202509071

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202509071 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：113117396 (22)申請日： 中華民國 113 (2024) 年 05 月 10 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2023/05/12 歐洲專利局 23173143.1
2023/11/30 歐洲專利局 23213531.9

(71)申請人：丹麥商珍美寶股份有限公司 (丹麥) GENMAB A/S (DK)
丹麥
德商生物新技術公司 (德國) BIONTECH SE (DE)
德國

(72)發明人：肯珀 克里斯特爾 KEMPER, KRISTEL (NL)；范德克羅夫 馬丁 VAN DER KROEF, MAARTEN (NL)；維希爾 丹尼斯 VERZIJL, DENNIS (NL)；果拉尼 安德里亞 GORLANI, ANDREA (IT)；果耶 寶琳 DE GOEJE, PAULINE LINDA (NL)；古林 拉斯 GUELEN, LARS (NL)；沙堤杰 大衛 SATIJN, DAVID P.E. (NL)；布雷吉 伊斯爾 BREIJ, ESTHER C.W. (NL)；薩辛 烏爾 SAHIN, UGUR (TR)；菲勒梅爾科夫 辛納 FELLERMEIER-KOPF, SINA (DE)；科內 馬倫 KOEHNE, MAREN (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：54 項 圖式數：49 共 321 頁

(54)名稱

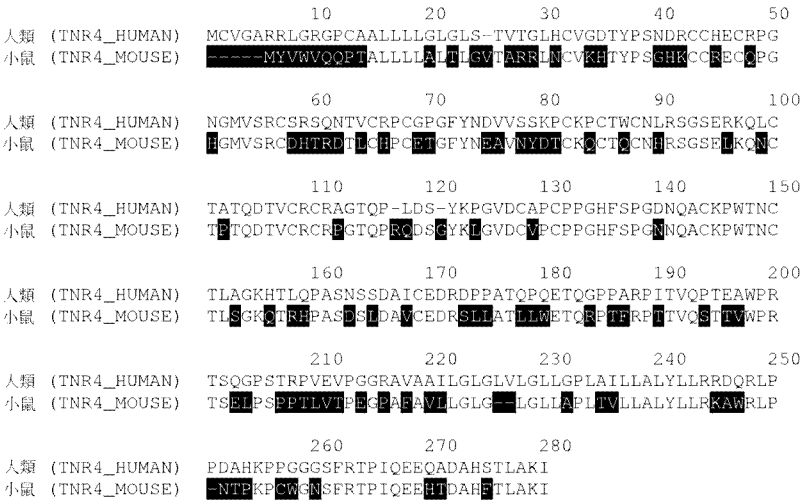
能夠與ＯＸ４０結合之抗體、其變異體及其用途

(57)摘要

本發明關於能夠與人類 OX40 及其變體結合之抗體，該等變體包含經修飾之 Fc 區，該經修飾之 Fc 區包含至少一個增強該抗體之 Fc-Fc 交互作用的突變及至少一個降低該抗體之效應功能的突變。本發明進一步提供包含該等抗體之醫藥組成物及該等抗體於治療及診斷程序、特別是在癌症療法中之用途。

The present invention relates to antibodies capable of binding to human OX40 and to variants thereof comprising a modified Fc region comprising at least one mutation that enhances the Fc-Fc interaction of the antibody and at least one mutation that reduces the Fc effector functions of the antibody. The invention further provides pharmaceutical compositions comprising the antibodies and use of the antibodies for therapeutic and diagnostic procedures, in particular in cancer therapy.

指定代表圖：


10 20 30 40 50
人類 (TNR4_HUMAN) MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLS-TVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPG
小鼠 (TNR4_MOUSE) -----MYVWVQQPTALLLLALTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPG
60 70 80 90 100
人類 (TNR4_HUMAN) NGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
小鼠 (TNR4_MOUSE) HGMVSRCDHTRDTLCHPGETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNC
110 120 130 140 150
人類 (TNR4_HUMAN) TATQDTVCRCRAGTQP-LDS-YKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
小鼠 (TNR4_MOUSE) TPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNC
160 170 180 190 200
人類 (TNR4_HUMAN) TLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
小鼠 (TNR4_MOUSE) TLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPR
210 220 230 240 250
人類 (TNR4_HUMAN) TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLP
小鼠 (TNR4_MOUSE) TSELPSPPTLVTPEGPAEAVLLGLG--LGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLP
260 270 280
人類 (TNR4_HUMAN) PDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
小鼠 (TNR4_MOUSE) -NTPKPCWGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI

【圖 4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

能夠與ＯＸ４０結合之抗體、其變異體及其用途

【英文發明名稱】

ANTIBODIES CAPABLE OF BINDING TO OX40, VARIANTS THEREOF AND USES THEREOF

【中文】

本發明關於能夠與人類OX40及其變體結合之抗體，該等變體包含經修飾之Fc區，該經修飾之Fc區包含至少一個增強該抗體之Fc-Fc交互作用的突變及至少一個降低該抗體之效應功能的突變。本發明進一步提供包含該等抗體之醫藥組成物及該等抗體於治療及診斷程序、特別是在癌症療法中之用途。

【英文】

The present invention relates to antibodies capable of binding to human OX40 and to variants thereof comprising a modified Fc region comprising at least one mutation that enhances the Fc-Fc interaction of the antibody and at least one mutation that reduces the Fc effector functions of the antibody. The invention further provides pharmaceutical compositions comprising the antibodies and use of the antibodies for therapeutic and diagnostic procedures, in particular in cancer therapy.

【指定代表圖】圖4

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

能夠與ＯＸ４０結合之抗體、其變異體及其用途

【英文發明名稱】

ANTIBODIES CAPABLE OF BINDING TO OX40, VARIANTS THEREOF AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明關於能夠與OX40結合之抗體及其在Fc區中包含一或多個突變的抗體變體片段，及此類抗體及Fc變體之用途。

【先前技術】

OX40(CD134, TNFRSF4)係277個胺基酸長之I型跨膜蛋白質，為腫瘤壞死因子(TNF)受體超家族(TNFRSF)之成員，其在與其配體OX40配體(OX40L)結合之後共刺激T細胞活化。OX40在人類中表現於活化之CD4+及CD8+ T細胞及調節型T細胞(regulatory T cell, Treg)上，但不表現於靜息初始T細胞(resting naïve T cell)上。

OX40唯一已知之配體係II型跨膜醣蛋白OX40L (TNFSF4; CD252)。OX40L不是組成型表現，但可在包括樹突狀細胞(dendritic cell, DC)、巨噬細胞及B細胞之抗原呈現細胞(antigen-presenting cell, APC)上誘導其表現。除

APC之外，OX40L亦在其他造血細胞諸如活化之天然殺手(NK)細胞或肥胖細胞、及非造血細胞諸如內皮細胞及平滑肌細胞(Croft et al. Immunol Rev. 2009 May;229(1):173-91)上表現。

在人類體內，OX40L與OX40之結合導致訊息傳導下調，且最終導致效應T細胞擴增及存活。此外，OX40訊息傳導促進記憶型T細胞之生成及抑制Treg之功能(Croft et al.Immunol Rev. 2009 May;229(1):173-91)。再者，促效性OX40抗體在與Treg交互作用之後，藉由骨髓及NK細胞誘導之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)來幫助耗盡腫瘤浸潤之OX40表現之Treg(Choi et al. J Immunother Cancer. 2020 Oct;8(2):e000966)。然而，在某些情況下，諸如當IFN-γ及IL-4不存在時，據報導OX40訊息傳導可能誘導Treg增殖(Ruby et al. J Immunol. 2009 Oct 15;183(8):4853-7)。

一項使用黑色素瘤細胞系及來自患者之樣本的小規模回溯性研究表明，在腫瘤微環境(tumor micro-environment, TME)中OX40之水平較低與抗-PD-1治療後之預後變差相關聯，尤其是在具有腫瘤浸潤之淋巴細胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)數量低之患者中。藉由用抗OX40促效性單株抗體(mAb)處理，結合過繼性T細胞療法(adoptive T-cell therapy)來活化OX40訊息傳導幫助恢復或加強T細胞媒介之抗腫瘤反應，從而使前列腺腫瘤攜帶之小鼠之生存獲益。OX40 mAb之抗腫瘤活性與T細胞浸潤到腫瘤中及效應T細胞之腫瘤內增殖相關聯(He et al.

Int Immunopharmacol. 2020 Dec;89(Pt B):107097)。

儘管付出許多努力，然而對展現增強抗腫瘤免疫反應之有效促效活性的促效性OX40治療抗體仍有需求。

【發明內容】

本發明關於OX40結合抗體及其Fc變體。

因此，在一個態樣中，本發明關於能夠與人類OX40結合之抗體，該抗體包含抗原結合區，該抗原結合區包含重鏈可變(VH)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO：12、13、及14中所示之序列，及輕鏈可變(VL)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO：16、DAS、及17中所示之序列，及人類IgG1 Fc區，該區包含P329R突變及E345R突變，其中胺基酸位置係根據Eu編號來編號。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其包含具有如SEQ ID NO：20中所示之序列的VH區及具有SEQ ID NO：21中所示之序列的VL區。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其包含具有如SEQ ID NO：20中所示之序列的VH區及具有SEQ ID NO：21中所示之序列的VL區，且進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其分別包含如SEQ ID NO：20及SEQ ID NO：21中所示之序列的VH區及VL區，且進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)，其

中，該抗體係人類IgG1同型。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其中該抗體對人類OX40具有3.4 x 10^{-9} M之結合親和力KD。

在一個態樣中，本發明關於人源化抗體。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其中該Fc區包含SEQ ID NO：3中所示之序列。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其中該抗體具有重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO：58中所示之序列。

在一個態樣中，本發明關於抗體，其中該抗體包含如SEQ ID NO：18中所示之重鏈(HC)及如SEQ ID NO：19中所示之輕鏈(LC)。

在一個態樣中，本發明關於組成物，其包含根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體。

在一個態樣中，本發明關於組成物，其包含根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體及醫藥上可接受之載劑。

在一個態樣中，本發明關於根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體，其係用作藥劑。

在一個態樣中，本發明關於根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體，其係用作藥劑，其中該疾病係癌症。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病之方法，該方法包含向有需要之個體投予根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病之方法，該方法包含向有需要之個體投予如本文中所定義之組成物或醫藥組成物。

在一個態樣中，本發明關於單離之核酸，其編碼根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體。

在一個態樣中，本發明關於表現載體，其包含此種核酸。

在一個態樣中，本發明關於重組宿主細胞，其產生根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體。

在一個態樣中，本發明關於一種配件套組，諸如用作伴隨診斷/用於鑑定在患者群體內對用根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體之治療具有反應傾向的彼等患者之套組。

在一個態樣中，本發明關於抗個體獨特型抗體，其結合至能夠與如本文中之任何態樣或具體實施例所定義之OX40結合之抗原結合區。

【圖式簡單說明】

[圖1]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體與在OX40轉染之HEK293F細胞上表現之(A)人類及(B)食蟹獼猴OX40之結合。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度(gMFI)之幾何平均值。

[圖2]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體與在OX40轉染之HEK293F細胞上表現之人類及食蟹獼猴OX40結合之半最大有效濃度(EC50)。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗的平均EC50+ SD。黑色虛線指示與人類OX40結合之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之平均EC50。

[圖3]顯示OX40改組構築體與野生型人類及小鼠OX40(TNR4)之序列比對。改組構築體中與人類OX40序列中之胺基酸不同的胺基酸係以反黑(in black)突顯。改組1 =具有小鼠CRD1之人類OX40；改組2 =具有小鼠CRD2之人類OX40；改組3 =具有小鼠CRD3之人類OX40；改組4 =具有小鼠CRD4之人類OX40。

[圖4]顯示人類及小鼠OX40(TNR4)之序列比對。小鼠OX40中與人類OX40序列中之胺基酸不同的胺基酸係以反黑突顯。

[圖5]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-007-RR、及IgG1-CD134-012-RR-K409R與瞬時轉染以表現小鼠OX40(A)、人類OX40(B)、或四種改組構築體中之一者的ExpiCHO-S細胞之結合，其中人類OX40之單一CRD被小鼠類似物(C至F)置換。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩次實驗中之一次代表性實驗的螢光強度(gMFI)之幾何平均值。

[圖6]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類

OX40抗體IgG1-CD134-h3C8-E345R、IgG1-CD134-RG7888、及IgG2s-CD134-SF2-E345R與瞬時轉染以表現小鼠OX40(A)、人類OX40(B)、或四種改組構築體中之一者的ExpiCHO-S細胞之結合，其中人類OX40之單一CRD被小鼠類似物(C至F)置換。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度之幾何平均值(geometric mean of the fluorescence intensity, gMFI)。

[圖7]顯示如由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-A4453、及IgG1-CD134-ABBV368與瞬時轉染以表現小鼠OX40(A)、人類OX40(B)、或四種改組構築體中之一者的ExpiCHO-S細胞之結合，其中人類OX40之單一CRD被小鼠類似物(C至F)置換。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度之幾何平均值(gMFI)。

[圖8]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體IgG1-CD134-GBR830、IgG1-CD134-Hu106、及IgG1-CD134-IBI101與瞬時轉染以小鼠OX40(A)、人類OX40(B)、或四種改組構築體中之一者的ExpiCHO-S細胞之結合，其中人類OX40之單一CRD被小鼠類似物(C至F)置換。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度之幾何平均值(gMFI)。

[圖9]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體IgG1-CD134-INCAGN1949及IgG1-CD134-MEDI0562與瞬時轉染以表現小鼠OX40(A)、人類OX40(B)、或四種改組構築體中之一者的ExpiCHO-S細胞之結合，其中人類OX40之單一CRD被小鼠類似物(C至F)置換。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度之幾何平均值(gMFI)。

[圖10]顯示如藉由流動式細胞測量術所測定之抗人類OX40抗體與瞬時轉染以表現小鼠OX40(A)、具有小鼠CRD1(B)之人類OX40、具有小鼠CRD2(C)之人類OX40、具有小鼠CRD3(D)之人類OX40、或具有小鼠CRD4(E)之人類OX40之ExpiCHO-S細胞之相對結合。所顯示之數據係在5 μg/mL之抗體濃度下測量之平均螢光強度(MFI)並標準化至抗體IgG1-CD134-A4453。黑點指示個別測量值而水平槓指示所進行之兩個實驗之平均值及SD。

[圖11]顯示OX40表現之報導子細胞受IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及抗體IgG1-CD134-h3C8之變體(A)、抗體IgG1-CD134-RG7888之變體(B)、IgG2s-CD134-SF2-E345R(C)、IgG1-CD134-007-RR及IgG1-CD134-012-RR(D)、及IgG1-CD134-11D4(E)之活化。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。所顯示之數據係來自在所進行之一個實驗中之單次測量之相對發光單位(RLU)、或二重複(圖A至圖D中之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)或五重複

(圖E中之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)測量值之平均RLU。

[圖12]顯示抗人類OX40抗體對過表現人類OX40之報導子細胞之活化的半最大有效濃度(EC_{50})。顯示者係源自二至五個獨立實驗中之個別EC_{50}值，其中水平線指示所組合之所有實驗之平均EC_{50}。黑色虛線代表IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之平均EC_{50}。

[圖13]顯示如由流動式細胞測量術所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及抗體IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-RG7888之變體、及IgG2s-CD134-SF2對活化之初代人類CD4+ (A)及CD8+ (B) T細胞增殖之效應。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係(A) CD4+及(B) CD8+ T細胞之平均擴增指數± SD，數據來自所測試之四至八個供體中一個代表性供體之二重複測量值。黑色虛線代表在抗人類OX40抗體不存在下培養之CD4+或CD8+ T細胞之擴增指數。(C)在第四天時分析之在多株活化之健康人類供體$CD8^-$ PBMC內$CD4^+$ T細胞之擴增指數，及(D)在多株活化之健康人類供體$CD4^-$ PBMC內$CD8^+$ T細胞之擴增指數。數據係源自所進行之三個實驗中所測試之四個供體中之一個代表性供體。

[圖14]顯示如由流動式細胞測量術所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及抗體IgG1-CD134-h3C8及IgG1-CD134-RG7888之變體對在CD4+ T細胞群體內CD4+中央記憶型T細胞之百分比之效應。將非結合抗體IgG1-b12-RR包

括在內以作為陰性對照。顯示之數據係在(A) CD4+ T細胞及(B) CD8+ T細胞中CCR7+CD45RA-細胞之平均百分比±SD，數據來自所測試之六個供體中一個代表性供體之二重複測量值。黑色虛線代表在抗人類OX40抗體不存在下培養之CD4+ T細胞中CCR7+CD45RA-細胞之百分比。

[圖15]顯示由SPR所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、其無Fc惰性突變之變體(亦即IgG1-CD134-003-HC6LC2-E345R)、及抗體IgG1-CD134-RG7888之兩個變體與固定化人類重組FcγRIa(A)、FcγRIIa[H](B)、FcγRIIa[R](C)、FcγRIIb(D)、FcγRIIIa[F](E)、及FcγRIIIa[V](F)構築體之結合。將具有野生型Fc結構域之抗HIV gp120抗體IgG1-b12包括在內以作為陽性對照。顯示之數據係相對結合反應，為在一個實驗中進行之單次測量。

[圖16]顯示由SPR所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、其無Fc惰性突變之變體(亦即IgG1-CD134-003-HC6LC2-E345R)、及抗體IgG1-CD134-h3C8之兩個變體與固定化人類重組FcγRIa(A)、FcγRIIa[H](B)、FcγRIIa[R](C)、FcγRIIb(D)、FcγRIIIa[F](E)、及FcγRIIIa[V](F)構築體之結合。將具有野生型Fc結構域之抗HIV gp120抗體IgG1-b12包括在內以作為陽性對照。顯示之數據係相對結合反應，為在一個實驗中進行之單次測量。

[圖17]顯示抗人類OX40抗體與瞬時轉染以表現FcγRIa之ExpiCHO-S細胞之結合。結合顯示為：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、其無Fc突變之變體(亦即IgG1-CD134-

003-HC6LC2)、及其親本嵌合抗體(亦即IgG1-CD134-003)(A)；及抗體IgG2-CD134-SF2之變體(B)；IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-INCAGN1949、及IgG1-CD134-IBI101(C)、及IgG1-CD134-h3C8之變體(D)、及IgG1-CD134-RG7888之變體(E)。將非結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。顯示之數據係來自所進行之兩個實驗中之一個代表性實驗的螢光強度之幾何平均值(gMFI)。

[圖18]顯示在T細胞活化之1、2、或3天之後，使用飽和濃度的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR，如藉由定量流動式細胞測量術所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對抗CD3/CD28之磁珠活化之初代人類CD4+及CD8+ T細胞之結合能力。呈現之數據係來自三個供體之抗體結合位點之平均數量± SD，其中符號代表來自個別供體之數量。

[圖19]顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與活化之人類CD4+及CD8+ T細胞以劑量依賴性方式結合。人類PBMC係在抗CD3/CD28抗體存在下培養2天，隨後與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-IBI101、IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-RG7888、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育。抗人類OX40抗體與T細胞之結合係藉由抗人類Fcγ抗體之流動式細胞數偵測來評估。顯示之數據係平均值± SD，數據來自所測試之三個供體中之一個代表性供體之二重複孔。

[圖20]顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或可溶性

OX40L(sOX40L)與活化之人類CD4+及CD8+ T細胞之結合。將由CD3/CD28磁珠活化兩天之抗人類CD4+及CD8+ T細胞與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或對照抗體IgG1-b12-RR在飽和濃度(2 μg/mL)的sOX40L存在或不存在下進行培育。藉由流動式細胞測量術分析結合。(A)抗體與CD4+及CD8+ T細胞的結合。(B) sOX40L與CD4+及CD8+ T細胞的結合。顯示之數據係平均幾何平均螢光強度(平均gMFI)，該數據來自三個供體中之一個代表性供體二重複孔±SD。

[圖21]顯示OX40表現之報導子細胞受抗人類OX40抗體之活化。(A)與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-003-E345R、IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-003-FEAL或非結合對照抗體IgG1-b12-RR在FcγRIIb-CHO-K1細胞不存在或存在下進行培育之OX40+ Jurkat報導子T細胞中之生物發光平均值± SD(其作為OX40促效劑活性之替代法)，以RLU ± SD呈現。顯示之數據來自一個實驗。(B)與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-IBI101、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR在FcγRIIb-CHO-K1細胞不存在或存在下進行培育之OX40+ Jurkat報導子T細胞中之生物發光平均值±SD。虛線代表在無抗體處理之情況下，孔之平均RLU值。顯示之數據來自兩個實驗中之一個代表性實驗。

[圖22]顯示在將多株活化之健康供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR培育二或五天之後，與人類T細胞活化相關聯之細胞表

面表現之標誌物之表現。表現4-1BB、CD25、HLA-DR、或PD-1之CD4+(A, C, E, G)及CD8+ T細胞(B, D, F, H)之百分比± SD係使用流動式細胞測量術來測定。顯示之數據係選自第二天或第五天，取決於那一天觀察到IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對各標誌物之效應最大。虛線代表僅與CD3抗體進行培育之標誌物表現之T細胞之百分比。所有顯示之數據係源自在三個實驗中所測試之七個供體中之一個代表性供體。在用5 μg/mL IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-b12-RR、或OX40促效性參考抗體類似物IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-11D4及IgG1-CD134-IBI101刺激之後，在刺激二至五天之後，如藉由流動式細胞測量術分析表現4-1BB、CD25、或HLA-DR之CD4+(I至K)及CD8+ T細胞(L至N)之百分比± SD。顯示之數據係從2至3個獨立實驗中所評估之4至7個供體中匯集之數據的平均標準化數據± SD。

[圖23]顯示在多株活化之健康人類供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育1、2、3、4、或6天之上清液中之細胞介素濃度之動力學。(A) TNFα、(B) IL-2、(C) IFNγ、及(D) IL-13之計算濃度平均值± SD係藉由多重ECLIA來測定。顯示之數據係源自總共測試之三個供體中之一個代表性供體。

[圖24]顯示在多株活化之健康人類供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育四天之上清液中之細胞介素濃度。PBMC樣本

在培育之前係未耗盡的或耗盡CD4+或 CD8+ T細胞。(A) TNFα、(B) IL-2、(C) IFNγ、及(D) IL-13之計算濃度平均值± SD係藉由多重ECLIA來測定。顯示之數據係源自總共測試之三個供體中之一個代表性供體。

[圖25]顯示在多株活化之健康人類供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育四天之上清液中之細胞介素濃度。(A) IFNγ、(B) IL-13、(C) IL-2、及(D) TNFα之計算濃度平均值± SD係藉由多重ECLIA來測定。顯示之數據係源自總共測試之兩個供體中之一個供體。

[圖26]顯示在多株活化之健康人類供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育四天之上清液中之細胞介素濃度。(A) IFNγ、(B) IL-13、(C) IL-2、及(D) TNFα之計算濃度平均值± SD係藉由多重ECLIA來測定。顯示之數據係源自總共測試之兩個供體中之一個供體。

[圖27]顯示在多株活化之健康人類供體PBMC樣本與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG2sCD134-SF2-E345R、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育之上清液中之細胞介素濃度。(A) IFNγ、(B) IL-13、(C) IL-2、及(D) TNFα之計算濃度平均值± SD係藉由多重ECLIA來測定。顯示之數據係源自總共測試之兩個供體中之一個供體。

[圖28]顯示如藉由流動式細胞測量術所評定之在抗原特異性人類T細胞增殖檢定中在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR處理後之第四天時之CD8+ T細胞增殖。(A)與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR進行培育之OX40表現之CLDN6特異性CD8+ T細胞之擴增指數平均值± SD，數據來自兩個實驗中所測試之三個供體中之一個代表性供體之二重複孔。黑色虛線指示在沒有抗體(僅培養基)之情況下從培育之iDC:CD8+ T細胞共培養物測定之基線值。(B) 在2 μg/mL IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR存在下，與自體CLDN6表現之(CLDN6+)或模擬轉染之(CLDN6-) iDC進行培育之OX40表現之CLDN6特異性CD8+ T細胞之二重複孔之擴增指數平均值± SD。顯示所測試之所有三個供體之數據。

[圖29]顯示如藉由流動式細胞測量術分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與FcγRIa表現之人類單核球衍生之M2c樣巨噬細胞缺乏結合。在培育15 min(A)及24 h(B)之後，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR或IgG1-b12與FcγRIa表現之人類單核球衍生之M2c樣巨噬細胞之結合。結合係相對於背景對照之結合(僅與二級抗體結合，由黑色虛線表示)顯示。點代表在兩個獨立實驗中所測量之三個個別供體，且長條圖及誤差槓分別代表三個供體之平均倍數變化及SD。

[圖30]顯示由SPR所分析之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與人類新生兒受體FcRn之結合。顯示之數據係在pH

6.0(A至E)及pH 7.4(F)下在FcRn與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之間的交互作用之感測器圖，其中所測試之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR以不同濃度測試，如各子面板所示。顯示之數據來自在pH 6.0下結合之三個實驗中之一個代表性實驗及在pH 7.4下結合之兩個實驗中之一個代表性實驗。

[圖31]顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-CD52-E345R與活化之CD4+及CD8+ T細胞之結合、及與其結合之C1q。(A至C)初代人類T細胞係用抗CD3/CD28磁珠刺激，且隨後與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD52-E345R、IgG1-b12-RR進行培育，藉由流動式細胞測量術評估抗體與細胞的結合。所顯示者係抗體與CD4+(A)及CD8+(B及C)T細胞之結合。圖C展示與圖B相同的IgG1-b12-RR數據，但不同的Y軸範圍。數據表示為平均gMFI± SD，數據來自三個實驗中所測試之三個供體中之一個代表性供體之二重複孔。C1q與已結合至活化之CD4+(D)及CD8+(E) T細胞上之OX40的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD52-E345R、或IgG1-b12-RR之結合如由流動式細胞測量術所分析。顯示之數據係平均gMFI± SD，數據來自三個實驗中所測試之三個供體中之一個代表性供體之二重複孔。

[圖32]顯示單價及雙價抗人類OX40抗體與活化之人類T細胞之結合。將使用抗CD3/CD28磁珠活化三天之人類CD4+(A)及CD8+(B) T細胞與IgG1-CD134-003-HC6LC2-

RR、單價OX40抗體BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-003-HC6LC2、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR進行培育並藉由流動式細胞測量術評估結合。顯示之數據係平均gMFI± SD，數據來自所測試之四個供體中之一個代表性供體之二重複孔。

[圖33]顯示在OX40+ T細胞報導子檢定及多株T細胞增殖檢定中，BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、及IgG1-CD134-003-RR-K409R之功能活性。(A)在與BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-003-RR-K409R、或IgG1-b12-RR進行培育之OX40+ Jurkat報導子T細胞中之生物發光(其作為OX40促效劑活性之替代法)，其係呈RLU形式。顯示之數據來自總共四個實驗中之一個代表性實驗。(B)在多株T細胞增殖中在與一定濃度範圍的BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、或IgG1-b12-RR進行培育之後如藉由流動式細胞測量術所分析之CD4+ T細胞增殖之富集，且以二重複孔之平均值± SD呈現。顯示之數據係CD4+ T細胞擴增指數，數據來自一個實驗中所測試之三個供體中之一個供體。

[圖34]顯示在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR處理後，在多株活化之健康人類供體PBMC培養物中之膜OX40表現及可溶性OX40(sOX40)

水平。(A)CD4+及CD8+ T細胞上OX40之細胞表面表現之二重複孔之平均值± SD，如藉由流動式細胞測量術所評定。(B)在上清液中sOX40之二重複孔之平均濃度± SD，如藉由ECLIA所測量。顯示之數據係源自類似實驗設置所測試之三個供體中之一個代表性供體。

[圖35]顯示在可溶性OX40(sOX40)存在下，OX40表現之報導子細胞受IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之活化。OX40+ Jurkat報導子細胞係在不同濃度的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR、及sOX40存在下培養5 h。生物發光(其作為OX40促效劑活性之替代法)係以二重複孔之平均RLU± SD測量。顯示之數據源自兩個實驗中之一個實驗。

[圖36]顯示在多株T細胞增殖檢定中，在sOX40存在或不存在下用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或非結合對照抗體IgG1-b12-RR處理後的多株活化之CD4+及CD8+ T細胞之增殖。顯示之數據係在第四天時如藉由流動式細胞測量術所測定之(A) CD4+ T細胞擴增指數、及(B) CD8+ T細胞擴增指數之二重複孔之平均值± SD。數據係源自所進行之一個實驗中所測試之四個供體中之一個代表性供體。

[圖37]顯示如藉由ECLIA在連續獲得之血漿樣本中所測定之在靜脈內抗人類OX40抗體投予之後，於SCID小鼠血漿中之總huIgG水平。數據以每個處理組三隻小鼠之平均huIgG濃度± SD表示，惟以下小鼠組除外：接受0.125 mg/kg或1.25 mg/kg之IgG1-CD134-003-RR-K409R(N=2)、

0.125 mg/kg之IgG1-CD134-003-FEAL(N=1)、或12.5 mg/kg之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR(N=2)。低於定量下限(LLOQ)之值未顯示(對於接受0.125 mg/kg IgG1-CD134-003-RR-K409R之小鼠為在第8天之後，N=3；對於接受0.125 mg/kg IgG1-CD134-003-FEAL之小鼠為在第14天之後，N=1)。斷續線指示根據兩室模型預測之WT huIgG血漿濃度。水平虛線指示ECLIA檢定之LLOQ及定量上限(ULOQ)。顯示之數據來自一個實驗。

[圖38]顯示在個別小鼠中之抗體藥物動力學參數。SCID小鼠在t=0時接受IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-003-RR-K409R、IgG1-CD134-003-FEAL之單一靜脈內注射，且總huIgG水平係藉由ECLIA在連續獲得之血漿樣本中測定，以計算CL(A)、t½(B)及Cmax(C)。將個別小鼠之值與指示每個處理組之平均值± SD之水平槓一起繪製。

[圖39]顯示在攜帶MC38腫瘤之人類OX40嵌入(hOX40 KI)之小鼠中測量之腫瘤體積。小鼠係在第0天時以不同濃度的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或20 mg/kg IgG1-b12-FEAL腹膜內處理。(A)在開始處理之後第10天時測量之腫瘤體積。將個別小鼠之值與指示每個處理組之平均值± SD之水平槓一起繪製。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(**P < 0.01)。(B)攜帶MC38腫瘤之hOX40 KI小鼠隨時間推移測量之平均腫瘤體積(± SEM)，其處理如圖中所示。(C) Kaplan-Meier曲線，其顯示如所

示處理之攜帶MC38腫瘤之小鼠的無進展存活期比例(定義為腫瘤體積< 500 mm3)。顯著性使用Mantel-Cox分析計算(*P < 0.05及***P < 0.001，其係相較於IgG1-b12-FEAL對照組)。

[圖40]顯示如藉由流動式細胞測量術所分析之來自用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠之周邊血液樣本中之T細胞百分比及絕對數量。顯示CD4+(A, B)及CD8 T細胞(C, D)在CD3+ T細胞群體內之百分比(A, C)及其之絕對數量(B, D)。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(* P < 0.05; **P < 0.01)。

[圖41]顯示表現增殖標誌物Ki67(A)、CD25(B)、IA/IE(C)、PD-1(D)、及4-1BB(E)之CD4+ T細胞之百分比，其係如藉由流動式細胞測量術在第5天(在兩次處理之後)時從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中取得之周邊血液樣本中分析。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(* P < 0.05; **P < 0.01)。

[圖42]顯示增殖及腫瘤特異性(ADPGK-四聚體特異性)CD8+ T細胞之百分比及絕對數量。顯示之數據係(A)表

現增殖標誌物Ki67之CD8+ T細胞之百分比、(B)CD8+Ki67+細胞之絕對數量、(C)腫瘤特異性CD8+ T細胞之百分比、及(D)腫瘤特異性CD8+ T細胞之絕對數量，其係如藉由流動式細胞測量術在第5天(在兩次處理之後)時從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中取得之周邊血液樣本中分析。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(**P < 0.01)。

[圖43]顯示表現增殖標誌物CD25(A)、IA/IE(B)、PD-1(C)、及4-1BB(D)之CD8+ T細胞之百分比，其係如藉由流動式細胞測量術在第5天(在兩次處理之後)時從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中取得之周邊血液樣本中分析。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計學上顯著差異(* P < 0.05; **P < 0.01)。

[圖44]顯示在經IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中之血漿細胞介素濃度。血漿樣本係在第0天(處理前)及在分別用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理一或兩次之後的第2及5天時收集。血漿樣本中之細胞介素分析係藉由ECLIA進

行。顯示之數據係四隻個別小鼠之濃度及(A) IFNγ、(B) IP-10、(C) IL-2、(D) IL-4、(E) MCP-1、(F) IL-10、(G) IL-27p28、及(H) TNFα之平均濃度。顯示之數據源自一個實驗。

[圖45]顯示從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之MC38攜帶之hOX40 KI小鼠收集的每mm2腫瘤組織之腫瘤內免疫細胞數量。每mm2腫瘤組織的(A) CD3+細胞、(B) CD3+Ki67+細胞、(C) CD4+細胞、(D) CD8+細胞、(E)顆粒酶B+細胞、及(F)人類OX40+細胞之數量，如藉由在腫瘤組織之定量免疫組織化學分析所測定。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表平均值± SD。*p < 0.05，其係如藉由Mann-Whitney測試所測定。

[圖46]顯示在攜帶MC38腫瘤之hOX40 KI小鼠中測量之腫瘤體積。小鼠係在第0天時以不同濃度的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或20 mg/kg IgG1-b12-FEAL腹膜內處理。(A)在開始處理之後第15天時測量之腫瘤體積。將個別小鼠之值與指示來自一個實驗所包括之每個處理組之平均值± SEM之水平槓一起繪製。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(* P < 0.05; **P < 0.01)。(B)攜帶MC38腫瘤之hOX40 KI小鼠隨時間推移測量之平均腫瘤體積(± SEM)，其處理如圖中所示。(C)Kaplan-Meier曲線，其顯示如所示處理之攜帶MC38腫瘤之小鼠的無進展存活期比例(定義為腫瘤體積< 500 mm3)。顯著性使用Mantel-Cox分析計算(*P < 0.05，其係相較於IgG1-b12-

FEAL對照組)。

[圖47]顯示在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR處理開始之後的第5天(在2次處理之後)時，使用流動式細胞測量術在從MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI收集之腫瘤樣本中偵測(A) CD45+細胞、(B) CD3+細胞、(C) CD4+ T細胞、(D) CD8+ T細胞、及(E) Treg之百分比。亦顯示(F) CD45+細胞、(G) CD3+細胞、(H) CD4+ T細胞、(I) CD8+ T細胞、及(J) Treg之絕對數量，如使用流動式細胞測量術所偵測。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分係計算顯著性(* P < 0.05)。

[圖48]顯示表現(A) CD25、(B)顆粒酶B(GZMB)、(C)人類OX40、及(D) PD-1之常規CD4+ T細胞之百分比，其係如藉由流動式細胞測量術在第5天(在兩次處理之後)時從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中取得之腫瘤樣本中分析。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(* P < 0.05; **P < 0.01; *** P < 0.001)。

[圖49]顯示表現(A) CD25、(B)顆粒酶 B(GZMB)、(C)人類OX40、及(D) PD-1之CD8+ T細胞之百分比，其係如藉由流動式細胞測量術在第5天(在兩次處理之後)時從用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR處理之MC38

腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中取得之腫瘤樣本中分析。在圖中之點代表個別小鼠，且柱及誤差槓代表來自一個實驗所包括之所有動物之平均值± SD。使用Mann-Whitney分析評定處理組之間的統計上的顯著差異(**P < 0.01; *** P < 0.001)。

【實施方式】

定義

術語「抗體(antibody)」(Ab)在本發明之背景下係指免疫球蛋白分子，免疫球蛋白分子之片段、或其任一的衍生物，其具有特異性結合抗原之能力。本發明之抗體包含免疫球蛋白之Fc結構域及抗原結合區。抗體通常含有兩個CH2-CH3區及連接區，例如鉸鏈區，例如至少一Fc結構域。因此，本發明之抗體可包含Fc區及抗原結合區。免疫球蛋白分子之重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原交互作用的結合結構域。抗體之恆定或「Fc」區可媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及補體系統之組分(諸如C1q，補體活化典型路徑中之第一組分)。如本文中所使用，除非上下文牴觸，否則免疫球蛋白之Fc區一般至少含有免疫球蛋白CH之CH2結構域及CH3結構域，且可包含連接區，例如鉸鏈區。Fc區通常經由例如連接兩個鉸鏈區之雙硫鍵及/或兩個CH3區之間的非共價交互作用而呈二聚化形式。二聚體可係同二聚體(其中兩個Fc區單體胺基酸序列係相同的)或異二聚體

(其中兩個Fc區單體胺基酸序列有一或多個胺基酸不同)。如所屬技術領域中眾所周知，全長抗體之Fc區片段可例如藉由用木瓜酶消化該全長抗體來生成。如本文中所定義之抗體除Fc區及抗原結合區域之外，還可包含免疫球蛋白CH1區及CL區中之一或兩者。抗體亦可係多特異性抗體，例如雙特異性抗體或類似分子。術語「雙特異性抗體」係指對至少兩個不同、一般不重疊的表位具有特異性之抗體。此類表位可以在相同或不同的目標上。若表位係在不同的目標上，則此類目標可在相同細胞或不同細胞或細胞類型上。如上所述，除非另有說明或上下文明顯牴觸，否則本文中之術語抗體包括包含Fc區之至少一部分並保留特異性結合抗原之能力的抗體之片段。此類片段可藉由任何已知技術提供，諸如酶切割、肽合成及重組表現技術。已顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。涵蓋在術語「Ab」或「抗體(antibody)」內之結合片段之實施例包括但不限於單價抗體(由Genmab在WO2007059782中描述)；重鏈抗體，其僅由兩條重鏈所組成且天然存在於例如駱駝科動物中(例如Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446)；ThioMabs, Roche, Wo2011069104)；經鏈交換工程改造之結構域(SEED或Seed體)，其係不對稱且雙特異性抗體樣分子(Merck, WO2007110205)；Triomab(Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al.1995 J Immunol 155:219; WO2002020039)；FcΔAdp(Regeneron, WO2010151792)；不對稱支架(Azymetric Scaffold)(Zymeworks/Merck,

WO2012/058768)；mAb-Fv(Xencor, WO2011/028952)；Xmab(Xencor)；雙可變結構域免疫球蛋白(Abbott, DVD-Ig，美國專利第7,612,181號)；雙結構域雙頭抗體(Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923)；雙功能抗體(ImClone/Eli Lilly)；杵入臼(knobs-into-holes)抗體型式(Genentech, WO9850431)；DuoBody(Genmab, WO 2011/131746)；雙特異性IgG1及IgG2(Pfizer/Rinat, WO11143545)；DuetMab(MedImmune, US2014/0348839)；靜電操縱抗體型式(Electrostatic steering antibody format)(Amgen，EP1870459及WO 2009089004；Chugai，US201000155133；Oncomed，WO2010129304A2)；雙特異性IgG1及IgG2(Rinat neurosciences Corporation, WO11143545)；CrossMAbs(Roche, WO2011117329)；LUZ-Y(Genentech)；雙選殖型(Biclonic)(Merus, WO2013157953)；雙靶向結構域抗體(Dual Targeting domain antibody)(GSK/Domantis)；二合一抗體或雙重作用Fab，其辨識兩種目標(Genentech, NovImmune, Adimab)；交聯之Mab(Karmanos Cancer Center)；共價融合之mAb (AIMM)；CovX-body(CovX/Pfizer)；FynomAbs (Covagen/Janssen ilag)；DutaMab (Dutalys/Roche)；iMab(MedImmune)；IgG樣雙特異性(ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2)：p. 65-74)；TIG-body、DIG-body、及PIG-body(Pharmabcine)；雙重親和力重靶向分子(Dual-affinity retargeting molecule)(Fc-DART或Ig-

DART，Macrogenics，WO/2008/157379、WO/2010/080538)；BEAT(Glenmark)；Zybodies(Zyngenia)；具有共同輕鏈(Crucell/ Merus, US7262028)或共同重鏈(κλBodies by NovImmune, WO2012023053)之方法，以及包含與含有Fc區之抗體片段融合之多肽序列的融合蛋白質，像scFv融合蛋白，像ZymoGenetics/BMS之BsAb、Biogen Idec之HERCULES(US007951918)；SCORPIONS(Emergent BioSolutions/Trubion 及 Zymogenetics/BMS)；Ts2Ab(MedImmune/AZ(Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3)：p. 672-92)；scFv融合蛋白(Genentech/Roche)；scFv融合蛋白(Novartis)；scFv融合(Immunomedics)；scFv融合蛋白(Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246)；TvAb(Roche,WO 2012025525, WO 2012025530)；mAb2(f-Star, WO2008/003116)；及雙scFv融合蛋白。應理解，除非另有說明，否則術語抗體包括單株抗體(諸如人類單株抗體)、多株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、單特異性抗體(諸如雙價單特異性抗體)、雙特異性抗體、任何同型和/或同種異型之抗體；抗體混合物(重組選殖株)，例如藉由Symphogen及Merus(Oligoclonics)所利用之技術生成，如WO2015/158867中所述之多聚體Fc蛋白質及如WO2014/031646中所述之融合蛋白質。雖然此等不同抗體片段及形式通常包括在抗體之涵意內，但是彼等全體地且各自獨立地係本發明之獨特特性，展現不同的生物學性質及效用。

天然受體之「促效性抗體」係結合受體以形成受體-

抗體複合物之化合物，且其活化該受體，從而起始訊息傳導路徑及進一步的生物過程。

本文中之術語「促效作用(agonism)」「促效性(agonistic)」可互換使用且係指或描述能夠直接或間接地，實質上誘導、促進、或增強OX40生物活性或活化的抗體。視需要地，「促效性OX40抗體」係能夠藉由與OX40之配體(稱為OX40L(CD134L、OX-40L、TNLG2B、OX4OL、GP34、CD252抗原、CD134配體、TAX轉錄活化醣蛋白1、CD252、OX40配體、OX40L、TNFSF4、腫瘤壞死因子配體超家族成員4、醣蛋白Gp34、TNF超家族成員4、TXGP1、Tax-轉錄活化醣蛋白1(34kD)、腫瘤壞死因子(配體)超家族，成員4、腫瘤壞死因子(配體)超家族成員4、腫瘤壞死因子超家族成員4))類似的機制活化OX40受體的抗體，其導致一或多種胞內訊息傳導路徑之活化，該訊息傳導路徑可包括NF-KB及MAPK8/JNK路徑之活化。

如本文中所述之「OX40抗體」或「抗OX40抗體」係與蛋白質OX40、特別是人類OX40特異性結合的抗體。

如本文中所使用之「變體」係指與親本或參考序列有一或多個胺基酸殘基不同的蛋白質或多肽序列。例如變體可與親本或參考序列具有至少80%，諸如90%、或95%、或97%、或98%、或99%之序列同一性。此外，或替代地，變體可與親本或參考序列相差12或更少個(諸如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個)突變，諸如胺基酸殘基之取代、插入、或刪除。因此，「變體抗體」或「抗體

變體」在本文中可互換使用且係指如相較於親本或參考抗體，例如在抗原結合區、Fc區或兩者中有一或多個胺基酸殘基不同的抗體。同樣地，「變體Fc區」或「Fc區變體」係指如相較於親本或參考Fc區，有一或多個胺基酸殘基不同的Fc區，視需要地與親本或參考Fc區胺基酸序列相差12或更少個(諸如11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個)突變，諸如胺基酸殘基之取代、插入、或刪除。親本或參考Fc區一般係人類野生型抗體之Fc區，取決於上下文，其可為特定的同型。呈二聚化形式之變體Fc區可為同二聚體或異二聚體，例如其中該二聚化Fc區之胺基酸序列中之一者包含突變，而另一胺基酸序列與親本或參考野生型胺基酸序列相同。包含Fc區胺基酸序列之野生型(一般為親本或參考序列)IgG CH及變體IgG恆定區胺基酸序列之實施例列於表3中。

如本文中所使用之術語「免疫球蛋白重鏈(immunoglobulin heavy chain)」或「免疫球蛋白之重鏈(heavy chain of an immunoglobulin)」意指免疫球蛋白之重鏈中之一者。重鏈一般由定義該免疫球蛋白之同型的重鏈可變區(本文中縮寫為VH)及重鏈恆定區(本文中縮寫為CH)所構成。重鏈恆定區一般由三個結構域CH1、CH2、及CH3所構成。如本文中所使用之術語「免疫球蛋白(immunoglobulin)」意指一類結構上相關之醣蛋白，其由二對多肽鏈(一對低分子量輕(L)鏈及一對重(H)鏈)所組成，所有四個鏈可能藉由雙硫鍵相互連接。免疫球蛋白之

結構已被充分表徵(參見例如Fundamental Immunology Ch. 7 Paul, W., 2nd ed. Raven Press, N.Y.1989)。在免疫球蛋白之結構內，二個重鏈係經由在稱為「鉸鏈區」中之雙硫鍵相互連接。與重鏈一樣，各輕鏈一般由幾個區所構成；輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區一般由一個結構域CL所構成。此外，VH及VL區可進一步細分為高度變異性之區(或在序列及/或結構定義之環形式中可為高度變異之高度變異區)，亦稱為互補決定區(CDR)，該等互補決定區間散置有更保守的區域，稱為框架區(FR)。各VH及VL一般由三個CDR及四個FR所組成，按下列順序自胺基端排列至羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本文中之CDR序列係根據IMGT定義(參見Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999] and Brochet X. Nucl.Acids Res.36, W503-508(2008))。

當本文中所使用時，術語「半分子(half molecule)」、「Fab臂(Fab arm)」及「臂(arm)」係指一個重鏈-輕鏈對。當雙特異性抗體被描述為包含「源自」第一抗體的半分子抗體及「源自」第二抗體的半分子抗體時，術語「源自(derived from)」指示該雙特異性抗體係藉由任何已知之方法將來自該第一及第二抗體之各者的半分子重組成所產生之雙特異性抗體來生成。在此背景下，「重組」不意欲受限於任何特定重組方法，且因此包括所有下文中所述之用於產生雙特異性抗體之方法，包括例如藉由「半分子交

換」(在所屬技術領域中亦描述為「Fab臂交換」及DuoBody®方法來重組，以及在核酸層級及/或通過在相同細胞中之兩個半分子之共表現來重組。

如本文中所使用之術語「抗原結合區(antigen-binding region)」或「結合區(binding region)」或抗原結合結構域係指能夠與抗原結合的抗體之區域。此結合區一般由抗體之VH及VL結構域所定義，該等結構域可進一步細分為高度變異性之區(或在序列及/或結構定義之環形式中可為高度變異之高度變異區)，亦稱為互補決定區(CDR)，該等互補決定區間散置有更保守的區域，稱為框架區(FR)。抗原可係任何分子，例如多肽，例如存在於細胞、細菌、或病毒粒子上。術語「抗原結合區(antigen-binding region)」及「抗原結合位點(antigen-binding site)」在本發明之背景下可互換使用，除非與上下文牴觸。

術語「抗原(antigen)」及「目標(target)」在本發明之背景下可互換使用，除非與上下文牴觸。

如本文中所使用之術語「結合(binding)」係指當使用抗體作為配體及使用抗原作為分析物藉由生物層干涉測量術測定時，抗體一般以對應於$1E^{6}$ M或更小，例如$5E^{7}$ M或更小、$1E^{7}$ M或更小、諸如$5E^{8}$ M或更小、諸如$1E^{8}$ M或更小、諸如$5E^{9}$ M或更小，或諸如$1E^{9}$ M或更小之K_D的結合親和力與預定抗原或目標之結合，且以對應於比該抗體與除預定抗原或密切相關之抗原以外的非特異性抗原(例如BSA、酪蛋白)結合之親和力低至少十倍的K_D的親和力結

合至預定抗原，諸如低至少100倍，例如低至少1,000倍，諸如低至少10,000倍，例如低至少100,000倍。

如本文中所使用之術語「K_D」(M)係指特定抗體-抗原交互作用之解離平衡常數，且係藉由將k_d除以k_a所獲得。

如本文中所使用之術語「k_d」(sec^{-1})係指特定抗體-抗原交互作用之解離速率常數。該值亦稱為k_{off}值或解離速率(off-rate)。

如本文中所使用之術語「k_a」(M^{-1} x sec^{-1})係指特定抗體-抗原交互作用之締合速率常數。該值亦稱為k_{on}值或締合速率(on-rate)。

如本文中所使用之術語「OX40」係指名稱為OX40之人類蛋白質，亦稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員4(TNFRSF4)。在顯示於SEQ ID NO：52中之胺基酸序列中，胺基酸殘基1至28係訊息肽，而胺基酸殘基29至277係成熟多肽。

在食蟹獼猴(Macaca fascicularis)中，OX40蛋白質具有SEQ ID NO：51中所示之胺基酸序列。

已揭示用於治療癌症之抗人類OX40之促效性IgG1抗體。

WO2009/079335A1揭示人類OX40結合抗體11D4，其在多種鼠腫瘤模型中顯示促效活性。抗體殖株11D4在抗人類CD3預培育之初代T細胞或健康供體PBMC樣本之培育後顯示誘導T細胞活化。11D4阻斷天然配體OX40L之結合，且亦顯示結合食蟹獼猴T細胞。Gutierrez等人報告，基於

11D4之臨床候選抗體BMS-986178當作為單一療法治療投予時，在1/2a期臨床試驗中之晚期癌症患者中沒有誘導劑量限制性毒性，也沒有誘導客觀反應(Gutierrez et al. Clin Cancer Res. 2021 Jan 15;27(2):460-472)。

其他描述經由嚙合人類OX40來誘導T細胞活化的OX40抗體包括株A4453(WO2019/223733)、Hu106(WO2020/030570A1)、MEDI0562(INN 10420，他佛利單抗(tavolimab))、ABBV368(INN 11242，瑞多非利單抗(revdofilimab))、IBI101(INN 11200；庫達利單抗(cudarolimab))、INCAGN1949(US10259882B2)、GSK-3174998(US9006399)、及49B4(WO2019/086497A2)。

術語「抗體結合區(antibody binding region)」係指抗原之區，其包含與抗體結合之表位。抗體結合區可藉由使用生物層干涉測量術之表位結合、藉由丙胺酸掃描、或藉由改組分析(shuffle assay)(使用抗原構築體，其中將該抗原之區與另一物種的抗原之區交換並測定該抗體是否仍結合至該抗原)來測定。在抗體結合區內參與與抗體交互作用之胺基酸可藉由氫/氘交換質譜法及藉由與其抗原結合之抗體結晶學來測定。

術語「表位(epitope)」意指由抗體特異性結合之抗原決定位。表位通常由分子之表面群組所組成，諸如胺基酸、糖側鏈或其組合，且通常具有特定之三維結構特徵，以及特定之電荷特徵。構形及非構形表位之區別在於在變性溶劑存在下失去與前者的結合，但不失去與後者的結

合。表位可包含直接參與結合之胺基酸殘基、及不直接參與結合之其他胺基酸殘基，諸如當抗體與抗原結合時被抗體有效地阻斷或覆蓋之胺基酸殘基(換言之，該胺基酸殘基係在該特異性抗體之足跡內或緊鄰該特異性抗體之足跡)。

如本文所使用之術語「單株抗體(monoclonal antibody)」、「單株Ab(monoclonal Ab)」、「單株抗體組成物(monoclonal antibody composition)」、「mAb」等係指具單一分子組成之抗體分子製劑。單株抗體組成物展示對特定表位之單一結合特異性及親和力。因此，術語「人類單株抗體(human monoclonal antibod)」係指展示單一結合特異性，具有源自人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。人類單株抗體可由融合至永生化細胞之融合瘤產生，該融合瘤包括從轉基因或反位染色體-非人類動物(諸如轉基因小鼠或大鼠)獲得之B細胞，其具有之基因組包含人類重鏈轉基因及輕鏈轉基因。單株抗體亦可從經重組修飾之宿主細胞、或使用細胞萃取物的系統產生，該細胞萃取物支持編碼該抗體之核酸序列之體外轉錄及/或轉譯。

如本文中所使用之術語「同型(isotype)」係指免疫球蛋白類別(例如IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM)或其任何同種異型，諸如由重鏈恆定區基因編碼之IgG1m(za)及IgG1m(f)。再者，各重鏈同型均可與kappa(κ)或lambda(λ)輕鏈組合。

當本文中使用時，術語「全長抗體(full-length antibody)」表示該抗體不是片段，且含有對該同型在自然界中通常發現之特定同型的全部結構域，例如在IgG1抗體方面有VH、CH1、CH2、CH3、鉸鏈、VL及CL結構域。在全長變體抗體中，重鏈及輕鏈恆定結構域以及可變結構域當相較於全長親本或野生型抗體時可特別含有改善該抗體之功能性質的胺基酸取代。根據本發明之全長抗體可藉由包含下列步驟之方法產生：(i)將CDR序列選殖到包含完整重鏈序列及完整輕鏈序列之合適載體中，及(ii)在合適之表現系統中表現完整重鏈序列及輕鏈序列。當從CDR序列或完全可變區序列開始時，產生全長抗體係在熟習本技術之人士的知識範圍內。因此，熟習本技術之人士將知道如何生成根據本發明之全長抗體。

如本文中所使用之術語「人類抗體(human antibody)」意欲包括包含源自人類種系免疫球蛋白序列及人類免疫球蛋白恆定結構域之可變區及框架區的抗體。本發明之人類抗體可包括非由人類種系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由在體外隨機或位點特異性誘變引入或藉由體內體細胞突變引入之突變、插入或刪除)。然而，如本文中所使用之術語「人類抗體(human antibody)」並不意欲包括其中已將源自另一個非人類物種(諸如小鼠)之種系的CDR序列移植到人類框架序列上的抗體。

如本文所使用之術語「人源化抗體(humanized

antibody)」係指經基因工程改造之非人類抗體，其含有人類抗體恆定結構域及經修飾以含有高水平的與人類可變結構域序列同源性之非人類可變結構域。此可藉由將共同形成該抗原結合位點的六個非人類抗體互補決定區(CDR)移植到同源人類受體框架區(FR)上來達成(參見WO92/22653及EP0629240)。為了完全重建該親本抗體之結合親和力及特異性，可能需要將來自該親本抗體(亦即非人抗體)之框架殘基取代到人類框架區(回復突變(back-mutation))中。結構同源性建模可協助識別框架區中對該抗體之結合性質重要的胺基酸殘基。因此，人源化抗體可包含非人類CDR序列、主要的人類框架區(該人類框架區視需要地包含非人類胺基酸序列之一或多個胺基酸回復突變)、及完全人類恆定區。視需要地，可應用額外之胺基酸修飾(其不一定為回復突變)來獲得具有較佳特徵(諸如親和力及生化性質)之人源化抗體。

如本文中所使用之術語「Fc區(Fc region)」或「Fc結構域(Fc domain)」可互換使用且係指重鏈恆定區之區域，其依抗體之N-端至C-端方向包含至少一個鉸鏈區、CH2區及CH3區。抗體之Fc區可媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(諸如效應細胞)及補體系統之組分)之結合。

除非另有說明或與上下文明顯牴觸，術語「親本多肽(parent polypeptide)」或「親本抗體(parent antibody)」應被理解為與根據本發明之多肽或抗體相同，但其中該親本

多肽或親本抗體不具有突變之多肽或抗體。例如，抗體IgG1-CD134-003係IgG1-CD134-003-P329R-E345R之親本抗體。

如本文所使用之術語「鉸鏈區(hinge region)」係指免疫球蛋白重鏈之鉸鏈區。因此，例如人類IgG1抗體之鉸鏈區對應於根據Eu編號(Eu索引)(如Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689(1991)中所示)的胺基酸216至230。然而，該鉸鏈區亦可為如本文中所述之任何其他亞型。

如本文所使用之術語「CH1區(CH1 region)」或「CH1結構域(CH1 domain)」係指免疫球蛋白重鏈之CH1區。因此，例如人類IgG1抗體之CH1區對應於根據Eu編號(如Kabat中所示(同上))的胺基酸118至215。然而，該CH1區亦可為如本文中所述之任何其他亞型。

如本文所使用之術語「CH2區(CH2 region)」或「CH2結構域(CH2 domain)」係指免疫球蛋白重鏈之CH2區。因此，例如人類IgG1抗體之CH2區對應於根據Eu編號(如Kabat中所示(同上))的胺基酸231至340。然而，該CH2區亦可為如本文中所述之任何其他亞型。

如本文所使用之術語「CH3區(CH3 region)」或「CH3結構域(CH3 domain)」係指免疫球蛋白重鏈之CH3區。因此，例如人類IgG1抗體之CH3區對應於根據Eu編號(如

Kabat中所示(同上))的胺基酸341至447。然而，該CH3區亦可為如本文中所述之任何其他亞型。

如本文中所使用之術語「Fc媒介之效應功能(Fc-mediated effector functions)」或「Fc效應功能(Fc effector functions)」可互換使用且意指多肽或抗體與其目標或細胞膜上之抗原結合的結果，其中該Fc媒介之效應功能可歸因於該多肽或抗體之Fc區。Fc媒介之效應功能之實施例包括(i) C1q結合、(ii)補體活化、(iii)補體依賴性細胞毒性(CDC)、(iv)抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性(ADCC)、(v) Fc-γ受體(FcγR)結合、(vi)抗體依賴性，FcγR媒介之抗原交聯、(vii)抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、(viii)補體增強之細胞毒性，(ix)與由抗體媒介之調理素化抗體(opsonized antibody)之補體受體結合、(x)調理作用、及(xi) (i)至(x)中任一者之組合。

如本文中所使用之術語「減少之Fc效應功能(decreased Fc effector function)」或「減少之Fc媒介之效應功能(Decreased Fc-mediated effector function)」可互換使用且意指當直接相較於在相同檢定中之親本多肽或抗體之Fc效應功能時，抗體之Fc效應功能減少。

如本文中所使用之術語「惰性(inertness/inert)」、「非活化(non-activating)」係指至少不能夠經由個別抗體之二個Fc區來結合一或多種FcγR、誘導FcγR媒介之FcγR交聯、或誘導FcγR媒介之目標抗原交聯、或不能夠結合C1q的Fc區。因此，在本發明之某些具體實施例中，Fc區

係惰性。因此，在某些具體實施例中，一些或所有的Fc媒介之效應功能係減弱或完全不存在。

如本文中所使用之術語「寡聚化(oligomerization)」意指將單體轉化成有限聚合度的過程。根據本發明之抗體可在目標結合(例如在細胞表面)之後經由Fc區之非共價締合形成寡聚體，諸如六聚體。抗OX40抗體通過Fc:Fc交互作用在細胞表面結合後之寡聚化可能增加OX40成簇，從而導致OX40細胞內訊息傳導之活化。包含E345R或E430G突變之抗體在細胞表面結合後對形成寡聚體(諸如六聚體)之能力可如：de Jong RN et al, PLoS Biol. 2016 Jan 6;14(1):e1002344中所述評估。Fc-Fc媒介之抗體寡聚化係在(細胞)表面上之目標結合之後，通過相鄰抗體之間的Fc區之分子間締合而發生且藉由引入E345R或E430G突變(根據Eu索引編號)來增加。

如本文中所使用之術語「成簇(clustering)」係指抗體通過非共價交互作用之寡聚化。

如本文中所使用之術語「Fc-Fc增強(Fc-Fc enhancing)」意指增加二個含有Fc區之抗體的Fc區之間的結合強度或穩定其等之間的交互作用，以使抗體在細胞表面上形成寡聚體，諸如六聚體。此增強可藉由在抗體之Fc區中之某些胺基酸突變，諸如E345R或E430G來獲得。在本發明之背景下，術語「單價抗體(monovalent antibody)」係指可與具有僅一個抗原結合結構域(例如一個Fab臂)的抗原上之特定表位交互作用的抗體分子。在雙特異性抗體之

背景下，「單價抗體結合(monovalent antibody binding)」係指該雙特異性抗體與具有僅一個抗原結合結構域(例如一個Fab臂)的抗原上之一個特定表位結合。

在本發明之背景下，術語「單特異性抗體(monospecific antibody)」係指僅對一個表位具有結合特異性的抗體。抗體可為單特異性單價抗體(亦即僅攜帶一個抗原結合區)或單特異性雙價抗體(亦即具有二個相同抗原結合區之抗體)。

術語「雙特異性抗體(bispecific antibody)」係指包含二個不同抗原結合結構域之抗體，例如二個不同Fab臂或二個具有不同CDR區的Fab臂。在本發明之背景下，雙特異性抗體對至少二個不同表位具有特異性。此類表位可在相同或不同的抗原或目標上。若該等表位係在不同抗原上，則該等抗原可能在相同細胞或不同細胞、細胞類型或結構上，諸如胞外基質或囊泡，及可溶性蛋白質。雙特異性抗體可能因此能夠交聯多種抗原，例如二種不同的細胞。本發明之特定雙特異性抗體能夠與OX40及第二目標結合。

術語「雙價抗體(bivalent antibody)」係指具有二個抗原結合區的抗體，該抗原結合區結合至在一或二個目標或抗原上之表位或結合至在相同抗原上之一或二個表位。因此，雙價抗體可能為單特異性、雙價抗體或或雙特異性、雙價抗體。

在本文中，術語「胺基酸(amino acid)」及「胺基酸

殘基(amino acid residue)」可互換使用且不應被理解為限制性。胺基酸係含有胺(-NH_2)及羧基(-COOH)官能基以及各胺基酸特有之側鏈(R基團)之有機化合物。在本發明之背景下，胺基酸可基於結構及化學特徵進行分類。因此，胺基酸之類別可反映在下表中之一或兩者中：

表1.基於R基團之結構及一般化學特徵的主要分類

類別	胺基酸
酸性殘基	D及E
鹼性殘基	K、R、及H
親水性不帶電荷殘基	S、T、N、及Q
脂族不帶電荷殘基	G、A、V、L、及I
非極性不帶電荷殘基	C、M、及P
芳族殘基	F、Y、及W

表2.胺基酸殘基之替代性物理及功能分類

類別	胺基酸
含羥基之殘基	S及T
脂族殘基	I、L、V、及M
環烯基相關之殘基	F、H、W、及Y
疏水性殘基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、及Y
帶負電荷之殘基	D及E
極性殘基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S、及T
帶正電荷之殘基	H、K、及R
小殘基	A、C、D、G、N、P、S、T、及V
非常小之殘基	A、G、及S
涉及轉折形成之殘基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P、及T
撓性殘基	Q、T、K、S、G、P、D、E、及R

以一種胺基酸取代另一種胺基酸可分類成保守型取代或非保守型取代。在本發明之背景下，「保守型取代」係將一種胺基酸用另一種具有類似結構及/或化學特徵之胺基酸取代，以如上述二個表中任一者中所定義之相同類別的另一種胺基酸殘基對一種胺基酸殘基進行之此種取代為：例如，白胺酸可經異白胺酸取代，因為其等均為脂族，支鏈型疏水物。類似地，麩胺酸可經天門冬胺酸取代，因為其等均係小的，帶負電荷之殘基。

在本發明之背景下，抗體中之取代係表示為：

原始胺基酸–位置–取代之胺基酸；

參考公認的胺基酸命名法，使用三個字母代碼或一個字母代碼，包括代碼「Xaa」或「X」以表示任何胺基酸殘基。因此，Xaa或X一般可代表20種天然存在之胺基酸中之任一者。本文中所使用之術語「天然存在(naturally occurring)」係指下列胺基酸殘基中之任一者：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、天門冬胺酸、天門冬醯胺、麩胺酸、麩胺醯胺、脯胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、及半胱胺酸。因此，符號「K409R」或「Lys409Arg」意指抗體包含以精胺酸取代在胺基酸位置409處之離胺酸。

將給定位置處之胺基酸取代成為任何其他胺基酸被稱為：

原始胺基酸–位置；或例如「K409」。

對於其中(多個)原始胺基酸及/或(多個)經取代之胺基酸可能包含多於一個，但不是所有胺基酸之修飾，該多於一個胺基酸可藉由「,」或「/」隔開。例如以精胺酸、丙胺酸、或苯丙胺酸取代在位置409處之離胺酸係：

「Lys409Arg,Ala,Phe」或「Lys409Arg/Ala/Phe」或「K409R,A,F」或「K409R/A/F」或「K409至R、A、或F」。

在本發明之背景下此種名稱可互換使用，但具有相同之含義及目的。

此外，術語「取代(a substitution)」涵蓋取代成任一種或其他十九種天然胺基酸，或取代成其他胺基酸，諸如非天然胺基酸。例如，位置409中之胺基酸K之取代包括下列取代中之各者：409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P、及409Y。附帶來說，此相當於名稱409X，其中X指定除該原始胺基酸以外之任何胺基酸。該等取代亦可被定名為K409A、K409C等，或K409A,C等，或K409A/C/等。藉由類推，此同樣適用於本文中所提及之各個及每一個位置，以具體地包括此等取代中之任一者。

根據本發明之抗體亦可包含胺基酸殘基之刪除。可將此種刪除表示為「del」，且包括例如書寫成K409del。因此，在此類具體實施例中，在位置409中之離胺酸已從該胺基酸序列刪除。

如本文中所使用之術語「宿主細胞(host cell)」意指已引入表現載體之細胞。應理解，此類術語不僅意指特定之個體細胞，且意指此種細胞之後代。因為某些修飾可能由於突變或環境影響而在後繼世代中發生，所以此後代事實上可能與親本細胞不同，但仍包括在如本文中所使用之術語「宿主細胞」之範疇內。重組宿主細胞包括，例如轉染瘤(transfectoma)，諸如CHO細胞、HEK293細胞、Expi293F細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、及淋巴細胞、及原核細胞諸如大腸桿菌及其他真核宿主，諸如植物細胞及真菌。

如本文中所使用之術語「轉染瘤(transfectoma)」包括表現該抗體或目標抗原之重組真核宿主細胞，諸如CHO細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、HEK293細胞、Expi293F細胞、植物細胞、或真菌，包括酵母細胞。

出於本發明之目的，在兩個胺基酸序列之間的序列同一性係使用如在EMBOSS套裝軟體(EMBOSS：歐洲分子生物學開放電腦軟體組(The European Molecular Biology Open Software Suite)，Rice等人之2000, Trends Genet. 16：276-277)，較佳地為5.0.0版或更新版之Needle程式本中所執行之Needleman-Wunsch演算法(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48：443-453)來測定。所使用之參數係10之間隙開口罰分(gap open penalty)、0.5之間隙延伸罰分(gap extension penalty)、及EBLOSUM62(BLOSUM62之EMBOSS版本)取代矩陣。使用Needle標記

之「最長同一性」(使用-nobrief選項獲得)之輸出作為同一性百分比且計算如下：

(相同殘基 x 100)/(比對長度-比對中之間隙總數)。

類似殘基之保留亦可或可替代地藉由類似性評分來測量，如藉由使用BLAST程式(例如通過NCBI取得之BLAST 2.2.8，使用標準設定BLOSUM62，開口間隙=11及延伸間隙=1)來測定。合適的變體通常展現與親本序列至少約45%之類似性，諸如至少約55%、至少約65%、至少約75%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或更多(例如約99%)。

如本文中所使用之術語「效應細胞(effector cell)」係指參與免疫反應之效應期的免疫細胞。例示性免疫細胞包括骨髓或淋巴來源之細胞，例如淋巴細胞(諸如B細胞及T細胞，包括細胞溶解性T細胞(CTL))、殺手細胞、天然殺手細胞、巨噬細胞、單核球、嗜酸性細胞、多形核細胞，諸如嗜中性細胞、顆粒球、肥胖細胞、及嗜鹼性細胞。一些效應細胞表現Fc受體(FcγR)或補體受體並執行特定之免疫功能。在一些具體實施例中，效應細胞(諸如例如天然殺手細胞)能夠誘導ADCC。例如，表現FcγR之單核球、巨噬細胞、嗜中性細胞、樹突狀細胞及庫佛氏細胞(Kupffer cell)參與目標細胞之特異性滅殺及/或將抗原呈遞給免疫系統之其他組分，或與呈遞抗原的細胞結合。在一些具體實施例中，ADCC可藉由抗體驅動之典型補體活化來進一步增強，導致在目標細胞上活化之C3片段的沉積。C3裂

