immunol* **148**(11): 3461-8.
- Angal, S., D. J. King, et al. (1993). "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody." *Mol Immunol* **30**(1): 105-8.
- Bachmann, M. F., M. Barner, et al. (1999). "CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation." *J Exp Med* **190**(10): 1383-92.
- Bansal-Pakala, P., A. G. Jember, et al. (2001). "Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance." *Nat Med* **7**(8): 907-12.
- Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34." *Embo J* **13**(17): 3992-4001.
- Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Identification of OX40 ligand and preliminary characterization of its activities on OX40 receptor." *Circ Shock* **44**(1): 30-4.
- Blazar, B. R., A. H. Sharpe, et al. (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow-transplant recipients." *Blood* **101**(9): 3741-8.
- Brocke, T., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles." *Eur J Immunol* **29**(5): 1610-6.
- Brugnoni, D., A. Bettinardi, et al. (1998). "CD134/OX40 expression by synovial fluid CD4+ T lymphocytes in chronic synovitis." *Br J Rheumatol* **37**(5): 584-5.
- Brunhouse, R. and J. J. Cebra (1979). "Isotypes of IgG: comparison of the primary structures of three pairs of isotypes which differ in their ability to activate complement." *Mol Immunol* **16**(11): 907-17.
- Calderhead, D. M., J. E. Buhmann, et al. (1993). "Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions." *J Immunol* **151**(10): 5261-71.
- Cheung, T. C., I. R. Humphreys, et al. (2005). "Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(37): 13218-23.
- Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, et al. (2005). "Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the b1ba-hvem complex." *J Biol Chem*.
- Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4): 265-73.

- Croft, M. (2005). "The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA." *Trends Immunol* **26**(6): 292-4.
- Evans, D. E., R. A. Prell, et al. (2001). "Engagement of OX40 enhances antigen-specific CD4(+) T cell mobilization/memory development and humoral immunity: comparison of alphaOX-40 with alphaCTLA-4." *J Immunol* **167**(12): 6804-11.
- Gadisseur, A. P., J. W. Gratama, et al. (1999). "Expression of T cell activation antigen CD134 (OX40) has no predictive value for the occurrence or response to therapy of acute graft-versus-host disease in partial T cell-depleted bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* **23**(10): 1013-7.
- Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(4): 1116-21.
- Gramaglia, I., A. Jember, et al. (2000). "The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion." *J Immunol* **165**(6): 3043-50.
- Gramaglia, I., A. D. Weinberg, et al. (1998). "Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." *J Immunol* **161**(12): 6510-7.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." *Annu Rev Immunol* **16**: 111-35.
- Higgins, L. M., S. A. McDonald, et al. (1999). "Regulation of T cell activation *in vitro* and *in vivo* by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein." *J Immunol* **162**(1): 486-93.
- Huber, H., S. D. Douglas, et al. (1971). "IgG subclass specificity of human monocyte receptor sites." *Nature* **229**(5284): 419-20.
- Humphreys, I. R., G. Walzl, et al. (2003). "A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection." *J Exp Med* **198**(8): 1237-42.
- Imura, A., T. Hori, et al. (1996). "The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells." *J Exp Med* **183**(5): 2185-95.
- Imura, A., T. Hori, et al. (1997). "OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration." *Blood* **89**(8): 2951-8.
- Ishida and Lonberg (2000). *11th Antibody Engineering Meeting*.
- Kabat, e. a. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest. Fifth Edition*.
- Kaleeba, J. A., H. Offner, et al. (1998). "The OX-40 receptor provides a potent co-stimulatory signal capable of inducing encephalitogenicity in myelin-specific CD4+ T cells." *Int Immunopharmacol* **10**(4): 453-61.
- Kjaergaard, J., J. Tanaka, et al. (2000). "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." *Cancer Res* **60**(19): 5514-21.

- Kotani, A., T. Ishikawa, et al. (2001). "Correlation of peripheral blood OX40+(CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* **98**(10): 3162-4.
- Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2002). "Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin." *Nat Biotechnol* **20**(9): 889-94.
- Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2004). "Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle." *Nat Genet* **36**(7): 775-80.
- Lane, P. (2000). "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells." *J Exp Med* **191**(2): 201-6.
- Latza, U., H. Durkop, et al. (1994). "The human OX40 homolog: cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen." *Eur J Immunol* **24**(3): 677-83.
- Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." *J Exp Med* **173**(3): 721-30.
- Linton, P. J., B. Bautista, et al. (2003). "Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo." *J Exp Med* **197**(7): 875-83.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- Lonberg, N. and D. Huszar (1995). "Human antibodies from transgenic mice." *Int Rev Immunol* **13**(1): 65-93.
- Ma, B. Y., S. A. Mikolajczak, et al. (2005). "The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells." *Blood* **106**(6): 2002-10.
- Mallett, S., S. Fossum, et al. (1990). "Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor." *Embo J* **9**(4): 1063-8.
- Maxwell, J. R., C. Ruby, et al. (2002). "Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity." *J Immunol* **168**(9): 4372-81.
- Maxwell, J. R., A. Weinberg, et al. (2000). "Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion." *J Immunol* **164**(1): 107-12.
- Pakala, S. V., P. Bansal-Pakala, et al. (2004). "Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions." *Eur J Immunol* **34**(11): 3039-46.
- Paterson, D. J., W. A. Jefferies, et al. (1987). "Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts." *Mol Immunol* **24**(12): 1281-90.
- Rogers, P. R. and M. Croft (2000). "CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." *J Immunol* **164**(6): 2955-63.
- Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* **15**(3): 445-55.

