

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0019797
(43) 공개일자 2024년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-7000219

(22) 출원일자(국제) 2022년06월09일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년01월03일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/097889

(87) 국제공개번호 WO 2022/258015
국제공개일자 2022년12월15일

(30) 우선권주장
PCT/CN2021/099228 2021년06월09일 중국(CN)

(71) 출원인
상하이 에피맵 바이오테라퓨틱스 컴퍼니, 리미티드
중국, 상하이 201112, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

(72) 발명자
공 시용
중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

리 바오쿤
중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인한얼

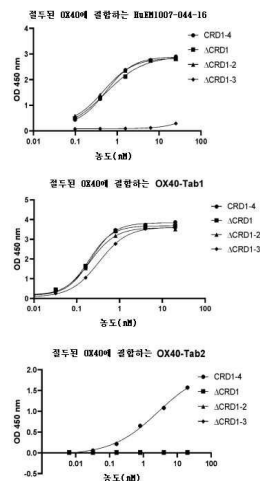
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 OX40 및/또는 PD-L1에 결합하는 항체 및 이중특이적 결합 단백질

(57) 요약

TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 OX40을 인식하는 신규 항체, 세포예정사-리간드 1(PD-L1)을 인식하는 신규 항체, 및 이들 항체를 사용하여 제조된 FIT-Ig 결합 단백질과 같은 이중특이적 OX40/PD-L1 결합 단백질을 제공한다. 항체 및 이중특이적 결합 단백질은 암과 같은 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)
C07K 2317/64 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

리우 판

중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

우 쉹빈

중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

우 쑤언

중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

장 루이

중국, 상하이 201210, 푸둥 뉴 디스트릭트, 4560
진케 로드, 빌딩 2, 6 플로어

명세서

청구범위

청구항 1

OX40에 특이적으로 결합하고, 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 분리된 항체(isolated antibody) 또는 이의 항원-결합 단편(antigen-binding fragment)으로서, 여기서:

CDR-H1이 SSWMN(서열번호 1)의 서열을 포함하고;

CDR-H2가 RIYPGDEITNYNGKFKD(서열번호 2) 또는 RIYPGDEITNYNAKFKD(서열번호 4)의 서열을 포함하고;

CDR-H3이 DLLMPY(서열번호 3)의 서열을 포함하고;

CDR-L1이 RSSKSLLYSNGITYLY(서열번호 5) 또는 RSSKSLLYSNAITYLY(서열번호 8)의 서열을 포함하고;

CDR-L2가 QMSNLAP(서열번호 6)의 서열을 포함하고;

CDR-L3이 AQNLELPFT(서열번호 7)의 서열을 포함하고,

임의로, CDR이 카바트 넘버링(Kabat numbering)에 따라 정의되는, 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체가 가변 중쇄 도메인 VH 및 가변 경쇄 도메인 VL을 포함하며, 여기서:

VH 도메인이 서열번호 9 또는 10의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하고/하거나

VL 도메인이 서열번호 17 또는 18의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는

VH 도메인이 서열번호 11-16 중 어느 하나로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고/하거나

VL 도메인이 서열번호 19-21 중 어느 하나로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는

분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서,

항체가 키메라(chimeric) 또는 인간화 항체이고, 임의로 항체가 인간화 항체이고,

추가로 임의로, 항체의 VH 도메인이 카바트 넘버링에 따른 아미노산 잔기 1E, 및 5Q, 27H, 28A, 38K, 40R, 43K, 48I, 67K, 68A, 70L로부터 선택된 1 내지 10개의 잔기, 예를 들어 10개의 잔기를 포함하고, VL 도메인이 카바트 넘버링에 따른 아미노산 잔기 69G 또는 69S, 예를 들어 69S를 포함하는, 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

항체가

조합	VH 서열	VL 서열
1	서열번호 11	서열번호 19
2	서열번호 12	서열번호 19
3	서열번호 13	서열번호 19
4	서열번호 14	서열번호 19
5	서열번호 11	서열번호 20
6	서열번호 12	서열번호 20
7	서열번호 13	서열번호 20
8	서열번호 14	서열번호 20
9	서열번호 10	서열번호 17
10	서열번호 9	서열번호 18
11	서열번호 10	서열번호 18
12	서열번호 9	서열번호 19
13	서열번호 11	서열번호 17
14	서열번호 15	서열번호 21
15	서열번호 15	서열번호 18
16	서열번호 16	서열번호 21
17	서열번호 16	서열번호 18

로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 VH 및 VL 서열의 조합을 포함하고, 임의로 항체가 서열번호 16의 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 하기의 특징 중 하나 이상을 갖는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

(i) OX40-발현 세포(예를 들어, OX40-발현 T 세포)의 세포 표면에 결합 시, OX40+ 세포에 대해 강한 결합 효능을 나타내고, 여기서 상기 세포 결합 효능이, 세포-기반 분석(cell-based assay)에서 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 측정 시, 약 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 EC50에 의해 반영됨;

(ii) 항체가 OX40의 세포외 도메인의 CRD3에서 인간 OX40에 결합함;

(iii) OX40에 대한 항체의 결합이 T 세포의 항-종양 면역성(anti-tumor immunity), 예를 들어 감소된 종양 부담/성장/세포 확대를 유도하고, 임의로 여기서 상기 항-종양 면역성이 항-종양 세포독성 및 항-종양 사이토카인의 분비를 포함함.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 서열번호 44의 아미노산 서열을 갖는 Fc 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 융합물(fusion) 또는 접합체(conjugate).

청구항 8

PD-L1에 특이적으로 결합하고, 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서:

CDR-H1이 TYGIN(서열번호 22)의 서열을 포함하고;

CDR-H2가 YIYIGNAYTEYNEKFKG(서열번호 23) 또는 YIYIGNGYTEYNEKFKG(서열번호 25)의 서열을 포함하고;

CDR-H3이 DLMVIAPKTMDY(서열번호 24)의 서열을 포함하고;

CDR-L1이 KASQDVGTA(서열번호 26)의 서열을 포함하고;

CDR-L2가 WASTRHT(서열번호 27)의 서열을 포함하고;

CDR-L3이 QQYSSYPYT(서열번호 28)의 서열을 포함하고,

임의로, 여기서 CDR이 카바트 넘버링에 따라 정의되는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서,

항체가 가변 중쇄 도메인 VH 및 가변 경쇄 도메인 VL을 포함하며, 여기서:

VH 도메인이 서열번호 29의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고/하거나 VL 도메인이 서열번호 32의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나; 또는

VH 도메인이 서열번호 30 또는 31 중 어느 하나로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고/하거나 VL 도메인이 서열번호 33 또는 34 중 어느 하나로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제8항에 있어서,

항체가 키메라 또는 인간화 항체이고, 임의로 항체가 인간화 항체인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 서열번호 44의 아미노산 서열을 갖는 Fc 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 용합물 또는 접합체.

청구항 13

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화(encoding)하는 핵산 분자.

청구항 14

제13항의 핵산 분자를 포함하는 벡터(vector).

청구항 15

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자를 발현하는 숙주 세포.

청구항 16

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제7항 및 제12항의 융합물 또는 접합체, 제13항의 핵산 분자, 제14항의 벡터, 또는 제15항의 숙주 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

생물학적 샘플에서 OX40을 검출하는 방법으로서, 생물학적 샘플을 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 제7항의 융합물 또는 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

생물학적 샘플에서 PD-L1을 검출하는 방법으로서, 생물학적 샘플을 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 제12항의 융합물 또는 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

OX40 및 PD-L1에 특이적으로 결합하고, OX40에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위, 및 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 부위를 포함하는 이중특이적(bispecific) 결합 단백질로서, 여기서

제1 항원-결합 부위가 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고, 여기서:

CDR-H1이 SSWMN(서열번호 1)의 서열을 포함하고;

CDR-H2가 RIYPGDEITNYNGKFKD(서열번호 2) 또는 RIYPGDEITNYNAKFKD(서열번호 4)의 서열을 포함하고;

CDR-H3이 DLLMPY(서열번호 3)의 서열을 포함하고;

CDR-L1이 RSSKSLLYSNGITYLY(서열번호 5) 또는 RSSKSLLYSNAITYLY(서열번호 8)의 서열을 포함하고;

CDR-L2가 QMSNLAP(서열번호 6)의 서열을 포함하고;

CDR-L3이 AQNLELPFT(서열번호 7)의 서열을 포함하고,

임의로, 제1 항원-결합 부위가 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하고; 및/또는

제2 항원-결합 부위가 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고, 여기서:

CDR-H1이 TYGIN(서열번호 22)의 서열을 포함하고;

CDR-H2가 YIYIGNAYTEYNEKFKG(서열번호 23) 또는 YIYIGNGYTEYNEKFKG(서열번호 25)의 서열을 포함하고;

CDR-H3이 DLMVIAPKTM DY(서열번호 24)의 서열을 포함하고;

CDR-L1이 KASQDVGTAVA(서열번호 26)의 서열을 포함하고;

CDR-L2가 WASTRHT(서열번호 27)의 서열을 포함하고;

CDR-L3이 QQYSSYPYT(서열번호 28)의 서열을 포함하고,

임의로, 제2 항원-결합 부위가 서열번호 31의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH 도메인, 및/또는 서열번호 34의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

여기서 CDR이 카뎀 넘버링에 따라 정의되는, 이중특이적 결합 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서,

제1 폴리펩티드 쇠, 제2 폴리펩티드 쇠 및 제3 폴리펩티드 쇠를 포함하고,
여기서

(i) 제1 폴리펩티드 쇠가 아미노 말단에서 카르복실 말단으로, CL이 VH_B에 직접 융합된(fused) VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc 또는 CH1이 VL_A에 직접 융합된 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하고; 제2 폴리펩티드 쇠가 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_A-CH1을 포함하고; 제3 폴리펩티드 쇠가 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_B-CL을 포함하거나; 또는

(ii) 제1 폴리펩티드 쇠가 아미노 말단에서 카르복실 말단으로, CH1이 VL_B에 직접 융합된 VH_A-CH1-VL_B-CL-Fc 또는 CL이 VH_A에 직접 융합된 VL_B-CL-VH_A-CH1-Fc를 포함하고; 제2 폴리펩티드 쇠가 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_B-CH1을 포함하고; 제3 폴리펩티드 쇠가 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_A-CL을 포함하고;

여기서 VL이 가변 경쇄 도메인이고, CL이 경쇄 불변 도메인이고, VH가 가변 중쇄 도메인이고, CH1이 중쇄 불변 도메인이고, Fc가 면역글로불린 Fc 영역, 예를 들어 IgG1의 Fc(임의로, 아미노 말단에서 카르복시 말단으로, 힌지(hinge)-CH2-CH3을 포함한다)이고;

여기서 VL_A-CL이 VH_A-CH1과 쌍을 이루어 제1 항원 A에 특이적으로 결합하는 제1 Fab를 형성하고, VL_B-CL이 VH_B-CH1과 쌍을 이루어 제2 항원 B에 특이적으로 결합하는 제2 Fab를 형성하고,

여기서 제1 항원 A가 OX40이고, 제2 항원 B가 PD-L1이고,

여기서 제1 폴리펩티드 쇠 중 2개, 제2 폴리펩티드 쇠 중 2개, 및 제3 폴리펩티드 쇠 중 2개가 결합하여 FIT-Ig 단백질을 형성하는

이중특이적 결합 단백질.

청구항 21

제19항에 있어서,

제1 폴리펩티드 쇠가 서열번호 35의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고,

제2 폴리펩티드 쇠가 서열번호 36의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고,

제3 폴리펩티드 쇠가 서열번호 37의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는

이중특이적 결합 단백질.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

하기의 특징 중 하나 이상을 갖는, 이중특이적 결합 단백질:

(i) OX40-발현 세포(예를 들어, OX40-발현 T 세포)의 세포 표면에 결합 시, OX40+ 세포에 대해 강한 결합 효능을 나타내고, 여기서 상기 세포 결합 효능이, 세포-기반 분석에서 유세포 분석에 의해 측정 시, 약 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 EC50에 의해 반영됨;

(ii) 결합 단백질이 OX40의 세포외 도메인의 CRD3에서 인간 OX40에 결합함;

(iii) OX40에 대한 결합 단백질의 결합이 T 세포의 항-종양 면역성, 예를 들어 감소된 종양 부담/성장/세포 확대의 촉진을 유도하고, 임의로 여기서 상기 항-종양 면역성이 항-종양 세포독성 및 항-종양 사이토카인의 분비를 포함함.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항의 이중특이적 결합 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 24

제23항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 25

제23항의 핵산 분자 또는 제24항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 26

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제19항 내지 제22항 중 어느 한 항의 이중특이적 결합 단백질을 제조하는 방법으로서,

항체, 항원-결합 단편, 또는 이중특이적 결합 단백질의 생산을 허용하는 조건 하에서 제15항 또는 제25항의 숙주 세포를 배양하고;

배양물로부터 항체, 항원-결합 단편 또는 이중특이적 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항의 이중특이적 결합 단백질, 제23항의 핵산, 제24항의 벡터, 또는 제25항의 숙주 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

PD-L1-연관된 활성이 유해하고/하거나 OX40-매개된 활성이 유리한 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 대상체(subject)에게 치료 유효량의 제16항 또는 제27항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

대상체가 인간인, 방법.

청구항 30

제28항에 있어서,

장애가 암인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 종양 괴사 인자 수용체 OX40(CD134)을 인식할 수 있는 항체, 및 적어도 하나의 OX40 결합 도메인 및 적어도 하나의 PD-L1 결합 도메인을 포함하는 관련된 이중특이적 결합 단백질, 예를 들어 이중특이적 OX40/PD-L1 결합 단백질(예를 들어, Fabs-in-Tandem 면역글로불린(FIT-Ig) 결합 단백질)에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 PD-L1을 인식할 수 있는 항체 및 적어도 하나의 PD-L1 결합 도메인 및 적어도 하나의 OX40 결합 도메인을 포함하는 관련된 이중특이적 결합 단백질, 예를 들어 이중특이적 OX40/PD-L1 결합 단백질(예를 들어, FIT-Ig 결합 단백질)에 관한 것이다. 본원에 개시된 항체 및 이중특이적 결합 단백질은 질병 치료, 예를 들어 암 면역요법에 유용할 수 있다. 본 개시내용은 추가로 상기 항체 또는 이중특이적 결합 단백질을 암호화(encoding)하는 핵산, 및 상기 항체 또는 이중특이적 결합 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 슈퍼패밀리(TNFR)는 다양한 면역 세포 기능을 매개할 수 있는 기능적으로 다양한 수용체의 큰 부류이다(Mayes PA, 2018). TNFR 슈퍼패밀리의 많은 구성원은 T 세포, B 세포, 자연살해(NK) 세포 뿐만 아니라 항원 제시 세포(APC)를 포함한 다수의 면역 세포 유형에서 발현될 수 있는 공동자극 수용체이며,

면역 세포 기능, 증식 및 생존을 유도하는 것으로 나타났다(Watts T.H., 2005).

[0003] 4개의 시스테인 풍부 도메인(CRD)을 특징으로 하는 I형 막관통 당단백질을 갖는 TNFR 슈퍼패밀리의 구성원인 OX40(CD134)은 주로 활성화된 CD4 및 CD8 T 세포와 Foxp3⁺ CD4⁺ 조절 T 세포(Treg)에서 발현되는 반면, 이의 리간드인 OX40L(CD252)은 활성화된 APC, 예를 들어 수지상 세포(DC), B 세포 및 대식세포에서 발현된다(Weinberg AD, 2011). TCR-MHC/펩티드 상호작용에 의해 활성화시, OX40L 동종삼량체가 형성되고 3개의 OX40 수용체에 결합하여 수용체 가교결합이 생성된다(Watts, 2005; Jane Willoughby, 2017). OX40의 고차 슈퍼-클러스터링(super-clustering)이 하류 신호전달을 매개하는 데 필요한 것으로 제안되었다. 클러스터링된 OX40 수용체는 TNF 수용체 관련 인자(TRAF)를 OX40의 세포내 도메인에 모집한다. TRAF2 및 3은 T 세포 분열, 생존 및 사이토카인 생산을 설명하는 PI3K/PKB, 핵 인자 κ B1(NF- κ B1) 및 NFAT 경로를 활성화한다(Croft, 2010; Kawamata, 1998; Song, 2008). 따라서, OX40의 하류 신호전달은 증식을 증가시키고, 세포사멸을 억제하고, T 세포로부터 더 큰 사이토카인 반응을 유도할 가능성이 있으며, 이들은 모두 OX40 작용성(agonistic) 항체에, 면역요법에 사용될 때 이끌어낼 수 있는 능력을 부여하는 기능적 결과이다.

[0004] 항종양 효능을 매개하는 작용성 항-OX40 항체의 기전은 다양한 마우스 종양 모델에서 광범위하게 조사되었다. 대부분의 작용성 항-OX40 mAb는 강력한 Fc γ R 결합을 위해 인간 IgG1 아이소타입을 채택하여 효과기 T 세포에 대한 공동 자극 신호 전달 경로를 촉발함으로써 활성화된 T 세포 하위집합의 생존 및 확대와 OX40에 의한 CD8 T 세포 반응의 T 세포 기억의 확립을 지원한다(Brendan D Curti, 2013; Glisson, 2020). 추가 데이터는 OX40 공동자극이 하류 신호전달을 통해 FoxP3 발현 및 Treg 유도를 억제한다는 것을 시사한다(Zhang X, 2018). OX40은 침윤된 Treg에서 고도로 발현되므로, OX40 항체에 의한 항종양 반응의 유도는 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 및 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)에 의한 Fc-매개된 효과기 기능을 통한 종양 내 Treg 세포의 고갈에 의존한다(Aspesslagh, 2016; Smyth, 2014). 그러나 종양 내 Treg의 고갈은 종양 미세환경(TME)에서 Treg에 대한 CD8⁺ 효과기 T 세포의 침윤 비를 향상시킬 수 있으며, 이는 향상된 항-종양 면역 반응과 여러 마우스 모델에서 향상된 생존으로 입증되었다(Jacquemin, 2015; Bulliard, 2014). 유리한 항-종양 효능으로 인해, 임상 개발 중인 대부분의 작용성 OX40 항체는 바람직한 항-종양 효능을 위한 IgG1 아이소타입이다(Choi, 2020; Brendan D Curti, 2013; Glisson, 2020). OX40-표적 약물을 사용한 임상 시험에서 단독 요법으로 사용하거나 면역 검사 차단제(ICB)와 병용하여 사용할 때 이의 안전성이 입증되었다. OX40 표적 치료법이 전임상 마우스 모델에서 인상적인 결과를 입증하였지만, 예비 임상 데이터에 따르면 인간에서의 단독 치료법으로서의 이의 효능은 보통 수준이다(Glisson, 2020; Carolina, 2020; Martin Gutierrez, 2020). 그럼에도 불구하고, 최근 발표된 1/2a상 연구(Martin Gutierrez, 2020)에 따르면 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-CTLA4와 함께 OX40 공동 자극은 효능의 명확한 개선을 가져오지 못하였다. 환자의 작용성 항-OX40 항체에 대한 낮은 반응은 두 가지 원인에 기인할 수 있다. 첫째, 일부 종양에서 Fc γ R 의존성 클러스터링은 TME에서 이용 가능한 침윤된 Fc γ R에 의해 제한될 때(Willoughby, 2017) 또는 Fc γ R 결합에 대해 경쟁하는 고농도의 내인성 IgG가 존재하는 경우(Christian Gieffers, 2013) 덜 효율적일 수 있다. 둘째, 최근 임상 연구에서 밝혀진 바와 같이, 항-OX40 IgG1 항체 치료 후 OX40⁺CD4⁺ 기억 T 세포의 백분율이 감소했는데, 이는 아마도 OX40⁺ 세포의 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 및 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 때문일 수 있다(Glisson, 2020). 따라서, 낮은 효과기 기능을 유지하면서 Fc γ R의 제한된 가용성에 관계없이 효과적인 슈퍼-클러스터링을 매개할 수 있는 새로운 세대의 항-OX40 효능제가 필요하다.

[0005] PD-L1(CD274)은 40 kDa I형 막관통 단백질이며, PD-1/PD-L1 신호전달 경로는 면역 관용 및 종양 면역 회피에서 중요한 역할을 한다. PD-L1은 많은 인간 종양 조직(예를 들어, 폐암, 위암, 유방암 및 장암)에서 발현된다. PD-1/PD-L1 억제 신호 전달 경로를 차단하면 억제된 T 세포가 활성화되어 암세포를 공격한다. 대부분의 항-PD-L1 mAb는 종양 항원 특이적 T 세포의 증식을 촉진함으로써 생체 내 및 환자 모두에서 종양 성장을 억제한다(Julie, 2012; Brahmer, 2012).