解產物係表現在骨髓細胞上之補體受體(CR)(諸如CR3)之配體。藉由效應細胞上之CR來鑑別補體片段可促進增強Fc受體媒介之ADCC。在一些具體實施例中，抗體驅動之典型補體活化導致目標細胞上之C3片段。該等C3裂解產物可促進直接補體依賴性細胞毒性(CDCC)。在一些具體實施例中，效應細胞可吞噬目標抗原、目標粒子或目標細胞，此可依賴於抗體結合且係由效應細胞表現之FcγR所媒介。效應細胞上之特定FcγR或補體受體之表現可能受體液性因子(諸如細胞介素)所調節。例如，已發現干擾素γ(IFNγ)及/或G-CSF可上調FcγRI之表現。此增強之表現增加FcγRI攜帶之細胞針對目標之細胞毒性活性。效應細胞可吞噬目標抗原或吞噬或裂解目標細胞。在一些具體實施例中，抗體驅動之典型補體活化導致目標細胞上之C3片段。此等C3裂解產物可藉由效應細胞直接促進吞噬作用或藉由增強之抗體媒介之吞噬作用來間接促進。在某些具體實施例中，其中該抗體具有惰性Fc區，該抗體不誘導Fc媒介之效應功能。

如本文中所使用之「效應T細胞」或「Teffs/Teff」係指執行免疫反應功能(諸如滅殺腫瘤細胞及/或活化可導致清除身體腫瘤細胞之抗腫瘤免疫反應)之T淋巴細胞。Teff表型之實施例包括$CD3^+CD4^+$及$CD3^+CD8^+$。Teffs可分泌、含有、或表現標誌物，諸如IFNγ、顆粒酶B及ICOS。應理解，Teffs可能不完全限於此等表型。

如本文中所使用之「記憶型T細胞(memory T cell)」

係指在去除感染之後長時間留在體內之T淋巴細胞。記憶型T細胞之實施例包括中央記憶型T細胞(CD45RA-CCR7+)及效應記憶型T細胞(CD45RA-CCR7-)。應理解，記憶型T細胞可能不完全限於此等表型。

如本文中所使用之「調節型T細胞」或「Tregs」或「Treg」係指通常藉由抑制其他(多種)T細胞和/或其他免疫細胞之活性來調節其他(多種)T細胞和/或其他免疫細胞之活性的T淋巴細胞。Treg表型之實施例係$CD3^+CD4^+CD25^+CD127dim$。Treg可進一步表現Foxp3。應理解，Treg可能不完全限於此表型。

如本文中所使用之術語「補體活化(complement activation)」係指典型補體路徑之活化，其係由稱為C1之大分子複合物與表面上之抗體-抗原複合物結合所起始。C1係由6個鑑別蛋白質C1q及絲胺酸蛋白酶之異四聚體(hetero-tetramer) C1r2C1s2所組成之複合物。C1係典型補體級聯反應之早期事件中之第一個蛋白質複合物，其涉及一系列裂解反應，該等反應從C4裂解成C4a及C4b以及C2裂解成C2a及C2b開始。C4b沉積並與C2a一起形成稱為C3轉化酶之酶活性轉化酶，該C3轉化酶將補體組分C3裂解成C3b及C3a，其形成C5轉化酶。此C5轉化酶將C5分解為C5a及C5b，且最後一個組分沉積在膜上，進而觸發補體活化之晚期事件，在該補體活化之晚期事件中末端補體組分C5b、C6、C7、C8及C9組裝成膜攻擊複合物(membrane attack complex, MAC)。補體級聯反應導致在細胞膜上產

生孔，其引起細胞之溶解，亦稱為補體依賴性細胞毒性(CDC)。在本文中其中抗體具有惰性Fc區之某些具體實施例中，該抗體不誘導補體活化。

補體活化可藉由使用C1q結合功效、CDC動力學CDC檢定(如WO2013/004842、WO2014/108198中所述)或藉由於Beurskens et al., J Immunol April 1, 2012 vol. 188 no. 7, 3532-3541中所述之C3b及C4b之細胞沉積方法來評估。

如本文中所使用之術語「C1q結合(C1q binding)」意指在C1q與已結合至其抗原之抗體之結合的背景下之Clq之結合。在本文中所述之背景下，抗體結合至其抗原應被理解為在體內及體外均會發生。C1q結合可如本文中之實施例8中所述，例如藉由使用固定化在人造表面上之抗體或藉由使用結合至細胞或病毒粒子表面上之預定抗原的抗體來評估。應理解本文中C1q與抗體寡聚體之結合為多價交互作用，導致高親合力(avidity)結合。例如，由於在本發明之抗體中引入突變所導致之Clq結合之減少可藉由將該經突變之抗體之Clq結合與其親本抗體(在相同檢定中不具有該突變之本發明抗體)之Clq結合進行比較來測量。

術語「治療(treatment)」係指投予有效量的本發明之治療活性抗體以用於緩解、改善、遏止、或根除(治愈)症狀或疾病狀態的目的。

術語「有效量(effective amount)」或「治療有效量(therapeutically effective amount)」係指在必要之劑量及時間段下有效達成所欲治療結果之量。抗體之治療有效量

可根據諸如個體之疾病狀態、年齡、性別、及體重之因素及抗體在個體中引發所欲反應之能力而變化。治療有效量亦係其中治療有益效果勝過抗體變體之任何毒性或有害效應之量。

本發明之特定具體實施例

在第一態樣中，本發明提供能夠與人類OX40結合之抗體，該抗體包含抗原結合區，該抗原結合區包含重鏈可變(VH)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO：12、13、及14中所示之序列，及輕鏈可變(VL)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO分別包含如SEQ ID NO：16、DAS、及17中所示之序列，及人類IgG1 Fc區，該區包含P329R突變及E345R突變，其中胺基酸位置係根據Eu編號來編號。據此，提供能夠結合至人類的抗OX40抗體。在本發明之具體實施例中，抗體結合OX40(例如在T細胞上)且在與其目標結合後具有促效性。據此，提供刺激T細胞之活化及增殖的抗體。該抗體可進一步刺激T細胞之記憶形成及存活。此種抗體可用於，例如治療癌症。該抗體進一步能夠與食蟹獼猴OX40結合，其對該抗體之毒理學研究係有用的。因此，在一個具體實施例中，根據本發明之抗體，該抗體能夠與具有SEQ ID NO：51之序列的食蟹獼猴OX40結合。

在本發明之另一具體實施例中，該抗體能夠與具有SEQ ID NO：52之序列的人類OX40結合。人類OX40包含

四個胞外結構域，分別定名為CRD1、CRD2、CRD3及CRD4。不受理論束縛，預期與CRD1結構域結合之抗體具有增強之活化T細胞之能力。在本發明之一個具體實施例中，抗體結合至人類OX40之CRD1結構域。在本發明之一個具體實施例中，抗體結合至人類OX40之表位，其允許該抗體在OX40L存在下與人類OX40結合。

所屬技術領域中眾所周知，結合親和力對於抗體功能可為重要的。因此，抗體與其同源抗原之親和力可能對該抗體活化所欲之胞內路徑太高或太。在一個具體實施例中，抗體對人類OX40具有1 x 10^{-9} M至6 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。在一個具體實施例中，抗體對人類OX40具有2 x 10^{-9} M至5 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。在一個具體實施例中，抗體對人類OX40具有3 x 10^{-9} M至4 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。在另一具體實施例中，抗體對人類OX40具有3,4 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。

在本發明之另一態樣中，抗體係人源化或嵌合抗體。

抗體之致免疫性可藉由人源化來降低，從而降低抗藥物抗體(anti-drug antibody, ADA)反應之水平。因此，在本發明之一個具體實施例中，抗體係人源化抗體。

在本發明之一個具體實施例中，抗體包含具有如SEQ ID NO：20中所示之序列的VH區及具有SEQ ID NO：21中所示之序列的VL區。據此，提供包含如SEQ ID NO：20中所示之人源化VH區及如SEQ ID NO：21中所示之人源化VL區的抗體。所屬技術領域中眾所周知，可將突變引入

具有充分表徵之序列及三維結構之蛋白質(諸如抗體)中而不使功能損失。因此，在本發明之一些具體實施例中，亦考慮在VH及/或VL序列之框架區中具有突變之變體，特別是分別如SEQ ID NO：20及SEQ ID NO 21中所示之VH及/或VL區之變體。如相較於親本VH及/或VL序列之框架區(亦即FR1、FR2、FR3及FR4)，變體可有一或多個胺基酸不同(例如在一或多個框架區中)，但仍允許抗原結合區保有至少相當大的比例(至少約90百分比、95百分比或更多)或甚至保留該親本抗體之所有親和力及/或特異性。一般而言，此類功能變體保留與親本序列之顯著序列同一性。例示性變體包括與各自親本VH或VL區相差5個或更少個，諸如5、4、3、2或1個突變之變體，該等突變諸如胺基酸殘基之取代。例示性變體包括主要藉由保守型胺基酸取代而與親本序列之VH及/或VL區不同的變異體；例如，在變體中之5個，諸如5、4、3、2或1個胺基酸取代可為保守型的。在本發明之進一步態樣中，抗體可在VH框架區及/或VL框架區中分別包含最多1、2或3個突變。此類突變可為取代。較佳的是，此類取代不會顯著改變本發明之抗OX40抗體之結合親和力及/或結合特異性。因此，本發明涵蓋本發明之抗OX40抗體之變體，該變體具有與包含如SEQ ID NO：12、13及14中所示之VH區CDR序列及如SEQ ID NO：16、DAS及17中所示之VL區CDR序列的抗體相同之功能特徵。

在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包

含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少80%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少85%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少90%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少95%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少96%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少97%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少98%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含與如SEQ ID NO：20中所示之VH區至少99%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VH區，該VH區包含如SEQ ID NO：20中所示之序列。

在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少80%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少85%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少90%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包

含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少95%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少96%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少97%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少98%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含與如SEQ ID NO：21中所示之VL區至少99%同一性的序列。在本發明之另一態樣中，抗體包含VL區，該VL區包含如SEQ ID NO：21中所示之序列。

在本發明之另一態樣中，抗體包含VH及VL區，該VH及VL區分別包含如SEQ ID NO：20及SEQ ID NO：21中所示之序列。

在一個態樣中，本發明之抗體係經單離之抗體。

在較佳具體實施例中，本發明之抗體係全長抗體。因此，本發明之抗體可進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)。該CH較佳地包含CH1區、鉸鏈區、CH2區及CH3區。

根據本發明之抗體可包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區係人類κ輕鏈。在另一態樣中，其可包含人類λ輕鏈恆定區。

根據本發明之抗體可較佳地進一步包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區係人類IgG1同型。因此，在一個具體實施例

中，抗體包含人類IgG1 Fc區。人類IgG1同型以各種同種異型存在，諸如IgG1m(f)、IgG1m(a)、IgG1m(x)及IgG1m(z)，該同種異型亦可分別寫成IgG1mf、IgG1ma、IgG1mx及IgG1mz。

在本發明之一個具體實施例中，抗體包含選自下列之Fc區：人類IgG1mf、人類IgG1ma、人類IgG1mx或人類IgG1mz同種異型。在本發明之一個具體實施例中，Fc區係IgG1mf同種異型。在本發明之一個具體實施例中，抗體包含Fc區，該Fc區具有SEQ ID NO：1中所示之序列。

藉由修飾抗體之Fc區最佳化效應功能可能改善治療性抗體於治療癌症或其他疾病之有效性，例如改善抗體引發針對抗原表現之細胞之免疫反應之能力。此類努力描述於，例如WO2013/004842 A2；WO2014/108198 A1；WO2018/146317；WO2018/083126；WO2018/031258 A1。

US2014/0377284A1揭示人類OX40-結合之抗體殖株12H3(亦定名SF2)，其不會阻斷OX40L與OX40之結合。SF2抗體誘導T細胞活化且顯示在體外阻抑Treg之抑制效應。Zhang等人證實抗體殖株SF2之促效性效應且效應功能可藉由不同的經工程改造之方法，包括引入六聚化增強之突變E345R(Zhang et al. J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27134-27146)來增強。

WO2016/164480A1揭示人類OX40結合抗體殖株(包括株h3C8)，其經分子工程改造以賦予增強之促效性效應。經工程改造之策略包括引入六聚化增強之突變E345R、

E430G、S440Y或其不同組合。此外，亦引入Fc惰性突變，諸如L234A-L235A-P329G。

US20190276549A1描述工程改造抗體之方法，該等抗體具有增強之Fc-Fc交互作用，同時進一步含有降低補體因子C1q及Fcγ受體之結合的突變，從而生成具有不依賴於與Fcγ受體嚙合之促效性質的非耗盡性免疫細胞靶向之抗體。

已描述進一步工程改造之方法以開發人類OX40促效性構築體，該等方法包括將Fc結構域共價連接至6個單結構域抗體以產生六價構築體(WO2017/019805A1)及由PD1之胞外結構域(ECD)通過IgG4 Fc連接蛋白質連接至OX40L三聚體之ECD所組成之融合蛋白質(US10449233)。

根據本發明之抗體包含經修飾之人類IgG1恆定區。此種人類IgG1包含Fc區，該Fc區包含CH2及CH3區。藉由修飾Fc區中之IgG1恆定區，其可能例如調節抗體之Fc效應功能或增加Fc-Fc交互作用，從而使該抗體傾向形成群簇(諸如六聚體)。在本發明之一個態樣中，人類IgG1或經修飾之人類IgG1係選自IgG1mf、IgG1ma、IgG1mx或IgG1mz。在一個具體實施例中，其係具有至少二個突變之經修飾之IgG1。在另一態樣中，其係具有至少二個突變之IgG1mf。在又另一態樣中，其係具有至少二個突變之IgG1ma。在進一步態樣中，其係具有至少二個突變之IgG1mx。在本發明之又另一態樣中，其係具有至少二個突變之IgG1mz。在一個特定態樣中，IgG係在Fc區中包含二或更

多個胺基酸取代之經修飾之人類IgG。在一個具體實施例中，其可係在Fc區中包含二或更多個胺基酸取代之人類IgG1。在本發明之進一步態樣中，IgG1mf在Fc區中包含二或更多個胺基酸取代。在本發明之進一步態樣中，IgG1mf在Fc區中包含三個胺基酸取代。在本發明之進一步態樣中，IgG1mf在Fc區中包含四個胺基酸取代。在本發明之進一步態樣中，IgG1mf在Fc區中包含五個胺基酸取代。在一個具體實施例中，IgG1 Fc區具有最多三個胺基酸取代。在一個具體實施例中，IgG1mf Fc區具有最多三個胺基酸取代。在一個具體實施例中，IgG1mf Fc區具有最多四個胺基酸取代。在一個具體實施例中，IgG1mf Fc區具有最多五個胺基酸取代。

在本發明之進一步態樣中，經修飾之IgG1重鏈恆定區在Fc區中包含最多五個胺基酸取代。在另一態樣中，其包含最多四個胺基酸取代。在另一態樣中，其包含最多三個胺基酸取代。在另一態樣中，其包含最多二個胺基酸取代。

在人類IgG1重鏈中對應於E345位置(其中該等胺基酸殘基係根據EU編號來編號)處之胺基酸殘基中之突變可改善抗體誘導CDC及其他效應功能之能力。不受理論束縛，咸信藉由引入E345R取代可刺激抗體之寡聚化，從而調控Fc媒介之效應功能，以便例如增加C1q結合、補體活化、CDC、ADCP、內化或其他可提供體內功效之(多種)相關功能。在一個具體實施例中，根據本發明之抗體包含Fc區，

該Fc區包含SEQ ID NO：2中所示之序列。

在一個態樣中，本發明關於變體抗體，其包含抗原結合區及變體Fc區，其中該抗原結合區能夠結合OX40。

據此，提供增強Fc-Fc交互作用的抗體，該Fc-Fc交互作用可導致在抗體結合後，OX40在細胞表面上以抗體依賴性方式成簇(antibody-dependent clustering)，從而增加本發明之抗體的促效作用。

在本發明之一個態樣中，抗體包含變體人類IgG1 Fc區或變體人類IgG1 CH區，該變體人類IgG1 CH區包含E345R突變及P329R突變。在下文中，提及Fc區中之突變可能同樣適用於人類IgG1 CH區中之(多個)突變，反之亦然。

如本文中所述，當根據EU編號來編號時，Fc區中欲突變之胺基酸的位置可關於(亦即對應於)其在天然存在(野生型)之人類IgG1重鏈中之位置給出。因此，若該親本Fc區已含有一或多個突變及/或若該親本Fc區係例如IgG1、IgG1mf、IgG1ma、IgG1mz或IgG1mz Fc區，則對應於人類IgG1重鏈中根據Eu編號來編號之胺基酸殘基(諸如例如E345)之胺基酸位置可藉由比對來判定。具體而言，將親本Fc區與野生型人類IgG1重鏈序列進行比對，以便識別在對應於人IgG1重鏈序列中之E345的位置中之殘基。任何野生型人類IgG1恆定區胺基酸序列均可用於此目的，包括在表3中所示之不同人類IgG1同種異體中之任一者。

在本發明之一個態樣中，相較於相同但包含該相同同

型或同種異型(諸如IgG1)之野生型IgG Fc區的抗體，在該IgG1 Fc區中之修飾誘導增加之OX40促效作用。此可例如藉由在對應於位置E345之胺基酸位置處引入R胺基酸來獲得，因此根據Eu編號，在人類IgG1重鏈中引入E345R。

在較佳具體實施例中，根據Eu編號，在對應於人類IgG1重鏈之位置E345之位置處的胺基酸殘基係R。因此，本發明之抗體可在Fc區中包含E345R取代。

據此，提供增強Fc-Fc交互作用的抗體，該Fc-Fc交互作用可導致在抗體結合後，OX40在細胞表面上以抗體依賴性方式成簇，從而增加本發明之抗體的促效作用。

在本發明之抗體之另一具體實施例中，根據Eu編號，在對應於人類IgG1重鏈之位置P329之位置處的胺基酸殘基係經R胺基酸取代，因此根據Eu編號，在人類IgG1重鏈中引入P329R突變。

在本發明之進一步態樣中，根據Eu編號，抗體在對應於人類IgG1重鏈之位置P329之位置處具有胺基酸殘基R。因此，本發明之抗體在Fc區中包含P329R取代。不受理論束縛，咸信在Fc區中包含E345R突變之本發明之抗體具有增加之血清清除率。本發明者發現在位置329處進一步引入突變(諸如P329R)將本發明之抗體之清除率恢復至包含人類IgG1 Fc區野生型序列(亦即在人類IgG1 Fc區中沒有任何突變)之抗體之水平。進一步，P329R突變減少該抗體結合至FcγR受體(諸如FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb及FcγRIIIa)之能力。

在本發明之較佳具體實施例中，根據Eu編號，Fc區在對應於人類IgG1重鏈之位置P329及E345之位置處包含P329R及E345R突變。據此，提供抗體，當相較於包含相同VH及VL區且包含相同IgG1重鏈恆定區(在位置329處包含野生型胺基酸P及在位置345處包含野生型胺基酸E除外)之抗體時，該抗體具有增加之OX40受體促效作用及可相比的藥物動力學性質，諸如血清清除率。

因此，本發明之具體實施例提供OX40結合抗體，當相較於包含相同VH及VL區但包含野生型IgG1重鏈恆定區(諸如例如SEQ ID NO：1中所示)之抗體的藥物動力學性質時，該OX40結合抗體在與OX40結合後該具有增加之受體促效作用，且其進一步具有可相比之藥物動力學性質，諸如類似或甚至相同的藥物動力學性質。換言之，本發明提供OX40結合抗體，其具有之藥物動力學性質與除包含野生型IgG1重鏈恆定區之外的相同OX40結合抗體之藥物動力學性質沒有顯著差異。

在一個具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區係野生型人類IgG1同型。

在本發明之一個具體實施例中，親本人類IgG1 Fc區及/或人類IgG1 CH區係野生型人類IgG1mf同種異型。在本發明之一個具體實施例中，親本人類IgG1 Fc區及/或人類IgG1 CH區係野生型人類IgG1ma同種異型。在本發明之一個具體實施例中，親本人類IgG1 Fc區及/或人類IgG1 CH區係野生型人類IgG1mx同種異型。在本發明之一個具體實

施例中，親本人類IgG1 Fc區及/或人類IgG1 CH區係野生型人類IgG1mz同種異型。

因此，除列舉之突變E345R及P329R之外，該變體Fc區可係人類IgG1 Fc區。

在另一態樣中，本發明提供包含重鏈恆定區之抗體，該重鏈恆定區包含選自包含下列之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO：58、59、60、及61。在一個態樣中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：58之胺基酸序列。在一個態樣中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：59之胺基酸序列。在一個態樣中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：60之胺基酸序列。在一個態樣中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：61之胺基酸序列。

在具體實施例中，根據本發明之抗體包含：

a. VH區，其包含SEQ ID NO：20中所示之胺基酸序列

b. VL區，其包含SEQ ID NO：21中所示之胺基酸序列，及

c. Fc區，其包含SEQ ID NO：3中所示之胺基酸序列。

在另一具體實施例中，根據本發明之抗體包含：

a. VH區，其包含SEQ ID NO：20中所示之胺基酸序列

b. VL區，其包含SEQ ID NO：21中所示之胺基酸序列，及

c. CH區，其包含SEQ ID NO：58中所示之胺基酸序列。

在另一具體實施例中，根據本發明之抗體包含重鏈，

其包含SEQ ID NO：18中所示之胺基酸序列及輕鏈，其包含SEQ ID NO：19中所示之胺基酸序列。

在又另一態樣中，本發明提供包含重鏈恆定區之抗體，該重鏈恆定區經修飾使得該抗體相對於除該修飾之外的相同抗體以更小程度誘導Fc媒介之效應功能。一種其實施例係包含P329R及E345R取代之本發明之OX40結合抗體。相較於除不包含P329R取代之外包含相同序列之抗體且亦相較於除不包含P329R及E345R取代之外包含相同序列(諸如野生型IgG1重鏈)之抗體，此種抗體以更小程度誘導一或多種Fc媒介之效應功能。在一個具體實施例中，Fc媒介之效應功能減少至少20%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少30%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少40%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少50%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少60%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少70%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少80%。在另一態樣中，Fc媒介之效應功能減少至少90%。在另一態樣中，抗體不誘導一或多種Fc媒介之效應功能。減少或完全不誘導的該一或多種Fc效應細胞功能可選自下列之群組：補體依賴性細胞毒性(CDC)、補體依賴性細胞媒介之細胞毒性(CDCC)、補體活化、抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞媒介之吞噬作用(ADCP)、Clq結合及FcγR結合。因此，在一個具體實施例中，相對於相同但有野生型IgG1 HC恆定區之抗體，本發明之抗體誘導

CDC之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導CDC。

在另一態樣中，相對於相同但具有野生型IgG1 HC恆定區之抗體，本發明之抗體誘導CDCC之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導CDCC。

在另一態樣中，相對於相同但具有野生型IgG1 HC恆定區之抗體，本發明之抗體誘導ADCC之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導ADCC。

在另一態樣中，相對於相同但具有野生型IgG1 HC恆定區之抗體，本發明之抗體誘導ADCP之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導ADCP。

在另一態樣中，相對於相同但具有野生型IgG1 HC恆定區之抗體，本發明之抗體誘導C1q結合之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導C1q結合。

在一個具體實施例中，本發明之抗體不結合C1q。據此描述一具體實施例，其中抗體當結合至細胞膜時，無法使C1q與該抗體之Fc區結合。在一個具體實施例中，抗體不誘導目標非依賴性流體相補體活化(target-independent fluid-phase complement activation)。

在另一態樣中，相對於相同但具有野生型IgG1 Hc恆定區之抗體，發明之抗體誘導FcγR結合之程度減少至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少減少至少90%、或最少減少至少95%、或減少至少98%。在另一具體實施例中，本發明之抗體不誘導FcγR結合。較佳地，FcγR結合係如實施例8中所測定。

在一個具體實施例中，相較於包含相同胺基酸序列但不包含P329R取代之抗體，本發明之抗體具有降低之C1q結合及降低之FcγR結合。在本發明之抗體之一個具體實施例中，與FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、及FcγRIIIa的結合降低。在一個具體實施例中，本發明之抗體與FcγRIa的結合降低至少20%，諸如至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%。在一個具體實施例中，本發明之抗體與FcγRIIa、FcγRIIb及FcγRIIa的結合降低至少60%，諸如至少70%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99%。在本發明之一個具體實施例中，抗體不與FcγRIIa、FcγRIIb、及FcγRIIa結合。

在一個具體實施例中，除該等列舉之突變之外，根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體係人類抗體。

在本發明之一具體實施例中，抗體係單價抗體。

在另一具體實施例中，抗體係雙價抗體。

此外，本發明之抗體可係單特異性抗體。

在一個具體實施例中，根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體係單株抗體，諸如人類單株抗體，諸如人類雙價單株抗體，諸如人類雙價全長單株抗體。

在較佳具體實施例中，根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體係人源化雙價全長單株抗體。在較佳具體實施例中，根據本發明之抗體係人源化抗體，其包含如SEQ ID NO：18中所示之重鏈及如SEQ ID NO：19中所示之輕鏈。據此描述具有2.66之SI平均分數之人源化抗體之具體實施例，其對應於具有低臨床致免疫性之抗體。

在較佳具體實施例中，除在Fc區中視需要列舉之突變之外，根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體係IgG1抗體，諸如全長IgG1抗體、諸如人類全長IgG1抗體，視需要地人類單株全長雙價IgG1,κ抗體，例如人類單株全長雙價IgG1m(f),κ抗體。

根據本發明之抗體有利地呈雙價單特異性型式，其包含與相同表位結合的二個抗原結合區。然而，亦考慮其中該等抗原結合區中之一者與不同表位結合的雙特異性型式。因此，除非上下文牴觸，否則根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體可係單特異性抗體或雙特異性抗體。

因此，在另一具體實施例中，本發明之抗體係雙特異性抗體，其包含能夠結合如本文中所述之人類OX40之第一抗原結合區及包含能夠與在人類OX40上之不同表位結合之第二抗原結合區。在另一具體實施例中，本發明之抗體係雙特異性抗體，其包含能夠結合如本文中所述之人類OX40之第一抗原結合區及包含能夠結合不同目標之第二抗原結合區。此種目標可在不同細胞上或與OX40相同細胞上。

在本發明之另一態樣中，抗體能夠與具有如SEQ ID NO：52中所示之序列的人類OX40結合。在另一具體實施例中，本發明之抗體還能夠與食蟹獼猴OX40(諸如SEQ ID NO：51所示)結合。

在本發明之進一步具體實施例中，抗體能夠結合OX40表現之人類T細胞。

在本發明之另一步具體實施例中，抗體能夠結合OX40表現之食蟹獼猴T細胞。

在本發明之另一具體實施例中，相較於無P329R及E345R突變之野生型親本抗體，該抗體具有增加之促效活性。

在本發明之另一具體實施例中，抗體誘導增加之T細胞增殖。

在本發明之另一具體實施例中，相較於無P329R及E345R突變之親本抗體，該抗體誘導增加之T細胞增殖。

在本發明之一個具體實施例中，全長IgG1抗體具有之

HC之C端離胺酸已經裂解掉。此種抗體亦被認為係「全長抗體」。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導人類T細胞之增殖，該等T細胞諸如$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞，諸如T輔助細胞及細胞毒性T細胞，如實施例7中所述。在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導人類CD4+ T細胞之增殖。在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導人類CD8+ T細胞之增殖。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導人類OX40表現之T細胞之活化。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導T細胞(諸如CD4+ T細胞及CD8+ T細胞)上OX40之表現。因此，該抗體能夠增加在CD4+ T細胞及CD8+ T細胞上OX40之表現。

在本發明另一具體實施例中，抗體能夠在Fcγ受體IIb交聯不存在下誘導人類OX40表現之T細胞之活化。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導在CD4+ T細胞及CD8+ T細胞上4-1BB、CD25、及HLA-DR之表現。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導具有中央記憶型T細胞表型之CD4+ T細胞及$CD8^+$ T細胞之增殖。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠誘導TNFα、IFNγ、IL-2及IL-13之分泌。在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠從CD8+ T細胞誘導TNFα、IFNγ、IL-

2及IL-13之分泌。

在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠在T細胞(諸如CD4+ T細胞)中誘導顆粒酶B。在本發明之另一具體實施例中，抗體能夠在T細胞(諸如CD4+ T細胞)中誘導增加之顆粒酶B水平。顆粒酶B可用作細胞毒性T細胞之標誌物。據此揭示一具體實施例，其中該抗體能夠生成具有增加之細胞溶解能力水平之T細胞。作為可用於治療各種疾病之治療劑的抗體係眾所周知的。對有需要之個體投予抗體之另一種方法包括投予編碼該抗體之核酸或核酸之組合以供在體內表現該抗體。

因此，在一個態樣中，本發明亦關於編碼根據本發明之抗體之重鏈之核酸序列，其中該重鏈包含VH區，該VH區包含：包含如SEQ ID NO：12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO：13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO：17中所示之序列的VH CDR3。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼根據本發明之抗體之重鏈核酸序列，其中該重鏈包含VH區，該VH區包含：包含如SEQ ID NO：12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO：13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO：17中所示之序列的VH CDR3及人類IgG1 CH區。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼VH區之核酸序列，該VH區包含如SEQ ID NO：20中所示之胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼VL區之核酸序列，該VL區包含如SEQ ID NO：21中所示之胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼如SEQ ID NO：18中所示之重鏈(HC)之核酸序列。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼如SEQ ID NO：19中所示之輕鏈(LC)之核酸序列。

在另一態樣中，本發明亦關於編碼如SEQ ID NO：18中所示之重鏈(HC)及如SEQ ID NO：19中所示之輕鏈(LC)之核酸序列。

在一個具體實施例中，本發明之抗體係由一種核酸所編碼。因此，編碼本發明之抗體之核酸序列係以一種核酸序列或相同的核酸分子存在。

在另一具體實施例中，本發明之抗體係由核酸序列之組合，一般而言由二種核酸序列所編碼。在一個具體實施例中，核酸序列之該組合包含編碼該抗體之重鏈之核酸序列及編碼該抗體之輕鏈之核酸序列。

在一些具體實施例中，本發明關於編碼抗體之核酸序列或核酸序列之組合，該抗體包含：

在一個具體實施例中，本發明之抗體係由一種核酸所編碼。因此，編碼本發明之抗體之核酸序列係存在於一種核酸或相同的核酸分子中。

在另一具體實施例中，本發明之抗體係由核酸序列之組合，一般而言由二種核酸序列所編碼。在一個具體實施例中，核酸序列之該組合包含編碼該抗體之重鏈之核酸序列及編碼該抗體之輕鏈之核酸序列。

如上述，核酸序列可用作向有需要之個體供應治療性

蛋白質(諸如抗體)之手段。

在一些具體實施例中，該核酸可係去氧核糖核酸(DNA)。適於在體內表現治療性蛋白(諸如抗體)之DNA及製備DNA之方法對所屬技術領域中具有通常知識者係眾所周知的，包括但不限於由Patel A et al., 2018, Cell Reports 25, 1982-1993所述者。

在一些具體實施例中，該核酸可係核糖核酸(RNA)，諸如信使RNA(mRNA)。在一些具體實施例中，mRNA可僅包含天然存在之核苷酸。在一些具體實施例中，mRNA可包含經修飾之核苷酸，其中經修飾係指該核苷酸在化學上不同於天然存在之核苷酸。在一些具體實施例中，mRNA包含天然存在及經修飾之核苷酸。

適於在個體體內表現治療性蛋白質(諸如抗體)之不同核酸序列對所屬技術領域中具有通常知識者係眾所週知的。例如，適於在個體中表現治療性蛋白質之mRNA通常包含開讀框(ORF)，其側接包含特定序列之非轉譯區(UTR)，且5´及3´端由帽結構及聚(A)尾所形成(參見例如Schlake et al., 2019, Molecular Therapy Vol. 27 No 4 April)。

用於最佳化適於體內表現之RNA及RNA分子(例如mRNA)之方法的實施例包括但不限於US9254311；US9221891；US20160185840及EP3118224中描述者。

投予至個體以在體內表現之(多種)裸核酸序列易於在個體中降解及/或引起致免疫性反應。此外，為了在體內

表現由核酸序列所編碼之抗體，該等核酸序列一般係呈適於核酸序列進入個體之細胞之形式投予。存在用於遞送用於在體內表現之核酸序列之不同方法且包括涉及機械及化學手段之兩種方法。例如，此類方法可能涉及電穿孔或將核酸紋刺在皮膚上(Patel et al., 2018, Cell Reports 25, 1982–1993)。適用向個體投予核酸序列之其他方法涉及以合適之配方投予核酸。因此，本發明亦關於一種遞送媒劑，其包含本發明之核酸。

在一些具體實施例中，該遞送媒劑可包含編碼根據本發明之抗體的重鏈之核酸序列。因此，在一個具體實施例中，該核酸序列可編碼重鏈，該重鏈包含VH區，該VH區包含：包含如SEQ ID NO:12所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO:13所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO:14所示之序列的VH CDR3；及具有P329R及E345R突變的人類IgG1 HC區，該等胺基酸殘基係根據EU編號來編號。

在一些具體實施例中，本發明亦關於一種遞送媒劑，其包含編碼根據本發明之抗體的輕鏈之核酸序列。因此，在一個具體實施例中，該核酸序列可編碼輕鏈，該輕鏈包含VL區，該VL區包含：包含如SEQ ID NO：16中所示之序列的VL CDR1、包含如：DAS中所示之序列的VL CDR2、及包含如SEQ ID NO：17中所示之序列的VL CDR3。

本發明亦關於遞送媒劑之混合物，其包含：包含編碼根據本發明之抗體的重鏈之核酸序列之遞送媒劑，及包含

編碼根據本發明之抗體變的輕鏈之核酸序列之遞送媒劑。因此，在一個具體實施例中，該遞送媒劑之混合物包含：包含編碼重鏈之核酸序列之遞送媒劑，該重鏈包含VH區，該VH區包含如SEQ ID NO:12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO:13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO:14中所示之序列的VH CDR3，及具有P329R及E345R突變的人類IgG1 CH區，該等胺基酸殘基係根據EU編號來編號；及包含編碼輕鏈之核酸序列之遞送媒劑，該輕鏈包含VL區，該VL區包含：包含如SEQ ID NO:16中所示之序列的VL CDR1、包含如：DAS中所示之序列的VL CDR2、及包含如SEQ ID NO:17中所示之序列的VL CDR3。

在一些具體實施例中，該遞送媒劑包含編碼根據本發明之抗體的重鏈及核輕鏈之核酸序列或核酸序列之組合。

因此，在一個具體實施例中，遞送媒劑可包含編碼重鏈之核酸序列之遞送媒劑，該重鏈包含VH區，該VH區包含如SEQ ID NO:12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO:13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO:14中所示之序列的VH CDR3，及具有P329R及E345R突變的人類IgG1 CH區，該等胺基酸殘基係根據EU編號來編號；及輕鏈，該輕鏈包含VL區，該VL區包含：包含如SEQ ID NO：16中所示之序列的VL CDR1、包含如:DAS中所示之序列的VL CDR2、及包含如SEQ ID NO:17中所示之序列的VL CDR3。

因此，編碼根據本發明之抗體的重鏈及輕鏈之核酸序列係存在於一個(相同)核酸分子中。

在另一具體實施例中，遞送媒劑可包含編碼包含如SEQ ID NO:9中之所示之序列的重鏈之核酸序列及編碼包含如SEQ ID NO:10中之所示之序列的輕鏈之核酸。

因此，編碼根據本發明之抗體變體的重鏈及輕鏈之核酸序列係存在於分開或不同的核酸分子中。

在一些具體實施例中，遞送媒劑可係脂質配方。配方之脂質可為(多個)粒子，諸如(多個)脂質奈米粒子(LNP)。本發明之核酸序列或核酸序列之組合可經包覆在該粒子內，例如在該LNP內。

適於將核酸投予至個體以在體內表現之不同脂質配方對所屬技術領域中具有通常知識者係眾所周知的。例如，該脂質配方一般可包含脂質、可離子化胺基脂質、PEG-脂質、膽固醇或其任何組合。

適於向個體投予核酸序列以表現治療性抗體的脂質配方之各種形式及製備方法係所屬技術領域中眾所周知的。此類脂質配方之實施例包括但不限於描述於下列者：US20180170866(Arcturus)、EP 2391343(Arbutus)、WO 2018/006052(Protiva)、WO2014152774(Shire Human Genetics)、EP 2 972 360(Translate Bio)、US10195156(Moderna)、及US20190022247(Acuitas)。

本發明亦提供編碼根據本文中所述之態樣或具體實施例中任一者之抗體變體之經單離之核酸序列及載體，以及

編碼該變體之載體及表現系統。適用於抗體及其變體之核酸構築體、載體及表現系統係所屬技術領域中已知的，且包括但不限於實施例中所述者。在其中變體抗體包含之HC及LC是分開的多肽而非含在單一多肽(例如，如在scFv-Fc融合蛋白質中)中之具體實施例中，編碼重鏈及輕鏈之核苷酸序列可存在於相同或不同的核酸或載體中。

因此，在一個態樣中，本發明提供編碼根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體之經單離之核酸序列或核酸序列之組合。本發明亦提供編碼VH區之核酸序列，該VH區包含：包含如SEQ ID NO：12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO：13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO：14中所示之序列的VH CDR3。

本發明亦提供編碼VL區之核酸序列，該VL區包含：包含如SEQ ID NO：16中所示之序列的VL CDR1、包含如：DAS中所示之序列的VL CDR2、包含如SEQ ID NO：17中所示之序列的VL CDR3。

此外，本發明亦提供編碼VH區之核酸序列，該VH區包含如SEQ ID NO：20中所示之胺基酸序列。本發明亦關於編碼VL區之核酸序列，該VL區包含如SEQ ID NO：21中所示之胺基酸序列。

在本發明之具體實施例中，核酸序列或核酸序列之組合係RNA或DNA。在本發明之具體實施例中，核酸序列或核酸序列之組合係mRNA。

本發明進一步提供表現載體，其包含根據本文中所述

之任何態樣或具體實施例之核酸序列或其組合。

在另一態樣中，本發明關於如本文中所述之用於在哺乳動物細胞中表現之核酸序列或核酸序列之組合。

在進一步具體實施例中，本發明關於重組宿主細胞，其產生如本文中所定義之抗體，視需要地其中該宿主細胞包含如上述之表現載體。在某些具體實施例中，重組宿主細胞係真核或原核細胞。

在另一態樣中，本發明關於產生根據本文中之任何態樣或具體實施例之抗體之方法，該方法包含在培養基中及在適於產生該抗體之條件下培養如上述之重組宿主細胞，及視需要地從該培養基中純化或單離該抗體。

在一個態樣中，本發明關於核酸或表現載體，其包含

(i) 編碼根據本文中所揭示之具體實施例中任一者之抗體的重鏈序列之核苷酸序列；

(ii) 編碼根據本文中所揭示之具體實施例中任一者之抗體的輕鏈序列之核苷酸序列；或

(iii) (i)及(ii)兩者。

在一個態樣中，本發明關於核酸或表現載體，其包含編碼根據本文中所揭示之具體實施例中任一者之抗體變體的重鏈序列之核苷酸序列。

在一個態樣中，本發明關於核酸序列或表現載體，其包含編碼根據本文中所揭示之具體實施例中任一者之抗體的重鏈序列及輕鏈序列之核苷酸序列。

在一個態樣中，本發明關於第一及第二核酸之組合或

第一及第二表現載體之組合，視需要地其等在相同宿主細胞中，其中該第一包含根據(i)之核苷酸序列，而該第二包含根據(ii)之核苷酸序列。

在本發明之背景下，表現載體可係任何合適的載體，包括染色體、非染色體、及合成之核酸載體(包含合適的一組表現控制元件之核酸序列)。此類載體之實施例包括SV40之衍生物、細菌質體、噬菌體DNA、桿狀病毒、酵母質體、源自質體及噬菌體DNA之組合的載體、及病毒核酸(RNA或DNA)載體。在一個具體實施例中，核酸係包含在裸DNA或RNA載體中，包括例如線性表現元件(如於例如Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355 59(1997)中所述)、緊密核酸載體(compacted nucleic acid vector)(如於例如US 6,077, 835及/或WO 00/70087中所述)、質體載體(諸如pBR322、pUC 19/18、或pUC 118/119)、「侏儒(midge)」最小尺寸之核酸載體(如於例如Schakowski et al., Mol Ther 3, 793 800(2001)中所述)，或作為沉澱之核酸載體構築體諸如CaPO4-沉澱之構築體(如於例如WO200046147、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551 55(1986)、Wigler et al., Cell 14, 725(1978)、及Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603(1981)中所述)。此類核酸載體及其用途係所屬技術領域中眾所周知的(參見例如US 5,589,466及US 5,973,972)。

在一個具體實施例中，載體係適用於在細菌細胞中表現抗體。此類載體之實施例包括表現載體，諸如

BlueScript(Stratagene)、pIN載體(Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509(1989))、pET載體(Novagen, Madison WI)等。

表現載體亦可為，或替代地為適用於在酵母系統中表現之載體。可採用任何適用於在酵母系統中表現之載體。合適的載體包括，例如包含組成型或誘導型啟動子(諸如α因子、醇氧化酶及PGH)之載體(綜述於：F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987)、及Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516 544(1987)中)。

表現載體亦可為，或替代地為適用於在哺乳動物細胞中表現之載體，例如包含麩醯胺酸合成酶作為可選標誌物之載體，諸如於Bebbington(1992) Biotechnology(NY) 10:169-175中所述之載體。

核酸及/或載體亦可包含編碼分泌/定位序列之核酸序列，其可將多肽(諸如新生多肽鏈)靶向周質空間(periplasmic space)或進入細胞培養基。此類序列係所屬技術領域中已知的且包括分泌前導肽或訊息肽。

表現載體可包含任何合適的啟動子、增強子及其他促進表現之元件或與之締合。此類元件之實施例包括強表現啟動子(例如人類CMV IE啟動子/增強子以及RSV、SV40、SL3 3、MMTV、及HIV LTR啟動子)、有效的聚(A)終止序列、質體產物在大腸桿菌中之複製起點、作為可選標誌物之抗生素抗性基因、及/或方便的選殖位點(例如多位點連

接子(polylinker))。與組成型啟動子(諸如CMV IE)相反，核酸亦可包含誘導型啟動子。

在一個具體實施例中，抗體編碼之表現載體可經由病毒載體定位在及/或遞送至宿主細胞或宿主動物中。

本發明亦提供產生如本文中所揭示之抗體之重組宿主細胞，視需要地其中該宿主細胞包含根據本發明之(多種)經單離之核酸或(多種)載體。一般而言，宿主細胞已經(多種)核酸或(多種)載體轉化或轉染。本申請專利之重組宿主細胞可為，例如真核細胞、原核細胞、或微生物細胞，例如轉染瘤。在特定具體實施例中，宿主細胞係真核細胞。在特定具體實施例中，宿主細胞係原核細胞。在一些具體實施例中，抗體係重鏈抗體。然而，在大多數具體實施例中，抗體將同時含有重鏈及輕鏈，因此該宿主細胞同時表現在相同或不同載體上之重鏈及輕鏈編碼之構築體。

宿主細胞之實施例包括酵母、細菌、植物及哺乳動物細胞，諸如CHO、CHO-S、HEK、HEK293、HEK-293F、Expi293F、PER.C6、NS0細胞、Sp2/0細胞或淋巴細胞。在一個具體實施例中，宿主細胞係CHO(中國倉鼠卵巢)細胞。例如，在一個具體實施例中，宿主細胞可包含穩定整合到細胞基因組中之第一及第二核酸構築體，其中該第一編碼如本文中所揭示之抗體變體的重鏈，而第二編碼如本文中所揭示之抗體變體的輕鏈。在另一具體實施例中，本發明提供包含非整合之核酸(諸如質體、黏質體、噬菌體、或線性表現元件)之細胞，該細胞包含如上所具體指

定之第一及第二核酸構築體。

在一個具體實施例中，該宿主細胞係能夠對蛋白質進行Asn連接之糖基化的細胞，例如真核細胞，諸如哺乳動物細胞，例如人類細胞。

在一個具體實施例中，該宿主細胞係不能從抗體重鏈有效地移除C端離胺酸K447殘基的宿主細胞。例如，於Liu et al.(2008) J Pharm Sci 97：2426(以引用方式併入本文中)中之表2列出許多此類抗體生產系統，例如Sp2/0、NS/0或基因轉殖乳腺(山羊)，其中僅獲得C-端離胺酸之部分移除。在一個具體實施例中，宿主細胞係具有改變之糖基化機制的宿主細胞。此類細胞已在所屬技術領域中有所描述且可用作在其中表現本發明之變體從而產生具有改變之糖基化的抗體之宿主細胞。參見例如Shields, R.L. et al.(2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740「Umana et al.(1999) Nat. Biotech. 17:176-1、以及EP1176195；WO03/035835；及WO99/54342。用於生成經工程改造之糖型之其他方法係所屬技術領域中已知的，且包括但不限於描述於下列文獻中者：Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294；Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740；Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473)、US6602684、WO00/61739A1；WO01/292246A1；WO02/311140A1；WO 02/30954A1；Potelligent™ technology(Biowa, Inc. Princeton, N.J.)；GlycoMAb™ glycosylation engineering technology

(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)；US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336：1239-49、以及描述於WO2018/114877、WO2018/114878及WO2018/114879中者。

在又進一步態樣中，本發明關於基因轉殖非人類動物或植物，其包含編碼一或二組人類重鏈及人類輕鏈之核酸，其中該動物或植物產生如本文中所揭示之抗體。

在一個具體實施例中，提供藉由上述方法獲得或可獲得之抗體。

在另一態樣中，本發明亦關於增加或減少本發明抗體之至少一種效應功能之方法，其包含將P329R及E345R突變引入到抗體中對應於人類IgG1重鏈之Fc區中之E345及P329(根據Eu編號來編號)的(多個)胺基酸殘基中。

因此，在某些具體實施例中，提供增加親本抗體之效應功能(諸如Fc媒介之效應功能)或諸如增加該抗體之生物活性(諸如OX40促效作用)之方法，該親本抗體包含Fc區及與OX40結合之抗原結合區，該方法包含將P329R及E345R突變引入到Fc區中對應於人類IgG1重鏈之Fc區中之P329及E345的胺基酸殘基中(其中該等胺基酸殘基係根據Eu編號來編號)；且其中該抗原結合區包含：包含如SEQ ID NO：12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO：13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO：14中所示之序列的VH CDR3、包含如SEQ ID NO：16中所示之序列的VL CDR1、包含如：DAS中所示之序列的VL CDR2、及包含

如SEQ ID NO：17中所示之序列的VL CDR3。

在其他某些具體實施例中，提供減少親本抗體之效應功能(諸如C1q結合或FcγR結合)之方法，該親本抗體包含：包含如SEQ ID NO：12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO：13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO：14中所示之序列的VH CDR3、包含如SEQ ID NO：16中所示之序列的VL CDR1、包含如：DAS中所示之序列的VL CDR2、及包含如SEQ ID NO：17中所示之序列的VL CDR3，且進一步在人類IgG1重鏈之Fc區中包含E345R胺基酸取代(其中該等胺基酸殘基係根據Eu編號來編號)，該方法包含在人類IgG1重鏈之Fc區(根據Eu編號來編號)中引入進一步的P329R胺基酸取代。據此，該親本抗體之效應功能(諸如C1q結合或FcγR結合)可能減少或可能完全消除。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，增加之效應功能包含OX40促效作用。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，效應功能係C1q結合。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，增效應功能係FcgR結合。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，降低之效應功能包含C1q結合及FcγR結合兩者。

在一個具體實施例中，效應功能係C1q結合。據此描述具體實施例，其中當相較於具有E345R突變但不具有

P329R突變之抗體時，根據本發明具有E345R及P329R突變之抗體具有減少之C1q結合。

在一個具體實施例中，減少之效應功能係與FcγR結合的結合。因此，在一個具體實施例中，與多種FcγR，諸如FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、及/或FcγRIIIa結合。在一個具體實施例中，與FcγRIa的結合減少。在一個具體實施例中，與FcγRIIa的結合減少。在一個具體實施例中，與FcγRIIb的結合減少。在一個具體實施例中，與FcγRIIIa的結合減少。

據此描述具體實施例，其中當相較於具有E345R突變但不具有P329R突變之抗體時，根據本發明具有E345R及P329R突變之抗體具有減少之FcγR。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，Fc區包含E345R及P329R突變。

在前述方法中任一者之一個具體實施例中，撇開列舉之(多個)突變之外，該抗體之Fc區係人類IgG1，更具體而言人類IgG1m(f)、IgG1m(a)、人類IgG1m(x)或人類IgG1m(z) Fc區。視需要地包含如SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60及SEQ ID NO:61所示之序列中之一者的Fc區。在較佳具體實施例中，抗體之Fc區係人類IgG1m(z) Fc區。例如，抗體可係人類全長IgG1抗體，視需要地人類單株全長雙價IgG1，κ抗體。此外，抗體可係單特異性或雙特異性抗體，諸如單特異性抗體。

雖然抗體之Fc區可係人類IgG1同型，但其可係任何天

然存在之人類IgG1同種異型序列，諸如人類IgG1m(f)、人類IgG1m(a)、人類IgG1m(x)或人類IgG1m(z)(其等亦可寫成人類IgG1mf、IgG1ma、人類IgG1mx或人類IgG1mz)，其中在一些具體實施例中，抗體之Fc區包含一或多個進一步的突變，如本文中別處所述。

本發明亦關於根據任何上述方法獲得或可獲得之抗體。

本發明亦關於包含根據本發明之抗體、根據本發明之核酸、根據本發明之表現載體或根據本發明之宿主細胞的組成物。

在進一步具體實施例中，根據本發明之組成物係醫藥組成物，其一般包含醫藥上可接受之載劑。在一個具體實施例中，醫藥組成物含有如本文中所揭示之任何態樣或具體實施例中所定義之抗體，或如本文中所揭示之任何態樣或具體實施例中所定義之表現載體。

在又進一步具體實施例中，本發明關於醫藥組成物，其包含：

- 如本文中所揭示之任何態樣及具體實施例中所定義之抗體，及
- 醫藥上可接受之載劑。

在一個具體實施例中，醫藥組成物係藉由靜脈內或皮下注射或輸注投予。

本發明亦關於配件套組(kit-of-parts)，諸如用作伴隨診斷之套組以用於鑑定在患者群體內對如本文中所定義之

抗體的治療具有反應傾向的彼等患者，該配件套組包含本文中所揭示之任何態樣或具體實施例中所定義之抗體；及該套組之使用說明。

本發明亦關於用於療法之配件套組，其包含根據本發明之抗體、或包含根據本發明之抗體的組成物，視需要地其中該配件套組含有多於一個劑量的該抗體。

在一個具體實施例中，配件套組在一或多個容器(諸如小瓶)中包含此種抗體或組成物。

在一個具體實施例中，配件套組包含此種抗體或組成物以供同時、單獨或依序用於療法中。

本發明之抗體具有許多涉及治療可藉由活化表現OX40之免疫細胞來治療的疾病及病症之治療用途。例如，可對培養中之細胞(例如體外或離體)或對人類個體(例如體內)投予抗體，以治療或預防各種不同病症及疾病。如本文中所使用，術語「個體(subject)」意欲包括可能受益於該抗體或對該抗體具有反應之人類及非人類動物。個體可例如包括患有可藉由調控OX40功能從而擴增例如$CD4^+$及/或$CD8^+$ T細胞群體來矯正或改善的疾病或病症的人類患者。因此，該抗體可用於在體內或體外引發T細胞群體(諸如T輔助細胞及細胞毒性T細胞)之增殖。

因此，在一個態樣中，本發明關於根據本發明之抗體、根據本發明之核酸或核酸之組合、根據本發明之遞送媒劑、根據本發明之表現載體、根據本發明之宿主細胞、根據本發明之組成物、或用作藥劑之根據本發明之醫藥組

成物。

在一個態樣中，本發明關於根據本發明之抗體、根據本發明之核酸或核酸之組合、根據本發明之遞送媒劑、根據本發明之表現載體、根據本發明之宿主細胞、根據本發明之組成物、或根據本發明之醫藥組成物於製備用於治療或預防疾病或病症之藥劑之用途。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投予根據本發明之抗體、根據本發明之核酸或核酸之組合、根據本發明之遞送媒劑、根據本發明之表現載體、根據本發明請求之宿主細胞、根據本發明之組成物、或根據本發明之醫藥組成物。

在一個態樣中，本發明關於根據任何態樣或具體實施例之抗體，其係用作藥劑。

在一個態樣中，本發明關於根據任何態樣或具體實施例之抗體於製備用於治療或預防疾病或病症之藥劑之用途。

在一個態樣中，本發明關於根據任何態樣或具體實施例之抗體，其用於治療或預防疾病或病症中。

在一個態樣中，本發明關於根據任何態樣或具體實施例之抗體，其用於診斷或用於診斷方法中。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投予根據任何態樣或具體實施例之抗體，其一般以治療有效量投予及/或投予足以治療該疾病或病症的時間。

在一個態樣中，本發明關於醫藥組成物，其包含根據任何態樣或具體實施例之抗體，其係用作藥劑。

在一個態樣中，本發明關於醫藥組成物，其包含根據任何態樣或具體實施例之抗體，其係用於治療或預防疾病或病症。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投予包含根據任何態樣或具體實施例之抗體的醫藥組成物，一般以治療有效量投予及/或投予足以治療該疾病或病症的時間。

在一個態樣中，本發明關於治療疾病或病症之方法，其包含下列步驟：

- 選擇罹患該疾病或病症之個體，及
- 向該個體投予根據任何態樣或具體實施例之抗體、或包含該抗體之醫藥組成物，一般以治療有效量投予及/或投予足以治療該疾病或病症的時間。

在一個具體實施例中，疾病或病症係癌症，亦即致瘤性病症，諸如例如血液癌症或惡性實體腫瘤。在另一具體實施例中，疾病或病症係炎症及/或自體免疫疾病或病症。

在本發明之一個具體實施例中，抗體係以1至20 mg/kg之劑量投予。在本發明之另一具體實施例中，抗體係以1 mg/kg之劑量投予。在本發明之另一具體實施例中，抗體係以2.5 mg/kg之劑量投予。在本發明之另一具體實施例中，抗體係以5 mg/kg之劑量投予。在本發明之另

一具體實施例中，抗體係以10 mg/kg之劑量投予。在本發明之另一具體實施例中，抗體係以20 mg/kg之劑量投予。在進一步態樣中，本發明關於抗個體獨特型抗體(anti-idiotypic antibody)，該抗個體獨特型抗體與包含至少一個能夠與OX40結合之抗原結合區的抗體(亦即，如本文中所述之根據本發明的抗體)結合。在特定具體實施例中，抗個體獨特型抗體與如本文中所述之能夠與OX40結合之抗原結合區結合。在較佳具體實施例中，抗個體獨特型抗體與由如SEQ ID NO：18中所示之重鏈及如SEQ ID NO：19中所示之輕鏈所指定之抗體結合。

抗個體獨特型(Id)抗體係辨識通常與抗體之抗原結合位點相關聯之獨特決定位的抗體。抗Id(antiId)抗體可藉由用欲製備之抗-Id抗體所針對的單株抗體免疫與抗OX40單株抗體來源相同的物種及遺傳類型之動物來製備。經免疫之動物一般可藉由產生針對此等個體獨特型決定位之抗體(抗-Id抗體)來辨識及回應於該免疫抗體之獨特型決定位。用於產生此類抗體之方法描述於例如US 4,699,880中。此類抗體係本發明之進一步特徵。

抗Id抗體亦可用作「免疫原」以在又另一動物中誘導免疫反應，產生所謂抗-抗-Id抗體。抗-抗-Id抗體與誘導該抗-Id抗體之原始單株抗體可為表位上相同的。因此，藉由使用針對單株抗體之個體獨特型決定位的抗體，有可能識別表現相同特異性之抗體的其他株。抗-Id抗體可藉由任何合適的技術(諸如本文中他處描述之關於本發明之

OX40特異性抗體者)變化(從而產生抗-Id抗體變體)及/或衍生。例如，可將單株抗-Id抗體與載劑(諸如匙孔血藍蛋白(KLH))共軛並用於免疫BALB/c小鼠。來自此等小鼠之血清一般將含有抗-抗-Id抗體，該抗-抗-Id抗體具有與原始/親本抗OX40抗體類似(若不是相同的話)之結合性質。

Fc區可在其C端具有離胺酸。此離胺酸之起源係在衍生此等Fc區的人類中發現之天然存在之序列。在重組抗體之細胞培養產生期間，此末端離胺酸可藉由(多種)內源性羧肽酶之蛋白水解作用而裂解，導致具有相同序列但缺乏C端離胺酸之恆定區。出於抗體之製造目的，可將編碼此末端離胺酸之DNA可從序列中省略，使得產生不具有離胺酸之抗體。從編碼或不編碼末端離胺酸之核酸序列產生的抗體在序列及功能上實質上相同，因為當例如使用在基於CHO之生產系統中產生之抗體時，該末端離胺酸之加工程度一般是高的(Dick, L.W. et al. Biotechnol. Bioeng. 2008;100：1132–1143)。因此，應理解，根據本發明之蛋白質(諸如抗體)可在有或沒有編碼或具有末端離胺酸之情況下生成。亦應理解，根據本發明之具有末端離胺酸之序列(諸如具有末端離胺酸之恆定區序列)可被理解為沒有末端離胺酸之對應序列，而該沒有末端離胺酸之序列亦可被理解為具有末端離胺酸之對應序列。

表3：序列表

SEQ ID NO:	識別代號	結構域	胺基酸序列
1	IgG1m(f)	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
2	IgG1m(f)-E345R	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
3	IgG1m(f)-P329R-E345R	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRA PIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
4	IgG1m(f)-K322A-E345R	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
5	IgG1m(f)-L234A-AGR	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG

			APIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
6	IgG1m(f)-RRE	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QESLSLSPG
7	κ輕鏈恆定區	恆定區	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
8	λ輕鏈恆定區	恆定區	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
9	IgG1-CD134-003	全重鏈	EQLKETGGGLVQPGGSLTLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDP VFGSTYYASWVNGRFAISSHNAQNTLYLQLNSLTAADTATYFCARDLRAFYSG WGGINLWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
10	IgG1-CD134-003	全輕鏈	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGQPPKLLIYDA SNLASGVPDRFSGSGSGTQFTLTISGVQSDDAATYYCLGGYDDDAENAFGGG TEVVVQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
11	IgG1-CD134-003	VH	EQLKETGGGLVQPGGSLTLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDP VFGSTYYASWVNGRFAISSHNAQNTLYLQLNSLTAADTATYFCARDLRAFYSG WGGINLWGPGTLVTVSS
12	IgG1-CD134-003	VH_CDR1	GFDFSSGY
13	IgG1-CD134-003	VH_CDR2	IDPVFGST
14	IgG1-CD134-003	VH_CDR3	ARDLRAFYSGWGGINL
15	IgG1-	VL	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGQPPKLLIYDA

	CD134-003		SNLASGVPDRFSGSGSGTQFTLTISGVQSDDAATYYCLGGYDDDAENAFGGGTEVVVQ
16	IgG1-CD134-003	VL_CDR1	QIVVNNNF
	IgG1-CD134-003	VL_CDR2	DAS
17	IgG1-CD134-003	VL_CDR3	LGGYDDDAENA
18	IgG1-CD134-003-HC6LC2 P329R-E345R	全重鏈	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYASWVNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARDLRAFYSGWGGINLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	IgG1-CD134-003-HC6LC2	全輕鏈	AAVLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLASGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLGGYDDDAENAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYASWVNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARDLRAFYSGWGGINLWGQGTLVTVSS
12	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VH_CDR1	GFDFSSGY
13	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VH_CDR2	IDPVFGST
14	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VH_CDR3	ARDLRAFYSGWGGINL
21	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VL	AAVLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLASGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLGGYDDDAENAFGGGTKVEIK
16	IgG1-	VL_CDR1	QIVVNNNF

	CD134-003-HC6LC2		
	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VL_CDR2	DAS
17	IgG1-CD134-003-HC6LC2	VL_CDR3	LGGYDDDAENA
22	IgG1-CD134-007	全重鏈	QSVEESGGRLVTPGTFLTLTCTVSGFSLSSYAMNWVRQSPGKGLEWIGIIYSDD IAYYASWAKGRFTISKTSTTVTLKMTSLTVADTATYFCARGDGDRSIWSFDLW GPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	IgG1-CD134-007	全輕鏈	AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSESVWNNNWLAWYQQKPGQPPNLLIY EASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTVSEVQSDDAATYYCQGGYYDSSPIWTFG GGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
24	IgG1-CD134-007	VH	QSVEESGGRLVTPGTFLTLTCTVSGFSLSSYAMNWVRQSPGKGLEWIGIIYSDD IAYYASWAKGRFTISKTSTTVTLKMTSLTVADTATYFCARGDGDRSIWSFDLW GPGTLVTVSS
25	IgG1-CD134-007	VH_CDR1	GFSLSSYA
26	IgG1-CD134-007	VH_CDR2	IYSDDIA
27	IgG1-CD134-007	VH_CDR3	ARGDGDRSIWSFDL
28	IgG1-CD134-007	VL	AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSESVWNNNWLAWYQQKPGQPPNLLIY EASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLTVSEVQSDDAATYYCQGGYYDSSPIWTFG GGTEVVVK
29	IgG1-CD134-007	VL_CDR1	ESVWNNNW
	IgG1-CD134-007	VL_CDR2	EAS

30	IgG1-CD134-007	VL_CDR3	QGGYYDSSPIWT
31	IgG1-CD134-012	全重鏈	QSLEESGGRLVTPGTPLTLICTVSGIDLSSGAMGWVRQAPGKGLEYIGYIYTGS GTTSYASWVNGRFTISMTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARDAASSYWGHFTL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-CD134-012	全輕鏈	DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASENIYSSLAWYQQKPGQPPKLLIYRTSTL ASGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYCQSYYHNSGGGYDYGFGGGT EVVAKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
33	IgG1-CD134-012	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLICTVSGIDLSSGAMGWVRQAPGKGLEYIGYIYTGS GTTSYASWVNGRFTISMTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARDAASSYWGHFTL WGQGTLVTVSS
34	IgG1-CD134-012	VH_CDR1	GIDLSSGA
35	IgG1-CD134-012	VH_CDR2	YTGSGTT
36	IgG1-CD134-012	VH_CDR3	ARDAASSYWGHFTL
37	IgG1-CD134-012	VL	DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASENIYSSLAWYQQKPGQPPKLLIYRTSTL ASGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYCQSYYHNSGGGYDYGFGGGT EVVAK
38	IgG1-CD134-012	VL_CDR1	ENIYSS
	IgG1-CD134-012	VL_CDR2	RTS
39	IgG1-CD134-012	VL_CDR3	QSYYHNSGGGYDYG
40	IgG1-CD134-11D4	全重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIS SSSSTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

			KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
41	IgG1-CD134-11D4	全輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	IgG1-CD134-11D4	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYIS SSSSTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFD YWGQGTLVTVSS
43	IgG1-CD134-11D4	VH_CDR1	GFTFSSYS
44	IgG1-CD134-11D4	VH_CDR2	ISSSSSTI
45	IgG1-CD134-11D4	VH_CDR3	ARESGWYLFDY
46	IgG1-CD134-11D4	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK
47	IgG1-CD134-11D4	VL_CDR1	QGISSW
	IgG1-CD134-11D4	VL_CDR2	AAS
48	IgG1-CD134-11D4	VL_CDR3	QQYNSYPPT
49	IgG2恆定區	恆定區	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
50	IgG2s-E345R恆定區	恆定區	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKTKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

51	食蟹獼猴 OX40	全長蛋白質	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAKLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNG MVSRCNRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSAKPCKACTWCNLRSGSERKQPCTAT QDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKH TLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWPRTSQRPSTR PVEVPRGPAVAAILGLGLALGLLGPLAMLLALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSF RTPIQEEQADAHSALAKI
52	人類 OX40	全長蛋白質	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG MVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT LQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRP VEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKI
53	小鼠 OX40; OX40mm	全長蛋白質	MYVWVQQPTALLLLALTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSR CDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVC RCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRH PASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTP EGPAFAVLLGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNSFRTPIQEEH TDAHFTLAKI
54	具有小鼠CRD1之人類OX40；OX40-CRD1mm		MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHG MVSRCDHTRDTLCHPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT LQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRP VEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKI
55	具有小鼠CRD2之人類OX40；OX40-CRD2mm		MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG MVSRCSRSQNTVCRPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPT QDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKH TLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRP VEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKI
56	具有小鼠CRD3之人類OX40；OX40-CRD3mm		MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG MVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ DTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK HTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPST RPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGS FRTPIQEEQADAHSTLAKI
57	具有小鼠CRD4之人類OX40；OX40-CRD4mm		MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG MVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQT RHPASDSLDAVCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRP VEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKI
58	人類	Fc區	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

	IgG1m(f)-P329R-E345R之鉸鏈、CH2、CH3區	(包括鉸鏈)	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	人類IgG1m(a)-P329R-E345R之鉸鏈、CH2、CH3區	Fc區(包括鉸鏈)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
60	人類IgG1m(x)-P329R-E345R之鉸鏈、CH2、CH3區	Fc區(包括鉸鏈)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG
61	人類IgG1m(z)-P329R-E345R之鉸鏈、CH2、CH3區	Fc區(包括鉸鏈)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	IgG1m(f)-L234F-L235E-D265A-F405L	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	IgG1-CD134-003-RR-K409R	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
64	VH CD52-CAMPATH-1H	VH	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGQGSLVTVSS
65	VH CD52-CAMPATH	VH_CDR1	GFTFTDFY

	-1H CDR1		
66	VH CD52-CAMPATH-1H CDR2	VH_CDR2	IRDKAKGYTT
67	VH CD52-CAMPATH-1H CDR3	VH_CDR3	AREGHTAAPFDY
68	VL CD52-CAMPATH-1H	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNN LQTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQHISRPRTFGQGTKVEIK
69	VL CD52-CAMPATH-1H CDR1	VL_CDR1	QNIDKY
	VL CD52-CAMPATH-1H CDR2	VL_CDR2	NTN
70	VL CD52-CAMPATH-1H CDR3	VL_CDR3	LQHISRPRT
71	VH gp120-b12	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMG WINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGP YSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS
72	VH gp120-b12 CDR1	VH_CDR1	GYRFSNFV
73	VH gp120-b12 CDR2	VH_CDR2	INPYNGNK
74	VH gp120-b12 CDR3	VH_CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
75	VL gp120-b12	VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSN RASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
76	VL gp120-b12 CDR1	VL_CDR1	HSIRSRR
	VL gp120-b12 CDR2	VL_CDR2	GVS
77	VL gp120-b12-CDR3	VL_CDR3	QVYGASSYT
78	IgG1-P329R-E345R-F405L	恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRA PIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

實施例

實施例1：生成抗人類OX40抗體及其Fc變體

如WO2016/110584A1中所述，為生成抗人類OX40抗

體，將九隻兔子用與人類IgG1之Fc部分融合之重組人類OX40(CD134)(Adipogen，目錄號AG-40B-0014；MAB Discovery GmbH)進行免疫。在一系列免疫之後於四個不同時間點收集血液樣本並富集B細胞。藉由流動式細胞測量術分選個別B細胞並將單一株在37℃下培養及擴增七天。在七天之後，收集培養物上清液以評估人類OX40特異性抗體之產生，且將B細胞冷凍並儲存在-80℃下直到進一步使用為止。

將已識別之OX40結合之V_H及V_L之獨特序列在HEK293細胞中瞬時共表現以生成兔子-人類嵌合抗體。基於評定抗體結合人類OX40之能力及促效活性的篩選檢定結果，選定30種嵌合抗體進行進一步測試。為此，此等抗體之V_H及V_L區經基因合成並選殖到人類IgG1恆定區之上游，之後在HEK293細胞中產生抗體並純化。首先藉由流動式細胞測量術測試該等抗體與人類及食蟹獼猴OX40的結合。選擇的此等抗體係以IgG1-P329R-E345R-K409R(IgG1-RR-K409R)主鏈之形式產生，以使用OX40生物發光報導子檢定(Promega)及PBMC增殖檢定來評定促效活性。基於此第二輪的篩選結果，三個嵌合抗體殖株(IgG1-CD134-003-P329R-E345R-K409R [IgG1-CD134-003-RR-K409R]、IgG1-CD134-007-RR-K409R、及IgG1-CD134-012-RR-K409R)被選為最具前景的候選者，將其中二者隨後進行人源化(IgG1-CD134-003-RR-K409R及IgG1-CD134-012-RR-K409R)。對於人源化，使用CDR移植及胺基酸點突變之組