- Salek-Ardakani, S. and M. Croft (2005). "Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134)." *Vaccine*.
- Sanchez, J., J. Casano, et al. (2004). "Kinetics of regulatory CD25high and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *Br J Haematol* **126**(5): 697-703.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* **6**(1): 90-8.
- Seko, Y., N. Takahashi, et al. (1999). "Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L, and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3." *J Pathol* **188**(4): 423-30.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* **2**(2): 116-26.
- Stuber, E., M. Neurath, et al. (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B' cells." *Immunity* **2**(5): 507-21.
- Sugamura, K., N. Ishii, et al. (2004). "Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 420-31.
- Takasawa, N., N. Ishii, et al. (2001). "Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones." *Jpn J Cancer Res* **92**(4): 377-82.
- Tanaka, T., F. Kitamura, et al. (1993). "Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice." *J Exp Med* **178**(3): 1103-7.
- Taylor, L., M. Bachler, et al. (2002). "In vitro and in vivo activities of OX40 (CD134)-IgG fusion protein isoforms with different levels of immune-effector functions." *J Leukoc Biol* **72**(3): 522-9.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(4): 1333-7.
- Title, T. V., A. D. Weinberg, et al. (1997). "Expression of the T-cell activation antigen, OX-40, identifies alloreactive T cells in acute graft-versus-host disease." *Blood* **89**(12): 4652-8.
- Totsuka, T., T. Kanai, et al. (2003). "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(4): G595-603.
- Tsukada, N., H. Akiba, et al. (2000). "Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **95**(7): 2434-9.
- Ukyo, N., T. Hori, et al. (2003). "Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response." *Immunology* **109**(2): 226-31.
- Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers." *J Exp Med* **190**(8): 1115-22.

[0325]

- Watanabe, T., J. Masuyama, et al. (2006). "CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells." *Clin Immunol* **120**:247-259.
- Weatherill, A. R., J. R. Maxwell, et al. (2001). "OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells in vivo." *Cell Immunol* **209**(1): 63-75.
- Weinberg, A. D. (2002). "OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines." *Trends Immunol* **23**(2): 102-9.
- Weinberg, A. D., M. Lemón, et al. (1996). "OX-40 antibody enhances for autoantigen specific V beta 8.2+ T cells within the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* **43**(1): 42-9.
- Weinberg, A. D., K. W. Wegmann, et al. (1999). "Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction *in vitro* and *in vivo* leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis." *J Immunol* **162**(3): 1818-26.
- Zingoni, A., T. Sornasse, et al. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." *J Immunol* **173**(6): 3716-24.

WO 95/12673
WO 95/21251

[0326]

도면의 간단한 설명

[0036]

도 1A 내지 도 1F: 인간 항-인간 OX40 항체를 사용한 유동 세포계측 분석. A: PHA 및 IL2를 사용하여 3일 동안 자극한 후, 인간 CD4 T-세포의 전방 산란 vs. 측방 산란 프로파일. B 내지 F: 인간 항-인간 OX40 항체로 표지된 활성화된 인간 T-세포 또는 대조군. 굵은 선은 활성화된 게이트에서의 세포 염색을 나타내고, 가는 선은 휴

지기의 게이트에서의 세포를 나타낸다. 이소형 대조군 IgG 항체에 의한 활성화된 세포의 표지는 히스토그램에서 점선으로 표시하였다. B: 112F32, C: 112V8, D: 112Y55, E: 112Y131, 및 F: 112Z5.

[0037] 도 2: 인간 항-인간 OX40 모노클로날 항체에 의한 활성화된 인간 T-세포의 염색. 나타낸 기하 평균 형광 강도 데이터는 도 1A에 도시한 것과 유사한 활성화된 T-세포 게이트로부터 유도한 것이다. 이러한 데이터를 사용하여 표 3에 나타낸 KD 및 BMAX를 결정하였다.

[0038] 도 3A 및 3B: OX40과의 결합에 대한, 5종의 OX40 항체의 경쟁. A: 코팅된 항체에 대한 hOX40:mFc 결합의 억제율(%) - 항-마우스 IgG-HRP로 검출. B: 마우스 항체에 대한 hOX40:hFc 결합의 억제율(%) - 양의 항-인간 IgG-HRP로 검출. 음의 값은 나타내지 않았다.

[0039] 도 4A 및 4B: OX40과의 결합에 대한, 5종의 OX40 항체의 경쟁. A: 차단 항체 및 바이오티닐화 항-OX40 항체로 염색된 활성화된 T-세포의 억제율(%) - SA-PE로 검출. B: 마우스 항-인간 OX40 항체 및 바이오티닐화 항-OX40 항체로 표지된 활성화된 T-세포의 억제율(%) - SA-PE로 검출. 음의 값은 나타내지 않았다.

[0040] 도 5A 및 5B: 인간 항-인간 OX40 모노클로날 항체에 의한, OX40에 대한 OX40L 결합의 차단 - ELISA 및 유동 세포계측으로 측정. A: 리간드 결합의 억제율(%) - ELISA에 의해 항-FLAG-HRP 2차 항체로 검출. B: OX40L 결합의 억제율(%) - 유동 세포계측에 의해 항-FLAG-PE 항체로 검출.

[0041] 도 6A 내지 6C: 패널 A 내지 패널 C는 3종의 상이한 공여자 쌍을 사용한 3가지 연구를 나타내고, T-세포 증식에 항-OX40 항체가 미치는 효과를 도시한다.

[0042] 도 7A 내지 7C: 항체 112V8G1 재조합 항체에 의한, 급성 이종 이식편-대-숙주 질환의 완화. A: 총 육안 병리(gross pathology) 스코어. B: 비장의 단일 세포 혼탁액을 인간 T-세포의 존재에 대하여 유동 세포계측으로 분석함. 각 치치군 중 각 집단의 T-세포 평균 수 및 표준 편차를 나타내었다. C: 마우스의 혈청에서 측정한 인간 인터페론 감마. 각 군의 마우스에 대한 인터페론 감마의 평균량 (pg/mL) 및 표준 편차를 나타내었다.