[0006] 이중특이적 항체는 2개의 상이한 항원/에피토프에 대해 이중 친화성을 갖는 조작된 항체의 부류이다. WO2015/103072에 개시된 바와 같은 FIT-IG(Fabs-In-Tandem ImmunoGlobulin)를 포함하여, 다양한 형태의 이중특이적 항체가 보고되고 연구되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0007] 본 개시내용은 PD-L1에 결합하는 신규 항체를 제공하며, 신규 항체는 높은 친화도로 OX40에 결합한다. 본 개시내용은 또한 PD-L1 및 OX40 둘 다에 동시에 결합하는 PD-L1/OX40 이중특이적 Fabs-in-Tandem 면역글로불린(FIT-Ig)을 제공한다. 본 개시내용의 항체 및 이중특이적 결합 단백질은 종양 침윤 림프구(TIL)에 대한 PD-L1 억제 신호전달을 차단하여 종양 세포에 대한 종양 침윤된 세포독성 T 세포를 재활성화할 수 있다.
- [0008] 본 개시내용의 이중특이적 항체는 이중 기전을 갖는 2개의 항원-결합 영역을 포함한다, 즉 첫째 이중특이적 항체 작용제는 이의 PD-L1-결합 영역을 통해 PD-L1 발현 종양 세포 또는 APC에 결합하는 반면, 이의 OX40 결합 영역을 통해서 OX40에 결합하여 슈퍼-클러스터링을 매개할 수 있으며, 따라서 조건부 PD-L1 의존 방식으로 T 세포를 활성화할 수 있다. 둘째, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 차단하여 PD-L1 매개 면적이 PD-1을 통해 회피하는 것을 방지한다. 따라서, 본 발명의 이중특이적 항체는 OX40에의 결합을 통해 T 세포를 활성화시키는 한편, PD-1/PD-L1 상호작용을 통해 T 세포 고갈을 방지함으로써 결과적으로 T 세포 활성화, 효과기의 증식 및 기억을 강화시켜 항-종양 효능을 증가시킨다. 더욱이, 본 개시내용의 이중특이적 항체는 Fc 영역에 LALA 돌연변이를 도입하여 OX40 양성 T 세포에 대한 ADCC 및 ADCP를 약화시킨다.
- [0009] 개시된 PD-L1/OX40 이중특이적 항체는 고차 OX40 클러스터링을 유도하고 PD-L1 가교결합을 통해 충분한 OX40 신호전달을 촉발함으로써 항-OX40 단독요법의 한계를 극복한다. 종양 세포상의 PD-L1과 T 세포상의 OX40의 동시 결합은 PD-1/PD-L1 억제 신호전달의 억제와 함께 T 세포상의 OX40의 PD-L1 의존적 활성화를 초래하고, 이는 효율적인 항-종양 면역(anti-tumor immunity)으로 이어질 수 있다. 따라서 OX40/PD-L1 이중특이적 항체는 암 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 항-OX40 항체의 에피토프 식별을 도시한다. 도 1a는 전장의 세포의 OX40(CRD1-4, 원) 및 절두된 OX40 변이체 ΔCRD1(CRD1 결여, 사각형), ΔCRD1-2(CRD1 및 CRD2 결여, 삼각형), ΔCRD1-3(CRD1, CRD2 및 CRD3 결여, 다이아몬드)에 대한 HuEM1007-044-16(상단), OX40-Tab1(중간), OX40-Tab2(하단)의 결합을 나타낸다. 도 1b는 전장의 세포의 OX40(CRD1-4, 원), mCRD1(CRD1이 쥐 CRD1로 대체된 CRD1-4, 사각형), mCRD2(CRD2 도메인이 쥐 CRD2로 대체된 CRD1-4, 삼각형), mCRD3(CRD3 도메인이 쥐 CRD3으로 대체된 CRD1-4, 역삼각형) 및 mCRD4(CRD4 도메인이 쥐 CRD4로 대체된 CRD1-4, 다이아몬드)에 대한 OX40-Tab2의 결합을 나타낸다.
- 도 2는 항-OX40 항체 HuEM1007-044-16(검은색)이 Treg 세포에 대한 T 효과기 세포의 선택적 증식을 유도함을 나타낸다. 관련 없는 인간 IgG(회색)를 음성 대조군으로 사용하였다.
- 도 3은, FACS에 의해 측정된 바와 같은, 음성 대조군인 관련 없는 인간 IgG(삼각형)와 함께 연속 희석된 항체 FIT1014-20a(다이아몬드) 및 HuEM0005-86-64(사각형)의 CHO-PD-L1 결합을 예시한다.
- 도 4는 연속 희석된 항체 FIT1014-20a(다이아몬드) 및 이의 모 OX40 항체 HuEM1007-44-16(사각형)을 포함하는, 인간 OX40-형질감염된 CHO 세포에의 결합에 대한 FACS 친화도의 결과를 나타낸다. 관련 없는 인간 IgG(삼각형)를 음성 대조군으로 사용한다.
- 도 5는 세포-기반 수용체 차단 분석에서 이중특이적 FIT1014-20a(사각형) 및 모 PD-L1 항체(삼각형)뿐만 아니라 음성 대조군으로서 관련 없는 인간 IgG(역삼각형)에 의한 PD-1/PD-L1 결합의 차단을 예시한다.
- 도 6은 이중특이적 FIT1014-20a(사각형) 및 모 PD-L1 항체(삼각형)뿐만 아니라 음성 대조군으로서 관련 없는 인간 IgG(역삼각형)에 의한 PD-L1 매개 억제 신호전달의 차단을 예시한다.
- 도 7(상단)은 이중특이적 FIT1014-20a(사각형) 및 각각 동일한 PD-L1 및 OX40 결합 도메인을 포함하는 2개의 모 항체의 조합(역삼각형)뿐만 아니라 음성 대조군으로서 관련 없는 인간 IgG(다이아몬드)에 의한 OX40 하류 신호전달의 활성화를 표시한다. 대조용 분석에서(하단), PD-L1을 발현하지 않는 CHO 세포는 FIT1014-20a 또는 2개의 모 항체의 조합에 의한 활성화의 결여를 나타낸다.
- 도 8은 FIT1014-20a(사각형), 모 항체의 조합(역 삼각형), 또는 관련 없는 인간 IgG(다이아몬드)와 공-배양 시 CHO-PD-L1-OS8 세포 및 인간 1차 T 세포의 공-배양 시스템으로부터의 IL2(상부, 배양 후 72시간) 및 IFN-γ(하

부, 배양 후 48시간) 생산을 나타낸다.

도 9는 FIT1014-20a(갈색) 및 모 항체의 조합(회색)과 함께 3일 배양 후 혼합 림프구 반응(MLR) 분석에서 관찰된 IL2 수준에 의해 평가된 T 세포 활성화를 표시한다.

도 10은 FIT1014-20a(사각형), 모 항체의 조합(역 삼각형), 또는 음성 대조군으로서 관련 없는 인간 IgG(다이아몬드)와 함께 96시간 배양 후 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 장독소 B(SEB) 분석에서 관찰된 IL2 수준에 의해 평가된 T 세포 활성화를 나타낸다.

도 11은 양성 대조군으로서 항 HLA-1(삼각형), 및 음성 대조군으로서 관련 없는 인간 IgG(사각형)를 사용하여, FIT1014-20a(원)의 보체 의존성 세포독성 분석을 나타낸다.

도 12는 FIT1014-20a(검은색 실선), HuEM1007-044-16-hIgG1(회색 실선), HuEM1007-044-16(대각선 줄무늬), OX40-Tab2(수평 줄무늬) 및 관련 없는 hIgG(체크보드)에 의한 CHO-OX40에 대한 식균작용 효과를 나타낸다.

도 13은 FIT1014-20a(삼각형), 모 PD-L1 mAb HuEM0005-86-64(사각형), 아테줄리주맙(사각형) 및 음성 대조군으로서 비히클(원)로 처리된 MC38-hPD-L1 종양 세포를 보유하는 인간화 OX40 및 PD-L1 B6 마우스에서의 항-종양 효능의 평가를 나타낸다

도 14는 비히클 대조군(원), 참조 PD-L1 항체 아테줄리주맙(사각형) 및 FIT1014-20a(삼각형)로 처리된 인간 PD-L1/PD-L1/OX40 녹인 마우스에서 확립된 CT26-hPD-L1 동계 종양의 종양 부피 프로파일을 나타낸다. 화살표는 할당된 작용제의 투여를 가리킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 개시내용은 항-OX40 항체, 항-PD-L1 항체, 이의 항원-결합 부분, 및 OX40 및 PD-L1 둘 다에 결합하는 FIT-Ig와 같은 다가의 이중특이적 결합 단백질에 관한 것이다. 본 개시내용의 다양한 양태는 항-OX40 및 이의 항원-결합 단편(antigen binding fragment), 항-PD-L1 항체 및 이의 항원-결합 단편, 인간 OX40 및 인간 PD-L1에 결합하는 FIT-Ig 결합 단백질, 및 이의 약제학적 조성물뿐만 아니라, 이러한 항체, 항원-결합 단편 및 결합 단백질을 제조하기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터(vector) 및 숙주 세포에 관한 것이다. 인간 OX40, 인간 PD-L1, 또는 둘 다를 검출하기 위해; 시험관내 또는 생체내에서 인간 OX40 및/또는 인간 PD-L1 활성을 조절하기 위해; 예를 들어 종양과 같은 외래 항원에 대한 적응 면역 반응을 유도 및/또는 강화하기 위해; 및 질병, 특히 암을 치료하기 위해 본 개시내용의 항체, 항원-결합 단편, 및 이중특이적 결합 단백질을 사용하는 방법이 또한 본 개시내용에 포함된다.

[0012] **정의**

[0013] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 잠재적인 모호성이 있는 경우, 여기에 제공된 정의가 사전 또는 외부 정의보다 우선한다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고, 복수 용어는 단수를 포함한다. 본원에서 "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, "포함하는"이라는 용어뿐만 아니라, "포함하다" 및 "포함하였다"와 같은 다른 형태의 사용은 제한되지 않는다. 또한, "요소" 또는 "성분" 등의 용어는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 하나의 단위를 구성하는 요소 및 성분과, 하나 초과와 하위단위를 구성하는 요소 및 성분을 모두 포함한다.

[0014] 본원에 사용된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 모든 불변 영역 및 도메인의 아미노산 위치는 문헌[Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기재된 카밧 넘버링(Kabat numbering)에 따라 넘버링되며, 본원에서 "카밧에 따른 넘버링"으로 지칭된다. 구체적으로, 문헌[Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)](647-660 페이지 참조)에 기재된 카밧 넘버링 시스템이 카와 및 람다 아이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 사용되며, 카밧 EU 인텍스 넘버링 체계(661-723 페이지 참조)는 불변 중쇄 도메인(CH1, 힌지(Hinge), CH2 및 CH3, 이 경우 본원에서 "카밧 EU 인텍스에 따른 넘버링"을 참조하여 더 명확해진다)에 대해 사용된다.

[0015] "단리된 단백질" 또는 "단리된 폴리펩티드"라는 용어는 이의 기원이나 유래하는 공급원으로 인해 이의 원래 상태에서 동반되는 자연적으로 연관된 성분과 연관되지 않거나, 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없거나, 상이한 종의 세포에 의해 발현되거나, 또 자연에서 발생하지 않는, 단백질 또는 폴리펩티드이다. 화학

적으로 합성되거나, 또는 자연적으로 유래된 세포와 다른 세포 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 이의 자연적으로 연관된 성분으로부터 "단리"될 수 있다. 또한, 당업계에 잘 알려진 단백질 정제 기술을 사용하여 단리함으로써 단백질에 자연적으로 연관된 성분이 실질적으로 없게 만들 수도 있다.

[0016] 항체, 결합 단백질 또는 펩티드와 제2 화학종과의 상호작용과 관련하여 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 상호작용이 제2 화학종 상의 특정 구조(예를 들어, 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존함을 의미한다. 예를 들어, 항체는 일반적인 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 일반적으로, 항체가 에피토프 "A"에 특이적이라면, 표지된 "A"와 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A(또는 표지되지 않은 유리 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다. 본 개시내용에 따르면, 특이적 결합 단백질은 10 nM 이하, 예를 들어 1 nM 이하의 K_D 로 상응하는 항원에 결합한다. " K_D "라는 용어는 평형 해리 상수(평형 결합 상수의 역수)를 의미하며, 본 기술 분야에 제공된 정의에 따라 사용된다. 항체 또는 결합 단백질이 상응하는 항원에 결합하는 K_D 값은 비제한적으로 형광 적정, 경쟁 ELISA, 등은 적정 열량측정(ITC)과 같은 열량측정법, 유세포 분석 적정 분석(flow cytometric titration analysis)(FACS 적정), 생물층 간섭계(BLI) 및 표면 플라스몬 공명(BIAcore)을 포함한 주지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0017] "항체"라는 용어는 광범위하게 4개의 폴리펩티드 쇄, 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)로 구성된 임의의 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 본질적인 에피토프 결합 특징을 유지하는 이의 임의의 항원-결합 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 지칭한다. 이러한 돌연변이체, 변이체 또는 유도체 항체 포맷은 당업계에 공지되어 있으며 비제한적인 구현예가 하기에서 논의된다.

[0018] 전장 항체에서, 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 세 가지 도메인으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 VL로 약칭함)과 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 CL이라는 하나의 도메인으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 고가변 영역, 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. VH 도메인의 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 CDR은 일반적으로 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 열거되며; 마찬가지로, VL 도메인의 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 CDR은 일반적으로 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 열거된다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류의 것일 수 있다.

[0019] "Fc 영역"이라는 용어는 온전한 항체의 파파인 절단에 의해 생성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. Fc 영역은 고유 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, 즉 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 예를 들어 IgM 및 IgE 항체의 Fc 영역의 경우에서와 같이, 선택적으로 CH4 도메인을 포함한다. IgG, IgA 및 IgD 항체의 Fc 영역은 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다. 대조적으로, IgM 및 IgE 항체의 Fc 영역에는 힌지 영역이 없지만 CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인을 포함한다. 항체 효과기 기능을 변경하기 위해 Fc 부분에 아미노산 잔기 교체를 갖는 변이체 Fc 영역은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Winter et al., 미국특허 제5,648,260호 및 제5,624,821호 참조). 항체의 Fc 부분은 하나 이상의 효과기 기능, 예를 들어 사이토카인 유도, ADCC, 식균작용, 보체 의존성 세포독성(CDC) 및/또는 항체 및 항원-항체 복합체의 반감기/제거율을 매개할 수 있다. 어떤 경우에는 이러한 효과기 기능이 치료 항체에 바람직하지만 다른 경우에는 치료 목적에 따라 불필요하거나 심지어 해로울 수도 있다. 특정 인간 IgG 아이소타입, 특히 IgG1 및 IgG3은 각각 $Fc\gamma R$ 및 보체 C1q에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 매개한다. 또 다른 구현예에서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 항체의 불변 영역, 예를 들어 항체의 Fc 영역에서 대체되어 항체의 효과기 기능을 변경시킨다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이량체화는 CH3 도메인의 이량체화에 의해 매개되고 CH1 불변 도메인을 Fc 불변 도메인(예를 들어, CH2 및 CH3)에 연결하는 힌지 영역 내의 디설파이드 결합에 의해 안정화된다. IgG의 소염 활성화는 IgG Fc 단편의 N-연결 글리칸의 시알릴화에 따라 달라진다. 소염 활성을 위한 정확한 글리칸 요건이 결정되었으며, 따라서 적절한 IgG1 Fc 단편이 생성될 수 있고, 이에 의해 효능이 크게 향상된 완전한 제조합, 시알릴화된 IgG1 Fc가 생성될 수 있다(문헌 [Anthony et al., Science, 320:373-376 (2008)] 참조).

[0020] 항체의 "항원-결합 부분" 및 "항원-결합 단편" 또는 "기능적 단편"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 항원, 즉 부분 또는 단편이 유래된 전장 항체와 동일한 항원(예를 들어, OX40, PD-L1)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될

수 있는 것으로 나타났다. 이러한 항체 구현에는 또한 이중특이적, 이중 특이적 또는 다중특이적 포맷일 수 있으며; 2개 이상의 상이한 항원(예를 들어, OX40 및 PD-L1과 같은 상이한 항원)에 특이적으로 결합한다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 가지의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 Fv 단편, (v) dAb 단편(Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989); PCT 공개 번호 WO 90/05144)(이는 단일 가변 도메인을 포함한다) 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 도메인인 VL과 VH는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, 이들을 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄(단쇄 Fv(scFv)로서 공지됨; 예를 들어 문헌[Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988)]; 및 문헌[Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)]을 참조하시오)로 만들어질 수 있게 하는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다. 이러한 단쇄 항체는 또한 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 및 상기 주어진 등가 용어 내에 포함되도록 의도된다. 디아바디와 같은 다른 형태의 단쇄 항체도 포함된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄에서 발현되지만 동일한 쇄 상의 2개의 도메인간에 짝을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인이 또 다른 쇄의 상보성 도메인과 강제로 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성시키게 하는 2가, 이중특이적 항체이다(예를 들어, 문헌[Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]을 참조하시오). 이러한 항체 결합 부분은 당업계에 공지되어 있다(Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, New York, 2001), p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). 또한, 단쇄 항체에는 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fv 분절(VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체"도 포함된다(Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995) 및 미국특허 제5,641,870호).

- [0021] 면역글로불린 불변(C) 도메인은 중쇄(CH) 또는 경쇄(CL) 불변 도메인을 의미한다. 쥐 및 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다.
- [0022] "단클론 항체" 또는 "mAb"라는 용어는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미한다, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 단일 항원 결정인자(에피토프)에 대해 매우 특이적이 높다. 또한, 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체 제제와 달리, 각 mAb는 항원의 단일 결정인자에 대한 것이다. "단클론성"이라는 수식어는 특정 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0023] 본 출원에 따른 항체 또는 결합 단백질의 경쇄 불변 도메인 CL, 중쇄 불변 도메인 CH 및 Fc 영역과 관련하여 "인간 서열"이라는 용어는 서열이 인간 면역글로불린이거나 인간 면역글로불린 서열로부터 유래한다는 것을 의미한다. 본 개시내용의 인간 서열은 고유의 인간 서열이거나, 하나 이상(예를 들어, 최대 20, 15, 10개)의 아미노산 잔기 변화를 포함하는 이의 변이체일 수 있다.
- [0024] "키메라(chimeric) 항체"라는 용어는 한 종의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열과 또 다른 종의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예를 들어 인간 불변 영역에 연결된 쥐 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다.
- [0025] "CDR-접목된 항체"라는 용어는 한 종의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL의 하나 이상의 CDR 영역 서열이 또 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예를 들어 인간 CDR 중 하나 이상이 쥐 CDR 서열로 대체된 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다.
- [0026] "인간화 항체"라는 용어는 비-인간 종(예를 들어, 마우스)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL 서열의 적어도 일부가 더 "인간-같도록", 즉 인간 생식계열 가변 서열에 더 유사하도록 변경된 항체를 의미한다. 인간화 항체의 한 유형은 비-인간 종(예를 들어, 마우스)으로부터의 CDR 서열이 인간 VH 및 VL 프레임워크 서열에 도입되는 CDR-접목된 항체이다. 인간화 항체는, 관심 항원에 면역특이적으로 결합하고, 실질적으로 인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 영역 및 불변 영역을 포함하지만 실질적으로 비-인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 이의 변이체, 유도체, 유사체 또는 단편이다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR과 관련하여 "실질적으로"라는 용어는 아미노산 서열이 비-인간 항체 CDR의 아미노산 서열에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 의미한다. 인간화 항체는 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비-인간의 CDR 영역에 상응하는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, Fv)을 실질적으로 전부 포함하며, 여기서 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 경우에 상응하고 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 공통 서열의 것이다. 한 구현예에서, 인간화

항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 경쇄뿐만 아니라 적어도 중쇄의 가변 도메인을 모두 함유한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 인간화 경쇄만을 함유한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 인간화 중쇄만을 함유한다. 특정 구현예에서, 인간화 항체는 경쇄 및/또는 인간화 중쇄의 인간화 가변 도메인만을 함유한다.

[0027] 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의의 부류의 면역글로불린과, 비제한적으로 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 아이소타입으로부터 선택될 수 있다. 인간화 항체는 하나 이상의 부류 또는 아이소타입으로부터의 서열을 포함할 수 있으며, 특정 불변 도메인은 당업계에서 널리 공지된 기술을 사용하여 원하는 효과기 기능을 최적화하도록 선택될 수 있다.

[0028] 인간화 항체의 프레임워크 및 CDR 영역은 모 서열과 정확하게 일치할 필요는 없으며, 예를 들어 공여자 항체 CDR 또는 수용체 프레임워크는 CDR 또는 해당 부위의 프레임워크 잔기가 공여자 항체나 공통 프레임워크에 상응하지 않도록 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 돌연변이가 유발될 수 있다. 그러나 예시적인 구현예에서, 그러한 돌연변이는 광범위하지 않을 것이다. 일반적으로 인간화 항체 잔기의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%는 모 FR 및 CDR 서열의 잔기에 상응할 것이다. 공여자 항체의 해당 위치에 나타나는 동일한 아미노산을 복원하기 위한 특정 프레임워크 위치에서의 역 돌연변이는 종종 특정 루프 구조를 보존하거나 표적 항원과의 접촉을 위해 CDR 서열의 방향을 올바르게 지정하기 위해 활용된다.

[0029] "CDR"이라는 용어는 항체 가변 도메인 서열 내의 상보성 결정 영역을 의미한다. 중쇄와 경쇄의 각 가변 영역에는 3개의 CDR이 존재하며, 이들은 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 지정된다. 본원에 사용된 "CDR 세트"라는 용어는 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역에서 발생하는 3개의 CDR 그룹을 의미한다. 이러한 CDR의 정확한 경계는 하기의 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 카밧에 의해 기재된 시스템(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991)))은 항체의 임의의 가변 영역에 적용할 수 있는 명확한 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐만 아니라 3개의 CDR을 한정하는 정확한 잔기 경계를 제공한다.

[0030] 지난 20년 동안 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 아미노산 서열에 대한 광범위한 공공 데이터베이스의 성장 및 분석을 통해 가변 영역 서열 내의 프레임워크 영역(FR)과 CDR 서열 사이의 전형적인 경계를 이해할 수 있게 되었으며 당업자로 하여금 카밧 넘버링, Chothia 넘버링, 또는 다른 체계에 따라 CDR을 정확하게 결정할 수 있게 하였다. 예를 들어, 문헌[Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," *In* Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433]을 참조한다.

[0031] "다가 결합 단백질"이라는 용어는 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 의미한다. 다가 결합 단백질은 어떤 경우에는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 조작되며 일반적으로 자연 발생 항체가 아니다.

[0032] "이중특이적 결합 단백질"(달리 언급되지 않는 한 "이중특이적 항체"라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있음)은 특이성이 상이한 2개의 표적에 결합할 수 있는 결합 단백질을 의미한다. 본 개시내용의 FIT-Ig 결합 단백질은 4개의 항원 결합 부위를 포함하고 전형적으로 4가 결합 단백질이다. 본 개시내용에 따른 FIT-Ig는 OX40 및 PD-L1 둘 다에 결합하고 이중특이적이다.

[0033] 2개의 긴(중) V-C-V-C-Fc 쇠 폴리펩티드와 4개의 짧은(경) V-C 쇠 폴리펩티드를 포함하는 FIT-Ig 결합 단백질은 4개의 Fab 항원 결합 부위(VL-CL과 쌍을 이루는 VH-CH1, 때로는 VH-CH1:VL-CL로 표시됨)를 나타내는 육량체를 형성한다. FIT-Ig의 각 절반은 중쇄 폴리펩티드와 2개의 경쇄 폴리펩티드를 포함하고, 3개 쇠의 VH-CH1 및 VL-CL 요소의 상보적인 면역글로불린 짝짓기는 나란히 배열된 2개의 Fab 구조의 항원 결합 부위를 생성시킨다. 본 개시내용에서, Fab 요소를 포함하는 면역글로불린 도메인은 도메인간 링커를 사용하지 않고 중쇄 폴리펩티드에 직접 융합(fusion)되는 것이 바람직하다. 즉, 긴(중) 폴리펩티드 쇠의 N-말단 V-C 요소는 이의 C-말단에서 다른 V-C 요소의 N-말단에 직접 융합되고, 이는 다시 C-말단 Fc 영역에 연결된다. 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질에서, 탠덤 Fab 요소는 다른 항원과 반응성일 수 있다. 각각의 Fab 항원 결합 부위는 항원 결합 부위당 총 6개의 CDR을 갖는 가변 중쇄 도메인 및 가변 경쇄 도메인을 포함한다.

[0034] FIT-Ig 분자의 설계, 발현 및 특성화에 대한 설명은 PCT 공개 WO 2015/103072에 제공되어 있으며, 이는 내용 전체가 본원에 포함된다. 이러한 FIT-Ig 분자의 예는 중쇄 및 2개의 상이한 경쇄를 포함한다. 중쇄는 구조식 VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc(여기서 CL은 VH_B에 직접 융합된다(즉 "포맷 LH")) 또는 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc(여기서 CH1은 VL_A에 직

접 융합된다(즉, "포맷 HL"))를 포함하고, FIT-Ig의 2개의 경쇄 폴리펩티드 쇄는 이에 상응하여 각각 식 VH_A-CH1 및 VL_B-CL 을 가지며; 대안적으로, 중쇄는 구조식 $VL_B-CL-VH_A-CH1-Fc$ (여기서 CL 은 VH_A 에 직접 융합된다("포맷 LH"의 경우)) 또는 $VH_A-CH1-VL_B-CL-Fc$ (여기서 $CH1$ 은 VL_B 에 직접 융합된다("포맷 HL"의 경우))를 포함하고, FIT-Ig의 2개의 경쇄 폴리펩티드 쇄는 이에 상응하여 각각 식 VL_A-CL 및 VH_B-CH1 을 가지며; 여기서 VL_A 는 항원 A에 결합하는 모 항체의 가변 경쇄 도메인이고, VL_B 는 항원 B에 결합하는 모 항체의 가변 경쇄 도메인이고, VH_A 는 항원 A에 결합하는 모 항체의 가변 중쇄 도메인이고, VH_B 는 항원 B에 결합하는 모 항체로부터의 가변 중쇄 도메인이고, CL 은 경쇄 불변 도메인이고, $CH1$ 은 중쇄 불변 도메인이고, Fc 는 면역글로불린 Fc 영역(예를 들어, IgG1 항체의 중쇄의 C-말단 힌지-CH2-CH3 부분)이다. 이중특이적 FIT-Ig 구현예에서, 항원 A와 항원 B는 서로 다른 항원이거나, 동일한 항원의 서로 다른 에피토프이다. 본 개시내용에서, A와 B 중 하나는 OX40이고 다른 하나는 PD-L1이다, 예를 들어 A는 OX40이고 B는 PD-L1이다.