合(Abzena)，且每個選殖設計五個人源化V_L鏈(LC1至LC5)及六個人源化V_H鏈(HC1至HC5)。將編碼所有V_H及V_L鏈之組合(每個選殖總共30對)及編碼在重鏈中具有RR突變之IgG1恆定區之DNA質體轉染到Expi293F細胞中以用於抗體生產。使用含有個別人源化OX40抗體變體之Expi293F細胞培養物之上清液藉由生物層干涉測量術評定抗體與人類及食蟹獼猴OX40之結合親和力及藉由流動式細胞測量術評定活化之初代人類T細胞(源自五位健康捐贈者)之結合親和力。

因源自IgG1-CD134-003-RR及IgG1-CD134-012-RR的所有人源化抗體變體之結合特性與親本抗體之結合特性十分類似，所以基於與最接近人類同源物之最高序列類似性來進一步選擇24種抗體並純化，以比較其等結合活化之初代人類T細胞、誘導OX40訊息傳導、及增強T細胞增殖之能力。選擇一種人源化OX40結合抗體(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)並連同在Fc結構域中具有不同突變之嵌合抗體IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-007、及IgG1-CD134-012在下列實施例中描述之實驗中，進一步表徵。

已獲得如下之本文中所使用之抗人類OX40抗體之序列：IgG1-CD134-Hu106(WO2020/030570A1，SEQ ID No 5及11)、IgG1-CD134-A4453(WO2019/223733，SEQ ID No 26及28)、IgG1-CD134-MEDI0562(INN 10420，他佛利單抗)、IgG1-CD134-ABBV368(INN 11242，瑞多非利單抗)、IgG1-CD134-IBI101(INN 11200，庫達利單抗)、

IgG1-CD134-GBR830(INN 11273，特拉佐利單抗(telazorlimab))、IgG1-CD134-INCAGN1949(US10259882B2，SEQ ID No 61及20)、IgG1-CD134-SF2及IgG2-CD134-SF2(US2014/0377284A1，VL1VH2，SEQ ID No 78及80)、IgG1-CD134-h3C8(WO2016/164480A1，SEQ ID No 118及119)、IgG1-CD134-RG7888(INN 10272，沃樂利珠單抗(vonlerolizumab)、及IgG1-CD134-49B4(WO2019/086497A2，SEQ ID No 40及41)。使用包含b12之V_H/V_L之人類IgG1抗體(HIV1 gp120特異性抗體)作為陰性對照(Barbas et al., J Mol Biol.1993 Apr 5;230(3):812-2)。

實施例2：抗人類OX40抗體對重組人類及食蟹獼猴OX40之結合親和力

使用無標記生物層干涉測量術在Octet HTX儀器(Sartorius)上測定抗人類OX40抗體(IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、IgG1-CD134-007、IgG1-CD134-012)及12種抗人類OX40 IgG1抗體對重組人類及食蟹獼猴OX40蛋白質之結合親和力。

實驗係在30℃及1,000 RPM下同時搖動來進行。為測定OX40抗體對人類及食蟹獼猴OX40之親和力，將Anti-Human IgG Fc Capture(AHC)生物感測器(Sartorius，目錄號18-5060)藉由暴露於10 mM甘胺酸(Sigma-Aldrich，目錄號15527)緩衝液(pH 1.7)中5秒，接著在sample

diluent(Sartorius，目錄號18-1104)中中和5秒來預調理；將兩個步驟重複五次。接下來，將AHC感測器用抗體(1 μg/mL於樣本稀釋液(Sample Diluent)中)裝載600秒。在樣本稀釋液中進行基線測量(100秒)之後，使用以2倍稀釋步驟之0.78至800 nM之濃度範圍來測定人類OX40(Acro Biosystems，目錄號OX0-H5224)及食蟹獼猴OX40(Acro Biosystems，目錄號OX0-C5220)之締合(200秒)及解離(1000秒)。

使用基於胺基酸序列之抗原之理論分子量進行計算。對於各抗體，使用參考感測器，將其與代替抗原之樣本稀釋液進行培育。AHC感測器係藉由暴露於10 mM甘胺酸緩衝液(pH 1.7)中5秒，接著在樣本稀釋液中中和5秒來再生；將兩個步驟重複兩次。隨後將感測器再用抗體裝載以用於下一循環的動力學測量。

數據係使用Data Acquisition Software v12.0(Sartorius)擷取且用Data Analysis Software v12.0(Sartorius)分析。數據追蹤係藉由減去參考感測器來對每一抗體進行校正。將Y軸與基線之最後10秒對準，並應用解離之步間校正對準(Interstep Correction alignment)以及薩維茨基-戈萊(Savitzky-Golay)濾波法。將反應<0.05 nm之數據追蹤排除在分析之外。對於具有低於50 nM之K_D值之抗體，將濃度高於100 nM之數據追蹤排除在分析之外。數據係使用200秒之締合時間及設定在50秒、200秒及1000秒之解離時間的所欲窗口，以1:1模型來擬合。解離時間係基於R^2值、

曲線之視覺檢查及在解離步驟期間之至少5%訊息衰減來選擇。

有十四種抗體(表4；由於次佳之曲線擬合，所以測試除IgG1-CD134-SF2、及IgG1-CD134-49B4-G236R-E345R-K439E [RRE]之外的所有抗體)對人類OX40之親和力可精確測定，其中K_D值大多在奈莫耳範圍內。

有八種OX40抗體(IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-007、IgG1-CD134-A4453、IgG1-CD134-MEDI0562、及IgG1-CD134-ABBV368)對食蟹獼猴OX40之親和力可精確測定。此等抗體測量之K_D值大多在奈莫耳範圍內(表4)。

抗體IgG1-CD134-RG7888對人類及食蟹獼猴OX40具有最高親和力。抗體IgG1-CD134-007、IgG1-CD134-012及IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對人類OX40之親和力比IgG1-CD134-h3C8更高。沒有可判定抗體IgG1-CD134-SF2與人類及食蟹獼猴OX40之結合特性之可靠解釋。

表4.抗人類OX40抗體與人類及食蟹獼猴OX40之結合親和力。

裝載樣本	樣本	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
IgG1-CD134-003	人類OX40	1.1E-09	3.3E+05	3.5E-04
	食蟹獼猴OX40	3.5E-09	2.8E+05	9.6E-04
IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R	人類OX40	3.4E-09	2.5E+05	8.6E-04
	食蟹獼猴OX40	2.7E-08	1.1E+05	2.9E-03
IgG1-CD134-007	人類OX40	2.0E-09	3.8E+05	7.5E-04
	食蟹獼猴OX40	7.1E-09	2.6E+05	1.8E-03
IgG1-CD134-012	人類OX40	1.1E-08	1.4E+05	1.6E-03
	食蟹獼猴OX40	1.8E-07*	9.8E+04*	1.8E-02*
IgG1-CD134-11D4	人類OX40	2.4E-09	1.7E+05	4.1E-04
	食蟹獼猴OX40	2.8E-07	1.0E+05	2.8E-02
IgG1-CD134-49B4-RRE	人類OX40	2.2E-07*	1.7E+05*	3.6E-02*
	食蟹獼猴OX40	1.6E-07*	1.5E+05*	2.4E-02*
IgG1-CD134-A4453	人類OX40	1.4E-08	1.6E+05	2.2E-03
	食蟹獼猴OX40	1.2E-08	1.5E+05	1.7E-03
IgG1-CD134-ABBV368	人類OX40	3.2E-08	5.1E+05	1.7E-02
	食蟹獼猴OX40	8.2E-08	2.3E+05	1.9E-02
IgG1-CD134-GBR830	人類OX40	6.7E-08	1.2E+05	7.7E-03
	食蟹獼猴OX40	ND	ND	ND
IgG1-CD134-h3C8	人類OX40	1.5E-08	3.7E+05	5.6E-03
	食蟹獼猴OX40	ND	ND	ND
IgG1-CD134-Hu106	人類OX40	9.3E-09	2.6E+05	2.4E-03
	食蟹獼猴OX40	2.4E-07*	1.2E+05*	2.9E-02*
IgG1-CD134-IBI101	人類OX40	5.3E-08	2.2E+05	1.2E-02
	食蟹獼猴OX40	4.0E-07*	7.4E+04*	3.0E-02*
IgG1-CD134-INCAGN1949	人類OX40	1.6E-07	1.9E+05	3.2E-02
	食蟹獼猴OX40	2.3E-07*	1.0E+05*	2.4E-02*
IgG1-CD134-MEDI0562	人類OX40	1.5E-08	1.5E+05	2.2E-03
	食蟹獼猴OX40	1.7E-08	1.1E+05	1.8E-03
IgG1-CD134-RG7888	人類OX40	2.3E-10	3.6E+05	8.4E-05
	食蟹獼猴OX40	6.1E-10	2.4E+05	1.4E-04
IgG1-CD134-SF2	人類OX40	ND	ND	ND
	食蟹獼猴OX40	ND	ND	ND

*由於次佳之曲線擬合，所以雖觀察到結合，但K_D、k_{on}及k_{dis}係不太可靠的值，導致使用1:1模型來解釋不可靠。ND：無法偵測到。

實施例3：使用生物層干涉測量術評定抗人類OX40 IgG1抗體之交叉阻斷

使用生物層干涉測量術在Octet HTX儀器(Sartorius)上進行IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、IgG1-CD134-007、IgG1-CD134-012、

及12種抗人類OX40 IgG1抗體之抗體交叉阻斷分析。實驗係在1,000 RPM及30℃下同時搖動來進行。

將胺反應性第二代(Amine Reactive 2nd Generation, AR2G)生物感測器(Sartorius，目錄號18-5092)用20 mM EDC(N-(3-二甲基胺基丙基)-N-乙基碳二亞胺鹽酸鹽；Sartorius，目錄號18-1033)及10 mM s-NHS(N-羥基磺基琥珀醯亞胺鈉鹽；Sartorius，目錄號18-1067)之溶液活化300秒。將活化之AR2G感測器用稀釋於10 mM乙酸鹽pH 5.0(Sartorius，目錄號18-1069)或pH 6.0(Sartorius，目錄號18-1070)中之20 μg/mL的第一抗體裝載600秒，並用1 M乙醇胺pH 8.5(ETA；Sartorius，目錄號18-1071)淬熄300秒。在樣本稀釋液(Sample Diluent)(Sartorius，目錄號18-1104)中進行50秒基線測量之後，將含有固定化抗體之AR2G生物感測器用與His標籤融合之人類OX40(100 nM，稀釋於Sample Diluent中；Acro Biosystems，目錄號OX0-H5224)裝載300秒。測定第二抗體(10 μg/mL，於Sample Diluent中)之締合(300秒)。感測器係藉由暴露於10 mM甘胺酸(Sigma-Aldrich，目錄號15527)緩衝液(pH 2.5)中5秒，接著在樣本稀釋液中中和5秒來再生。

數據係使用Data Acquisition Software v12.0(Sartorius)擷取且用Data Analysis HT Software v12.0(Sartorius)分析。數據追蹤係藉由減去參考曲線(樣品稀釋液代替第二抗體)來校正，以便校正從固定化第一抗體之抗原解離。將Y軸與締合步驟之開始對準，且應用薩維茨基-戈萊濾波

法。將第二抗體之經校正之締合反應以矩陣格式作圖(表5)。反應≥ 0.1 nm被認為是非交叉阻斷抗體對，而反應< 0.1被認為是阻斷抗體配對。對於一些抗體配對，第二抗體相較於緩衝液對照顯示訊號減少。此被認為係抗體置換，亦即第二抗體替代第一抗體與抗原之間的交互作用(Abdiche et al., PLoS ONE 2017 Jan 6;12(1)：e0169535)。

交叉阻斷分析之結果總結於表5中。數據顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR阻斷IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-012之結合、及抗體IgG1-CD134-11D4與人類OX40之結合，而不阻斷抗體IgG1-CD134-MEDI0562、IgG1-CD134-SF2、IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-ABBV368、IgG1-CD134-INCAGN1949、IgG1-CD134-49B4-RRE、IgG1-CD134-Hu106、IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-GBR830、IgG1-CD134-IBI101、及IgG1-CD134-A4453。在IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與IgG1-CD134-007之間觀察到細微的替代行為。IgG1-CD134-007沒有阻斷IgG1-CD134-012與人類 OX40之結合，但阻斷抗體IgG1-CD134-ABBV368、IgG1-CD134-49B4-RRE、IgG1-CD134-Hu106、IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-GBR830、及IgG1-CD134-IBI101。從測試之抗體來看，僅IgG1-CD134-11D4被IgG1-CD134-012阻斷。

抗體IgG1-CD134-ABBV368、IgG1-CD134-INCAGN1949、IgG1-CD134-49B4-RRE、IgG1-CD134-Hu106、IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-GBR830、及

IgG1-CD134-IBI101全部互相交叉阻斷。類似地，抗體IgG1-CD134-MEDI0562、IgG1-CD134-SF2、IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-ABBV368、及IgG1-CD134-INCAGN1949全部互相交叉阻斷。抗體IgG1-CD134-A4453不會交叉阻斷任何其他測試之抗體。

表5.使用生物層干涉測量術進行抗體交叉阻斷之測定。固定化第一抗體係垂直顯示而第二抗體係水平顯示。顯示者係第二抗體之經校正之締合反應。反應< 0.1被認為阻斷抗體配對(以灰色格表示)，而反應≥ 0.1nm被認為非阻斷抗體配對(未標記)。對於一些抗體對，第二抗體相較於緩衝液對照顯示訊息略有減少，指示發生抗體替代(以粗體數字表示)。在一些情況下，抗體之間的交互作用在目視檢查感測圖之後被手動調整至非阻斷(以加底線數字表示)。

	IgG1-CD134-MEDI0562	IgG1-CD134-SF2	IgG1-CD134-RG7888	IgG1-CD134-ABBV368	IgG1-CD134-INCAGN1949	IgG1-CD134-49B4-RRE	IgG1-CD134-Hu106	IgG1-CD134-h3C8	IgG1-CD134-GBR830	IgG1-CD134-IBI101	IgG1-CD134-007	IgG1-CD134-003	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	IgG1-CD134-012	IgG1-CD134-11D4	IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-MEDI0562	0.00	0.01	0.02	-0.01	0.01	0.20	0.31	0.31	0.33	0.26	0.32	0.30	0.34	0.23	0.29	0.45
IgG1-CD134-SF2	0.01	0.01	0.01	0.04	0.02	0.03	0.03	0.18	0.19	0.07	0.22	0.21	0.22	0.14	0.17	0.36
IgG1-CD134-RG7888	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.43	0.61	0.31	0.64	0.66	0.65	0.42	0.48	1.04
IgG1-CD134-ABBV368	-0.02	0.00	0.01	-0.04	-0.03	-0.01	-0.01	-0.03	-0.01	-0.02	-0.05	0.72	0.85	0.51	0.62	0.80
IgG1-CD134-INCAGN1949	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.06	0.15	0.19	0.07	0.10	0.29
IgG1-CD134-49B4-RRE	0.15	0.00	0.02	0.00	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.20	0.25	0.10	0.13	0.20
IgG1-CD134-Hu106	0.69	0.01	0.10	0.00	-0.01	0.09	0.05	0.00	0.02	-0.02	0.00	0.64	0.74	0.51	0.59	0.74
IgG1-CD134-h3C8	0.54	0.23	0.41	-0.03	-0.02	0.00	0.01	-0.03	-0.02	-0.03	-0.02	0.46	0.50	0.35	0.42	0.51
IgG1-CD134-GBR830	0.32	0.16	0.26	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.20	0.19	0.16	0.23	0.30
IgG1-CD134-IBI101	0.28	0.04	0.23	0.01	0.01	0.03	0.01	-0.01	0.02	0.01	0.00	0.23	0.34	0.28	0.35	0.39
IgG1-CD134-007	1.14	0.78	0.47	0.00	0.55	0.04	0.05	-0.01	0.07	0.02	0.01	**-0.07**	**-0.04**	0.82	0.98	1.18
IgG1-CD134-003	1.39	0.92	0.66	1.27	1.39	0.93	1.06	0.39	0.97	0.74	**-0.02**	0.02	0.04	0.00	0.09	1.51
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	1.73	1.22	1.38	1.68	1.74	1.69	1.39	0.88	1.08	1.23	**-0.07**	-0.03	0.00	0.03	0.02	1.89
IgG1-CD134-012	0.82	0.60	0.54	0.87	0.73	0.69	0.80	0.75	0.84	0.82	0.80	-0.01	-0.02	0.00	0.05	0.87
IgG1-CD134-11D4	0.14	0.11	0.11	0.13	0.11	0.10	0.13	0.12	0.13	0.15	0.15	0.01	0.00	0.00	0.02	0.18
IgG1-CD134-A4453	0.41	0.42	0.47	0.29	0.25	0.27	0.29	0.29	0.28	0.24	0.28	0.26	0.31	0.22	0.26	0.01

實施例4：抗人類OX40抗體與細胞表面表現之人類及食蟹獼猴OX40之結合

使用瞬時轉染之FreeStyle 293-F懸浮液(HEK293F)細胞藉由流動式細胞測量術來分析抗人類OX40抗體IgG1-

CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、IgG1-CD134-007-RR、IgG1-CD134-012-RR-K409R、及12種抗人類OX40抗體(十一種IgG1抗體及一種IgG2抗體)與細胞表面表現之人類及食蟹獼猴OX40之結合。將非結合抗體IgG1-b12-RR用作陰性對照抗體。

HEK293F細胞(ThermoFisher，目錄號R79007)係根據製造商的說明，使用293fectin Transfection Reagent (ThermoFisher，目錄號12347019)及含有Glutamax之Opti-MEM® I 低血清培養基(Opti-MEM® I Reduced Serum Medium with Glutamax)(ThermoFisher，目錄號51985034)(補充有50單位青黴素及50單位鏈黴素(pen/strep; Lonza，目錄號17-603E))，經編碼全長人類或食蟹獼猴OX40(分別為SEQ ID NO：52及SEQ ID NO：51)之哺乳動物表現載體pSB瞬時轉染。

將轉染之細胞接種在96孔盤(30,000個細胞/孔；ThermoFisher，目錄號163320)上進行依序培育，其中之間的洗滌步驟使用螢光活化之細胞分選(fluorescence-activated cell sorting, FACS)緩衝液1(磷酸鹽緩衝之生理食鹽水[PBS；Lonza，目錄號BE17-517Q]，補充有0.1%牛血清白蛋白[BSA；Roche，目錄號10735086001]及0.02%疊氮化鈉[NaN_3；Bio-World，目錄號41920044-3])，該FACS緩衝液1補充有2 mM乙二胺四乙酸(EDTA；Sigma-Aldrich，目錄號03690)。將細胞依序與50 μL的抗人類OX40抗體連續稀釋液(在EDTA補充之FACS緩衝液1中以10倍稀釋步驟

進行，最終濃度範圍為0.005至50 μg/mL)在4℃下培育30 min，並與於EDTA補充之FACS緩衝液1中之50 μL的R-藻紅素(R-phycoerythrin, R-PE)共軛之山羊抗人類IgG F(ab')$_2$溶液(Jackson ImmunoResearch，目錄號109-116-098，以1:200稀釋)在4℃下培育30 min。然後將細胞使用EDTA補充之FACS緩衝液1洗滌，重新懸浮於30 μL的存活力標誌物(viability marker) ToPro-3(Invitrogen，目錄號T3605，以1:10,000稀釋)於EDTA補充之FACS緩衝液1中之溶液中，且隨後在iQue® 3流式細胞儀(Satorius)上分析。使用FlowJo軟體分析數據並使用GraphPad Prism將數據視覺化。

所有測試抗體均顯示與人類及食蟹獼猴OX40以劑量依賴性方式結合(圖1A、B)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-007-RR、及IgG1-CD134-012-RR-K409R對人類及食蟹獼猴OX40之半最大有效濃度(EC_{50})與大多數所測試之其他抗體可相比(圖2)。相較於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-007-RR、及IgG1-CD134-012-RR-K409R，抗體IgG2s-CD134-SF2-E345R、IgG1-CD134-GBR830、IgG1-CD134-Hu106、及IgG1-CD134-MEDI0562對與人類OX40的結合具有較高的EC_{50}，而IgG2s-CD134-SF2-E345R、IgG1-CD134-GBR830、及IgG1-CD134-h3C8-E345R對與食蟹獼猴OX40的結合具有較高的EC_{50}。對與人類及食蟹獼猴OX40結合兩者而言，僅抗體IgG1-CD134-49B4-E345R及IgG1-CD134-ABBV368具有比IgG1-CD134-

003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-007-RR、及IgG1-CD134-012-RR-K409R略低的EC_{50}。

對於大多數抗體，與人類OX40結合之EC_{50}及與食蟹獼猴OX40結合之EC_{50}差異不大，惟抗體IgG1-CD134-h3C8-E345R及IgG1-CD134-GBR830除外，此兩種抗體對食蟹獼猴OX40之EC_{50}值均高於對人類OX40。

實施例5：使用結構域改組之OX40分子(domain-shuffled OX40 molecules)判定對抗人類OX40抗體與人類OX40之結合重要的結構域

OX40蛋白質含有三個完整的富含半胱胺酸之結構域(cysteine-rich domain)(CRD；CRD1、CRD2、及CRD4)及截斷之CRD(CRD3；Willoughby et al. Mol Immunol. 2017 Mar; 83:13-22)。OX40L結合涵蓋CRD1至3。OX40L係三聚體的且各三聚體與在T細胞表面上之三個OX40分子締合。三聚體受體:配體複合物之形成確保OX40之胞質結構域的成簇，該等胞質結構域含有許多TNFR家族成員特有之QEE模體，為TNFR相關因子(TNFR-associated factor, TRAF)銜接蛋白質創造停泊位點(docking site)。此等交互作用將受體與各種訊息傳導路徑之活化(例如經由NF-κB及PI3K/AKT之活化)的連接聯繫起來(Willoughby et al. Mol Immunol. 2017 Mar; 83:13-22)。

為判定哪些CRD對抗人類OX40抗體與人類OX40之結合是重要的，在人類與小鼠OX40之間進行DNA改組。四

個改組構築體係從編碼人類OX40之DNA中藉由用小鼠CRD類似物置換個別CRD來製備(圖3)。以此方式，生成下列構築體：人類OX40(SEQ ID NO：52)、小鼠OX40(SEQ ID NO：53)、具有小鼠CRD1之人類OX40(SEQ ID NO：54)、具有小鼠CRD2之人類OX40(SEQ ID NO：55)、具有小鼠CRD3之人類OX40(SEQ ID NO：56)、及具有小鼠CRD4之人類OX40(SEQ ID NO：57)。人類與小鼠OX40之間的同源性有限(圖4)。因此，若人類OX40中之CRD對抗OX40抗體之結合至關重要，則在用小鼠類似物置換該結構域後，結合將會喪失。反之亦然，若OX40抗體與結構域改組之OX40分子之結合保留，則表明該改組之人類OX40結構域對結合並不重要。

根據製造商的規程，使用ExpiFectamine™ CHO 轉染套組(ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit)(ThermoFisher，目錄號A29131)將四個改組構築體、以及野生型人類及小鼠OX40在ExpiCHO-S細胞上瞬時表現。為測定抗人類OX40抗體IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、IgG1-CD134-007-RR、IgG1-CD134-012-RR-K409R、及11種額外OX40抗體(十種IgG1抗體及一種IgG2抗體)與細胞表面表現之改組構築體及與野生型人類及小鼠OX40之結合，將轉染之細胞(30,000個細胞/孔)在96孔盤(ThermoFisher，目錄號163320)中與於FACS緩衝液1中之50 μL的個別OX40抗體之連續稀釋液(以10倍稀釋步驟方式進行，最終濃度範圍為0.005至50

μg/mL)在4℃下進行培育30 min。將細胞在FACS緩衝液1中洗滌兩次並隨後與50 μL的二級抗體R-PE共軛之山羊抗人類IgG F(ab')$_2$(Jackson ImmunoResearch，目錄號109-116-098；以1:200稀釋)於FACS緩衝液1中之溶液在黑暗中在4℃下進行培育30 min。接下來，將細胞在FACS緩衝液1中洗滌兩次，重新懸浮於30 μL的存活力標誌物ToPro-3(Invitrogen，目錄號T3605，以1:10,000稀釋)於補充有2 mM EDTA之FACS緩衝液1中之溶液中，並在iQue Screener Plus(Intellicyt Corporation, USA)上分析。使用FlowJo軟體分析數據並使用GraphPad Prism將數據視覺化。將非靶定結合抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照抗體。

所有測試之抗人類OX40抗體均顯示與野生型人類OX40結合(圖5至圖9)，而除在最高濃度下之抗體IgG1-CD134-RG7888之外，所有測試之抗體均未顯示與野生型小鼠OX40結合(圖6A)。

抗體IgG1-CD134-A4453係唯一顯示與具有小鼠CRD4之人類OX40的結合喪失的抗體(圖7B、圖7F)，因此被用於標準化其他抗體之結合數據，以便合併兩組個別實驗之結果(圖10)。經合併、標準化之數據顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR喪失與具有小鼠CRD1之人類OX40的結合(圖10B)(與IgG1-CD134-012-RR-K409R及抗體IgG1-CD134-11D4類似)，同時保留與所有其他改組構築體的結合(圖10C至圖10E)。IgG1-CD134-007-RR及抗體IgG1-CD134-h3C8-E345R、IgG1-CD134-ABBV368、IgG1-CD134-

GBR830、IgG1-CD134-Hu106、IgG1-CD134-IBI101、及IgG1-CD134-INCAGN1949顯示與具有小鼠CRD2之人類OX40的結合喪失(圖10C)。抗體IgG1-CD134-RG7888、IgG2s-CD134-SF2-E345R、IgG1-CD134-INCAGN1949、及IgG1-CD134-MEDI0562顯示與具有小鼠CRD3之人類OX40的結合喪失(圖10D)。

總而言之，此等數據表明CRD1對IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-CD134-012-RR-K409R與人類OX40的結合至關重要，而對於除IgG1-CD134-11D4以外之所有測試之抗體來說，其他的CRD對人類OX40結合至關重要(表6)。對於IgG1-CD134-007-RR及IgG1-CD134-h3C8-E345R，CRD2對與人類OX40的結合似乎至關重要，而對於IgG2s-CD134-SF2-E345R及IgG1-CD134-RG7888，CRD3似乎至關重要。

表6.對抗人類OX40抗體與人類OX40之結合至關重要的結合區

抗體	結合區			
	CRD1	CRD2	CRD3	CRD4
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	X			
IgG1-CD134-012-RR-K409R	X			
IgG1-CD134-11D4	X			
IgG1-CD134-007-RR		X		
IgG1-CD134-h3C8-E345R		X		
IgG1-CD134-ABBV368		X		
IgG1-CD134-GBR830		X		
IgG1-CD134-Hu106		X		
IgG1-CD134-IBI101		X		
IgG1-CD134-INCAGN1949		X	X	
IgG1-CD134-RG7888			X	
IgG2s-CD134-SF2-E345R			X	
IgG1-CD134-MEDI0562			X	
IgG1-CD134-A4453				X

實施例6：基於細胞之OX40報導子檢定中之抗人類OX40抗體之促效活性

使用經人類OX40轉染之Jurkat細胞(OX40 Bioassay；Promega，目錄號JA2191)測量具有六聚化增強之突變(E345R)且進一步由活性或非活性Fc主鏈所組成之不同抗人類OX40抗體的OX40促效劑活性。此等細胞在NF-κB反應元件之控制下表現螢火蟲螢光素酶基因並組成型表現人類OX40，導致回應於OX40促效作用的螢光素酶產生。將$OX40^+$ Jurkat細胞解凍並在白色不透明96孔平底培養盤(30,000個細胞/孔；PerkinElmer，目錄號6005680)中於檢定緩衝液(RPMI1640培養基[Promega，目錄號G708A]。補充有5%熱滅活之胎牛血清[FBS；目錄號J121A])中在37℃/5% CO_2下靜置整隔夜。隔天，將抗體稀釋液系列(於檢定緩衝液中以5倍稀釋步驟方式進行，最終濃度範圍為0.000026至10 μg/mL [圖11A至圖11D]或0.00064至50 μg/mL [圖11E])添加至孔中並在37℃/5% CO_2下培育5 h。測試抗體係IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、IgG1-CD134-007-RR, IgG1-CD134-012-RR、及抗體IgG1-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-h3C8-E345R-L234A-L235A-P329G(IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG)、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG、及IgG2s-CD134-SF2-E345R。將非結合抗體IgG1-b12-RR用作為陰性對照。在培育之後，根據製造商的說明，將藉由混合Bio-

Glo螢光素酶檢定緩衝液(Bio-Glo Luciferase Assay Buffer)(Promega，目錄號G719A)及Bio-Glo螢光素酶檢定受質(Bio-Glo Luciferase Assay Substrate)(Promega，目錄號G720A)製備之Bio-Glo螢光素酶試劑(Bio-Glo Luciferase Assay Reagent)以1:1比例添加至含有$OX40^+$ Jurkat細胞及抗體稀釋液系列之各孔中，並在黑暗中在RT下培育5至10 min。發光係使用EnVision多標記分析儀(EnVision Multilabel Reader)(PerkinElmer)測量並在使用GraphPad Prism軟體生成之長條圖中以相對發光單位(RLU)呈現。EC_{50}值係使用GraphPad Prism計算。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR比IgG1-h3C8抗體之兩種六聚化增強之(E345R)變體誘導更強的人類OX40表現之報導子細胞之活化，該等IgG1-h3C8抗體之變體具有惰性Fc主鏈(LALAPG)或顯示無C1q結合及降低之FcγR結合之Fc主鏈(K322A；圖11A)。如由前者抗體觀察到更高的最大RLU訊號(圖11A)，及由IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR的略低EC_{50}值(圖12)所反映，與IgG1-h3C8變體相比，由IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之最大細胞活化水平更高來說明此。類似地，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在誘導報導子細胞活化方面優於IgG1-RG7888抗體之兩種六聚化增強之變體(IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG及IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R)(圖11B，圖12)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR亦誘導比IgG1-RG7888變體更高的最大活化水平(圖12)。此外，IgG1-CD134-003-HC6LC2-

RR比攜帶六聚化增強之突變的IgG2-CD134-SF2之Fc惰性變體誘導更強的報導子細胞之活化，其由更高的最大RLU訊號及更低的EC_{50}值(IgG2s-CD134-SF2-E345R；圖11C，圖12)所反映。IgG1-CD134-007-RR及IgG1-CD134-012-RR均誘導報導子細胞活化，其中IgG1-CD134-012-RR誘導更高的最大活化，其與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR可相比(圖11D，圖12)。沒有觀察到抗體IgG1-CD134-11D4之報導子細胞活化(圖11E)。

總之，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示誘導過表現人類OX40之報導子細胞之活化的效力比攜帶E345R六聚化增強之突變且由惰性Fc主鏈或顯示無C1q結合及降低之FcγR結合之Fc主鏈所組成之抗體IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-RG7888、及IgG2-CD134-SF2更高。同樣，IgG1-CD134-007-RR及IgG1-CD134-012-RR誘導報導子細胞之活化，而在此檢定中抗體IgG1-CD134-11D4未偵測到活性。007及012之非人源化變體連同人源化003株在此進行測試。在最初的PBMC增殖實驗中，007株之功能活性比003及012低。012株在人源化之後在T細胞增殖檢定中失去功能活性。

實施例7：抗人類OX40抗體增強T細胞增殖之能力

為研究IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)對誘導T細胞增殖之能力，並將此能力與具有六聚化增強之突變(E345R)且進一步由活性Fc

主鏈、非活性Fc主鏈(L234A-L235A-P329G; LALAPG)、或顯示無C1q結合及降低之FcγR結合(K322A)之Fc主鏈所組成之抗體進行比較，使用健康供體人類周邊血液單核細胞(PBMC)執行多株T細胞增殖檢定(polyclonal T-cell proliferation assay)。

PBMC係藉由Ficoll-Paque密度梯度分離(GE Healthcare，目錄號17-1440-03)從健康供體之膚色血球層(Transfusionszentrale, University Hospital, Mainz, Germany)獲得。在適用之情況下，分別使用CD4或CD8微珠(Miltenyi Biotec GmbH，目錄號130-097-48及130-045-201)耗盡PBMC中之$CD4^+$ 或$CD8^+$ T細胞。分離程序大致上根據製造商的說明執行，其中有些微修改(將微珠之體積降低)且原則上與$CD4^-$及$CD8^-$ PBMC之單離相同。簡而言之，在測定細胞數量之後，將細胞懸浮液離心，並丟棄上清液。將細胞以每80 µL緩衝液之1×10^7個活細胞重新懸浮於MACS緩衝液(DPBS [Thermo Fisher Scientific，目錄號14190250]、5 mM乙二胺四乙酸[EDTA；Sigma-Aldrich，目錄號03690]、1%人類白蛋白[CSL Behring，目錄號PZN-00504775])中。每10^7個細胞，添加12 µL的CD4或CD8微珠。在2至8℃下之15 min培育前及兩次在培育期間將細胞及磁珠充分混合，以確保均勻標記。然後將細胞懸浮液用MACS緩衝液洗滌(8 min, 300 ×g, RT)並通過30 µm細胞過濾器(BD Biosciences，目錄號340626)過濾。將LS管柱(Miltenyi Biotec GmbH，目錄號130-042-401)置於

MACS MultiStand(Miltenyi Biotec GmbH)上之QuadroMACS分離器中並用MACS緩衝液平衡。將管柱用磁珠標記之細胞裝載，並允許懸浮液藉由重力流動來流過，使磁珠標記之細胞保留在管柱內。然後將管柱用MACS緩衝液洗滌三次。丟棄含有磁珠標記之$CD4^+$及$CD8^+$細胞之管柱。將在流過液(flow through)中之未標記之$CD4^-$及$CD8^-$ PBMC離心(8 min, 300×g, RT)，重新懸浮於DPBS中，並計數。

PBMC樣本各自根據製造商的說明用CellTrace™ Violet(Thermo Fisher Scientific目錄號C34557)標記。

將CellTrace™ Violet標記之PBMC在96孔圓底盤中於含有5%匯集之人類血清(One Lambda Inc.，目錄號A25761)之伊思考夫氏改良杜爾貝可氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific，目錄號31980030)中在0.3 μg/mL可溶性抗人類CD3抗體(STEMCELL technologies，目錄號60011)及IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-h3C8-E345R-L234A-L235A-P329G(E345R-LALAPG)、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG、IgG2s-CD134-SF2-E345R或非結合陰性對照抗體IgG1-b12-RR之連續稀釋液(以2倍或10倍稀釋步驟方式進行，最終抗體濃度範圍為0.00098至10 μg/mL)存在下進行培育。在培養四天之後，將細胞用存活力染料(Thermo Fisher Scientific，目錄號65-0865-14，以1:1,500稀釋)及螢光標記之針對人類

CD4(eBioscience，目錄號17-0048-42，以1:100稀釋)、CD8(BD Biosciences，目錄號564116，以1:400稀釋)、CCR7(BioLegend，目錄號353206，以1:50稀釋)及CD45RA(BD Biosciences，目錄號560675，以1:100稀釋)之抗體染色。使用BD FACSCelesta™流式細胞儀(BD Biosciences)藉由$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞中之CellTrace™ Violet稀釋程度(CellTrace™ Violet dilution)之流動式細胞測量術分析來評估T細胞增殖。使用FlowJo軟體中增殖建模工具中之內建公式計算擴增指數。此外，評定在$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞中之中央記憶型細胞($CCR7^+CD45RA^-$)之百分比。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR以劑量依賴性方式高效增強$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖(圖13)。IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG亦增強$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖，但與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相比顯示效力降低(圖13A，圖13B)。相比之下，IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG、IgG2s-SF2-E345R或IgG1-b12-RR並未增強$CD4^+$或$CD8^+$ T細胞增殖(圖13A，圖13B)。當在較大健康供體PBMC同群中測試IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR增強$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖之能力時，觀察到$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖之一致以劑量依賴性方式增強，對此可計算出EC_{50}(n=17；表7)。

表7：在多株T細胞增殖檢定中之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR增強之CD4+及CD8+ T細胞增殖之EC_{50}值(其於17位健康人類供體之結果)。

供體	EC_{50} CD4+ T 細胞增殖		EC_{50} CD8+ T 細胞增殖	
	pg/ml	nM	pg/ml	nM
1	0.009	0.057	0.028	0.190
2	0.024	0.159	0.029	0.195
3	0.012	0.084	0.013	0.087
4	0.007	0.048	0.007	0.048
5	0.008	0.053	0.009	0.058
6	0.006	0.038	0.008	0.051
7	0.019	0.129	0.041	0.273
8	0.016	0.107	0.005	0.033
9	0.007	0.048	0.008	0.052
10	0.017	0.111	0.016	0.109
11	0.010	0.067	0.014	0.095
12	0.009	0.060	0.009	0.058
13	0.019	0.125	0.052	0.346
14	0.008	0.052	0.008	0.054
15	0.020	0.132	0.018	0.117
16	0.008	0.053	0.011	0.074
17	0.018	0.119	0.017	0.116
平均 EC_{50}	0.013	0.085	0.017	0.115
平均 SD	0.006	0.038	0.013	0.088

為評定CD4+ T細胞之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR增加之增殖是否與CD8+ T細胞之存在有關，或反之亦然，使用CD8+或CD4+ T細胞耗盡之PBMC樣本進行多株T細胞增殖檢定。在CD8+ T細胞不存在下，CD4+ T細胞保留IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之T細胞增殖增加，但在CD4+ T細胞不存在下CD8+ T細胞則無(圖13C，圖13D)。此表明在多株T細胞增殖檢定中，CD4+ T細胞之存在對IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之CD8+ T細胞增殖係不可或

缺的。

此外，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理以劑量依賴性方式增加CCR7$^+$CD45RA$^-$中央記憶型CD4$^+$及CD8$^+$ T細胞之百分比(圖14)。IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG亦以劑量依賴性方式增加中央記憶型CD4$^+$ T細胞之百分比，但與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相比效力降低。相比之下，在用IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、或IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG處理後，未觀察到中央記憶型CD4$^+$ T細胞之百分比有明顯差異(圖14)。

實施例8：抗人類OX40抗體與人類及食蟹獼猴Fcγ受體之結合

使用兩種方法，亦即藉由表面電漿共振(SPR)、及藉由與FcγRIa轉染之ExpiCHO-S細胞結合之抗人類OX40抗體之流動式細胞測量術分析來分析不同抗人類OX40抗體與人類Fcγ受體(FcγR)的結合，該等抗體由具有六聚化增強之突變(E345R)且進一步由活性Fc主鏈、非活性Fc主鏈(L234A-L235A-P329G；LALAPG、或P329R)或顯示無C1q結合及降低之FcγR結合(K322A)之Fc主鏈所組成。

對於前者方法，使用Biacore SPR系統分析OX40-特異性抗體變體IgG1-CD134-003-HC6LC2、IgG1-CD134-003-HC6LC2-E345R、IgG1-CD134-003-HC6LC2-P329R-E345R(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR)、及選擇的其他OX40特異

性抗體(參見圖15至圖16)與人類FcγR變體之結合，並與作為參考樣本之具有野生型Fc結構域(IgG1-b12)之抗HIV gp120抗體進行比較。根據製造商的說明，使用胺偶合及His捕獲套組(Cytiva，目錄號BR100050及目錄號29234602)，用抗His抗體共價塗佈Biacore S系列CM5感測晶片(Biacore Series S Sensor Chips CM5)(Cytiva，目錄號29104988)。接下來，將經His標籤之FcγRIa、FcγRIIa(167-His [H]及167-Arg [R])、FcγRIIb、或FcγRIIIa(176-Phe [F]及176-Val [V])(Sino Biological，分別為目錄號10256-H08S-B、目錄號10374-H08H1、目錄號10374-H27H、目錄號10259-H27H-B、目錄號10389-H27H、及目錄號10389-H27H1-B)在HBS-EP+緩衝液(Cytiva，目錄號BR100669)中可逆地捕獲到抗His晶片表面上，直到達到400 RU的捕獲反應為止。在進行三次HBS-EP+緩衝液循環之後，注射抗體樣本，每個樣本進行12個循環，以生成結合曲線，FcγRIa使用0至3,000 nM之抗體濃度範圍，而其他FcγR使用0至10,000 nM之抗體濃度範圍。將在FcγR塗佈之表面(活性表面)上分析之各樣品亦在用於背景校正之不含FcγR(參考表面)之平行流通槽上分析。藉由使用10 mM甘胺酸-HCl pH 1.5(Cytiva，目錄號BR100354)使表面再生來進行從抗His塗佈之表面的解離。使用Biacore Insight Evaluation軟體(Cytiva)來生成感測器圖，並應用四參數邏輯(4PL)擬合來計算個別人類OX40特異性抗體相對於參考樣本(IgG1-b12)之結合。

對於後者方法，ExpiCHO-S細胞(ThermoFisher，目錄號A29127)係如下經人類FcγRIa瞬時轉染。將ExpiCHO-S細胞(大約3.0 × 10^6個細胞/mL；ThermoFisher Scientific，目錄號A29133)在ExpiCHO™ ExpressionMedium(Thermo Fisher Scientific，目錄號A2910001)中培養。對於各轉染，將10 μg的編碼FcγR1a之DNA混合於0.39 mL的冷的OptiPro™ Serum-Free Medium(OptiPro™ SFM，ThermoFisher Scientific，目錄號A29131)中，且並行地，將0.03 mL ExpiFectamineCHO™試劑(ThermoFisher Scientific，目錄號A29131)添加至0.37 mL的冷OptiPro™ SFM中。然後，將0.4 mL的後者混合物添加至DNA/OptiPro混合物中並在RT下培育1至5 min。接下來，將此混合物滴加至培養之ExpiCHO-S細胞中。在18至22 h的培育之後，每個培養瓶添加0.06 mL的ExpiCHO™ Enhancer(ThermoFisher Scientific，目錄號A29131)及2.4 mL的ExpiCHO Feed(ThermoFisher Scientific，目錄號A29131)。在轉染之後，將細胞在37℃、70%濕度、8% CO_2下同時搖動來培育24 h，然後冷凍於補充有10% DMSO之ExpiCHO™Expression Medium(Sigma-Aldrich，目錄號D2438)中。

將轉染之細胞平板接種於含培養基(RPMI1640，具有L-麩醯胺酸及25mM HEPES [Capricorn Scientific，目錄號RPMI-HA]，補充有50單位青黴素及50單位鏈黴素[pen/strep；Lonza，目錄號17-603E]及10%含鐵之供體牛血清[DBSI；Gibco，目錄號20371-030])之96孔U型底盤

(20,000個細胞/孔；ThermoFisher，目錄號163320)中。接下來，在4℃下將細胞與25 μL的OX40特異性抗體IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-003-HC6LC2、IgG1-CD134-003、或其他OX40特異性抗體之(變體)於FACS緩衝液1中之連續稀釋液(參見圖17；以3倍稀釋步驟方式進行，最終濃度範圍為0.00051至10 μg/mL)進行培育30 min。在培育之後，使用FACS緩衝液1將細胞洗滌兩次，並隨後在4℃下與50 μL的R-PE標記之F(ab')$_2$片段山羊抗人類IgG，F(ab')$_2$片段特異性(Jackson ImmunoResearch，目錄號109-116-097，以1:200稀釋)於FACS緩衝液1中之溶液進行培育30 min。接下來，使用FACS緩衝液1將細胞洗滌兩次，並與30 μL的存活力標誌物ToPro-3(Invitrogen，目錄號T3605，以1:10,000稀釋)於FACS緩衝液1(補充有2 mM EDTA)中之溶液在黑暗中在RT下進行培育20 min。所有樣本均在iQue® 3流式細胞儀(Satorius)上測量。使用FlowJo軟體分析數據並使用GraphPad Prism將數據視覺化。

在SPR測量中，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示與高親和力受體FcγRIa之殘餘結合低，同時未觀察到此抗體與FcγRIIa(H及R變體)、FcγRII2b、或FcγRIIIa(F及V變體；圖15至圖16)之結合。IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R及IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R顯示與所有測試之FcγR結合，縱然略低於陽性對照IgG1-b12(圖15至圖16)。相比之下，帶有E345R-LALAPG Fc主鏈之後者抗體

之變體顯示未與所測試之任何FcγR結合。使用類似的方法，在高抗體濃度(100 nM [14.9 μg/mL]之上)下觀察到IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與食蟹獼猴FcγRIa的殘餘結合低。

使用FcγRIa轉染之ExpiCHO-S細胞及流動式細胞測量術分析，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示未與FcγRIa結合(圖17A)。觀察到攜帶野生型Fc結構域之抗體變體，包括IgG1-CD134-003-HC6LC2、IgG1-CD134-003、IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-INCAGN1949、IgG1-CD134-IBI101、IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-h3C8-E345R、IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-RG7888-E345R及攜帶E345R-K322A突變之IgG1-CD134-h3C8及IgG1-CD134-RG7888之變體與FcγRIa結合(圖17A，圖17C至圖17E)。觀察到IgG2抗體IgG2-SF2及IgG2s-SF2-E345R、及帶有E345R-LALAPG突變之IgG1-h3C8及IgG1-RG7888之變體未與FcγRIa結合(圖17B，圖17D至圖17E)。

總之，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示與人類IgG Fcγ受體的結合最小(FcγRIa)或沒有結合(FcγRIIa、FcγRIIb、及FcγRIIIa)。

實施例9：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對活化之初代CD4⁺及CD8⁺ T細胞之抗體結合能力

在活化24 h、48 h、及72 h之後定量測定活化之初代人類CD4⁺及CD8⁺ T細胞之細胞表面上的結合位點數量。首

先，根據製造商的說明，藉由使用RosetteSep®人類T細胞富集混合液(Human T Cell Enrichment Cocktail)(StemCell Technologies，目錄號15021)直接從膚色血球層進行負向選擇，接著在Ficoll梯度(PromoCell，目錄號C-44010或Corning，目錄號25-072-CI)上進行密度離心來富集總人類T細胞。將富集之T細胞在PBS(GE Healthcare，目錄號SH3A3830.03或Capricorn Scientific，目錄號SP-2121-500 mL)中洗滌一次，在300×g下離心3 min，並重新懸浮於活化培養基(RPMI-1640培養基[Lonza，目錄號BE12-115F / Capricorn，目錄號RPMI-HA]，補充有10%熱滅活FBS [ATCC，目錄號30-2020]、1% 青黴素/鏈黴素、及1% L-麩醯胺酸[Gibco，目錄號25030-081])中。使用於PBS中之Cellometer ViaStain® AOPI溶液(Nexcelom Bioscience，目錄號CS2-0106)在Cellometer Auto 2000存活力計數器(Nexcelom Biosciences)上計數富集之T細胞，以區分活細胞與死細胞。將細胞沉澱並重新懸浮於活化培養基中。

為誘導T細胞活化，用PBS洗滌抗CD3/CD28磁珠(Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28；ThermoFisher Scientific，目錄號11131D)，並將T細胞及磁珠以1:2磁珠與細胞的比率重新懸浮於活化培養基中。接下來，將300,000個具有磁珠之T細胞(150 μL)平板接種在圓底96-孔盤(ThermoFisher Scientific，目錄號163320)之每孔中，並在37℃、5% CO_2下培育一天、兩天、及三天。接下來，使用Dynal®磁珠分離器(Invitrogen，目錄號

3019669)移出磁珠，此後在活化培養基中洗滌T細胞。將此磁珠移出步驟重複兩次。使用AOPI溶液計數細胞以區分活細胞與死細胞。

根據製造商的說明，使用人類IgG校正物套組(Human IgG Calibrator Kit)(Biocytex，目錄號CP010)及流動式細胞測量術來分析IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合位點數量。將磁珠活化之T細胞平板接種於圓底96孔盤(50,000個細胞/孔；ThermoFisher Scientific，目錄號163320)中。將細胞用PBS洗滌一次及用FACS緩衝液1洗滌一次，並在4℃下與稀釋於FACS緩衝液1中之1 μg/mL(亦即飽和抗體濃度水平)的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR培育30 min。接下來，將每磁珠含有明確數量的人類IgG單株抗體之校正磁珠(包括在套組中)與細胞分開平板接種於FACS緩衝液1(每孔15 μL磁珠)中。在FACS緩衝液1中洗滌之後，將細胞及校正磁珠與表8中所述之抗體組於FACS緩衝液1中在4℃下避光培育30 min。將細胞及磁珠懸浮液均洗滌兩次，並重新懸浮於稀釋於FACS緩衝液1中之80 μL ToPro-3存活力標誌物(1:10,000；Invitrogen，目錄號T3605)中，並在BD FACSCelesta細胞分析儀上測量。使用FlowJo軟體分析數據。使用UltraComp eBEADS(Thermo Fisher Scientific，目錄號01-2222-42)進行補償。代表每個細胞之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合位點數量之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之抗體結合能力(antibody binding capacity, sABC)係藉由使用GraphPad Prism軟體從標準曲線內差來

測定。

表8： 分析在活化之CD4+及CD8+ T細胞子群上IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合位點之抗體組

目標	株	標記	目錄號	供應商	稀釋度
CD4	RPA-T4	太平洋藍	300521	Biolegend	1:200
CD8	SK1	APC-Cy7	557834	BD Biosciences	1:100
山羊抗人類 IgG H(ab')2	n.a.	R-PE	109-116-098	Jackson ImmunoResearch	1:200

就CD4+及CD8+ T細胞而言，與刺激一天相比，在刺激兩天及三天之後，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合位點數量更高(圖18)。此外，在所有時間點上，在CD4+ T細胞上之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合位點數量(亦即sABC)比在CD8+上大約4.5至8.5倍更高(刺激一天及三天，CD4平均sABC分別為11,285及21,682；CD8平均sABC分別為1,322及4,816)。

實施例10：抗人類OX40抗體與表現OX40之活化之T細胞之結合

如實施例9中所述，在T細胞活化後可誘導T細胞上OX40之表現，其中在活化兩天至三天之後觀察到最大表現。此處，使用流動式細胞測量術評定抗人類OX40抗體與經抗CD3/CD28抗體活化之T細胞之結合。

健康人類供體PBMC基本上如實施例7中所述純化。在檢定培養基中將細胞濃度調整至每mL為2×10^6個細胞(最終濃度)，並平板接種於6孔盤(Greiner，目錄號657160)中。將

PBMC用0.3 μg/mL抗CD3(STEMCELL Technologies，目錄號60011)及0.5 μg/mL抗CD28抗體(BioLegend，目錄號302934)進行刺激，並在37℃、5% CO_2下培養兩天。接下來，收獲PBMC，計數，並於FACS緩衝液1(DPBS，含2%熱滅活FBS及2 mM乙二胺四乙酸[EDTA])中調至2×10^6個細胞/mL之濃度。藉由用市售抗OX40抗體染色來確認在刺激之T細胞上之OX40表現(數據未顯示)。將活化之PBMC以每孔1×10^5個細胞轉移至96孔圓底盤中，並與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-IBI101、IgG1-CD134-11D4、IgG1-CD134-RG7888、或非結合對照抗體IgG1-b12-RR(以4倍稀釋步驟進行，最終濃度：0.00061至10 μg/mL)中任一者進行培育。在RT下60 min之後，製備細胞以進行流動式細胞測量術分析。為此，將細胞用150 μL的FACS緩衝液1洗滌兩次，並添加於FACS緩衝液1中之30 μL/孔細胞-表面抗體混合物(表9)，該混合物含有針對人類Fcγ抗體之抗體(表9)及可固定之存活力染料eFluor780(1:1,500)。染色程序係在4℃下避光執行15至20 min。將染色之細胞用120至150 μL FACS緩衝液1(5 min, 460 ×g, RT)洗滌兩次，並重新懸浮於60至100 μL FACS緩衝液1中，直接用於流動式細胞測分析。在FACSymphony A3上擷取流動式細胞測量數據並用FlowJo軟體分析。

表9：用於評定抗人類OX40抗體與活化之人類T細胞之結合的抗體組

目標	株	標記	目錄號	供應商	稀釋度
CD4	SK3	PerCP-eFluor710	46-0047-42	Thermo Fisher Scientific	1:100
CD8α	SK1	APC	345775	BD Biosciences	1:100
CD19	HIB19	BV421	562440	BD Biosciences	1:150
CD56	B159	PE-Cy7	557747	BD Biosciences	1:100
人類 Fcγ	多株	AF488	109-546-098	Jackson	1:500

所有測試之抗人類OX40抗體均以劑量依賴性方式與來自所測試之所有供體之經刺激之CD4⁺及CD8⁺ T細胞結合(代表性供體顯示於圖19中)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與經刺激之T細胞結合之EC_{50}值係在高皮莫耳範圍中，其中平均EC_{50}值為0.140 nM/0.021 μg/mL(CD4⁺ T細胞；表10)及0.159 nM/0.024 μg/mL(CD8⁺ T細胞；表10)。其他抗人類OX40抗體之EC_{50}值有在類似範圍內(IgG1-CD134-11D4)、略微更高(IgG1-CD134-RG7888)、或明顯更高(IgG1-CD134-IBI101)，而IgG1-CD134-RG7888則達到更高的最大結合平台區。

表10：抗人類OX40抗體與活化之人類CD4⁺及CD8⁺ T細胞之結合的EC_{50}值。SD：標準偏差。

	與CD4⁺ T細胞結合 - EC_{50} [pg/mL]				與CD8⁺ T細胞結合 - EC_{50} [pg/mL]			
	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	IgG1-CD134-11D4	IgG1-CD134-RG7888	IgG1-CD134-IBI101	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	IgG1-CD134-11D4	IgG1-CD134-RG7888	IgG1-CD134-IBI101
供體 1	0.0773	0.0800	0.0453	0.101	0.0829	0.0894	0.0627	0.128
供體 2	0.0167	0.0178	0.0292	0.100	0.0163	0.0146	0.0332	1.860
供體 3	0.0187	0.0224	0.0316	0.111	0.0217	0.0295	0.0398	0.192
平均值	0.0709	0.0734	0.0354	0.104	0.0736	0.0778	0.0451	0.727
SD	0.0056	0.0062	0.0087	0.0056	0.0085	0.0125	0.0156	0.962

此等結果指示，相對於基準OX40促效性抗體，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合OX40表現之活化之人類T細胞具有類似(IgG1-CD134-11D4)或更高的表觀親和力(IgG1-CD134-RG7888, IgG1-CD134-IBI101)。

實施例11：在可溶性OX40L存在下IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與人類OX40之結合

除彼等的膜結合形式之外，OX40及OX40L還均以可溶性形式存在(sOX40及sOX40L)，先前已將該等可溶性形式與自體免疫疾病連繫起來。此等可溶性形式之生物活性性質由報告所支持，即sOX40可與膜表現之OX40競爭OX40L交互作用。此可抑制發炎反應，且因此模擬Treg功能 Laustsen et al. Arthritis Res Ther. 2014 Oct 30; 16(5):474)。

目前臨床開發中大多數促效性OX40抗體均與OX40L(OX40之天然配體)相同之區域結合，且抗體與此區結合已與強的OX40促效劑及抗腫瘤活性相關聯(Zhang et al. 2019. Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. Cell Rep 27：3117-3123 e3115)。在可溶性OX40L(sOX40L)存在下測試IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與表現在活化之T細胞上之人類OX40之結合，反之亦然。

為確定sOX40L與活化之人類$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞結合

之飽和濃度，並評估在此飽和濃度的sOX40L存在下IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合，將人類PBMC用抗CD3/CD28磁珠刺激兩天(基本上如實施例9中所述，此處不同之處在於使用6孔盤[Greiner，目錄號657160]及含有5%匯集之人類血清之IMDM培養基[PHS, One Lambda Inc.，目錄號A25761])。將刺激之PBMC沉澱，重新懸浮於FACS緩衝液2(DPBS，含2%熱滅活FBS [Sigma-Aldrich，目錄號F7524]及2 mM EDTA [Sigma-Aldrich，目錄號03690])中，並接種(100,000個細胞/孔)於圓底96孔盤(VWR International GmbH，目錄號734-197)中。接下來，將細胞與以0.00017至30 μg/mL之最終濃度範圍(對於刺激之細胞為於FACS緩衝液2中之三倍稀釋步驟進行，或對於未刺激之細胞為30 μg/mL)之鼠Fc標籤之人類sOX40L(Sino Biological，目錄號13127-H04H)在RT下培育30 min以判定sOX40L之飽和結合濃度，或在2 μg/mL sOX40L存在或不存在下與以0.00046至10 μg/mL之最終濃度範圍(在第一步驟中稀釋10倍，隨後為於FACS緩衝液2中之三倍稀釋步驟進行)之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-b12-RR抗體在RT下培育30 min以判定結合競爭。接下來，將細胞用150 μL的FACS緩衝液2洗滌兩次並單獨或與AF488共軛之山羊抗人類IgG F(ab')2二級抗體(以1:500稀釋於FACS緩衝液2中；Jackson ImmunoResearch，目錄號109-546-098)一起在30 μL的APC共軛之山羊抗小鼠IgG F(ab')2二級抗體(以1:1,000稀釋於FACS緩衝液2中；Jackson

ImmunoResearch，目錄號115-135-164)中在4℃下避光培育20 min。接下來，將細胞在FACS緩衝液中洗滌兩次，並與表11中所述稀釋於FACS緩衝液2(含有1:1,500 Fixable Viability Stain eFluor 780)中之30 μL的抗體組在4℃下避光培育20 min。隨後將細胞用120至150 μL的FACS緩衝液2洗滌兩次，並使用BD高通量取樣器(BD High Throughput sampler)在BD FACSCelesta流式細胞儀上測量並使用FlowJo軟體進行分析。

表11：用於染色CD4+及CD8+ T細胞之抗體組

目標	株	標記	目錄號	供應商	稀釋度
CD4	SK3	BV421 BV605	565997 564116	BD Biosciences BD Biosciences	1:100 1:400

sOX40L之飽和濃度測定為2 μg/mL。在2 μg/mL sOX40L存在下，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與OX40之最大結合未受阻礙(圖20A)，儘管在sOX40L存在下，與CD4+及CD8+ T細胞結合之EC_{50}值大約三倍更高(表12)。相反地，在IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR存在下，sOX40L結合以劑量依賴性方式喪失(圖20B)，指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR可能阻斷sOX40L之結合。此表明OX40L及IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合OX40上之重疊結構域，但OX40L之存在對IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合影響甚微(但反之並非如此)。

表12：在可溶性OX40L存在下IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與活化之T細胞之結合，且反之亦然。

	n	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 結合 平均 EC_{50} ± SD (μg/mL) n)		平均 EC_{50} ± SD (nM)	
		$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	3	0.019 ± 0.009	0.017 ± 0.004	0.130 ± 0.058	0.114 ± 0.029
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR + 2 μg/mL sOX40L	3	0.054 ± 0.022	0.038 ± 0.009	0.359 ± 0.150	0.254 ± 0.061
		sOX40L 結合 平均 EC_{50} ± SD (μg/mL) n)			
		$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR + 2 μg/mL sOX40L	3	0.086 ± 0.014	0.084 ± 0.005	0.579 ± 0.094	0.561 ± 0.037

實施例12：在Fcγ受體表現之細胞不存在或存在下抗人類OX40抗體之促效劑活性

在實施例6中，描述使用經人類OX40轉染之Jurkat細胞進行的檢定，以研究不同抗人類OX40抗體之效力。此處，使用相同檢定，同時研究在FcγR表現之細胞存在或不存在下，對於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及下列之其變體誘導OX40促效劑活性之效力：具有Fc活性主鏈(IgG1-CD134-003；SEQ ID No 9及10)、或具有如由SEQ ID NO：2所列之恆定區所示之帶有六聚化增強之突變E345R之Fc主鏈、或具有如由SEQ ID NO：62所列之恆定區所示之帶有Fc惰性突變L234F、L235E、及D265A(F405L突變除外，其促進半分子與另一帶有K409R突變之半分子之異二聚化)(Labrijn et al. Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. PNAS 2013; 110(13):5145-50)之Fc主鏈。在一組單獨的實驗中，評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-11D4、IgG1-RG7888、及IgG1-CD134-IBI101誘導OX40促效劑活性之效

力。在本文中所述之實驗中，使用非結合對照抗體IgG1-b12-RR作為陰性對照。

該檢定基本上如實施例6中所述進行，但有些許不同之處：此處，OX40表現之Jurkat細胞係在轉染表現人類Fcγ受體2B之CHO-K1細胞(Promega，目錄號JA2255；FcγRIIb-CHO K1細胞)存在或不存在下用抗人類OX40抗體進行刺激。將FcγRIIb-CHO K1細胞之小瓶解凍並將細胞懸浮於14.5至29 mL的RPMI 1640培養基(隨Promega套組提供，目錄號JA2191)中，該培養基補充有5%胎牛血清(FBS，隨Promega套組提供，目錄號JA2191)。將細胞以每孔100 μL平板接種於96孔白色平底檢定盤(Fisher Scientific，目錄號10072151)中。在5至6 h的培育(37℃，5% CO_2)之後，將孔中之培養基丟棄且每孔添加60 μL的OX40表現之Jurkat效應細胞(在有或沒有FcγRIIb-CHO K1細胞之情況下)，並培育16至20 h(37℃，5% CO_2)。此外，此處使用CLARIOstar® Plus微量盤式讀取器(microplate reader)(BMG Labtech)測量發光。數據係用S型、4PL、X為對數(濃度)方程式進行擬合，並在使用GraphPad Prism軟體生成之線圖中以RLU之形式呈現。EC_{50}值係源自擬合曲線。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導有效劑量依賴性OX40促效劑活性，與經由FcγRIIb表現之細胞的Fc嚙合無關(圖21A)。在FcγRIIb表現之細胞不存在下，強OX40促效劑活性僅在含有六聚化增強之突變之抗人類OX40抗體

(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 及 IgG1-CD134-003-E345R)觀察到，而沒有六聚化增強之突變之抗人類OX40抗體(IgG1-CD134-003及IgG1-CD134-003-FEAL)僅誘導非常弱的OX40訊息傳導。FcγRIIb表現之細胞之存在明顯增強FcγR結合抗人類OX40抗體(IgG1-CD134-003及IgG1-CD134-003-E345R)之OX40訊息傳導活性，而添加FcγRIIb表現之細胞不會增加或僅略微增加具有惰性Fc主鏈之抗人類OX40抗體(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-CD134-003-FEAL)之活性。

與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相反，在所述檢定中，抗人類OX40抗體IgG1-CD134-11D4、IgG1-RG7888、及IgG1-CD134-IBI101僅在Fcγ表現之細胞存在下誘導OX40促效劑活性，且不存在時則否(圖21B)。

總之，與缺乏六聚化增強之突變之其他抗人類OX40抗體相反，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導有效的劑量依賴性OX40促效劑活性，其與FcγR表現之細胞無關。

實施例13：在與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR培育後T細胞活化標記之表現

使用實施例7中所述之T細胞增殖檢定，研究在將健康人類供體PBMC與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR培育之後，T細胞活化相關之細胞表面表現之標誌物之表現。此外，評定OX40促效性參考抗體類似物IgG1-CD134-BMS986178、IgG1-CD134-RG7888、及IgG1-CD134-

IBI101增強T細胞活化相關之細胞表面表現之標誌物之表現的效力。為測量CD4+及CD8+ T細胞上4-1BB、CD25、HLA-DR、及PD-1之表現水平，洗滌細胞並在含30 μL的FACS緩衝液之96孔圓底盤(VWR International，目錄號734-1797)中用滴定量的抗體(表13)、Viability Dye eFluor 780(1:1,500；ThermoFisher Scientific，目錄號65-0865-14)及brilliant stain buffer plus(1:10；BD Biosciences，目錄號566385)對CD4、CD8、4-1BB、CD25、HLA-DR、PD-1、以及存活力進行染色。染色程序係在4℃下避光執行15 min。然後將細胞用150 μL的FACS緩衝液洗滌兩次，並重新懸浮於60至100 μL的FACS緩衝液中，以進行流動式細胞測量術分析。流動式細胞測量數據係使用BD High Throughput取樣器在BD FACSymphony A3流式細胞儀上擷取。使用FlowJo判定在CD4+及CD8+ T細胞群體內表現活化標誌物4-1BB、CD25、HLA-DR、及PD-1之細胞百分比，並使用GraphPad Prism以線形曲線呈現。

表13：用於評定T細胞活化相關之標誌物之表現水平之抗體組。

目標	株	標記	目錄號	供應商	稀釋度
CD4	OKT4	APC	17-0048-42	ThermoFisher Scientific	1:100
CD8α	SK1	BV605	564116	BD Biosciences	1:400
4-1BB	4B4-1	BV711	740798	BD Biosciences	1:80
CD25	2A3	BUV395	564034	BD Biosciences	1:80
HLA-DR	L243	PE-Cy7	307616	Biolegend	1:50
PD-1	EH12.2H7	AF488	329936	Biolegend	1:50

在IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR培育之兩天及五天之

後，分析活化標誌物之表現。在所有供體中，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR以劑量依賴性方式增加$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖，如在第五天之評定(數據未顯示)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在第二天或第五天、或這兩天均誘導表現4-1BB、CD25、及HLA-DR之$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞之百分比以劑量依賴性方式增加，但PD-1在大多數分析之供體中則無(圖22A至圖22H)。

與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相反，測試之OX40促效性參考抗體類似物IgG1-CD134-RG7888、IgG1-CD134-BMS986178及IgG1-CD134-IBI101並未增加表現4-1BB、CD25或HLA-DR之$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞之百分比(圖22I至圖22P)。

實施例14：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在使用健康人類供體PBMC之多株活化之T細胞增殖檢定中增強細胞介素分泌

在培養1、2、3、4、及/或6天之後，從多株T細胞增殖檢定(大致的檢定設置描述實施例7中；細胞係用CellTrace Violet [使用CellTrace™ Violet Kit，Thermo Fisher Scientific，目錄號C34557]或CFSE [使用Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit，Life Technologies，目錄號No. V12883]進行染色)中收集之上清液中的細胞介素濃度係按照製造商的規程藉由多重ECLIA(multiplexed ECLIA)使用V-Plex Proinflammatory Panel 1 Human Kit(如10-plex：

IFN-γ、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL 10、IL 12p70、IL-13及TNF-α；MSD，目錄號K15049D-2)或V-PLEX Human Proinflammatory Panel I Kit(4-plex：IFN-γ、IL-1β、IL-6及TNF-α，MSD，目錄號K15052D-2)來測定。簡而言之，在用150 μL的PBST(DPBS，含0,05% Tween® 20 [Sigma-Aldrich，目錄號P7949])洗滌MSD盤之後，將標準品或樣本(以1:2至1:200稀釋)添加至孔(50 μL/孔)中並將盤在RT下持續搖動培育2 h。將盤用PBST洗滌3次，並添加偵測抗體(25 μL/孔)。在RT下持續搖動培育2 h之後，將盤用PBST洗滌3次。隨後，添加讀取緩衝液(150 μL/孔)並立即將盤在MESO QuickPlex SQ 120讀取器上分析。此外，按照實施例7中所述之程序，在培養四天之後，從提及之多株T細胞增殖檢定(其中$CD4^+$或$CD8^+$ T細胞被耗盡)收集的上清液中測定細胞介素濃度。此外，在培養四天之後將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導細胞介素分泌之能力與抗人類OX40抗體IgG1-h3C8-K322A-E345R、IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG、IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R、IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG、及IgG2s-CD134-SF2-E345R進行比較。將非結合抗體IgG1-b12-RR用作為陰性對照。結果使用GraphPad Prism以線圖呈現。

在所有供體中，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR以劑量依賴性方式增加$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖(數據未顯示)。在動力學實驗中，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在IgG1-

CD134-003-HC6LC2-RR之最高測試濃度(0.2及2 μg/mL)下增強細胞介素分泌，TNFα為三至四天之後(圖23A)，IL-2為兩天之後(接著在第三天至第六天相對快速下降(圖23B)，而IFNγ(圖23C)及IL-13(圖23D)為兩天之後。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在第四天時在$CD8^+$ T細胞耗盡之PBMC中誘導TNFα、IFNγ、及IL-13分泌增加，而此等細胞介素在$CD4^+$ T細胞耗盡之PBMC中不分泌或僅略微分泌(圖24)。