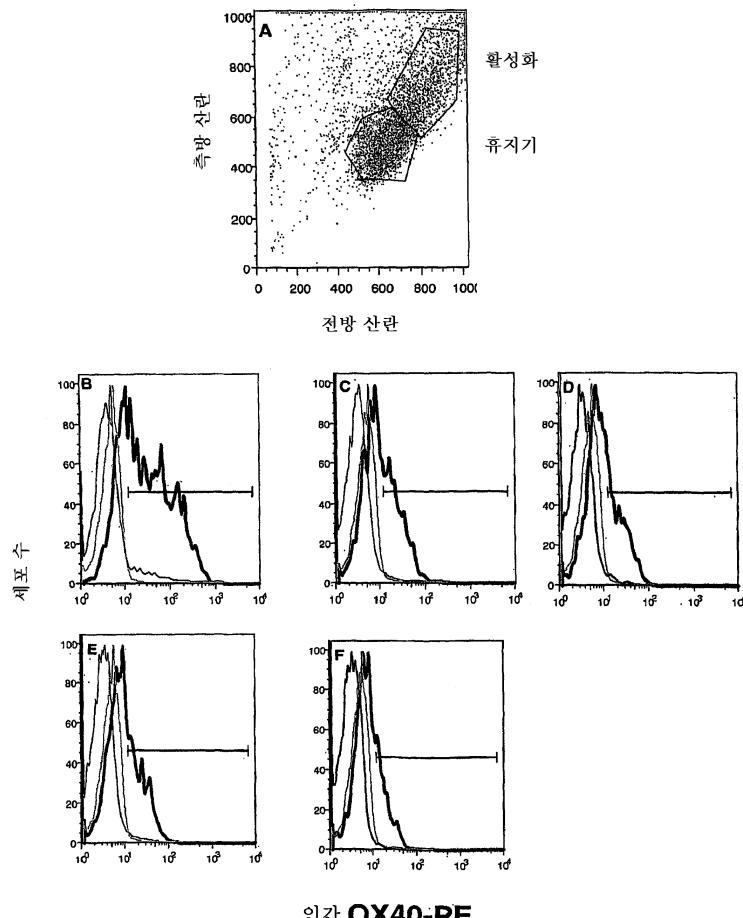
[0043] 도 8A 내지 8C: 항체 112V8G1에 의한, 만성 이종 이식편-대-숙주 질환의 완화. A: 개개의 마우스의 총 육안 병리 스코어. B: 마우스 비장 중 인간 T-세포의 평균 수 및 표준 편차 - 유동 세포계측으로 결정. C: CD4 T-세포의 전달 후 제48일에 SCID 마우스의 말초 림프절 중 인간 T-세포의 평균 수.

[0044] 도 9A 내지 9C: 제0일, 제3일 또는 제6일 투여시 항체 112V8G4PE에 의한 급성 이종 이식편-대-숙주 질환의 완화. A: 제0일에 처치한 개개의 마우스의 총 육안 병리 스코어. B: 제0일에 처치한 마우스에서 제12일에 비장 중 인간 T-세포의 평균 수 및 상기 군의 표준 편차. C: 제3일 또는 제6일에 처치한 개개의 마우스의 총 육안 병리 스코어.

[0045] 도 10: 항-인간 OX40 인간 IgG1 항체에 의한 특이적 용해율(%). 항-인간 OX40 인간 IgG1 항체는 EL4-인간 OX40 표적의 ADCC를 매개한다.