[0035] 본원에 사용된 " k_{on} "(또한 "Kon", "kon")이라는 용어는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 항원이 결합하여 결합 복합체, 예를 들어 항체/항원 복합체를 형성하는 결합 속도 상수를 의미하는 것으로 의도된다. " k_{on} "은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "결합 속도 상수" 또는 " ka "라는 용어로도 공지되어 있다. 이 값은 하기 방정식에 나타난 바와 같이 표적 항원에 대한 항체의 결합 속도 또는 항체와 항원 사이의 복합체 형성 속도를 나타낸다:

[0036] 항체("Ab") + 항원("Ag") $\rightarrow$ Ab-Ag.

[0037] 본원에 사용된 " k_{off} "(또한 "Koff", "koff")라는 용어는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 결합 복합체(예를 들어, 항체/항원 복합체)로부터 결합 단백질(예를 들어, 항체)의 해리에 대한 해리 속도 상수, 또는 "해리 속도 상수"를 의미하는 것으로 의도된다. 이 값은 하기 방정식에 나타난 바와 같이 표적 항원으로부터 항체의 해리 속도 또는 시간 경과에 따른 Ab-Ag 복합체의 유리 항체 및 항원으로의 분리를 나타낸다:

[0038] Ab + Ag $\leftarrow$ Ab-Ag.

[0039] 본원에 사용된 " K_D "(또한 " K_d ")라는 용어는 "평형 해리 상수"를 의미하고, 평형에서 적정 측정시 얻은 값을 의미하거나, 또는 해리 속도 상수(k_{off})를 결합 속도 상수(k_{on})로 나눔으로써 얻은 값을 의미한다. 결합 속도 상수(k_{on}), 해리 속도 상수(k_{off}) 및 평형 해리 상수(K_D)는 항원에 대한 항체의 결합 친화도를 나타내는 데 사용된다. 결합 및 해리 속도 상수를 결정하는 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. 형광 기반 기법을 사용하면 높은 감도와 평형 상태에서 생리학적 완충액의 샘플을 검사할 수 있는 능력이 제공된다. BIAcore®(생물분자 상호작용 분석) 분석과 같은 다른 실험 접근법 및 장비가 사용될 수 있다(예를 들어, BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden로부터 입수할 수 있는 장비). 예를 들어 Octet® RED96 시스템(Pall ForteBio LLC)을 사용하는 생물층 간섭계(BLI)는 또 다른 친화성 분석 기법이다. 추가로, Sapidyn Instruments(Boise, Idaho)에서 입수할 수 있는 KinExA® (Kinetic Exclusion Assay) 분석도 사용할 수 있다.

[0040] "단리된 핵산"이라는 용어는 인간 개입에 의해, 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 연관되지 않고; 자연적으로 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결되거나; 또는 더 큰 서열의 일부로 자연에서 발생하지 않는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이들의 일부 조합의)를 의미한다.

[0041] 본원에 사용된 "벡터"라는 용어는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 유형은 추가 DNA 분절이 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가적인 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 특정 벡터는 이것이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제가 가능하다(예를 들어, 세균 복제 기원을 갖는 세균 벡터 및 에피솜 포유 동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있으며, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 개시내용은 동등한 기능을 수행하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아테노바이러스 및

아데노 관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

[0042] "작동적으로 연결된"이라는 용어는 기재된 성분이 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있는 병치를 의미한다. 암호화 서열에 "작동적으로 연결된" 조절 서열은 암호화 서열의 발현이 조절 서열과 적합한 조건 하에서 달성되는 방식으로 결합된다. "작동적으로 연결된" 서열에는 관심 유전자와 인접한 발현 조절 서열 및 관심 유전자를 조절하기 위해 트랜스로 또는 거리를 두고 작용하는 발현 조절 서열이 모두 포함된다. 본원에 사용된 "발현 조절 서열"이라는 용어는 결합된 암호화 서열의 발현 및 가공에 영향을 미치는 데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 발현 조절 서열에는 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 가공 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, Kozak 합의 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우, 단백질 분비를 향상시키는 서열이 포함된다. 그러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르며; 원핵생물에서 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고; 진핵생물에서 일반적으로 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열"이라는 용어는 그 존재가 발현 및 가공에 필수적인 성분을 포함하도록 의도되며, 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들어 리더 서열 및 융합 파트너 서열도 포함할 수 있다.

[0043] 본원에 언급된 "형질전환"은 외인성 DNA가 숙주 세포에 들어가는 모든 과정을 의미한다. 형질전환은 당업계에 주지된 다양한 방법을 사용하여 자연적 또는 인공적 조건 하에서 일어날 수 있다. 형질전환은 외래 핵산 서열을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 방법은 형질전환되는 숙주 세포에 기초하여 선택되며, 형질감염, 바이러스 감염, 일렉트로포레이션, 리포펙션 및 입자 충격을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 "형질전환된" 세포에는 삽입된 DNA가 자율 복제 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정적으로 형질전환된 세포가 포함된다. 또한 제한된 기간 동안 삽입된 DNA 또는 RNA를 일시적으로 발현하는 세포도 포함된다.

[0044] "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")라는 용어는 외인성 DNA가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 한 구현예에서, 숙주 세포는 예를 들어 미국특허 제7,262,028호에 기재된 숙주 세포와 같이, 항체를 암호화하는 2개 이상(예를 들어, 다중) 핵산을 포함한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 지칭하고자 한다. 특정 변형은 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 다음 세대에서 발생할 수 있기 때문에 이러한 자손은 실제로 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만 여전히 본원에서 사용되는 "숙주 세포"라는 용어의 범위 내에 포함된다. 한 구현예에서, 숙주 세포는 임의의 생명의 왕국으로부터 선택된 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 진핵 세포에는 원핵생물, 진균, 식물 및 동물 세포가 포함된다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 원핵생물 세포주 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*); 포유동물 세포주 CHO, HEK 293, Jurkat, COS, NS0, SP2 및 PER.C6; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비시아에를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0045] 본원에 사용된 "유효량"이라는 용어는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 중증도 및/또는 지속 기간을 감소시키거나 개선하는데 충분하고; 장애의 진행을 예방하고; 장애의 퇴행을 유발하고; 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 재발, 발달 또는 진행을 예방하고; 장애를 검출하거나; 또는 다른 치료법(예를 들어, 예방제 또는 치료제)의 예방 또는 치료 효과(들)를 강화하거나 개선시키는 데 충분한 치료법의 양을 의미한다.

[0046] 본원에 사용된 "T 세포의 활성화" 또는 "T 세포 활성화"는 특정 외래 항원이 동종의 미경험 T 세포가 이에 반응하도록 유도하는 세포 매개 면역의 핵심 과정을 의미한다. T 세포의 증식 및/또는 분화 및 다량의 효과기 T 세포(예를 들어, 세포독성 T 림프구)의 생성에 반영되는 T 세포 활성화는 예를 들어 외래 항원의 감소 또는 제거를 초래할 수 있다. 과정은 복잡하며 다수의 요인, 예를 들어 면역억제성 종양 미세환경에 의해 조절된다. 과정을 측정할 수 있는 T 세포 활성화의 징후에는 T 세포로부터의 IL-2 또는 IFN- γ 분비의 유의미한 증가 및/또는 항원 반응의 증가(예를 들어, 종양 제거)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 측정 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0047] 본 개시내용에 따른 항체, 이의 항원-결합 단편 및 결합 단백질, 항체 및 결합 단백질을 정제하기 위해 당업계에서 이용가능한 다양한 방법 및 물질 중 하나 이상을 사용하여 (의도된 용도를 위해) 정제할 수 있다. 이러한 방법 및 물질에는 의도된 용도에 허용되는 순도를 얻기 위한 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L 또는 항체의 특정 리간드, 이의 항원 결합 단편 또는 결합 단백질에 접합된(conjugated) 수지, 입자 또는 멤브레인을 사용함), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어 이온 교환 입자 또는 멤브레인을 사용함), 소수성 상호작용 크로마토그래피("HIC", 예를 들어 소수성 입자 또는 멤브레인을 사용함), 한외여과, 나노

여과, 정용여과, 크기 배제 크로마토그래피("SEC"), 낮은 pH 처리(오염 바이러스 비활성화) 및 이들의 조합이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 오염 바이러스를 불활성화하기 위한 저 pH 처리의 비제한적 예는 18℃ 내지 25℃에서 60 내지 70분 동안 0.5 M 인산을 사용하여 본 개시내용의 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 결합 단백질질을 포함하는 용액 또는 현탁액의 pH를 pH 3.5로 감소시키는 것을 포함한다.

[0048] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들어, 일렉트로포레이션, 리포펙션)을 위해 표준 기법이 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조사의 사양에 따라, 또는 당업계에서 일반적으로 수행되거나 본원에 기재된 대로 수행될 수 있다. 진술한 기술 및 절차는 일반적으로 당업계에 주지되어 있고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 설명된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)]을 참조한다.

[0049] 항-OX40 및 항-PD-L1 단일특이적 항체

[0050] 본 개시내용의 항-OX40 및 항-PD-L1 항체는 당업계에 공지된 임의의 수의 기법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 WO 2021/1034434를 참조한다. 예를 들어, 숙주 세포로부터의 발현, 여기서 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)는 표준 기법에 의해 숙주 세포 내로 형질감염된다. "형질감염"이란 용어의 다양한 형태는 외인성 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포에 도입하기 위해 일반적으로 사용되는 다양한 기법, 예를 들어 일렉트로포레이션, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하고자 한다. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 개시내용의 항체를 발현하는 것이 가능하지만, 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 숙주 세포에서의 항체의 발현이 특히 고려되는데, 그 이유는 이러한 진핵 세포(예를 들어, 포유동물 세포)가 원핵 세포보다 더 잘 조립되고 접합하게 폴딩된 면역 활성 항체를 분비할 가능성이 더 높기 때문이다.

[0051] 본 개시내용의 재조합 항체를 발현하기 위한 포유동물 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(문헌[Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980)]에 기재된 dhfr⁻ CHO 세포 포함, 예를 들어 문헌[Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982)]에 기재된 바와 같은 DHFR 선택성 마커와 함께 사용된다), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포이다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입될 때, 항체는, 숙주 세포에서 항체가 발현되거나 숙주 세포가 증식하는 배양 배지 내로 항체가 추가로 분비되도록 하기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생산된다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 항체를 회수할 수 있다.

[0052] 숙주 세포를 또한 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 항원-결합 단편을 생산하는 데 사용할 수 있다. 상기 절차에 대한 변형이 본 개시내용의 범위 내에 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 항원-결합 단편을 암호화하는 DNA로 숙주 세포를 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 재조합 DNA 기술은 또한 관심 항원에 결합하는 데 필요하지 않은 경쇄와 중쇄 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거하는 데 사용될 수도 있다. 이러한 절단된 DNA 분자로부터 발현된 분자도 본 개시내용의 항체에 포함된다. 또한, 이작용성 항체는 표준 화학적 가교결합 방법에 의해 본 개시내용의 항체를 제2 항체 또는 또 다른 기능성 모이어티에 가교결합시킴으로써 생산될 수 있다.

[0053] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 재조합 발현을 위한 예시적인 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 인산칼슘-매개된 형질감염에 의해 dhfr⁻ CHO 세포 내로 도입된다. 재조합 발현 벡터 내에서 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소에 작동적으로 연결되어 유전자의 높은 전사 수준을 유도한다. 재조합 발현 벡터는 또한 메토타렉세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선택을 허용하는 DHFR 유전자를 운반한다. 선택된 형질감염된 숙주 세포를 배양하여 항체 중쇄 및 경쇄가 발현되도록 하고, 온전한 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질감염체를 선택하고, 숙주 세포를 배양하고, 배양 배지로부터 항체를 회수하기 위해 표준 분자 생물학 기법이 사용된다. 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 재조합 항체가 생산될 때까지 적합한 배양 배지에서 본 개시내용의 형질감염된 숙주 세포를 배양함으로써 재조합 항-OX40 또는 항-PD-L1 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 임의로, 방법은 배양 배지로부터 재조합 항체를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0054] 항-OX40 항체

[0055] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 OX40 Ig-유사 도메인의 막 근위 CRD에서 OX40에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 항체는, 예를 들어 세포 기반 분석(cell-based assay)에서 측정된 바와 같이, 높

은 세포 결합 효능을 갖고/거나 낮은 내재화 속도를 특징으로 한다.

- [0056] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 단리된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 개시한다. 추가 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하며, 여기서:
- [0057] - CDR-H1은 SSWMN(서열번호 1)의 서열을 포함하고;
- [0058] - CDR-H2는 RIYPGDEITNYNGKFKD(서열번호 2) 또는 RIYPGDEITNNAKFKD(서열번호 4)의 서열을 포함하고;
- [0059] - CDR-H3는 DLLMPY(서열번호 3)의 서열을 포함하고;
- [0060] - CDR-L1은 RSSKSLYSNGITYLY(서열번호 5) 또는 RSSKSLYSNAITYLY(서열번호 8)의 서열을 포함하고;
- [0061] - CDR-L2는 QMSNLAP(서열번호 6)의 서열을 포함하고;
- [0062] - CDR-L3은 AQNLELPFT(서열번호 7)의 서열을 포함하고,
- [0063] 여기서 CDR은 카뎀 넘버링에 따라 정의된다.
- [0064] 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 카뎀 넘버링에 따른 위치 H31-H35, H50-H66 및 H99-H104에 (i) 서열번호 1, 2, 3 또는 (ii) 서열번호 1, 4, 3으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDRH3의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0065] 한 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 카뎀 넘버링에 따른 위치 L24-39, L55-61 및 L94-102에 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3에 대해 서열번호 5, 6 및 7 또는 서열번호 8, 6 및 7의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0066] 특정 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 카뎀 넘버링에 따라 VH 도메인에 G62A 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 카뎀 넘버링에 따라 VL 도메인에 G34A 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 아스파라긴 탈아미드화 경향을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 돌연변이가 있는 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 돌연변이가 없는 모 항체에 비해 증가된 안정성을 갖는다.
- [0067] 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1-3 및 5-7의 CDR 서열에 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 그러나 5개 이하의 잔기 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1, 4, 3 및 5-7의 CDR 서열에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 그러나 5개 이하의 잔기 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1-3 및 8, 6, 7의 CDR 서열에 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 그러나 5개 이하의 잔기 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1, 4, 3 및 8, 6, 7의 CDR 서열에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 그러나 5개 이하의 잔기 변형을 포함한다. 아미노산 변형은 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가, 예를 들어 보존적 치환일 수 있다.
- [0068] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 VH/VL 서열 쌍: 서열번호 11/19, 12/19, 13/19, 14/19, 11/20, 12/20, 13/20, 14/20, 10/17, 9/18, 10/18, 9/19, 11/17, 15/21, 15/18, 16/21 및 16/18로 이루어지는 그룹으로부터 선택된, 중쇄 중쇄 도메인 VH 및 경쇄 가변 도메인 VL의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다. CDR은 가장 널리 사용되는 CDR 정의 체계, 예를 들어 카뎀, Chothia 또는 IMGT 정의를 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0069] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인 VH 및 경쇄 가변 도메인 VL을 포함하며, 여기서:
- [0070] - VH 도메인은 서열번호 9 또는 10의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하고/하거나
- [0071] - VL 도메인은 서열번호 17 또는 18의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0072] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인 VH 및 경쇄 가변 도메인 VL을 포함하며, 여기서:

- [0073] - VH 도메인은 서열번호 11-16으로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고/하거나
- [0074] - VL 도메인은 서열번호 19-21로부터 선택된 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 항-OX40 항체는, 동일하거나 개선된 결합 특성, 예를 들어 해리 속도 및/또는 결합 속도로 OX40에 결합하는 능력을 유지하면서, 참조 서열에 비해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하고 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열번호 9, 10, 또는 서열 번호 11-16 중 어느 하나에서 총 1 내지 11개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역(즉, FR)에서 발생한다. 임의로, 항-OX40 항체는 서열번호 9, 10, 또는 서열번호 11-16 중 어느 하나의 VH 서열(해당 서열의 번역 후 변형 포함)을 포함한다. 특정 구현예에서, VH는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (b) 서열번호 2 또는 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (c) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, VH 서열은 인간화 VH 서열이다.
- [0076] 일부 구현예에서, 항-OX40 항체는, 동일하거나 개선된 결합 특성, 예를 들어 해리 속도 및/또는 결합 속도로 OX40에 결합하는 능력을 유지하면서, 참조 서열에 비해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하고 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열번호 17, 18, 또는 서열 번호 19-21 중 어느 하나에서 총 1 내지 5개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 구현예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역(즉, FR)에서 발생한다. 임의로, 항-OX40 항체는 서열번호 17, 18, 또는 서열번호 19-21 중 어느 하나의 VL 서열(해당 서열의 번역 후 변형 포함)을 포함한다. 특정 구현예에서, VL 서열은 (a) 서열번호 5 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (b) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (c) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, VL 서열은 인간화 VL 서열이다.
- [0077] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16을 포함하거나 이로 이루어지는 중쇄 가변 도메인 VH, 및 서열번호 21을 포함하거나 이로 이루어지는 경쇄 가변 도메인 VL을 포함한다.
- [0078] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체이다.
- [0079] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 인간화 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 결합 특성을 개선하기 위해 프레임워크 영역의 위치에 하나 이상의 역 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 인간화 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편의 VH 도메인은 인간에서 잔기로의 역 돌연변이를 포함한다: 카밧 넘버링에 따라 1번 위치에 Glu(1E), 및 임의로 5번 위치에 Gln(5Q), 27번 위치에 His(27H), 28번 위치에 Ala(28A), 38번 위치에 Lys(38K), 40번 위치에 Arg(40R), 43번 위치에 Lys(43K), 48번 위치에 Ile(48I), 67번 위치에 Lys(67K), 68번 위치에 Ala(68A), 및 70번 위치에 Leu(70L) 중 하나 이상. 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 인간화 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편의 VL 도메인은 임의로 인간에서 잔기: 카밧 넘버링에 따른 69번 위치에서 Ser(69S)로의 역 돌연변이를 포함한다.
- [0080] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 (i) 1E, (ii) 1E 및 27H, (iii) 1E, 27H, 48I, 및 70L, (iv) 1E, 27H, 38K, 43K, 48I, 67K, 및 70L, (v) 1E, 40R, 및 43K, (vi) 1E, 5Q, 27H, 28A, 38K, 40R, 43K, 48I, 67K, 68A, 및 70L(모두 카밧 넘버링에 따름)로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 VH 도메인 중의 역-돌연변이된 아미노산 잔기; 및/또는 카밧 넘버링에 따른 VL 도메인 중의 69S의 역-돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 인간화 항체이다.
- [0081] 한 구현예에서, 본 개시내용에 따른 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 카밧 넘버링에 따른 VH 도메인 중의 아미노산 잔기 1E, 5Q, 27H, 28A, 38K, 40R, 43K, 48I, 67K, 68A 및 70L, 및 VL 도메인 중의 아미노산 잔기 69S를 포함하는 인간화 항체이다. 추가 구현예에서, 본 개시내용에 따른 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 카밧 넘버링에 따른 VH 도메인 중의 G62A 돌연변이 및 카밧 넘버링에 따른 VL 도메인 중의 G34A 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 단리된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 하기로 이루어지는 그룹으로

부터 선택된 VH 및 VL 서열의 조합을 포함한다:

조합	하기를 포함하거나 이루어지는 VH 서열	하기를 포함하거나 이루어지는 VL 서열
1	서열번호 11	서열번호 19
2	서열번호 12	서열번호 19
3	서열번호 13	서열번호 19
4	서열번호 14	서열번호 19
5	서열번호 11	서열번호 20
6	서열번호 12	서열번호 20
7	서열번호 13	서열번호 20
8	서열번호 14	서열번호 20
9	서열번호 10	서열번호 17
10	서열번호 9	서열번호 18
11	서열번호 10	서열번호 18
12	서열번호 9	서열번호 19
13	서열번호 11	서열번호 17
14	서열번호 15	서열번호 21
15	서열번호 15	서열번호 18
16	서열번호 16	서열번호 21
17	서열번호 16	서열번호 18

[0083]

[0084]

일부 구현예에서, 항체는 서열번호 16의 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 VH 도메인, 및 서열번호 21의 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 VL 도메인을 포함한다.

[0085]

본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편의 일부 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 고유 또는 변형 Fc 영역일 수 있는 Fc 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE 또는 IgD로부터의 인간 Fc 영역이다. 항체의 유용성에 따라, 적어도 하나의 효과기 기능, 예를 들어 ADCC 및/또는 CDC를 변화(예를 들어, 감소 또는 제거)시키기 위해 변형 Fc 영역을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 효과기 기능을 변화시키기 위한 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 L234A 및 L235A를 갖는 Fc 영역을 포함하는 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편을 제공한다.

[0086]

일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체의 항원-결합 단편은 예를 들어 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 또는 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv)일 수 있다.

[0087]

한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40 세포의 도메인 또는 이의 일부에 결합한다. 일부 구현예에서, OX40 세포의 도메인은 UniProt 식별자 P43489 하의 인간 OX40 단백질의 아미노산 서열 L29-A214, 또는 서열번호 44의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다:

```

MCVGARRLGKGPAAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPC
GPGFYNDVVSCKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFS
PGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPFPARPI TVQPTEAWPRTSQG
PSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQA
DAHSTLAKI (서열번호 44)

```

[0088]

[0089]

한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40 세포의 도메인의 CRD3 영역에서 OX40에 결합한다.

