

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-503031

(P2023-503031A)

(43)公表日 令和5年1月26日(2023.1.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 4
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		4 C 2 0 6
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全64頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-528949(P2022-528949)	(71)出願人	522194094		
(86)(22)出願日	令和2年11月19日(2020.11.19)		ベイジーン (ベイジン) カンパニー リ		
(85)翻訳文提出日	令和4年5月17日(2022.5.17)		ミテッド		
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/129964		BEIGENE (BEIJING) C		
(87)国際公開番号	WO2021/098748		O., LTD.		
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		中華人民共和国 ベイジン 102206		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2019/120021		、チャンピン、チョングアンクン ライフ		
(32)優先日	令和1年11月21日(2019.11.21)		サイエンス パーク、サイエンス パーク		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		ロード、ナンバー 30		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	110002871	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 化学療法剤との組合せでの抗OX40抗体による癌治療の方法

(57)【要約】

提供されるのは、化学療法剤との組合せで、ヒトOX40 (ACT35、CD134、又はTNFRSF4) に結合する非競合抗OX40抗体及びその抗原結合フラグメントにより癌を治療する方法である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌治療の方法であって、追加の化学療法剤との組合せで有効量の非競合抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合フラグメントを対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記抗 O X 4 0 抗体が、ヒト O X 4 0 に特異的に結合し、且つ

(i) (a) 配列番号 3 の H C D R (重鎖相補性決定領域) 1 と (b) 配列番号 2 4 の H C D R 2 と (c) 配列番号 5 の H C D R 3 とを含む重鎖可変領域及び (d) 配列番号 2 5 の L C D R (軽鎖相補性決定領域) 1 と (e) 配列番号 1 9 の L C D R 2 と (f) 配列番号 8 の L C D R 3 とを含む軽鎖可変領域、

10

(i i) (a) 配列番号 3 の H C D R 1 と (b) 配列番号 1 8 の H C D R 2 と (c) 配列番号 5 の H C D R 3 とを含む重鎖可変領域及び (d) 配列番号 6 の L C D R 1 と (e) 配列番号 1 9 の L C D R 2 と (f) 配列番号 8 の L C D R 3 とを含む軽鎖可変領域、

(i i i) (a) 配列番号 3 の H C D R 1 と (b) 配列番号 1 3 の H C D R 2 と (c) 配列番号 5 の H C D R 3 とを含む重鎖可変領域及び (d) 配列番号 6 の L C D R 1 と (e) 配列番号 7 の L C D R 2 と (f) 配列番号 8 の L C D R 3 とを含む軽鎖可変領域、又は

(i v) (a) 配列番号 3 の H C D R 1 と (b) 配列番号 4 の H C D R 2 と (c) 配列番号 5 の H C D R 3 とを含む重鎖可変領域及び (d) 配列番号 6 の L C D R 1 と (e) 配列番号 7 の L C D R 2 と (f) 配列番号 8 の L C D R 3 とを含む軽鎖可変領域、

20

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 O X 4 0 抗体又は抗原結合フラグメントが、

(i) 配列番号 2 6 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 2 8 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、

(i i) 配列番号 2 0 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 2 2 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、

(i i i) 配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 1 6 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、又は

(i v) 配列番号 9 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 1 1 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、

30

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記追加の化学療法剤が、白金剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記白金剤が、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、及びテトラプラチンからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記追加の化学療法剤が、F O L F O X (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びオキサリプラチン) からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌が、固形腫瘍又は液性腫瘍である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記癌が、結腸直腸癌、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、脳癌、子宮頸癌、膀胱癌、子宮癌、結腸癌、肝癌、脾癌、肺癌、子宮内膜癌、骨癌、精巣癌、皮膚癌、腎癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、唾液腺癌、骨髓腫、及びリンパ腫からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記癌が、肝細胞癌、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、基底細胞癌、乳癌、皮膚扁平上皮細胞癌、軟骨肉腫、血管肉腫、胆管細胞癌、軟部組織肉腫、結腸直腸癌、黒色腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、多形性膠芽腫、及び B - リンパ腫からなる群から選択される、請