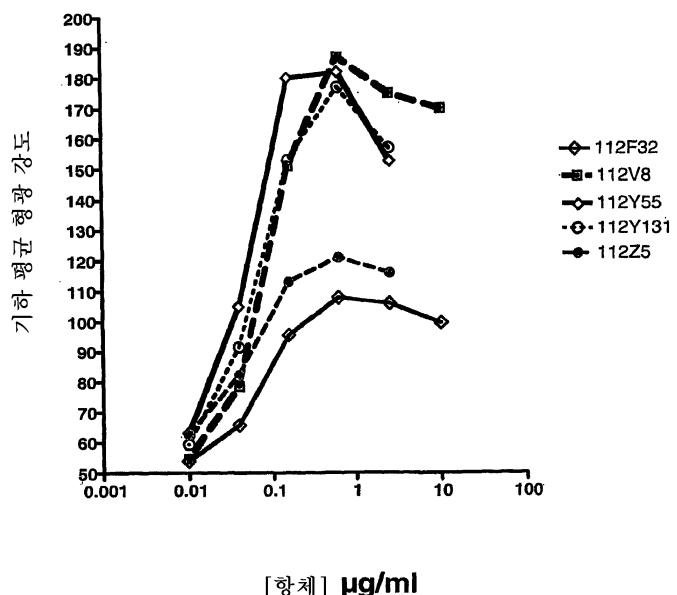
도면

도면1

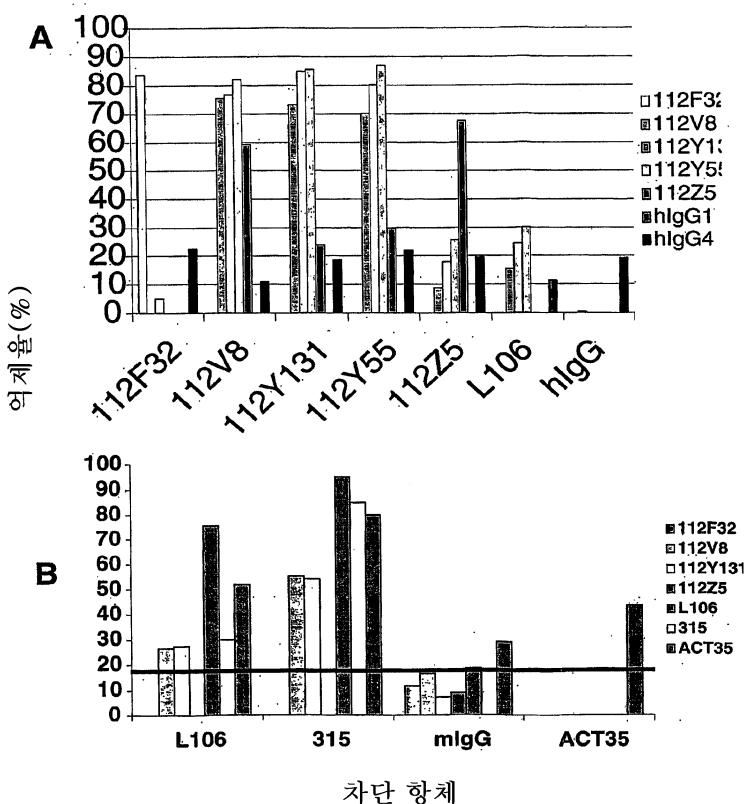


인간 OX40-PE

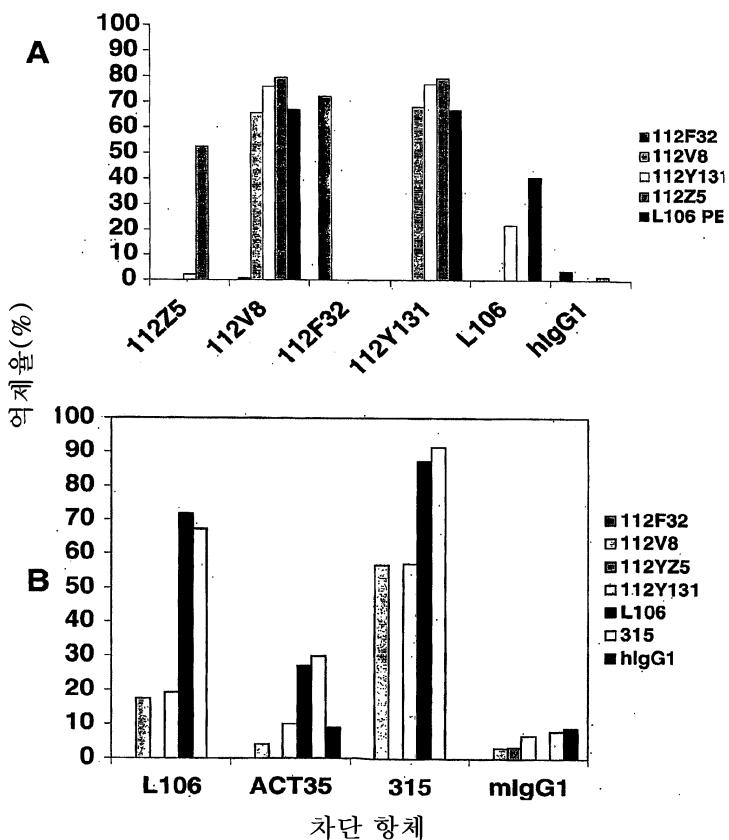
도면2



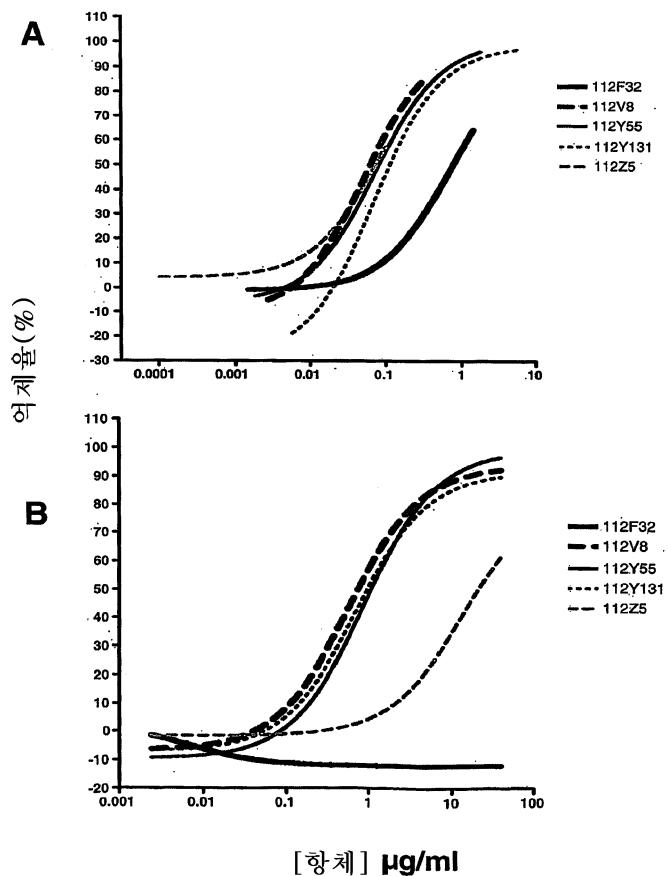