- [0090] 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 생물층 간섭계 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 적어도 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 인간 OX40에 대한 결합 속도 상수(k_{on})를 갖는다.
- [0091] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 생물층 간섭계 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이, $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 미만, $3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 미만, $2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 미만, $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 미만, $9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $2.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 미만, $8 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 미만, $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 미만의 인간 OX40에 대한 해리 속도 상수(k_{off})를 갖는다. 추가 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체이고, 동일한 항체 포맷에서 서열번호 9/10 및 17/18의 VH 및 VL 서열 쌍을 갖는 항체의 인간 OX40에 대한 k_{off} 값의 약 50-500%, 예를 들어 약 80-150%인 인간 OX40에 대한 k_{off} 를 갖는다. 일반적으로, 긴 해리 속도는 형성된 복합체의 느린 해리와 상관이 있는 반면, 짧은 해리 속도는 빠른 해리와 상관이 있다. 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 더 낮은 해리 속도로 표시되는 바와 같이, W02015153513에 기재된 바와 같이 1A7.gr.1의 친화도보다 더 높은 표적 OX40에 대한 친화도를 갖는다.
- [0092] 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 나노몰 내지 피코몰(10^{-8} 내지 10^{-10}) 범위, 예를 들어 $8 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $2 \times 10^{-10} \text{ M}$, 또는 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만의 OX40에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다.
- [0093] 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40을 발현하는 CHO 세포주 또는 T 세포주(예를 들어, 1차 T 세포 및 Jurkat)와 같은 OX40^+ 표적 세포에 표시된 OX40에 특이적으로 결합한다. 세포 기반 분석에서 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 측정된 바와 같이, 항-OX40 항체는 OX40^+ 세포에 대해 강한 결합 효능을 나타내며, 여기서 상기 세포 결합 효능은 약 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 EC50에 의해 반영된다. 추가 구현예에서, EC50은 0.5 nM 이하이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 9/10 및 17/18의 VH 및 VL 서열 쌍을 갖는 항체와 비교하여 표적 세포에 표시된 OX40에 유사하거나 더 높은 결합 효능을 나타낸다. 한 구현예에서, OX40-발현 세포에 대한 항체의 결합 효능은 실시예 1.2에 기재된 바와 같이 세포 기반 분석에서 측정된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 상기 언급된 결합 효능을 갖는 OX40의 결합은 생체내 또는 시험관내에서 세포 효과를 유도하기에 충분하다. 추가 구현예에서, 효과는 T 세포의 활성화 및/또는 증식이다.
- [0094] 한 구현예에서, 항체는 이의 리간드 OX40L이 OX40-발현 세포의 세포 표면에서 결합하는 것처럼 OX40에 결합할 수 있다. 다른 구현예에서, 항체는 OX40/OX40L 신호전달을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 추가 구현예에서, 항체는 OX40/OX40L 경로와 관련된 T 세포 활성화 및 증식을 유도 및/또는 향상시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0095] **항-PD-L1 항체**
- [0096] 본 개시내용은 또한 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항체를 제공한다.
- [0097] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-PD-L1 항체는 6개의 CDR 세트, 즉 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하며, 여기서:
- [0098] CDR-H1은 TYGIN(서열번호 22)의 서열을 포함하고;
- [0099] CDR-H2는 YIYIGNAYTEYNEKFKG(서열번호 23) 또는 YIYIGNGYTEYNEKFKG(서열번호 25)의 서열을 포함하고;
- [0100] CDR-H3은 DLMVIAPKTM DY(서열번호 24)의 서열을 포함하고;
- [0101] CDR-L1은 KASQDVGTAVA(서열번호 26)의 서열을 포함하고;
- [0102] CDR-L2는 WASTRHT(서열번호 27)의 서열을 포함하고;
- [0103] CDR-L3은 QQYSSYPYT(서열번호 28)의 서열을 포함하고,

- [0104] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 정의된다.
- [0105] 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0106] - 서열번호 29, 30, 또는 31의 서열 또는 이와 적어도 80%-90%, 또는 95%-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH 도메인, 및/또는
- [0107] - 서열번호 32, 33, 또는 34의 서열, 또는 이와 적어도 80%-90%, 또는 95%-99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL 도메인.
- [0108] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 31의 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 34의 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0109] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 본 개시내용에 따른 항-PD-L1 항체는 당해 분야에서 잘 확립된 기법에 의해 동일한 표적 항원을 인식하는 유도체 결합 단백질을 만드는 데 사용될 수 있다. 이러한 유도체는 예를 들어 단쇄 항체(scFv), Fab 단편(Fab), Fab' 단편, F(ab')₂, Fv 및 디설파이드 연결된 Fv일 수 있다. 이러한 유도체는 예를 들어, 본 개시내용에 따른 항-OX40 항체 또는 본 개시내용에 따른 항-PD-L1 항체를 포함하는 융합 단백질 또는 접합체(conjugate)일 수 있다. 융합 단백질은 다중특이적 항체 또는 CAR 분자일 수 있다. 상기 접합체는 항체-약물 접합체(ADC)일 수도 있고, 방사성동위원소 등의 검출제와 접합된 항체일 수도 있다.
- [0110] 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PD-L1, 예를 들어 인간 PD-L1에 대해 나노몰-이하 수준, 예를 들어 1×10^{-9} M 미만, 8×10^{-10} M 미만, 6×10^{-10} M 미만, 4×10^{-10} M 미만, 3×10^{-10} M의 해리 상수(K_d)를 갖는다. 한 구현예에서, 본원에 기재된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PD-L1+ 표적 세포 상에 표시된 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 유세포 분석, 생물층 간섭계 및/또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 바와 같이, 항-PD-L1 항체는 PD-L1⁺ 세포에 대해 강한 결합 효능을 나타낸다. 인간 PD-L1에 대한 상기 세포 결합 효능은 시노물구스 PD-L1에 대한 것과 유사하며, 예를 들어 FACS 결합에 의한 EC50 및/또는 BLI 또는 BIAcore에 의한 K_d에 따라 <5배 차이 또는 <3배 차이이다.
- [0111] **OX40xPD-L1 이중특이적 결합 단백질**
- [0112] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 OX40 및 PD-L1 둘 다에 결합할 수 있는 OX40/PD-L1 이중특이적 결합 단백질, 특히 Fabs-in-Tandem 면역글로불린(FIT-Ig)을 제공한다. FIT-Ig의 각 가변 도메인(VH 또는 VL)은 표적 항원 중 하나, 즉 OX40 또는 PD-L1에 결합하는 하나 이상의 "모" 단클론 항체로부터 취득될 수 있다. FIT-Ig 결합 단백질은 본원에 개시된 항-OX40 및 항-PD-L1 단클론 항체, 예를 들어 인간화 항-OX40 및 인간화 항-PD-L1 모 항체의 가변 도메인 서열을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0113] 본 개시내용의 한 양태는 FIT-Ig 분자에서 원하는 적어도 하나 이상의 특성을 갖는 모 항체를 선택하는 것에 관한 것이다. 한 구현예에서, 항체 특성은 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 해리 속도, 세포 결합 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 용해도, 생산 효율, 면역원성, 약동학, 생체이용률, 조직 교차 반응성, 자기 발생성 항원 결합 등으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0114] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 이중특이적 FIT-Ig 단백질은 임의의 도메인간 펩티드 링커 없이 구성된다. 탠덤 결합 부위를 갖는 다가 조각된 면역글로불린 포맷에서는 유연한 링커를 사용하여 결합 부위를 공간적으로 분리하지 않는 한 인접한 결합 부위가 서로 간섭할 것이라는 것이 해당 분야에서 일반적으로 이해되었다. 그러나 본 개시내용의 OX40/PD-L1 FIT-Ig에 대해, 본원에 개시된쇄식에 따른 면역글로불린 도메인의 배열은, 형질감염된 포유동물 세포에서 잘-발현되고, 적절하게 조립되며, 표적 항원 OX40 및 PD-L1에 결합하는 온전한 이중특이적, 다가 면역글로불린-유사 결합 단백질로서 분비되는 폴리펩티드쇄를 생성시킨다는 것이 발견되었다. 하기 실시예를 참조한다. 더욱이, 결합 단백질로부터 합성 링커 서열을 생략하면, 포유동물 면역 체계가 인식할 수 있는 항원 부위의 생성을 피할 수 있으며, 이러한 방식으로 링커를 제거하면 FIT-Ig의 가능한 면역원성이 감소하고, 천연 항체와 같은 순환 반감기가 발생한다.
- [0115] 일부 구현예에서, 본 출원에 따른 OX40 x PD-L1 이중특이적 결합 단백질은 하기를 포함한다:
- [0116] a) OX40에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위; 및

- [0117] b) PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위.
- [0118] 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합 단백질은 본 출원에 따른 임의의 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래되고 본원에 기재된 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 OX40 결합 부위를 형성한다. 일부 추가 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합 단백질은 본원에 따르고 본원에 기재된 임의의 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된 VH/VL 쌍을 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 OX40 결합 부위를 형성한다.
- [0119] 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합 단백질은 본원에 기재되고 본 출원에 따른 임의의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된 6개의 CDR 세트, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 추가로 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 PD-L1 결합 부위를 형성한다. 일부 추가 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합 단백질은 본 출원에 따르고 본원에 기재된 임의의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된 VH/VL 쌍을 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 PD-L1 결합 부위를 형성한다.
- [0120] 한 구현예에서, 본 출원에 따른 이중특이적 OX40/PD-L1 결합 단백질의 OX40 결합 부위 및 PD-L1 결합 부위는 각각 인간화 VH/VL 서열을 포함하여, 인간화된다.
- [0121] **이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질**
- [0122] 한 구현예에서, 본 출원에 따른 OX40 x PD-L1 이중특이적 결합 단백질은 OX40 및 PD-L1에 결합할 수 있는 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질이다. Fabs-in-Tandem 면역글로불린(FIT-Ig) 결합 단백질은 6개의 폴리펩티드쇄를 포함하고 2개의 외부 Fab 결합 영역과 2개의 내부 Fab 결합 영역을 갖춘 4개의 기능성 Fab 결합 영역을 갖는 이중특이적 4가 결합 단백질이다. 결합 단백질은 포맷 (외부 Fab - 내부 Fab - Fc)_x 2를 채택하고 항원 A와 항원 B 모두에 결합한다. 한 양태에서, 본 출원에 따른 OX40 x PD-L1 이중특이적 결합 단백질은 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질이며, 여기서 FIT-Ig 단백질의 2개의 Fab 도메인은 OX40에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 부위를 부여하고; FIT-Ig 단백질의 다른 두 Fab 도메인은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 부여한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 FIT-Ig 결합 단백질은 면역글로불린 도메인 사이에 링커를 사용하지 않는다.
- [0123] 한 구현예에서, 결합 단백질은 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc 또는 VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc를 포함하는 제1 폴리펩티드, 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_A-CH1을 포함하는 제2 폴리펩티드, 및 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_B-CL을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하며, 대안적으로 결합 단백질은 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_B-CL-VH_A-CH1-Fc 또는 VH_A-CH1-VL_B-CL-Fc를 포함하는 제1 폴리펩티드, 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_B-CH1을 포함하는 제2 폴리펩티드, 및 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_A-CL을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하며; 여기서 VL은 경쇄 가변 도메인을 나타내고, CL은 경쇄 불변 도메인을 나타내고, VH는 중쇄 가변 도메인을 나타내고, CH1은 중쇄의 제1 불변 도메인을 나타내고, A는 OX40을 나타내고, B는 PD-L1을 나타낸다. 각각의 이중특이적 결합 단백질은 2개의 상기 제1 폴리펩티드, 2개의 상기 제2 폴리펩티드 및 2개의 상기 제3 폴리펩티드를 포함하는 육량체이며, 4개의 Fab 항원 결합 부위, 즉 OX40 결합을 위한 2개(VL_A-CL과 쌍을 이루는 VH_A-CH1, VH_A-CH1::VL_A-CL로 표시됨) 및 PD-L1 결합을 위한 2개(VL_B-CL과 쌍을 이루는 VH_B-CH1, VH_B-CH1::VL_B-CL로 표시됨)를 나타낸다.
- [0124] 일부 구현예에서, FIT-Ig 결합 단백질에서 VH-CH1과 쌍을 이루는 VL-CL에 의해 형성된 OX40에 결합하는 Fab(예를 들어, A가 OX40인 경우, VL_A-CL 및 VH_A-CH1에 의해 형성되거나; 또는 B가 OX40인 경우, VL_B-CL 및 VH_B-CH1에 의해 형성됨)는 본 출원에 따르고 본원에 기재된 임의의 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된, 6개의 CDR 세트, 즉 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 OX40 결합 부위를 형성한다. 일부 추가의 구현예에서, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 각각 서열번호 1, 2, 3 및 5, 6, 7의 서열; 서열번호 1, 4, 3 및 5, 6, 7의 서열; 서열번호 1, 2, 3 및 8, 6, 7의 서열; 또는 서열번호 1, 4, 3 및 8, 6, 7의 서열을 포함한다.
- [0125] 일부 구현예에서, FIT-Ig 결합 단백질 중 OX40에 결합하는 Fab는 본 출원에 따르고 본원에 기재된 임의의 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된 VH/VL 쌍을 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, VH/VL 쌍은 하기 VH/VL 서열 쌍: 서열번호 11/19, 12/19, 13/19, 14/19, 11/20, 12/20, 13/20, 14/20, 10/17, 9/18, 10/18, 9/19, 11/17, 15/21, 15/18, 16/21 및 16/18로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 서열 또는 이와 적어도

80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, FIT-Ig 결합 단백질 중의 OX40에 결합하는 Fab는 서열번호 16의 VH 서열 및 서열번호 21의 VL 서열을 포함한다.

[0126] 일부 구현예에서, FIT-Ig 결합 단백질에서 VH-CH1과 쌍을 이루는 VL-CL에 의해 형성된 PD-L1에 결합하는 Fab(예를 들어, A가 PD-L1인 경우, VL_A-CL 및 VH_A-CH1에 의해 형성되거나; 또는 B가 PD-L1인 경우, VL_B-CL 및 VH_B-CH1에 의해 형성됨)는 본 출원에 따르면 본원에 기재된 임의의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 유래된, 6개의 CDR 세트, 즉 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함하여 이중특이적 결합 단백질의 PD-L1 결합 부위를 형성한다. 일부 구현예에서, FIT-Ig 결합 단백질에서 VH-CH1과 쌍을 이루는 VL-CL에 의해 형성된 PD-L1에 결합하는 Fab는 6개의 CDR 세트를 포함하며, 여기서 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 각각 서열번호 22, 23, 24 및 26, 27, 28의 서열; 또는 서열번호 22, 25, 24 및 26, 27, 28의 서열을 포함한다. 일부 추가 구현예에서, PD-L1에 결합하는 Fab는 서열번호 31 및 34의 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH/VL 쌍을 포함한다.

[0127] 본 개시내용에서, OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드쇄를 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, CL이 VH_{PD-L1}에 직접 융합된 VL_{OX40}-CL-VH_{PD-L1}-CH1-Fc 또는 CH1이 VL_{OX40}에 직접 융합된 VH_{PD-L1}-CH1-VL_{OX40}-CL-Fc를 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_{OX40}-CH1을 포함하고; 여기서 제3 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_{PD-L1}-CL을 포함한다. 대안의 구현예에서, OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드쇄를 포함하며, 여기서 제1 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, CH1이 VH_{PD-L1}에 직접 융합된 VH_{OX40}-CH1-VL_{PD-L1}-CL-Fc 또는 CL이 VH_{OX40}에 직접 융합된 VL_{PD-L1}-CL-VH_{OX40}-CH1-Fc를 포함하며, 여기서 제2 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, VH_{PD-L1}-CH1을 포함하고; 여기서 제3 폴리펩티드쇄는 아미노에서 카르복실 말단으로, VL_{OX40}-CL을 포함한다. 일부 구현예에서, VL_{OX40}은 항-OX40 항체의 경쇄 가변 도메인이고, CL은 경쇄 불변 도메인이고, VH_{OX40}은 항-OX40 항체의 중쇄 가변 도메인이고, CH1은 중쇄 불변 도메인이고, VL_{PD-L1}은 항-PD-L1 항체의 경쇄 가변 도메인이고, VH_{PD-L1}은 항-PD-L1 항체의 중쇄 가변 도메인이고; 임의로 도메인 VL_{PD-L1}-CL은 항-PD-L1 모 항체의 경쇄와 동일하고, 도메인 VH_{PD-L1}-CH1은 항-PD-L1 모 항체의 중쇄 가변 및 중쇄 불변 도메인과 동일하고, 도메인 VL_{OX40}-CL은 항-OX40 모 항체의 경쇄와 동일하고, 도메인 VH_{OX40}-CH1은 항-OX40 모 항체의 중쇄 가변 및 중쇄 불변 도메인과 동일하다.

[0128] 하나의 구현예에서, VH_{OX40}-CH1은 서열번호 38에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0129] 서열번호 38:

EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGHAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEITNNAKFKDK
ATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN

[0130]

HKPSNTKVDKKVEPKSC

[0131]

[0132] 하나의 구현예에서, VL_{OX40}-CL은 서열번호 37에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0133] 서열번호 37:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLYSNAITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA PGVPDRF
SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPLEPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0134]

[0135] 하나의 구현예에서, VH_{PD-L1}-CH1은 서열번호 36에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0136] 서열번호 36:

```
EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGINWVRQAPGQGLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGR
FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDLMVIAPKTMQDWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
```

[0137]

[0138] 하나의 구현예에서, VL_{PD-L1}-CL은 서열번호 39에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0139] 서열번호 39:

```
DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVGTAFAVWYQKPKGAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSSYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC
```

[0140]

[0141] FIT-Ig 결합 단백질에 대한 상기 식에서, Fc 영역은 적어도 하나의 Fc 효과기 기능(예를 들어 Fc γ R, ADCC 및/또는 CDC에 대한 Fc의 결합)이 예를 들어, LALA 돌연변이(EU 넘버링 체계에 따라, Leu234에서 Ala234로, Leu235에서 Ala235로)의 도입에 의해 감소되거나 제거된 IgG1의 인간 Fc 영역이다. 추가 구현예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 40과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 한 구현예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 삼중 돌연변이 M252Y/S254T/T256E(YTE, EU 넘버링 체계에 따른 넘버링)를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, Fc 영역의 아미노산 서열은 서열번호 41과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다.

[0142] 서열번호 40:

```
DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0143]

[0144] 서열번호 41:

```
DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

[0145]

[0146] 한 구현예에서, 본 개시내용의 FIT-Ig 결합 단백질은 모 항체의 하나 이상의 특성을 유지한다. 일부 구현예에서, FIT-Ig는 모 항체에 필적하는 표적 항원(즉, PD-L1 및 OX40)에 대한 결합 친화도를 유지하는데, 이는 OX40 및 PD-L1 항원 표적에 대한 FIT-Ig 결합 단백질의 결합 친화도가, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭계에 의해 측정된 바와 같이, 각각의 표적 항원에 대한 모 항체의 결합 친화도와 비교하여 10배 넘게 변하지 않음을 의미한다.

[0147] 한 구현예에서, 본 개시내용의 FIT-Ig 결합 단백질은 OX40 및 PD-L1에 결합하고, 제1 폴리펩티드 쇄, 제2 폴리펩티드 쇄, 및 제3 폴리펩티드 쇄로 구성되며, 여기서:

[0148] - 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 35의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고,

[0149] - 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 36의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하고,

- [0150] - 제3 폴리펩티드쇄는 서열번호 37의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0151] 한 구현예에서, 본 개시내용의 FIT-Ig 결합 단백질은 OX40 및 PD-L1에 결합하고, 서열번호 35의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제1 폴리펩티드; 서열번호 36의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제2 폴리펩티드; 및 서열번호 37의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제3 폴리펩티드로 구성된다.
- [0152] **이중특이적 결합 단백질의 특성**
- [0153] 한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 PD-L1 및 OX40 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 인간화 OX40 결합 부위, 또는 키메라 OX40 결합 부위, 예를 들어 인간화 OX40 결합 부위를 포함한다. 한 구현예에서, FIT-Ig 단백질 포맷의 인간화 OX40 결합 부위는 서열번호 10 및 18의 VH 및 VL 쌍으로 이루어지는, 동일한 FIT-Ig 포맷의 키메라 OX40 결합 부위에 비해 OX40 결합에 대해 더 느린 해리 속도를 갖는다. 추가 구현예에서, 키메라 OX40 결합 부위에 대한 인간화 OX40 결합 부위의 해리 속도 비는, 표면 플라스몬 공명 또는 생물층 간섭계에 의해 측정된 바와 같이, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% 미만이다. 한 구현예에서, OX40에 대해 본원에 기재된 FIT-Ig 결합 단백질의 해리 속도는, 표면 플라스몬 공명 또는 생물층 간섭계에 의해 측정된 바와 같이, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, $9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만이다. 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 FIT-Ig 결합 단백질 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 10^{-8} 내지 10^{-10} 범위, 예를 들어 $8 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 미만, $8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $2 \times 10^{-9} \text{ M}$, or less than $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 미만, $8 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $6 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만, $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만 또는 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 미만의 OX40에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다. 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 FIT-Ig 결합 단백질 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40 결합에 관하여 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 의 범위, 예를 들어 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 해리 속도, 및 $1 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 의 범위, 예를 들어 $7 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 미만의 K_D 를 갖는다.
- [0154] 한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 PD-L1 및 OX40에 결합할 수 있는 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 세포 배양 배지로부터 1-단계 정제 후에 SEC-HPLC에 의해 검출된 바와 같이 90% 이상의 순도를 갖는다. 한 구현예에서, 1-단계 정제된 결합 단백질은 SEC-HPLC에 의해 검출된 바와 같이 91%, 92%, 93%, 95%, 97%, 99% 이상의 순도를 갖는다.
- [0155] 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 PD-L1 발현 세포 및 OX40 발현 세포 모두에 결합할 수 있다. 한 구현예에서, PD-L1 발현 세포는 인간 PD-L1 형질감염된 CHO 세포주 또는 종양 세포이다. 한 구현예에서, OX40-발현 세포는 OX40-발현 T 세포/세포주, 예를 들어 CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, Treg 세포 또는 Jurkat 세포이다.
- [0156] 한 구현예에서, 세포 기반 분석에서 유세포 분석에 의해 측정된 바와 같이, OX40-발현 세포에 대한 이중특이적 FIT-Ig결합 단백질의 결합 효능은 이중특이적 FIT-Ig 단백질과 동일한 OX40 결합에 대한 VH/VL 서열 쌍을 포함하는 상응하는 모 항-OX40 단클론 IgG 항체와 동등하거나 이에 필적할 만하다. 한 구현예에서, PD-L1 발현 세포에 대한 이중특이적 FIT-Ig결합 단백질의 결합 효능은, 예를 들어 실시예 3 및 4에 기재된 분석에서, 유세포 분석에 의해 측정된 바와 같이, 이중특이적 결합 단백질과 동일한 PD-L1에 대한 VH/VL 서열 쌍을 포함하는 상응하는 모 항-PD-L1 단클론 IgG 항체와 동등하거나 이에 필적할 만하다.
- [0157] 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 결합 단백질은 OX40, PD-L1, 또는 둘 다의 생물학적 기능을 조절할 수 있다. 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 PD-L1 의존성의 측면에서 OX40 신호전달을 활성화할 수 있다. 한 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 결합 단백질은 OX40 신호 경로에 의한 T 세포의 활성화를 나타낸다. 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 PD-L1 의존적 방식으로 종양 세포에 대해 OX40-활성화 T 세포 세포독성을 나타낸다. 한 구현예에서, 본 개시내용의 이중특이적 결합 단백질은 PD-L1 의존적 방식으로 종양 세포에 대한 T

세포의 사이토카인 분비 활성을 향상시키는 데 사용된다.

[0158] 한 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 PD-L1-의존적 OX40 활성화를 나타낸다. 한 구현예에서, PD-L1 발현 세포 대 OX40 발현 T 세포의 비는 약 1:1이다. 추가 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 결합 단백질은, PD-L1 발현 세포의 부재 하에 T 세포에서 훨씬 적은 OX40 활성화와 비교하여, 및 이중특이적 FIT-Ig 단백질과 동일한 PD-L1 결합에 대한 VH/VL 서열 쌍을 포함하는 상응하는 모 항-PD-L1 단클론 IgG 항체 및 이중특이적 FIT-Ig 단백질과 동일한 OX40 결합에 대한 VH/VL 서열 쌍을 포함하는 상응하는 모 항-OX40 단클론 IgG 항체의 조합에 의해 유도된 PD-L1 발현 세포의 존재 하에 T 세포 활성화에서 훨씬 적은 OX40 활성화와 비교하여, PD-L1 발현 세포의 존재 하에 T 세포 활성화에서 OX40 활성화를 나타낸다.