50

求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書で開示されているのは、化学療法剤との組合せで、ヒト OX40 に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントにより癌を治療する方法である。

【背景技術】

【0002】

OX40 (ACT35、CD134、又は TNFRSF4 としても知られる) は、およそ 50KD の I 型膜貫通糖タンパク質であり且つ腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー (TNFRSF) のメンバーである (Croft, 2010、Gough and Weinberg, 2009)。成熟ヒト OX40 は、37AA 細胞質内テール及び 185AA 細胞外領域を含む 249 アミノ酸 (AA) 残基で構成される。OX40 の細胞外ドメインは、3 つの完全な及び 1 つの不完全なシステインリッチドメイン (CRD) を含有する。OX40 の細胞内ドメインは、TRAF2、TRAF3、及び TRAF5 を含むいくつかの TNFR 関連因子 (TRAF) への結合を媒介して細胞内キナーゼへの OX40 の連結を可能する 1 つの保存シグナリング関連 QEE モチーフを含有する (Arch and Thompson, 1998、Willoughby et al., 2017)。

【0003】

OX40 は、活性化ラット CD4⁺T 細胞上で最初に発見され、続いて、T 細胞からネズミ及びヒトホモログがクローニングされた (al-Shamkhani et al., 1996、Calderhead et al., 1993)。T ヘルパー (Th) 1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、さらにはレギュラトリート (Treg) 細胞を含めて、活性化 CD4⁺T 細胞上での発現のほか、OX40 発現は、活性化 CD8⁺T 細胞、ナチュラルキラー (NK) T 細胞、好中球、及び NK 細胞の表面上でも見いだされている (Croft, 2010)。これとは対照的に、低 OX40 発現は、ナイーブ CD4⁺ 及び CD8⁺T 細胞上、さらにはほとんどの休止メモリー T 細胞上に見いだされる (Croft, 2010、Soroosh et al., 2007)。ナイーブ T 細胞上での OX40 の表面発現は一過性である。TCR 活性化後、T 細胞上での OX40 発現は、24 時間以内に大幅に増加し、2~3 日でピークを生じ、5~6 日間持続する (Gramaglia et al., 1998)。

【0004】

OX40 に対するリガンド (OX40L、gp34、CD252、又は TNFSF4 としても知られる) は、OX40 に対する唯一のリガンドである。他の TNFSF (腫瘍壊死因子スーパーファミリー) メンバーに類似して、OX40L は、23AA 細胞内ドメイン及び 133AA 細胞外ドメインを含む 183AA を含有する II 型糖タンパク質である (Croft, 2010、Gough and Weinberg, 2009)。OX40L は、天然では、細胞表面上にホモメリックトリマー複合体を形成する。リガンドトリマーは、CRD4 の関与なしに主にレセプターの CRD1、CRD2、及び部分的 CRD3 領域を介してリガンドモノマー-モノマー界面で OX40 の 3 つのコピーと相互作用する (Compaan and Hymowitz, 2006)。OX40L は、活性化 B 細胞 (Stuber et al., 1995)、成熟従来型樹状細胞 (DC) (Ohshima et al., 1997)、形質細胞様 DC (pDC) (Ito et al., 2004)、マクロファージ (Weinberg et al., 1999)、及びランゲルハンス細胞 (Sato et al., 2002) を含めて、活性化抗原提示細胞 (APC) 上に主に発現される。そのほか、OX40L は、NK 細胞、マスト細胞、活性化 T 細胞のサブセット、さらには血管内皮細胞、平滑筋細胞などの他の細胞型上に発現されることが分かっている (Croft, 2010、Croft et al., 2009)。

【0005】

10

20

30

40

50

トリメリックOX40Lによるライゲーションを介するOX40トリマー化又はアゴニスティック抗体によるダイマー化は、その細胞内QEEモチーフへのアダプター分子TRAF2、TRAF3、及び／又はTRAF5のリクルートメント及びドッキングに寄与する(Arch and Thompson, 1998、Willoughby et al., 2017)。TRAF2及びTRAF3のリクルートメント及びドッキングはさらに、カノニカルNF- κ B1経路及び非カノニカルNF- κ B2経路の両方の活性化をもたらすことが可能であり、これによりT細胞の生存、分化、拡大、サイトカイン産生、及びエフェクター機能のレギュレーションに重要な役割を果たす(Croft, 2010、Gramaglia et al., 1998、Huddleston et al., 2006、Rogers et al., 2001、Ruby and Weinberg, 2009、Song et al., 2005a、Song et al., 2005b、Song et al., 2008)。