如與IgG1-CD134-h3C8及IgG1-CD134-RG7888(帶有K322A-E345或E345R-LALAPG突變)、及IgG2s-CD134-SF2-E345R之變體相比，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導更高的TNFα、IL-2、及IL-13細胞介素水平，同時IFNγ觀察到類似的趨勢，儘管在後者情況下，在二重複測量之間存在相對大的差異(圖25，26，27)。

總而言之。此處所述之結果指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在使用健康人類供體PBMC之多株T細胞增殖檢定中增強促發炎細胞介素釋放，此取決於$CD4^+$ T細胞之存在。此外，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在此檢定中比其他測試之六聚化增強之抗人類OX40抗體(亦即IgG1-CD134-h3C8、IgG1-CD134-RG7888、及IgG2s-SF2之變體)更有效增強細胞介素分泌。

實施例15：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在抗原特異性T細胞增殖檢定中增強$CD8^+$ T細胞增殖之能力

使用受同源抗原刺激之T細胞藉由流動式細胞測量術來研究IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對增加$CD8^+$ T細胞增殖之能力。將用OX40及辨識由主要組織相容性I型(MHC-I)分子所呈遞之CLDN6衍生之肽的TCR電穿孔之人類$CD8^+$ T細胞與用人類全長CLDN6電穿孔之自體未成熟moDC(iDC)進行共培養。

PBMC係藉由Ficoll-Paque密度梯度分離(基本上如實施例7中所述並用於細胞分離)從健康人類供體獲得之膚色血球層單離。在細胞分離之前，藉由流動式細胞測量術確認PBMC為HLA-A*02陽性。取決於可用性，使用MACS管柱或AutoMACS Pro Separator(皆為Miltenyi Biotec GmbH)進行細胞分離。使用CD14磁性微珠(Miltenyi Biotec GmbH，目錄號130-050-201)從新鮮地單離之PBMC正向選擇$CD14^+$單核球及負向選擇$CD14^-$周邊血液淋巴球(PBL)。使用CD8磁性微珠從先前冷凍之PBL單離$CD8^+$ T細胞。分離程序大致上根據製造商的說明執行，其中有些微修改(將微珠之體積降低；每10^7個細胞為12 μL磁珠)且原則上與$CD14^+$/$CD14^-$細胞之分離及$CD8^+$ T細胞之單離相同。

該單離之$CD14^+$單核球經分化成iDC。為此，將每個T175懸浮液培養燒瓶(Greiner Bio-One GmbH，目錄號661195)中之至多40 × 10^6個$CD14^+$單核球於DC培養基(RPMI 1640，5% PHS、1× 最低必需培養基非必需胺基酸[MEM-NEAA；Life Technologies GmbH，目錄號11140-035]、1 mM丙酮酸鈉[Life Technologies GmbH，目錄號

11360-039])中在培育箱(37℃，5% CO_2)中培養五天，該DC培養基含有200 ng/mL GM-CSF(Miltenyi Biotec GmbH，目錄號130-093-868)及200 ng/mL IL-4(Miltenyi Biotec，目錄號130-093-924)。在培養三天之後，將每個燒瓶中之一半培養基更換。由於從燒瓶中取出的培養基中含有非黏附的單核球，所以將培養基離心(8 min, 300×g, RT)，丟棄上清液，將細胞沉澱物重新懸浮於新鮮的DC培養基中，然後與200 ng/mL GM-CSF及200 ng/mL IL-4(最終濃度)一起倒回原來的燒瓶中。在五天之後，藉由與含有2 mM EDTA之10 mL的DPBS在37℃下培育10 min來將黏附的細胞從細胞培養瓶上脫離，並與非黏附細胞收穫在一起後再進一步使用。用DPBS洗滌iDC(8 min, 300×g, RT)，計數並冷凍保存於含有10% DMSO(AppliChem GmbH，目錄號A3672,0100)之FBS(Sigma-Aldrich，目錄號F7524)中或重新懸浮於X-VIVO 15培養基中以用於直接電穿孔。

使用ECM 830 Electroporation System將單離自PBL之$CD8^+$ T細胞及iDC電穿孔。$CD8^+$ T細胞係用編碼CLDN6特異性TCR之α及β鏈之RNA(各10 μg，TCR#12α、TCR#12β)及10 μg的OX40編碼之RNA進行電穿孔。iDC係用2 μg的編碼CLDN6之RNA或不用RNA(作為模擬對照)來進行電穿孔(表14)。

表14：用於電穿孔之RNA

RNA	說明
CLDN6	編碼人類CLDN6之RNA（GRCh37/代碼nc002cm.5）
OX40	編碼人類OX40之RNA (UniProt P43489)
TCRα12α	編碼CLDN6特異性TCR α鏈之RNA (WO 2015 150327)
TCRα12β	編碼CLDN6特異性TCR β鏈之RNA (WO 2015 150327)

iDC之電穿孔通常以5 × 10^6個細胞在250 µL X-VIVO 15培養基中執行。T細胞係在250 µL X-VIVO 15培養基中以10至15 × 10^6個細胞之更高細胞密度進行電穿孔。在RT下將細胞移液到比色管(4.0 mm間隙大小；VWR International，目錄號732-0023)。將RNA添加至細胞中並藉由抽吸來混合。在混合之後立即進行電穿孔，T細胞為500 V、3 ms、及1個脈衝而iDC為300 V、12 ms、1個脈衝。在電穿孔之後立即將750 µL預熱之檢定培養基(IMDM, 5% PHS)添加至細胞中。為評估電穿孔效率，將每孔2.5 × 10^5個iDC及每孔2至3 × 10^5個$CD8^+$ T細胞(未電穿孔之細胞及電穿孔後CFSE染色，見下文)在含150 µL檢定培養基之96孔圓底盤中培養。將剩餘的iDC轉移至6孔盤(Greiner，目錄號657160)中並在每6孔3 mL檢定培養基中培養O/N並電穿孔(37℃，5% CO_2)。將電穿孔之T細胞轉移至15 mL試管中並在用CFSE標記前培育至少2 h(37℃，5% CO_2)。

使用Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit(Life Technologies GmbH，目錄號V12883)將電穿孔之$CD8^+$ T細胞用CFSE標記。將CFSE以9 mM之儲備濃度溶解在DMSO中並以等分試樣儲存在-20℃下。將PBMC用DPBS(8 min,

300×g, RT)洗滌。將沉澱物以20 × 10^6個細胞/mL之濃度重新懸浮於DPBS中。添加相同體積的1.6 μM CFSE溶液(從儲備溶液中以DPBS稀釋)。將細胞在培育箱(37℃, 5% CO_2)中培育10 min。藉由添加兩倍過量體積的FBS(Sigma-Aldrich，目錄號F7524)來停止標記反應，接著在RT下靜置2 min。為洗滌細胞，將細胞懸浮液之體積用檢定培養基補足，接著離心(8 min, 300×g, RT)。在CFSE標記之後，按電穿孔來將細胞重新懸浮於3 mL檢定培養基中，轉移至6孔盤中並培養O/N(37℃, 5% CO_2)。

在O/N培育之後，收穫電穿孔之iDC及CFSE標記之$CD8^+$ T細胞，並使用C-Chip細胞計數腔室(cell counting chamber)及赤蘚紅(erythrosine) B溶液來計數。將濃度調整至於檢定培養基中之1.5 × 10^6個T細胞/mL及1.5 × 10^5個iDC/mL。將$CD8^+$ T細胞及iDC以10:1比率(每孔7.5 × 10^4個T細胞及7.5 × 10^3個iDC)接種在96孔圓底盤中。對於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR劑量反應分析，製備IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR的連續稀釋液(0.0003至10 μg/mL，最終濃度)。IgG1-b12-RR係用作非結合對照抗體，其濃度與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相同。將稀釋之抗體添加至接種之細胞中。視需要添加檢定培養基以達到每孔中總體積為150 μL。將盤在振動平台上溫和搖動(150 RPM, 1 min)並培養四天(37℃, 5% CO_2)。藉由流動式細胞測量術分析細胞之增殖，如下所述。

對於細胞增殖，將培養之細胞用CD8抗體(BD

Biosciences，目錄號564116；稀釋度1:400)及Fixable Viability Dye eFluor780(ThermoFisher Scientific，目錄號65-0865-14；1:1,500)在含30 μL的FACS緩衝液之96孔圓底盤中進行染色。染色及洗滌程序係如實施例10中所述執行。流動式細胞測量數據係使用BD™ High Throughput取樣器在BD FACSCelesta流式細胞儀上擷取。流動式細胞測量術數據係用FlowJo軟體分析。

使用GraphPad Prism軟體將擴增指數與對應的抗體濃度作圖，並將數據用「S型、4PL、X為對數(濃度)方程式」進行擬合。EC_{50}值係源自擬合曲線。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導純化之CFSE標記之OX40-及CDLN6-TCR-電穿孔之$CD8^+$ T細胞之增殖以劑量依賴性方式增加，該等細胞係與自體CLDN6-電穿孔之iDC共培養四天(圖28A)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在抗原刺激存在下僅增加$CD8^+$ T細胞增殖，確認TCR活化係OX40共刺激之先決條件，且IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR未誘導靜置T細胞之增殖(圖28B)。

實施例16：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與FcγRIa表現之人類單核球衍生之M2c樣巨噬細胞之結合

為評估如藉由SPR偵測之實施例8中所述之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與FcγRIa之最小結合是否可能具有生物學相關性，藉由流動式細胞測量術評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與由人類單核球衍生之M2c樣巨噬細胞在

生理上表現之FcγRIa之結合。

為此，根據製造商的說明，在淋巴細胞分離培養基(Lymphocyte Separation Medium)(Promocell，目錄號C-44010)上藉由密度梯度離心(以800×g進行20 min，使用低速煞車)，從在LeucoSep™試管(Greiner，目錄號227290)中之健康人類供體(Sanquin血液供應基金會，荷蘭)之膚色血球層純化人類周邊血液單核細胞(PBMC)。將PBMC層小心轉移至50 mL試管中，並用過量體積的PBS(HyClone，目錄號SH3A3830.03)洗滌。純化之PBMC係藉由離心(在300×g進行10 min)沈澱、洗滌及重新懸浮PBS中，並使用於PBS中之Cellometer ViaStain™ AOPI染色液(AOPI Staining Solution)(Nexcelom Bioscience，目錄號CS2-0106)在Cellometer Auto 2000存活力計數器(Nexcelom Biosciences)上計數，以區分活細胞與死細胞。

根據製造商的說明書，使用CD14 MicroBead(Miltenyi Biotec，目錄號130-050-201)藉由正向選擇從PBMC純化人類單核球。計數$CD14^+$細胞並以1.0×10^6個細胞/mL之密度重新懸浮於CellGenix® GMP DC培養基(CellGenix，目錄號20801-0500)中，該培養基補充有50 ng/mL巨噬細胞群落刺激因子(M-CSF；Gibco，目錄號PHC9501)。

對於單核球向M2c樣巨噬細胞之極化，將純化之單核球平板接種於含M-CSF補充之CellGenix GMP DC培養基(CellGenix，目錄號20801-0500)的具有UpCell™表面(UpCell™ Surface)之100 mm^2 Nunc™培養皿(8×10^6個細胞

/培養皿，密度為1.0 × 10^6個細胞/mL；Thermo Fisher Scientific，目錄號174902)中。將細胞在上文提及之培養基中培養(37℃/5% CO_2) 7天，接著於CellGenix GMP DC培養基中培養3天，該CellGenix GMP DC培養基補充有50 ng/mL M-CSF、50 ng/mL介白素(IL)-4(R&D Systems，目錄號204-IL)、及50 ng/mL IL-10(R&D Systems，目錄號1064-IL/CF)。在培養十天之後，將培養皿在RT下放置40至60 min使巨噬細胞從培養皿表面脫離。藉由離心(在300×g下進行5 min)使脫離之巨噬細胞沉澱，計數並以1.5 × 10^6個細胞/mL之密度重新懸浮於CellGenix GMP DC培養基中。

單核球衍生之巨噬細胞之M2c樣表型，及彼等伴隨的FcγRIa表現係藉由流動式細胞測量術確認。將細胞平板接種於96孔圓底盤(75,000個細胞/孔；Thermo Fisher Scientific，目錄號163320)中，離心、並於FACS緩衝液中洗滌兩次。接下來，將細胞與50 µL的FITC標記之抗人類CD64(FcγRIa)抗體(BioLegend，目錄號305006；以1:25稀釋)或與50 µL的用於人類M2c巨噬細胞表徵之抗體混合物(表15)於FACS緩衝液中在4℃下避光培育30 min，且隨後在FACS緩衝液中洗滌兩次。

目標	標記	株	同型	供應商	目錄號	稀釋度
Human CD163	BV421	GHI/61	小鼠 IgG1, κ	Biolegend	333612	1:200
Human CD206	BV711	15-2	小鼠 IgG1, κ	Biolegend	321136	1:200

表15：用於確認M2c表型之抗體組

接下來，將與用於M2c表徵之抗體進行培育的細胞重新懸浮於100 µL的補充有存活力標誌物7-AAD(7胺基放線

菌素D；BD Pharmingen，目錄號68981E；以1:240稀釋)之FACS緩衝液中，並在BD FACSymphony™細胞分析儀(BD Biosciences)上測量。將與FcγRIa抗體進行培育的細胞重新懸浮於100 μL的補充有存活力標誌物DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚；BD Pharmingen，目錄號564907；以1:5,000稀釋)之FACS緩衝液中，並在BD LSRFortessa™細胞分析儀上測量。

為評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合，將單核球衍生之巨噬細胞平板接種於96孔圓底盤(75,000個細胞/孔)中，使用FACS緩衝液洗滌兩次，並與50 μL的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-b12、或IgG1-b12-RR於CellGenix GMP DC培養基(最終抗體濃度為10 μg/mL)中在37℃/5% CO_2下進行培育15 min或24 h。接下來，將細胞使用FACS緩衝液洗滌兩次，並與50 μL的R-PE共軛之山羊抗人類IgG F(ab')2(Jackson ImmunoResearch，目錄號109 116 097；以1:200稀釋)於FACS緩衝液中在4℃下進行培育30 min。在於FACS緩衝液中洗滌兩次之後，將細胞重新懸浮於100 μL的補充有存活力標誌物DAPI(BD Pharmingen，目錄號564907；以1:5,000稀釋)之FACS緩衝液中，並隨後在BD LSRFortessa細胞分析儀上測量。

將IgG1-b12(其具有野生型Fc結構域)包括在內以作為與M2c樣巨噬細胞結合之陽性對照，且將Fc惰性IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。在培育15 min及24 h之後，IgG1-b12顯示與FcγRIa表現之M2c樣巨噬細胞有效結合，

但IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-b12-RR在所測試之三個供體中任一者之任一時間點均未觀察到結合(圖29)。此外，未觀察到由IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與由食蟹獼猴單核細胞所表現之食蟹獼猴FcγR1a的結合(數據未顯示)。因此，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR被認為在生理環境中無法結合FcγRIa。

實施例17：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與新生兒Fc受體之結合

在pH 6.0及pH 7.4下藉由SPR體外評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與固定化新生兒Fc受體(FcRn)之結合。將重組His標籤之FcRn蛋白質(SinoBiological，目錄號CT009-H08H-B)之等分試樣稀釋於PBS-P+緩衝液pH 7.4(Cytiva，目錄號28995084)中或於pH調整至6.0之PBS-P+緩衝液(藉由添加鹽酸[Sigma-Aldrich，目錄號30721-M])中並使用以將FcRn蛋白質捕捉至抗His抗體塗佈之感測器晶片之表面上，其使用10 μL/min之流速及60秒之接觸時間。此導致捕捉之水平範圍為35至60 RU。

在三次pH 6.0或pH 7.4 PBS-P+緩衝液之啟動循環之後，注射抗體之濃度系列(6.25至100 nM，在pH 6.0或pH 7.4 PBS-P+緩衝液中以兩倍稀釋步驟進行)，以生成之結合曲線。將在具有捕捉之FcRn之表面(活性表面)上分析之各樣品亦在用於背景校正之無捕捉之FcRn(參考表面)之平行流通槽上分析。將含有HBS-EP+作為(模擬)分析物之第三

啟動循環之訊號從其他感測器圖中減去，以產生雙重參考數據。在各循環結束之後，使用10 mM Glycine HCl pH 1.5(Cytiva，目錄號 BR100354)再生表面。使用在Biacore Insight Evaluation軟體(Cytiva)中預先定義之「使用捕捉之多循環動力學(Multi-cycle kinetics using capture)」來分析數據。

在pH 6.0下，觀察到IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與FcRn以劑量依賴性方式結合(圖30A至圖30E)，而在pH 7.4下則未觀察到FcRn結合(圖30F)。此等結果顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在pH 6.0結合FcRn，但在pH 7.4則否，正如IgG1分子所預期。

實施例18：C1q與膜結合IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR結合之評定

為確認缺乏與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之Fc結構域結合之補體，藉由流動式細胞測量術測定C1q與已結合至表現於活化之人類T細胞之膜上之OX40的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合。作為C1q結合之陽性對照，IgG1-CD52-E345R(VH SEQ ID No：64，VL SEQ ID No：68；恆定區SEQ ID No：2)包括攜帶與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相同的六聚化增強之突變，但缺乏Fc惰性突變。將Fc惰性非結合對照抗體IgG1-b12-RR包括在內以作為陰性對照。

在Lymphocyte Separation Medium(Corning，目錄號

25-072-CI)上藉由使用RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail(實施例9)之負向選擇，接著密度離心(800×g，20 min，使用低速煞車)，從健康自願者(Sanquin血液供應基金會，荷蘭)獲得之膚色血球層純化人類T細胞，以上均根據製造商的說明。

將純化之T細胞在PBS(HyClone)中洗滌，沉澱，並重新懸浮於活化培養基(RPMI 1640，含25 mM HEPES及L-麩醯胺酸[Lonza，目錄號BE12-115F]，補充有10% FBS[Sanquin，目錄號K1146)、50單位青黴素及50 μg/mL鏈黴素[Lonza，目錄號DE17-603E]、及1% L-麩醯胺酸[Lonza，目錄號BE17-605E])中。接下來，使用Cellometer ViaStain™ AOPI Staining Solution(Nexcelom Bioscience，目錄號CS2-0106)，在Cellometer Auto 2000細胞存活力計數器(Nexcelom Biosciences)上計數T細胞，以區分活細胞與死細胞。隨後將細胞平板接種在圓底96孔盤(Thermo Fisher Scientific，目錄號170189；3×10^5個細胞/孔於150 μL中)中。為誘導OX40表現，將T細胞藉由與抗CD3/CD28磁珠(Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28；Thermo Fisher Scientific，目錄號11132D)以1:2磁珠與細胞比率在37℃下培育72 h來活化，在培育之後，使用磁鐵將磁珠移出並匯集細胞，在PBS中洗滌一次。並計數。

為評估C1q與細胞結合IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合，將CD3/CD28活化之人類T細胞平板接種於圓底96孔盤(50,000個細胞/孔)中並與IgG1-CD134-003-HC6LC2-

RR、IgG1-CD52-E435R、或IgG1-b12-RR之連續稀釋液(以3倍稀釋步驟進行，最終濃度為0.00051至30 μg/mL)於活化培養基中以80 μL之總體積在37℃進行培育15 min，以使抗體結合至細胞。接下來，添加20 μL的正常人類血清(NHS； Sanquin；最終濃度為20%)作為C1q之來源，並將混合物在冰上進行培育45 min。將細胞用冷FACS緩衝液洗滌兩次，隨後與50 μL的異硫氰酸螢光素(FITC)共軛之兔子抗人類C1q抗體(DAKO，目錄號F0254；以1:100稀釋；最終濃度為20 μg/mL)及人類T細胞表徵用之抗體(表16)於FACS緩衝液中之混合物在4℃下避光培育30 min。

表16：用於T細胞表徵之抗體組。

目標	標記	株	同型	供應商	目錄號	稀釋度
Human CD4	Pacific Blue	RPA-T4	Mouse IgG1, κ	Biolegend	300521	1:200
Human CD8	APC-Cy7	RPA-T8	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	557834	1:100

接下來，將細胞用冷FACS緩衝液洗滌兩次，沉澱，及重新懸浮於80 μL的補充有存活力標誌物TO-PRO™-3 Iodide(Invitrogen，目錄號T3605；以1:10,000稀釋)之FACS緩衝液中。藉由流動式細胞測量術在BD FACSCelesta™細胞分析儀(BD Biosciences)上分析C1q結合。使用GraphPad Prism軟體，使用非線性迴歸分析(具可變斜率之S型劑量反應)來分析結合曲線。在與抗體連續稀釋液之培育步驟之後，評定OX40抗體與活化之T細胞之結合。將細胞用冷FACS緩衝液洗滌兩次，並與50 μL的 R-藻紅素(R-PE)共軛之山羊抗人類IgG F(ab')2(Jackson ImmunoResearch，目錄號109-116-098；以1:200稀釋)及人

類T細胞表徵用之抗體(表16)於FACS緩衝液中之混合物在4℃下避光培育30 min。接下來，將細胞用冷FACS緩衝液洗滌兩次，沉澱，及重新懸浮於80 μL的補充有存活力標誌物TO-PRO™-3 Iodide(以1:10,000稀釋)之FACS緩衝液中。藉由流動式細胞測量術在BD FACSCelesta細胞分析儀上分析抗體結合。使用GraphPad Prism軟體，使用非線性迴歸分析(具可變斜率之S型劑量反應)來分析結合曲線。

藉由流動式細胞測量術確認IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及IgG1-CD52-E345R與活化之$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞之結合(圖31A至圖31C)。雖然C1q有效地結合膜結合之IgG1-CD52-E345R，但在任何測試之抗體濃度下均未觀察到C1q與膜結合之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之結合(圖31D，圖31E)。未觀察到C1q與經IgG1-b12-RR培育之細胞之結合。此等結果指示C1q無法結合膜結合之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR。

為確認IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR未誘導目標非依賴性流體相補體活化(fluid-phase complement activation)，將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在正常人類血清(NHS)中培育，並藉由ELISA測定作為補體活化之量度的C4d之產生。其顯示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在體外未誘導流體相補體活化(數據未顯示)。

實施例19：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及其變體之單價與雙價之評定

為判定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR是否為單價結合或亦可雙價結合至OX40，將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR與活化之T細胞之結合與功能性單價OX40特異性抗體(BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R；其通過親本抗體IgG1-b12-RR-F405L [由SEQ ID No 78、75及71所構成]及IgG1-CD134-003-RR-K409R [由SEQ ID No 63, 21及20所構成]之受控Fab臂交換而生成)之結合進行比較。健康供體T細胞係在體外用抗CD3/CD28磁珠刺激三天以誘導OX40表現。隨後，藉由流動式細胞測量術分析IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、單價結合抗體BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、嵌合對照抗體IgG1-CD134-003、或陰性對照抗體IgG1-b12-RR與活化之$CD4^+$及$CD8^+$之結合。

總人類T細胞係如實施例18中所述藉由直接從膚色血球層之負向選擇來富集。將富集之T細胞於PBS(Capricorn Scientific，目錄號SP-2121-500 mL)中或於補充有2% DBSi(Gibco，目錄號20371-030)及2 mM EDTA(Sigma-Aldrich，目錄號03690)之PBS中洗滌一次或兩次。使用於PBS中之Cellometer ViaStain® AOPI溶液(Nexcelom Bioscience，目錄號CS2-0106)在Cellometer Auto 2000細胞存活力計數器(Nexcelom Biosciences)上計數純化之T細胞，以區分活細胞與死細胞。將T細胞沉澱並重新懸浮於活化培養基中。

如實施例9中所述，使用抗CD3/CD28磁珠

(Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28)藉由CD3及CD28刺激72 h來活化T細胞；ThermoFisher Scientific，目錄號11131D)。活化之T細胞可直接使用或將其冷凍保存於具有L-麩醯胺酸及HEPES(Lonza，目錄號12-115F)之IMDM培養基及防凍冷凍培養基(Lonza；目錄號12-132A)之1:1混合物中，以供進一步使用。

將活化之T細胞接種(50,000個細胞/孔)於圓底96孔盤(Thermo Scientific，目錄號163320)中，用PBS(GE Healthcare，目錄號SH3A3830.03)洗滌一次並用FACS緩衝液洗滌一次。此後，將細胞重新懸浮於50 μL的稀釋於FACS緩衝液中之一級抗體(IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、或對照抗體IgG1-CD134003-RR-K409R、IgG1-b12-RR、及IgG1-CD134-003)(以三倍稀釋步驟進行，濃度範圍為0.0005至10 μg/mL)中，並在4℃下培育30 min，藉由流動式細胞測量術在BD FACSymphony A1細胞分析儀(BD Biosciences)上測量並使用FlowJo軟體分析。

如由gMFI Y-軸(gMFI Y-span)所確定，單價OX40特異性抗體BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R顯示與活化之$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞以劑量依賴性方式結合，與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相比，該BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R抗體與$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞兩者具有較高的最大結合(圖32)。嵌合對照抗體IgG1-CD134-003顯示與$OX40^+$ $CD4^+$及$CD8^+$ T細胞的結合與

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR類似，指示較高的最大結合係由BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R之單價所驅動，而非CDR嵌合特質(chimerism)或在不同Fc主鏈中之功能性不相關的突變。此等數據表明IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR不完全以單價方式結合，還可能以雙價方式結合。

實施例20：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及其單價結合變體之功能比較

如實施例19中所述，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR不完全以單價方式結合，還可能以雙價方式結合。此處，在兩個獨立檢定中比較IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及單價結合變體BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R之功能活性，該兩個獨立檢定亦即基於細胞之OX40報導子檢定及使用健康人類供體PBMC之多株T細胞增殖檢定。

為測量在細胞報導子檢定中之OX40促效劑活性，使用OX40生物檢定(OX40 Bioassay)套組(Thaw and Use Kit；Promega，目錄號JA2191)，其基本上如實施例6中所述。簡而言之，在解凍之後，將$OX40^+$ Jurkat細胞以每孔60 μL平板接種於新的96孔白色平底檢定盤(PerkinElmer，目錄號6005680)中，並培育16至20 h(37℃，5% CO_2)。隔天，在具有5% FBS之RPMI 1640培養基中製備IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、及對照抗體IgG1-CD134-003-RR-K409R、IgG1-

CD134-003、IgG1-CD134-003-FEAL、及IgG1-b12-RR之稀釋液(以三倍稀釋步驟進行，最終濃度0.000457至1 μg/mL)。將20 μL的製備之抗體稀釋系列或僅培養基添加至孔中，並將檢定盤培育5 h(37℃, 5% CO_2)。在培育之後，將檢定盤平衡至RT。隨後，將80 μL的Bio-Glo™螢光素酶檢定基質(Bio-Glo™ Luciferase Assay substrate)添加至各孔中，並將盤在持續搖動下避光培育10 min。使用EnVision多盤式分析儀(EnVision Multiplate Reader)(PerkinElmer)測量發光。數據係在使用GraphPad Prism軟體生成之線圖中以相對發光單位(RLU)呈現。數據係用S型、4PL、X為對數(濃度)方程式進行擬合。

為評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R、及陰性對照抗體IgG1-b12-RR(濃度範圍在0.0015 μg/mL與30 μg/mL之間)在多株T細胞增殖檢定中之能力，遵循實施例7中所述之程序。

在基於細胞之OX40報導子檢定中，BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R誘導之OX40促效劑活性之效力比IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR低大約五倍，指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之最佳促效劑活性係經由其以兩個Fab臂結合之能力來達到(圖33A)。在多株T細胞增殖檢定中，BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R增強$CD4^+$ T細胞增殖(圖33B)，然而，與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相比，需要更高濃度才能達到最大效應。

總而言之，此等結果指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-

RR之最佳生物活性係經由其以兩個Fab臂結合OX40之能力來達到。

實施例21：回應於與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR體外培育之T細胞OX40表現及OX40脫落

使用從健康人類供體獲得之PBMC，在多株T細胞增殖檢定中分析在$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞上之OX40回應於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之表現水平之變化(該多株T細胞增殖檢定大致的檢定設置描述於實施例7中；PBMC係使用CellTrace™ Violet套組[Thermo Fisher Scientific，目錄號C34557；染色說明參見實施例7]用細胞痕量紫色(cell trace violet)或使用Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit [Life Technologies，目錄號V12883；染色說明參見實施例15]之CFSE進行染色)。對於測試供體中之七個，膜表現之OX40係如實施例13中所述在與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR進行培育之二至五天之後藉由流動式細胞測量術測定(抗體染色：APC標記之CD4抗體[ThermoFisher Scientific，目錄號17-0048-42；稀釋度1:100]、BV605標記之CD8α抗體[BD Biosciences，目錄號564116；稀釋度1:400]、PE標記之OX40抗體[BD Biosciences，目錄號340420；稀釋度1:80])，而對於其餘三個供體，表現係在培育之一至四天及六天之後評定(抗體染色：PerCP-eFluor710標記之CD4抗體[ThermoFisher Scientific，目錄號46-0047-42；稀釋度1:100]、PE-Cy7標記之CD8α抗體[TONBO，目錄號60-

0088-T100；稀釋度1:100]、BV421標記之OX40抗體(BD Biosciences，目錄號744881；稀釋度1:80)。在$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞上之OX40表現係在分析幾何平均螢光強度(gFMI)值之一維直方圖中評定。

已在健康供體及患有自體免疫疾病及癌症之患者兩者之血清中偵測到可溶性OX40(sOX40)(Taylor and Schwarz. Identification of a soluble OX40 isoform：development of a specific and quantitative immunoassay. J Immunol Methods 255：67-72)，且被視為藉由阻斷OX40配體(OX40L)與膜結合之OX40的結合而作用為誘餌受體。在測定OX40表現當天，藉由ECLIA評定OX40回應於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR體外處理之脫落。已從多株T細胞增殖檢定中收集的上清液中之sOX40濃度係按照製造商的規程使用U-PLEX Human OX40/TNFRSF4 Assay(MSD，目錄號K151T7K-2)藉由多重ECLIA來測定。簡而言之，將稀釋於稀釋液100之25 μL生物素化抗體添加至MSD Gold Small Spot Streptavidin盤之每孔中，並在RT下培育1 h。將盤用PBST洗滌三次並將標準品或樣本(樣本以1:8稀釋於稀釋液58中)添加至孔(總50 μL/孔)中，並將盤在持續搖動下在RT下培育2 h。將盤用PBST洗滌三次，並添加稀釋於稀釋液3中之偵測抗體(50 μL/孔)。將盤在持續搖動下在RT下培育1 h，並將盤用PBST洗滌三次。隨後，添加Gold Read Buffer B(150 μL/孔),並立即將盤在MESO QuickPlex SQ 120影像儀(MSD)上分析。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR(以0.01 μg/mL或更高之濃度)分別在培育兩天之後在十個供體中之三個的$CD4^+$上、及在培育三至六天之後、或在五天之後在十個供體中之六個的$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞上、或在培育兩至三天之後的$CD8^+$ T細胞上增強CD3誘導之OX40表現(如圖34A中所例示，總共三個供體中有一個具有反應之供體；在額外測試之供體中觀察到供體變異性)。並行地，對所有三個供體測試sOX40釋放，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理隨時間推移以劑量依賴性方式增強上清液中之sOX40濃度，指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導sOX40之連續釋放，該釋放係在第三天開始並持續向上增加直到第六天(圖34B)。儘管觀察到IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR對sOX40偵測ECLIA套組之部分干擾，但在用0.2及2 μg/mL的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理後，清楚偵測到sOX40水平增加。

此等數據表明儘管具有高度供體變異性。但IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR可增強在$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞之膜上之OX40表現，且並行地增強OX40從質膜之脫落。

實施例22：可溶性OX40對IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR促效劑活性之干擾評定

在實施例21中，描述IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR可增強在$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞上之OX40膜表現，且並行地增強OX40從質膜之脫落。此處，研究sOX40對IgG1-CD134-

003-HC6LC2-RR在基於細胞之OX40報導子檢定中對誘導OX40促效作用(參見實施例6)及在多株T細胞增殖檢定中對增加T細胞增殖(參見實施例7)所觀察到之能力之影響。

為研究sOX40之存在是否干擾IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR媒介之OX40促效劑活性，該檢定係在無FcγRIIb-CHO K1細胞下如實施例13中所述進行。在沒有或與sOX40(人類OX40，AcroBiosystems，目錄號OX0-H5224)一起之情況下，添加最終濃度範圍在0.0024至40 μg/mL(1:4連續稀釋)之間的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR及最終濃度範圍在1與1,000 ng/mL(1:10連續稀釋)之間的sOX40，並使用CLARIOstar Plus微量盤式讀取器測量發光。為研究sOX40之存在是否干擾IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR-增加之T細胞增殖，在沒有或與sOX40(0.1 ng/mL至1,000 ng/mL；1:10連續稀釋)一起之情況下添加0.002至40 μg/mL IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-RR(1:4連續稀釋)，進一步按照實施例7中所述之方法，(但省略CD45RA及CCR7染色)進行。

雖然IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之劑量依賴性OX40促效劑活性在低濃度的sOX40存在下仍保留，但在1,000 ng/mL sOX40下觀察到減少，且在100 ng/mL sOX40下觀察到較小程度之減少(圖35)。類似地，在$CD4^+$及$CD8^+$T細胞增殖中之IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之劑量依賴性增加在sOX40至多10 ng/mL之濃度存在下仍保留，而對於IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR濃度上至0.625 μg/mL，

在100 ng/mL sOX40及1,000 ng/mL sOX40下均觀察到$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖的增加降低(圖36)。在與較高測試IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR濃度(≥2.5 μg/mL)進行培育之PBMC樣本中未觀察到受sOX40之干擾。

總而言之，在報導子細胞及多株活化之T細胞中，sOX40對IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR誘導之OX40促效作用之干擾僅在濃度明顯高於預期臨床相關濃度下才觀察到。

實施例23：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之臨床前致免疫性評定

使用擴充智能(augmented intelligence, AI)平台iTope-AI及TCED(Abzena)在電腦模擬中進行IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之重鏈(HC)及輕鏈(LC)之致免疫性評定。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之致免疫性潛力係在體外使用EpiScreen DC:T細胞增殖檢定(Abzena)藉由測量與先前已與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR進行培育的MoDC共培養之人類$CD4^+$ T細胞之增殖來進一步分析。

在電腦模擬中生成與跨越IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR HC及LC之蛋白質序列重疊八個胺基酸的9-mer肽群。使用iTope-AI技術，預測每個9-mer之胺基酸側鏈與全世界發現之46個最常見的人類白血球抗原(HLA)等位基因(HLA-DR、DP及-DQ同種異型)之間的有利交互作用。對於顯示有利交互作用之肽，P1錨定位置指示了其等序列之

第一個胺基酸。對於46種同種異型之各者，個別肽被給予從0(無結合)至3(強結合)之結合評分，且將所有同種異型之彼等分數相加在一起以提供每個9-mer之總體風險評分，稱為位置風險評分(Position Risk Score)。當其等位置風險評分達到1至2、3至5、或6+時，混雜肽(promiscuous peptide)(位置風險評分>0)分別被認為係弱、中等、或強MHC II類結合劑。整個測試蛋白質序列之總評分係藉由將所有個別肽獲得之位置風險評分相加來計算。將與人類蛋白質體之序列完全同源之9-mer肽排除在分析之外乃因T細胞耐受性，種系序列不太可能具有致免疫性潛力。然後可將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之總評分與基準mAb(例如鼠、嵌合、人源化、及人類mAb)觀察到之總評分進行比較。

為評估IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR HC及LC之致免疫性風險，藉由基本局部比對檢索工具(basic local alignment search tool, BLAST)檢索針對TCED中之肽序列詢查該等已識別出之混雜肽，以識別與Abzena先前離體EpiScreen研究中刺激T細胞反應之超過10,000個肽的不相關蛋白質及抗體(亦即T細胞表位)中之任何高序列同源性。

EpiScreen DC:T細胞檢定係藉由測量$CD4^+$ T細胞反應(基於記憶之致免疫性之主要驅動因素)用於評定IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在體外之潛在致免疫性。首先，從英國國家衛生服務輸血服務中心(UK National Health

Service blood transfusion service)同意下獲得之健康供體白血球錐(leukocyte cone)(抽血之後24小時內)中單離PBMC。該等供體係使用序列特異性寡核苷酸(sequence-specific oligonucleotide, SSO) HLA分型方法(VHBio)藉由HLA-DR單倍型(HLA-DR haplotype)來表徵。選擇使用50位健康PBMC供體同群以代表所有已知HLA等位基因，惟HLA-DP(由於其盛行率低且可能表現水平低，所以在選擇中未加以考慮)除外。

在使用前將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR於MoDC培養基(RPMI 1640 [ThermoFisher，目錄號21875-034]，補充有人類血清[HS；VWR，目錄號21001PM])、2-巰基乙醇(2ME；Sigma，目錄號M3148]、L麩醯胺酸[ThermoFisher，目錄號25030-024]、青黴素/鏈黴素[ThermoFisher，目錄號15140-122]、介白素(IL)-4 [Peprotech，目錄號200-04]、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子[GM-CSF; Peprotech，目錄號300-03])中稀釋至0.75 μM(112.5 μg/mL)。作為陽性對照，亦測定T細胞對新生抗原匙孔血藍蛋白(KLH)之反應。KLH(Pierce Life Technologies，目錄號77600)係作為於蒸餾水中之10 mg/mL儲備溶液儲存在−20℃下。將KLH之等分試樣解凍，之後立即在MoDC培養基中稀釋至1 mg/mL。將Herceptin®(賀癌平)(Roche，目錄號HERC/150/1/BG)用作基準抗體(以其低臨床致免疫性而聞名)並作為20 mg/mL儲備溶液儲存在−80℃下，並且在臨用前才解凍及於MoDC培養基中稀釋至125 μg/mL。

為了製備MoDC，根據製造商的說明，用陰性人類單核球純化套組(StemCell Technologies，目錄號19058RF)及自動化細胞純化儀器(RoboSep™ StemCell Technologies)，從供體PBMC純化$CD14^+$單核球。將單核球重新懸浮於MoDC培養基中並以每孔1.5×10^6個平板接種於含2 mL培養基(最終體積)之低結合24孔盤中，並且在37℃下培育。在第二天，用新鮮培養基更換1 mL MoDC培養基來餵養細胞。在第四天，再次用1 mL MoDC培養基餵養細胞，該培養基亦含有下列試劑(最終濃度)：0.3 μM(45 μg/mL) IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、0.3 μM(45 μg/mL)賀癌平(基準抗體)或100 μg/mL KLH(陽性對照)。除添加試劑之外，未處理之對照孔係與含試劑之孔相同方式處理。將細胞培育1 h (37℃/5% CO_2)。在培育之後，添加0.01 μg/mL脂多醣(LPS；Sigma，目錄號L4391)以誘導MoDC成熟。在第五天，收獲成熟之MoDC，計數並使用台酚藍(Sigma，目錄號T8154)染料排除來評定存活力。存活力係表示為未被台酚藍染色之細胞佔總細胞數量之百分比。細胞存活力評定確認IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及KLH及賀癌平對照不影響在EpiScreen分析中使用之MoDC之存活率。然後在用於增殖檢定前，將成熟之MoDC進行γ-輻照(40 Gy)。最後，使用人類$CD4^+$ T細胞富集套組(StemCell Technologies，目錄號19052)及自動化細胞純化儀器從相同供體之PBMC藉由負向選擇來純化自體$CD4^+$ T細胞。

在計數及評定細胞存活力之後，將1×10^6個CD4+ T細

胞以10:1之T:DC比率與1 × 10^5個γ輻照之MoDC於含培養基(RPMI 1640，補充有人類血清、2-巰基乙醇、L-麩醯胺酸)之24孔盤中共培養12天。在第9、10、11及12天，將培養物溫和地重新懸浮並將3 × 100 μL等分試樣各自轉移至圓底96孔中進行脈衝標記(pulse labeling)。將細胞藉由添加100 μL含有1.0 μCi [^{3}H]-胸苷(Perkin Elmer)之培養基並在37℃下培育6 h來進行脈衝，之後使用TomTec Mach III細胞收穫器收穫到過濾墊(filter mats)上。對於各樣本，在MicroBeta Microplate Beta Counter上於ParaLux™低背景計數模式下藉由MeltiLex™(Perkin Elmer)閃爍計數來測定每分鐘計數(counts per minute, CPM)。致免疫性係表示為刺激指數(stimulation index, SI)，各樣本之定義為含有用化合物處理之T細胞之孔的平均CPM/基線之CPM平均值(未處理之對照孔)。

刺激指數(SI)=(平均CPM(處理孔))(平均CPM(未處理孔))

基於先前Abzena執行之分析，建立SI ≥1.90之經驗閾值作為最小訊號雜訊(signal-to-noise)閾值，該閥值允許最大靈敏度且不會偵測到大量偽陽性反應或忽略細微致免疫性事件。在測試供體中，誘導反應高於此閾值之樣本在誘導T細胞免疫反應方面被評為陽性。對於在給定時間點之各樣本，藉由使用未配對兩個樣本司徒頓t-檢定(unpaired two sample student's t-test)，將與試劑裝載之成熟DC樣本進行培育之$CD4^+$ T細胞之三重複CPM與僅與培養基培養之

成熟MoDC進行培育之$CD4^+$ T細胞之三重複CPM進行比較來認定統計上顯著性($P<0.05$)的陽性增殖反應。在時間進程檢定期間至少在一個時間點為陽性($SI \geq 1.90$, $p < 0.05$)之供體被評為陽性供體，且SI平均量值係由陽性供體反應之平均值計算。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR HC序列(攜帶P329R及E345R Fc突變)之iTope-AI分析預測在HC恆定區中總共有12個非種系混雜結合肽，其被分類為強(2)、中等(2)或弱(8) II類MHC結合劑(表17)。P329R突變位在已識別之弱結合劑中之二者中(P1錨定位置C317及K318；表17)，但該等弱結合劑與TCED中之任何已知T細胞均不匹配。此等肽中均不存在E345R突變。此外，12個非種系混雜結合肽中有10個被預測在HC可變結構域(VH)中，其中兩個被預測為中度結合劑，且兩個被預測為強結合劑(表17)。發現在框架(Fw)3中識別之肽(位置風險評分：1)與TCED中之肽同源。總體而言，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR HC之iTope總評分為45。

表17：藉由iTope-AI及TCED分析識別出之非種系混雜IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR HC肽。9-mer肽各自由其P1錨定位置所表示。可變區係根據Kabat編號來編號，接續的恆定區為線性編號。混雜結合肽之位置風險評分被分為弱(1至2)、中等(3至5)及強(6+)親和力結合劑。將從TCED識別之同源肽列出。

P1錨定位置[a]	P1位置[b]	肽序列[c,d]	位置風險評分	TCED同源性[e]	
				同源序列	TCED關鍵錨定位置
27	CDR-H1	FDPSSGYMS	1	無	N.A.
45	Fw2	LEWIGYIDP	1	無	N.A.
47	Fw2	WIGYIDPVF	15	無	N.A.
54	CDR-H2	PGSTYYASW	2	無	N.A.
58	Fw3	YYASWVNGR	4	無	N.A.
59	Fw3	YASWVNGRF	2	無	N.A.
82C	Fw3	LRAEDTATY	1	L-A-D-ATY	1, 7, 9
90	Fw3	YYCARDLRA	13	無	N.A.
92	Fw3	CARDLRAPY	3	無	N.A.
99	CDR-H3	PYSGWGGIN	1	無	N.A.
317	恆定	CKVSNKALR	1	無	N.A.
318	恆定	KVSNKALRA	1	無	N.A.
		iTope-IA總評分[f]	45		

[a] 9-mer肽之第一個胺基酸。

[b] P1位置，可變區根據Kabat編號；恆定區為線性編號。

[c] 加底線之殘基指示位置在根據IMGT定義所定義的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR VH CDR中。

[d] R：在IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR Fc區中之P329R突變；位置係根據Eu編號。

[e] 測試序列之總評分係藉由將所有個別肽獲得之位置風險評分相加來計算。

非種系結合肽之HC TCED預測之總結。將從TCED識別出且具P1>P9>P7錨定位置之同源肽列出。特定「錨定」位置與II類MHC結合之貢獻存在等級之分，其中所觀察之最大效應為P1>P9>P7>P6>P4。

iTope-AI分析預測在IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之LC中存在三個強結合、兩個中等結合、及10個弱結合非種系混雜II類MHC結合肽，均存在於LC(VL)序列之可變結

構域中(表18)。識別出該等預測之肽中有三者(兩個弱結合肽及一個中等結合肽)為TCED中之同源肽。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR LC序列之iTope總評分為74。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之總評分(HC及LC總評分之總和)係119，此與其準人源化mAb一致。

表18：藉由iTope-AI及TCED分析識別之非種系混雜IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR LC肽。9-mer肽各自由其P1錨定位置所表示。可變區係根據Kabat編號來編號，接續的恆定區為線性編號。混雜結合肽之位置風險評分被分為弱(1至2)、中等(3至5)及強(6+)親和力結合劑。將從TCED識別之同源肽列出。

P1錨定位置[a]	P1位置[b]	肽序列[c]	位置風險評分	TCED同源性[e]	
				同源序列	TCED揭錨錨定位置
21	Fw1	ITCQSSQIV	2	無	N.A.
27A	CDR-L1	IVVNNNRLS	17	無	N.A.
31	CDR-L1	NRLSWYQQK	5	N-L-WYQQK	1, 6, 7, 9
32	CDR-L1	RLSWYQQKP	2	--SWYQQKP	4, 6, 7, 9
47	Fw2	LIYDASNLA	29	無	N.A.
49	Fw2	YDASNLASG	3	無	N.A.
50	CDR-L2	DASNLASGV	7	無	N.A.
51	CDR-L2	ASNLASGVP	1	無	N.A.
52	CDR-L2	SNLASGVPD	2	無	N.A.
53	CDR-L2	NLASGVPDR	1	無	N.A.
54	CDR-L2	LASGVPDRF	1	L--GVP-RF	1, 4, 6, 9
88	Fw3	CLGGYDDDA	1	無	N.A.
89	CDR-L3	LGGYDDDAE	1	無	N.A.
98	CDR-L3	NAFGGGTKV	1	無	N.A.
99	CDR-L3	AFGGGTKVE	1	無	N.A.
		iTope-IA總評分[d]	74		

[a] 9-mer肽之第一個胺基酸。

[b] P1位置，可變區根據Kabat編號；恆定區為線性編號。

[c] 加底線之殘基指示位置在根據IMGT定義所定義的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR VL CDR中。

[d] 測試序列之總評分係藉由將所有個別肽獲得之位置風險評分相加來計

算。
[e]非種系結合肽之LC TCED詢查之總結。將從TCED識別出且匹配P1>P9>P7≥P6≥P4錨定位置之同源肽列出。

裝載有IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之成熟MoDC誘導低頻率的陽性T細胞增殖反應(SI ≥ 1.90)，亦即在供體同群中佔8%(4/50)(表19)。此與已知顯示臨床致免疫性低之賀癌平處於相同範圍內(在供體同群中增殖誘導佔8%[4/50])，且低於由Abzena基於在臨床上被認為具有增加之致免疫性風險之蛋白質的歷史EpiScreen數據所設定之10%閾值。將新生抗原KLH包括在內以作為用於致免疫性之陽性對照，其顯示88%陽性反應率。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR及賀癌平之SI平均量值(陽性供體反應之SI平均值)係可相比的(分別為SI = 2.66 ± 0.6，SI = 2.64 ± 0.7)，且相較於KLH(SI=4.6 ± 2.54)較低。

表19：由裝載有IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、賀癌平、或KLH之成熟MoDC所引發之$CD4^+$ T細胞增殖反應程度之總結

樣本	SI平均值	SD	%反應[1]
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	2.66	0.60	8
賀癌平	2.64	0.70	8
KLH	4.60	2.54	88

[1]在至少一個時間點具有T細胞增殖反應之供體之百分比(SI ≥ 1.90，$p < 0.05$，其中SI平均量值係由陽性供體反應之平均值計算)。

總而言之，此等數據指示IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之臨床上致免疫性風險低。亦即在已知臨床上顯示低致免疫性的治療性抗體之範圍內。

實施例24：在小鼠中研究在目標結合不存在下IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之藥物動力學分析

在小鼠中分析抗人類OX40抗體IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在目標結合不存在下之藥物動力學(PK)特徵，並與兩種嵌合對照抗體進行比較，該等兩種嵌合對照抗體或含有惰性突變L234F-L235E-D265A及DuoBody突變F405L、或除DuoBody突變F405R之外還含有與IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR相同之RR Fc突變(分別為IgG1-CD134-003-FEAL及IgG1-CD134-003-RR-K409R)。如實施例5及圖5A中所示，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR不與小鼠OX40結合，因此實驗設計在目標結合不存在下測試提及之抗人類OX40抗體在體內之藥物動力學行為。同樣，IgG1-CD134-003-FEAL及IgG1-CD134-003-RR-K409R不會結合小鼠OX40(數據未顯示)。將雌性嚴重合併免疫缺陷小鼠(SCID小鼠，Envigo；C.B-17/IcrHan®Hsd Prkdcscid)飼養在烏特勒支大學(Utrecht University)的中央實驗室動物研究設施(Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium, GDL)之無菌獨立通風飼養籠(IVC)中，每個飼養籠有五隻小鼠，具有任意提供之無菌食物及水。小鼠在抵達GDL後會接受尾部紋身以供識別的目的。動物實驗的進行符合從指令(2010/63/EU)翻譯之荷蘭動物保護法(WoD)及「癌症研究動物實驗」實務守則(Inspection V&W, Zutphen, The Netherlands, 1999)並取得烏特勒支倫理委員會批准。如由歐盟實驗動物科學協會聯合會(Federation of European

Laboratory Animal Science Associations, FELASA)所定義，動物係根據良好動物規範，在由實驗動物照護評鑑及認證協會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)及ISO 9001:2018所認證之動物設施中飼養及處理。

在10週齡時，對雌性SCID小鼠(每組3隻小鼠)之尾靜脈靜脈內注射60 μL的含有提及之測試及對照抗體(對應於每公斤體重大約0.125、1.25及12.5 mg抗體)之溶液。在抗體投予之後10分鐘、4 h、1天、2天、8天、14天及21天時收集40 μL的血液樣本，從血液樣本收集血漿並儲存在-65℃下直到由ELISA測定總人類IgG濃度。為獲得血漿，將血液收集到Microvette® CB 300 K2 EDTA小瓶(Sarstedt，目錄號16.444.100)中，並在無熱滅活之情況下以14,000×g離心10 min。將96孔MULTI-ARRAY標準盤(MULTI-ARRAY Standard plate)(MSD，目錄號L15XA-3)用於PBS中之2 μg/mL小鼠抗huIgG捕捉抗體(IgG2amm-1015-6A05；Genmab，批號3093-008-EP)在2至8℃下塗佈16至24 h。在將盤用PBS-T(PBS – Lonza，目錄號BE17-156Q –補充有0.05% Tween 20 – Sigma，目錄號 P1379)洗滌以移除未結合之抗體之後，使用於PBS-T中之MSD Blocker A將未佔用之表面用3%(w/v) BSA在RT下阻斷60 ± 5 min，接著用PBS-T洗滌。用於生成參考曲線之校正樣本係藉由在具有IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、IgG1-CD134-003-FEAL或IgG1-CD134-003-RR-K409R之稀釋系列之檢定緩衝液(最終濃度

範圍為0.156至20 μg/mL)中加入2%的Pooled Mouse Plasma K2EDTA(BIOIVT，目錄號MSE00PLK2PNN)來製備。用於確認個別檢定運行之效度的品質控制樣本係藉由將未稀釋之Pooled Mouse Plasma K2EDTA加入涵蓋參考曲線範圍之三種抗體濃度來製備：0.5 μg/mL(低濃度之品質控制；LQC)、1.75 μg/mL(中濃度之品質控制；MQC)及15 μg/mL(高濃度之品質控制；HQC)。

接下來，將塗佈之盤與50 μL的稀釋於檢定緩衝液(1% [w/v] MSD Blocker A [Meso Scale Discovery – MSD –，目錄號R93AA-1]於PBS-T [PBS – Lonza，目錄號BE17-156Q – 補充有0.05% Tween 20 – Sigma，目錄號P1379]中)中之小鼠血漿樣本、校正樣本及品質控制樣本(均為單一樣本)在RT下進行培育90 ± 5 min。在用PBS-T洗滌之後，將盤與SULFO-TAG共軛之抗huIgG偵測抗體(IgG2amm-1015-4A01-ST；Genmab，批號210329_PSM_0053#001；IgG2amm-1015-4A01抗體，使用MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester [MSD，目錄號R91AO-1]標記)在RT下進行培育90 ± 5 min。在用PBS-T洗滌之後，藉由添加含三丙胺(TPA)之讀取緩衝液(Read Buffer)(MSD GOLD Read Buffer，目錄號R92TG-2)生成電化學發光(ECL)訊號，該讀取緩衝液以電化學方式刺劑在盤之電極表面處之固定化抗體上的SULFO-TAG。ECL訊號係在MESO Sector S 600盤讀取器(MSD)上於620 nm處測量，並使用SoftMax® Pro GxP Software(Molecular Devices)進行處理。

在目標結合不存在下，小鼠中之WT huIgG之預測IgG濃度時間曲線係基於文獻(Bleeker W.K., et al. 2001. Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy：studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect. Blood 98：3136-3142)中所述之具有線性清除率之WT huIgG抗體之兩室PK模型(two-compartment PK model)來測定。此模型適宜地描述在先前內部研究中觀察到之小鼠體內其他(非結合)huIgG分子之PK概況。

PK參數係使用Phoenix WinNonlin軟體(Certara)藉由用於IV(或在相關情況下為血管外)藥物投予之非-分室法(non-compartmental method)得出。計算下列參數：

• C_{max} –最大觀察抗體濃度(μg/mL)，其定義為在抗體注射後在血液樣本中觀察到之最高抗體濃度。

• t_{max} –觀察到C_{max}時之取樣時間點(h)。

• $t_{½}$ –終末消除半衰期(h)，其藉由在對數(濃度)與時間圖(d)之終末階段上至少三個數據點之線性回歸所測定。

• AUC_{inf}：從時間點零(t=0)至無限時間之血漿濃度-時間曲線下面積(h*μg/mL)。t=0至最後測量時間點(t_{last}=21 d)之間的面積係藉由線性上升-對數線性下降梯形法(linear up - log-linear down trapezoidal method)來計算。從t_{last}至無限時間之面積係使用在抗體注射後3天至21天之間估計之消除速率(λz)來計算。

• CL –全身血漿清除率(mL/h/kg)，其計算為劑量

/AUC_{inf}。對於具有血管外PK曲線之小鼠，所計算之CL係藉由表觀生體可用率(F)隱式標準化(implicitly normalized)之CL。

PK參數係按處理組由平均值±標準偏差(SD)總結，惟t_{max}除外，其由中位數及範圍總結。使用GraphPad Prism將結果視覺化。

在小鼠體內，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示與IV投予非目標結合人類IgG抗體一致且典型之PK性質，其中在最早測試之注射後時間點的暴露最大，接著呈兩階段下降(圖37)。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR顯示比兩種嵌合OX40靶定對照抗體略低的總CL及略長的$t_{½}$。在測試之劑量範圍內，所有三種抗體之C_{max}類似(圖38，表20)。

表20：每個處理組之抗體PK參數。除非另有說明，否則顯示者係每個處理組之三隻小鼠之抗體CL、$t_{½}$、AUC_{inf}及C_{max}的平均值± SD，及抗體t_{max}之中位數與範圍。

抗體處理	抗體劑量 (mg/kg)	中位數 t_{max} 與範圍 (h)	平均值 C_{max} ± SD (µg/mL)	平均值 $t_{½}$ ± SD (h)	平均值 AUC_{inf} ± SD (h*µg/mL)	平均值 CL ± SD (mL/h/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	0.125	0.16 (0.16-0.16)	1.64 ± 0.259	277 ± 63.6	284 ± 60.6	0.454 ± 0.0903
	1.25	0.16 (0.16-0.16)	25.8 ± 4.39	211 ± 7.95	4,180 ± 748	0.305 ± 0.0505
	12.5	0.16 (0.16-0.16)	226 ± 9.87	292 ± 41.8[a]	57,800 ± 6,030[a]	0.217 ± 0.0227[a]
IgG1-CD134-003-FEAL	0.125	24 (0.16-24)	0.938 ± 0.363	166 ± 3.92[a]	174 ± 44.7[a]	0.741 ± 0.190[a]
	1.25	0.16 (0.16-0.16)	17.2 ± 4.01	139 ± 7.7	2,150 ± 169	0.583 ± 0.0445
	12.5	0.16 (0.16-0.16)	182 ± 50.6	205 ± 19.6	28,400 ± 2,090	0.441 ± 0.0315
IgG1-CD134-003-K409R-RR	0.125	0.16 (0.16-24)	1.01 ± 0.493	126 ± 17.6[a]	129 ± 17[a]	0.975 ± 0.128[a]
	1.25	0.16 (0.16-24)	16.7 ± 8.82	152 ± 10.7	2,150 ± 374	0.594 ± 0.111
	12.5	0.16 (0.16-0.16)	226 ± 45.1	185 ± 14.8	25,300 ± 1,620	0.496 ± 0.031

[a]平均值及SD係基於來自兩隻小鼠的樣本。

總而言之，此等數據指示，在目標結合不存在下，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之PK性質與WT huIgG之PK性質可相比。

實施例25：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之體內抗腫瘤功效

由於如實施例5中所證，與小鼠OX40(mOX40)缺乏結合，所以IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之抗腫瘤活性係在免疫活性C57BL/6小鼠中評定，該小鼠經基因工程改造以表現人類OX40之胞外結構域(hOX40嵌入[KI]小鼠)與mOX40胞內結構域。IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之體內抗腫瘤活性係在接種同基因型MC38小鼠結腸癌細胞之hOX40 KI小鼠中評定。此外，在MC38攜帶之hOX40 KI小鼠之周邊血液中研究回應於用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之藥物動力學變化。

在C57BL/6背景下之hOX40 KI小鼠(品系C57BL/6-*Tnfrsf4*$^{tm1(TNFRSF4)}$/Bcgen，目錄號110014)係從Beijing Biocytogen Co., Ltd.獲得，其特色為在免疫活性小鼠中具有人源化藥物目標(亦即OX40)。小鼠係在Biocytogen Co., Ltd.繁殖並轉移至CrownBioscience, Inc.。所有動物實驗均在Crown Bioscience, Inc.進行，並在執行前取得當地機構動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准。如由實驗動物照護評鑑及認證協會(AAALAC)法規所定義，動物係根據之良好動物規範

來飼養及處理。所有實驗數據管理及報告程序均嚴格根據適用的Crown Bioscience, Inc.指引及標準操作程序。將8至9週齡大的雌性hOX40 KI小鼠於下側區皮下(SC)注射1 × 10^6個MC38細胞(FuDan IBS cell center，目錄號1101MOU-PUMC000523，於PBS中之100 μL)。每週使用測徑器評估腫瘤生長三次。腫瘤體積(mm^3)係從測徑器測量，計算為([長度] × [寬度] × [寬度])/ 2，其中長度係最長的腫瘤維度，且寬度係垂直於長度之最長的腫瘤維度。

該研究由抗腫瘤活性研究及藥效學(PD)研究所組成。使用匹配分佈(Matched Distribution)法(StudyDirector™軟體)基於腫瘤體積將小鼠隨機分組。從所有接種MC38細胞之84隻動物中，首先將具有58.2 mm^3之平均腫瘤體積之40隻小鼠招募到四個組(10隻小鼠/組)中，以評定抗腫瘤活性(表21)。此外，將剩餘的44隻動物隨機化，且將其中具有63.6 mm^3之平均腫瘤體積之16隻招募到四個組(四隻小鼠/組)中以進行PD分析(稱為PD第1部分)，(表22)。由於在此等16隻動物採血期間，在一些試管中有血塊形成(PD第1部分)，所以決定納入額外16隻小鼠作為研究之第2部分(PD第2部分)。為此，在七天之後對剩餘28隻小鼠進行第三次隨機分組，產生四組，每組四隻小鼠，具有146.81 mm^3之平均腫瘤體積。

表21:hOX40 KI小鼠之處理組及劑量水平(抗腫瘤活性部分)

組	組 大小	第0天之 平均腫瘤體積 (+/- SEM; mm^3)	抗體	抗體劑量	劑量方案
1	10	58.2 +/- 1.88	IgG1-b12-FEAL	20 mg/kg	2QW×3 第0、3、7、10、14、17天，IP投予
2	10	58.2 +/- 1.90	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	20 mg/kg	
3	10	58.2 +/- 1.88	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	5 mg/kg	
4	10	58.2 +/- 1.88	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	1 mg/kg	

表22　hOX40 KI小鼠之處理組及劑量水平(PD第1及第2部分)

研究	組	組 大小	第0天之 平均腫瘤體積 (+/- SEM; mm^3)	抗體	抗體劑量	劑量方案
PD第1部分	1	4	63.9 +/- 3.64	IgG1-b12-FEAL	20 mg/kg	第0、3天，IP投予
	2	4	63.8 +/- 3.08	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	20 mg/kg	
	3	4	63.8 +/- 3.08	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	5 mg/kg	
	4	4	62.9 +/- 3.79	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	1 mg/kg	
PD第2部分	5	4	158.3 +/- 22.76	IgG1-b12-FEAL	20 mg/kg	
	6	4	143.2 +/- 18.26	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	20 mg/kg	
	7	4	143.6 +/- 18.70	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	5 mg/kg	
	8	4	142.2 +/- 14.09	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	1 mg/kg	

處理係從隨機分組當天(第0天)開始。將小鼠IP注射IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR(1、5、或20 mg/kg)或IgG1-b12-FEAL對照抗體(20 mg/kg)。對於各小鼠，根據體重調整給藥體積(於PBS中之10 μL/g)。從給藥開始之後。每週評估腫瘤生長三次。為評估隨時間推移之抗腫瘤活性，動

物係每週給藥兩次，為期三週(2QW×3)。為評估在PD第1及第2部分之藥效學，動物係在第0天及第3天給藥兩次。

腫瘤生長抑制(tumor growth inhibition, TGI)之測定係基於在第0天(開始給藥)時與所有組均完整的最後一天時的平均腫瘤體積之間的差異，並使用下列公式對各處理組進行計算：

$$TGI = \left(1 - \left(\frac{Tt - T0}{Ct - C0}\right)\right) \times 100\%$$

其中Tt =處理組在所有組均完整的最後一天時之平均腫瘤體積，Ct =對照組在所有組均完整的最後一天時之平均腫瘤體積，T0 =處理組在第0天時之平均腫瘤體積，及C0 =對照組在第0天時之平均腫瘤體積。表X中詳述本研究之TGI反應類別分類。

表23：腫瘤生長抑制分類

TGI反應分類	TGI (%)
無反應者	TGI < 30%
中間	30% ≤ TGI ≤ 90%
反應者	TGI > 90%

當腫瘤體積超過1,500 mm^3或當動物達到人道終點時(例如體重相對於第一天給藥[亦即第0天]減輕> 20%、腫瘤潰瘍且潰瘍直徑大於5 mm、或在觀察到嚴重的臨床徵象時)，停止個別小鼠實驗。將任何發生潰瘍或壞死腫瘤之動物立即分開並單獨飼養。

對於無進展存活期分析，採用500 mm^3之腫瘤體積臨界值(cut-off)。腫瘤進展> 500 mm^3之時間點係在GraphPad

Prism中使用對個別腫瘤生長曲線(假設指數生長方程式)之非線性回歸曲線擬合，並繪製成Kaplan-Meier曲線來計算。藉由非參數對數秩Mantel-Cox分析，接著使用SPSS軟體進行成對比較，來比較處理組與對照組之間的無進展存活期。

為評估IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之藥效學效應，在兩次給藥之後，將小鼠安樂死並在第5天分析周邊血液免疫細胞群體之變化，包括$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞增殖及活化。在實驗之第5天時在異氟醚氣體麻醉下經由心臟穿刺收集大約50至100 μL的全血，並轉移到K2-EDTA試管(BD，目錄號36597499)中。對於細胞表面染色，將全血樣本(PD第1部分[9隻動物]及PD第2部分[14隻動物]兩者；將具有血塊之全血樣本排除在分析之外；50至100 μL)與1 μg/mL Mouse BD Fc Block™(目錄號553141；稀釋於PBS + 0.09%疊氮化鈉中)在4℃下在黑暗中進行培育10 min。然後，將細胞用一般免疫表型分析用抗體組(表24)、或用T細胞表徵用之抗體組(表25)染色。

對於一般免疫表型分析，將稀釋於Fc阻斷緩衝液中之表24中詳述之抗體混合物(抗FOXP3抗體除外)添加至各樣本中，並在4℃下染色30 min。藉由將2 mL的室溫紅血球裂解緩衝液(1×；BioGems，目錄號64010-00100)添加至各試管中，在黑暗中在RT下培育10 min，並溫和渦旋來裂解細胞。將樣本使用PBS藉由在300×g下離心5 min並丟棄上清液來洗滌兩次。在將細胞沉澱物重新懸浮之後，添加

200 µL的固定/透化緩衝液(Fixation/Permcabilization buffer)(cBiosciencc，目錄號00-5523)，脈衝渦旋混合，並在黑暗中在RT下培育30 min。將細胞使用1X透化緩衝液(cBiosciencc，目錄號00-5523；稀釋於蒸餾H_2O中)，接著離心並傾析上清液來洗滌兩次。將FOXP3抗體於100 µL透化緩衝液中添加至各樣本中，並在黑暗中在RT下培育30 min。在用2 mL PBS洗滌細胞之後，將細胞重新懸浮於250 µL PBS中，並在BD LSRFortessa™ X-20細胞分析儀(BD Biosciences)上分析。使用Kaluza分析軟體分析數據。使用123count cBeads(ThermoFisher Scientific，目錄號01-1234-42)計算絕對數量。將100 µL磁珠添加至待計數之樣本中。使用下列方程式計算絕對計數：

$$\text{絕對計數 (細胞/µL)} = \frac{(\text{細胞計數} \times \text{cBead體積})}{(\text{cBead 計數} \times \text{細胞體積})} \times \text{cBead 濃度}$$

對於T細胞表徵，在阻斷細胞之後將ADPGK四聚體添加至各樣本中，溫和渦旋，並在黑暗中在4℃下培育30 min。然後，將稀釋於Fc阻斷緩衝液中之表25中詳述之抗體混合物(Ki67除外)添加至各樣本中，並在4℃下染色30 min。將細胞如上述裂解並洗滌。在將細胞沉澱物重新懸浮之後，將細胞遵循如上所述之方法進行Ki67之胞內染色。在用2 mL PBS洗滌細胞之後，將細胞重新懸浮於250 µL PBS中，並在BD LSRFortessa X-20細胞分析儀(BD Biosciences)上分析。使用Kaluza分析軟體分析數據。如上述使用123count cBeads計算絕對數量。

表4：用於免疫表型分析之流動式細胞測量術組

標靶物	螢光染料	株	目錄號	同型	供應商	稀釋度
細胞表面染色						
CD3	BUV395	17A2	740268	大鼠IgG2b, κ	BD	1:100
CD4	BV421	GK1.5	100438	大鼠IgG2b, κ	Biol egend	1:50
CD8	PE-eFluor™ 610	53-6.7	61-0081-82	大鼠IgG2a, κ	eBioscience	1:50
CD11b	PE-Cy7	M1/70	101216	大鼠IgG2b, κ	Biol egend	1:100
CD19	BV711	6D5	115555	大鼠IgG2a, κ	Biol egend	1:100
CD45	FITC	30-F11	103108	大鼠IgG2b, κ	Biol egend	1:100
CD206	PerCP/Cyanine5.5	C068C2	141708	大鼠IgG2a, κ	Biol egend	1:100
CD335	BV605	29A1.4	137619	大鼠IgG2a, κ	Biol egend	1:50
F4/80	BV510	BM8	123135	大鼠IgG2a, κ	Biol egend	1:50
I-A/I-E	AF700	M5/114.15.2	107622	大鼠IgG2b, κ	Biol egend	1:50
Ly-6G	BV785	1A8	127645	大鼠IgG2a, κ	Biol egend	1:100
Ly-6C	APC	HK1.4	128016	大鼠IgG2c, κ	Biol egend	1:50
存活力	eFluor 780	NA	65-0865-18	NA	eBioscience	1:100
細胞內染色						
FOXP3	PE	FJK-16s	12-5773-82	大鼠IgG2a, κ	eBioscience	1:20