[0159] 한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 종양 세포에 대한 T 세포 세포독성 또는 사이토카인 분비 활성을 초래한다. 추가 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질 결합 단백질은 항종양 면역을 향상시키고/시키거나 종양 면역 회피를 방해한다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 항종양 활성, 예를 들어 종양 부담 감소, 종양 성장 억제 또는 신생물 세포 확대 억제를 나타낸다. 일부 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 슈퍼-클러스터링을 매개할 수 있다. 일부 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 고차 OX40 클러스터링을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 조건부 PD-L1 의존적 방식으로 T 세포를 활성화할 수 있다. 일부 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은 PD-L1 가교결합을 통해 충분한 OX40 신호전달을 촉발할 수 있어, 예를 들어 항-OX40 단독 요법의 한계를 극복할 수 있다. 일부 구현예에서, 이중특이적 OX40/PD-L1 FIT-Ig 결합 단백질은, 적합한 대조군, 예를 들어 2개의 모 항체의 조합의 부가 효과와 비교하여, 당업계에 공지된 방법에 의해 측정된 바와 같이, IL-2 생산과 같은 T 세포 활성을 상승적으로 자극한다.

[0160] 핵산, 벡터, 및 숙주 세포

[0161] 추가 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산; 본 개시내용의 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산; 및 OX40 및 PD-L1 모두와 결합할 수 있는, Fabs-in-Tandem 면역글로불린 (FIT-Ig) 결합 단백질을 포함한 이중특이적 결합 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산을 제공한다. 이러한 핵산은 다양한 유전적 분석을 수행하기 위해 또는 본원에 기재된 항체 또는 결합 단백질의 하나 이상의 특성을 발현, 특성화 또는 개선하기 위해 벡터에 삽입될 수 있다. 벡터는 본원에 기재된 항체 또는 결합 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 핵산 분자는 벡터를 운반하는 특정 숙주 세포에서 항체 또는 결합 단백질의 발현을 허용하는 적절한 전사 및/또는 번역 서열에 작동적으로 연결된다. 본원에 기재된 결합 단백질의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 클로닝하거나 발현시키기 위한 벡터의 예에는 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV 및 pBJ 및 이들의 유도체가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0162] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 항체 또는 결합 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터를 발현하거나 발현할 수 있는 숙주 세포를 제공한다. 본 개시내용에 유용한 숙주 세포는 원핵생물이거나 진핵생물일 수 있다. 예시적인 원핵 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이이다. 본 개시내용에서 숙주 세포로서 유용한 진핵 세포에는 원핵생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포가 포함된다. 예시적인 진균 세포는 사카로마이세스 세레비지아에를 포함하는 효모 세포이다. 본 개시내용에 따른 숙주 세포로서 유용한 예시적인 동물 세포는 포유동물 세포, 조류 세포 및 곤충 세포를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 포유동물 세포는 CHO 세포, HEK 세포, Jurkat 세포 및 COS 세포를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0163] 생산 방법

[0164] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 항체 또는 항원-결합 단편을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양 배지 중에서 숙주 세포가 OX40에 결합할 수 있는 항체 또는 단편을 발현하도록 하기에 충분한 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는, 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생산하는 방법을 제공한다.

[0165] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양 배지 중에서 숙주 세포가 PD-L1에 결합할 수 있는 항체 또는 단편을 발현하도록 하기에 충분한 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 생산하는 방법을 제공한다.

[0166] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 FIT-Ig 결합 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양 배지 중에서 OX40 및 PD-L1에 결합할 수 있는 결합 단백질을 발현하도록 하기에 충분한 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는, OX40 및 PD-L1에 결합할 수 있는 이종특이적, 다가 결합 단백질, 구체적으로 OX40 및 PD-L1에 결합하는 FIT-Ig 결합 단백질의 생산하는 방법을 제공한다. 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 단백질은 단리되어 본원에 개시된 다양한 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0167] 항체 및 결합 단백질의 용도

[0168] 인간 OX40 및/또는 PD-L1에 결합하는 능력을 고려하여, 본원에 기재된 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 본원에 기재된 이종특이적 다가 결합 단백질을 예를 들어, 표적 항원 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 OX40 또는 PD-L1, 또는 둘 다를 검출하는 데 사용할 수 있다. 본 개시내용의 항체, 항원-결합 단편 및 결합 단백질은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 방사성 면역분석(RIA) 또는 조직 면역조직화학과 같은 통상적인 면역분석에 사용될 수 있다. 본 개시내용은 생물학적 샘플을 본 개시내용의 항체, 이의 항원-결합 부분 또는 결합 단백질과 접촉시키고, 표적 항원에 대한 결합이 일어나는지 여부를 검출하고, 이에 의해 생물학적 샘플에서 표적의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 OX40 또는 PD-L1을 검출하는 방법을 제공한다. 항체, 항원-결합 단편 또는 결합 단백질을, 결합되거나 결합되지 않은 항체/단편/결합 단백질의 검출을 용이하게 하기 위해 검출 가능한 물질로 직접적으로 또는 간접적으로 표지할 수 있다. 적합한 검출 물질에는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질 및 방사성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예에는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제가 포함된다. 적합한 보결분자단 복합체의 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되며; 적합한 형광 물질의 예에는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린이 포함되고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하며; 적합한 방사성 물질의 예에는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 또는 ^{153}Sm 이 포함된다.

[0169] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체, 이의 항원-결합 단편은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 인간 PD-L1 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 항체, 이의 항원-결합 단편은 본 개시내용의 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 결합 단백질이 교차 반응하는 PD-L1을 갖는 인간 대상체(subject)에서 또는 다른 포유동물 대상체에서, 인간 PD-L1 활성을 억제하는 데, 예를 들어 PD-L1 발현 세포를 함유하는 세포 배양물에서 PD-L1과 관련된 세포 신호전달을 억제하는 데 사용될 수 있다.

[0170] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 PD-L1 활성이 유해한 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 본 개시내용의 항체 또는 이종특이적 결합 단백질을 제공하며, 여기서 항체 또는 결합 단백질은 대상체에서 PD-L1에 의해 매개되는 활성이 감소하도록 대상체에게 투여된다. 본원에 사용된 "PD-L1 활성이 유해한 장애"라는 용어는 장애를 앓고 있는 대상체에서 PD-L1과 이의 수용체(예를 들어, PD-1)와의 상호작용이 장애의 병태생리학의 원인이 되거나 장애 악화에 기여하는 요인인 질환 및 기타 장애를 포함하고자 한다. 이러한 질환 또는 장애의 예로는 면역 회피와 관련된 종양, 또는 종양 면역 회피를 나타내는 종양이 있다. 따라서, PD-L1 활성이 유해한 장애는 PD-L1 활성의 억제가 장애의 증상 및/또는 진행을 완화시킬 것으로 예상되는 장애이다. 한 구현예에서, 본 개시내용의 항-PD-L1 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이종특이적 결합 단백질은 악성 세포의 성장 또는 생존을 억제하거나 종양 부담을 감소시키는 방법에 사용된다.

[0171] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 이종특이적 결합 단백질(FIT-Ig)은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 PD-L1-발현 종양 세포에 대한 T 세포 세포독성 또는 사이토카인-분비 활성을 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 이종특이적 결합 단백질은 본 개시내용의 항체, 이의 항원 결합 단편, 또는 이종특이적 결합 단백질과 교차반응하는 PD-L1을 갖는 인간 대상체 또는 다른 포유동물 대상체에서 PD-L1 발현 악성 세포의 성장 또는 확대를 억제하는 데 사용될 수 있다.

[0172] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 OX40-매개된 신호전달 활성이 유리한 질환 또는 장애(예를 들어, OX40⁺ T 세포 침윤 종양)를 앓고 있는 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 본 개시내용의 항체 또는 이종특이적 결합 단백질을 제공한다. 본원에서 "OX40-매개된 신호전달 활성이 유리한 장애"라는 용어는 장애를 앓고 있는 대상체에서 OX40의 슈퍼-클러스터링 및/또는 활성화가 T 세포를 활성화시키고 종양과 같은 질환 또는 장애의 효과를 역전시키고/증상을 완화시키고/진행을 늦추는 질환 및 기타 장애를 포함하도록 의도된다. 한 구현예에서, 본 개시내용의 항-OX40 항체, 이의 항원-결합 단편 또는 이종특이적 결합 단백질은 악성 세포의 성장 또는 생존을 억제하거나 종양 부담을 감소시키는 방법에 사용된다.

- [0173] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 T 세포의 OX40 활성화를 통해 대상체에서 PD-L1 발현 악성종양을 치료하는데 사용하기 위한 PD-L1/OX40 이중특이적(FIT-Ig) 결합 단백질을 제공하며, 여기서 결합 단백질이 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 악성종양은 종양, 예를 들어 결장암과 같은 고형 종양이다.
- [0174] 일부 추가 구현예에서, 본 개시내용의 항체(이의 항원-결합 단편 포함) 및 결합 단백질은 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 통합되거나 이의 제조에 사용된다(상기 기재됨). 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 개시내용의 항체 또는 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"에는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예에는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합 중 하나 이상이 포함된다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 다가 알코올(만니톨 또는 소르비톨과 같은) 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 약제학적으로 허용되는 담체는 조성물에 존재하는 항체 또는 결합 단백질의 유효기간 또는 유효성을 향상시키는 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제와 같은 소량의 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다.
- [0175] 본 개시내용의 방법은 주사(예를 들어, 일시 주사 또는 연속 주입)에 의해 비경구 투여용으로 제형화된 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 주사용 제형은 보존제가 첨가된 단위 투여형(예를 들어, 앰플 또는 다회투여 용기)으로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 주요 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클(예를 들어 발열원이 없는 멸균수)과 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.
- [0176] 본 개시내용의 용도는 데포 제제로서 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 지속성 제형은 이식(예를 들어, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일 중의 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지로, 또는 난용성 유도체(예를 들어, 난용성 염)로 제형화될 수 있다.
- [0177] 본 개시내용의 항체, 이의 항원-결합 단편, 또는 결합 단백질은 또한 다양한 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다. 본원에 기재된 항체, 이의 항원-결합 단편 및 결합 단백질은 단독으로 또는 추가 작용제, 예를 들어 추가 치료제와 조합하여 사용될 수 있으며, 추가 작용제는 이의 의도된 목적을 위해 당업자에 의해 선택된다. 예를 들어, 추가 작용제는 본 개시내용의 항체 또는 결합 단백질에 의해 치료되는 질환 또는 상태를 치료하는데 유용한 것으로 당업계에서 인식된 치료제일 수 있다. 추가 작용제는 또한 치료 조성물에 유익한 속성을 부여하는 작용제, 예를 들어 조성물의 점도에 영향을 미치는 작용제일 수 있다.
- [0178] **약제학적 조성물**
- [0179] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 항체, 또는 이의 항원-결합 부분, 또는 이중특이적 다가 결합 단백질(즉, 주요 활성 성분) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용의 2개 이상의 항체, 예를 들어 항-OX40 항체 및 항-PD-L1 항체를 포함할 수 있다. 추가 구현예에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 본 개시내용에 따른 적어도 하나의 항체, 및 적어도 하나의 이중특이적 결합 단백질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 본 개시내용의 하나 이상의 항체 또는 결합 단백질을 포함한다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 항체(예를 들어, 항-OX40 및 항-PD-L1 항체) 또는 이의 항원-결합 단편(들)의 조합, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 특히, 본 개시내용은 OX40 및 PD-L1에 결합할 수 있는 적어도 하나의 FIT-Ig 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 개시내용의 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 추가 성분에는 예방제 및/또는 치료제, 검출제, 예를 들어 항종양 약물, 세포독성제, 다양한 특이성의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 검출 가능한 표지 또는 리포터가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 한 구현예에서, 약제학적 조성물은 PD-L1 활성이 유해하고/하거나 OX40 활성이 유리한 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 추가적인 예방제 또는 치료제, 즉 본 개시내용의 항체 또는 결합 단백질 이외의 작용제를 포함한다. 한 구현예에서, 추가적인 예방제 또는 치료제는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 개선에 유용하거나, 사용되었거나, 현재 사용되고 있는 것으로 공지되어 있다.
- [0180] 본 개시내용의 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하고; 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료, 관리 또는 개선시키고; 및/또는 연구하는 데 사용하기 위한 것이지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 조성물은 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 부형제는 일반적으로

1차 활성 성분 이외에(즉, 본 개시내용의 항체, 이의 항원 결합 부분 또는 결합 단백질 이외에) 조성물에 원하는 특징을 제공하는 임의의 화합물 또는 화합물의 조합이다.

[0181] **치료 방법 및 의학적 용도**

[0182] 한 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 본 개시내용에 따른 하나 이상의 항체 및/또는 하나 이상의 이중특이적 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함한다.

[0183] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 T 세포를 활성화하는 방법을 제공한다. 일부 추가 구현예에서, T 세포의 활성화는 T 세포 매개 항종양 활성의 유도 및/또는 강화를 초래할 수 있다. 일부 추가 구현예에서, 항종양 활성은 종양 세포에 대한 세포독성 및/또는 사이토카인 생산이며, 여기서 상기 사이토카인은 예를 들어 IL-2 또는 IFN- γ 이다. 일부 추가 구현예에서, T 세포는 CD8⁺T 세포이다. 일부 다른 구현예에서, T 세포는 CD4⁺T 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포는 효과기 T 세포이다.

[0184] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에게 본 개시내용에 따른 하나 이상의 항체 및/또는 하나 이상의 이중특이적 결합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 암은 중앙 면역 회피, 또는 중앙 면역 회피를 나타내는 종양이다. 일부 추가 구현예에서, 암은 T 세포 기능 장애가 있는 암과 같이 T 세포 활성화에 반응하는 암이다. 일부 추가 구현예에서, 암은 예를 들어 정상 대상체 또는 정상 세포에서의 수준과 비교하여 PD-L1 단백질 발현 수준이 증가되거나 PD-L1을 암호화하는 핵산 수준이 증가된 암이다. 한 구현예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 OX40-매개 신호전달 활성이 유리한 장애(예를 들어 OX40⁺ T 세포 침윤 종양)를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 항-OX40 항체 또는 이의 OX40-결합 단백을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 항체 또는 결합 단백질은 OX40에 결합할 수 있고 OX40을 발현하는 세포에서 OX40 매개 신호전달을 활성화할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료에 있어서 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단백질의 유효량의 용도를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료를 위한 조성물의 제조에 있어서 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단백질의 용도를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 항-OX40 항체 또는 이의 항원-결합 단백을 제공한다.

[0185] 본원에 기재된 방법 또는 용도의 추가 구현예에서, 본 개시내용의 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단백질은 OX40에 결합하고, 서열번호 16의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 VH 도메인, 및 서열번호 21의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 VL 도메인을 포함한다.

[0186] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 PD-L1 활성이 유해한 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 항-PD-L1 항체 또는 이의 PD-L1-결합 단백을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 항체 또는 결합 단백질은 PD-L1에 결합하고 PD-L1이 PD-L1의 수용체, 예를 들어 PD-1과 상호작용하는 것을 차단하고, 따라서 PD-L1의 수용체를 발현하는 세포에서 PD-L1-관련 신호전달을 억제할 수 있다.

[0187] 본원에 기재된 방법 또는 용도의 추가 구현예에서, 본 개시내용의 항-PD-L1 항체 또는 항원-결합 단백질은 PD-L1에 결합하고, 서열번호 31의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 VH 도메인, 및 서열번호 34의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 VL 도메인을 포함한다.

[0188] 다른 구현예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 OX40-매개된 신호전달 활성이 유리하고(예를 들어 OX40⁺ T 세포 침윤된 종양) 및/또는 PD-L1 활성이 유해한 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 PD-L1 및 OX40에 결합할 수 있는 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료에 있어서 본원에 기재된 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질의 유효량의 용도를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료를 위한 조성물의 제조에 있어서 본원에 기재된 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백질의 용도를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 장애의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 이의 이중특이적 FIT-Ig 결합 단백을 제공한다.

[0189] 본원에 기재된 방법 또는 용도의 추가 구현예에서, 본 개시내용의 FIT-Ig 결합 단백질은 OX40 및 PD-L1에 결합하고, 서열번호 35의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제1 폴리펩티드, 서열번호 36의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제2 폴리펩티드, 및 서열번호 37의 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이루어지는 제3 폴리펩티드로 구성된다.

[0190] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체 또는 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애는 악성 세포의 세포 표면에서 PD-L1을 발현하는 다양한 악성종양을 포함한다. 일부 추가 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체 또는 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애는 예를 들어 PD-L1/PD-1 상호작용을 통해 종양 면역 회피를 나타내는 종양을 포함한다. 다른 구현예에서, 항체 또는 결합 단백질은 악성 세포의 성장 또는 생존을 억제한다. 다른 구현예에서, 항체 또는 결합 단백질은 종양 부담을 감소시킨다. 또 다른 구현예에서, 암은 결장암이다.

[0191] 본원에 기재된 치료 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에게 추가 활성 성분을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 추가 활성 성분은 의도된 치료 목적을 위해 본 발명의 항체 또는 결합 단백질, 예를 들어 항종양 활성을 갖는 또 다른 약물과 함께 적합하게 존재한다. 본 개시내용의 치료 방법에서, 추가적인 활성 성분은 본 개시내용의 항체 또는 결합 단백질을 포함하는 조성물에 통합될 수 있으며, 이 조성물은 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용의 치료 방법은 본원에 기재된 항체 또는 결합 단백질을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계, 및 추가의 활성 성분을 대상체에게 본 개시내용의 항체 또는 결합 단백질을 투여하는 단계 전에, 이와 동시에, 또는 이후에 대상체에게 투여하는 별도의 단계를 포함할 수 있다.

[0192] 이제 본 개시내용을 상세히 기재하였지만, 이는 단지 예시를 위해 포함되고 본 개시내용을 제한하려는 의도가 아닌 하기 실시예를 참조함으로써 더욱 명확하게 이해될 것이다.

[0193] 실시예

[0194] 실시예 1 항-OX40 항체의 생성

[0195] 실시예 1.1 항-OX40 단클론 항체 8G9D5C5의 스크리닝, 클로닝 및 서열 분석

[0196] 항-OX40 단클론 항체를 표준 하이브리도마 스크리닝 프로토콜에 의해 생성시켰다. 면역화를 위해 세포 면역화 및 유전자 총(DNA 면역화)을 사용하였고, 여기서 면역원은 각각 인간 OX40을 과발현하는 HEK293 세포 및 인간 OX40 유전자를 함유하는 발현 플라스미드였다. CHO-K1 세포를 발현하는 인간 OX40을 사용하여 하이브리도마 클론을 결합 활성 및 생물학적 활성에 대해 스크리닝하였다. 추가 특성화를 위해 클론 8G9D5C5를 선택하였다.

[0197] 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시키기 위해, TRIzol 시약(Cat. No. 15596, Invitrogen)을 사용하여 $>5 \times 10^6$ 세포로부터 클론 8G9D5C5의 전체 RNA를 단리하고, SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix(18080, Invitrogen)를 사용하여 역 전사를 수행하여 cDNA를 생산하고, 이를 마우스 Ig-프라이머 세트(Cat. No. 69831-3, Novagen)를 사용하여 PCR에 주형으로서 적용하였다. PCR 산물을 SYBR Safe DNA 겔 착색제를 사용하여 1.2% 아가로스 겔에서 전기영동을 통해 분석하였다. 정확한 크기의 DNA 단편을 NucleoSpin® Gel 및 PCR Clean-up(Cat. No. 740609, MACHEREY-NAGEL)으로 정제하고, pMD18-T 벡터에 개별적으로 서브클로닝하고, 이어서 수용성 이 콜라이 세포로 형질전환시켰다. 각 형질전환으로부터 15개의 콜로니를 선택하고 삽입된 단편의 서열을 DNA 서열분석으로 분석하였다. 서열분석된 콜로니의 대다수(15개 중 적어도 8개)가 동일한 서열을 생성하는 경우 서열을 확인하였다. 클론 8G9D5C5 가변 영역의 아미노산 서열을 표 1에 나열하였다. 보체 결합인자 영역(CDR)은 카밧 넘버링 체계에 따라 밑줄 표시되었다.

[0198] [표 1]

[0199] 항-OX40 항체의 가변 영역의 아미노산 서열

Ab	쇄	서열번호	아미노산 서열
8G9D5C5	VH	9	QVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGHAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEITNYNGKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARDLLMPYWGQGTLLTVSA
	VL	17	DIVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNGITYLYWYLQKPGQSPHLLIYQMSNLPAGVPPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEADVGIYYCAQNLELPFTFGSGTKLEIK

[0200]

[0201] 실시예 1.2 키메라 항체 생성 및 특성화

[0202] 표 1에 제공된 8G9D5C5의 VH 및 VK 유전자를 각각 합성하고 인간 IgG1 및 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 벡터에 클로닝하였다. 중쇄 벡터 및 경쇄 벡터 모두로 동시-형질감염된 293E 세포를 7일 동안 배양하고, 이어서 상등액을 수확하고 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다.

[0203] 정제된 키메라 항체를 EM1007-44c로 지정하였다. 세포 표면상의 인간 또는 시노 OX40에 대한 결합 활성을 FACS에 의해 평가하였다. 간략하게, 5×10^5 세포를 96-웰 플레이트(Corning, #3799)의 각 웰에 시딩하였다. 세포를 400 g에서 5분간 원심분리하고 상등액을 버렸다. 각 웰에 대해 100 nM 부터 시작하여 3x 연속 희석된 항체 100 μ l를 첨가하고 세포와 혼합하였다. 60분 동안 4°C 배양 후, 플레이트를 세척하여 과잉의 항체를 제거하였다. 이어서 2차 Alexa Fluor® 647-접합된 염소 항-인간 IgG 항체(1:500 신선한 희석, Jackson ImmunoResearch, #109-606-098)를 첨가하고 실온에서 20분 동안 세포와 함께 배양하였다. 원심분리 및 세척의 추가 라운드 후, 세포를 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 판독하기 위해 FACS 완충액에 재현탁하였다. 중앙 형광강도(MFI) 판독값을 항체 농도에 대해 플롯팅하고 GraphPad Prism 8.0으로 분석하였다.

[0204] 하류 신호전달을 활성화하는 OX40의 능력을 Jurkat-OX40-NF- κ B 루시퍼라제 분석에서 검출하였다. 간략하게, 고 결합 플레이트(Corning, #3361)를 4°C에서 100 nM 부터 시작하여 밤새 EM1007-44c의 3x 연속 희석물로 코팅하고, 세척하고, 이어서 OX40-NF-KB 리포터 웰당 1×10^5 세포를 시딩하고 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 ONE-Glo™ 발광 분석 키트(Promega, Cat. #E6130) 시약을 제조하고 제조사의 지침에 따라 첨가하였다. Varioskan™ LUX 마이크로플레이트 판독기(ThermoFisher Scientific)에서 발광 신호에 대해 플레이트를 판독하였다.

[0205] EM1007-44c를, 1차 T 세포를 활성화하고 T 세포 증식을 촉진하는 이의 능력에 대해 추가로 평가하였다. 간략하게, 1차 T 세포 자극을 100 nM 및 1 μ g/ml OKT3(Biolegend, #317326)에서 시작하여 4°C에서 밤새 배양에 의해 EM1007-44c의 3x 연속 희석물로 공동 코팅된 고 결합 플레이트(Corning, #3361)에서 측정하였다. PD-L1+ T 세포를 상업용 인간 T 세포 분리 키트(Stemcell Technologies, #17951)를 사용하여 인간 PBMC로부터 정제하고, 새로 코팅되고 PBS 세척된 플레이트에 웰당 1×10^5 세포로 첨가하였다. 플레이트를 37°C 및 5% CO2에서 96시간 동안 배양하였다. 각 웰에 대해, IFN- γ 정량화를 위해 100 μ l의 상등액을 수집한 다음, 50 μ l/웰의 CellTiter-Glo® 발광 세포 생존력 분석(Promega, #G7570) 혼합물을 첨가하고 제조사의 지침에 따라 세포 생존력 검출을 위해 실온에서 10분간 배양하였다.