10

【0006】

正常組織では、OX40発現は低く、主にリンフォイド器官のリンパ球上で生じる(Durkop et al., 1995)。しかしながら、自己免疫性疾患(Carboni et al., 2003、Jacquemin et al., 2015、Szypowska et al., 2014)や癌(Kjaergaard et al., 2000、Vetto et al., 1997、Weinberg et al., 2000)などの病理学的病態を有する動物モデル及びヒト患者の両方で、OX40発現のアップレギュレーションが頻繁に免疫細胞上で観測されている(Redmond and Weinberg, 2007)。とりわけ、OX40の発現増加は、結腸直腸癌及び皮膚メラノーマを有する患者のより長い生存に関連し、且つ遠隔転移及びより進行した腫瘍の特徴の発生に逆相関する(Ladanyi et al., 2004、Petty et al., 2002、Sarff et al., 2008)。また、抗OX40抗体治療は、各種マウスモデルにおいて抗腫瘍効能を誘発可能であることが示されたことから(Aspesslagh et al., 2016)、免疫療法標的としてOX40の潜在能力が示唆される。Curtiらにより行われた癌患者における最初の臨床試験では、腫瘍特異的T細胞の抗腫瘍効能及び活性化の証拠がアゴニスティック抗OX40モノクローナル抗体で観測されたことから、OX40抗体は、抗腫瘍T細胞反応をブーストするのに有用であることが示唆される(Curti et al., 2013)。

20

30

【0007】

抗腫瘍効能を媒介するアゴニスティック抗OX40抗体の作用機序は、主にマウス腫瘍モデルで試験されてきた(Weinberg et al., 2000)。最近まで、腫瘍でのアゴニスティック抗OX40抗体の作用機序は、エフェクターT細胞の共刺激シグナリング経路さらにはTreg細胞の分化及び機能に対する阻害効果をトリガーするその能力に帰属された(Aspesslagh et al., 2016、Ito et al., 2006、St Rose et al., 2013、Voo et al., 2013)。最近の研究では、動物腫瘍モデル及び癌患者の両方で、腫瘍浸潤Tregは、エフェクターT細胞(CD4⁺及びCD8⁺の両方)並びに末梢Tregよりも高レベルのOX40を発現することが示された(Lai et al., 2016、Marabelle et al., 2013b、Montler et al., 2016、Soroosh et al., 2007、Timperi et al., 2016)。したがって、抗OX40抗体が抗腫瘍反応をトリガーする二次的作用は、抗体依存細胞傷害性(ADCC)及び／又は抗体依存細胞食作用(ADCP)を介して腫瘍内OX40⁺Treg細胞を枯渇させるそのFc媒介エフェクター機能に依拠する(Aspesslagh et al., 2016、Bulliard et al., 2014、Marabelle et al., 2013a、Marabelle et al., 2013b、Smyth et al., 2014)。この研究では、Fc媒介エフェクター機能を有するアゴニスティック抗OX40抗体は、腫瘍内Tregを優先的には枯渇させてCD8⁺エフェクターT細胞と腫瘍マイクロ環境(TME)内のTregとの比を改善することが可

40

50

能であり、その結果、抗腫瘍免疫反応の改善、腫瘍退縮の増加、及び生存の改善がもたらされることが実証される（Bulliard et al., 2014、Carboni et al., 2003、Jacquemin et al., 2015、Marabelle et al., 2013b）。これらの知見に基づけば、アゴニスティック活性及びFc媒介エフェクター機能の両方を有するアゴニスティック抗OX40抗体を開発する医療上の必要性は満たされていない。