도면3



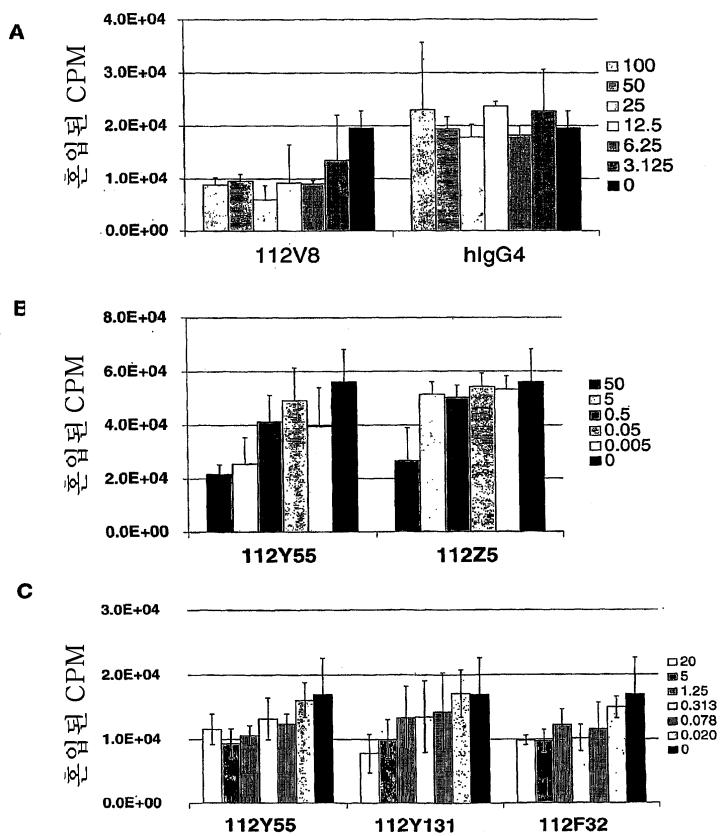
도면4



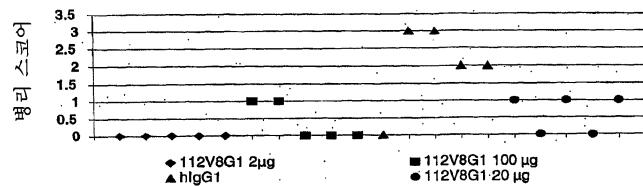
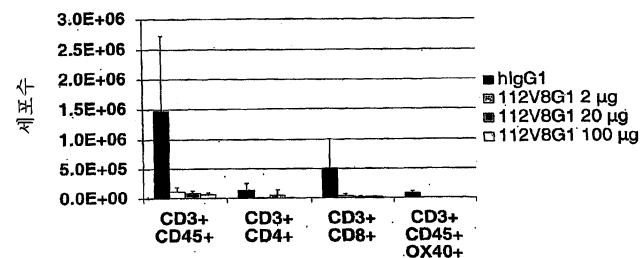
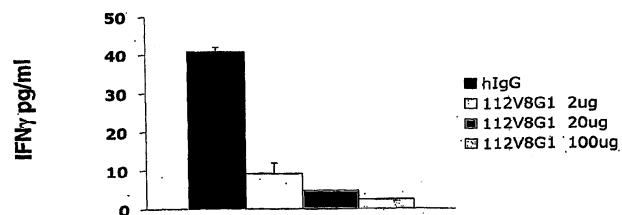
도면5