[0206] 하기 표 2에 요약된 데이터는 EM1007-44c가 세포 표면에서 인간 OX40 및 시노 OX40의 유사한 결합 활성을 가지며 OX40 신호전달 및 1차 T 세포를 활성화할 수 있음을 입증한다.

[0207] [표 2]

[0208] EM1007-44c의 특성화

특성화 분석	결과
CHO-K1-hOX40에 대한 결합, EC50 (nM)	2.6
CHO-K1-cOX40에 대한 결합, EC50 (nM)	2.11
T 세포 활성화 분석, IFN- γ 분비, EC50 (nM)	1.18
T 세포 활성화 CTG, EC50 (nM)	3.7
OX40-Jurkat-NF- κ B-리포터, EC50 (nM)	0.43
OX40-Jurkat-NF- κ B-리포터, 최대 변화 배수	1.517

[0209]

[0210] 실시예 1.3 EM1007-44c의 인간화

[0211] 표 1에 제공된 EM1007-mAb044c 가변 영역 유전자를 사용하여 인간화 항체를 생성시켰다. 먼저, EM1007-mAb044c의 VH 도메인 및 VK(VL 카파) 도메인의 아미노산 서열을, 전체적으로 가장 잘 일치하는 인간 생식계열 Ig V-유전자 서열을 찾기 위해 V BASE 데이터베이스(<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php>)로부터 입수할 수 있는 인간 Ig V-유전자 서열과 비교하였다. VH 및 VK의 프레임워크 분절을 또한 V BASE의 J 영역 서열에서 이용 가능한 FR 서열과 비교하여 각각 쥐 VH 및 VK 영역과 가장 높은 상동성을 갖는 인간 프레임워크를 찾았다. 경쇄의 경우 가장 가까운 인간 V-유전자 일치는 O1 유전자였으며; 중쇄의 경우 가장 가까운 인간 일치는 VH1-69 유전자였다. 이어서, 인간화 가변 도메인 서열을, EM1007-044c 경쇄의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3이 O1 유전자 및 JK2 프레임워크 4 서열의 프레임워크 서열에 접목된 반면, EM1007-mAb044c 중쇄의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3은 VH1-69 및 JH1 프레임워크 4 서열의 프레임워크

크 서열에 접목되도록 설계하였다.

[0212] 한편으로, 마우스 아미노산이 루프 구조 또는 VH/VK 인터페이스를 지원하는 데 중요한 프레임워크 위치를 식별하기 위해 EM1007-mAb044c의 3차원 Fv 모델을 생성시켰다. 인간 프레임워크 서열 내의 상응하는 잔기는 친화성/활성을 유지하기 위해 확인된 위치에서 마우스 잔기로 역 돌연변이되어야 한다. EM1007-mAb044c VH 및 VK에 대해 여러 가지 바람직한 역 돌연변이가 표시되었으며, 대안적인 VH 및 VK 설계를 하기 표 3에 나타난 바와 같이 구성하였다. EM1007-mAb044c의 CDR-H2 및 CDR-L1에서 발견되는 "NG"(Asn-Gly) 패턴은 탈아민화되기 쉽고 제조 과정에서 이질성을 초래할 수 있으므로, NG(Asn-Gly)에서 NA(Asn-Ala)로의 돌연변이(굵은 이탤릭체로 강조 표시)를 함유하는 VH 및 VL 도메인, 예를 들어 "EM1007-mAb044VH(G-A)" 및 "EM1007-mAb044VK(G-A)"로 지정된 것들을 또한 설계하고 평가하였다.

[0213] [표 3]

[0214] 역 돌연변이가 있는 EM1007-044에 대한 인간화 VH/VK 설계*

VH 또는 VK 식별자를 갖는 인간화 EM1007-mAb044	아미노산 서열
	1234567890123456789012345678901234567890
EM1007-mAb044VH	QVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGHAFSSSWMNWVKQR PGKGLEWIGRIYPGDEITNYNGKFKDKATLTADKSSSTAY MQLSSSLTFEDSAVYFCARDLLMPYWGQGLTVTVSA (서열번호 9)
EM1007-mAb044VH(G-A)	QVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGHAFSSSWMNWVKQR PGKGLEWIGRIYPGDEITNYN AK FKDKATLTADKSSSTAY MQLSSSLTFEDSAVYFCARDLLMPYWGQGLTVTVSA (서열번호 10)
HuEM1007-mAb044VH.1	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SGGTFSSSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIYPGDEITNYNGKFKDRVTITADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 11)
HuEM1007-mAb044VH.1a	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SG HT TFSSSWMNWVRQA PGQGLEWMGRIYPGDEITNYNGKFKDRVTITADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 12)
HuEM1007-mAb044VH.1b	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SG HT TFSSSWMNWVRQA PGQGLEW I GRIYPGDEITNYNGKFKDRVT I TADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 13)
HuEM1007-mAb044VH.1c	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SG HT TFSSSWMNWVRQA PG K GLEW I GRIYPGDEITNYNGKFKDK V TLTADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 14)
HuEM1007-mAb044VH.1d	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SGGTFSSSWMNWVR QR PGKGLEWMGRIYPGDEITNYN AK FKDRVTITADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 15)
HuEM1007-mAb044VH.1e	<u>EV</u> QLQQSGAEVKKPGSSVKVSC KA SG HA FSSSWMNWV KQR PGKGLEW I GRIYPGDEITNYN AK FKDKATLTADKSTSTAY MELSSLRSED TAV YYCARDLLMPYWGQGLTVTVSS (서열번호 16)

[0215]

VH 또는 VK 식별자를 갖는 인간화 EM1007-mAb044	아미노산 서열 1234567890123456789012345678901234567890
EM1007-mAb044VK	DIVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNGITYLYW YLQKPGQSPHLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGIIYYCAQNLELPFTFGSGTKLEIK (서열번호 17)
EM1007-mAb044VK(G-A)	DIVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNAITYLYW YLQKPGQSPHLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGIIYYCAQNLELPFTFGSGTKLEIK (서열번호 18)
HuEM1007-mAb044VK.1	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLYSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYYCAQNLELPFTFGGQGTKLEIK (서열번호 19)
HuEM1007-mAb044VK.1a	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLYSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYYCAQNLELPFTFGGQGTKLEIK (서열번호 20)
HuEM1007-mAb044VK.1b	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLYSNAITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVIYYCAQNLELPFTFGGQGTKLEIK (서열번호 21)

*가트 넘버링 체계에 따른 CDR 서열은 단일 밑줄 표시되고; 프레임워크 역-돌연변이는 이중 밑줄 표시되며, NG(Asn-Gly)에서 NA(Asn-Ala)로의 돌연변이는 굵은 이탤릭체 표시된다.

인간화 VH 및 VK(VL 카파) 유전자를 합성하고 이어서 각각 LALA 돌연변이가 있는 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 및 인간 카파 경쇄 불변 도메인을 함유하는 벡터에 클로닝하였다(하기에 서열을 나타낸다).

LALA 돌연변이가 있는 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열(서열번호 42):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

인간 카파 경쇄 불변 도메인의 아미노산 서열(서열번호 43):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

인간화 VH 및 인간화 VK 쇄의 짝짓기는 CDR-H2 및 CDR-L1에서 G-A 돌연변이로 인한 잠재적인 영향을 평가하기 위해 "EM1007-mAb044c-9" 내지 "EM1007-mAb044c-13", "EM1007-mAb044c-15" 및 "EM1007-mAb044c-17"로 지정된 키메라 항체와 함께, 하기 표 4에 나타난 바와 같은, "HuEM1007-044-1" 내지 "HuEM1007-044-8", "HuEM1007-044-14" 및 "HuEM1007-044-16"으로 지정된 10개의 인간화 항체를 생성시켰다.

[표 4]

[0225] 항-OX40 인간화 EM1007-044 항체

항체 식별자	중쇄 중의 VH 영역	경쇄 중의 VK 영역
HuEM1007-044-1	HuEM1007-mAb044VH.1	HuEM1007-mAb044VK.1
HuEM1007-044-2	HuEM1007-mAb044VH.1a	HuEM1007-mAb044VK.1
HuEM1007-044-3	HuEM1007-mAb044VH.1b	HuEM1007-mAb044VK.1
HuEM1007-044-4	HuEM1007-mAb044VH.1c	HuEM1007-mAb044VK.1
HuEM1007-044-5	HuEM1007-mAb044VH.1	HuEM1007-mAb044VK.1a
HuEM1007-044-6	HuEM1007-mAb044VH.1a	HuEM1007-mAb044VK.1a
HuEM1007-044-7	HuEM1007-mAb044VH.1b	HuEM1007-mAb044VK.1a
HuEM1007-044-8	HuEM1007-mAb044VH.1c	HuEM1007-mAb044VK.1a
EM1007-mAb044c-9	EM1007-mAb044VH(G-A)	EM1007-mAb044VK
EM1007-mAb044c-10	EM1007-mAb044VH	EM1007-mAb044VK(G-A)
EM1007-mAb044c-11	EM1007-mAb044VH(G-A)	EM1007-mAb044VK(G-A)
EM1007-mAb044c-12	EM1007-mAb044VH	HuEM1007-mAb044VK.1
EM1007-mAb044c-13	HuEM1007-mAb044VH.1	EM1007-mAb044VK
HuEM1007-044-14	HuEM1007-mAb044VH.1d	HuEM1007-mAb044VK.1b
EM1007-mAb044c-15	HuEM1007-mAb044VH.1d	EM1007-mAb044VK(G-A)
HuEM1007-044-16	HuEM1007-mAb044VH.1e	HuEM1007-mAb044VK.1b
EM1007-mAb044c-17	HuEM1007-mAb044VH.1e	EM1007-mAb044VK(G-A)

[0226]

[0227]

표 4의 17개 항체는 모두 HEK293 세포의 일시적 형질감염에 의해 발현되었으며, 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되고, 해리 속도 상수(k_{off})에 의해 순위화되었다. 간략하게, 항체 결합 친화도 및 동역학을 Octet® RED96 생물층 간섭계(Pal1 ForteBio LLC)에 의해 특성화하였다. 항체를 항-hIgG Fc 포획(AHC) 바이오센서(Pal1)에 의해 120초 동안 100 nM의 농도로 포획하였다. 그 후, 센서를 실행 완충액(1X pH 7.2 PBS, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA)에 60초 동안 침지시켜 기준선을 확인하고, 이어서 지정된 농도의 제조항 인간 OX40/His 융합 단백질(NovoProtein, CB17)에 200초 동안 침지시켜 결합을 측정한다. 다음, 해리를 위해 600초 동안 실행 완충액에 침지시켰다. 정규화 기준으로서 전부 EM1007-044c 키메라 항체를 함유하는 4개의 시험 그룹(표 5에 나열된 바와 같은)에서 분석을 수행하였다. ForteBio 데이터 분석 소프트웨어(Pal1)를 사용하여 결합 및 해리 곡선을 1:1 Langmuir 결합 모델에 적합시켜 하기 표 5에 나타낸 바와 같은 해리 속도 상수를 획득하였다. 각 항체의 해리 속도를 나란히 획득한 동일한 시험 그룹의 EM1007-mAb044c 키메라 항체의 해리 속도와 비교하여, 정규화된 지수로서 작용하는 상응하는 해리 속도 비를 생성하였다. 항체의 정규화된 지수는 인간 OX40에 대한 보다 높은 친화도를 가리킨다.

[0228]

[표 5]

[0229] 인간화 및 키메라 EM1007-044 항체의 해리 속도(koff)

시험 그룹	항체	해리 속도 (k_{off}) (1/초)	정규화된 지수
1	HuEM1007-044-1	1.03×10^{-03}	306%
	HuEM1007-044-2	9.44×10^{-04}	281%
	HuEM1007-044-3	8.59×10^{-04}	255%
	HuEM1007-044-5	8.18×10^{-04}	243%
	HuEM1007-044-6	1.11×10^{-03}	331%
	EM1007-mAb044c	3.36×10^{-04}	100%
2	HuEM1007-044-7	1.09×10^{-03}	343%
	HuEM1007-044-8	1.01×10^{-03}	317%
	EM1007-mAb044c-9	3.09×10^{-04}	97%
	EM1007-mAb044c-10	2.99×10^{-04}	94%
	EM1007-mAb044c-11	3.17×10^{-04}	100%
	EM1007-mAb044c-12	8.10×10^{-04}	255%
3	EM1007-mAb044c	3.18×10^{-04}	100%
	HuEM1007-044-4	1.48×10^{-03}	486%
	EM1007-mAb044c-13	1.30×10^{-03}	427%
4	EM1007-mAb044c	3.05×10^{-04}	100%
	HuEM1007-044-14	9.52×10^{-04}	341%
	EM1007-mAb044c-15	9.49×10^{-04}	340%
	HuEM1007-044-16	3.52×10^{-04}	126%
	EM1007-mAb044c-17	2.56×10^{-04}	92%
	EM1007-mAb044c	2.79×10^{-04}	100%

[0230]

[0231] EM1007-mAb044c-11의 해리 속도는 EM1007-mAb044c의 경우와 유사하며, 이는 전자의 VH 및 VL에서 동반 NG(Asn-Gly)에서 NA(Asn-Ala)로의 돌연변이가 결합 친화도를 손상시키지 않음을 시사한다. 따라서, 인간화 설계인 HuEM1007-044-16은 친화도를 가장 잘 유지하면서 NG에서 NA로의 돌연변이를 또한 모두 포함하여 이중특이적 분자 구성에 사용될 것이다.

[0232] 실시예 1.4 항-OX40 항체의 특성화

[0233] 실시예 1.4.1 에피토프 식별

[0234] OX40 세포외 도메인으로부터의 4개의 시스테인 풍부 도메인(CRD)을 UniProt(식별자: P43489)으로부터 확인하였으며, 전장의 세포외 OX40(CRD1-4) 및 절두된 OX40 변이체 Δ CRD1(CRD1 결여), Δ CRD1-2(CRD1 및 CRD2 결여), Δ CRD1-3(CRD1, CRD2 및 CRD3 결여), mCRD1(CRD1 도메인이 쥐 CRD1로 대체된 CRD1-4), mCRD2(CRD2 도메인이 쥐 CRD2로 대체된 CRD1-4), mCRD3(CRD3 도메인이 쥐 CRD3으로 대체된 CRD1-4) 및 mCRD4(CRD4 도메인이 쥐 CRD4로 대체된 CRD1-4)가 Biointron에 의해 합성되었다. HuEM1007-044-16, OX40-Tab1(W02015153513), OX40-Tab2(W020151761)의 OX40 또는 OX40 절두된 단백질에의 결합을 ELISA를 사용하여 분석하여 적절한 결합 에피토프를 확인하였다. 간략하게, OX40 변이체를 각각 96웰 플레이트(Corning, #3361)에 1 μ g/ml로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양한 다음 0.05% Tween 20이 포함된 PBS로 세척하고 차단 완충액(0.05% Tween 20 및 2% BSA를 포함하는 PBS)으로 37°C에서 2시간 동안 차단하였다. 코팅되고 차단된 플레이트에, 연속적으로 희석된 항체를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 3회 세척하고, 이어서 HRP-표지된 2차 항체를 첨가하였다. 발색을 위해 테트라메틸벤지딘(TMB) 발색 용액을 5분 동안 첨가한 후 반응을 1 M HCl로 급냉시켰다. 450 nm에서의 흡광도(OD450)를 마이크로플레이트 판독기에서 측정하였다. 도 1a는 상기에 기재된 ELISA 분석 결과를 보여주며, 이는 OX40-mAb가 CRD 3 도메인을 표적화하는 반면, OX40-Tab1 및 OX40-Tab2는 각각 입체형태 에피토프 및 CRD1 도메인 또는 CRD1 도메인을 함유하는 입체형태 에피토프를 표적화함을 시사한다. 상응하는 쥐 대응물로 대체된 지정된 CRD 도메인을 갖는 단일 OX40 변이체를 사용하는 것을 제외하고, 또 다른 ELISA 분석을 유사하게 수행하였으며, 도 1b에 나타난 결과는 인간 CRD1, CRD2 및 CRD4 도메인이 Tab2 결합에 중요하다는 것을 추가로 시사한다.

[0235] 실시예 1.4.2 T 효과기 세포의 선택적 증식

[0236] 항 OX40 항체의 작용적 효과를 CD4 미경험 세포로부터의 Treg 분화에 의해 측정하였다. 간략하게, 시판되는 키트(Stemcells, #17555)를 사용하여 분리된 CD4 미경험 T 세포를 2 μ g/ml OKT3 및 30 nM의 HuEM1007-044-16으로

미리 코팅된 6-웰 플레이트에 웰당 5×10^6 개 세포로 시딩하였다. $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ CD28(Biolegend, #302934) 및 $5 \text{ ng}/\text{ml}$ TGF-베타를 보충하여 5일간 배양한 후, FACS 분석을 사용하여 CD25+Foxp3+로 정의된 Treg 세포 집단 및 비-Treg T 세포 집단을 평가하였다. 도 2는 HuEM1007-044-16 처리가 Treg 세포에 대한 T 효과기의 선택적 증식을 유도하고 심지어 30 nM 농도에서 Treg 분극화를 감소시키는 것을 나타낸다.

[0237] 실시예 1.4.3 OX40 효능제 mAb 내재화 분석

간략하게, 인간 OX40을 과발현하는 5×10^5 CHO 세포(CHO-hOX40)를 96-웰 플레이트(Corning, #3799)의 각 웰에 시딩하고 내재화 억제제의 존재 또는 부재 하에서 다양한 농도의 HuEM1007-044-16 처리를 가할 수 있다. 37°C 에서 60분 배양 후, 플레이트를 여러 번 세척하여 과잉 항체를 제거한 다음 2차 Alexa Fluor® 647-접합된 염소 항-인간 IgG 항체(1:500 신선한 희석, Jackson ImmunoResearch, #109-606-098)를 첨가하고, 실온에서 20분간 배양하였다. 또 다른 라운드의 원심분리 및 세척 후에, CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 판독하기 위해 세포를 FACS 완충액에 재현탁한다. 중앙 형광 강도(MFI) 판독값을 항체 농도에 대해 플롯팅하고 GraphPad Prism 8.0으로 분석할 수 있다.

[0239] 실시예 2 항-PDL1 항체의 생성 및 특성화

항-PD-L1 항체 EM0005-mAb86을 W02021/104434에 기재된 바와 같이 수득하였다. HEK293 세포에 의해 발현되고 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제 후, EM0005-mAb86은 10% 초과액의 응집 백분율을 나타내었으며, 이는 항체 자체 또는 이를 결합 도메인으로 활용하는 이중특이적 분자의 CMC 개발에 대한 도전을 시사한다. 더 양호한 개발가능성을 갖는 항체를 위해, EM0005-mAb86 VH 및 VL 서열(표 6에 나열됨)을 사용하고 전장 항체의 변경된 물리화학적 특성, 예를 들어 총 전하 변화, 소수성 패치 파괴 및/또는 생물학적 활성에 대한 영향 없이 또는 최소한의 영향으로 친수성 증가를 위해 프레임워크 서열 변화를 가하였다.

[표 6]

EM0005-mAb86의 가변 영역의 아미노산 서열*

Ab	쇄	서열 번호	AA 서열
EM0005-mAb86	VH	29	QVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSGYTFITTYGINWVKRPGQGLEWIGY IYIGNGYTEYNEKFKGKATLTSDPSSRTAYMQLSSLTSEDSATYFCARDL MVIAPKTMIDYWGQGTSTVTVSS
	VL	32	DIQMNSHKEFMSTSVGDRVSIITCKASQDVGTAVALYQKPGQSPKLLIYW ASTRHTGVPRDFTGGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPYTFGG GTKLEMK

*가변 넘버링에 따른 CDR은 밑줄 표시된다.

간략하게, EM0005-mAb86의 인간화 가변 도메인 서열을, CDR-L3 뒤에 JK4 프레임워크 4 서열과 함께 V BASE로부터 다양한 생식계열 유전자의 프레임워크 서열상에 이의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(EM0005-mAb86의 VL에 대해 표 6에 제공된 바와 같은)이 접목되고; CDR-H3 뒤에 JH6 프레임워크 4 서열과 함께 V BASE로부터 다양한 VH 프레임워크 서열상에 이의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(EM0005-mAb86의 VH에 대해 표 6에 제공된 바와 같은)이 접목되도록 설계하였다.

설계된 VH 및 VK(VL 카파) 유전자를 합성하고 이어서 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 및 인간 카파 경쇄 불변 도메인(실시예 1.3에 제공된 서열)을 함유하는 벡터에 각각 클로닝하였다. 인간화 VH 및 인간화 VK 쇄의 짝짓기는 50개의 인간화 항체를 생성시켰으며, 그 중 49개는 카발 넘버링에 따라 1번 위치에 Q(Gln)에서 E(Glu) 돌연변이 및 82a번 위치에 C(Cys)에서 S(Ser) 돌연변이를 갖는 것을 제외하고 HuEM0005-86-21과 동일한 서열을 갖도록 설계된 HuEM0005-86-64와 함께, "HuEM0005-86-15" 내지 "HuEM0005-86-63"으로 지정되었다. 추가적인 키메라 변이체 EM0005-86c-1을, NG(Asn-Gly)에서 NA(Asn-Ala) 돌연변이(이는 탈아민화 반응이 일어나기 쉽고 제조 과정에서 이질성을 초래할 수 있는 패턴인, EM0005-mAb86의 CDR-H2에 "NG"(Asn-Gly)를 피하기가 바람직한 것으로 추정된다)에 의한 항체 결합 특성에 대한 영향을 평가하기 위해 "EM0005-86c"의 CDR-H2에 G55A 돌연변이를 갖도록 설계하였다.

모든 항체는 HEK293에서 일시적으로 발현되었으며, 이를 1-단계 단백질 A 정제에 의해 정제하고, SEC-HPLC에 의해 발현 역가 및 순도에 대해 평가하였다. 정제된 항체의 불순물은 주로 응집 분획이므로, 순도가 높을수록 해

당 항체의 응집 성향이 낮다는 것을 의미한다.

[0248] 역가 및 순도에 기반하여, 50개의 인간화 항체 중 10개를 선택하고 2개의 그룹에서 표 7에 나타난 바와 같이 해리 속도 상수(k_{off})에 대해 추가로 분석하였다. EM0005-mAb86과 동일한 VH/VL 서열(표 6에 제공됨)을 갖는 키메라 항체 EM0005-86c를 각 그룹에서 양성 대조군으로 사용하고 정규화를 위한 기초로 사용하였다. 간략하게, Octet®RED96 생물층 간섭계(Pal1 ForteBio LLC)를 사용하여 항체의 친화도 및 결합 동역학을 특성화하였다. 120초 동안 100 nM의 농도로 포획된 항체를 갖는 항-hIgG Fc Capture(AHC) 바이오센서(Pal1)를 실행 완충액(1X pH 7.2 PBS, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA)에 60초 동안 침지시켜 기준선을 확인하고, 이어서 단일 농도의 재조합 인간 PD-L1/His 융합 단백질(NovoProtein, Cat. No. C315)에 침지시켜 200초 동안 결합을 측정한다. 실행 완충액에 침지시켜 600초 동안 해리를 측정하였다. ForteBio 데이터 분석 소프트웨어(Pal1)를 사용하여 결합 및 해리 곡선을 1:1 Langmuir 결합 모델에 적합시켰다. 표 7에 나타난 해리 속도 비를 동일한 시험 그룹에서 EM0005-86c에 대한 인간화 항체의 해리 속도에 의해 계산하였다. 해리 속도 비는 정규화된 지수로서 작용하며, 따라서 인간화 항체를 시험 그룹 전체에서 서로 비교할 수 있다. 더 낮은 해리 속도 비는 인간 PD-L1에 대한 항체의 더 높은 친화도를 나타낸다. 순도 및 해리 속도 데이터를 기반으로 추가 조사를 위해 HuEM0005-86-21을 선택하였다.