【0008】

これまでのところ、診療でのアゴニスティック抗OX40抗体は、主に、OX40-OX40L相互作用をブロックするリガンド競合抗体である（たとえば、国際公開第2016196228A1号パンフレット）。OX40-OX40L相互作用は、有効な抗腫瘍免疫を増強するのに必須であるので、OX40-OX40Lのブロッキングは、こうしたリガンド競合抗体の効能を制限する。したがって、OX40に特異的に結合すると同時にOX40とOX40Lとの相互作用に干渉しないOX40アゴニスト抗体は、癌及び自己免疫性障害の治療に有用である。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示の発明者らは、抗OX40抗体と追加の化学療法剤との組合せが、以上の活性医薬剤単独の各々の単独療法と比較して、癌における腫瘍成長の有意な阻害を生じることを見いだした。

20

【0010】

本開示は、免疫細胞でOX40を活性化してシグナリングを誘発することにより抗腫瘍免疫を促進するアゴニスティック抗OX40抗体及びその抗原結合性フラグメントに関する。

【0011】

一実施形態では、ヒトOX40に結合するアゴニスティックモノクローナル抗体は、又はその抗原結合性フラグメント。一態様では、本開示の抗体は、OX40Lと競合することもOX40のそのリガンドOX40Lへの結合に干渉することもない。

【0012】

本開示は下記実施形態を包含する。

30

【0013】

癌治療の方法であって、追加の化学療法剤との組合せで有効量の非競合抗OX40抗体又はその抗原結合フラグメントを対象に投与することを含む方法。

【0014】

抗OX40抗体が、ヒトOX40に特異的に結合し、且つ

(i) (a) 配列番号3のHCDR（重鎖相補性決定領域）1と、(b) 配列番号24のHCDR2と、(c) 配列番号5のHCDR3とを含む重鎖可変領域、及び(d) 配列番号25のLCDR（軽鎖相補性決定領域）1と、(e) 配列番号19のLCDR2と、(f) 配列番号8のLCDR3とを含む軽鎖可変領域、

(ii) (a) 配列番号3のHCDR1と、(b) 配列番号18のHCDR2と、(c) 配列番号5のHCDR3とを含む重鎖可変領域、及び(d) 配列番号6のLCDR1と、(e) 配列番号19のLCDR2と、(f) 配列番号8のLCDR3とを含む軽鎖可変領域、

40

(iii) (a) 配列番号3のHCDR1と、(b) 配列番号13のHCDR2と、(c) 配列番号5のHCDR3とを含む重鎖可変領域、及び(d) 配列番号6のLCDR1と、(e) 配列番号7のLCDR2と、(f) 配列番号8のLCDR3とを含む軽鎖可変領域、又は

(iv) (a) 配列番号3のHCDR1と、(b) 配列番号4のHCDR2と、(c) 配列番号5のHCDR3とを含む重鎖可変領域、及び(d) 配列番号6のLCDR1と、(e) 配列番号7のLCDR2と、(f) 配列番号8のLCDR3とを含む軽鎖可変領域

50

を含む、方法。

【0015】

O X 4 0 抗体又は抗原結合フラグメントが、

(i) 配列番号 2 6 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 2 8 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、

(i i) 配列番号 2 0 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 2 2 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、

(i i i) 配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 1 6 を含む軽鎖可変領域 (V L) 、又は

(i v) 配列番号 9 を含む重鎖可変領域 (V H) 及び配列番号 1 1 を含む軽鎖可変領域 (V L)

10

を含む、方法。

【0016】

追加の化学療法剤が、白金剤である、方法。

【0017】

白金剤が、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、及びテトラプラチンからなる群から選択される、方法。

【0018】

追加の化学療法剤が、F O L F O X (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びオキサリプラチン) からなる、方法。

20

【0019】

癌が、固形腫瘍又は液性腫瘍である、方法。

【0020】

癌が、結腸直腸癌、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、脳癌、子宮頸癌、膀胱癌、子宮癌、結腸癌、肝癌、脾癌、肺癌、子宮内膜癌、骨癌、精巣癌、皮膚癌、腎癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、唾液腺癌、骨髓腫、及びリンパ腫からなる群から選択される、方法。