表25：用於T細胞表徵之流動式細胞測量術組

標靶物	螢光染料	株	目錄號	同型	供應商	稀釋度
細胞表面染色						
CD3	BUV395	17A2	740268	大鼠IgG2b, κ	BD	1:100
CD4	BV421	GK1.5	100438	大鼠IgG2b, κ	Biolegend	1:100
CD8	FITC	KT15	D271-4	大鼠IgG2a, κ	MBL	1:20
CD25	BV510	PC61	102042	大鼠IgG1, λ	Biolegend	1:20
CD45	BV785	30-F11	103149	大鼠IgG2b, κ	Biolegend	1:100
CD137	PE-Cyanine7	17B5	25-1371-82	倉鼠IgG	eBioscience	1:20
H-2Db-ADPGK PUMO	APC	NA	TB-5113-2	NA	MBL	1:10
hOX40(ACT-1341106)	PE	1106	340420	小鼠 IgG1, κ	BD	1:20
LAP/PE	AF700	MS/114.15.2	107622	大鼠IgG2b, κ	Biolegend	1:100
PD-1	BV605	29F.1A12	135219	大鼠IgG2a, κ	Biolegend	1:20
存活力	eFluor 780	NA	65-0865-18	NA	eBioscience	1:100
細胞染色						
Ki67	PerCP-eFluor 710	SolA15	46-5698-82	小鼠 IgG1, κ	eBioscience	1:100

血漿樣本係在第0、2、及5天從PD第1及第2部分之小鼠中獲得。每隻小鼠經由下頜靜脈(第0天及第2天)，或在第5天時經由心臟穿刺抽取50 µL血液，並收集在EDTA抗凝血試管(BD，目錄號365974)中。將試管充分混合以確保血液樣本與抗凝血劑完全接觸，然後離心(8000 RPM，5 min，4℃下)。在離心之後，將上清液轉移至1.5 mL艾本德管中。

血漿中之小鼠細胞介素(IFNγ、IL-2、IL-4、IL-10、TNFα、IP-10、MCP-1、IL-27/p28)水平係根據製造商的說明，在MESO QuickPlex SQ 120儀器(MSD, LLC.，目錄號

AI0AA-0)上使用V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Mouse套組(MSD LLC，目錄號K15048D-2)以多重ECLIA來測定。細胞介素濃度係使用標準曲線數據來計算，該標準曲線數據係藉由MSD工作台軟體擬合至四參數邏輯(4PL)擬合並使用GraphPad Prism軟體作圖。

在此等研究之任何小鼠中，處理對具有良好的耐受性，且沒有報告疾病之臨床徵象或觀察到回應於抗體處裡之體重減輕。如在處理開始之後14天(所有處理組仍完整之最後一天)所測量，與IgG1-b12-FEAL處理相比，用5 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理顯著延緩腫瘤長大(Mann Whitney，P = 0.0011)，導致基於TGI之中間反應(50.0%；圖39A，圖39B；表26)。與對照組相比，用低(1 mg/kg)及高(20 mg/kg) IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理在第14天時未導致顯著更小的腫瘤體積(Mann-Whitney，分別為P = 0.3527及P = 0.0753)。與IgG1-b12-FEAL處理之對照組相比，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之小鼠(5 mg/kg或20 mg/kg)之無進展存活期顯著更長(Mantel-Cox，分別為P < 0.001及P = 0.031；圖39C及表27)。

表26：hOX40 KI小鼠在處理後之腫瘤體積之Mann-Whitney分析。在所有組均完整的最後一天(第14天)，使用Mann-Whitney分析將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理組之腫瘤體積與IgG1-b12-HEAL對照組之腫瘤體積進行比較。其於第14天時之腫瘤體積計算作用處理組之TGI值。**：P < 0.01。

處理	劑量 (mg/kg)	PVI	PVI顯著	TGI (%)
IgG1-b12-HEAL	20	NA	NA	NA
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	20	0.0753	ns	27.9
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	5	0.0011	**	50.0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR	1	0.3527	ns	18.5

表27：hOX40 KI小鼠在處理後之無進展存活期之Mantel-Cox分析。無進展存活期(其於500 mm^3之腫瘤體積臨界值)係藉由Mantel-Cox分析之方式，識別組間存活期之總體差異，隨後進行組間之成對比較(SPSS)來分析。*：P < 0.05，及***：P < 0.001。

處理組	IgG1-b12-HEAL 20 mg/kg	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 20 mg/kg	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 5 mg/kg	IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 1 mg/kg	中位數存活期 (天數)
IgG1-b12-HEAL 20 mg/kg	NA	0.091	<0.001	0.086	11.6
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 20 mg/kg	*	NA	0.266	0.427	12.5
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 5 mg/kg	***	ns	NA	0.968	14.6
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 1 mg/kg	ns	ns	ns	NA	12.9

使用1類MHC ADPGK四聚體測定在處理之後腫瘤特異性CD8+ T細胞之百分比。

在用1、5、及20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，在MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠之周邊血液

中觀察到CD4+ T細胞之百分比顯著增加(圖40A)，其係與用20 mg/kg IgG1-b12-FEAL處理之小鼠相比。CD4+ T細胞之絕對數量未改變，可能指示CD4+細胞之頻率增加可能歸因於CD8+ T細胞之減少(圖40B，圖40D)。用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之hOX40 KI小鼠誘導之周邊血液CD4+ T細胞之增殖及活化如由表現增殖標誌物Ki67及活化標誌物CD25、IA/IE、PD-1、及4-1BB之CD4+ T細胞之百分比顯著增加所示(圖41A至圖41E)。此外，與IgG1-b12-FEAL處理相比，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理導致OX40表現之CD4+ T細胞之百分比顯著下降，可能導因於OX40脫落(數據未顯示)。所有觀察到之對CD4+ T細胞之效應均為劑量非依賴性，惟4-1BB上調除外，其顯示劑量依賴性(圖41E)。

在用1、5及20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理後，在周邊血液中觀察到CD8+ T細胞之百分比及絕對數量降低，以及增殖之CD8+Ki67+ T細胞之百分比(1、5、及20 mg/kg)及腫瘤特異性(ADPGK+) CD8+ T細胞之百分比及絕對數量增加(1及5 mg/kg；圖40C、圖40D、圖42)。

如由表現CD25(所有IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR劑量)、IA/IE(1及5 mg/kg)、PD-1(所有IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR劑量)、及4-1BB(5及20 mg/kg；圖43)之CD8+ T細胞之百分比顯著增加所偵測，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理誘導周邊血液中之CD8+ T細胞之活化。與IgG1-b12-FEAL對照處理之小鼠相比，用1或20 mg/kg

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之小鼠顯示在周邊血液中之$CD8^+OX40^+$ T細胞之顯著降低，可能導因於OX40脫落(數據未顯示)。

IFNγ、IP-10、IL-2、IL-4、IL-10、MCP-1、IL-27p28、及TNFα之濃度係在第0天時(處理前)、及第2及第5天時(第一次及第二次用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或IgG1-b12-FEAL處理之後兩天)從小鼠收集之血漿樣本藉由ECLIA來測定。如相較於用IgG1-B12-FEAL處理，在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，在第5天時觀察到IFNγ、IP-10、IL-2、IL-4、IL-10、MCP-1、IL-27p28、及TNFα之血漿濃度增加。在此等細胞介素分泌概況中沒有觀察到明確的劑量反應關係。

總之，與非結合對照抗體相比，5 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中展現出顯著抗腫瘤活性。此外，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理導致在周邊血液中之$CD8^+$ T細胞及$CD4^+$ T細胞活化，如由數種活化標誌物及腫瘤特異性$CD8^+$ T細胞之表現相對增加所證。最後，在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理後，小鼠血漿樣本中測得之IFNγ、IP-10、IL-2、IL-4、IL-10、MCP-1、IL-27p28、及TNFα之濃度增加。

實施例26：對源自用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之小鼠的腫瘤組織進行定量免疫組織化學分析

如實施例25中所述，與非結合對照抗體相比，IgG1-

CD134-003-HC6LC2-RR在MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中展現出抗腫瘤活性。此處，在源自用1、5、及20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR或作為對照之20 mg/kg IgG1-b12-FEAL處理之MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠之腫瘤組織內進行定量免疫組織化學(IHC)以分析T細胞群體之存在、T細胞表型、及腫瘤增殖指數。

在處理五天之後，將源自如實施例25中所述處理之hOX40 KI小鼠的腫瘤收獲，解剖、固定於福馬林中、石蠟包埋並切片(4 μm)。對於組織學評定，將腫瘤切片脫蠟，並用Tissue-Tek Prisma H&E Stain Kit(Sakura，目錄號6190)使用Tissue-Tek Prisma Plus Automated Slide Stainer (Sakura)染色。對於評估腫瘤內之標誌物陽性細胞，將切片脫蠟並使用CC1緩衝液(Roche，目錄號950-124)取回抗原，接著淬熄內源性過氧化酶(Dako Agilent，目錄號S2003)，並使用Roche Ventana Discovery(DISC)自動染色儀平台，用阻斷緩衝液(Roche，目錄號05268869001)阻斷非特異性結合位點。將切片與一級抗體(表28)進行培育，使用抗兔子免疫組織化學偵測套組偵測：對於CD4及顆粒酶B，僅用抗兔子DISC Omnimap(Roche，目錄號05269679001)；對於CD8及OX40，依序用DISC抗兔子HQ(Roche，目錄號07017812001)然後用抗HQ HRP Multimer(Roche，目錄號06442544001)擴增。根據製造商說明使用3,3'-二胺基聯苯胺(ChromoMap DAB；Roche，目錄號05266645001)將HRP視覺化。

表28：用於定量免疫組織化學分析之一級抗體。N/A：不適用；conc：濃度；hOX40：人類OX40；RTU：即用型(由供應商預先稀釋)。

目標	宿主	目錄號	供應商	株	儲備濃度 (mg/mL)	最終濃度/稀釋液 (mg/mL)
CD4	兔子	ab183685	Abcam	EPR19514	0.623	0.005
CD8	兔子	98941	Cell Signaling	D4W2Z	未知	1:200
顆粒酶B	兔子	ab255598	Abcam	EPR22645-206	0.543	0.005
hOX40	兔子	ab264465	Abcam	EPR23001-88	0.513	0.010
同型	兔子	3900S	Cell Signaling	DA1E	2.5	0.006
Neg ctrl	N.A.	5266319001	Roche	N/A	N/A	N/A

在所有檢定中，細胞核係藉由與邁耶(Mayer)的蘇木精一起培育來複染。染色特異性係藉由在連續組織切片上併入同型、陽性及陰性對照染色來控制。將染色之載玻片在AxioScan Z1(Zeiss)上經受全載玻片成像。

進行多重免疫螢光檢定以共染色CD3(RTU檢定，株2GV6，目錄號790-4341，Roche)、Ki-67(RTU檢定，株30-9，Roche，目錄號790-4286)及泛細胞角蛋白(pan-cytokeratin)(多株，50x稀釋，ThermoFisher，目錄號PA1-27114)。將標準厚度(4 μm)之IHC組織切片經受脫蠟及抗原取回(Tris-EDTA緩衝液，pH 7.8)之標準規程。對於多重免疫螢光，使用螢光團共軛之二級抗體(FAM標記，用於CD3，[Discovery-FAM套組，Roche，目錄號7988150001]；Rhodamine6G標記，用於Ki-67 [Discovery-Rhodamine6G套組，Roche目錄號7988168001]；Cy5標記，用於泛細胞角蛋白[Discovery-Cy5套組，Roche，目錄號7551215001])。染色特異性係藉由在連續組織切片上併入同型對照染色來

控制。將組織用DAPI複染。將切片用ProLong Gold Antifade Mountant(ThermoFisher，目錄號P10144)固定。將整個組織載玻片在AxioScan Z1(Zeiss)上用標準掃描設定檔掃描。

使用預先編程之軟體分析演算法(CytoNuclear v2.0.9用於明視野影像，HighPlex FL v4.2.14用於螢光影像)在HALO軟體(Indica Labs)中分析數位影像，以在存活的腫瘤內區域內進行細胞定量。細胞定量讀數已藉由計算(1)標誌物陽性細胞佔有核細胞總數之百分比及(2)每表面積(mm^2)之標誌物陽性細胞數量來生成。

在用任何IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理劑量處理之後，觀察到每mm^2組織之$CD4^+$ T細胞數量顯著增加(圖45A至圖45D)。此外，在用1 mg/kg或5 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，每mm^2組織之顆粒酶B^+細胞數量顯著增加，其中在源自用5 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之小鼠的腫瘤組織中觀察到最強的增加(圖45E)。在每mm^2組織之$OX40^+$細胞數量中未觀察到處理之效應(圖45F)。

總而言之，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理在處理五天之後導致hOX40 KI小鼠之鼠MC38腫瘤中$CD4^+$ T細胞及顆粒酶-B^+細胞之數量增加，如使用定量IHC所評定。

實施例27：IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR之體內抗腫瘤功效

在實施例25中，其描述與非結合對照抗體相比，抗人類OX40抗體IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR在MC38腫瘤攜帶之hOX40 KI小鼠中展現出顯著抗腫瘤活性。此處，使用相同鼠腫瘤模型及實施例25中所述之方法，進行體內劑量範圍探索研究(in vivo dose-range finding study)。與實施例25中所述之方法的唯一不同之處在於，此處hOX40 KI小鼠係IP注射IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR(1、2.5、5、10、或20 mg/kg)或IgG1-b12-FEAL對照抗體(20 mg/kg)，每週兩次，為期三週。進行隨機分組，平均腫瘤體積為61.77 mm^3。將60隻動物分配至6組，每組10隻動物(每個劑量水平1組)。

如在處理開始之後15天所測量，與IgG1-b12-FEAL處理相比，用1、5、或20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理顯著延緩腫瘤長大(Mann Whitney，分別為P = 0.0433、P = 0.0052、P = 0.0133)，導致基於TGI之中間反應(分別為41.7%、52.2%、或43.2%；圖46A，圖46B)。與對照組相比，用2.5 mg/kg及10 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理在第15天時未導致顯著更小的腫瘤體積(Mann-Whitney，分別為P = 0.5787及P = 0.0753)。與IgG1-b12-FEAL處理之對照組相比，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之小鼠(1 mg/kg或5 mg/kg)之無進展存活期顯著更長(Mantel-Cox，分別為P = 0.015及P = 0.01；圖46C)。

總而言之，在攜帶MC38腫瘤之hOX40 KI小鼠之體內劑量範圍探索研究中，由在第15天時之腫瘤長大及無進展

存活期之分析所示，在用1、5、或20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理小鼠之後觀察到顯著抗腫瘤活性。此等結果確認實施例25中所得出之結論。

實施例28：在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後對MC38腫瘤之體內效應

在實施例25中，描述hOX40 KI小鼠中之MC38體內腫瘤模型，以研究IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之功效。此處基本上遵循實施例25中所述之程序，研究在鼠腫瘤樣本中，IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理對T細胞數量及T細胞活化之效應。與實施例25中所述之程序相反，當達到200 mm^3之平均腫瘤體積時，才將小鼠隨機分組到處理組(n=7/處理組；用20 mg/kg、5 mg/kg、或1 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR、或20 mg/kg IgG1-b12-RR i.p.處理)中，並在開始處理之後第5天時(亦即在給予2次處理之後)收集之腫瘤樣本中測量藥效學效應。如實施例25中所述使用表29中之螢光標記之抗體，使用流動式細胞測量術分析免疫表型分析及T細胞活化。

將下列閘控策略用於表型及分析免疫細胞子群之活化。在閘控單態細胞(singlet)之後，藉由閘控L/D^-細胞將活細胞與死細胞區分開。在活細胞閘內，閘控$CD45^+$細胞，之後將$CD19^+$閘控出。將在$CD45^+CD19^-$群體內之$CD3^+$細胞進一步分成$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞。常規CD4+ T細胞係由表現CD4且不表現FOXP3所定義。Treg係由表現CD4、

CD25、及FOXP3所定義。對常規CD4及CD8 T細胞子群之CD25、顆粒酶B(GZMB)、人類OX40、及PD-1之表現進行分析。

表29：用於免疫表型分析及T細胞活化之流動式細胞測量術組

標誌物	螢光團	株	目錄號	同型	供應商
CD45	BV785	30-F11	103149	大鼠IgG2b, κ	BioLegend
CD3	BUV395	17A2	740268	大鼠IgG2b, κ	BD
CD19	APC	6D5	115512	大鼠IgG2a, κ	BioLegend
CD4	FITC	GK1.5	100406	大鼠IgG2b, κ	BioLegend
CD8	PE-ef610	53-6.7	61-0081-82	大鼠IgG2a, κ	eBioscience
CD25	BV605	PC61	102036	大鼠IgG1, λ	BioLegend
PD-1	BV711	29F.1.A12	135231	大鼠IgG2a, κ	BioLegend
FoxP3	PE	FJK-16s	12-5773-82	大鼠IgG2a, κ	eBioscience
GZMB	PE-Cy7	QA16A02	372214	小鼠IgG1, κ	BioLegend
hOX40	BV421	L106	744881	小鼠IgG1, κ	BD
L/D	eFluor780	N/A	65-0865-14	N/A	eBioscience

在用1、5、及20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理後，僅在用20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後收集之腫瘤樣本中之Treg百分比中觀察到顯著變化，而如與源自用20 mg/kg IgG1-b12-RR處理之小鼠的腫瘤樣本相比，在$CD45^+$細胞、$CD3^+$細胞、及常規$CD4^+$ T細胞、或$CD8^+$ T細胞之百分比中未觀察到顯著變化(圖47)。儘管$CD45^+$細胞、$CD3^+$細胞、$CD4^+$ T細胞、及$CD8^+$ T細胞之絕對數量有增加之趨勢，但僅在5 mg/kg劑量的IgG1-

CD134-003-HC6LC2-RR下觀察到Treg顯著增加(圖47)。

在用各劑量的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，觀察到表現人類OX40之常規CD4+ T細胞之百分比顯著增加(圖48)。在用1或20 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後之腫瘤樣本中觀察到表現PD-1或顆粒酶B(GZMB)之常規 CD4+ T細胞顯著增加(表30；圖48)。儘管沒有統計學上顯著性，但在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後之表現CD25之常規CD4+ T細胞中觀察到增加的趨勢。

在用各劑量的IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，亦觀察到表現人類OX40之CD8+ T細胞之百分比顯著增加(表31；圖49)。雖然觀察到表現GZMB或PD-1之CD8+ T細胞之百分比增加，此等效應不具統計學上顯著性。在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後，在表現CD25之CD8+ T細胞中沒有觀察到一致性增加(表31；圖49)。

表30：在用IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理之後在從hOX40 KI小鼠收集之腫瘤中，表現CD25、人類OX40、GZMB、或PD-1之常規CD4+ T細胞之百分比的Mann-Whitney分析。使用Mann-Whitney分析將IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR處理組之百分比與IgG1-b12-RR對照組之百分比進行比較。*：P < 0.05；**：P < 0.01，***：P < 0.001。

IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR 處理組	CD4+CD25+ T 細胞	CD4+GZMB+ T 細胞	CD4+OX40+ T 細胞	CD4+PD-1+ T 細胞
20 mg/kg	0.0793	0.0012	0.0006	0.0163
5 mg/kg	0.2593	0.0973	0.0111	0.2086
1 mg/kg	0.2593	0.0041	0.0262	0.0767

表31：在用IgG1-CD134-003-IC6LC2-RR處理之後在從hOX40 KI小鼠收集之脾臟中，表現CD25、人類OX40、GZMB、或PD-1之CD8+ T細胞之百分比的 Mann-Whitney 分析。使用 Mann-Whitney 分析將 IgG1-CD134-003-IC6LC2-RR處理組之百分比與IgG1-b12-RR對照組之百分比進行比較。*：P < 0.05；**：P < 0.01，***：P < 0.001。

IgG1-CD134-003-IC6LC2-RR 處理組	CD8+CD25+ T 細胞	CD8+GZMB+ T 細胞	CD8+OX40+ T 細胞	CD8+PD-1+ T 細胞
20 mg/kg	0.3997	0.0728	0.0023	0.2593
5 mg/kg	0.6043	0.0973	0.0006	0.1649
1 mg/kg	0.1550	0.6700	0.0006	0.3176

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="896243-中文SEQ-1106.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-11-
06">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>113117396</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2024-05-10</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>P0214-WO-PCT</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>EP</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>23173143.1</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-05-12</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">丹麥商珍美寶股份有限公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Genmab A/S</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">肯珀  克里斯特爾</InventorName>
 <InventorNameLatin>Kemper, Kristel</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="en">ANTIBODIES CAPABLE OF BINDING TO OX40,
VARIANTS THEREOF AND USES THEREOF</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="zh">能夠與ＯＸ４０結合之抗體、其變異體及其用途
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>78</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q160">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q161">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
```

GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q162">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q163">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q164">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q165">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q166">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="8">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q167">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q168">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EQLKETGGGLVQPGGSLTLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYASW
VNGRFAISSHNAQNTLYLQLNSLTAADTATYFCARDLRAFYSGWGGINLWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_s
equence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

```
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>218</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..218</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q169">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGQPPKLLIYDASNLASGVPD
RFSGSGSGTQFTLTISGVQSDDAATYYCLGGYDDDAENAFGGGTEVVVQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</IN
SDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q170">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EQLKETGGGLVQPGGSLTLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYASW
VNGRFAISSHNAQNTLYLQLNSLTAADTATYFCARDLRAFYSGWGGINLWGPGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="12">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q171">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GFDFSSGY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="13">
   <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q172">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IDPVFGST</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q173">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ARDLRAFYSGWGGINL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q174">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGQPPKLLIYDASNLASGVPD
RFSGSGSGTQFTLTISGVQSDDAATYYCLGGYDDDAENAFGGGTEVVVQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q175">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QIVVNNNF</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="17">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q176">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>LGGYDDDAENA</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>452</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..452</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q177">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYAS
WVNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARDLRAFYSGWGGINLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>218</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..218</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q178">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AAVLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLASGVPD
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLGGYDDDAENAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</IN
SDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="20">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>123</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..123</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q179">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFDFSSGYMSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGSTYYAS
WVNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARDLRAFYSGWGGINLWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q180">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AAVLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQIVVNNNFLSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLASGVPD
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLGGYDDDAENAFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>446</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..446</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q181">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVEESGGRLVTPGTFLTLTCTVSGFSLSSYAMNWVRQSPGKGLEWIGIIYSDDIAYYASWA
KGRFTISKTSTTVTLKMTSLTVADTATYFCARGDGDRSIWSFDLWGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="23">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>219</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..219</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q182">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSESVWNNNWLAWYQQKPGQPPNLLIYEASTLASGVSS
RFKGSGSGTQFTLTVSEVQSDDAATYYCQGGYYDSSPIWTFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</I
NSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q183">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSVEESGGRLVTPGTFLTLTCTVSGFSLSSYAMNWVRQSPGKGLEWIGIIYSDDIAYYASWA
KGRFTISKTSTTVTLKMTSLTVADTATYFCARGDGDRSIWSFDLWGPGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q184">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GFSLSSYA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q185">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>IYSDDIA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q186">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARGDGDRSIWSFDL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q187">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSESVWNNNWLAWYQQKPGQPPNLLIYEASTLASGVSS
RFKGSGSGTQFTLTVSEVQSDDAATYYCQGGYYDSSPIWTFGGGTEVVVK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q188">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ESVWNNNW</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="30">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q189">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QGGYYDSSPIWT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q190">

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSLEESGGRLVTPGTPLTLICTVSGIDLSSGAMGWVRQAPGKGLEYIGYIYTGSGTTSYASW
VNGRFTISMTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARDAASSYWGHFTLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>219</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..219</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q191">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASENIYSSLAWYQQKPGQPPKLLIYRTSTLASGVPSRF
KGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYCQSYYHNSGGGYDYGFGGGTEVVAKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</I
NSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q192">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSLEESGGRLVTPGTPLTLICTVSGIDLSSGAMGWVRQAPGKGLEYIGYIYTGSGTTSYASW
VNGRFTISMTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARDAASSYWGHFTLWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q193">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GIDLSSGA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q194">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YTGSGTT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q195">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARDAASSYWGHFTL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q196">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASENIYSSLAWYQQKPGQPPKLLIYRTSTLASGVPSRF
KGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYCQSYYHNSGGGYDYGFGGGTEVVAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q197">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ENIYSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q198">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QSYYHNSGGGYDYG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="40">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q199">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
```

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_seque
nce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q200">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="42">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q201">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q202">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GFTFSSYS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q203">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ISSSSSTI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q204">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARESGWYLFDY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="46">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q205">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="47">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q206">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QGISSW</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="48">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q207">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQYNSYPPT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="49">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>325</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..325</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q208">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="50">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>325</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..325</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q209">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQP
RRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q210">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Macaca fascicularis</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAKLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSQNT
VCRPCGPGFYNDVVSAKPCKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACK
PWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPAVAAILGLG
LALGLLGPLAMLLALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSFRTPIQEEQADAHSALAKI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="52">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q211">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNT
VCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACK
PWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG
LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="53">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>272</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..272</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q212">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYVWVQQPTALLLLALTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHP
CETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPW
TNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPEGPAFAVLLGLGLG
LLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q213">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDT
LCHPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACK
PWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG
LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="55">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q214">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNT
VCRPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACK
PWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG
```

LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>279</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..279</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q215">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNT
VCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGDNQA
CKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILG
LGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q216">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNT
VCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGNNQACK
PWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG
LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="58">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>231</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..231</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q217">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>231</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..231</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q218">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="60">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>231</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..231</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q219">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYT
QKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="61">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>231</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..231</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q220">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="62">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q221">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="63">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q222">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="64">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q223">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEY
NPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGQGSLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="65">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q224">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GFTFTDFY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="66">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q225">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IRDKAKGYTT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q226">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AREGHTAAPFDY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="68">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q227">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNNLQTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQHISRPRTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="69">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q228">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QNIDKY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q229">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LQHISRPRT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="71">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>127</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..127</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q230">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSA
KFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="72">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q231">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GYRFSNFV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q232">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>INPYNGNK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="74">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q233">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q234">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDR
FSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="76">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q235">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>HSIRSRR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="77">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q236">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVYGASSYT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="78">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q237">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
```

KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種能夠與人類OX40結合之抗體，該抗體包含，

a. 抗原結合區，其包含重鏈可變(VH)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO: 12、13、及14中所示之序列，及輕鏈可變(VL)區，其中該CDR1、CDR2、及CDR3分別包含如SEQ ID NO: 16、DAS及17中所示之序列，及

b. 人類IgG1 Fc區，其包含P329R突變及E345R突變，其中該等胺基酸位置係根據Eu編號來編號。

【請求項2】如請求項1之抗體，其中該抗體能夠與具有SEQ ID NO: 52之序列的人類OX40結合。

【請求項3】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體能夠與人類OX40之CRD1結構域結合。

【請求項4】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體對人類OX40具有3 x 10^{-9} M至4 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。

【請求項5】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體對人類OX40具有3.4 x 10^{-9} M之結合親和力K_D。

【請求項6】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體能夠與具有SEQ ID NO: 51之序列的食蟹獼猴OX40結合。

【請求項7】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體係人源化或嵌合抗體。

【請求項8】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體包含具有如SEQ ID NO: 20中所示之序列的VH區及具有SEQ ID NO: 21中所示之序列的VL區。

【請求項9】如前述請求項中任一項之抗體，其中該Fc區屬於人類IgG1mf、人類IgG1ma、人類IgG1mx或人類IgG1mz同種異型。

【請求項10】如前述請求項中任一項之抗體，其中該Fc區係人類IgG1mf同種異型。

【請求項11】如前述請求項中任一項之抗體，其中該Fc區係包含SEQ ID NO: 3中所示之序列。

【請求項12】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體係雙價的。

【請求項13】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體係單特異性、雙特異性或多特異性抗體。

【請求項14】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體係全長抗體。

【請求項15】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體具有重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含選自包含下列之群組的序列：SEQ ID NO: 58、59、60、及61。

【請求項16】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體具有重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO: 58中所示之序列。

【請求項17】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體包含如SEQ ID NO: 18中所示之重鏈(HC)及如SEQ ID

NO: 19中所示之輕鏈(LC)。

【請求項18】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體係促效性的。

【請求項19】如前述請求項中任一項之抗體，其中，相較於無P329R及E345R突變之野生型親本抗體，該抗體具有增加之促效活性。

【請求項20】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體誘導增加之T細胞增殖。

【請求項21】如前述請求項中任一項之抗體，其中，相較於無P329R及E345R突變之親本抗體，該抗體誘導增加之T細胞增殖。

【請求項22】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體當如本文實施例7中所述檢定時能夠誘導人類T細胞之增殖，該等T細胞諸如$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞，諸如T輔助細胞及細胞毒性T細胞。

【請求項23】如前述請求項中任一項之抗體，其中該抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區經修飾使得該抗體相對於無P329R及E345R突變之親本抗體以更小程度誘導一或多種Fc媒介之效應功能。

【請求項24】如請求項23之抗體，其中該一或多種Fc媒介之效應功能係減少至少20%，諸如至少30%或至少40%、或至少50%或至少60%或至少70%、或至少80%或至少90%。

【請求項25】如請求項23或24之抗體，其中該抗體不

誘導一或多種Fc媒介之效應功能。

【請求項26】如請求項23至25中任一項之抗體，其中該一或多種Fc媒介之效應功能係選自下列群組：補體依賴性細胞毒性(CDC)、補體活化、抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞媒介之吞噬作用(ADCP)、C1q結合及FcγR結合。

【請求項27】如請求項25或26中任一項之抗體，其中該抗體不誘導C1q結合。

【請求項28】一種組成物，其包含如請求項1至27中任一項所定義之抗體。

【請求項29】一種醫藥組成物，其包含如請求項1至27中任一項所定義之抗體及醫藥上可接受之載劑。

【請求項30】如請求項1至27中任一項所定義之抗體，其係用作藥劑。

【請求項31】如請求項30之用作藥劑之抗體，其係用於治療疾病。

【請求項32】如請求項31之用作藥劑之抗體，其中該疾病係癌症。

【請求項33】如請求項32之用作藥劑之抗體，其中該癌症係實體腫瘤或血液癌症。

【請求項34】一種治療疾病之方法，該方法包含向有需要之個體投予如請求項1至27中任一項所定義之抗體、如請求項28中所定義之組成物、或如請求項29中所定義之醫藥組成物。

【請求項35】如請求項34之方法，該方法係用於治療癌症。

【請求項36】一種編碼如請求項1至27中任一項之抗體的單離之核酸序列或核酸序列之組合。

【請求項37】一種編碼VH區之核酸序列，該VH區包含：包含如SEQ ID NO: 12中所示之序列的VH CDR1、包含如SEQ ID NO: 13中所示之序列的VH CDR2、包含如SEQ ID NO: 14中所示之序列的VH CDR3。

【請求項38】一種編碼VL區之核酸序列，該VL區包含：包含如SEQ ID NO: 16中所示之序列的VL CDR1、包含序列DAS的VL CDR2、包含如SEQ ID NO: 17中所示之序列的VL CDR3。

【請求項39】如請求項36及37中任一項之核酸序列，其編碼包含如SEQ ID NO: 20中所示之胺基酸序列的VH區。

【請求項40】如請求項36及38中任一項之核酸序列，其編碼包含如SEQ ID NO: 21中所示之胺基酸序列的VL區。

【請求項41】一種核酸序列，其編碼如請求項1至27中任一項之抗體的重鏈。

【請求項42】一種核酸序列，其編碼如請求項1至27中任一項之抗體的輕鏈。

【請求項43】如請求項37、39及41中任一項之核酸序列，其中該重鏈包含如SEQ ID NO: 18中所示之胺基酸序

列。

【請求項44】如請求項38、40及42中任一項之核酸序列，其中該輕鏈包含如SEQ ID NO: 19中所示之胺基酸序列。

【請求項45】一種如請求項36至44中任一項之核酸序列、或核酸序列之組合，其中該核酸係DNA或RNA，諸如mRNA。

【請求項46】如請求項37至45中任一項之核酸序列，其係單離之核酸序列。

【請求項47】一種表現載體，其包含如請求項36至46中任一項之核酸序列或其組合。

【請求項48】一種如請求項37至47中任一項之核酸序列、或核酸序列之組合，其係用於在哺乳動物細胞中表現。

【請求項49】一種重組宿主細胞，其產生如請求項1至27中任一項所定義之抗體，視需要地其中該宿主細胞包含如請求項47之表現載體。

【請求項50】如請求項49之重組宿主細胞，其係真核或原核細胞。

【請求項51】一種醫藥組成物，其包含如請求項37至46中任一項之核酸序列、或如請求項47中所定義之表現載體、及醫藥上可接受之載劑。

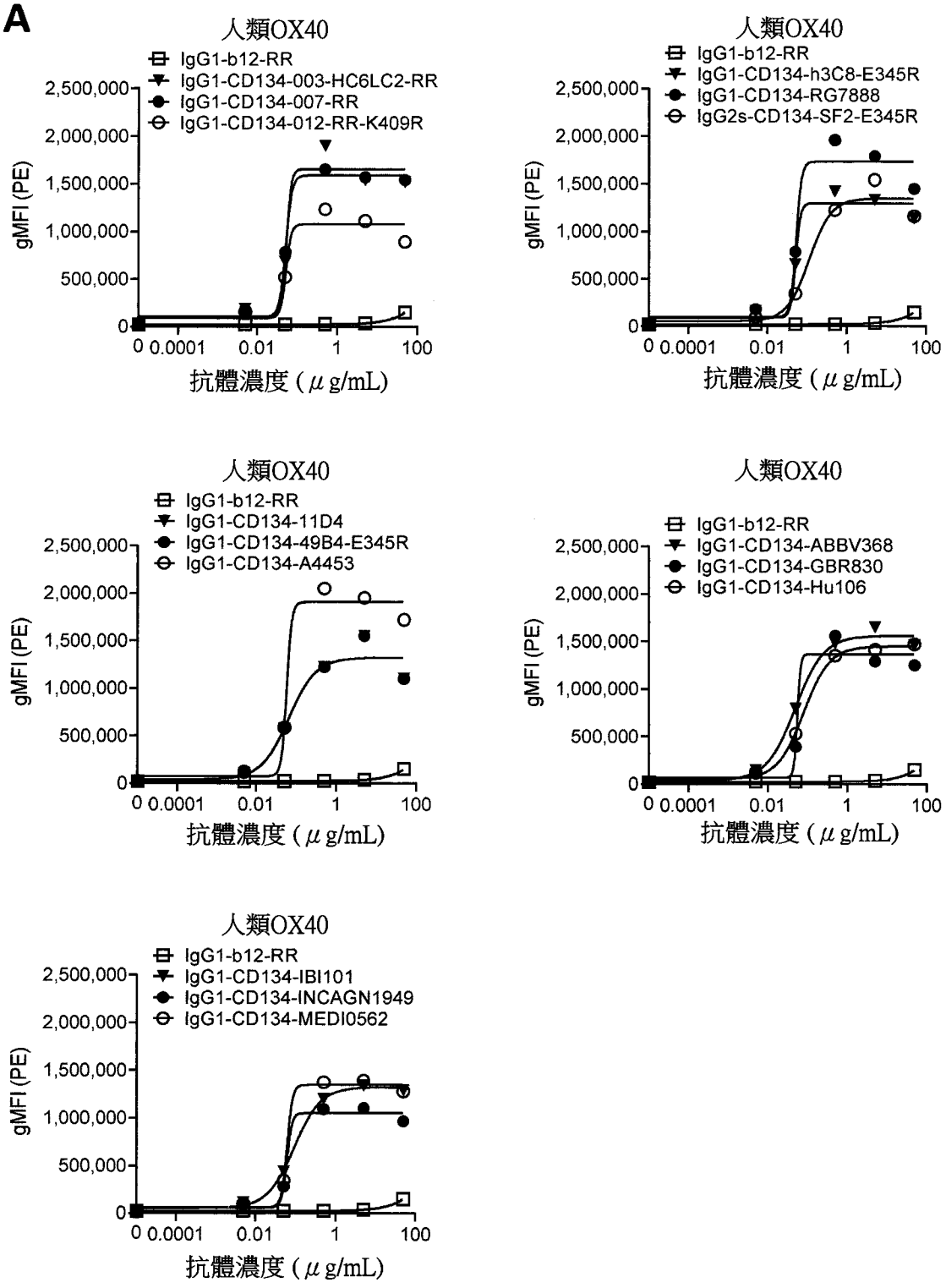
【請求項52】一種產生如請求項1至27中任一項之抗體之方法，其包含在培養基中及在適於產生該抗體之條件

下培養如請求項49或50之重組宿主細胞，及視需要地從該培養基中純化或單離該抗體。

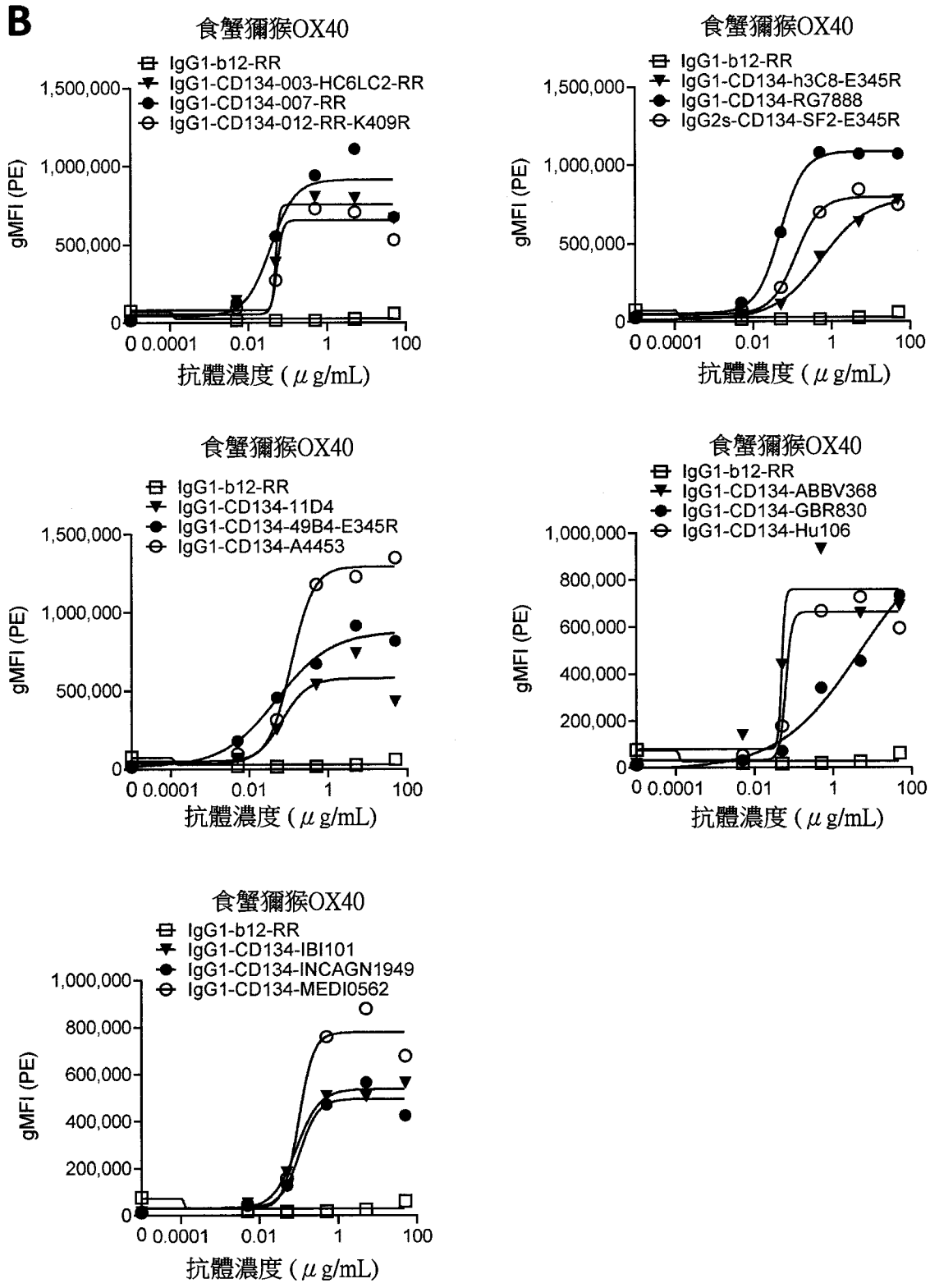
【請求項53】一種配件套組(kit-of-parts)，諸如用作伴隨診斷/用於鑑定在患者群體內對如請求項1至27中任一項所定義之抗體的治療具有反應傾向的彼等患者之套組，其包含如請求項1至27中任一項所定義之抗體；及該套組之使用說明。

【請求項54】一種抗個體獨特型抗體(anti-idiotypic antibody)，其與如請求項1至27中任一項所定義之能夠與OX40結合之抗原結合區結合。

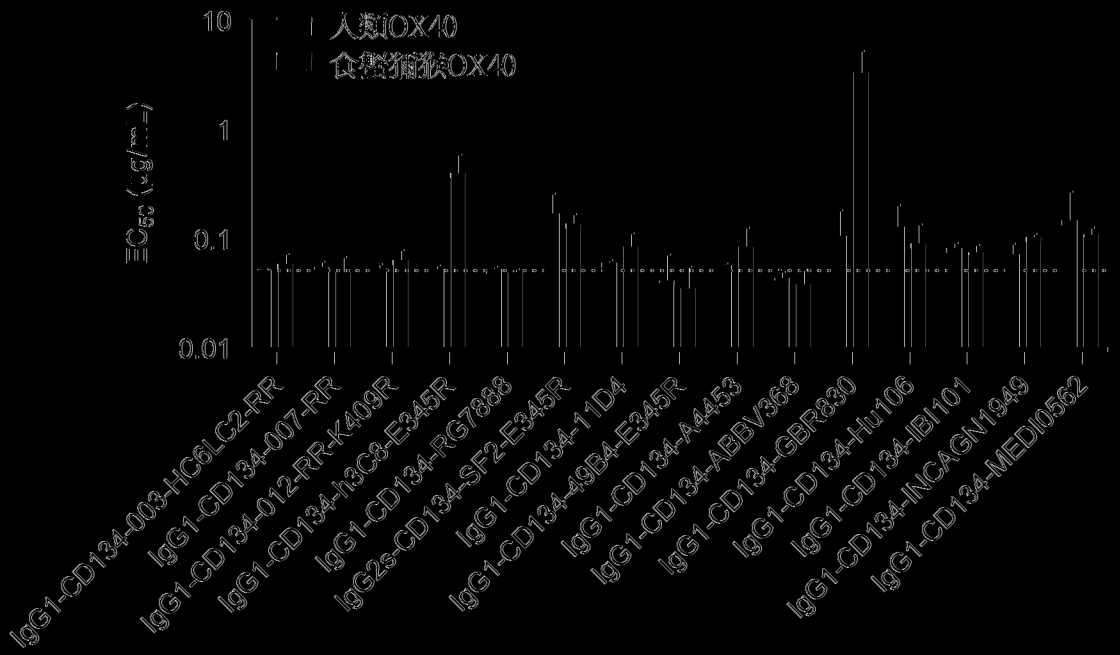
【發明圖式】


A
人類OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
gMFI (PE)
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
人類OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
gMFI (PE)
抗體濃度 (μg/mL)
人類OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-49B4-E345R
IgG1-CD134-A4453
gMFI (PE)
抗體濃度 (μg/mL)
人類OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
gMFI (PE)
抗體濃度 (μg/mL)
人類OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562
gMFI (PE)
抗體濃度 (μg/mL)

【圖 1】


B
食蟹獼猴OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
gMFI (PE)
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
食蟹獼猴OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
gMFI (PE)
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
食蟹獼猴OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-49B4-E345R
IgG1-CD134-A4453
gMFI (PE)
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
食蟹獼猴OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
食蟹獼猴OX40
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

【圖 1】(續)


10
1
0.1
0.01
人類IOX40
食蟹猿類IOX40
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-49B4-E345R
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562

|(圖 2)|


10 20 30 40 50
TNR4_HUMAN MCVGARRLGRGPCAALLLA LGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEKCRPG
TNR4_HUMAN Shuffle 1 MCVGARRLGRGPCAALLLA LGLGLSTVTGLNCVKDTYPSGHKCCREKCQPG
Shuffle 1
TNR4_HUMAN Shuffle 2 MCVGARRLGRGPCAALLLA LGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEKCRPG
TNR4_HUMAN Shuffle 3 MCVGARRLGRGPCAALLLA LGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEKCRPG
TNR4_HUMAN Shuffle 4 MCVGARRLGRGPCAALLLA LGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEKCRPG
TNR4_MOUSE ----MYVWVQQPTALLLALALTLGV TARRLNCVKDTYPSGHKCCREKCQPG
60 70 80 90 100
TNR4_HUMAN NGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
TNR4_HUMAN Shuffle 1 HGMVSRCDHTRDTVCHPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
Shuffle 1
TNR4_HUMAN Shuffle 2 NGMVSRCSRSQNTVCRPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSETKQNC
Shuffle 2
TNR4_HUMAN Shuffle 3 NGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
TNR4_HUMAN Shuffle 4 NGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
TNR4_MOUSE HGMVSRCDHTRDTVCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSETKQNC
110 120 130 140 150
TNR4_HUMAN TATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
TNR4_HUMAN Shuffle 1 TATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
TNR4_HUMAN Shuffle 2 TPTQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
TNR4_HUMAN Shuffle 3 TATQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
Shuffle 3
TNR4_HUMAN Shuffle 4 TATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGNNQACKPWTNC
Shuffle 4
TNR4_MOUSE TPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNC
160 170 180 190 200
TNR4_HUMAN TLAGKHTLQPASNSSDALCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
TNR4_HUMAN Shuffle 1 TLAGKHTLQPASNSSDALCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
TNR4_HUMAN Shuffle 2 TLAGKHTLQPASNSSDALCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
TNR4_HUMAN Shuffle 3 TLAGKHTLQPASNSSDALCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
TNR4_HUMAN Shuffle 4 TLSGKQTRQPASDSTDAVCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
TNR4_MOUSE TLSGKQTRQPASDSTDAVCEDRSTQATTTWETQRPTERPTTVQSTTVWPR
210 220 230 240 250
TNR4_HUMAN TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLP
TNR4_HUMAN Shuffle 1 TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLP
TNR4_HUMAN Shuffle 2 TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLP
TNR4_HUMAN Shuffle 3 TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLP
TNR4_HUMAN Shuffle 4 TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLGPLAILLALYLLRRDQRLP
TNR4_MOUSE TSETPSPPTLVTPEGPAPAVTLGLG-LGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLP
260 270 280
TNR4_HUMAN PDALLKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK
TNR4_HUMAN Shuffle 1 PDALLKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK
TNR4_HUMAN Shuffle 2 PDALLKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK
TNR4_HUMAN Shuffle 3 PDALLKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK
TNR4_HUMAN Shuffle 4 PDALLKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAK
TNR4_MOUSE -NTPKPCWGNSFRTPIQEEETDAHFTLAK

圖 3

```
                                10          20          30          40          50
人類 (TNR4_HUMAN)   MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLS-TVTGLHCVGDTYPSNDRCCHDCRPG
小鼠 (TNR4_MOUSE)   ------MYVWVQQPTALLLLASTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRDCQPG

                                60          70          80          90          100
人類 (TNR4_HUMAN)   NGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGEYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLC
小鼠 (TNR4_MOUSE)   HGMVSRCDHTRDTVCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSERKQNC

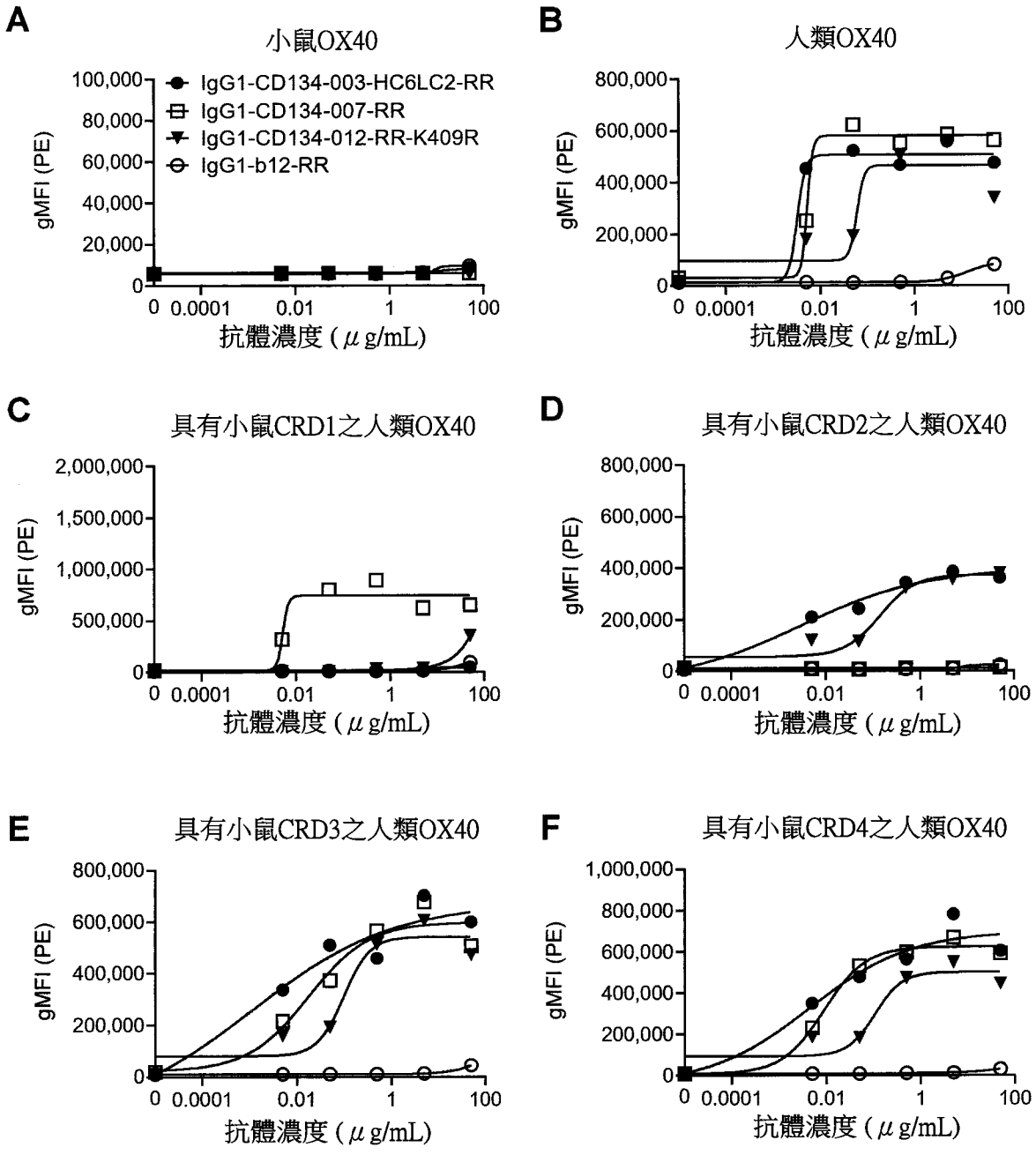
                                110         120         130         140         150
人類 (TNR4_HUMAN)   TATQDTVCRCRAGTQP-LDS-YKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNC
小鼠 (TNR4_MOUSE)   TPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNC

                                160         170         180         190         200
人類 (TNR4_HUMAN)   TLAGKHTLQPASNSSDALCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPR
小鼠 (TNR4_MOUSE)   TLSGKQTRHPASDSTDAVCEDRSLLATLAWETQRPTERPTLVQSTTVWPR

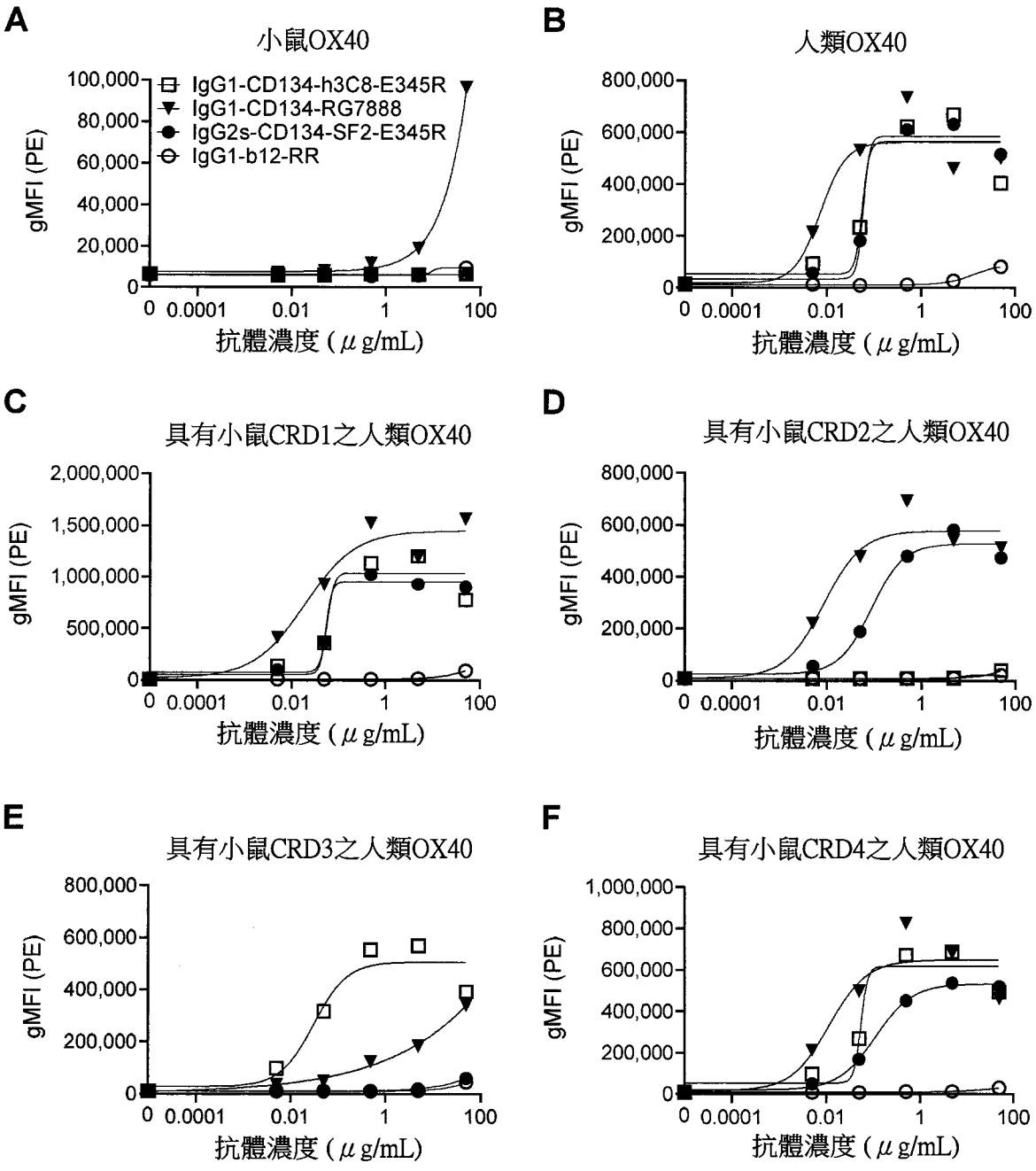
                                210         220         230         240         250
人類 (TNR4_HUMAN)   TSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLP
小鼠 (TNR4_MOUSE)   TSKLPSPPTLVLPEGPAEAVLLGLG-LGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLP

                                260         270         280
人類 (TNR4_HUMAN)   PDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
小鼠 (TNR4_MOUSE)   -NTPKPCWGNSFRTPIQEEQTLDAHHTLAKI
```

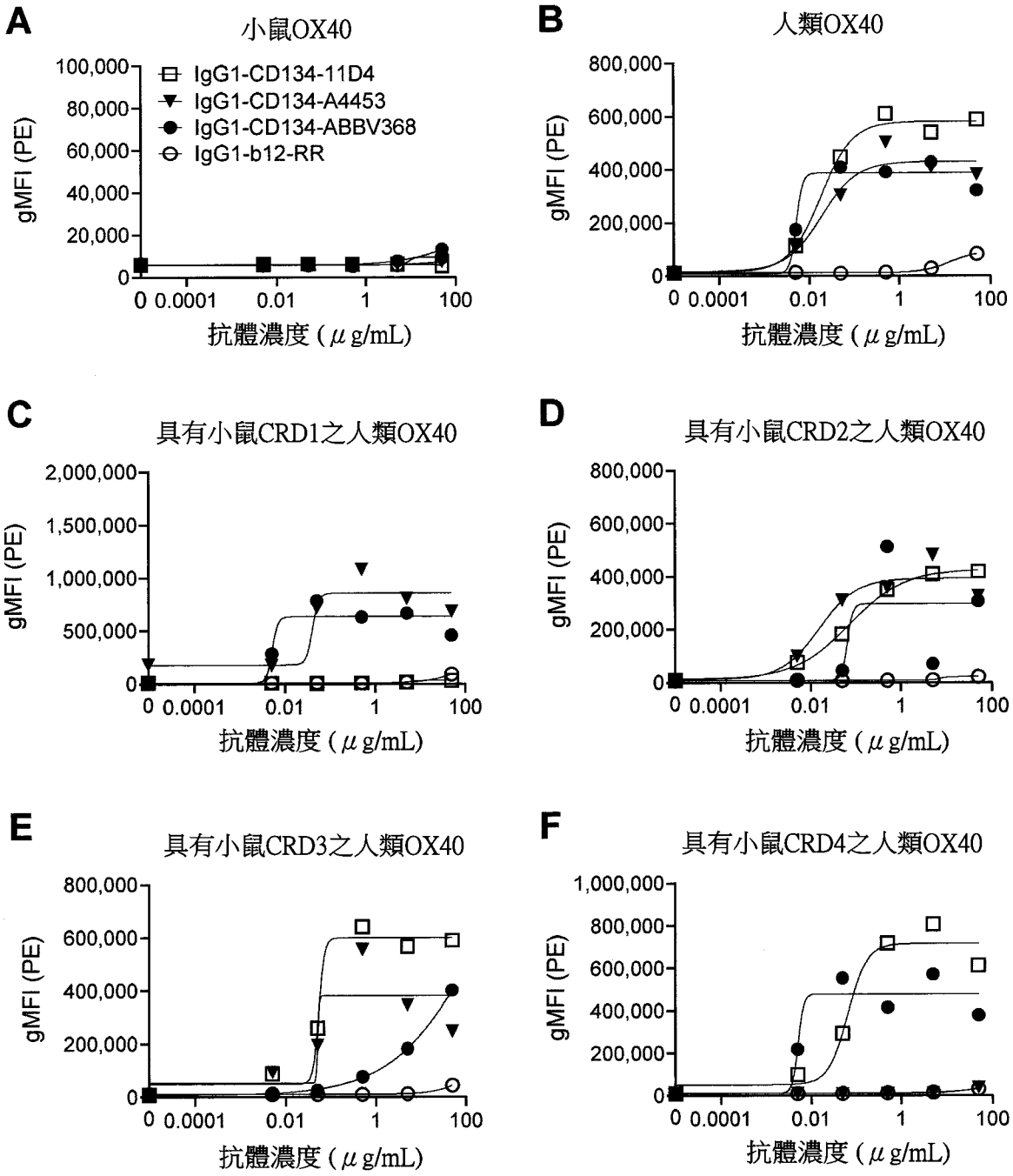
圖 4


A
小鼠OX40
gMFI (PE)
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-b12-RR
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
具有小鼠CRD1之人類OX40
gMFI (PE)
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
具有小鼠CRD2之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
E
具有小鼠CRD3之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
F
具有小鼠CRD4之人類OX40
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

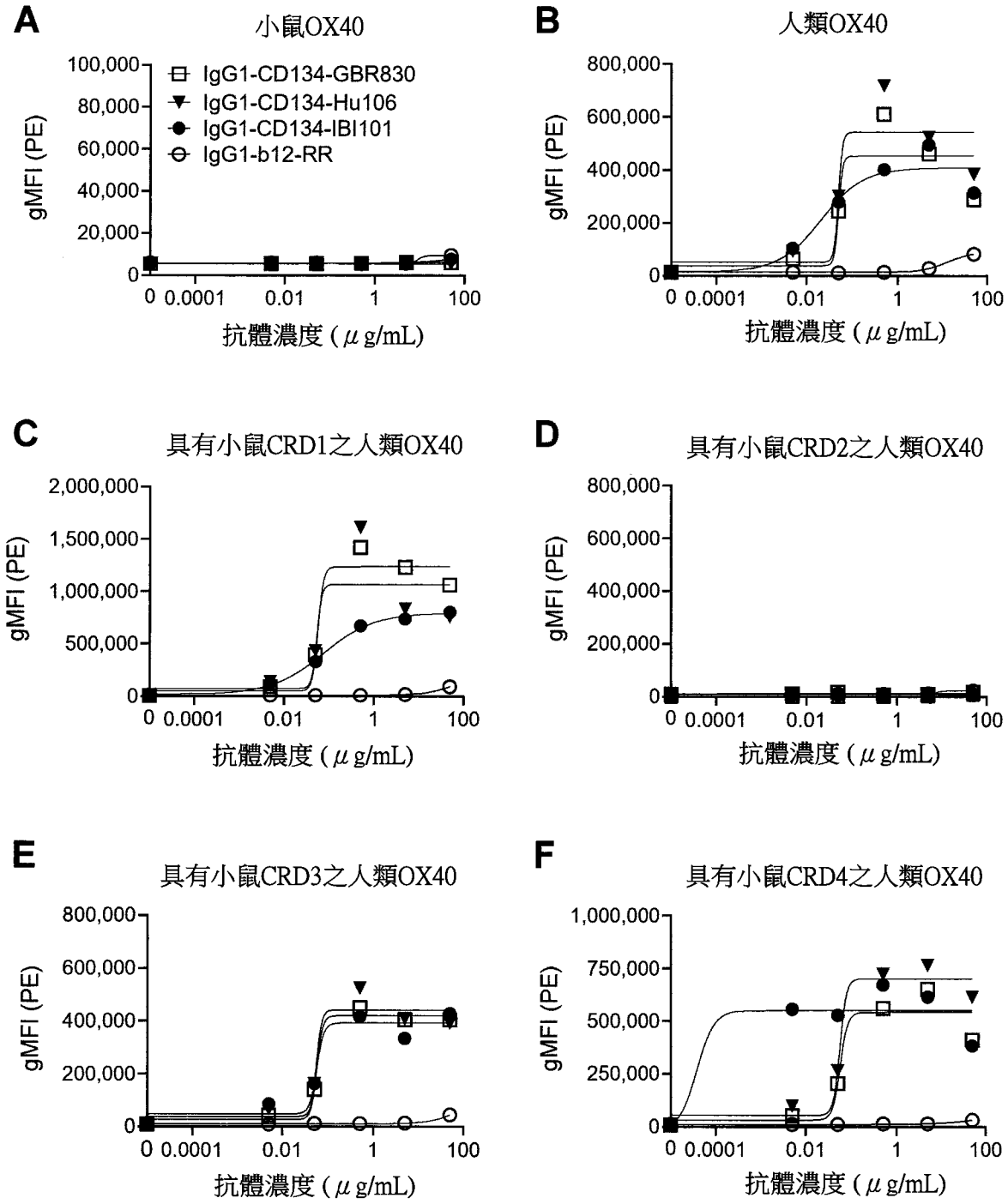
【圖 5】


A
小鼠OX40
gMFI (PE)
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-b12-RR
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
具有小鼠CRD1之人類OX40
gMFI (PE)
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
具有小鼠CRD2之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
E
具有小鼠CRD3之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
F
具有小鼠CRD4之人類OX40
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

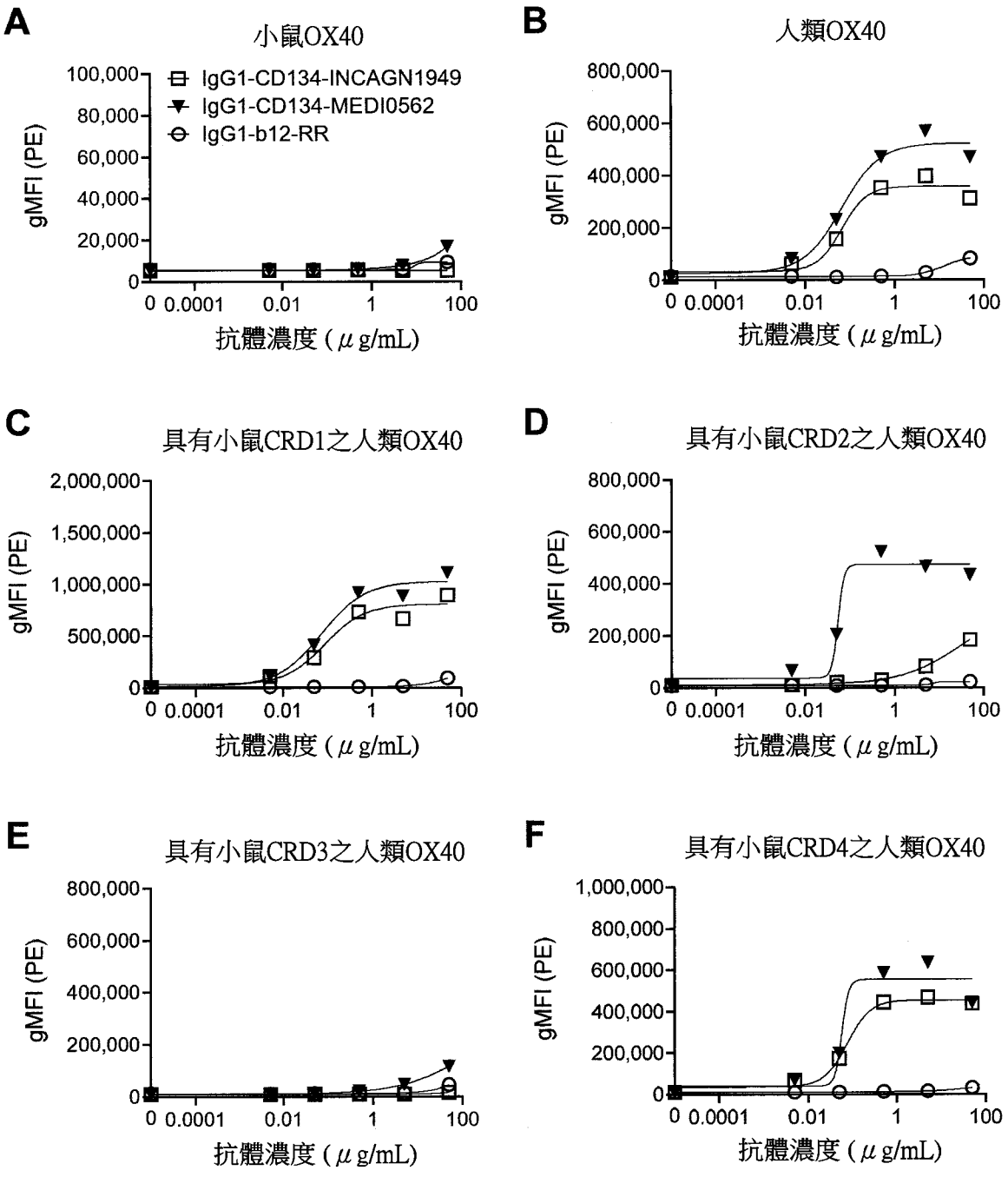
【圖 6】


A
小鼠OX40
gMFI (PE)
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-b12-RR
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
具有小鼠CRD1之人類OX40
gMFI (PE)
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
具有小鼠CRD2之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
E
具有小鼠CRD3之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
F
具有小鼠CRD4之人類OX40
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

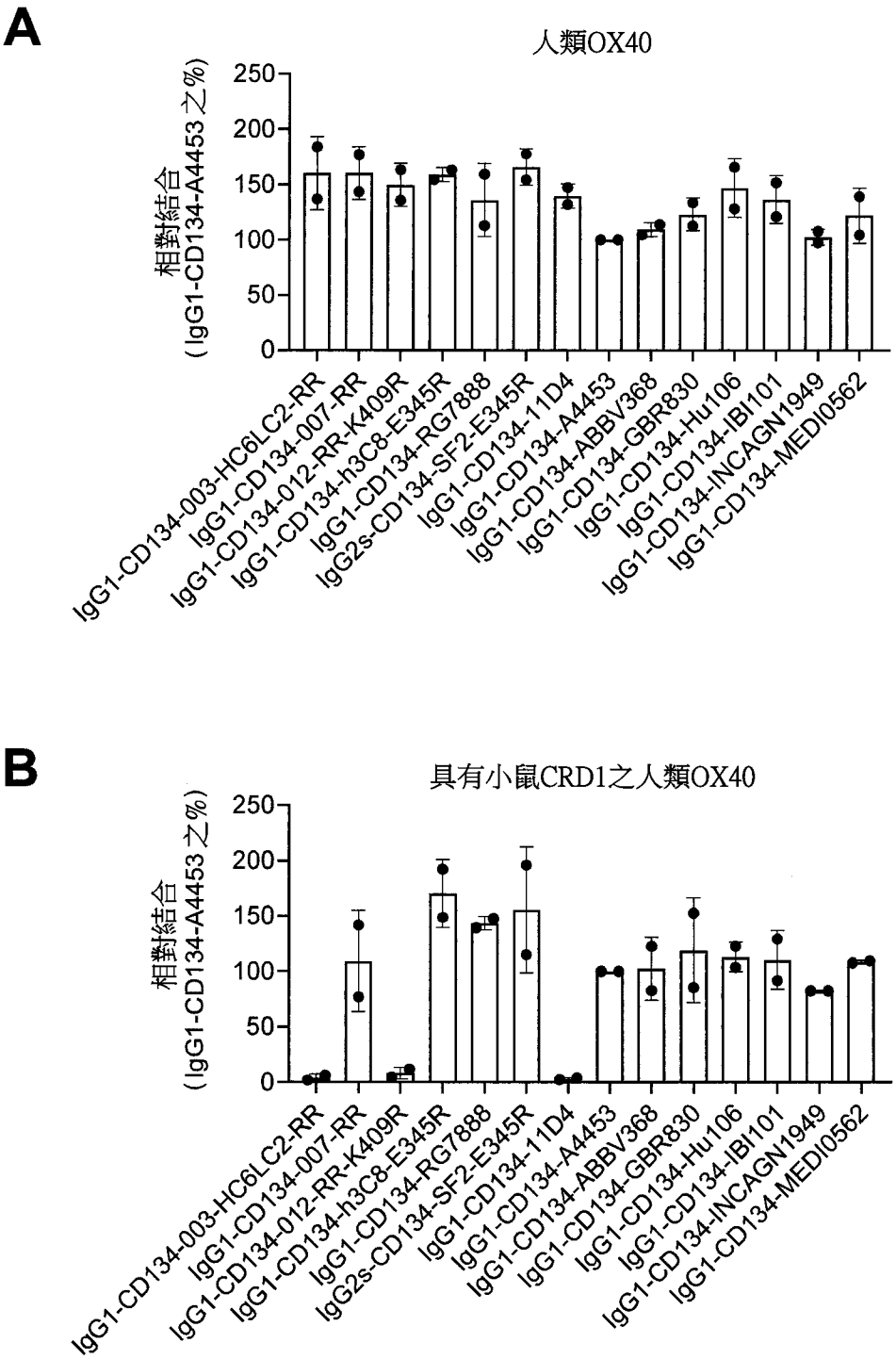
【圖 7】


A
小鼠OX40
gMFI (PE)
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-b12-RR
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
具有小鼠CRD1之人類OX40
gMFI (PE)
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
具有小鼠CRD2之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
E
具有小鼠CRD3之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
F
具有小鼠CRD4之人類OX40
gMFI (PE)
1,000,000
750,000
500,000
250,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

【圖 8】

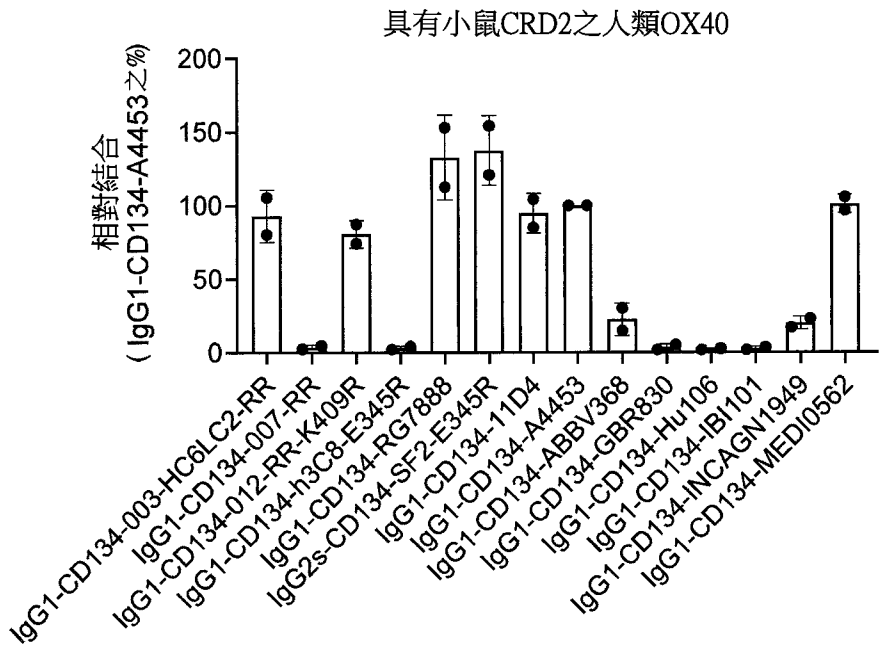

A
小鼠OX40
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562
IgG1-b12-RR
gMFI (PE)
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
具有小鼠CRD1之人類OX40
gMFI (PE)
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
具有小鼠CRD2之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
E
具有小鼠CRD3之人類OX40
gMFI (PE)
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)
F
具有小鼠CRD4之人類OX40
gMFI (PE)
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0 0.0001 0.01 1 100
抗體濃度 (μg/mL)

【圖 9】


A
人類OX40
相對結合
(IgG1-CD134-A4453 之%)
250
200
150
100
50
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562
B
具有小鼠CRD1之人類OX40
相對結合
(IgG1-CD134-A4453 之%)
250
200
150
100
50
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562

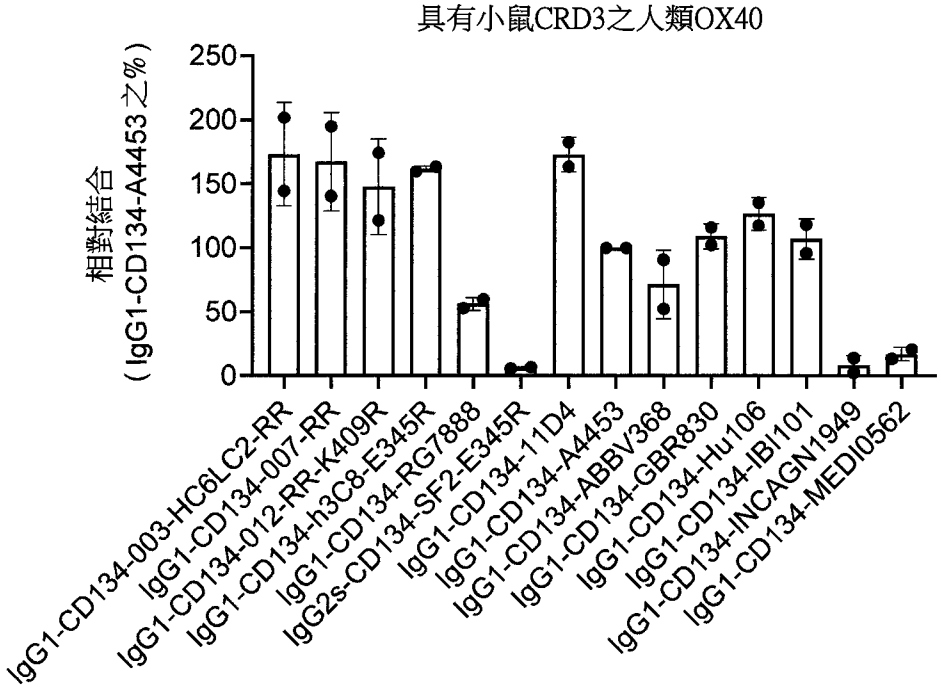
【圖 10】

C


具有小鼠CRD2之人類OX40
相對結合
(IgG1-CD134-A4453之%)
200
150
100
50
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562

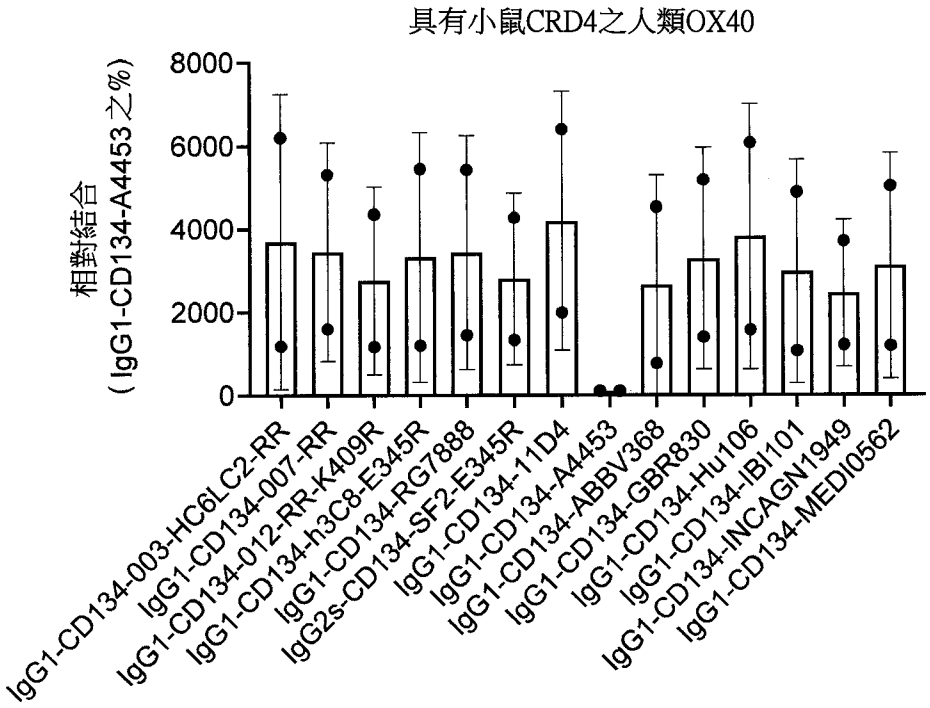
【圖 10】(續)

D

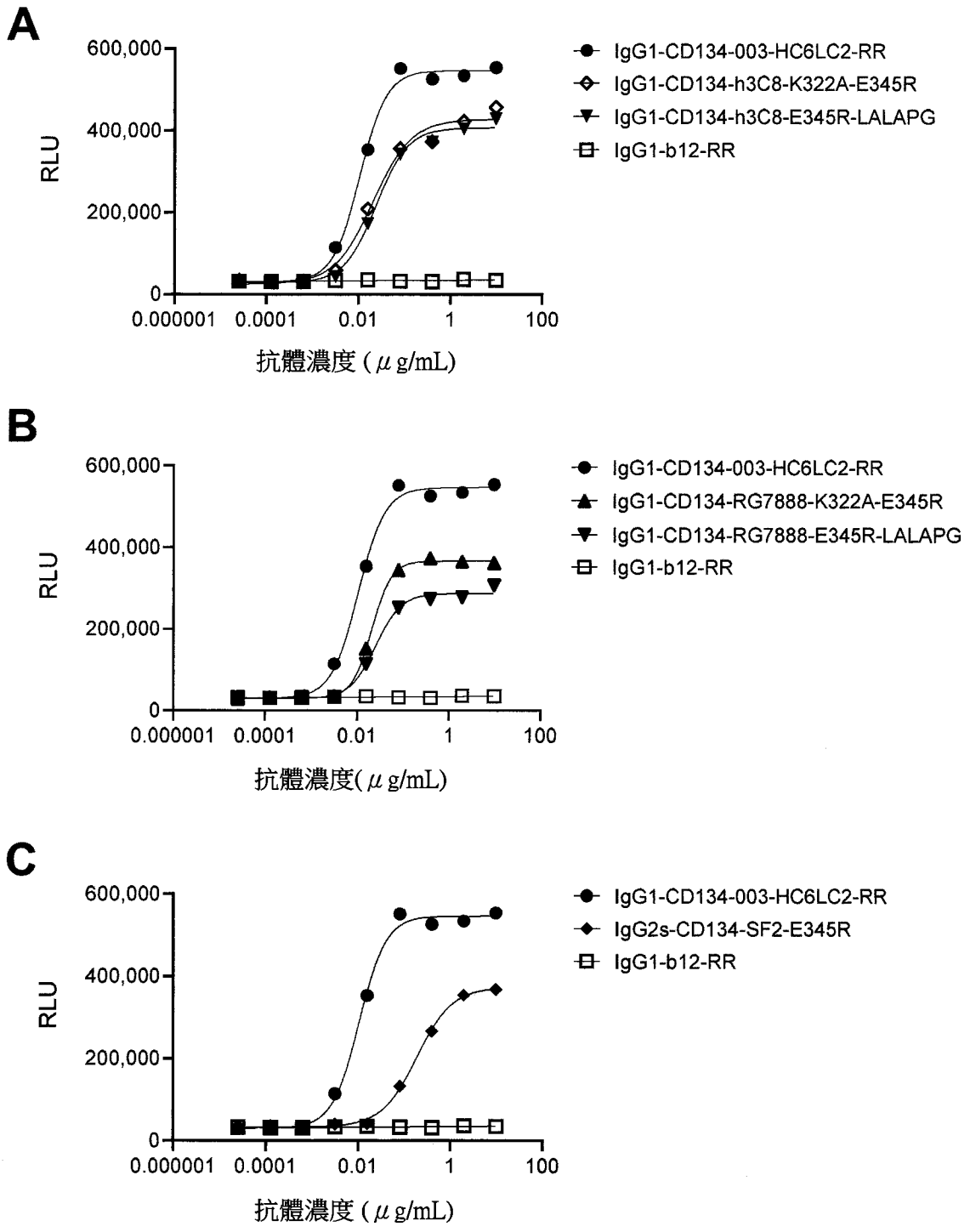

具有小鼠CRD3之人類OX40
相對結合
（IgG1-CD134-A4453之%）
250
200
150
100
50
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562

【圖 10】(續)

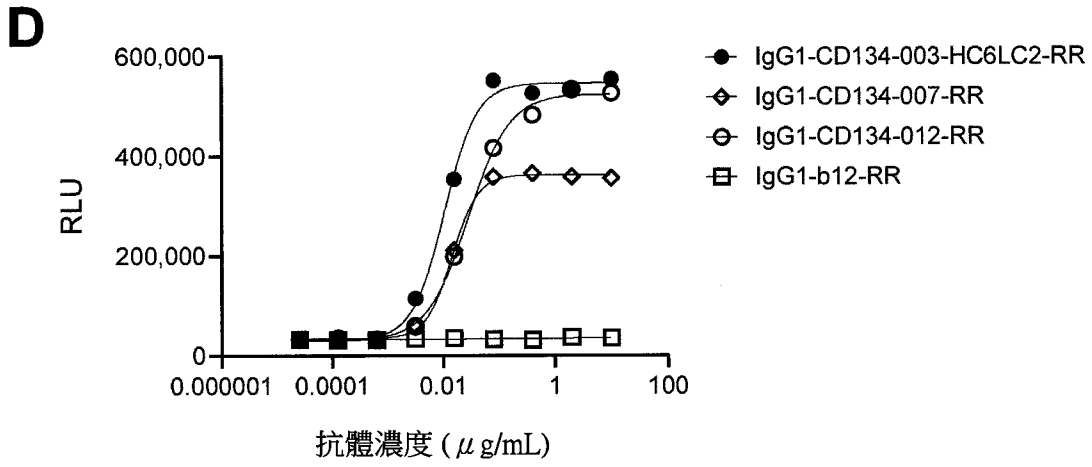
E

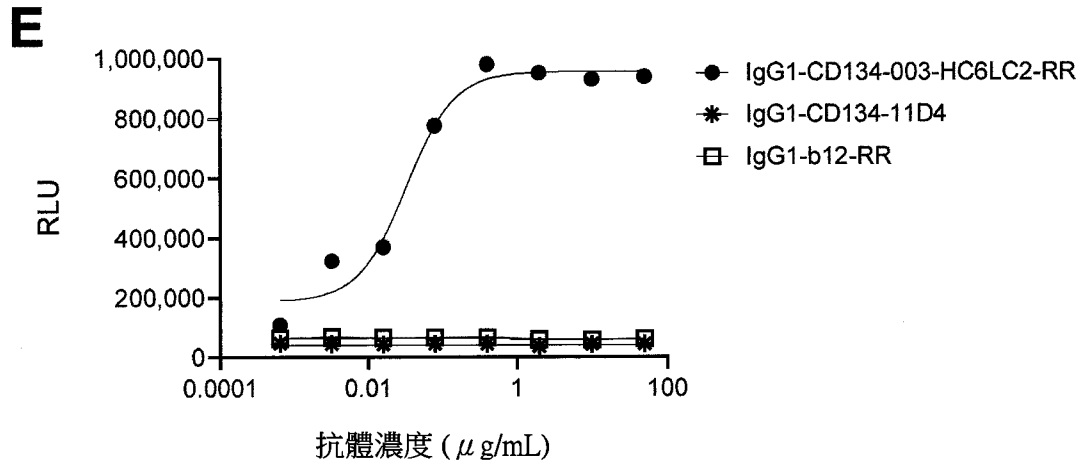

具有小鼠CRD4之人類OX40
相對結合
(IgG1-CD134-A4453之%)
8000
6000
4000
2000
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR-K409R
IgG1-CD134-h3C8-E345R
IgG1-CD134-RG7888
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-A4453
IgG1-CD134-ABBV368
IgG1-CD134-GBR830
IgG1-CD134-Hu106
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-MEDI0562

【圖 10】(續)

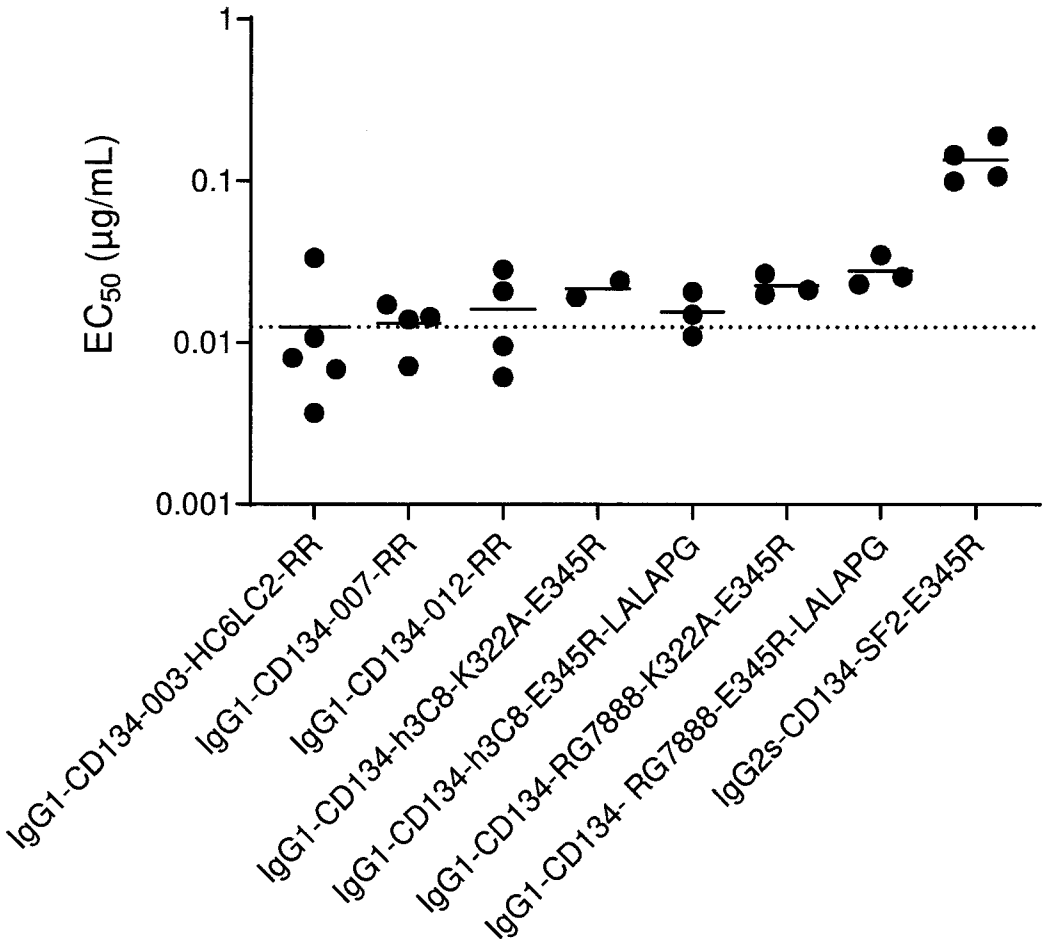

A
600,000
400,000
200,000
0
RLU
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R
IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG
IgG1-b12-RR
B
600,000
400,000
200,000
0
RLU
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度(μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R
IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG
IgG1-b12-RR
C
600,000
400,000
200,000
0
RLU
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-b12-RR

【圖 11】


D
600,000
400,000
200,000
0
RLU
0.000001
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR
IgG1-b12-RR

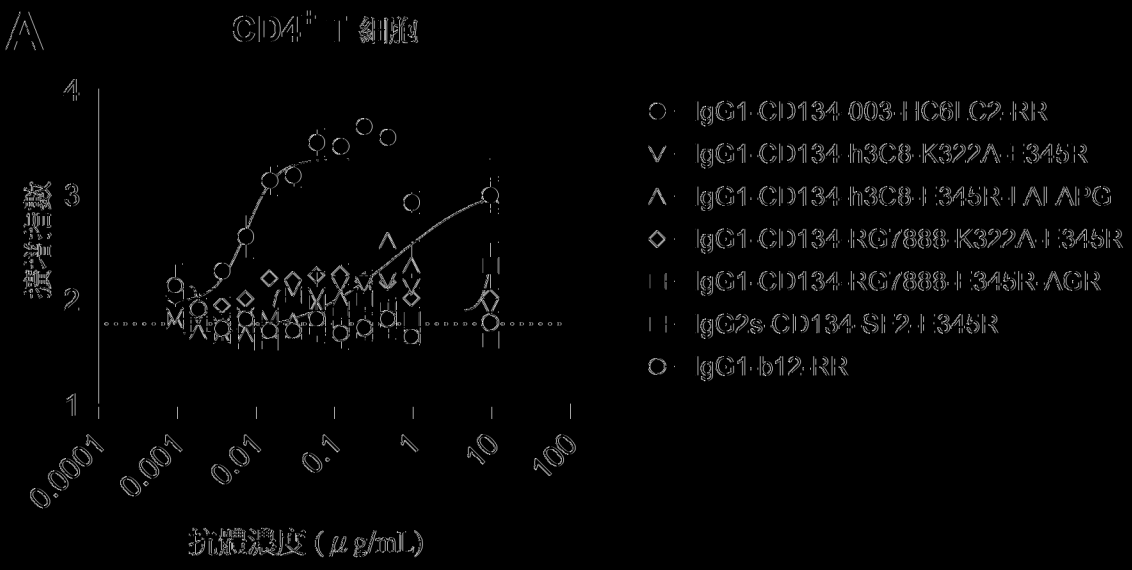

E
1,000,000
800,000
600,000
400,000
200,000
0
RLU
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-b12-RR

【圖 11】(續)

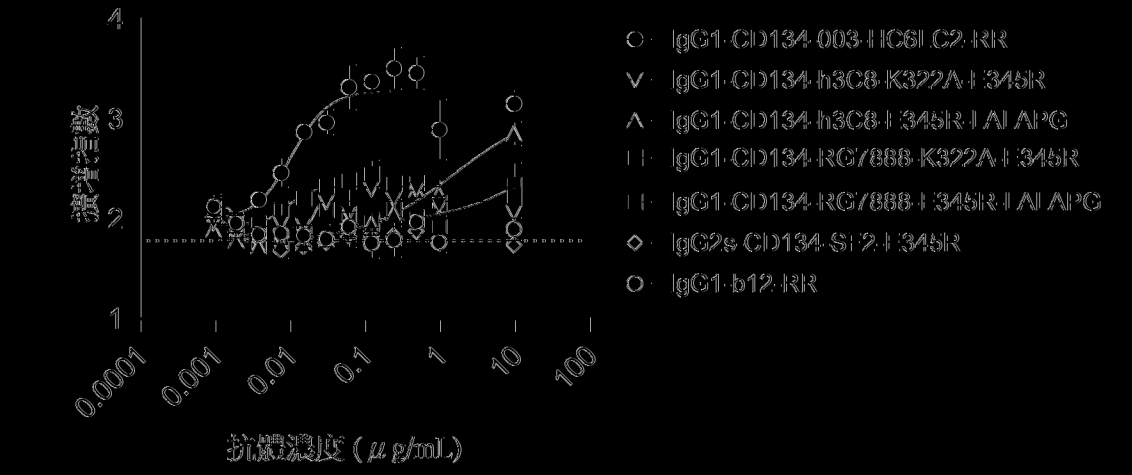

1
0.1
0.01
0.001
EC50 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-007-RR
IgG1-CD134-012-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R
IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R
IgG1-CD134- RG7888-E345R-LALAPG
IgG2s-CD134-SF2-E345R

【圖 12】

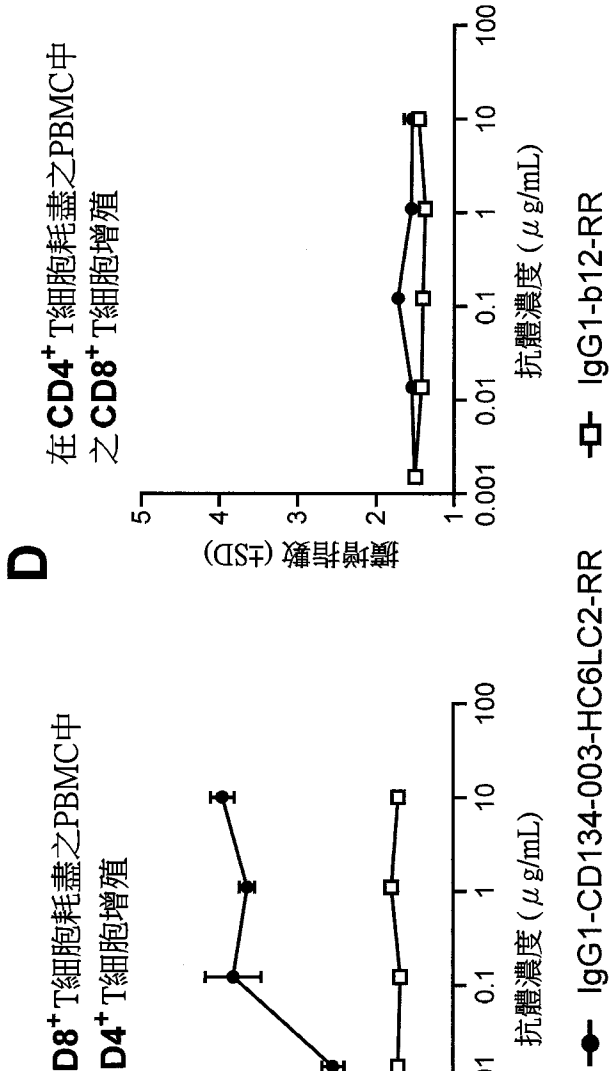
A


CD4+ T 細胞
4
3
2
1
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度（μg/mL）
IgG1-CD134-003-IC6I C2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-345R
IgG1-CD134-h3C8-345R-AI APG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-345R
IgG1-CD134-RG7888-345R-AGR
IgG2s-CD134-SI 2-345R
IgG1-b12-RR

B


CD8+ T 細胞
4
3
2
1
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度（μg/mL）
IgG1-CD134-003-IC6I C2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-345R
IgG1-CD134-h3C8-345R-AI APG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-345R
IgG1-CD134-RG7888-345R-AI APG
IgG2s-CD134-SI 2-345R
IgG1-b12-RR

（圖 13）


C
在 CD8+ T細胞耗盡之PBMC中
之 CD4+ T細胞增殖
擴增指數 (±SD)
抗體濃度 (μg/mL)
D
在 CD4+ T細胞耗盡之PBMC中
之 CD8+ T細胞增殖
擴增指數 (±SD)
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR

【圖 13】(續)

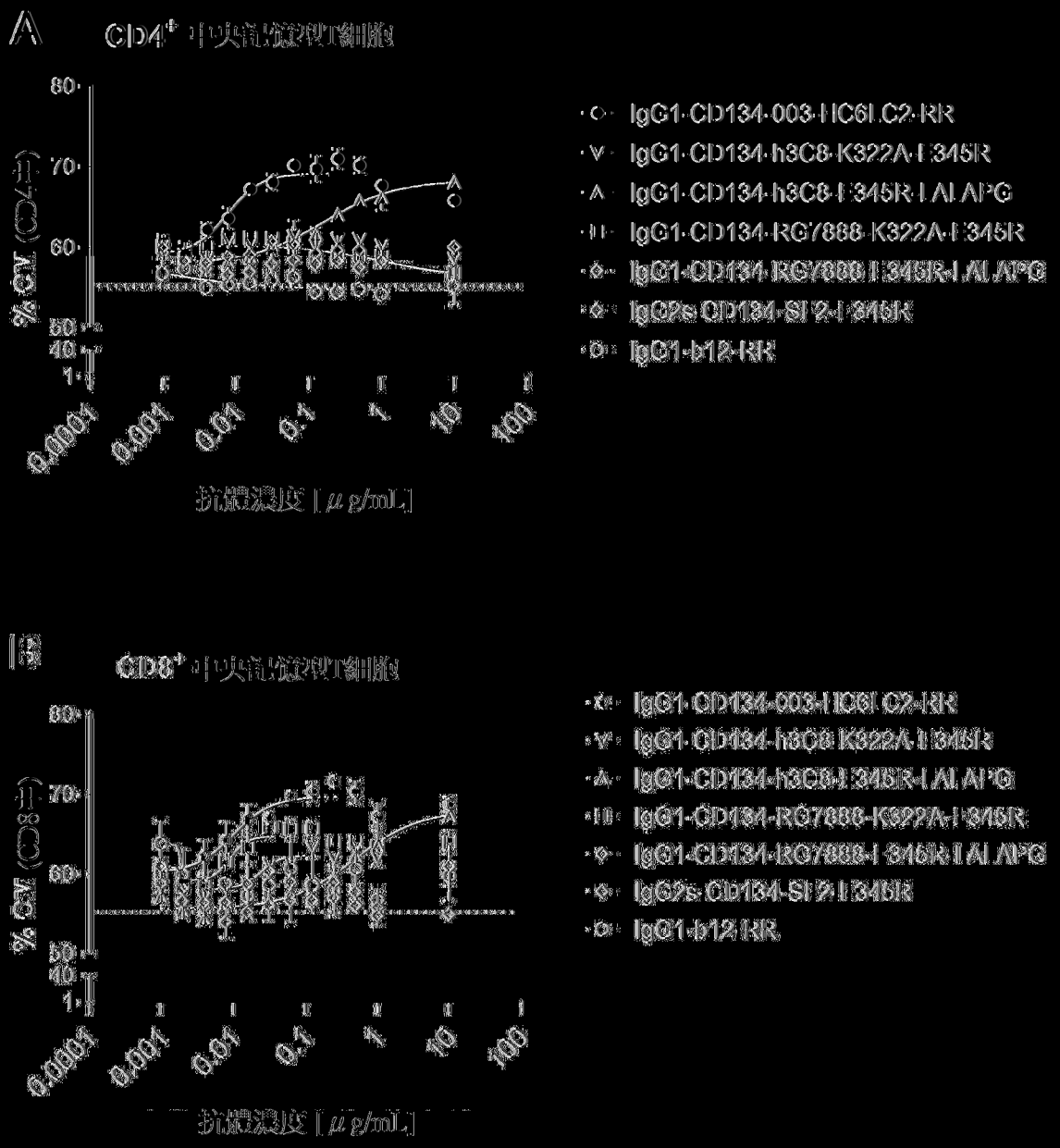
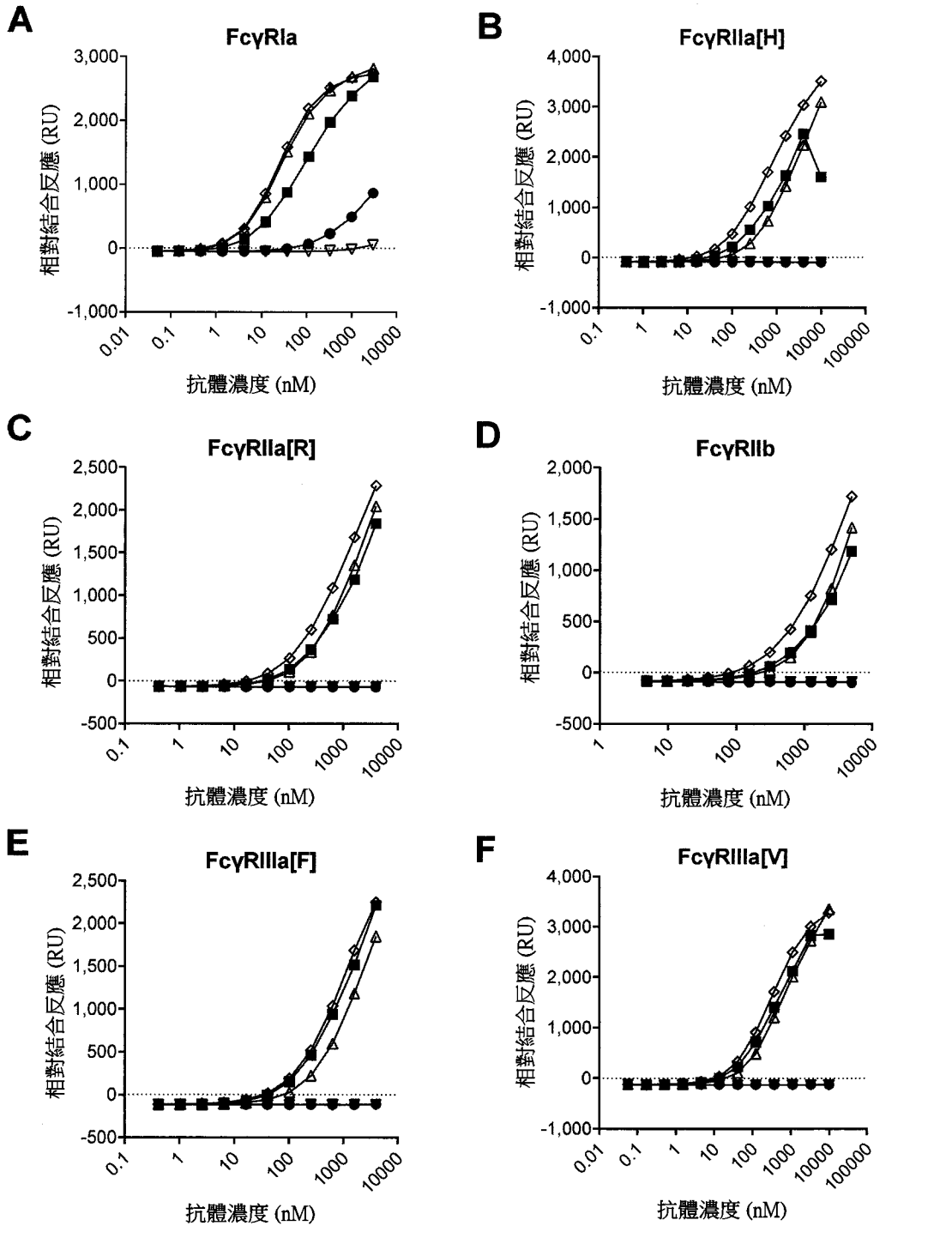
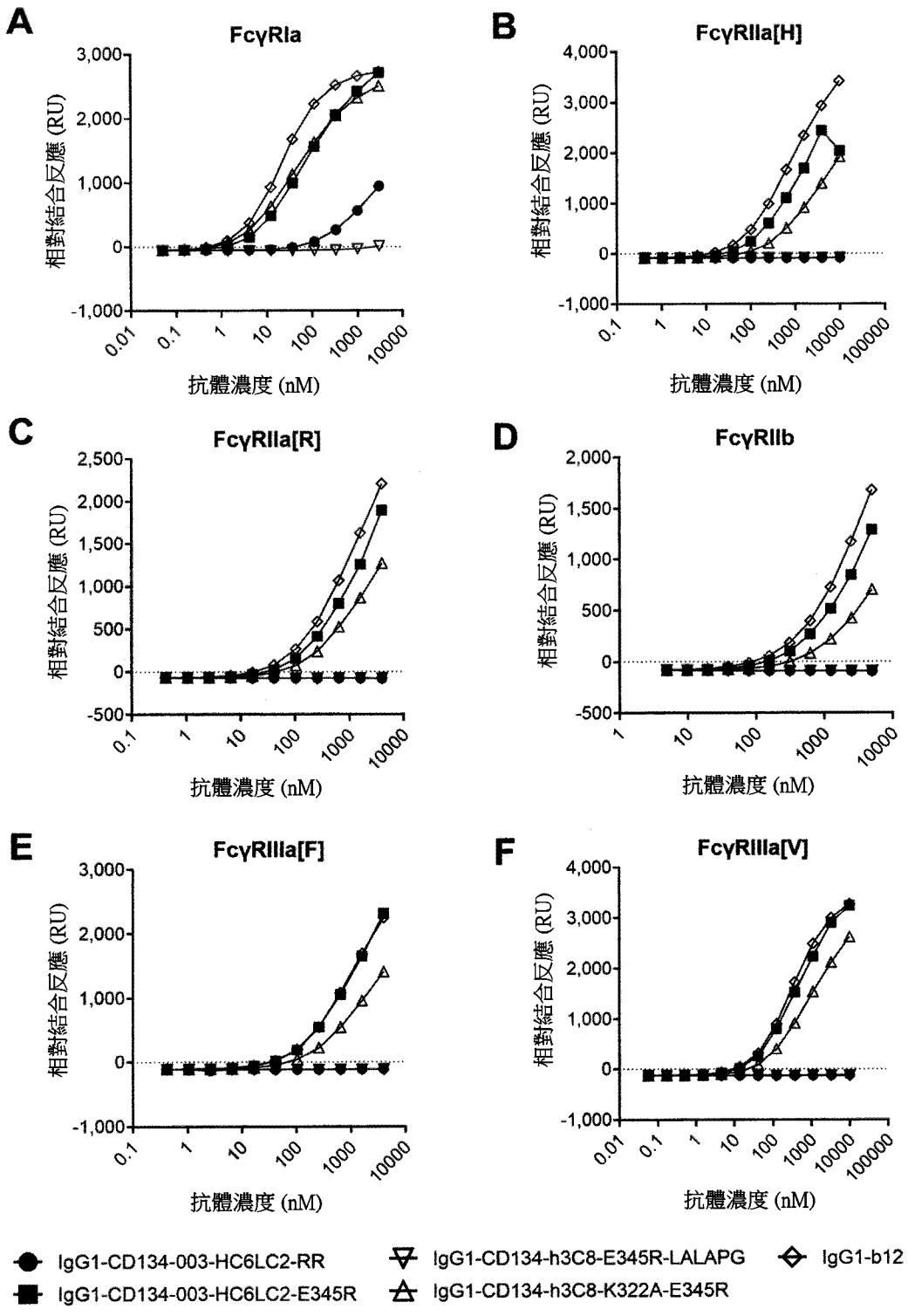

A
CD4+ 中央記憶型T細胞
% CM (CD4+)
80
70
60
50
40
1
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 [μg/mL]
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-L345R
IgG1-CD134-h3C8-L345R-LALAPG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-L345R
IgG1-CD134-RG7888-L345R-LALAPG
IgG2s-CD134-SI2-L345R
IgG1-b12-RR
B
CD8+ 中央記憶型T細胞
% CM (CD8+)
抗體濃度 [μg/mL]
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-L345R
IgG1-CD134-h3C8-L345R-LALAPG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-L345R
IgG1-CD134-RG7888-L345R-LALAPG
IgG2s-CD134-SI2-L345R
IgG1-b12-RR

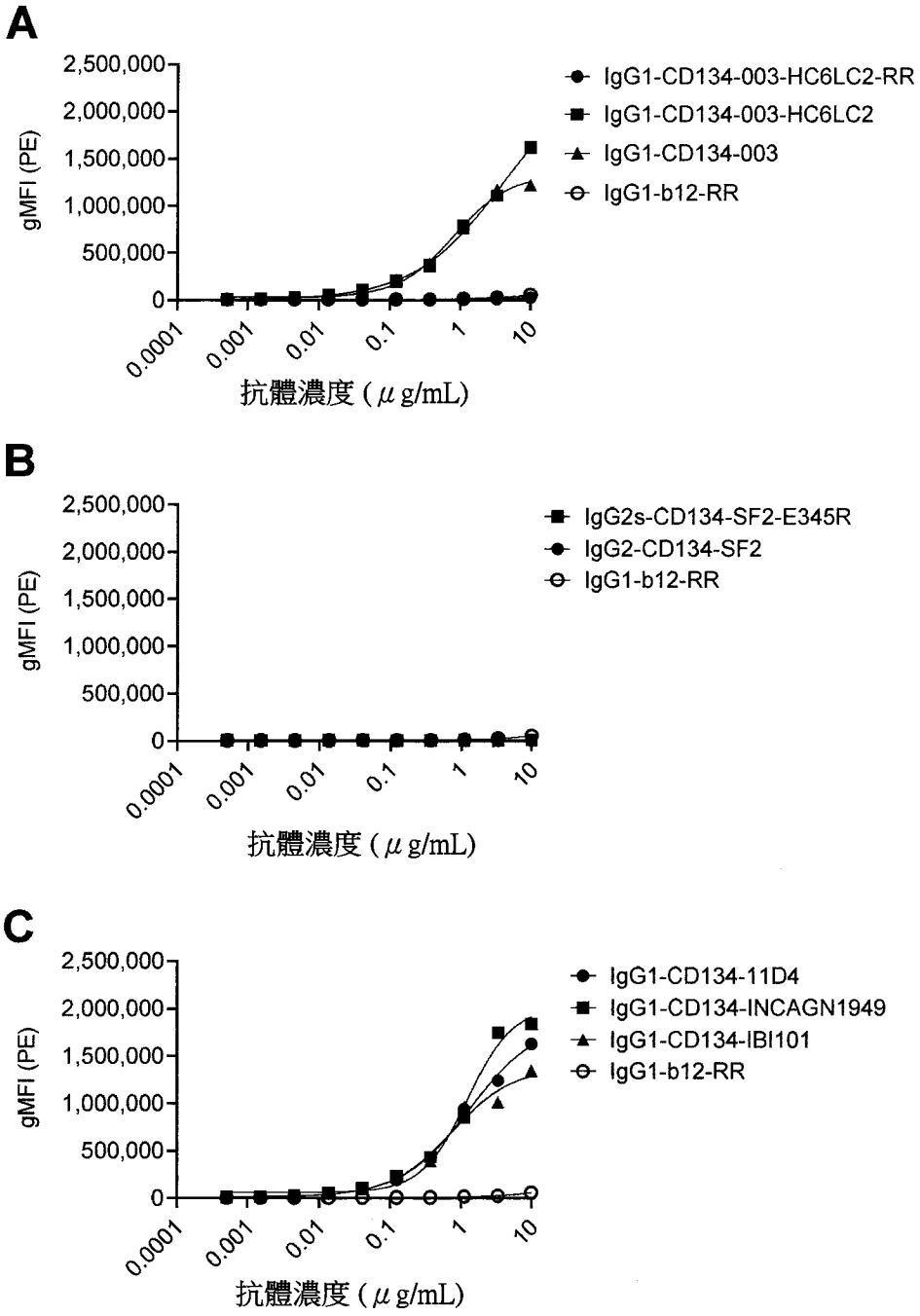
圖 14


A
FcγRIa
B
FcγRIIa[H]
C
FcγRIIa[R]
D
FcγRIIb
E
FcγRIIIa[F]
F
FcγRIIIa[V]
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-E345R
IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG
IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R
IgG1-b12

【圖 15】

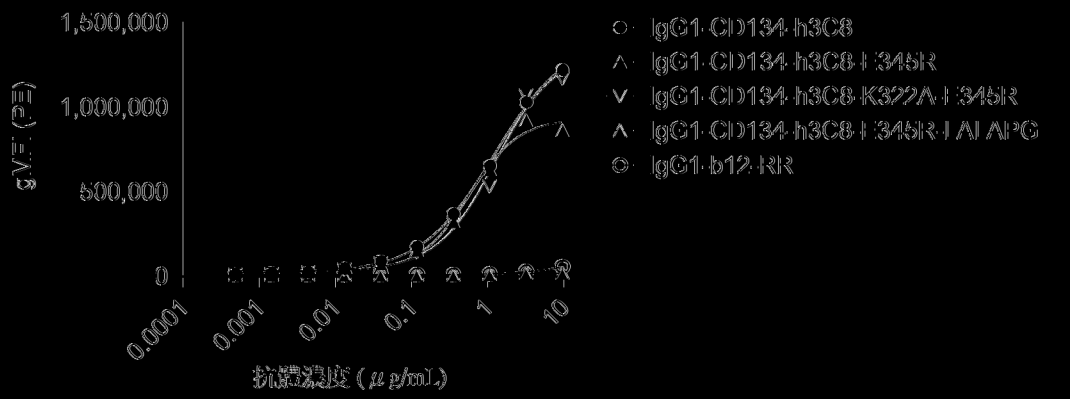

A
FcγRIa
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
B
FcγRIIa[H]
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
C
FcγRIIa[R]
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
D
FcγRIIb
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
E
FcγRIIIa[F]
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
F
FcγRIIIa[V]
相對結合反應 (RU)
抗體濃度 (nM)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-E345R
IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG
IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R
IgG1-b12

【圖 16】


A
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
gMFI (PE)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2
IgG1-CD134-003
IgG1-b12-RR
B
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
gMFI (PE)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG2-CD134-SF2
IgG1-b12-RR
C
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
gMFI (PE)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-INCAGN1949