[0249] [표 7]

[0250] 인간화 및 키메라 EM0005-mAb86 항체의 해리 속도(k_{off})

시험 그룹	항체	생산성 (mg/L)	해리 속도 (k_{off}) (1/초)	EM0005-86c에 대한 해리 속도 비	SEC-HPLC에 의한 순도
1	HuEM0005-86-18	5.0	3.25×10^{-04}	119%	92%
	HuEM0005-86-20	2.2	2.26×10^{-04}	83%	97%
	HuEM0005-86-21	7.0	2.39×10^{-04}	88%	95%
	HuEM0005-86-29	1.2	1.63×10^{-04}	60%	90%
	EM0005-86c-1	7.7	1.88×10^{-04}	69%	91%
	EM0005-86c		2.72×10^{-04}	100%	90%
2	HuEM0005-86-39	25.4	2.22×10^{-04}	153%	91%
	HuEM0005-86-41	13.4	1.57×10^{-04}	108%	96%
	HuEM0005-86-42	14.0	1.41×10^{-04}	97%	95%
	HuEM0005-86-55	4.7	1.71×10^{-04}	118%	90%
	HuEM0005-86-62	22.4	2.47×10^{-04}	170%	94%
	HuEM0005-86-63	19.0	2.76×10^{-04}	190%	94%
	EM0005-86c		1.46×10^{-04}	100%	90%

[0251]

[0252] HuEM0005-86-21을 기반으로, HuEM0005-86-64를 C82aS 돌연변이를 포함하도록 추가 설계하고 FIT-Ig 구성에 사용하였다. HuEM0005-86-64의 서열을 표 8에 나타낸다.

[0253] [표 8]

[0254] HuEM0005-86-64의 아미노산 서열

식별자	서열번호	아미노산 서열
		1234567890123456789012345678901234567890
HuEM0005-86-64 VH	31	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVRQA PGQGLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGRFVFSLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYYCARDLMVIAPKTM DYWGQGT TVTS S
HuEM0005-86-64 VL	34	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVGTA VAWYQ QKP GKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISS LQP EDFATYYCQ QYSSYP YTFGGGTKEIK

[0255]

[0256] 실시예 3 PDL1/OX40 FIT-Ig의 생성 및 특성화

[0257] 실시예 3.1 PDL1/OX40 FIT-Ig FIT1014-20a의 구성

[0258] FIT1014-20a로 지정된 PD-L1/OX40 FIT-Ig를 모 항체 HuEM0005-86-64(인간화 항-PD-L1, 표 8 참조) 및 HuEM1007-44-16(인간화 항-OX40, 표 3 및 표 4 참조)의 면역글로불린 도메인에 대한 암호화 서열을 사용하여 구성하였다. FIT-Ig FIT1014-20a는 3 성분의 폴리펩티드 체로 구성된 육량체이다:

[0259] 폴리펩티드 체 #1은 도메인 식: 돌연변이 인간 불변 IgG1의 Fc에 직접 융합된 HuEM1007-44-16의 VH-CH1에 직접 융합된 HuEM0005-86-64의 VL-CL을 가지며; CH2 도메인 삼중 돌연변이 M252Y/S254T/T256E('YTE', EU 넘버링)는 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 약 10배 증가시킨다. 이는 FIT1014-20a의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0260] 폴리펩티드 체 #2는 도메인 식: HuEM0005-86-64의 VH-CH1을 가지며;

[0261] 폴리펩티드 체 #3은 도메인 식: HuEM1007-44-16의 경쇄(VL-CL)를 갖는다. 3개의 발현된 FIT1014-20a 폴리펩티드 체에 대한 아미노산 서열을 하기 표 9에 나타낸다.

[0262] [표 9]

[0263] FIT1014-20a 성분 쇠의 아미노산 서열*

폴리펩티드	서열번호	아미노산 서열
		1234567890123456789012345678901234567890
FIT1014-20a FIT-Ig 폴리펩티드 쇠 #1 (VL _{PD-L1} -CL-VH _{OX40} -CH1-Fc)	35	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGHAFSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDEITNNAKFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLSRSED TAVYYCARDLLMPYWG QGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
FIT1014-20a FIT-Ig 폴리펩티드 쇠 #2 (VH _{PD-L1} -CH1)	36	EVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFTTYGINWVRQAPGQGLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGRFVFLDTSTVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARDLMVIAPKTMDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
FIT1014-20a FIT-Ig 폴리펩티드 쇠 #3 (VL _{OX40} -CL)	37	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLYSNAITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGPVDRFSSSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCAQNLLEPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0264]

[0265] *가변 영역은 굵은 글씨로 표시되고; YTE 돌연변이는 밑줄 표시된다.

[0266] 3 성분 폴리펩티드 쇠 각각에 대한 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 분자를 합성하고 pcDNA3.1 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였다. 3 성분 폴리펩티드 쇠 각각을 발현하기 위한 3개의 제조함 pcDNA3.1 발현 벡터를 HEK 293E 세포에 공동 형질감염시켰다. 형질감염 후 세포 배양 약 6일 후, 상등액을 수확하고 단백질을 A 친화성 크로마토그래피를 수행하여 정제된 PD-L1/OX40 FIT-Ig 이중특이적 결합 단백질을 수득하였다.

[0267] 실시예 3.2 PD-L1/OX40 FIT-Ig의 결합 활성

[0268] FACS 결합

[0269] PD-L1/OX40 항체의 세포 결합 친화도를 각각 인간 PD-L1을 과발현하는 CHO(ATCC, #CCL-61)(CHO-PD-L1) 및 OX40을 과발현하는 CHO(CHO-OX40)에 대해 측정하였다. 간략하게, 5×10^5 세포를 96-웰 플레이트(Corning, #3799)의 각 웰에 접종하였다. 세포를 400 g에서 5분간 원심분리하고 상등액을 버렸다. 각 웰에 대해 100 nM 부터 시작하는 항체의 3x 연속 희석액 100 μ l를 첨가하고 세포와 혼합하였다. 60분 동안 4°C 배양한 후, 플레이트를 여러 번 세척하여 과잉 항체를 제거하였다. 이어서 2차 Alexa Fluor® 647-접합된 염소 항-인간 IgG 항체(1:500 신선한 희석, Jackson ImmunoResearch, #109-606-098)를 첨가하고 실온에서 20분 동안 세포와 함께 배양하였다. 추가 라운드의 원심분리 및 세척 후에, 세포를 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 판독을 위해 FACS 완충액에 재현탁하였다. 중앙 형광 강도(MFI) 판독값을 항체 농도에 대해 플롯팅하고 GraphPad Prism 8.0으로 분석하였다.

[0270] 도 3에 나타난 바와 같이, FIT-1014-20a의 CHO-PD-L1에 대한 결합 친화도는 이의 모 항-PD-L1 단클론 항체(HuEM0005-86-64)의 경우에 다소 가까우며, 음성의 관련 없는 인간 IgG는 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

[0271] 도 4에 나타난 인간 OX40 형질감염된 CHO 세포에의 결합에 대한 FACS 친화도의 결과는 FIT1014-20a가 이의 모

OX40 항체 HuEM1007-44-16보다 상대적으로 낮은 결합 친화도를 가짐을 가리킨다(4.3 nM 대 1.8 nM의 EC50).

PD-L1 및 OX40에 대한 친화도

FIT1014-20a의 PD-L1 결합 활성을 Octet® Red 감지 장치(ForteBio, Red 96)를 사용하여 생물층 간섭계에 의해 검출하였다. 30초 동안 100 nM의 농도로 포획된 FIT1014-20a(YTE)를 갖는 항-hIgG Fc 포획(AHC) 바이오센서(Pa11)를 실행 완충액(1X pH 7.2 PBS, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA)에 60분간 침지시켜 기준선을 확인하고, 이어서 재조합 인간 또는 시노 PD-L1-his 단백질의 연속 희석액(100 nM, 33.3 nM, 11.1 nM, 3.7 nM)에 침지시켜 200초 동안 결합을 측정한다. 실행 완충액에 침지시켜 1200초 동안 해리를 측정하였다. 결합 및 해리 곡선을 ForteBio 데이터 분석 소프트웨어(Pa11)를 사용하여 1:1 Langmuir 결합 모델에 적합시켜 동역학 속도 상수 Kon 및 Koff를 생성시켰다. 이어서, 항체와 관련된 표적 단백질 사이의 반응의 평형 해리 상수 KD(M)를 $KD = koff/kon$ 으로 계산하였다. OX40에 대한 친화도를 PD-L1-his 단백질 대신에 인간 또는 시노 OX40(300 nM, 100 nM, 33.3 nM, 11.1 nM)을 사용하는 것을 제외하고 유사하게 검출하였다. 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[표 10]

PD-L1 및 OX40 단백질에 대한 FIT1014-20a의 결합 친화도

분석물	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
인간 OX40	7.81E+04	4.70E-04	6.02E-09
시노 OX40	7.80E+04	4.00E-04	5.13E-09
인간 PD-L1	6.20E+05	1.58E-04	2.55E-10
시노 PD-L1	4.70E+05	2.76E-04	5.87E-10

실시예 4 PD-L1 차단

실시예 4.1 PD-1/PD-L1 결합 차단

PD-1/PD-L1 결합의 차단을 세포 기반 수용체 차단 분석(RBA)에서 평가하였으며, 100 μ l의 2×10^5 세포/웰의 CHO-PD-L1 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Corning, Cat #3799)에 첨가하고, 0.016 nM 내지 50 nM로 연속 희석된 항체 50 μ l 및 50 μ g/ml PD-1-mFc(NovoProtein, #C754) 50 μ l를 각 웰에 첨가하고 가볍게 혼합한 후 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 세척하고 Alexa Fluor® 647 항-마우스 IgG(1:500, Jackson ImmunoResearch, #115-606-008)에 의해 염색하였다. 신호를 FACS에 의해 판독하고, 곡선을 GraphPad Prism 8.0에 의해 적합시켰다. 도 5에 도시된 바와 같이, FIT1014-20a는 이의 모 항-PD-L1 항체인 HuEM0005-86-64와 유사한 PD-L1 과발현 세포에 대한 PD-1 단백질 결합을 차단하는 효능을 입증하였다.

실시예 4.2 PD-L1 매개된 억제 신호전달 차단

PD-L1 억제 신호전달의 차단을 CHO-PD-L1-OS8(US8735553에 개시된 바와 같이, 이때 OS8이 T 세포 활성화 분자로서 사용되고 PD-L1이 안정하게 형질도입되었다), 및 인간 PD-1 및 NFAT 반응 요소에 의해 구동되는 루시퍼라제 리포터를 모두 발현하는 Jurkat-PD-1-NFAT-루시퍼라제 리포터 세포주의 공동배양에 의해 조사하였다. 간략하게, 대수 증식기의 CHO-PD-L1-OS8을 수확하고, 세척하고, 분석 배지(10% FBS가 포함된 RPMI1640)에 재현탁하고, 웰당 1×10^5 세포로 96-웰 플레이트(Corning, Cat. #3799)에 50 μ l 시딩하고, 이어서 웰당 1×10^5 로 Jurkat-PD-1-NFAT-루시퍼라제 리포터 세포 50 μ l를 첨가하였다. 연속적으로 희석된 샘플 항체 50 μ l를 첨가하고 세포 혼합물과 함께 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양 후, ONE-Glo™ 발광 분석 키트(Promega, Cat. #E6130) 시약을 제조하고 제조사의 지침에 따라 첨가하였다. Varioskan™ LUX 마이크로플레이트 판독기(ThermoFisher Scientific)에서 발광 신호에 대해 플레이트를 판독하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, FIT1014-20a는 이의 모 항-PD-L1 항체인 HuEM0005-86-64와 마찬가지로, PD-L1 매개된 PD-1 하류 신호전달을 차단하는 데 유사한 성능을 입증하였다.

실시예 5. OX40 하류 신호전달의 PD-L1 의존적 활성화

PD-L1 의존성 OX40 하류 신호전달 활성화를 유도하는 능력을, Jurkat-OX40-NF κ B-루시퍼라제 리포터 세포주와 CHO-PD-L1을 공동 배양한 다음 PD-L1 가교결합을 통해 OX40의 활성화를 검사함으로써 평가하였다. 4×10^4 세포/

웰로 PD-L1을 발현하는 CHO 100 μ l 및 1×10^5 세포/웰로 OX40-발현하는 NF- κ B-루시페라제 리포터 세포주 100 μ l를 96 웰 플레이트(Corning, Cat. #3799)에 공동-시딩하고, 연속 희석된 항체 50 μ l와 함께 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면, ONE-Glo™ 발광 분석 키트(Promega, Cat. #E6130) 시약을 제조하고 제조사의 지침에 따라 첨가하였다. Varioskan™ LUX 마이크로플레이트 판독기(ThermoFisher Scientific)에서 발광 신호에 대해 플레이트를 판독하였다. 도면에 나타난 바와 같이, FIT1014-20a는 PD-L1 양성 세포 존재 하에서 용량 의존적인 방식으로 OX40 하류 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화를 유도한 반면(도 7, 상단), 모 mAb의 조합에서는 그렇지 않았다. 동일한 항체 및 리포터 세포주를 사용하되, PD-L1 음성 CHO 세포를 사용하는 병행 분석을 대조군으로 수행하였으며, 도 7(하단)에 나타난 바와 같은 활성화의 결여는 FIT1014-20a 유도된 활성화가 PD-L1 의존적임을 가리킨다.

[0284] 실시예 6. T 세포 활성화

[0285] 실시예 6.1 1차 T 세포에 의한 IFN- γ 및 IL2 생산

T 세포 활성화를, CHO-PD-L1-OS8 세포와 인간 1차 T 세포의 공동 배양 시스템에서 IFN- γ 및 IL2 생산에 의해 측정하였다. 간략하게, CHO-PD-L1-OS8을 수확하고, 세척하고, 분석 배지(10% FBS를 포함하는 RPMI1640)에 4×10^5 세포/ml로 재현탁하고, 100 μ l의 세포를 96-웰 플레이트(Corning, #3799)에 첨가하였다. T 세포를 상업용 인간 T 세포 분리 키트(Stemcell Technologies, #17951)를 사용하여 인간 PBMC로부터 정제하고 4×10^5 세포/ml 100 μ l를 세포 플레이트에 첨가하였다. 시험 항체 및 관련 없는 음성 인간 IgG를 첨가하고 세포 혼합물과 함께 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며, PerkinElmer IFN- γ 검출 키트(PerkinElmer; # TRF1217M)를 사용하여 IFN- γ 생산 측정을 위해 상등액을 샘플링하였다. PerkinElmer IL-2 검출 키트(PerkinElmer; #TRF1221M)를 사용하여 IL-2 생산 측정을 위해 72시간 배양 후 추가 상등액을 샘플링하였다. 도 8에 도시된 IFN- γ 및 IL2 생산에 따라, FIT1014-20a는 단일특이적 모 항체의 조합과 비교하여 용량 의존적 방식으로 T 세포를 활성화하여 IFN- γ 및 IL2를 모두 생산할 수 있었다.

[0287] 실시예 6.2 혼합 림프구 반응(MLR) 분석

본원에 기재된 이중특이적 항체(BsAb)가 OX40 및 PD-L1/PD-1 차단과 동시 활성화를 통해 T 세포를 상승적으로 자극할 수 있는지를 결정하기 위해, 보고된 바와 같이 혼합 림프구 반응(MLR) 분석을 설정하여(Tourkva et al., 2001) T 세포 활성화에 대한 효과를 평가하였다. 간략하게, 단핵구 농축 키트(Stemcell, 19058)를 사용하여 PBMC로부터 분리된 단핵구를 50 ng/ml GM-CSF(R&D, #215-GM-050/CF), 35 ng/ml IL-4(R&D, #204-IL-050/CF)가 보충된 배지(RPMI1640+10% FBS)에서 6일 동안 유지시켰다. 성숙한 DC를 20 ng/ml TNF- α (R&D, #210-TA-005/CF), 50 μ g/ml 폴리 I:C(Sigma, #I3036)를 보충하여 유도하고, 추가로 2일 동안 37°C, 5% CO2에서 배양하였다. EasySep™ 인간 CD4⁺ T 농축 키트(Stemcell, #17952)에 의해 PBMC로부터 분리된 동종이계 인간 CD4⁺ T 세포 100 μ l의 CD4⁺ T 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트(Corning, #3799)에 웰당 1×10^5 세포로 시딩하고, 100 μ l의 성숙한 DC를 웰당 1×10^5 세포로 플레이트에 첨가하고 연속 희석된 항체와 함께 배양하였다. 상등액을 3일 후에 수집하여 MLR 반응의 판독값으로서 IL-2 생산을 검출하였다. 도 9에 나타난 MLR 분석으로부터의 IL2 수준은 FIT1014-20a가 IL-2 생산의 촉진에 있어서 두 모 항체 모두의 조합보다 더 효능 있음을 암시한다.

[0289] 실시예 6.3 스타필로코커스 장독소 B(SEB) 분석

T 세포 활성화에 대한 효과를 추가로 평가하기 위해 초항원 스타필로코커스 아우레우스 장독소 B(SEB)를 사용하는 세균 독소 자극 분석을 수행하였다. 간략하게, 건강한 인간 공여자로부터의 100 μ l의 PBMC를 2×10^5 세포/웰로 96-웰 분석 플레이트에 시딩한 다음, 50 μ l의 시험 항체의 연속 희석액을 첨가하고 37°C에서 PBMC와 함께 30분 동안 배양하였다. 최종 농도가 10 ng/ml인 SEB 용액 50 μ l를 첨가하고 플레이트를 96시간 동안 추가로 배양하였다. PerkinElmer IL-2 검출 키트(PerkinElmer; #TRF1221M)를 사용하여 IL-2 측정을 위해 100 μ l의 세포 배양 상등액을 수집하였다. 도 10에 나타난 IL-2 수준에서 알 수 있듯이, FIT-1014-20a는 이의 모 항-OX40 및 PD-L1 항체의 조합보다 T 세포 활성화를 강화하는 데 더 효능이 있다.

[0291] 실시예 7 Fc 매개 효과기 기능의 조사

[0292] 실시예 7.1 활성화된 CD4⁺ 세포에 대한 보체 의존성 세포독성

EasySep™ 인간 CD4⁺ T 농축 키트(Stemcell, #17952)에 의해 PBMC로부터 분리되고 T 세포 활성화제(Stemcell,

#10971)에 의해 3일 동안 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포를 수확하고 1×10^6 세포/ml로 희석하고, 50 μ l의 활성화된 $CD4^+$ T 세포 용액을 96웰 세포 플레이트(Corning, #3799)에 첨가하고, 50 μ l의 정상 인간 혈청 보체(Quidel, #A113)를 세포 플레이트에 첨가하고, 이어서 연속 희석된 항체 50 μ l, 관련 없는 인간 IgG(음성 대조군으로서) 또는 항 HLA(양성 대조군으로서, AntibodyGenie, AGEL1612)를 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 6시간 배양한 후, 세포 세포독성 alamarBlue™ 세포 생존력 시약(Thermofisher, # DAL1100). 도 11에 나타난 바와 같이, FIT1014-20a는 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포에 대해 어떠한 세포독성도 생산하지 않은 반면, 양성 대조군 항-HLA는 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포에 대해 용량 의존적 세포독성을 나타내었다.

[0294]

실시예 7.2 CHO-OX40에 대한 식균작용 효과

[0295]

간략하게, $CD14^+$ 단핵구를 신선한 PBMC로부터 분리하고 6일 동안 100 ng/ml M-CSF(R&D; 216-MC-010/CF)와 함께 배양하여 대식세포로 분화시킨 다음, CellTrace™ Far Red(Thermo Fisher Scientific, C34564)로 표지하였다. 96웰 플레이트(Corning, 7007)에 웰당 2×10^5 세포로 CellTrace™ CFSE(Thermo Fisher Scientific, C34554) 표지된 CHO-OX40 세포 100 μ l, 4×10^5 밀도의 Far red 표지된 인간 대식세포 50 μ l, 및 할당된 농도의 항체 50 μ l를 첨가하고, 이어서 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 유세포 분석을 통해 Far red⁺ 세포 내 CFSE⁺ 세포의 백분율에 의해 식균작용을 평가하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, FIT1014-20a 및 HuEM 1007-044-16(모 OX40 mAb)은 식균작용 효과를 거의 나타내지 않은 반면, hIgG1 HuEM 1007-044-16을 갖는 이의 모 HuEM 1007-044-16 및 참조 항체 OX40-Tab2는 약간의 식균작용 효과를 나타내었다.

[0296]

실시예 8 MC38 결장 종양 모델을 보유하는 인간화 PD-L1 및 OX40 마우스에서의 항종양 효능

[0297]

FIT1014-20a의 항종양 효능을, 인간 PD-L1 발현 MC38 종양 세포(Shanghai Model Organisms Center Inc., Shanghai, China)를 보유하는 hPD-L1/hOX40 트랜스유전자 동계 마우스 모델(BiocytoGen, Beijing, China)에서 조사하였다. 0.1 ml PBS에 현탁된 PD-L1-발현 MC38 세포(5×10^6 세포)를 hPD-L1/hOX40tg 암컷 마우스의 오른쪽 등 옆구리에 피하 주사하였다. 5일 후(0일), 마우스를 종양 부피(평균 70 mm³)를 기준으로 그룹(n = 6)으로 무작위 할당하였다. 0, 3, 6, 9일차에 시험 항체를 복강내 주사하였다. 종양 크기 및 체중을 1주일에 2회 측정하였다. 도 13의 결과는 FIT1014-20a 처리 그룹 마우스가 아테졸리주맙 또는 모 PD-L1 mAb(HuEM0005-86-64)의 단독 요법보다 우수한 종양 성장 억제를 나타냄을 입증한다.

[0298]

실시예 9 CT26 결장 종양 모델을 보유하는 인간화 PD-L1, PD-1 및 OX40 마우스에서의 항종양 효능

[0299]

i.p. 투여 후 FIT1014-20a의 생체 내 항종양 활성을 인간 PD-1/PD-L1/OX40 녹인 마우스(GemPharmatech, China)에서 확립된 CT26-hPD-L1 동계 종양에 대해 추가로 조사하였다. 0.1 ml PBS에 현탁된 PD-L1-발현 CT26 세포(2.5×10^6 세포)를 hPD-L1/hPD-1/hOX40 트랜스유전자 암컷 마우스의 오른쪽 등 옆구리에 피하 주사하였다. 5일 후(0일), 마우스를 종양 부피(평균 80 mm³)를 기준으로 무작위로 그룹화하고(n = 8), 0, 3, 6일차에 시험 항체를 복강내 주사하였다. 종양 크기 및 체중을 1주일에 2회 측정하였다. 도 14의 결과는 FIT1014-20a 치료 그룹 마우스가 아테졸리주맙 mAb의 단독요법보다 우수한 종양 성장 억제를 나타냄을 입증한다.