【0021】

癌が、肝細胞癌、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、基底細胞癌、乳癌、皮膚扁平上皮細胞癌 (c u t a n e o u s s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a) 、軟骨肉腫、血管肉腫、胆管細胞癌、軟部組織肉腫、結腸直腸癌、黒色腫、メルケル細胞癌、膠芽腫、多形性膠芽腫、及びB-リンパ腫からなる群から選択される、方法。

30

【0022】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 1 3、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 4、及び配列番号 2 5 からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む。

【0023】

他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、(a) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 1 3、配列番号 1 8、配列番号 2 4、及び配列番号 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の相補性決定領域 (H C D R) を含む重鎖可変領域、及び／又は (b) 配列番号 6、配列番号 2 5、配列番号 7、配列番号 1 9、及び配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の相補性決定領域 (L C D R) を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0024】

他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 4、配列番号 1 3、配列番号 1 8、又は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、の 3 つの相補性決定領域 (H C D R) を含む重鎖可変領域、及び／又は (b) 配列番号 6 又は配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 7 又は配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C

50

D R 3 と、の 3 つの相補性決定領域（L C D R）を含む軽鎖可変領域を含む。

【0025】

他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（a）配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、若しくは配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、若しくは配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、若しくは配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、の 3 つの相補性決定領域（H C D R）を含む重鎖可変領域、及び／又は（b）配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、若しくは配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、若しくは配列番号 25 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、の 3 つの相補性決定領域（L C D R）を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0026】

他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0027】

一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0028】

他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、を含む軽鎖可変領域を含む。

【0029】

他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 と、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する H C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する H C D R 3 と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号 25 のアミノ酸配列を有する L C D R 1 と、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する L C D R 2 と、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する L C D R 3 と、を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【0030】

一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（a）配列番号 9、配列番号 14、配列番号 20、若しくは配列番号 26 のアミノ酸配列、又は配列番号 9、配列番号 14、配列番号 20、若しくは配列番号 26 のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % 同一のアミノ酸配列、を有する重鎖可変領域、及び／或いは（b）配列番号 11、配列番号 16、配列番号 22、若しくは配列番号 28 のアミノ酸配列、又は配列番号 11、配列番号 16、配列番号 22、若しくは配列番号 28 のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、若し

50

くは99%同一のアミノ酸配列、を有する軽鎖可変領域を含む。

【0031】

他の一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、(a)配列番号9、配列番号14、配列番号20、若しくは配列番号26のアミノ酸配列、又は配列番号9、配列番号14、配列番号20、若しくは配列番号26のアミノ酸配列中に1、2、若しくは3つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列、を有する重鎖可変領域、及び／又は(b)配列番号11、配列番号16、配列番号22、若しくは配列番号28のアミノ酸配列、又は配列番号11、配列番号16、配列番号22、若しくは配列番号28のアミノ酸中に1、2、3、4、若しくは5つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖可変領域を含む。他の一実施形態では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

10

【0032】

一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、

(a)配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

(b)配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

(c)配列番号20のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号22のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

(d)配列番号26のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号28のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0033】

一実施形態では、本開示の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4アイソタイプである。より具体的な実施形態では、本開示の抗体は、野生型ヒトIgG1(ヒトIgG1wt又はhuIgG1としても参照される)又はIgG2のFcドメインを含む。他の一実施形態では、本開示の抗体は、S228P及び／又はR409K置換(EU番号付けシステムによる)を有するヒトIgG4のFcドメインを含む。

【0034】

一実施形態では、本開示の抗体は、 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ M}$ の結合親和性(K_D)でOX40に結合する。他の一実施形態では、本開示の抗体は、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、又は約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ の結合親和性(K_D)でOX40に結合する。

30

【0035】

他の一実施形態では、本開示の抗ヒトOX40抗体は、カニクイザルOX40に対する種交差結合活性を示す。

【0036】

一実施形態では、本開示の抗OX40抗体は、OX40-OX40L相互作用界面の外側のヒトOX40のエピトープに結合する。他の一実施形態では、本開示の抗OX40抗体は、OX40へのOX40リガンド結合と競合しない。さらに他の一実施形態では、本開示の抗OX40抗体は、OX40とそのリガンドOX40Lとの相互作用をブロックしない。