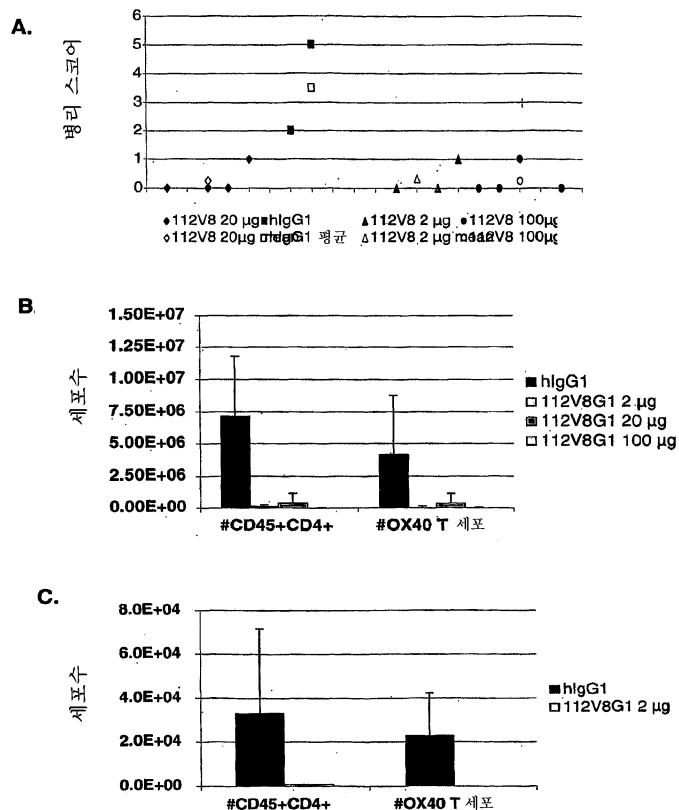
도면6



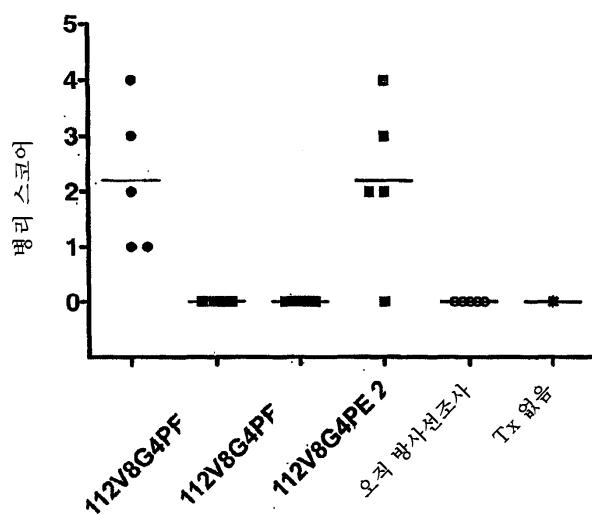
도면7

A.**B.****C.**

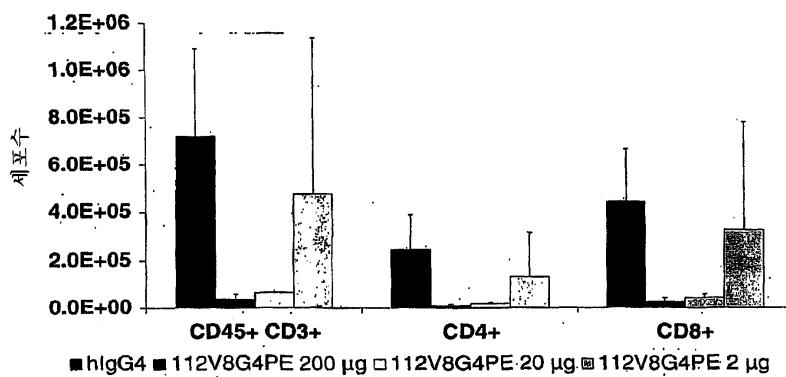
도면8



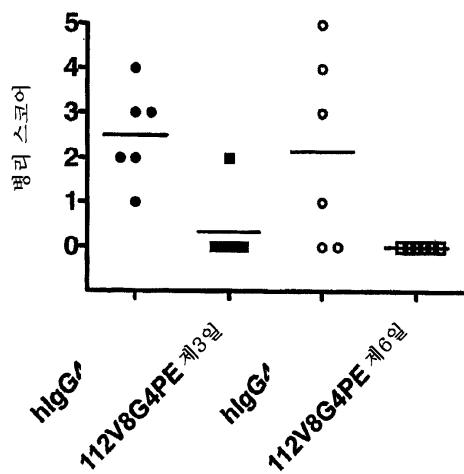
도면9A



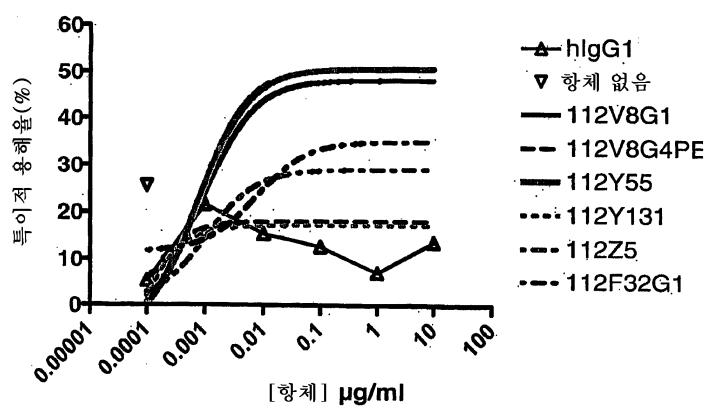
도면9B



도면9C



도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN PHARMA KABUSHIKI KAISHA

KATO, SHINICHIRO

SOLOFF NUGENT, RACHEL

YOSHIDA, HITISHI

CROFT, MICHAEL

<120> HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY HUMAN CD134 (OX40) AND METHODS OF
MAKING AND USING SAME

<130> 021286-0368859

<140> TO BE ASSIGNED

<141> HEREWITH

<150> PCT/US2006/045522

<151> 2006-11-27

<150> 60/739,659

<151> 2005-11-25

<160> 54

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1302

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtgcgtgg gggctcgccg gctgggccgc gggccgtgtg cggctctgct cctcctggc 60

ctggggctga gcaccgtgac gggctccac tgtgtcgaaa acacctaccc cagcaacgac 120

cggtgctgcc acgagtgcag gccaggcaac gggatggtga gccgctgcag ccgcctccag 180

aacacggtgt gccgtccgtg cggccgggc ttctacaacg acgtggtcag ctccaagccg 240

tgcaagccct gcacgtggtg taacctcaga agtgggagtg agcggaaagca gctgtgcacg 300

gccacacagg acacagtctg ccgctgccgg gcgggcaccc agcccctgga cagctacaag 360
 cctggagttt actgtcccc ctgcctcca gggcacttct ccccaggcgta caaccaggcc 420
 tgcaagccct ggaccaactg caccttggtt gggaaagcaca ccctgcagcc ggccagcaat 480
 agctcggacg caatctgtga ggacagggac cccccagccca cgccagcccc ggagacccag 540
 ggccccccgg ccaggcccat cactgtccag cccactgaag cctggccag aacctcacag 600
 ggaccctcca gatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc 660
 ctggggggac cgtcagtctt cctttcccc caaaaaccca aggacacct catgatctcc 720
 cggaccctcg aggtcacatg cgtgggttg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 780
 ttcaactggc acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaagcc gcgggaggag 840
 cagtcacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccc tccgtcacca ggactggctg 900
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccgcccc catcgagaaa 960
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc 1020
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1080
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1140
 cctccgtgc tggactccga cggctccttc ttcccttaca gcaagctcac cgtggacaag 1200
 agcaggtggc agcagggaa cgtttctca tgctccgtga tgcattggc tctgcacaac 1260
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1302

<210> 2
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Cys	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ala	Leu
1				5			10					15			

Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Val
							20					25			30

Gly	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asn	Asp	Arg	Cys	Cys	His	Glu	Cys	Arg	Pro
						35					40			45	

Gly	Asn	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Cys
					50			55			60				

Arg	Pro	Cys	Gly	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Asp	Val	Val	Ser	Ser	Lys	Pro
65					70			75			80				

Cys	Lys	Pro	Cys	Thr	Trp	Cys	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Lys
					85			90			95				

Gln	Leu	Cys	Thr	Ala	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly
					100			105			110				

Thr	Gln	Pro	Leu	Asp	Ser	Tyr	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Cys	Ala	Pro	Cys
					115			120			125				

Pro	Pro	Gly	His	Phe	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Gln	Ala	Cys	Lys	Pro	Trp
						130			135			140			