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-b12-RR

【圖 17】

D)


1,500,000
1,000,000
500,000
0
gVE (cells)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
hGC1-CD134-h3C8
hGC1-CD134-h3C8 I 345R
hGC1-CD134-h3C8 K322A I 345R
hGC1-CD134-h3C8 I 345R I AI APG
hGC1-b12-RR

E)

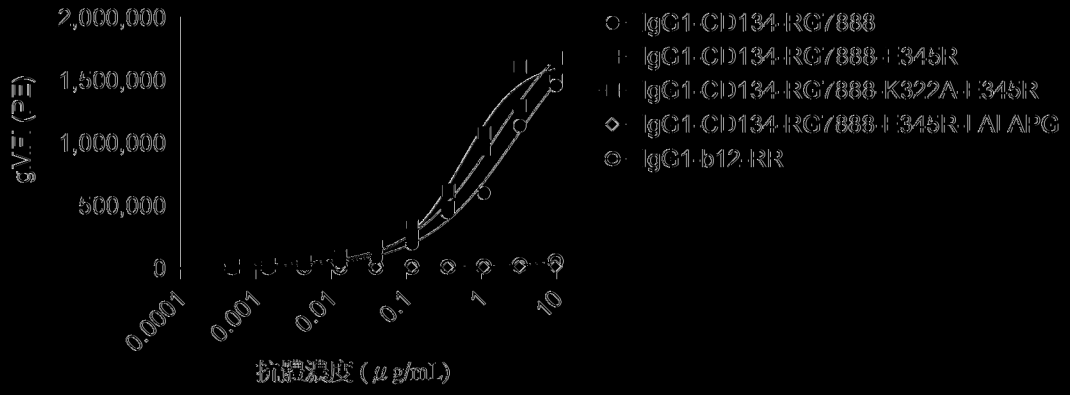
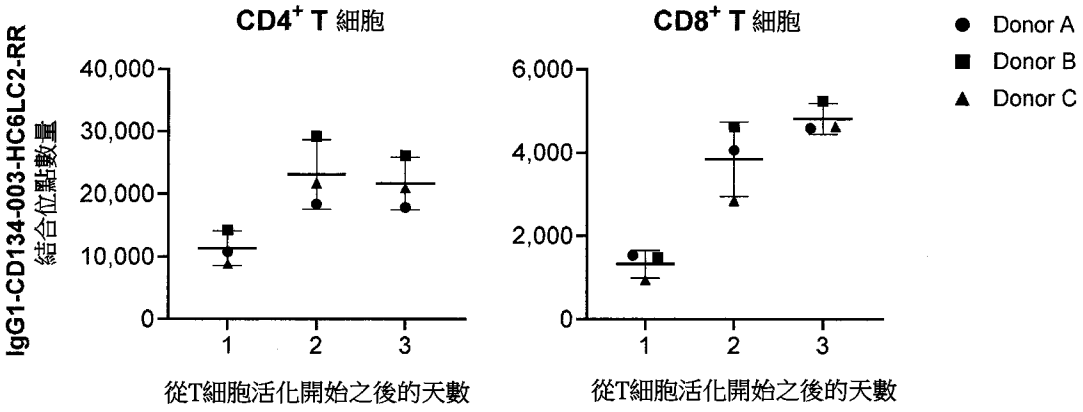
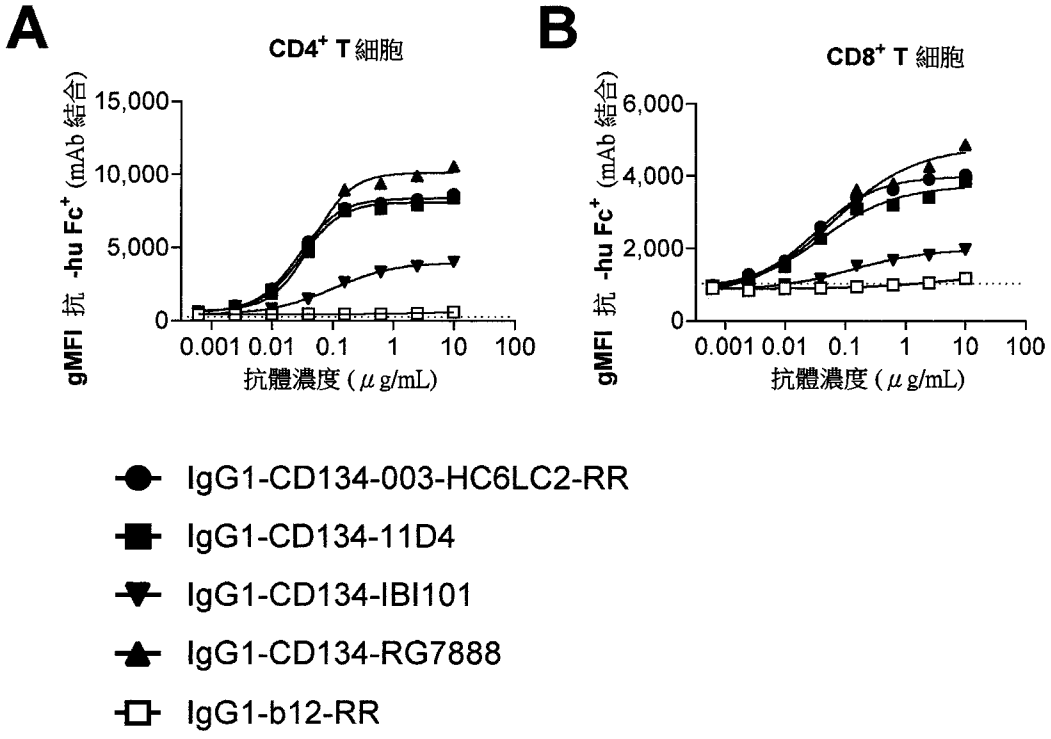

2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
gVE (cells)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
hGC1-CD134-RG7888
hGC1-CD134-RG7888 I 345R
hGC1-CD134-RG7888 K322A I 345R
hGC1-CD134-RG7888 I 345R I AI APG
hGC1-b12-RR

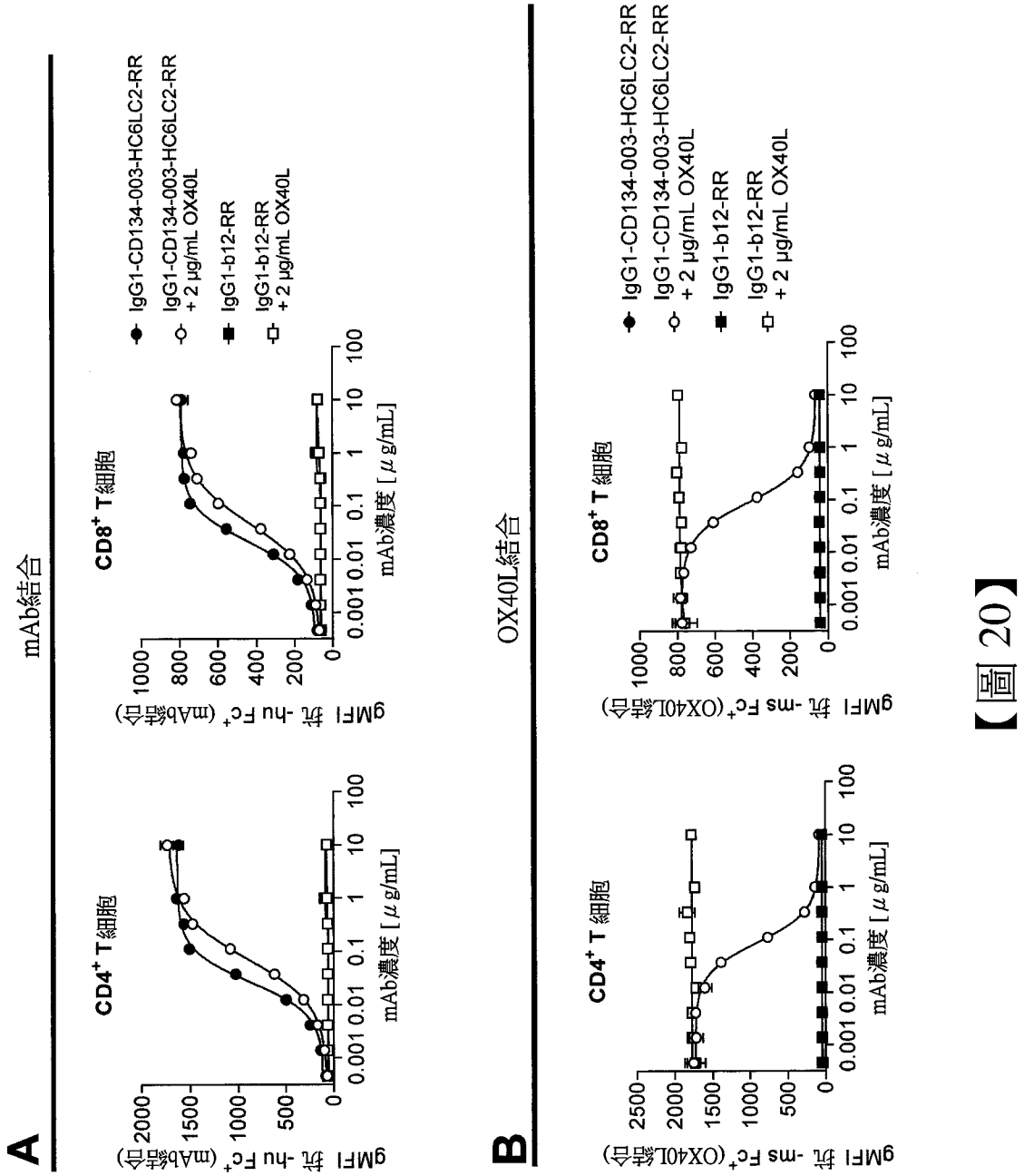
圖 17 (續)


CD4+ T 細胞
CD8+ T 細胞
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
結合位點數量
40,000
30,000
20,000
10,000
0
6,000
4,000
2,000
1
2
3
從T細胞活化開始之後的天數
Donor A
Donor B
Donor C

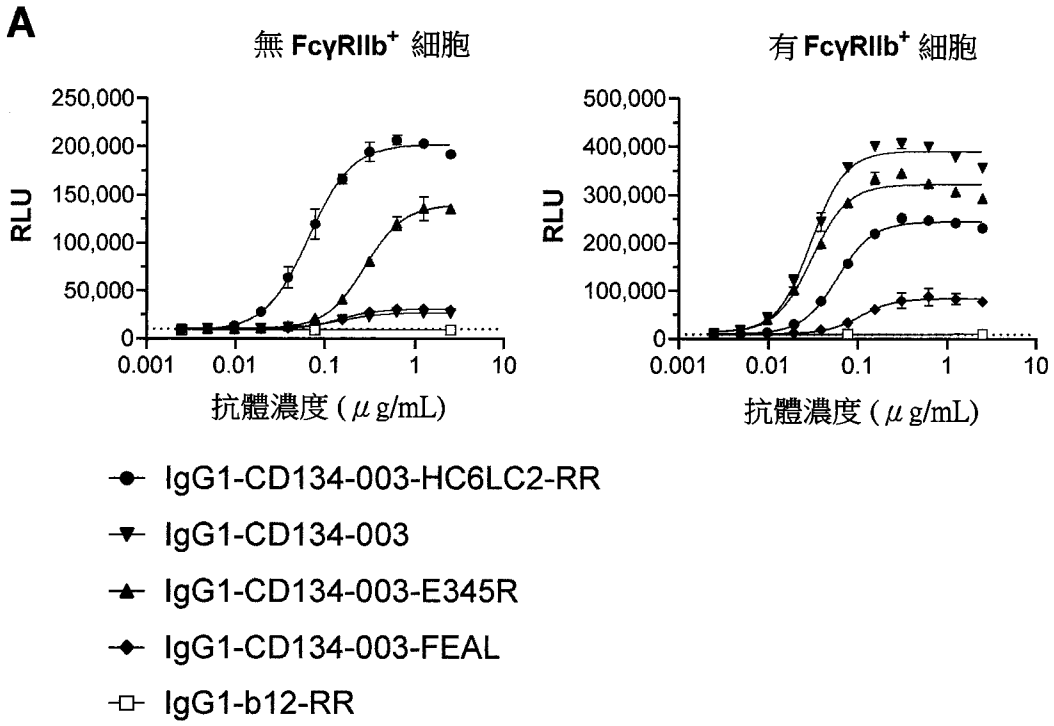
【圖 18】


A
B
CD4+ T 細胞
CD8+ T 細胞
gMFI 抗 -hu Fc+ (mAb 結合)
15,000
10,000
5,000
6,000
4,000
2,000
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-CD134-RG7888
IgG1-b12-RR

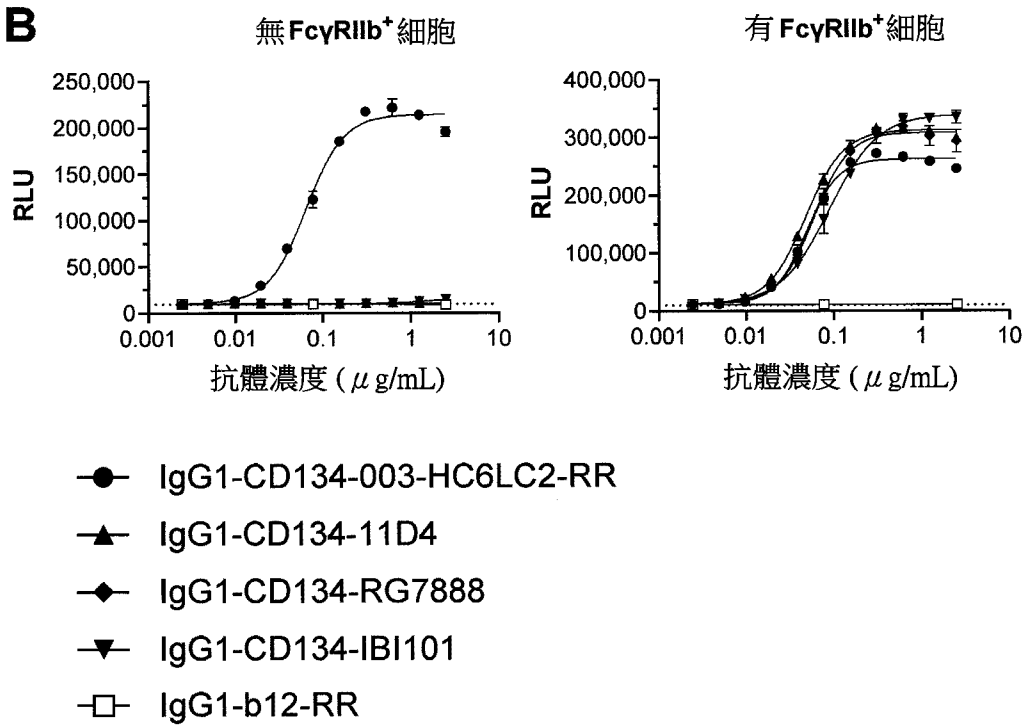
【圖 19】


A
mAb結合
CD4+ T細胞
gMFI 抗 -hu Fc+ (mAb結合)
mAb濃度 [μg/mL]
CD8+ T細胞
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR + 2 μg/mL OX40L
IgG1-b12-RR
IgG1-b12-RR + 2 μg/mL OX40L
B
OX40L結合
gMFI 抗 -ms Fc+ (OX40L結合)

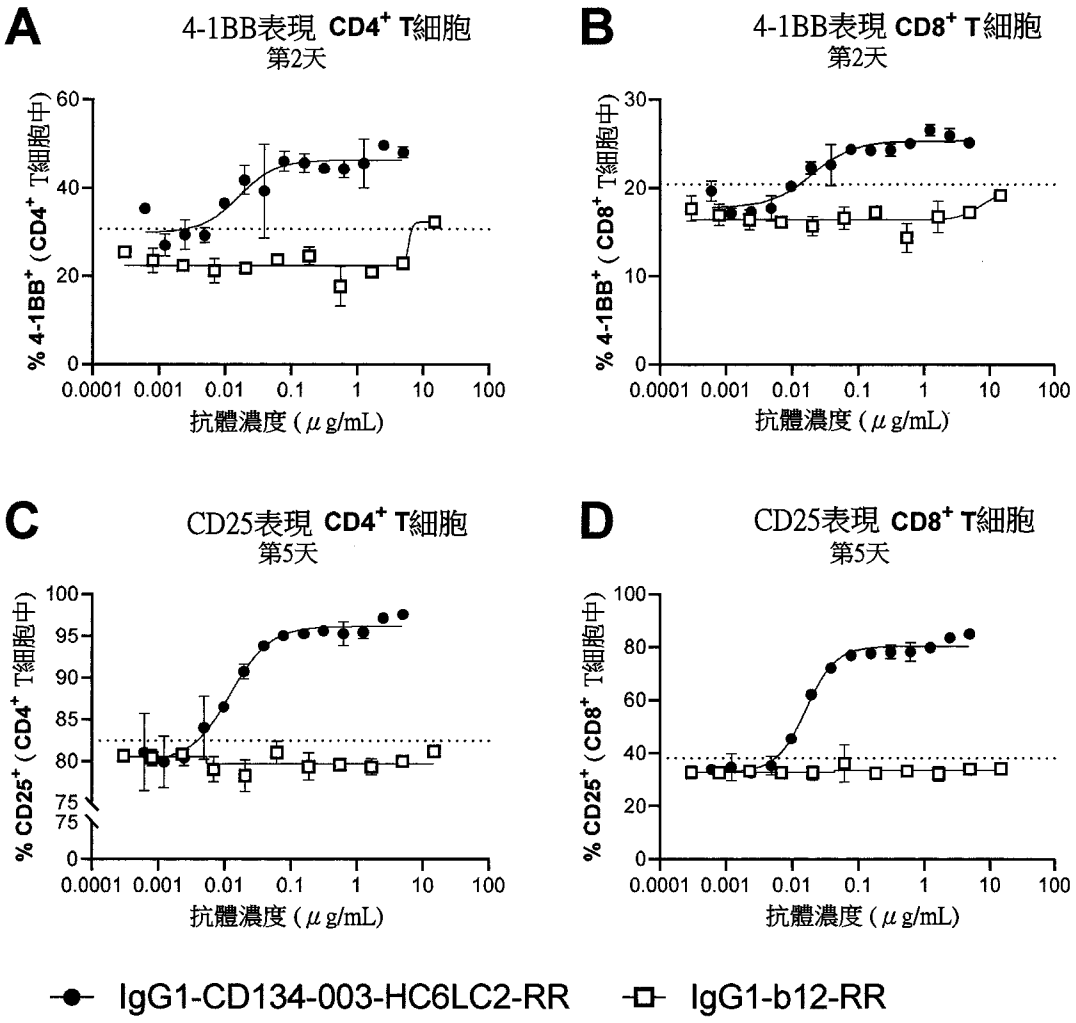
【圖 20】


A
無 FcγRIIb+ 細胞
有 FcγRIIb+ 細胞
RLU
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003
IgG1-CD134-003-E345R
IgG1-CD134-003-FEAL
IgG1-b12-RR

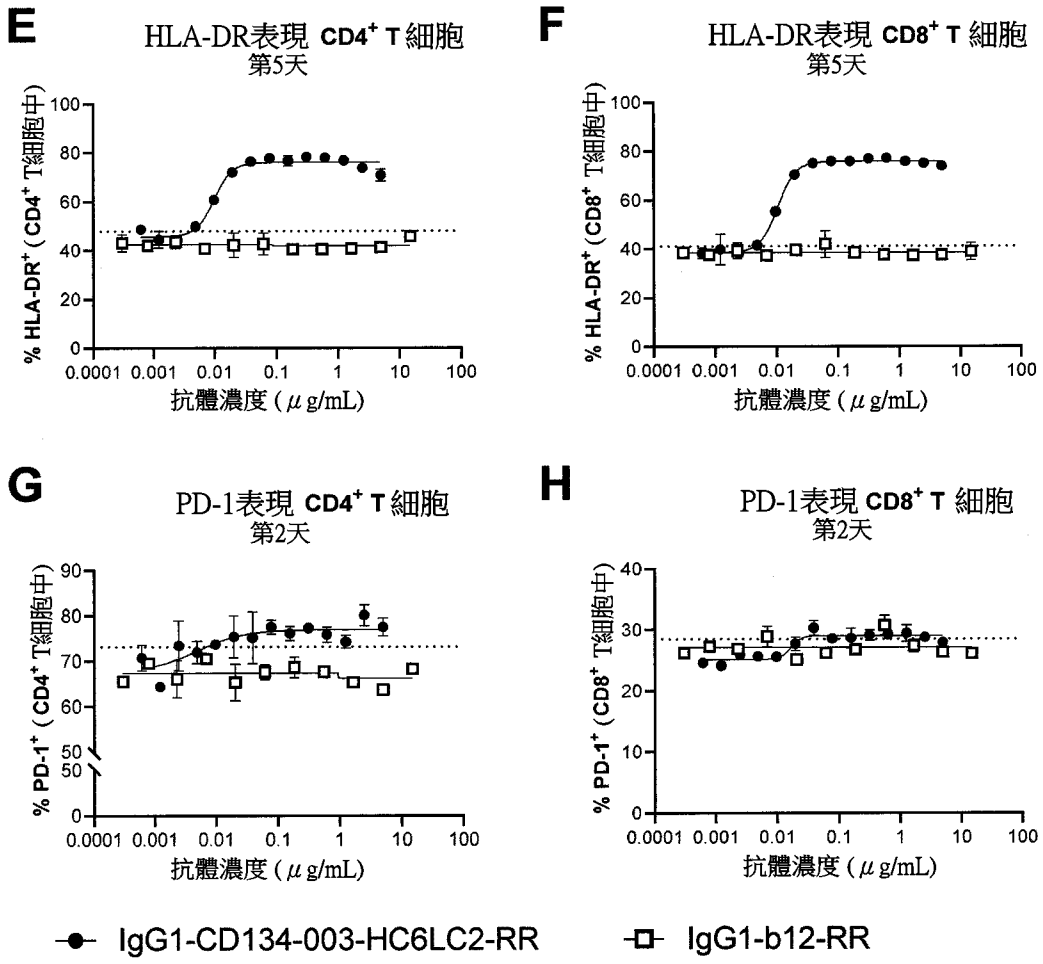
【圖 21】


B
無FcγRIIb+細胞
有FcγRIIb+細胞
RLU
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
400,000
300,000
200,000
100,000
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-RG7888
IgG1-CD134-IBI101
IgG1-b12-RR

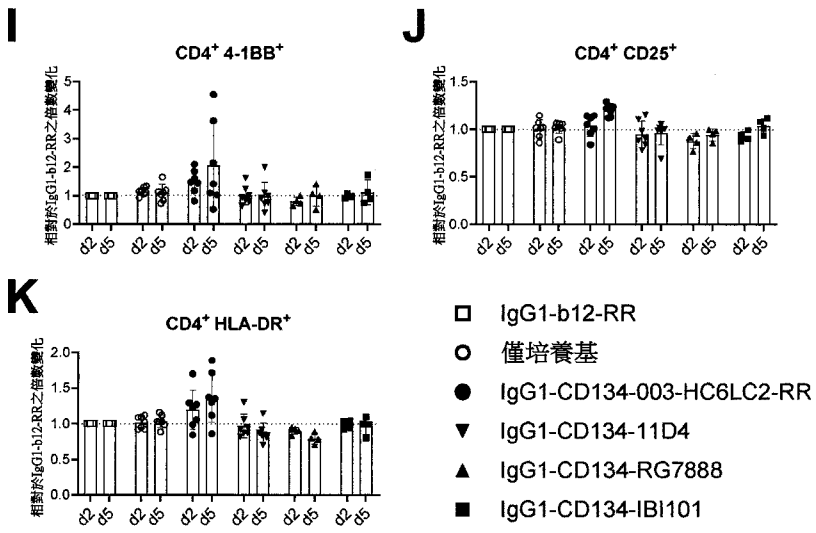
【圖 21】(續)


A
4-1BB表現 CD4+ T細胞
第2天
% 4-1BB+ (CD4+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
B
4-1BB表現 CD8+ T細胞
第2天
% 4-1BB+ (CD8+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
C
CD25表現 CD4+ T細胞
第5天
% CD25+ (CD4+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
D
CD25表現 CD8+ T細胞
第5天
% CD25+ (CD8+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR

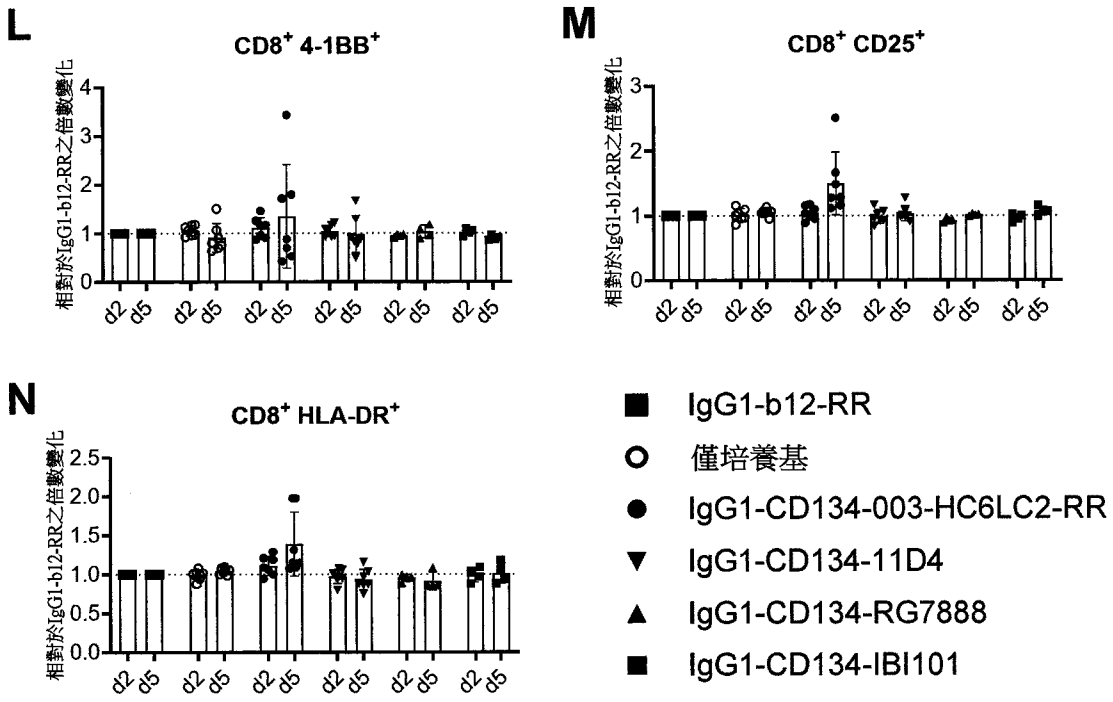
【圖 22】


E
HLA-DR表現 CD4+ T細胞
第5天
% HLA-DR+ (CD4+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
F
HLA-DR表現 CD8+ T 細胞
第5天
% HLA-DR+ (CD8+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
G
PD-1表現 CD4+ T細胞
第2天
% PD-1+ (CD4+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
H
PD-1表現 CD8+ T 細胞
第2天
% PD-1+ (CD8+ T細胞中)
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR

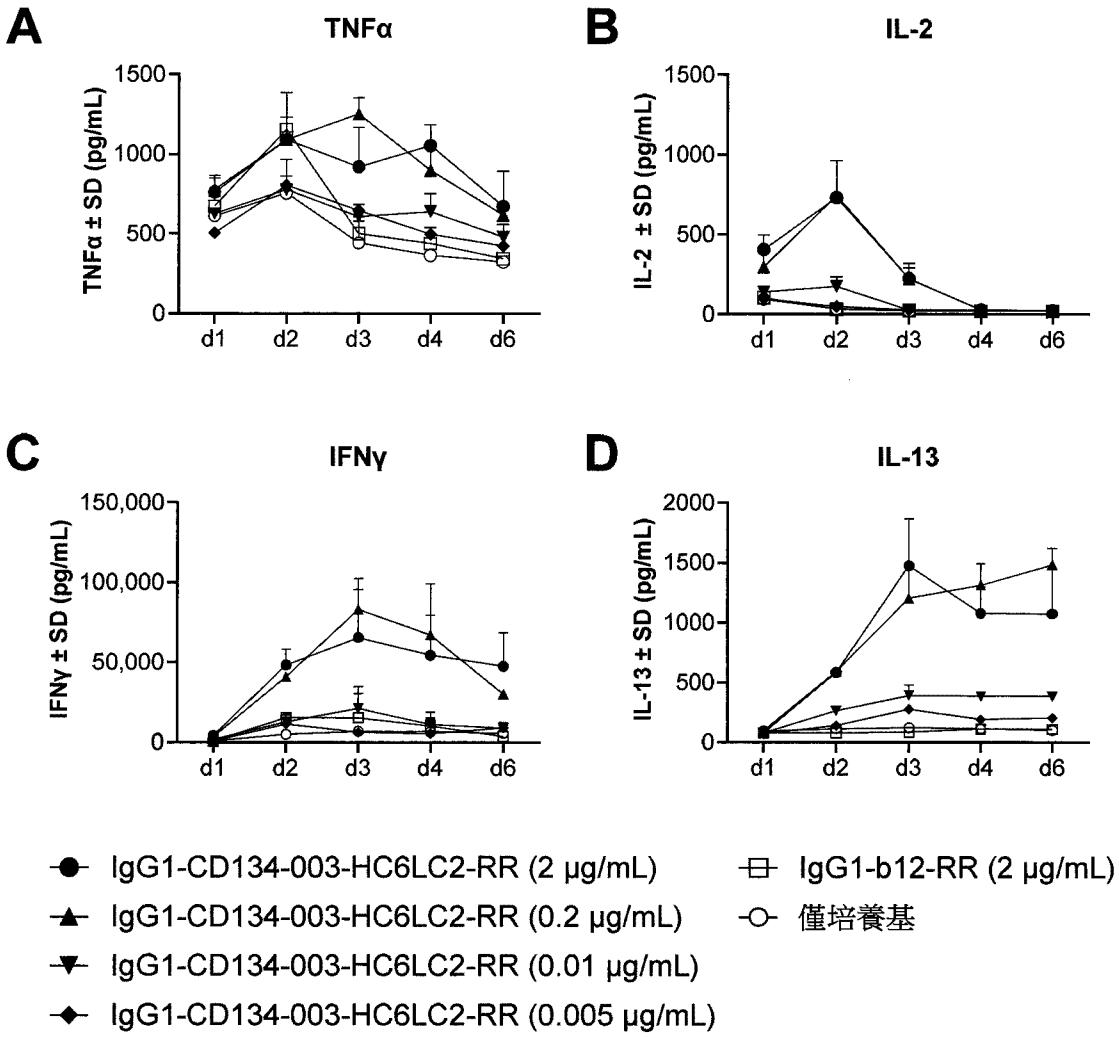
【圖 22】(續)


I
CD4+ 4-1BB+
J
CD4+ CD25+
K
CD4+ HLA-DR+
相對於IgG1-b12-RR之倍數變化
d2
d5
IgG1-b12-RR
僅培養基
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-RG7888
IgG1-CD134-IBI101

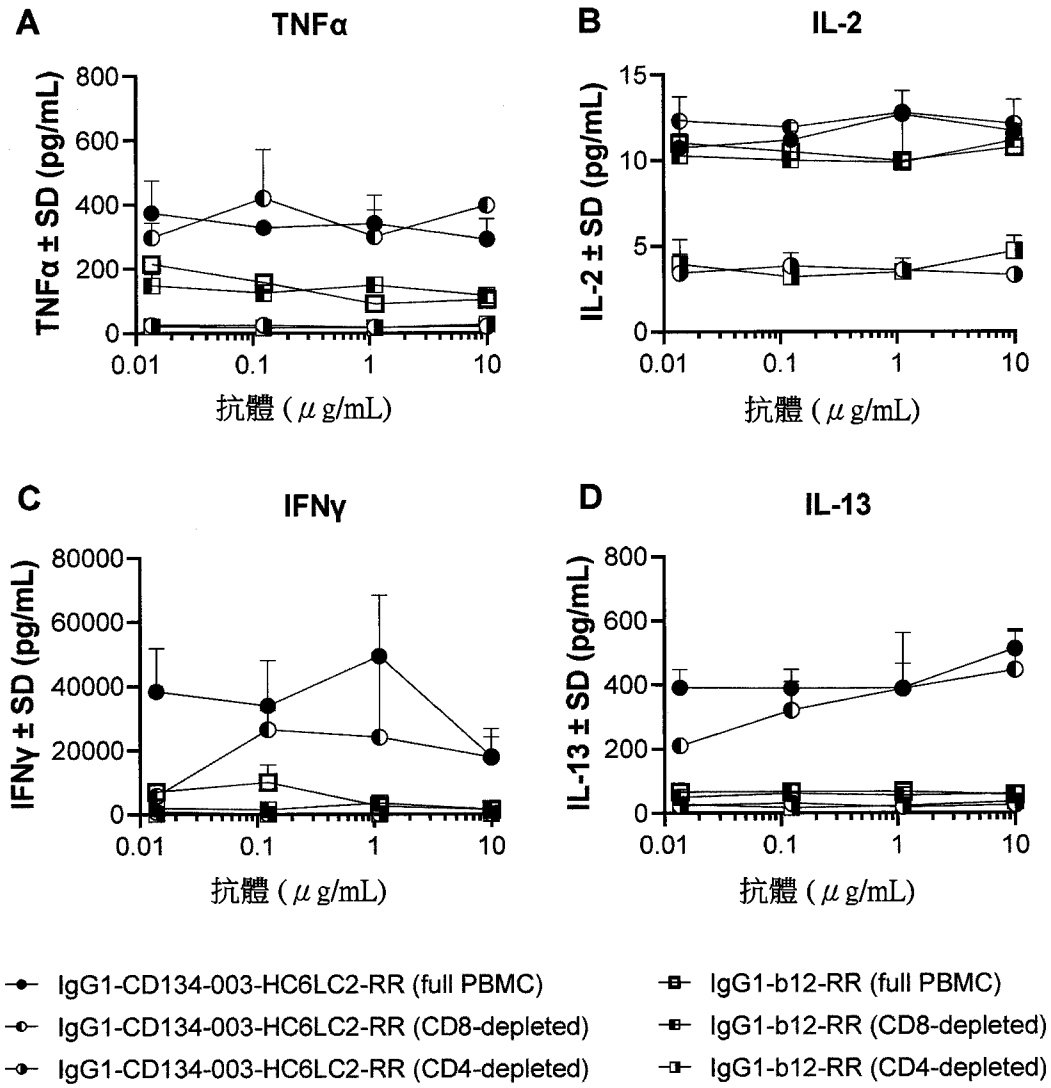
【圖 22】(續)


L
CD8+ 4-1BB+
相對於IgG1-b12-RR之倍數變化
M
CD8+ CD25+
相對於IgG1-b12-RR之倍數變化
N
CD8+ HLA-DR+
相對於IgG1-b12-RR之倍數變化
d2 d5
IgG1-b12-RR
僅培養基
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-11D4
IgG1-CD134-RG7888
IgG1-CD134-IBI101

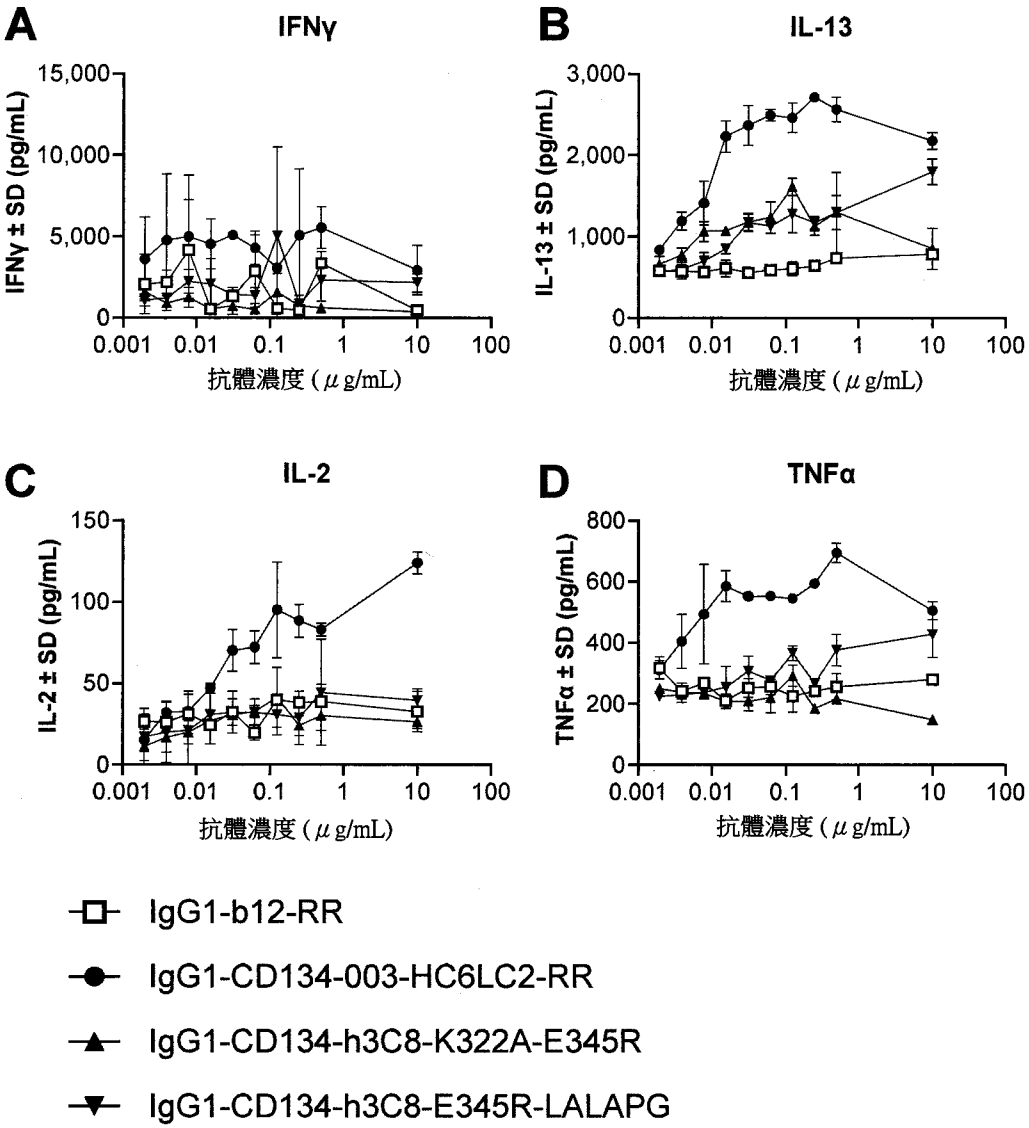
【圖 22】(續)


A
TNFα
TNFα ± SD (pg/mL)
1500
1000
500
0
d1
d2
d3
d4
d6
B
IL-2
IL-2 ± SD (pg/mL)
1500
1000
500
0
d1
d2
d3
d4
d6
C
IFNγ
IFNγ ± SD (pg/mL)
150,000
100,000
50,000
0
d1
d2
d3
d4
d6
D
IL-13
IL-13 ± SD (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
d1
d2
d3
d4
d6
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (2 μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.2 μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.01 μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.005 μg/mL)
IgG1-b12-RR (2 μg/mL)
僅培養基

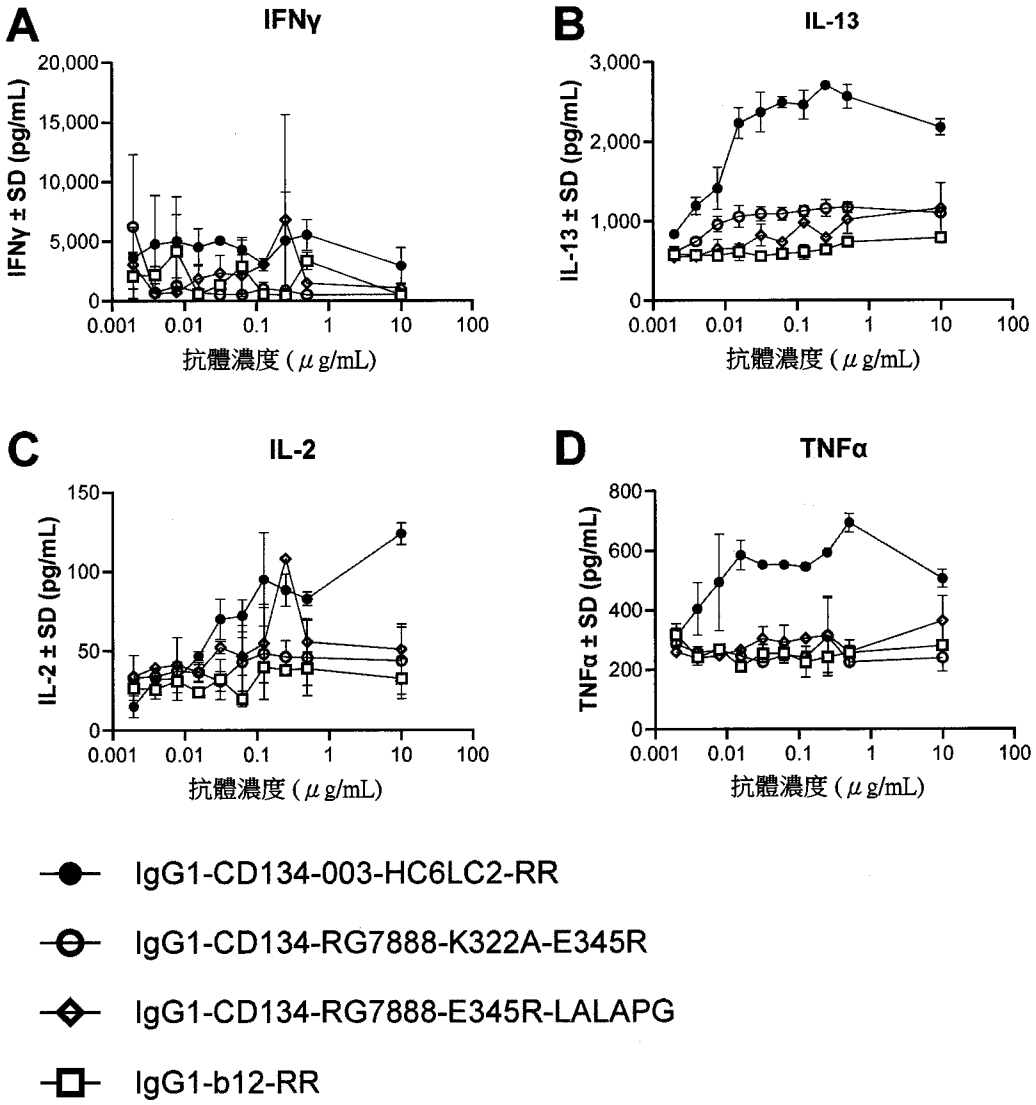
【圖 23】


A
TNFα
TNFα ± SD (pg/mL)
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
抗體 (μg/mL)
B
IL-2
IL-2 ± SD (pg/mL)
15
10
5
0
0.01
0.1
1
10
抗體 (μg/mL)
C
IFNγ
IFNγ ± SD (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
抗體 (μg/mL)
D
IL-13
IL-13 ± SD (pg/mL)
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
抗體 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (full PBMC)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (CD8-depleted)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (CD4-depleted)
IgG1-b12-RR (full PBMC)
IgG1-b12-RR (CD8-depleted)
IgG1-b12-RR (CD4-depleted)

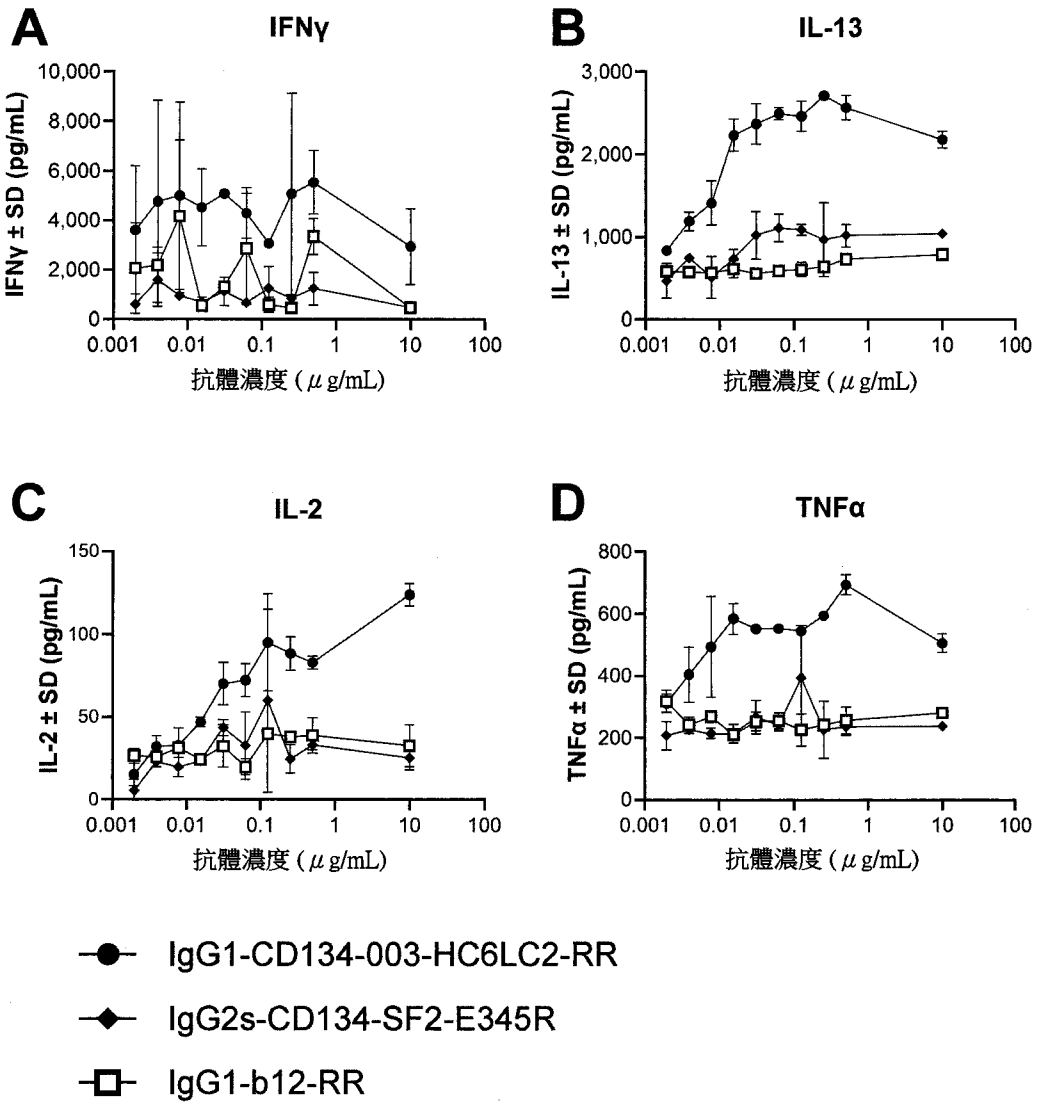
【圖 24】


A
IFNγ
IFNγ ± SD (pg/mL)
15,000
10,000
5,000
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
IL-13
IL-13 ± SD (pg/mL)
3,000
2,000
1,000
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
C
IL-2
IL-2 ± SD (pg/mL)
150
100
50
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
D
TNFα
TNFα ± SD (pg/mL)
800
600
400
200
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-b12-RR
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-h3C8-K322A-E345R
IgG1-CD134-h3C8-E345R-LALAPG

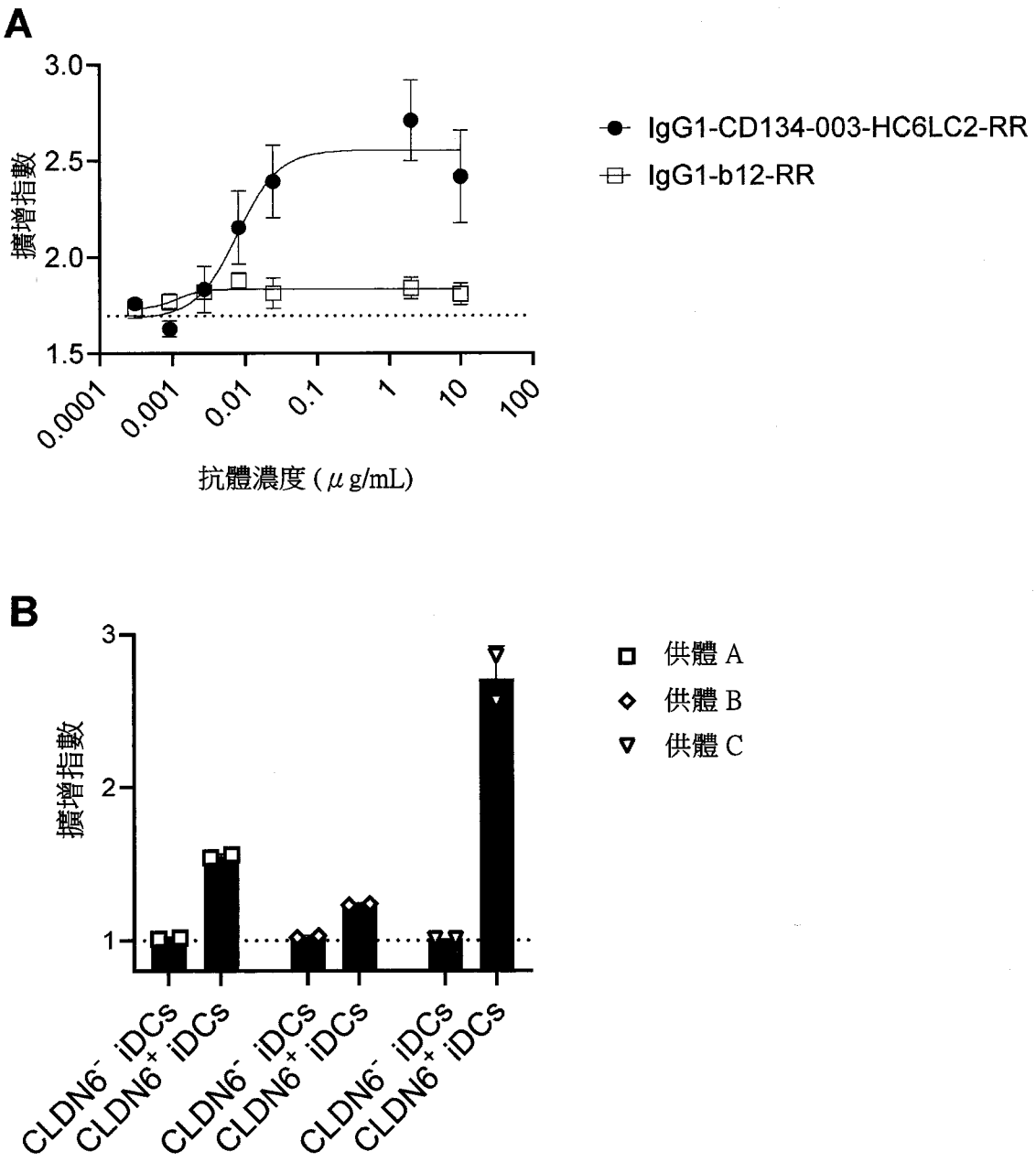
【圖 25】


A
IFNγ
IFNγ ± SD (pg/mL)
20,000
15,000
10,000
5,000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (μg/mL)
B
IL-13
IL-13 ± SD (pg/mL)
3,000
2,000
1,000
0
抗體濃度 (μg/mL)
C
IL-2
IL-2 ± SD (pg/mL)
150
100
50
0
抗體濃度 (μg/mL)
D
TNFα
TNFα ± SD (pg/mL)
800
600
400
200
0
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-RG7888-K322A-E345R
IgG1-CD134-RG7888-E345R-LALAPG
IgG1-b12-RR

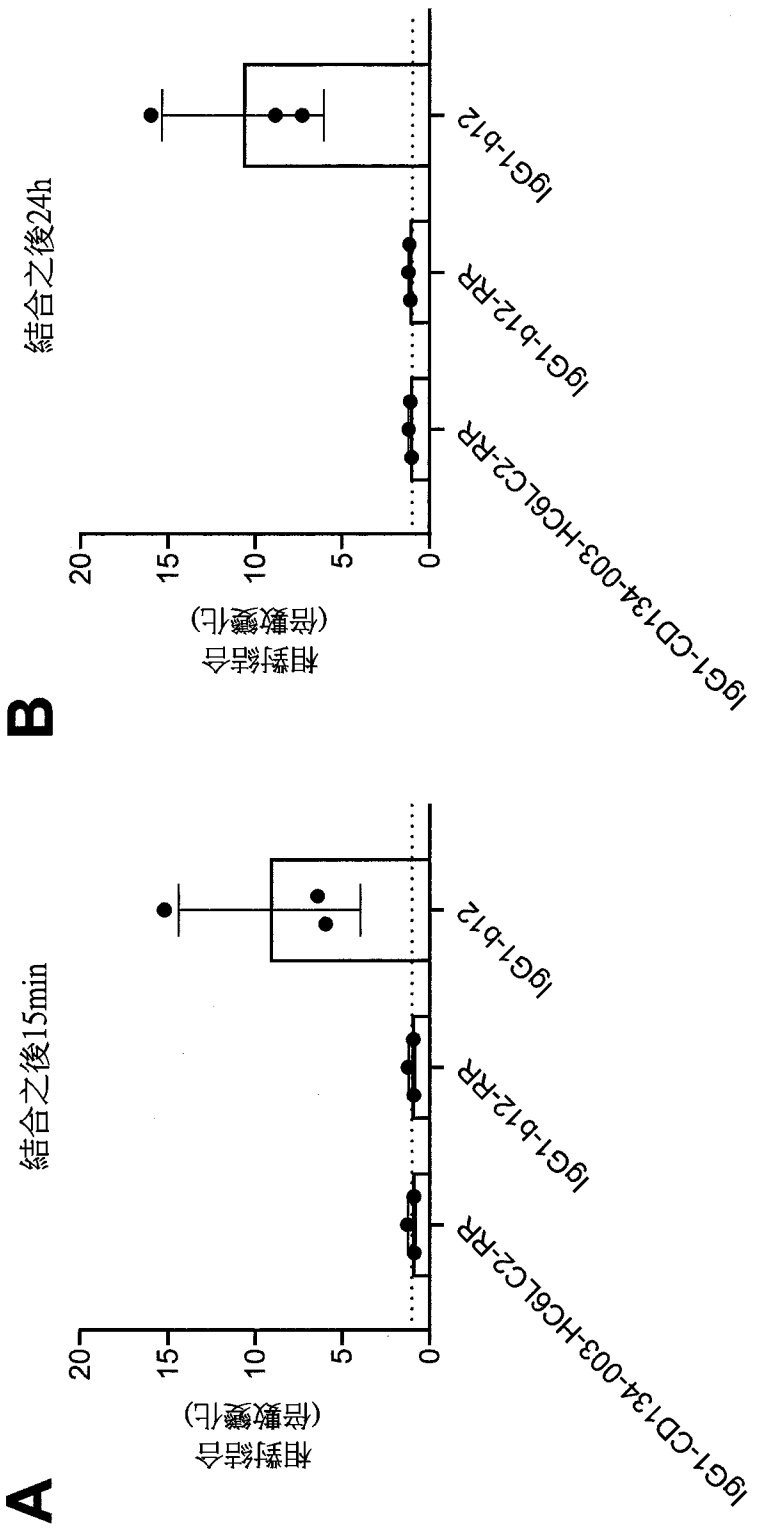
【圖 26】


A
IFNγ
IFNγ ± SD (pg/mL)
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (μg/mL)
B
IL-13
IL-13 ± SD (pg/mL)
3,000
2,000
1,000
0
C
IL-2
IL-2 ± SD (pg/mL)
150
100
50
D
TNFα
TNFα ± SD (pg/mL)
800
600
400
200
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG2s-CD134-SF2-E345R
IgG1-b12-RR

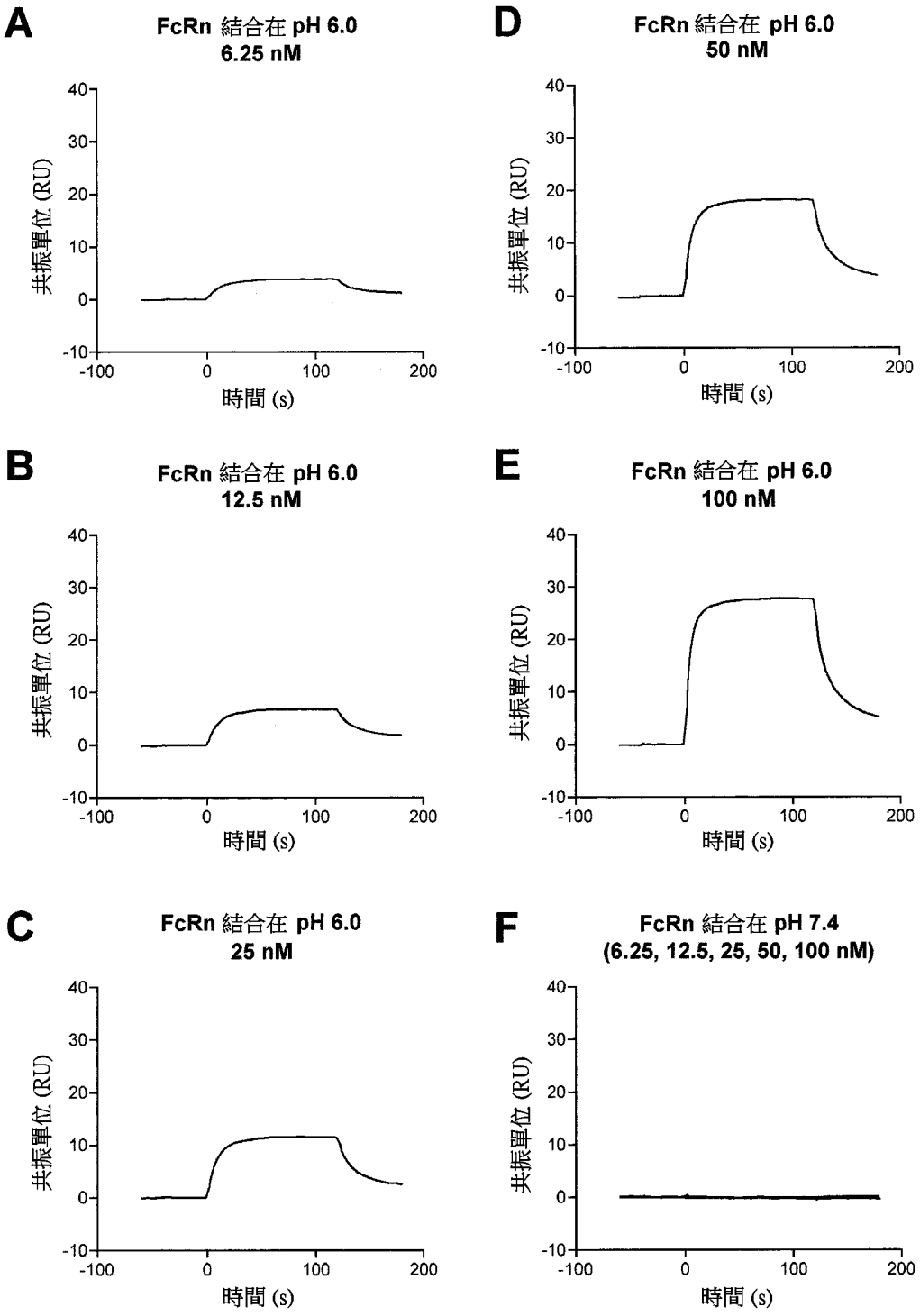
【圖 27】


A
3.0
2.5
2.0
1.5
擴增指數
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR
B
3
2
1
擴增指數
CLDN6- iDCs
CLDN6+ iDCs
CLDN6- iDCs
CLDN6+ iDCs
CLDN6- iDCs
CLDN6+ iDCs
供體 A
供體 B
供體 C

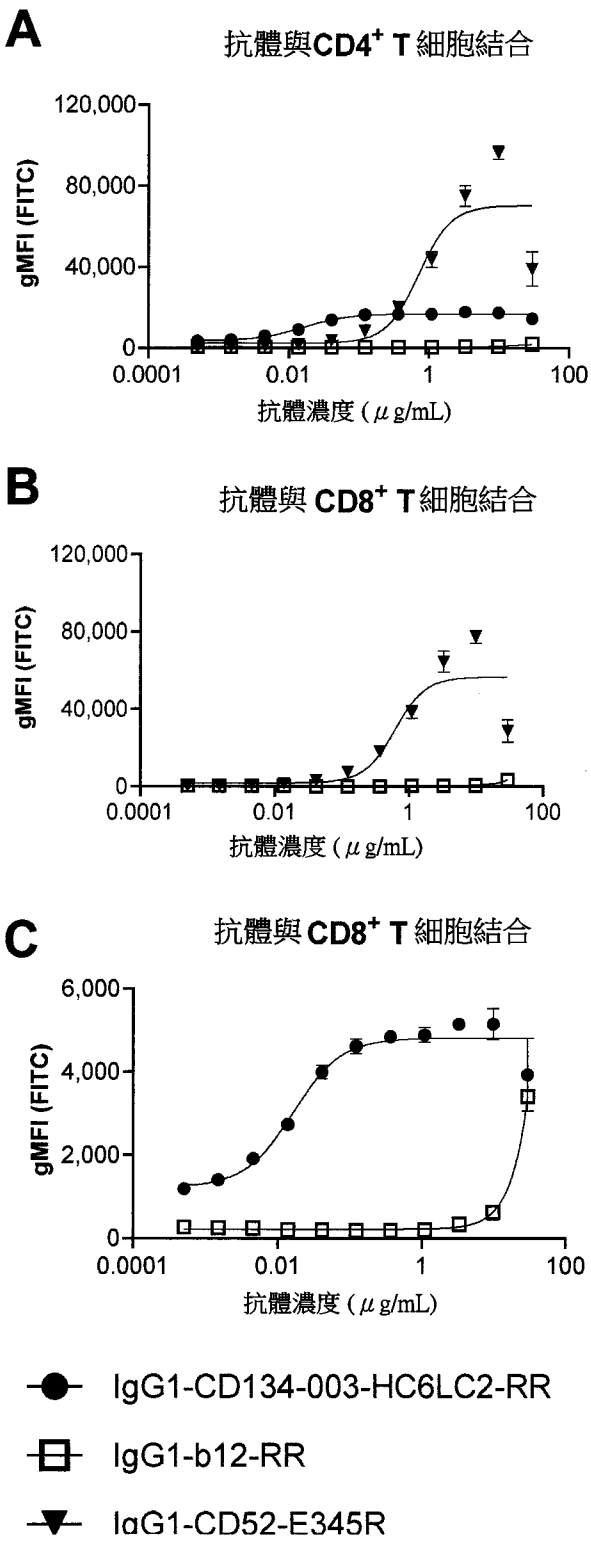
【圖 28】


A
結合之後15min
相對結合
(倍數變化)
0
5
10
15
20
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR
IgG1-b12
B
結合之後24h
相對結合
(倍數變化)
0
5
10
15
20
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR
IgG1-b12

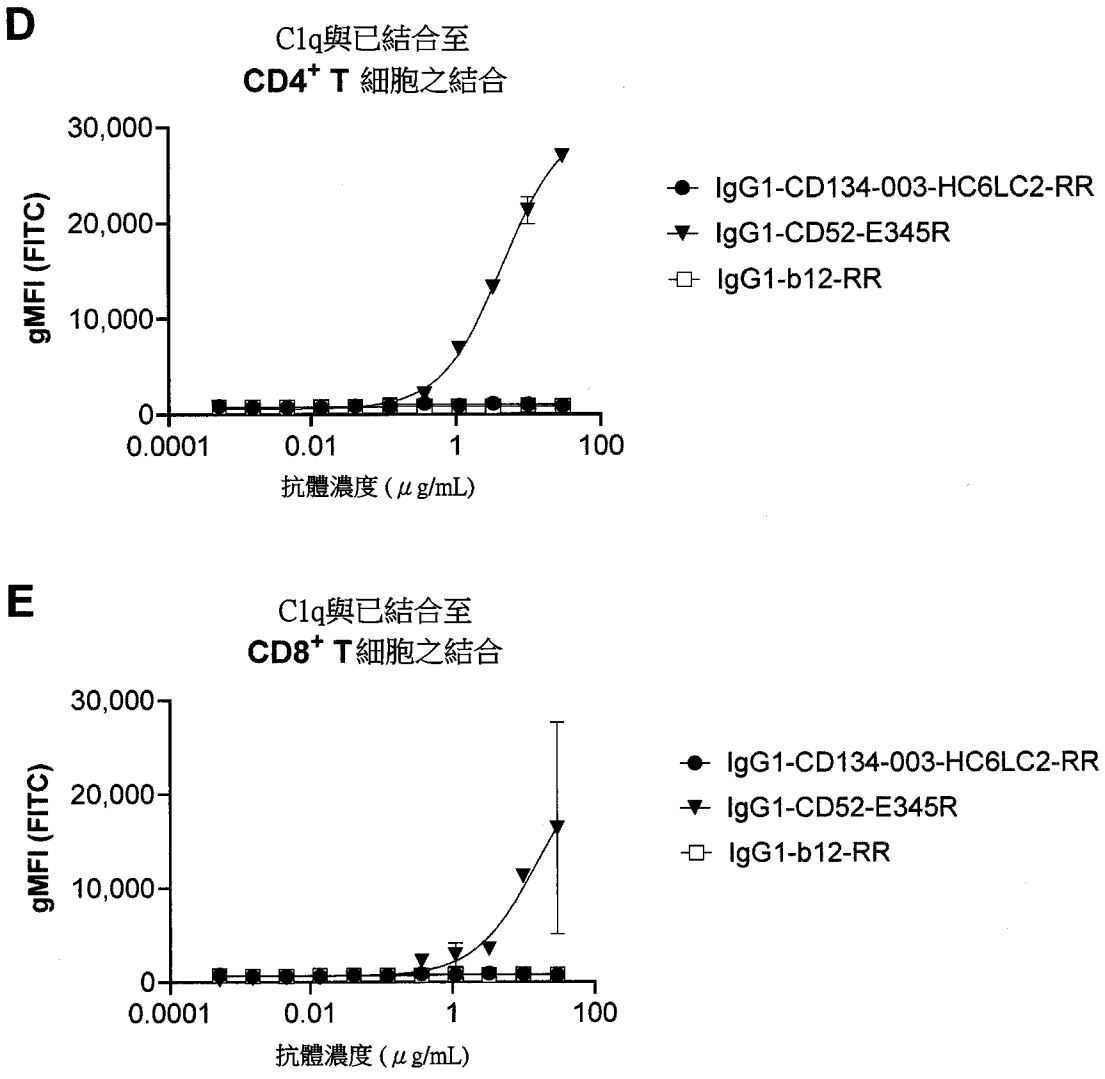
【圖 29】


A
FcRn 結合在 pH 6.0
6.25 nM
D
FcRn 結合在 pH 6.0
50 nM
B
FcRn 結合在 pH 6.0
12.5 nM
E
FcRn 結合在 pH 6.0
100 nM
C
FcRn 結合在 pH 6.0
25 nM
F
FcRn 結合在 pH 7.4
(6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM)
共振單位 (RU)
時間 (s)
40
30
20
10
0
-10
-100
0
100
200

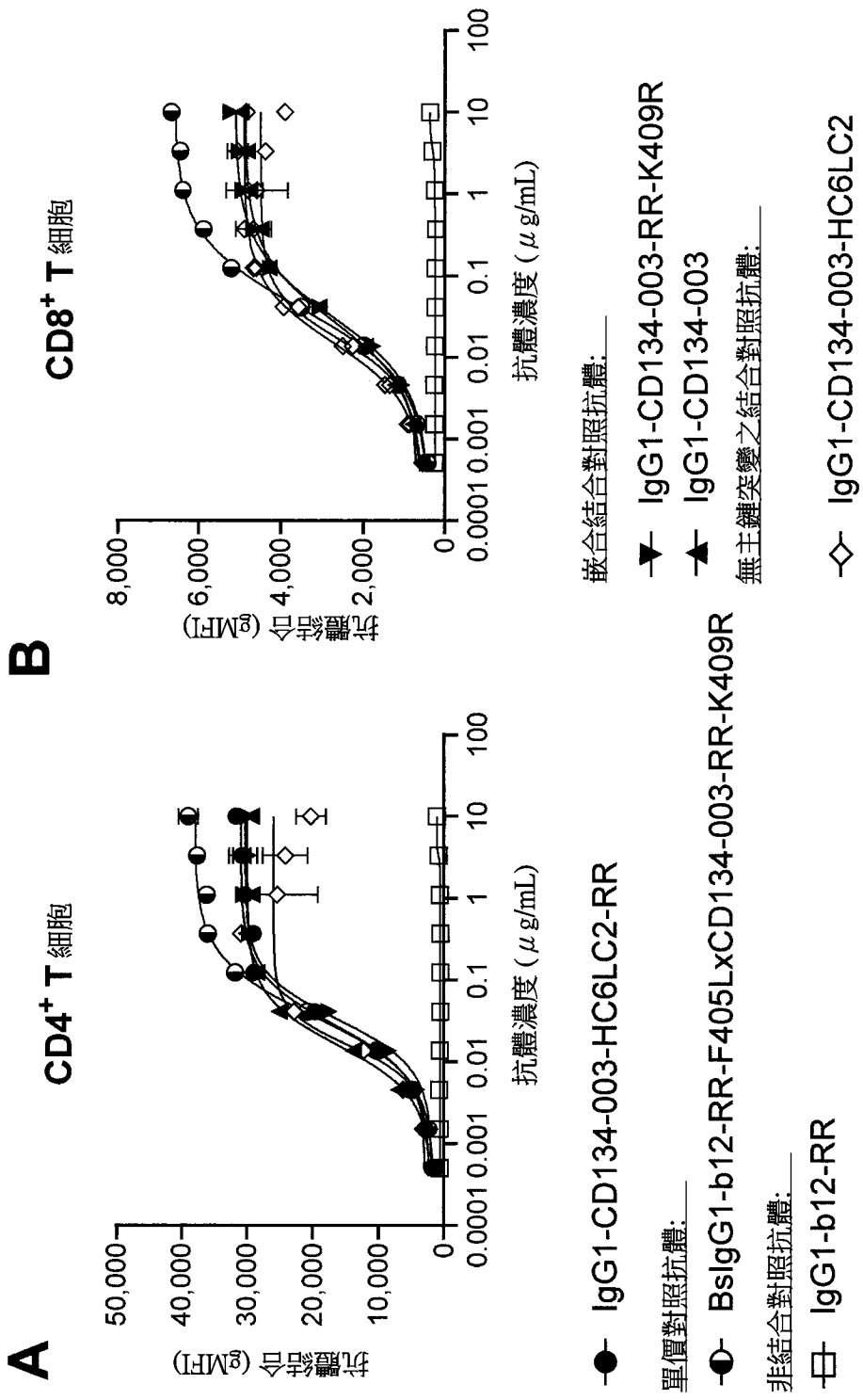
【圖 30】


A
抗體與CD4+ T細胞結合
gMFI (FITC)
120,000
80,000
40,000
0
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
B
抗體與 CD8+ T細胞結合
gMFI (FITC)
120,000
80,000
40,000
0
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
C
抗體與CD8+ T細胞結合
gMFI (FITC)
6,000
4,000
2,000
0
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-b12-RR
IgG1-CD52-E345R

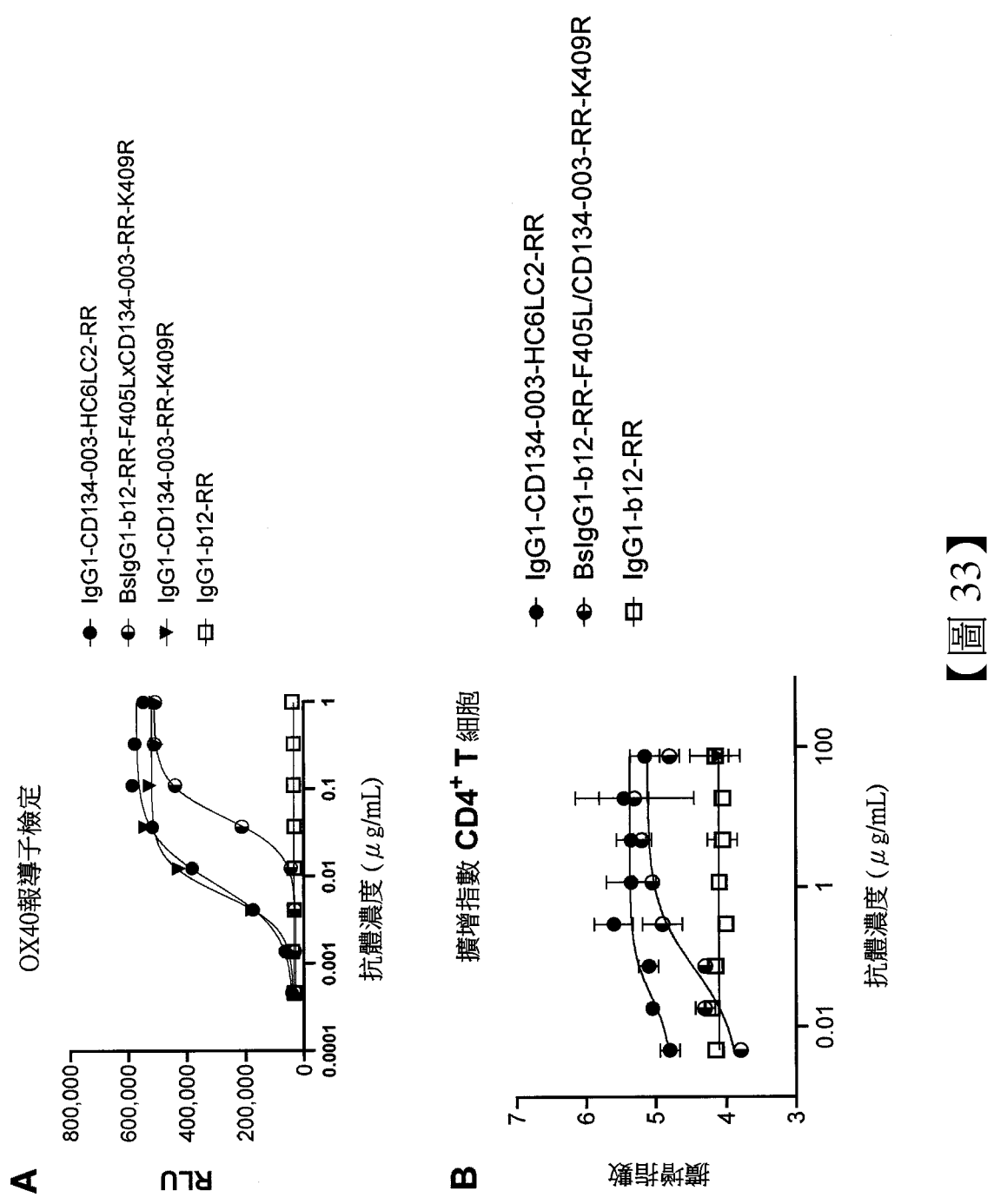
【圖 31】


D
C1q與已結合至
CD4+ T 細胞之結合
gMFI (FITC)
30,000
20,000
10,000
0
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD52-E345R
IgG1-b12-RR
E
C1q與已結合至
CD8+ T細胞之結合
gMFI (FITC)
30,000
20,000
10,000
0
0.0001
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD52-E345R
IgG1-b12-RR

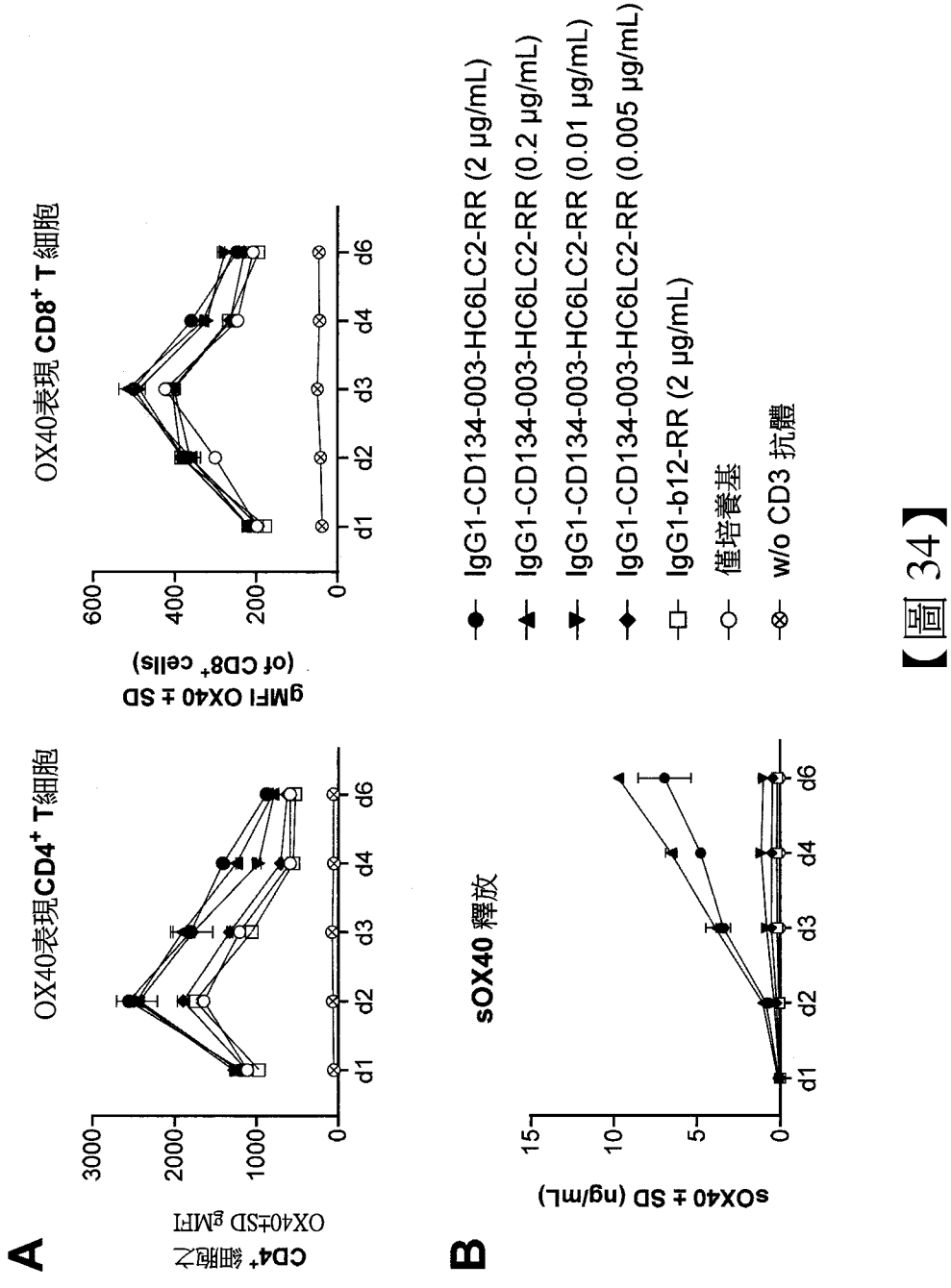
【圖 31】(續)


A
CD4+ T 細胞
抗體結合 (gMFI)
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
B
CD8+ T 細胞
抗體結合 (gMFI)
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
單價對照抗體:
BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R
非結合對照抗體:
IgG1-b12-RR
嵌合結合對照抗體:
IgG1-CD134-003-RR-K409R
IgG1-CD134-003
無主鏈突變之結合對照抗體:
IgG1-CD134-003-HC6LC2

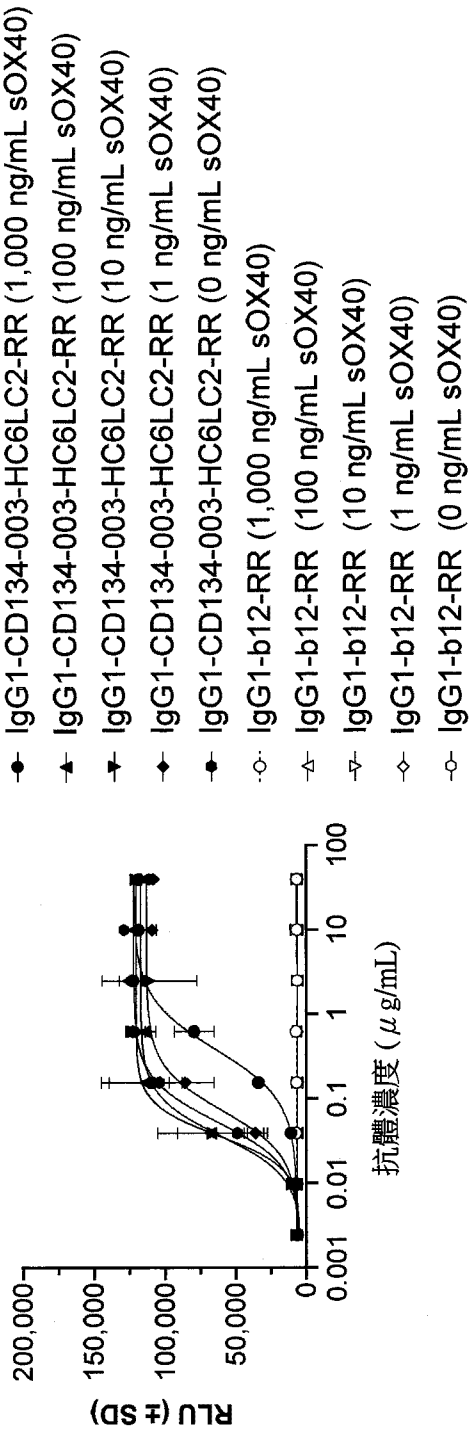
【圖 32】


A
OX40報導子檢定
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