40

【0037】

本開示の抗体は、アゴニスティックであり、免疫反応を有意に増強する。ある実施形態では、本開示の抗体は、混合リンパ球反応(MLR)アッセイで初代T細胞を有意に刺激してIL-2を産生可能である。

【0038】

一実施形態では、本開示の抗体は、強いFc媒介エフェクター機能を有する。抗体は、NK細胞によるレギュラトリーT細胞(Treg細胞)などのOX40^{Hi}標的細胞に対する抗体依存細胞性細胞傷害性(ADCC)を媒介する。一態様では、本開示は、異なるOX40発現レベルに基づいて特異的T細胞サブセットの抗OX40抗体媒介in vi

50

t r o 枯渴を評価する方法を提供する。

【0039】

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、OX40-OX40L相互作用をブロックしない。そのほか、OX40抗体は、動物モデルで示されるように、in vivoで用量依存抗腫瘍活性を呈する。用量依存活性は、OX40-OX40L相互作用をブロックする抗OX40抗体の活性プロファイルから区別される。

【0040】

本開示は、抗体又は抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸に関する。一実施形態では、単離された核酸は、配列番号10、配列番号15、配列番号21、若しくは配列番号27のVHヌクレオチド配列、又は配列番号10、配列番号15、配列番号21、若しくは配列番号27に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、且つ本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントのVH領域をコードする。代替的又は追加的に、単離された核酸は、配列番号12、配列番号17、配列番号23、若しくは配列番号29のVLヌクレオチド配列、又は配列番号12、配列番号17、配列番号23、若しくは配列番号29に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、且つ本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントのVL領域をコードする。

【0041】

別の態様では、本開示は、OX40抗体又はその抗原結合フラグメントと、任意選択的な薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1、及びOX40-His構築物の模式図である。OX40 ECD：OX40細胞外ドメイン。N：N末端。C：C末端。

【図2】表面プラズモン共鳴（SPR）による精製されたキメラ（ch445）並びにヒト化（445-1、445-2、445-3、及び445-3 IgG4）抗OX40抗体の親和性決定を示す。

【図3】フローサイトメトリーによるOX40結合の決定を実証する。OX40陽性HuT78/OX40細胞は、各種抗OX40抗体（抗体ch445、445-1、445-2、445-3、及び445-3 IgG4）とともにインキュベートされ、FACS解析に付された。結果は、平均蛍光強度（MFI、Y軸）により示される。

【図4】フローサイトメトリーによるOX40抗体の結合を示す。HuT78/OX40及びHuT78/cynoOX40細胞は、抗体445-3で染色され、平均蛍光強度（MFI、Y軸において示された）は、フローサイトメトリーにより決定された。

【図5】表面プラズモン共鳴（SPR）によるOX40野生型及び点突然変異体に対する445-3 Fabの親和性決定を示す。

【図6】抗体445-3とOX40上のそのエピトープとの間の詳細な相互作用を示す。抗体445-3及びOX40は、それぞれ、淡灰色及び黒色で描かれる。水素結合又は塩ブリッジ、パイパイスタッキング、及びファンデルワールス（VDW）相互作用は、それぞれ、破線、二重破線、及び実線で表される。

【図7】抗体445-3がOX40L結合に干渉しないことを実証する。HEK293/OX40L細胞を染色する前に、OX40-マウスIgG2a（OX40-mIgG2a）融合タンパク質は、ヒトIgG（+HuIgG）、抗体445-3（+445-3）、又は抗体1A7.gr1（+1A7.gr1、米国特許出願公開第2015/0307617号明細書参照）とともに1：1のモル比でプレインキュベートされた。OX40-mIgG2a/抗OX40抗体複合体へのOX40Lの結合は、HEK293/OX40L細胞及びOX40-mIgG2a/抗OX40抗体複合体の共インキュベーション、続く抗マウスIgG二次Abとの反応及びフローサイトメトリーにより決定された。結果は、

10

20

30

40

50

デュプリケートの平均±SDで示された。統計的有意性：*：P<0.05、**：P<0.01。

【図8】報告されたOX40/OX40L複合体（PDBコード：2HEV）とともにOX40/445-3Fabの構造アライメントを示す。OX40Lは白色で示され、445-3Fabは灰色で示され、且つOX40は黒色で示される。