Thr	Asn	Cys	Thr	Leu	Ala	Gly	Lys	His	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Asn
					145			150			155			160	

Ser	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Glu	Asp	Arg	Asp	Asp	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro
					165			170			175					

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Arg Ser Cys Asp Lys
 195 200 205

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 210 215 220

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 225 230 235 240

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 245 250 255

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 260 265 270

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 275 280 285

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 290 295 300

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 305 310 315 320

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 325 330 335

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 340 345 350

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 355 360 365

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

370 375 380

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 385 390 395 400

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 405 410 415

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 420 425 430

Lys

<210> 3
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atggagtggg gcccgctg gttttcctt gttgttattt tagaaggtgt ccagtgtggg 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctg gtacagcctg ggggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatagcatga actgggtccg ccaggctcca 180

ggaaaggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagta gtagtaccat atactatgca 240

gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actgtatctg 300

caaataaca gcctgagaga cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggagtgtat 360

cacaatggct ggtccttctt tgactactgg ggccaggaa ccctactcac cgtctcctca 420

<210> 4
 <211> 390
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
atggacatga gggcctcgcc tagctcctg gggctcctgc tgctctgtt cccaggtgcc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagtccccatcctactgt ctgcattgtt aggaaacaga 120

gtcaccatta ctgtcgccg gagtcaggat attagcagct gtttagcctg gtatcagcag 180

aaaccagaga aagcccctaa gtcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtgggtc 240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagattca ctctcaccat cagcagcctg 300

cagcctgaag atttgcaac ttattactgc caacagtata atagttaccc cttcaccc 360

ggccaaggga cacgactgga gattaaacga 390

<210> 5
<211> 423
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
atggacacac tttgctccac gtcctgctg ctgaccatcc cttcatgggt cttgtcccag 60

atcaccttga aggagtctgg tcctacgcta gtgaagccca aacagacct cacgctgacc 120

tgcaccccttct ctggattctc actcagcaact agtggaatgg gtgtggctg gatccgtcag 180

cccccaggaa aggcctgga gtggcttgca gtcatttatt gggatgtca tcaactctac 240

agtccatctc tgaagagcag gtcaccatc accaaggaca cttccaaaaa ccagggtggc 300

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacat attactgtgc acacagacga 360

ggggccttcc agcactgggg ccagggcacc ctggtcaccg ttcctcagc ttccaccaag 420

ggc 423

<210> 6
<211> 387
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6	
atggaaaccc cagcgcagct tctttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga	60
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcaccca gcagggccac tggcatccca	240
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag	300
cctgaagatt ttgcagtgtt tactgttag cagtatgata gctcgctcac tttggcgga	360
gggaccaagg tggagatcaa acgaact	387

<210> 7	
<211> 140	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	

<400> 7

Met Glu Trp Gly Pro Cys Trp Val Phe Leu Val Val Ile Leu Glu Gly			
1	5	10	15

Val Gln Cys Gly Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln		
20	25	30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala			
65	70	75	80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Tyr His Asn Gly Trp Ser Phe Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 8
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asn Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg
 130

<210> 9
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Asp Thr Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Lys Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Val Ile Tyr Trp Asp Asp His Gln Leu Tyr
 65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala His Arg Arg Gly Ala Phe Gln His Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

<210> 10
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Asp Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115

120

125

Thr

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 11
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 12
tcttgccac ctgggtttg ctgggcttgt g 31

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 13
aggcacacaa cagaggcagt tccagattc 30

<210> 14
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 14

gtaaaaacgac ggccagtg

18

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 15

cagggaaacag ctagac

17

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 16

gagagagaga gctagctgag gagacggta ccagggt

37

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 17

agagagagag gtcgaccacc atggacacac tttgctccac g

41

<210> 18
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 18
agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc 42

<210> 19
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 19
agagagagag cgtacgtttgc atctccacct tggccctcc 40

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 20
gctggagggc acggcacca cgctg 25

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 21

gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc

26

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 22
accgtgtcga ctggattcca aggcatttcc ac 32

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 23
ggtgcttagct gaggagacgg tgac 24

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 24
aatcaagatc tgtcaggaca ca 22

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 25
tatcccgtagtac gtttaatctc cagtcgtgtc 30

<210> 26
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 26
agagagagag gtcgaccacc atggacacac tttgctccac g 41

<210> 27
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 27
agagagagag gctagctgaa gagacggta ccattgt 37

<210> 28
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 28
agagagagag gtcgaccacc atggaaaccc cagcgcagct t 41

<210> 29
<211> 40
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 29

agagagagag cgtacgttt attccacct tggcccttg

40

<210> 30

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 30

agagagagag gtgcaccacc atggacacac tttgctccac g

41

<210> 31

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 31

agagagagag gctagctgaa gagacggta ccattgt

37

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 32

agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc

42

<210> 33
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 33
agagagagag cgtacgttt attccacct tggtcccctg 40

<210> 34
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 34
agagagagag gtgcaccacc atgaccatga ttacgccaag c 41

<210> 35
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 35
gagagagaga gcttagctgag gagacggta ccagggt 37

<210> 36
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 36

agagagagag atctctcacc atggaagccc cagctcagct tc 42

<210> 37
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 37
agagagagag cgtacgttta atctccagtc gtgtcccttg 40