[0300] 서열 목록:

서열번호	설명	서열
1	항-OX40 HCDR1	SSWMN
2	항-OX40 HCDR2	RIYPGDEITNYNGKFKD
3	항-OX40 HCDR3	DLLMPY
4	항-OX40 HCDR2	RIYPGDEITNYNAKFKD
5	항-OX40 LCDR1	RSSKSLLYSNGITYLY
6	항-OX40 LCDR2	QMSNLAP
7	항-OX40 LCDR3	AQNLELPFT
8	항-OX40 LCDR1	RSSKSLLYSNAITYLY
9	EM1007-mAb044VH (칼론.8G9D5C5)	QVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGHAFSSSSWMNWVKQ RPGKGLEWIGRIYPGDEITNYNGKFKDKATLTADKSSST AYMQLSSLTFEDSAVYFCARDLLMPYWGQGLVTVSA
10	EM1007-mAb044VH(G-A)	QVQLQQSGPELVKPGASVTISCKASGHAFSSSSWMNWVKQ RPGKGLEWIGRIYPGDEITNYNAKFKDKATLTADKSSST AYMQLSSLTFEDSAVYFCARDLLMPYWGQGLVTVSA
11	HuEM1007-mAb044VH.1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSSSSWMNWVRQ APGQGLEWMGRIYPGDEITNYNGKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
12	HuEM1007-mAb044VH.1a	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSSSSWMNWVRQ APGQGLEWMGRIYPGDEITNYNGKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
13	HuEM1007-mAb044VH.1b	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSSSSWMNWVRQ APGQGLEWIGRIYPGDEITNYNGKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
14	HuEM1007-mAb044VH.1c	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSSSSWMNWVKQ APGKGLEWIGRIYPGDEITNYNGKFKDKVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
15	HuEM1007-mAb044VH.1d	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDTFSSSSWMNWVRQ APGKGLEWMGRIYPGDEITNYNAKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
16	HuEM1007-mAb044VH.1e	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGHAFSSSSWMNWVKQ RPGKGLEWIGRIYPGDEITNYNAKFKDKATLTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDLLMPYWGQGLVTVSS
17	EM1007-mAb044VK	DIVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNGITYLY WYLQKPGQSPHLLIYQMSNLAPGVPRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGIYYCAQNLELPFTFGSGTKLEIK
18	EM1007-mAb044VK(G-A)	DIVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLYSNAITYLY WYLQKPGQSPHLLIYQMSNLAPGVPRFSSSGSGTDFTL RISRVEAEDVGIYYCAQNLELPFTFGSGTKLEIK
19	HuEM1007-mAb044VK.1	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLYSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAPGVPRFSSSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCAQNLELPFTFGQGTKLEIK
20	HuEM1007-mAb044VK.1a	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLYSNGITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAPGVPRFSSSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCAQNLELPFTFGQGTKLEIK

[0301]

서열번호	설명	서열
21	HuEM1007-mAb044 VK.1b	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLYSNAITYLY WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVVPDRFSSSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYCAQNLELPFTFGQGTKLEIK
22	항-PD-L1 HCDR1	TYGIN
23	항-PD-L1 HCDR2	YIYIGNAYTEYNEKFKG
24	항-PD-L1 HCDR3	DLMVIAPKTM DY
25	항-PD-L1 HCDR1	YIYIGNGYTEYNEKFKG
26	항-PD-L1 LCDR1	KASQDVGTA VA
27	항-PD-L1 LCDR2	WASTRHT
28	항-PD-L1 LCDR3	QQYSSYPYT
29	항-PD-L1 EM0005-m Ab86 VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSGYTFTTYGINWVKRPGQ GLEWIGYIYIGNGYTEYNEKFKGKATLTSDPSSRTAYMQLSSL TSEDSAIYFCARDLMVIAPKTM DYWGQGTSTVTVSS
30	HuEM0005-86-21 V H	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGINWVRQ APGQGLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGRFVFSLDTSVST AYLQICSLKAEDTAVYYCARDLMVIAPKTM DYWGQGT TV TVSS
31	HuEM0005-86-64 V H	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGINWVRQA PGQGLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGRFVFSLDTSVSTA YLQISSSLKAEDTAVYYCARDLMVIAPKTM DYWGQGT TVT VSS
32	항-PD-L1 EM0005-m Ab86 VL	DIQMNQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVGTA VAWYQQKPGQS PKLLIYWASTRHTGVPRDFTFGGSGTDFTLTISNVQSEDLADY FCQQYSSYPYTFGGG TKLEMK
33	HuEM0005-86-21 V L	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCKASQDVGTA VAWYQQK PGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYSSYPYTFGGG TKVEIK
34	HuEM0005-86-64 V L	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCKASQDVGTA VAWYQQK PGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYSSYPYTFGGG TKVEIK
35	FIT1014-20a 채 #1 VL _{PD-L1} -CL-VH _{OX40} -CH1-Fc	DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKA PKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSSYPYTFGGG TKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC E VQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCASGHAFSSSWMNWVKRPGKG LEWIGRIYPGDEITNNAKFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARDLLMPYWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCTCPPEAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

[0302]

서열번호	설명	서열
36	FIT1014-20a쇄 #2 VH _{PDL1} -CH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVRQAPGQ GLEWMGYIYIGNAYTEYNEKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSL KAEDTAVYYCARDLMVIAPKTMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV DKKVEPKSC
37	FIT1014-20a쇄 #3 VL _{OX40} -CL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLYSNAITYLYWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLAPGVDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCAQNLELPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE
38	VH _{OX40} -CH1	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHAFSSSWMNWVKQ RPGKGLEWIGRIYPGDEITNNAKFKDKATLTADKSTST AYMELSSLSRSEDVAVYYCARDLLMPYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHHKPSNTKVDDKKVEPKSC
39	VL _{PDL1} -CL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCKASQDVGTAWAYQQK PGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQYSSYPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	LALA 돌연변이를 갖는 hlg G1로부터의 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	돌연변이 LALA&YTE를 갖는 hlg G1로부터의 Fc 영역	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	돌연변이 LALA를 갖는 hlg G1로부터의 중쇄 불변 도메인	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
43	인간 카파 경쇄 불변 도메인	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	인간 OX40	MCVGARRLGRGPCAALLLGLGLSTVTVGLHCVGDTYPSN DRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVS KPKCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTCRCRAGTQPLD SYKPGVDCAPCPPGHFSFGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQ

		PASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAW PRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLPLAIL LALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKI
--	--	---

[0305] 참고문헌:

- Aspeshlagh S. *et al.*, Eur. J. Cancer. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. 52:50-66.
- Brahmer JR. *et al.*, N. Engl. J. Med (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. 366(26):2455-65.
- Bulliard Y. *et al.*, Immunol Cell Biol. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγRs, leading to antitumor efficacy. 92(6):475-80.
- Choi Y. *et al.*, J Immunother Cancer. (2020). T-cell agonists in cancer immunotherapy.
- Carolina Alves Costa Silva. *et al.*, ESMO Open (2020). New pathways in immune stimulation:targeting OX40. 5(1):e000573.
- Croft M., Annu. Rev. Immunol.(2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). 28: 57-78.
- Curti BD. *et al.*, Cancer Res. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. 73(24):7189-7198
- Gieffers C. *et al.*, Mol Cancer Ther (2013). APG350 induces superior clustering of TRAIL receptors and shows therapeutic antitumor efficacy independent of cross-linking via Fcγ receptors. 12(12):2735-47.

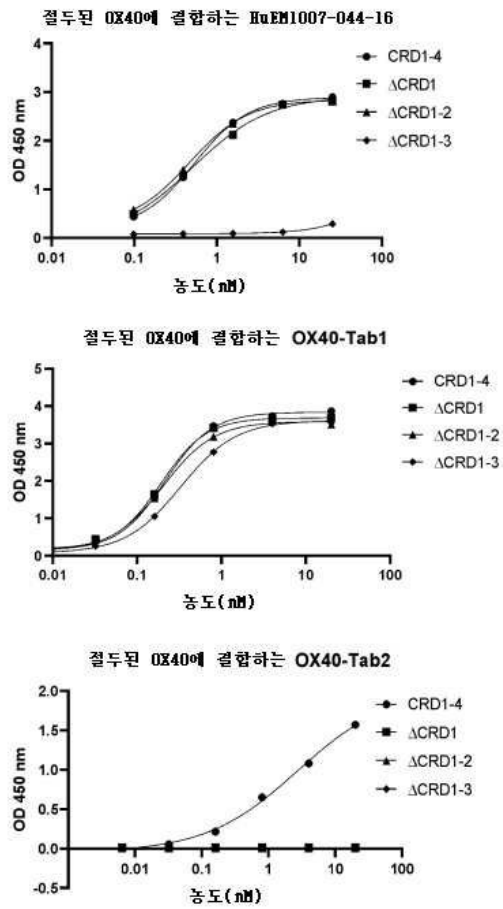
[0306]

- Glisson BS. *et al.*, Clin Cancer Res. 2020. Safety and Clinical Activity of MEDI0562, a Humanized OX40 Agonist Monoclonal Antibody, in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. 26(20):5358-5367.
- Gutierrez M. *et al.*, Clin Cancer Res. (2021). OX40 Agonist BMS-986178 Alone or in Combination with Nivolumab and/or Ipilimumab in Patients with Advanced Solid Tumors. 27(2):460-472.
- Jacquemin C. *et al.*, Immunity. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. 42(6):1159-70.
- Kawamata S. *et al.*, J. Biol. Chem (1998). Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. 273 (10), 5808-5814.
- Mayes PA, Hance KW, Hoos A. Nat Rev Drug Discov. (2018). The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. 17(7):509-527.
- Schaer DA. *Et al.*, J. Immunother. Cancer (2014) Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. 2, 7.
- Smyth MJ. *et al.*, Immunol Cell Biol. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. 92(6):473-4.
- Song J. *et al.*, Immunol (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. 180 (11), 7240-7248.
- Tourkova IL. *et al.*, Immunol Lett. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. 78(2):75-82.
- Watts TH. Annu. Rev. Immunol. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu. Rev. Immunol. 23, 23-68.
- Weinberg AD. *et al.*, Immunol Rev. (2011). Science gone translational: the OX40 agonist story. 2011, 244:218-231
- Willoughby J. *et al.*, Mol Immunol (2017). Mar; 83:13-22.
- Zhang X. *et al.*, Cell Rep. (2018). OX40 Costimulation Inhibits Foxp3 Expression and Treg Induction via BATF3-Dependent and Independent Mechanisms. 24(3): 607-618.

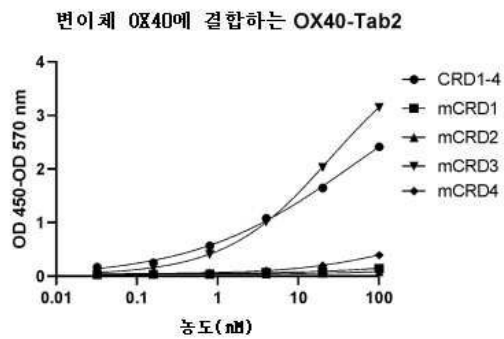
[0307]

도면

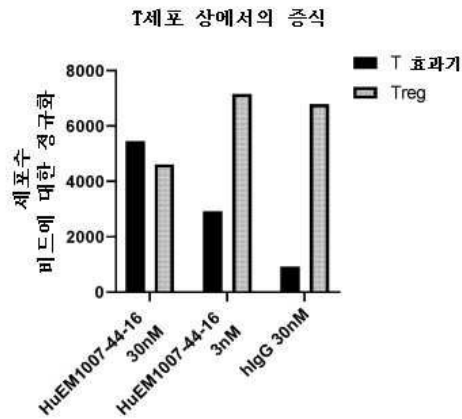
도면1a



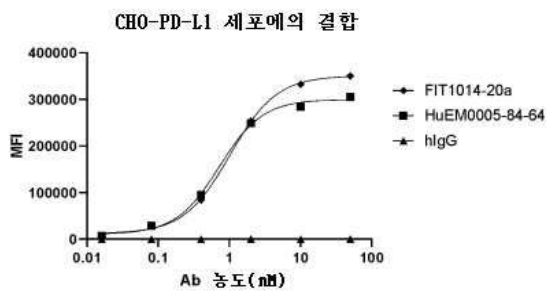
도면1b



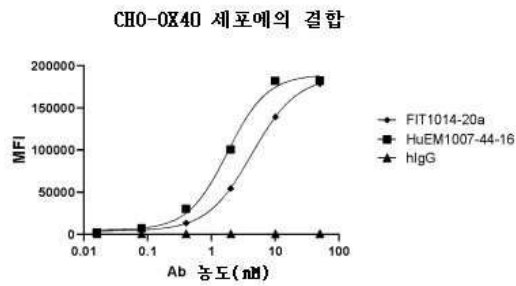
도면2



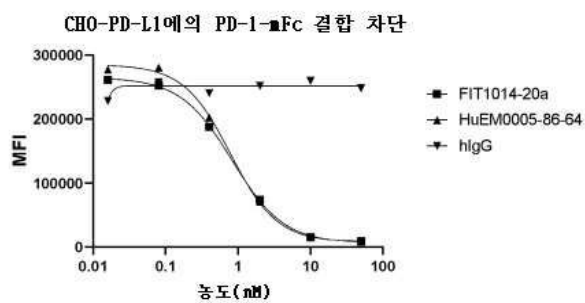
도면3



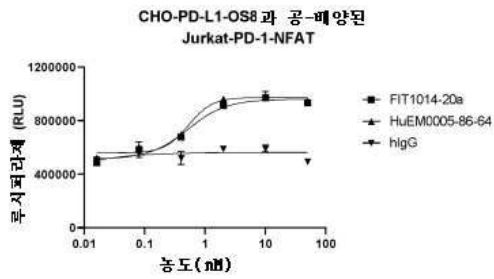
도면4



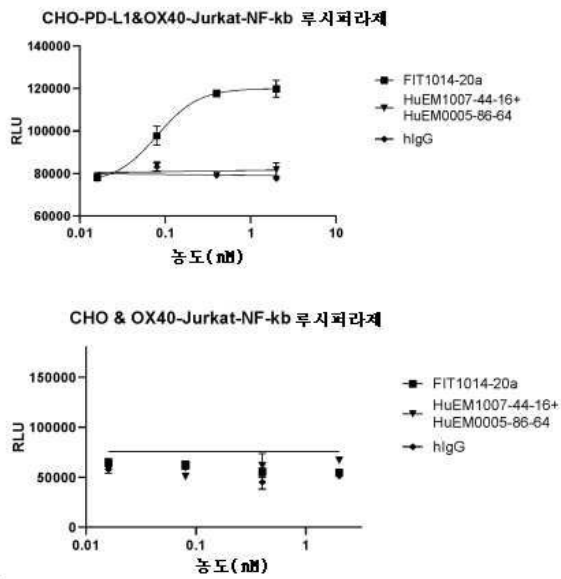
도면5



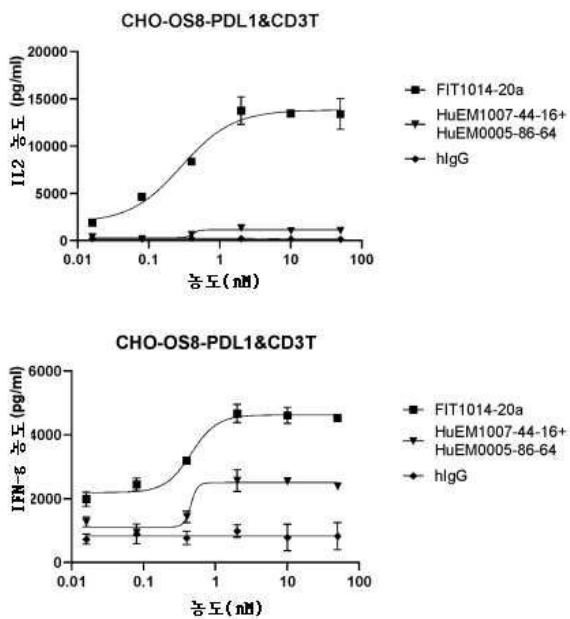
도면6



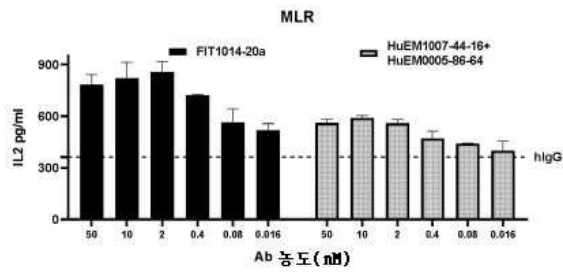
도면7



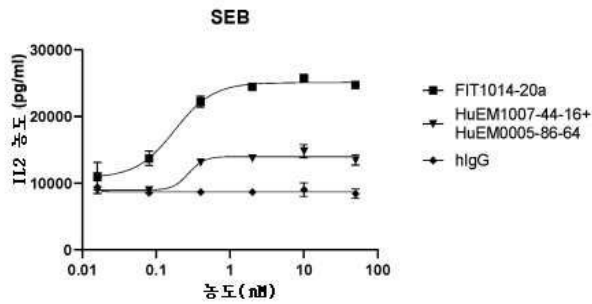
도면8



도면9

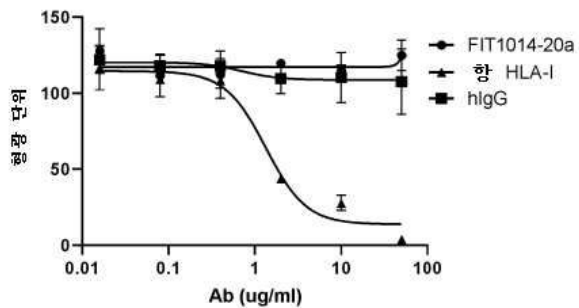


도면10

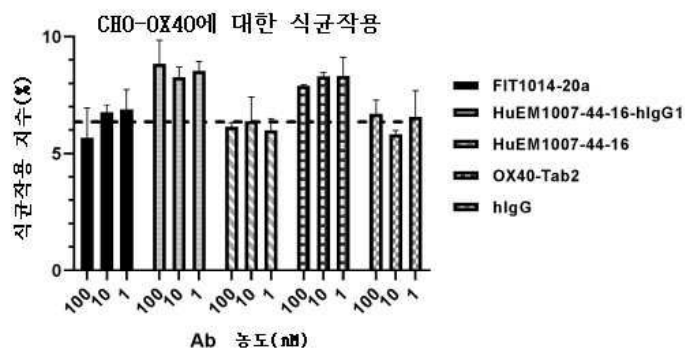


도면11

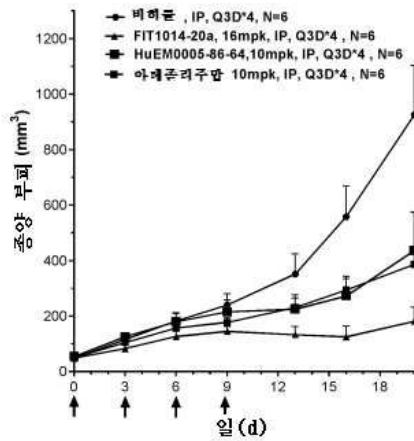
인간 CD4 T 세포에 대한 보체-의존성
세포독성



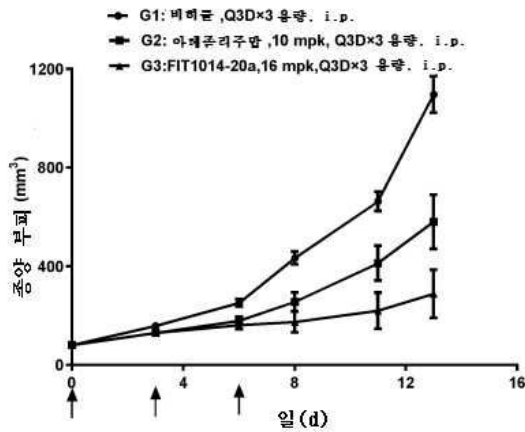
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Epimab

EpimAb Biotherapeutics (HK) Limited

<120> Antibodies and bispecific binding proteins that bind OX40 and/or PD-L1

<130> PF 220458PCT

<150> PCT/CN2021/099228

<151> 2021-06-09

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-OX40 HCDR1

<400> 1

Ser Ser Trp Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Anti-OX40 HCDR2

<400> 2

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-OX40 HCDR3

<400> 3

Asp Leu Leu Met Pro Tyr

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-OX40 HCDR2

<400> 4

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-OX40 LCDR1
 <400> 5
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-OX40 LCDR2
 <400> 6
 Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-OX40 LCDR3
 <
 400> 7
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-OX40 LCDR1
 <400> 8
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EM1007-mAb044VH (clone.8G9D5C5)

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ala Phe Ser Ser Ser			
	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe			
	50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			

65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ala			

115

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EM1007-mAb044VH(G-A)

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ala Phe Ser Ser Ser			
	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 11

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1a

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1b

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1c

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1d

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VH.1e

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EM1007-mAb044VK

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro His Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EM1007-mAb044VK(G-A)

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Ala Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VK.1

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VK.1a

<400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HuEM1007-mAb044VK.1b

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Ala Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 HCDR1

<400> 22

Thr Tyr Gly Ile Asn

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 HCDR2

<400> 23

Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Ala Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 HCDR3

<400> 24

Asp Leu Met Val Ile Ala Pro Lys Thr Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 HCDR1

<400> 25

Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 LCDR2

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 LCDR2

<400> 27

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 LCDR3

<400> 28

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 29

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 EM0005-mAb86

VH

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Pro Ser Ser Arg Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Met Val Ile Ala Pro Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HuEM0005-86-21 VH
<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Ala Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Met Val Ile Ala Pro Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 31
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HuEM0005-86-64 VH
<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Ala Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Met Val Ile Ala Pro Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-PD-L1 EM0005-mAb86 VL

<400> 32

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105
 <210> 33
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HuEM0005-86-21 VL
 <400> 33
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HuEM0005-86-64 VL
 <400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 659

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIT1014-20a Chain #1 VLPDL1-CL-VHOX40-CH1-Fc

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
210 215 220

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
225 230 235 240

His Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
245 250 255

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr
260 265 270

Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
275 280 285

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
290 295 300

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly
305 310 315 320

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
325 330 335

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
340 345 350

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

355 360 365
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 370 375 380
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 385 390 395 400
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 405 410 415
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

 420 425 430
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 435 440 445
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 450 455 460
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 465 470 475 480
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

 485 490 495
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 500 505 510
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 515 520 525
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 530 535 540
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

 545 550 555 560
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 565 570 575
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 580 585 590
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 595 600 605

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

610 615 620
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
625 630 635 640
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
645 650 655
Pro Gly Lys

<210> 36

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIT1014-20a Chain #2 VHPDL1-CH1

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Ala Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Met Val Ile Ala Pro Lys Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 <210> 37
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FIT1014-20a Chain #3 VLOX40-CL
 <400> 37
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser

 20 25 30
 Asn Ala Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHOX40-CH1

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Glu Ile Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe

50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Leu Met Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VLPDL1-CL

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 40

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region from hIgG1 with LALA mutations

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225
<210> 41
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fc region from hIgG1 with mutations LALA&YTE
<400> 41
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
20 25 30

Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 42

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain constant domain from hIgG1 with mutations LALA

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human kappa light chain constant domain

<400> 43

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 44

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> human OX40

<400> 44

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