【図9】抗OX40抗体445-3がTCR刺激との関連でIL-2産生を誘発することを示す。OX40陽性HuT78/OX40細胞（図9A）は、抗OX40抗体の存在下で人工抗原提示細胞（APC）系（HEK293/OS8^{Low}-FcγRI）とともに一晚共培養され、IL-2産生は、T細胞刺激に対するリードアウトとして使用された（図9B）。培養上清中のIL-2は、ELISAにより検出された。結果は、トリプリケートの平均±SDで示される。

10

【図10】抗OX40抗体がMLR反応を増強することを示唆する。in vitro分化樹状細胞（DC）は、抗OX40抗体（0.1~10μg/ml）の存在下で同種異系CD4⁺T細胞とともに2日間共培養された。上清中のIL-2は、ELISAにより検出された。試験はすべて、クアドルプリケートで行われ、結果は、平均±SDとして示された。統計的有意性：*：P<0.05、**：P<0.01。

【図11】抗OX40抗体445-3がADCCを誘発することを実証する。ADCCアッセイは、抗OX40抗体（0.004~3μg/ml）又はコントロールの存在下でエフェクター細胞としてNK92MI/CD16V細胞及び標的細胞としてHuT78/OX40細胞を用いて実施された。等しい数のエフェクター細胞及び標的細胞は、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）放出を検出する前に5時間にわたり共培養された。細胞傷害性のパーセンテージ（Y軸）は、実施例12に記載のように製造業者のプロトコルに基づいて計算された。結果は、トリプリケートの平均±SDで示される。

20

【図12】NK細胞との組合せの抗OX40抗体445-3がin vitroの活性化PBMCでCD8⁺エフェクターT細胞とTregとの比を増加させることを示す。ヒトPBMCは、PHA-L（1μg/ml）によりあらかじめ活性化され、次いで、抗OX40抗体又はコントロールの存在下でNK92MI/CD16V細胞とともに共培養された。異なるT細胞サブセットのパーセンテージは、フローサイトメトリーにより決定された。CD8⁺エフェクターT細胞とTregとの比がさらに計算された。図12Aは、CD8⁺/合計T細胞比を示す。図12Bは、Treg/合計T細胞比である。図12Cは、CD8⁺/Treg比を示す。データは、デュプリケートの平均±SDとして示される。指示濃度での445-3と1A7.gr1との統計的有意性が示される。*：P<0.05、**：P<0.01。

30

【図13A】1A7.gr1ではなく抗OX40抗体445-3がOX40ヒト化マウスにおけるMC38結腸直腸癌同種同系モデルで用量依存抗腫瘍活性を明らかにすることを示す。MC38ネズミ結腸癌細胞（2×10⁷）は、雌ヒトOX40トランスジェニックマウスにおいて皮下に植え込まれた。腫瘍体積によるランダム化後、動物は、抗OX40抗体又はアイソタイプコントロールのどちらかが指示通り週1回で3回腹腔内注射された。図13Aは、漸増用量の445-3抗体と漸増用量の1A7.gr1抗体とを比較するとともに、腫瘍成長の低減を比較する。

40

【図13B】1A7.gr1ではなく抗OX40抗体445-3がOX40ヒト化マウスにおけるMC38結腸直腸癌同種同系モデルで用量依存抗腫瘍活性を明らかにすることを示す。MC38ネズミ結腸癌細胞（2×10⁷）は、雌ヒトOX40トランスジェニックマウスにおいて皮下に植え込まれた。腫瘍体積によるランダム化後、動物は、抗OX40抗体又はアイソタイプコントロールのどちらかが指示通り週1回で3回腹腔内注射された。図13Bは、その具体的用量で治療されたすべてのマウスのデータを提示する。データは、6匹のマウス/群で平均腫瘍体積±平均の標準誤差（SEM）として提示される。統計的有意性：*：P<0.05 vs アイソタイプコントロール。