BsIgG1-b12-RR-F405LxCD134-003-RR-K409R
IgG1-CD134-003-RR-K409R
IgG1-b12-RR
RLU
800,000
600,000
400,000
200,000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
抗體濃度 (μg/mL)
B
擴增指數 CD4+ T 細胞
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
BsIgG1-b12-RR-F405L/CD134-003-RR-K409R
IgG1-b12-RR
擴增指數
7
6
5
4
3
0.01
1
100
抗體濃度 (μg/mL)

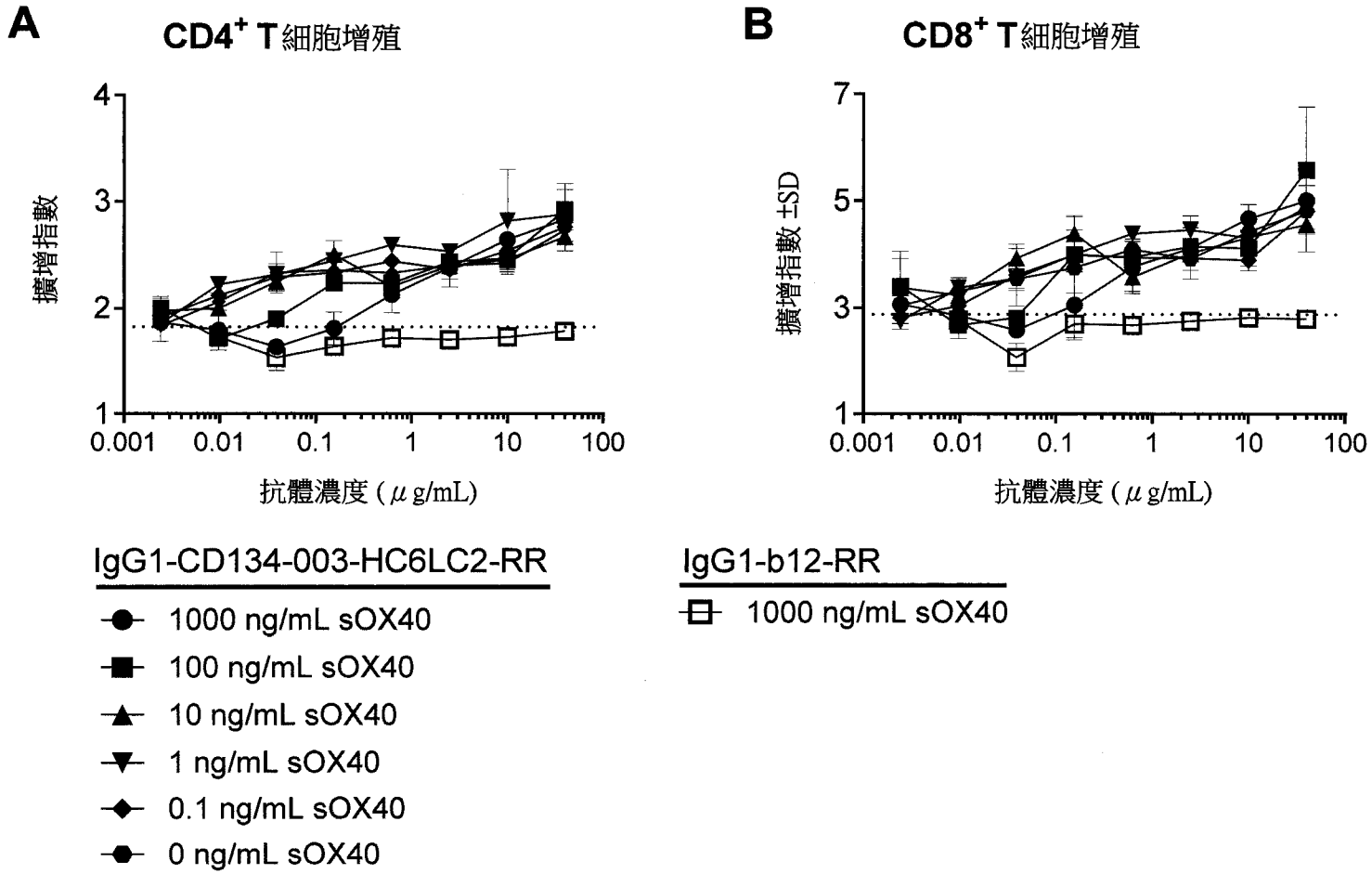
【圖 33】


A
OX40表現CD4+ T細胞
CD4+ 細胞之 OX40±SD gMFI
3000
2000
1000
0
d1
d2
d3
d4
d6
OX40表現 CD8+ T 細胞
gMFI OX40 ± SD (of CD8+ cells)
600
400
200
0
B
sOX40 釋放
sOX40 ± SD (ng/mL)
15
10
5
0
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (2 µg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.2 µg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.01 µg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0.005 µg/mL)
IgG1-b12-RR (2 µg/mL)
僅培養基
w/o CD3 抗體

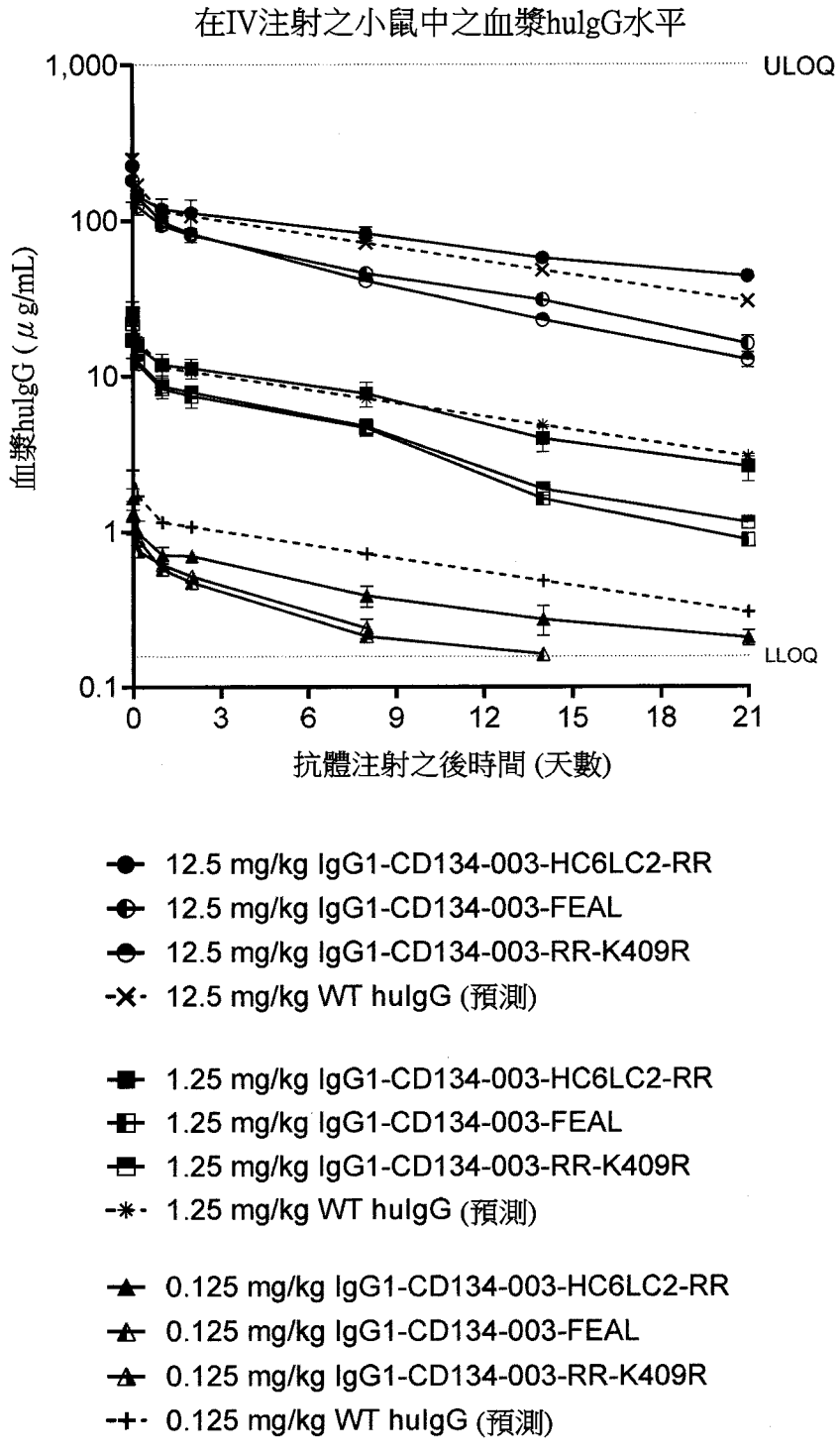
【圖 34】


IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1,000 ng/mL sOX40)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (100 ng/mL sOX40)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (10 ng/mL sOX40)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 ng/mL sOX40)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (0 ng/mL sOX40)
IgG1-b12-RR (1,000 ng/mL sOX40)
IgG1-b12-RR (100 ng/mL sOX40)
IgG1-b12-RR (10 ng/mL sOX40)
IgG1-b12-RR (1 ng/mL sOX40)
IgG1-b12-RR (0 ng/mL sOX40)
RLU (± SD)
200,000
150,000
100,000
50,000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度 (μg/mL)

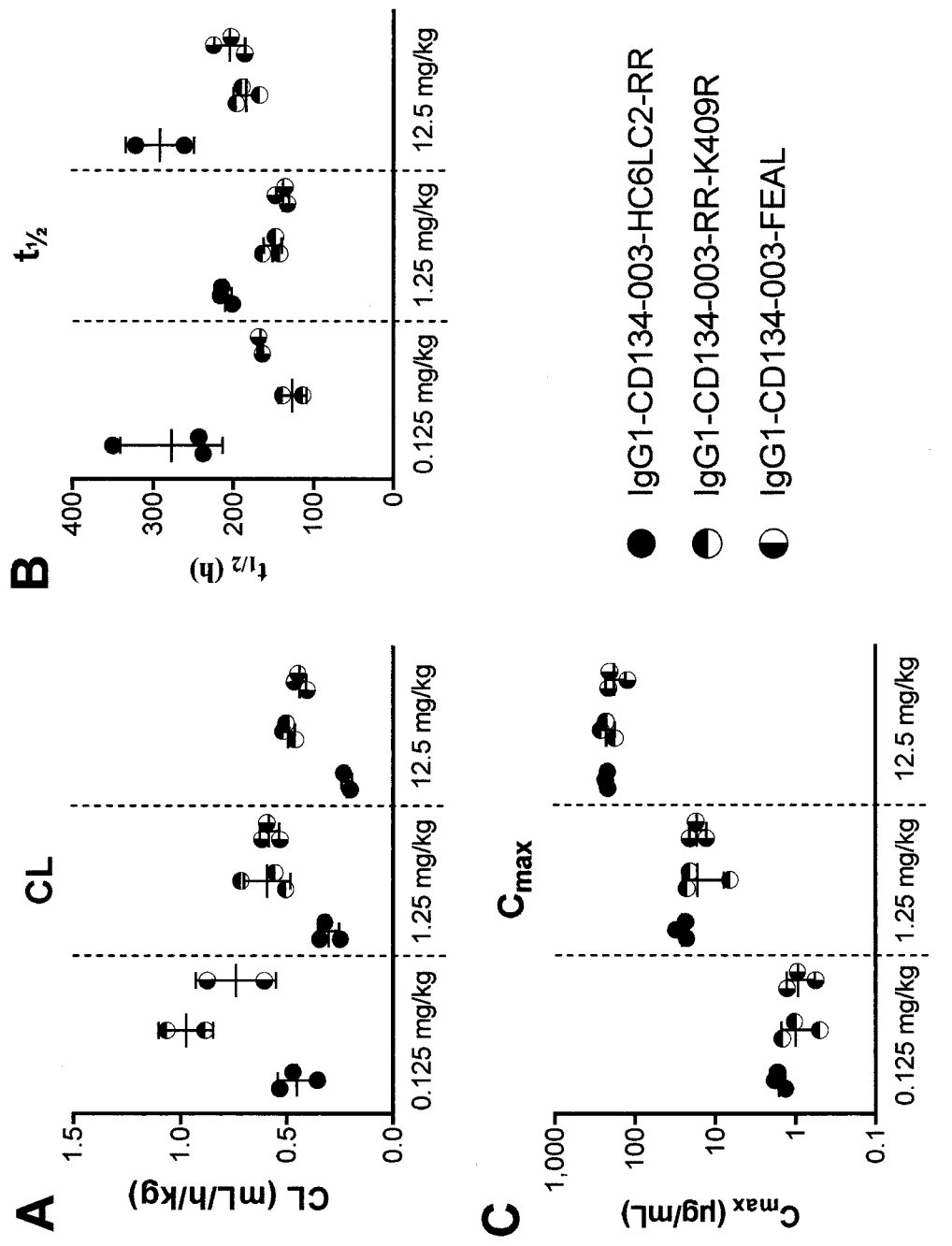
【圖 35】


A
CD4+ T細胞增殖
擴增指數
抗體濃度 (μg/mL)
B
CD8+ T細胞增殖
擴增指數 ±SD
抗體濃度 (μg/mL)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
1000 ng/mL sOX40
100 ng/mL sOX40
10 ng/mL sOX40
1 ng/mL sOX40
0.1 ng/mL sOX40
0 ng/mL sOX40
IgG1-b12-RR
1000 ng/mL sOX40

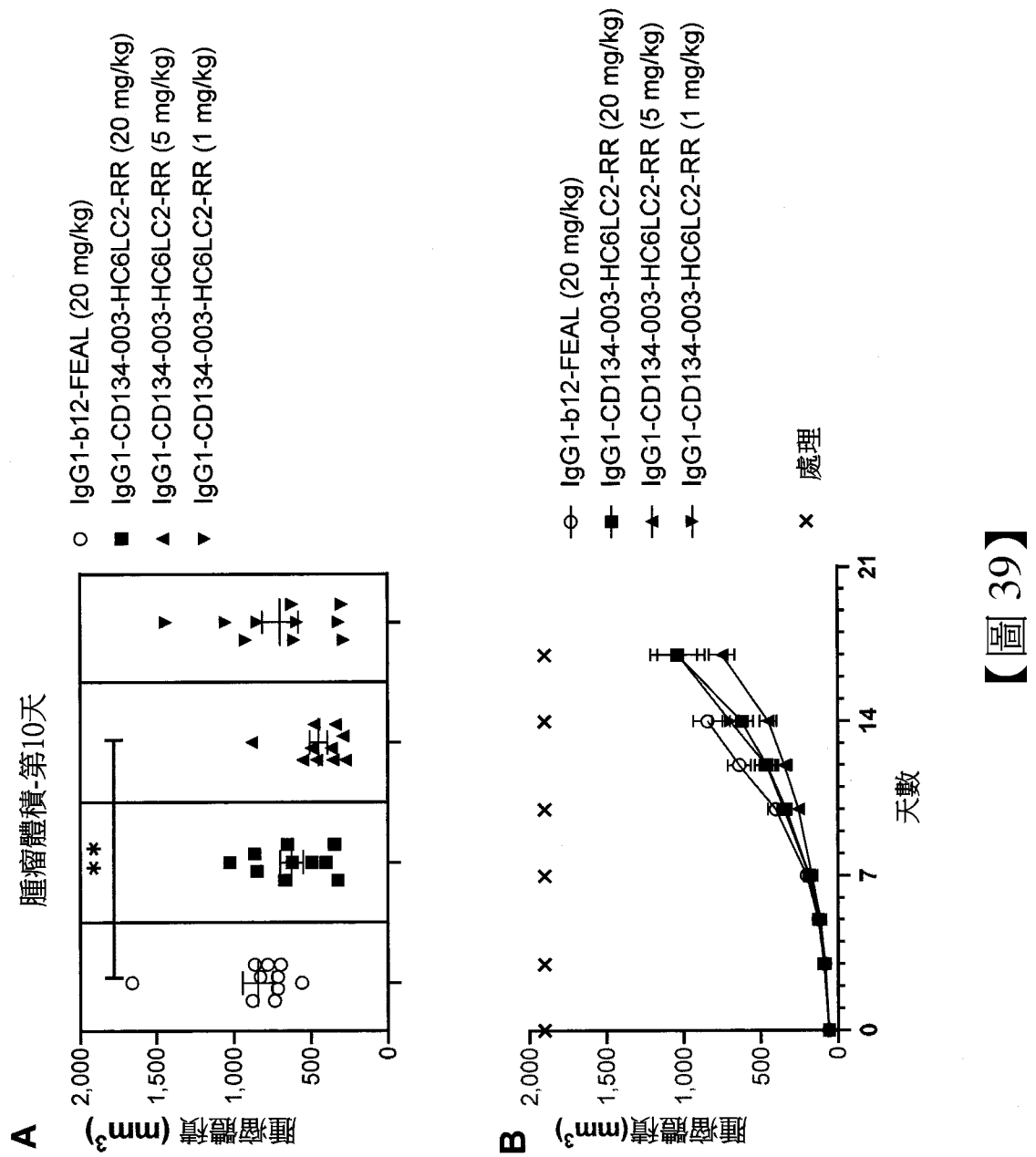
【圖 36】


在IV注射之小鼠中之血漿hulgG水平
1,000
100
10
1
0.1
ULOQ
LLOQ
血漿hulgG (μg/mL)
0
3
6
9
12
15
18
21
抗體注射之後時間 (天數)
12.5 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
12.5 mg/kg IgG1-CD134-003-FEAL
12.5 mg/kg IgG1-CD134-003-RR-K409R
12.5 mg/kg WT huIgG (預測)
1.25 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
1.25 mg/kg IgG1-CD134-003-FEAL
1.25 mg/kg IgG1-CD134-003-RR-K409R
1.25 mg/kg WT huIgG (預測)
0.125 mg/kg IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
0.125 mg/kg IgG1-CD134-003-FEAL
0.125 mg/kg IgG1-CD134-003-RR-K409R
0.125 mg/kg WT huIgG (預測)

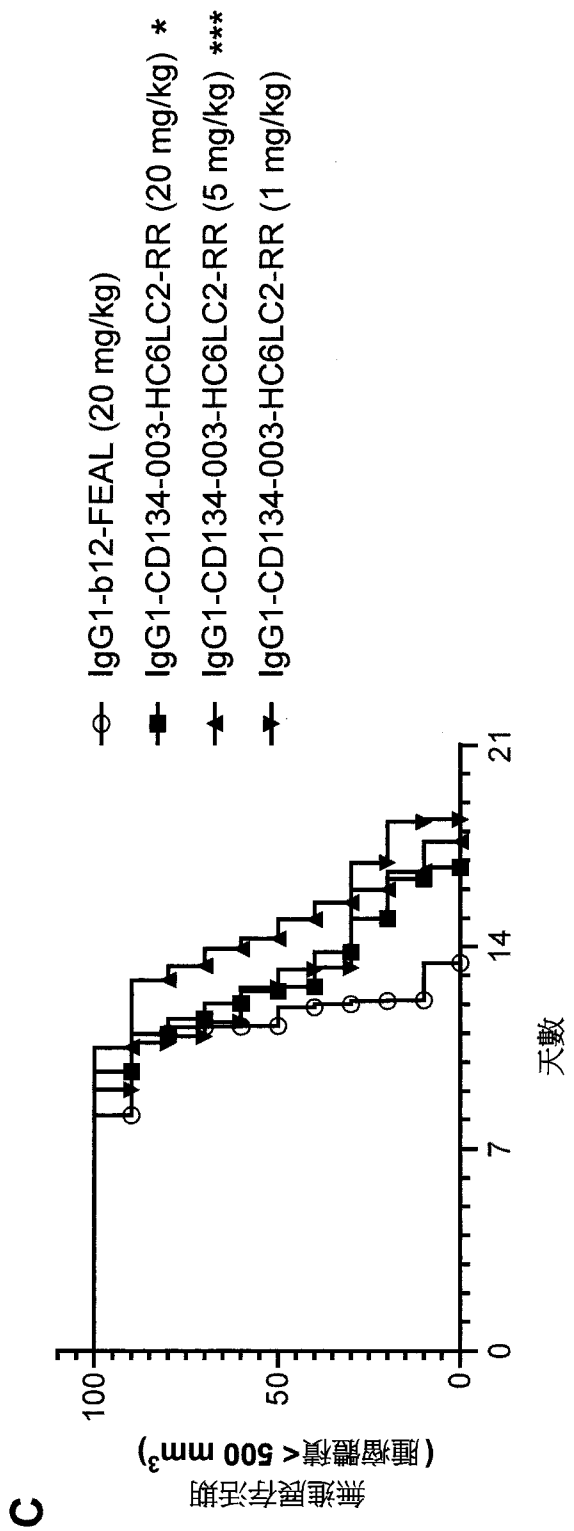
【圖 37】


A
CL
CL (mL/h/kg)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.125 mg/kg
1.25 mg/kg
12.5 mg/kg
B
t½
t1/2 (h)
400
300
200
100
0
0.125 mg/kg
1.25 mg/kg
12.5 mg/kg
C
Cmax
Cmax (μg/mL)
1,000
100
10
1
0.1
0.125 mg/kg
1.25 mg/kg
12.5 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
IgG1-CD134-003-RR-K409R
IgG1-CD134-003-FEAL

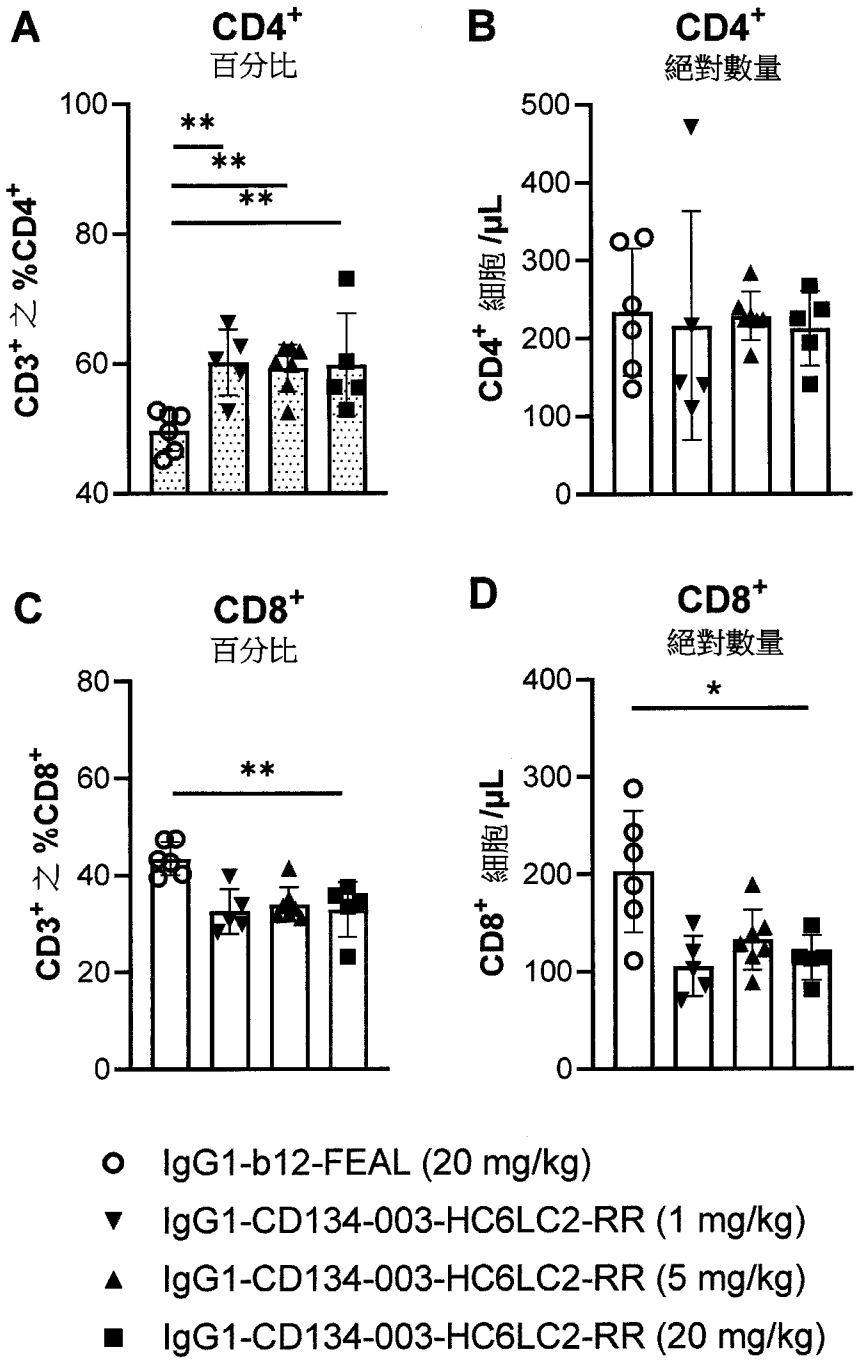
【圖 38】


A
腫瘤體積-第10天
**
腫瘤體積 (mm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
B
腫瘤體積(mm³)
2,000
1,500
1,000
500
0
0
7
14
21
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
處理

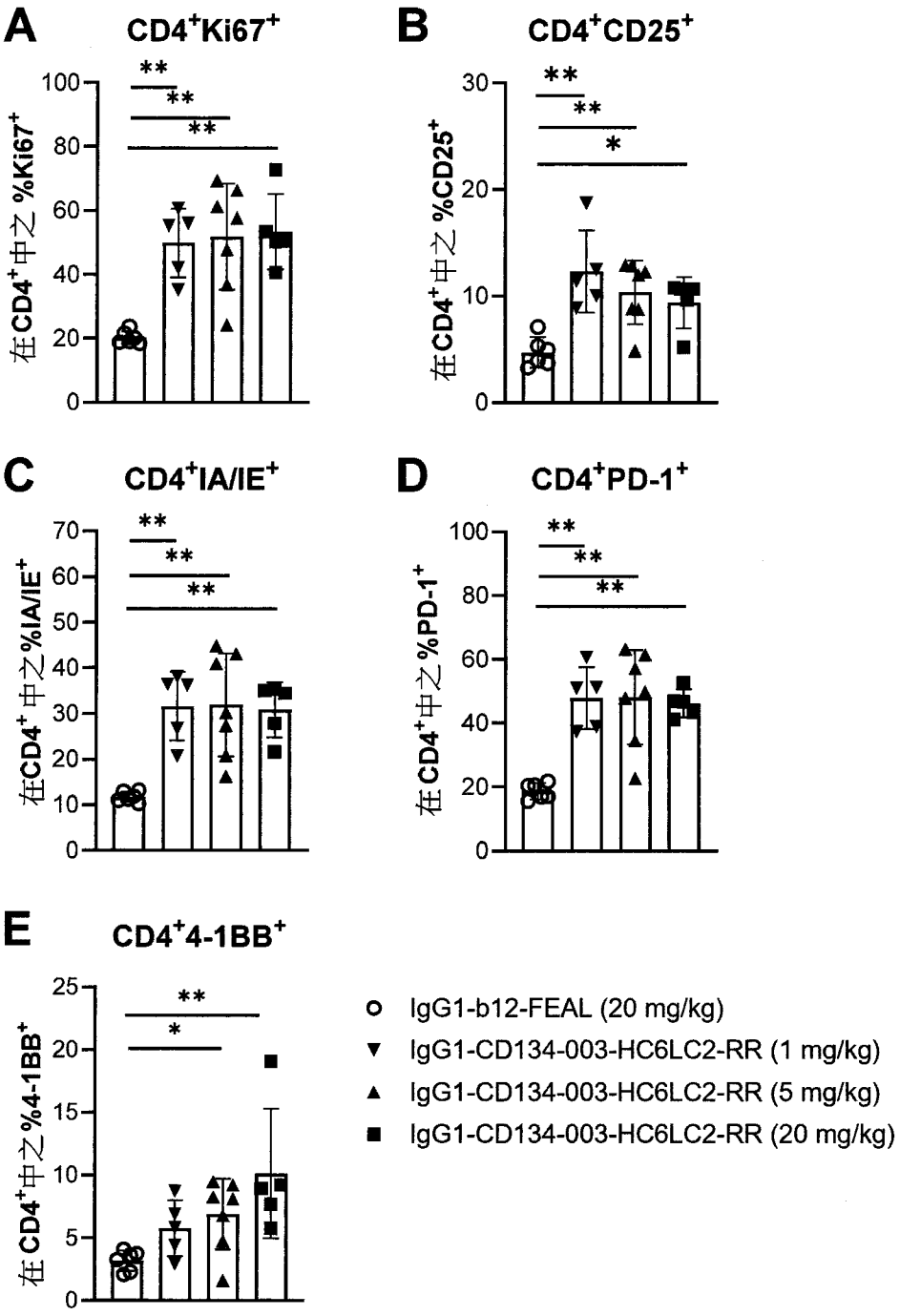
【圖 39】


C
無進展存活期
(腫瘤體積< 500 mm³)
100
50
0
0
7
14
21
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg) *
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg) ***
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

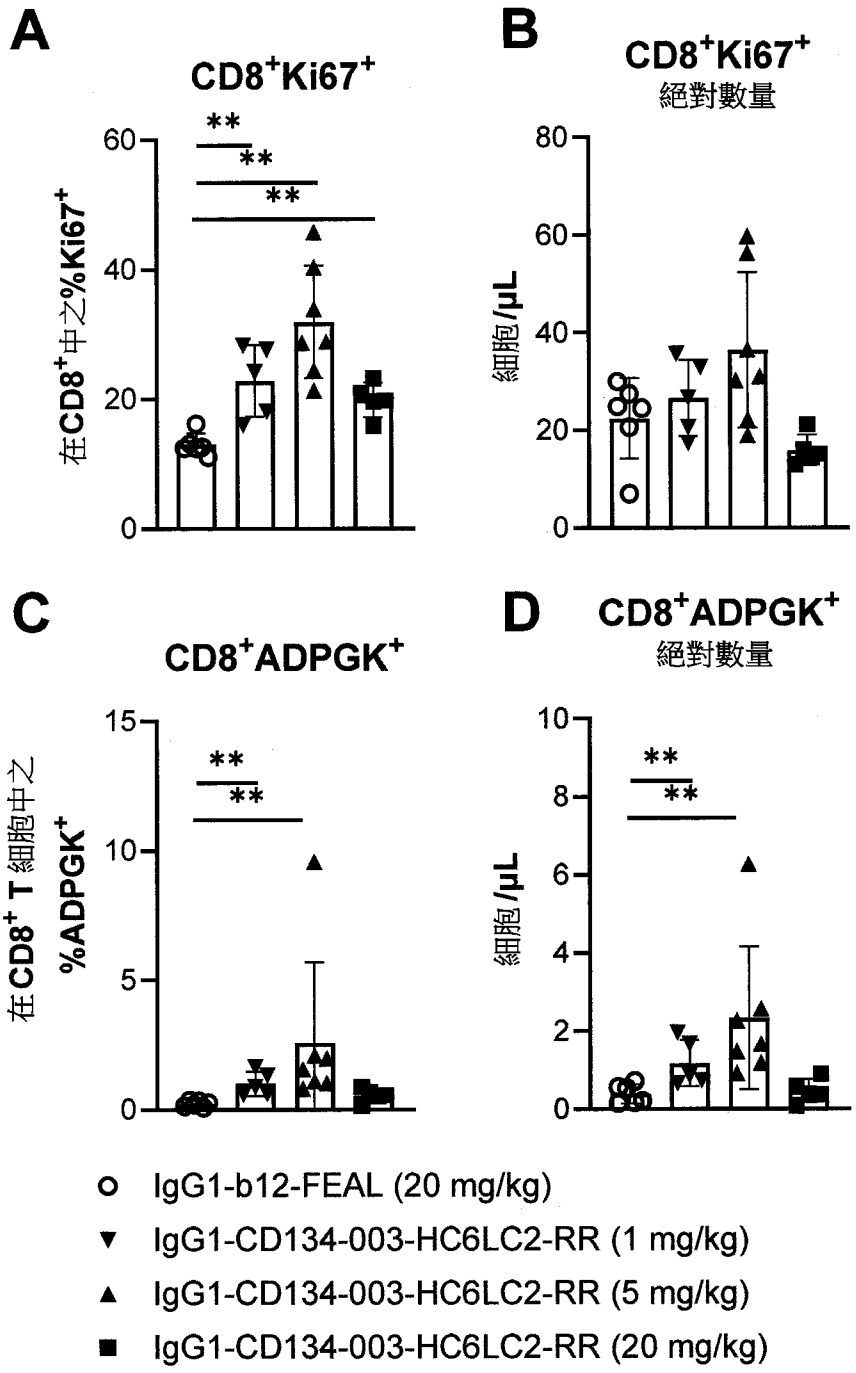
【圖 39】(續)


A
CD4+
百分比
CD3+ 之 %CD4+
100
80
60
40
**
**
**
B
CD4+
絕對數量
CD4+ 細胞 /μL
500
400
300
200
100
0
C
CD8+
百分比
CD3+ 之 %CD8+
80
60
40
20
0
**
D
CD8+
絕對數量
CD8+ 細胞 /μL
400
300
200
100
0
*
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)

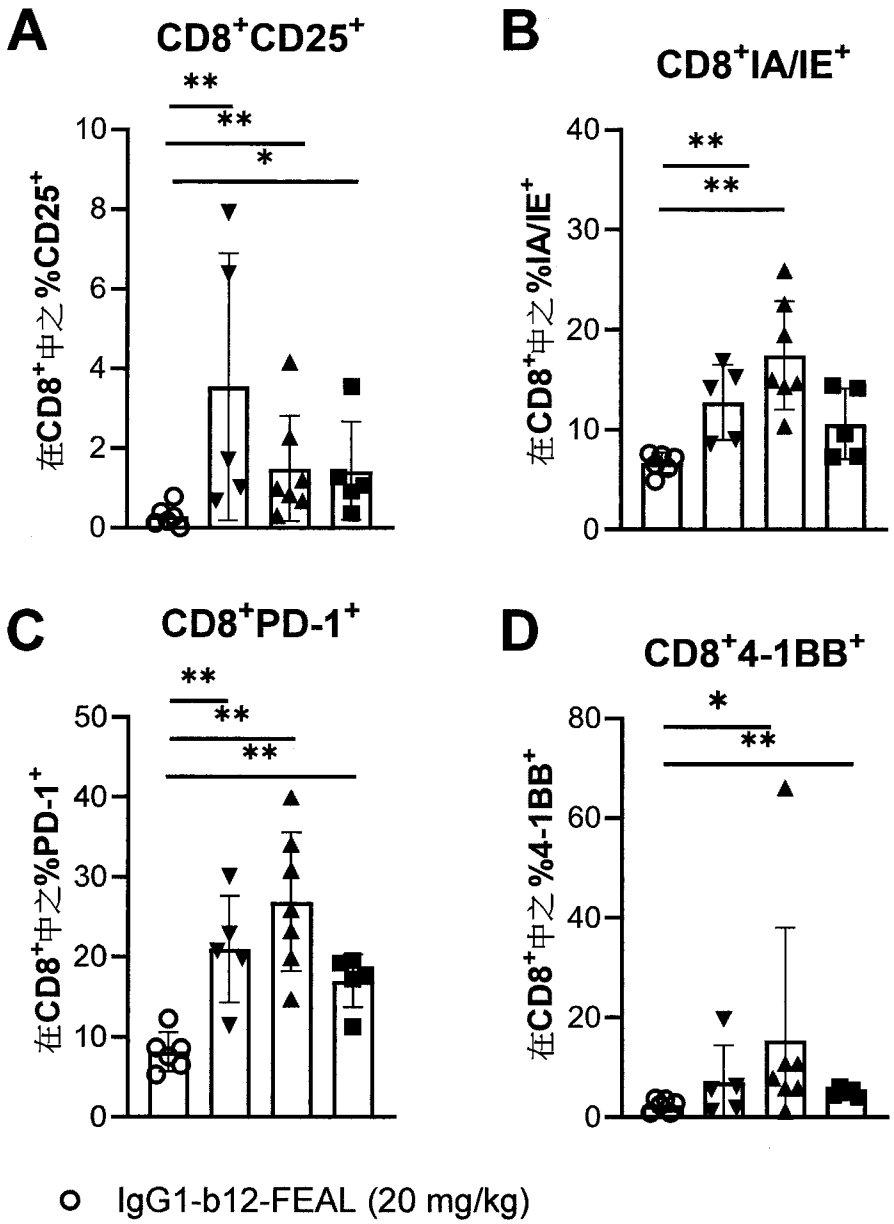
【圖 40】


A
CD4+Ki67+
在CD4+中之 %Ki67+
B
CD4+CD25+
在CD4+中之 %CD25+
C
CD4+IA/IE+
在CD4+中之%IA/IE+
D
CD4+PD-1+
在CD4+中之%PD-1+
E
CD4+4-1BB+
在CD4+中之%4-1BB+
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)

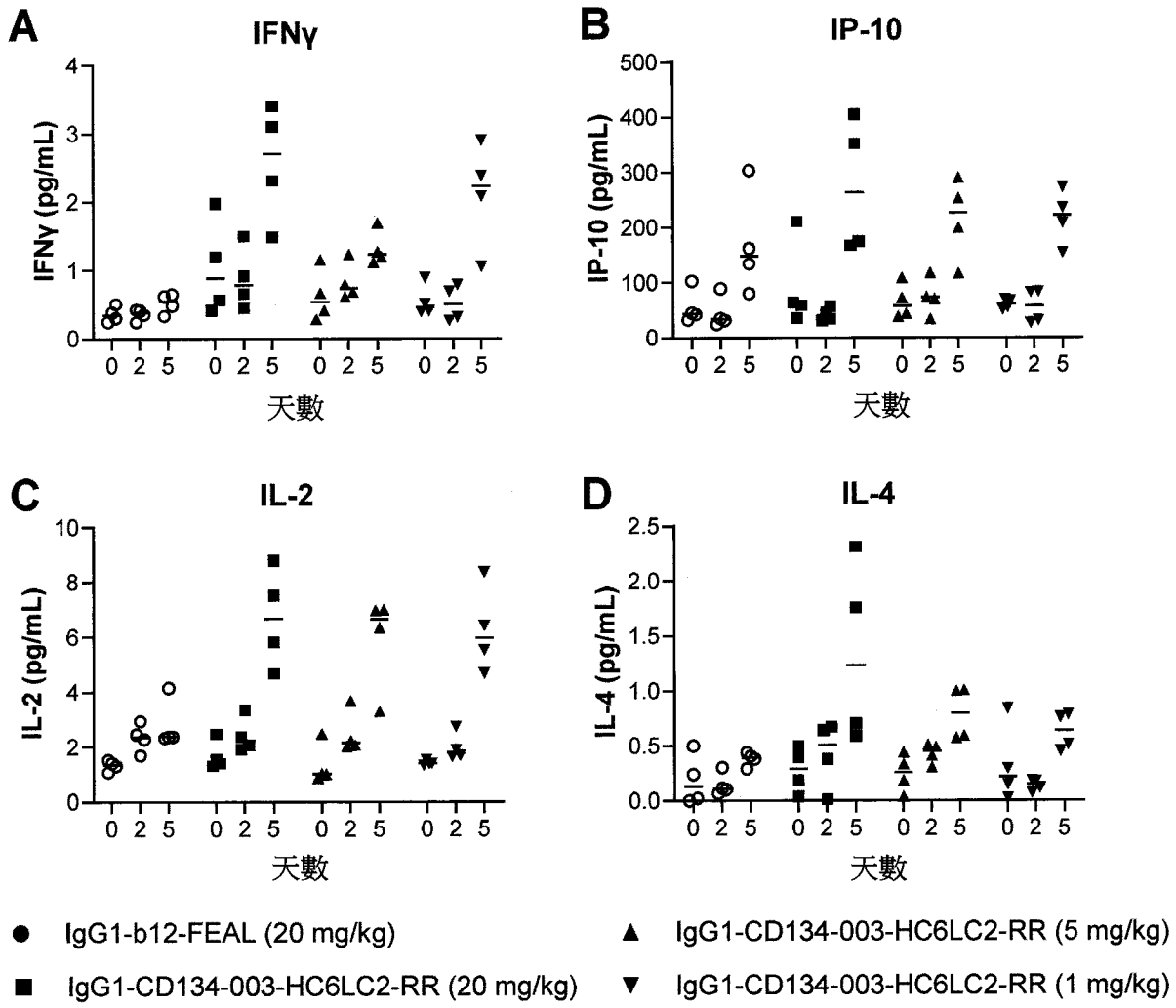
【圖 41】


A
CD8+Ki67+
在CD8+中之%Ki67+
60
40
20
0
**
**
**
B
CD8+Ki67+
絕對數量
細胞/μL
80
60
40
20
0
C
CD8+ADPGK+
在CD8+ T 細胞中之
%ADPGK+
15
10
5
0
**
**
D
CD8+ADPGK+
絕對數量
細胞/μL
10
8
6
4
2
0
**
**
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)

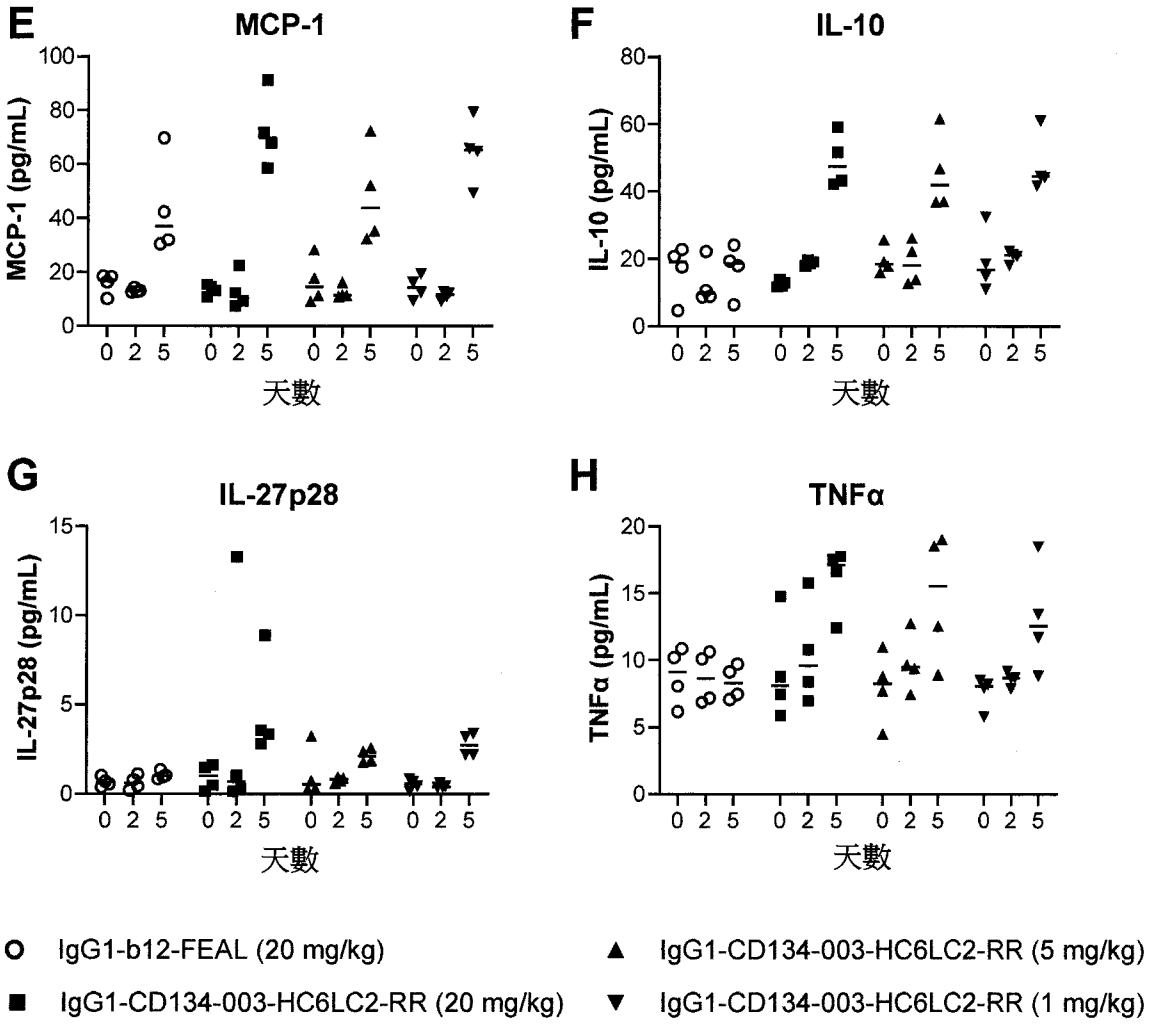
【圖 42】


A
CD8+CD25+
在CD8+中之%CD25+
B
CD8+IA/IE+
在CD8+中之%IA/IE+
C
CD8+PD-1+
在CD8+中之%PD-1+
D
CD8+4-1BB+
在CD8+中之%4-1BB+
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)

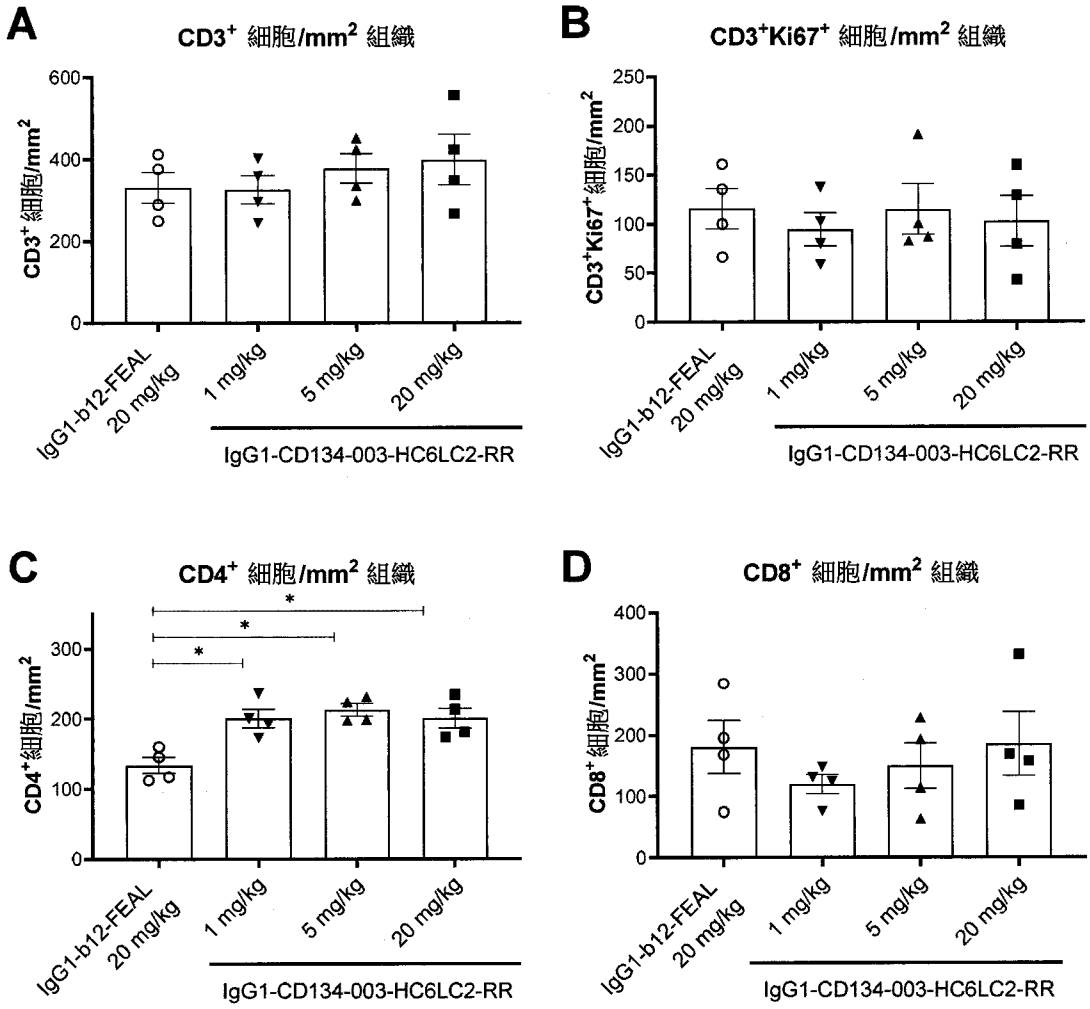
【圖 43】


A
IFNγ
IFNγ (pg/mL)
天數
B
IP-10
IP-10 (pg/mL)
天數
C
IL-2
IL-2 (pg/mL)
天數
D
IL-4
IL-4 (pg/mL)
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

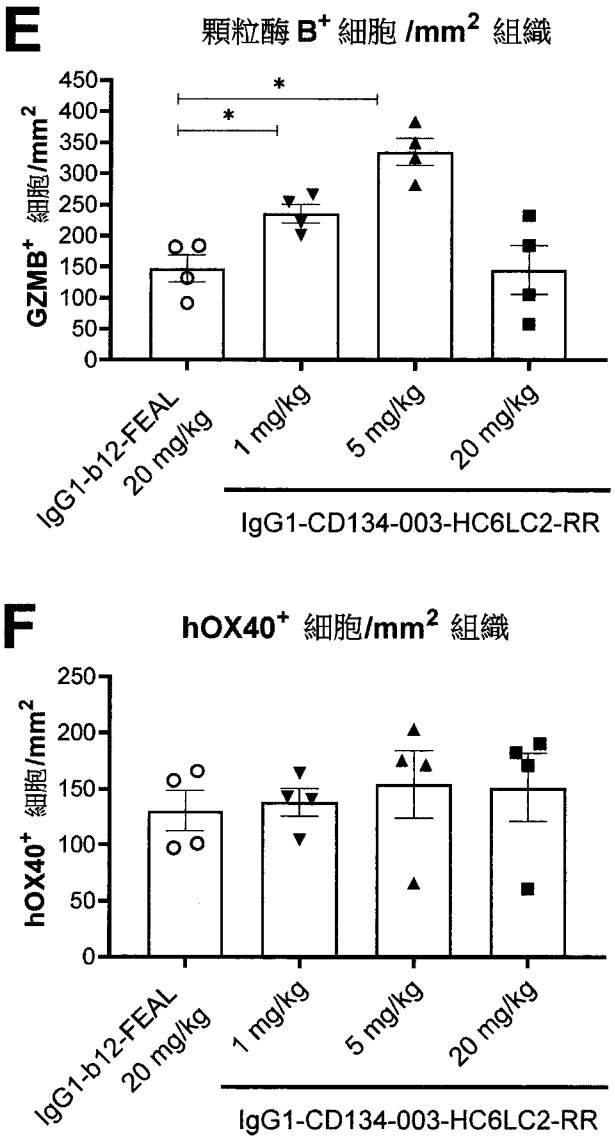
【圖 44】


E
MCP-1
MCP-1 (pg/mL)
100
80
60
40
20
0
0 2 5 0 2 5 0 2 5 0 2 5
天數
F
IL-10
IL-10 (pg/mL)
80
60
40
20
0
0 2 5 0 2 5 0 2 5 0 2 5
天數
G
IL-27p28
IL-27p28 (pg/mL)
15
10
5
0
0 2 5 0 2 5 0 2 5 0 2 5
天數
H
TNFα
TNFα (pg/mL)
20
15
10
5
0
0 2 5 0 2 5 0 2 5 0 2 5
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

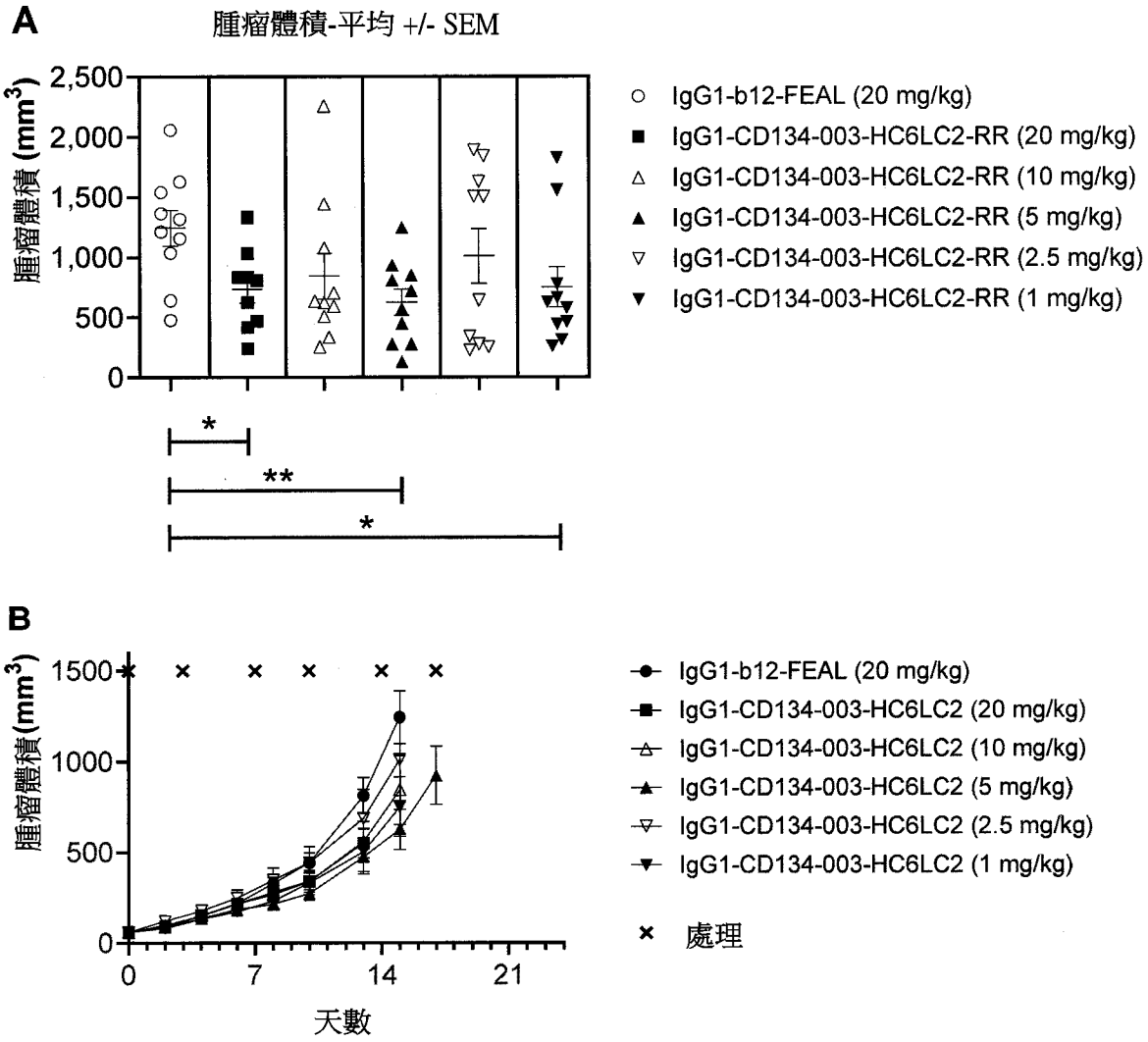
【圖 44】(續)


A
CD3+ 細胞/mm2 組織
CD3+細胞/mm2
600
400
200
0
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
B
CD3+Ki67+ 細胞/mm2 組織
CD3+Ki67+細胞/mm2
250
200
150
100
50
0
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
C
CD4+ 細胞/mm2 組織
CD4+細胞/mm2
*
*
*
300
200
100
0
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
D
CD8+ 細胞/mm2 組織
CD8+細胞/mm2
400
300
200
100
0
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR

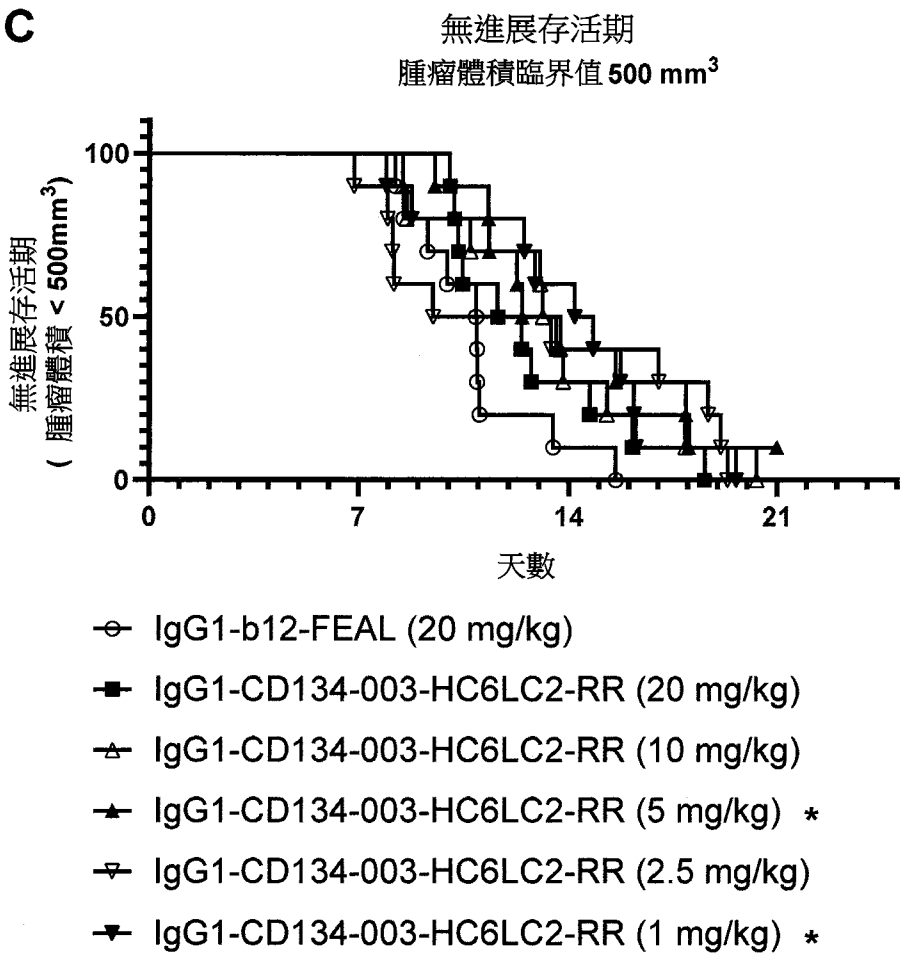
【圖 45】


E
顆粒酶 B+ 細胞 /mm2 組織
GZMB+ 細胞/mm2
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR
F
hOX40+ 細胞/mm2 組織
hOX40+ 細胞/mm2
250
200
150
100
50
0
IgG1-b12-FEAL 20 mg/kg
1 mg/kg
5 mg/kg
20 mg/kg
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR

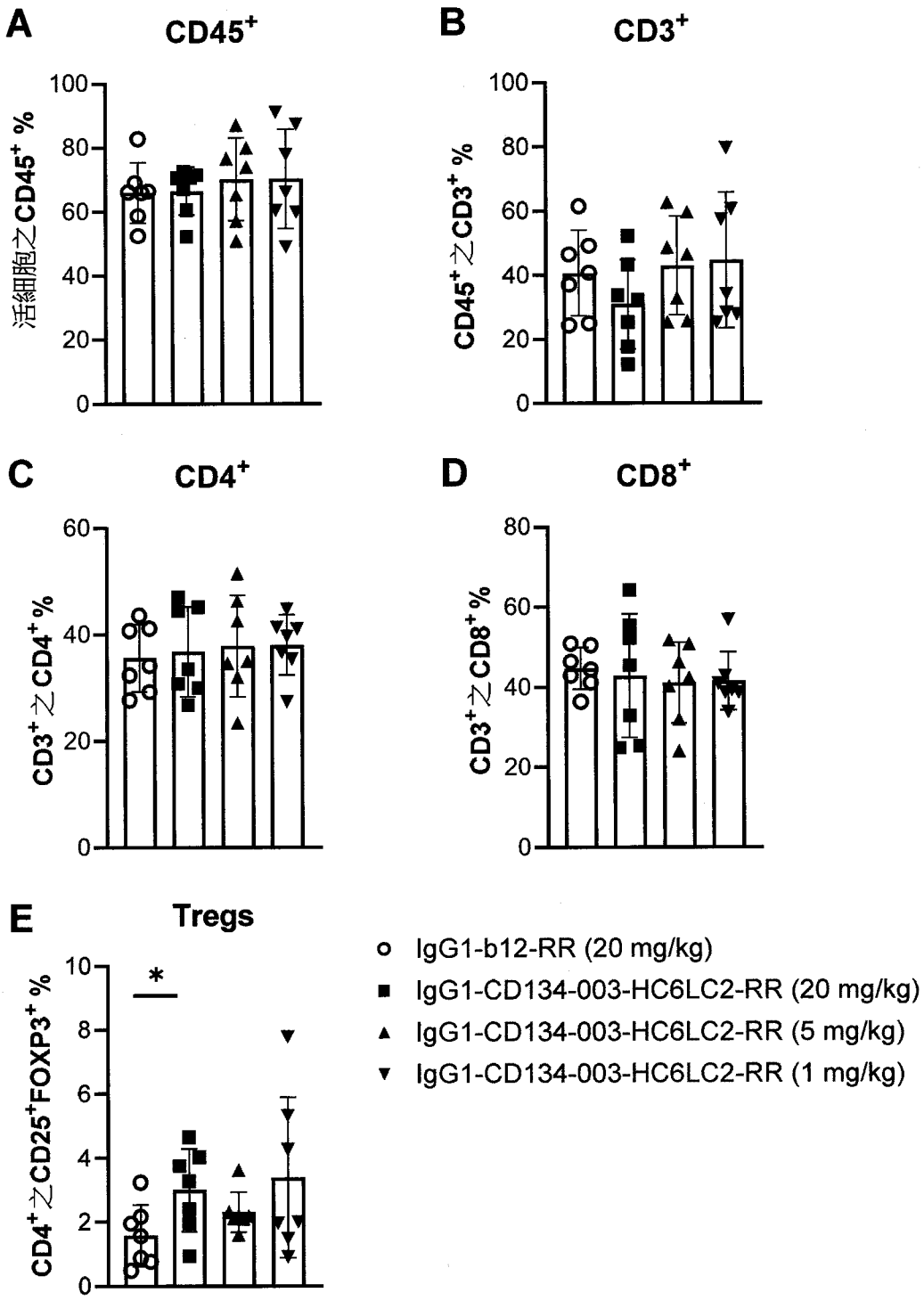
【圖 45】(續)


A
腫瘤體積-平均 +/- SEM
腫瘤體積 (mm3)
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
*
**
*
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (10 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (2.5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)
B
腫瘤體積(mm3)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2 (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2 (10 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2 (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2 (2.5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2 (1 mg/kg)
處理

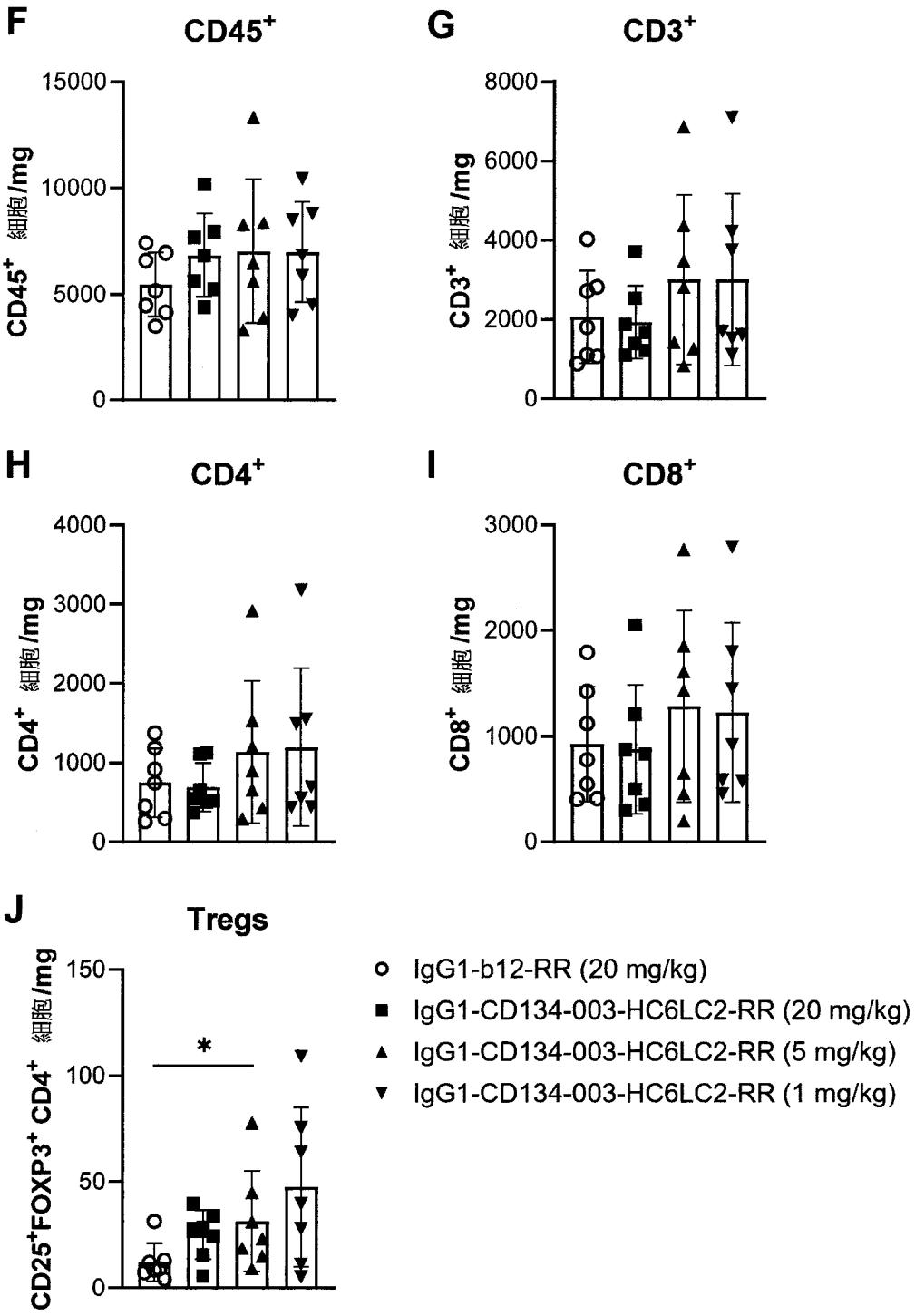
【圖 46】


C
無進展存活期
腫瘤體積臨界值 500 mm3
無進展存活期
（腫瘤體積 < 500mm3）
100
50
0
0
7
14
21
天數
IgG1-b12-FEAL (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (10 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg) *
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (2.5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg) *

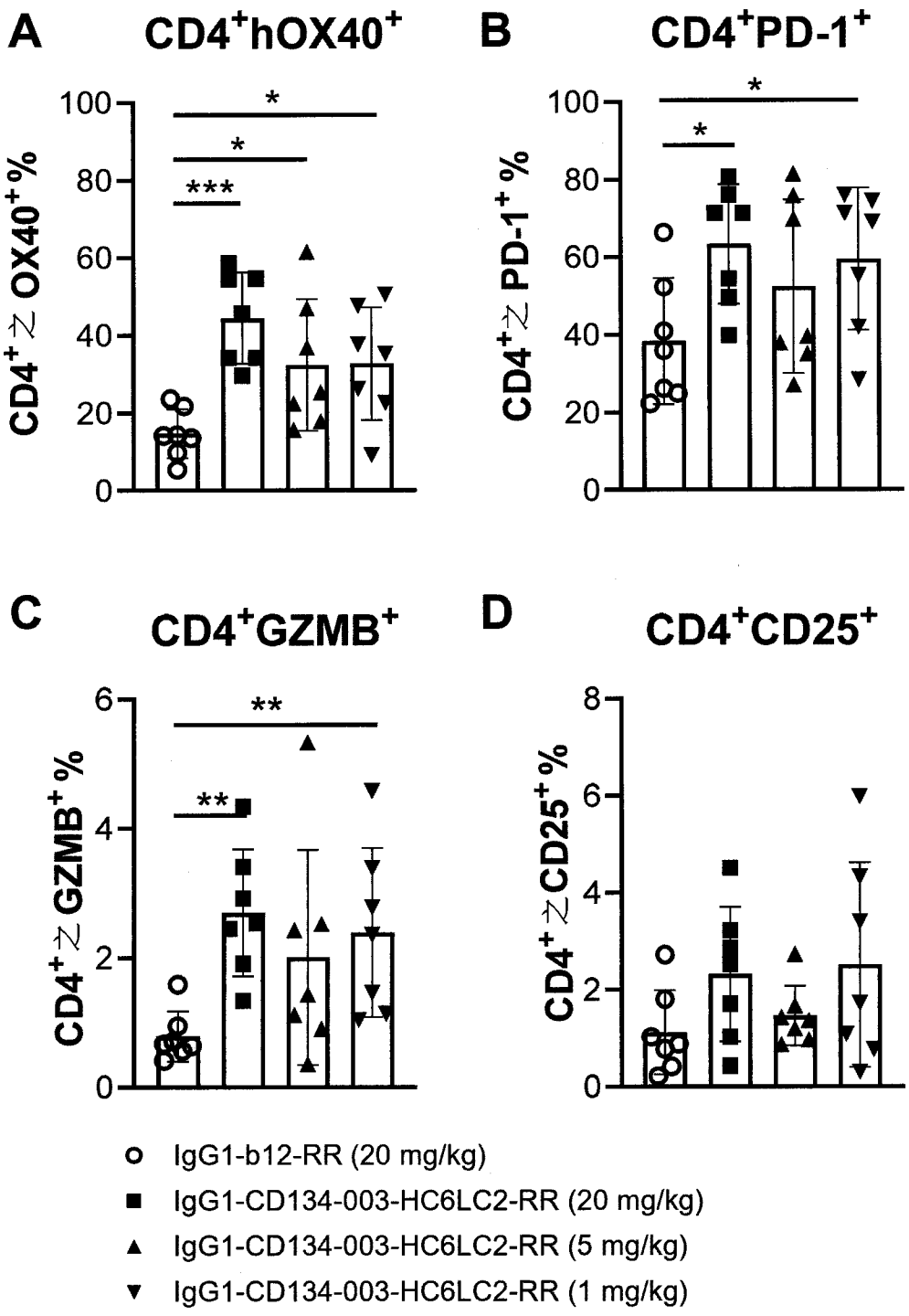
【圖 46】(續)


A
CD45+
活細胞之CD45+ %
B
CD3+
CD45+之CD3+ %
C
CD4+
CD3+之CD4+ %
D
CD8+
CD3+之CD8+ %
E
Tregs
CD4+之CD25+FOXP3+ %
*
IgG1-b12-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

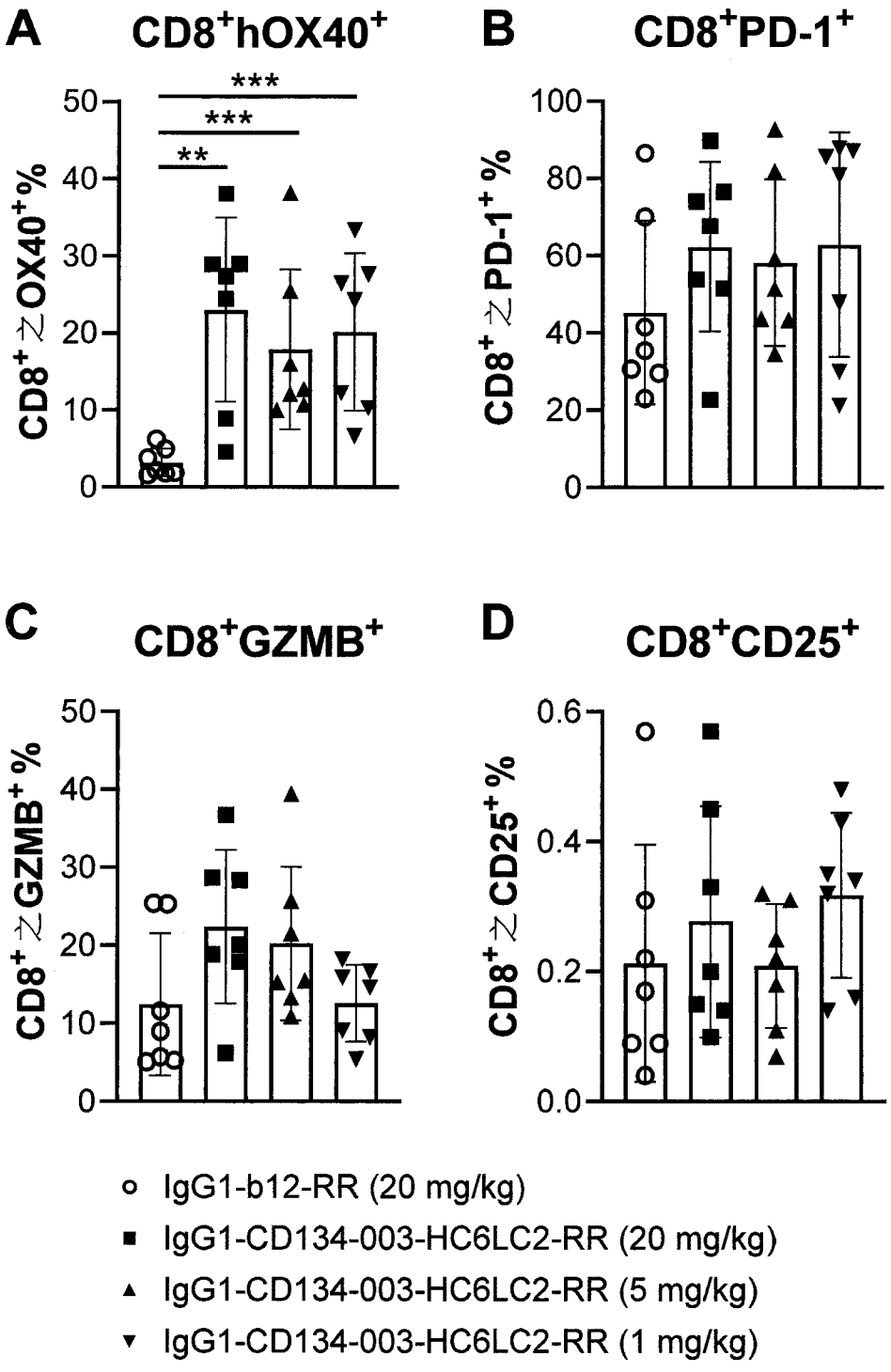
【圖 47】


F
CD45+
CD45+ 細胞/mg
15000
10000
5000
0
G
CD3+
CD3+ 細胞/mg
8000
6000
4000
2000
0
H
CD4+
CD4+ 細胞/mg
4000
3000
2000
1000
0
I
CD8+
CD8+ 細胞/mg
3000
2000
1000
0
J
Tregs
CD25+FOXP3+ CD4+ 細胞/mg
150
100
50
0
*
IgG1-b12-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

【圖 47】(續)


A
CD4+hOX40+
CD4+之OX40+%
100
80
60
40
20
0
*
*
***
B
CD4+PD-1+
CD4+之PD-1+%
100
80
60
40
20
0
*
*
C
CD4+GZMB+
CD4+之GZMB+%
6
4
2
0
**
**
D
CD4+CD25+
CD4+之CD25+%
8
6
4
2
0
IgG1-b12-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

【圖 48】


A
CD8+hOX40+
CD8+之OX40+%
***
***
**
B
CD8+PD-1+
CD8+之PD-1+%
C
CD8+GZMB+
CD8+之GZMB+%
D
CD8+CD25+
CD8+之CD25+%
IgG1-b12-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (20 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (5 mg/kg)
IgG1-CD134-003-HC6LC2-RR (1 mg/kg)

【圖 49】