<210> 38
<211> 408
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
atggacacac tttgctccac gtcctgctg ctgaccatcc cttcatgggt cttgtccag 60

atcaccttga aggagtctgg tcctacgctg gtgaaaccca cacagacct cacgctgtcc 120

tgcaccttct ctgggttctc actcagcaact agtggagtggt gtgtggctg gatccgtcag 180

cccccaggaa aggccctgga atggcttgca ctcattcatt gggatgatgc tgagcgctac 240

agtccatctc tgaagagcag gtcaccatc accaaggaca cctccaaaaa ccagggtggc 300

cttacaatga ccaacatgga ctttgtggac acagccacat attactgtgc acacacccgg 360

ggggcttttg atatctgggg ccaaggaca atggtcaccg tctttca 408

<210> 39
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
atgaaaaccc cagcgcagct tctttcctc ctgctactct ggctccaga taccaccgga 60

gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgttttg ctccagggga aagagccatc 120
 ctctcctgca gggcagtc gagtgtagc agcagttct tagcctggta ccaacagaaa 180
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgeattta gcagggccac tggcatccca 240
 gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttactc tcaccatcg cagactggag 300
 cctgaagatt ttgcagtgtt tactgttag cagtatgata gtcacggac gttcgccag 360
 gggaccaagg tgaaatcaa a 381

<210> 40
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 atggacacac tttgtccac gtcctgctg ctgaccatcc ttcatgggt cttgtcccag 60
 atcaccttga aggagtctgg tcctacgctg gtgaaaccca cacagaccct cacgctgacc 120
 tgcaccccttct ctggattctc actcagcact agtggagttgg gtgtggctg gatccgttag 180
 cccccaggaa aggcctgga gtggcttgca ctcatttatt gggatgatca tagcccctac 240
 agcccatctc tgaagagcag gtcaccatc accaaggaca cctccaaaaa ccaggtggc 300
 cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacat attactgtgc acgcacccgg 360
 gggcttttgg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctttca 408

<210> 41
 <211> 401
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41

atggaagccc cagcgcagct tctttccctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaatttgt tgacacagtc tccagccacc ctgtttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctccgtca gggccagtca gggtagttagc agctacttag cctggtagcc gcagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctct catctatgt gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtgcagttggcc tggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagattttgcagtttata ctgtcagcag cgttagaact ggcattcgac gttcgccaa 360

gggaccaagg tgaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat c 401

<210> 42

<211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

atgaccatgttacgccaag ctttgttaccg agctcgatc cactagtaac ggccgccagt 60

tgcttggaaat tcgccttct aatacgactc actataggc aagcagtggatcaacgcag 120

agtacggggg gaggcttgggt acagcctggc aggtccctga gactctcctg tgcaaggctct 180

ggattcaccc ttgtatgatta tggcatgcac tgggtccggc aagctccagg gaaggccctg 240

gagtgggtct caggtattatgttggaaatagt gatagtatag gctatgtgga ctctgtgaag 300

ggccgattca ccatctccag agacaacgcc aagaactccc tgtatctgca aatgaacagt 360

ctgagagtttggc accacacggc cttgttattac tgtgtaaaatgttgg ctggtagc 420

tttgcacttggc aaccctggc accgtctccttca 462

<210> 43

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43
atggaagccc cagctcagct tctttccctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtttgtt ctccaggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctct catctatgt gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtgc cagtggttc tggacagac ttcaactca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagattttgc agtttata ctgtcagcag cgttagcaact ggccgatcac cttcgccaa 360

gggacacgac tggagattaa a 381

<210> 44
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met	Asp	Thr	Leu	Cys	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Ile	Pro	Ser	Trp
1															

Val	Leu	Ser	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Lys
20															

Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
35															

Ser	Thr	Ser	Gly	Val	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
50															

Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	His	Trp	Asp	Asp	Ala	Glu	Arg	Tyr
65															

Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Leu Val Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala His Thr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 45
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

85	90	95
----	----	----

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Asp Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 46
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Met Asp Thr Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp His Ser Pro Tyr
 65 70 75 80

Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

115

120

125

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 47
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp His Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 48

<211> 154
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp Pro Leu Val
1 5 10 15

Thr Ala Ala Ser Val Leu Glu Phe Ala Leu Leu Ile Arg Leu Thr Ile
20 25 30

Gly Gln Ala Val Val Ser Thr Gln Ser Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
35 40 45

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
50 55 60

Asp Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
65 70 75 80

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Val
85 90 95

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
100 105 110

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu
115 120 125

Tyr Tyr Cys Val Lys Asp Ile Ser Gly Trp Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
145 150

<210> 49

<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 50
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu

195

200

205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 51
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Cys	Lys	Pro	Cys
Thr	Trp	Cys	Asn
85		90	
Leu			Arg
			Ser
			Gly
			Ser
			Glu
			Arg
			Lys

Gln	Leu	Cys	Thr
Ala	Thr	Gln	Asp
100		105	
			Thr
			Val
			Cys
			Arg
			Cys
			Arg
			Ala
			Gly

Thr	Gln	Pro	Leu
Asp	Ser	Tyr	Lys
115		120	
			Pro
			Gly
			Val
			Asp
			Cys
			Ala
			Pro
			Cys

Pro	Pro	Gly	His
Phe	Ser	Pro	Gly
130		135	
			Asp
			Asn
			Gln
			Ala
			Cys
			Lys
			Pro
			Trp

Thr	Asn	Cys	Thr
Leu	Ala	Gly	Lys
145		150	
			His
			Thr
			Leu
			Gln
			Pro
			Ala
			Ser
			Asn

Ser	Ser	Asp	Ala
Ile	Cys	Glu	Asp
165		170	
			Arg
			Asp
			Pro
			Pro
			Ala
			Thr
			Gln
			Pro

Gln	Glu	Thr	Gln
Gly	Pro	Pro	Ala
180		185	
			Arg
			Pro
			Ile
			Thr
			Val
			Gln
			Pro
			Thr

Glu	Ala	Trp	Pro
Arg	Ser	Gly	Arg
195		200	
			Thr
			Ser

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg	Pro	Ala	Gly
Pro	Gly	Phe	Tyr
1		5	
			Asn
			Asp
			Val
			Val
			Ser
			Ser
			Lys
			Pro

Cys

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys
1 5 10 15

<210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala
1 5 10 15

Ile Cys