【図14A】OX40抗体で行われたアミノ酸改変の表である。

【図14B】OX40抗体で行われたアミノ酸改変の表である。

50

【図15】マウス結腸癌（CT26）モデルにおける化学療法剤（オキサリプラチン）との組合せでのOX40抗体による治療を示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

定義

本文書中の他の箇所に具体的な定義がない限り、本明細書で用いられる他の科学技術用語はすべて、当業者により通常理解される意味を有する。

【0044】

添付の特許請求の範囲を含めて、本明細書で用いられる場合、「a」、「an」、「the」などの語の単数形は、とくに文脈上明確に規定されない限り、それらの対応する複数形の参照語を含む。

10

【0045】

「or（又は）」という用語は、とくに文脈上明確に規定されない限り、「and／or（及び／又は）」という用語を意味するように用いられ、それと互換的に用いられる。

【0046】

本明細書で用いられる「抗癌剤」という用語は、限定されるものではないが、細胞傷害剤、化学療法剤、放射線療法及び放射線療法剤、標的化抗癌剤、及び免疫療法剤を含めて、癌などの細胞増殖障害の治療に使用可能ないずれかの作用剤を意味する。

【0047】

「OX40」という用語は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーのメンバーであるおおよそ50KDのI型膜貫通糖タンパク質を意味する。OX40は、ACT35、CD134、又はTNFRSF4としても知られる。ヒトOX40のアミノ酸配列（配列番号1）は、アクセッション番号NP_003318にも見いだされうるとともに、OX40タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、アクセッション番号：X75962.1である。「OX40リガンド」又は「OX40L」という用語は、OX40の唯一のリガンドを意味し、gp34、CD252、又はTNFSF4との互換性がある。

20

【0048】

本明細書中の「administration（投与）」、「administering（～を投与すること）」、「treating（～を治療すること）」、及び「treatment（治療）」という用語は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、又は生物学的流体に適用されるとき、外因性の医薬剤、治療剤、診断剤、又は組成物と、動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官、又は生物学的流体と、の接触を意味する。細胞の治療は、細胞への試薬の接触、さらには流体が細胞に接触している場合には流体への試薬の接触を包含する。「administration（投与）」及び「treatment（治療）」という用語は、試薬、診断剤、結合性化合物による、又は他の細胞による、細胞などのin vitro及びex vivo治療も意味する。本明細書中の「対象」という用語は、いずれかの生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（たとえば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、最も好ましくはヒトを含む。いずれかの疾患又は障害を治療することとは、一態様では、疾患又は障害を寛解させること（すなわち、疾患又はその臨床症状の少なくとも1つの発生を緩徐化又は停止又は低減すること）を意味する。他の一態様では、「treat（～を治療する）」、「treating（～を治療すること）」、又は「treatment（治療）」とは、患者により識別できないおそれのあるものを含めて、少なくとも1つの物理的パラメータを軽減又は寛解することを意味する。さらに他の一態様では、「treat（～を治療する）」、「treating（～を治療すること）」、又は「treatment（治療）」とは、疾患又は障害を物理的に（たとえば、識別可能な症状の安定化）、生理学的に（たとえば、物理的パラメータの安定化）、又はその両方のどれかをモジュレートすることを意味する。さらに他の一態様では、「treat（～を治療する）」、「treating（～を治療すること）」、又は「treatment（治療）」とは、疾患又は障害の発症又は発生又は進行を予防又は遅延することを意味する。

30

40

50

【0049】

本開示との関連での「対象」という用語は、哺乳動物、たとえば霊長動物、好ましくは高等霊長動物、たとえばヒト（たとえば、本明細書に記載の障害を有する又は有するリスクのある患者）のことである。

【0050】

本明細書で用いられる「親和性」という用語は、抗体と抗原との相互作用の強度を意味する。抗原内では、抗体「アーム」の可変領域が非共有結合力を介して数多くの部位で抗原と相互作用し、相互作用が大きくなるほど親和性は強くなる。

【0051】

本明細書で用いられる「抗体」という用語は、対応する抗原に非共有結合で、可逆的に、且つ特異的に結合可能であるイムノグロブリンファミリーのポリペプチドを意味する。たとえば、天然に存在するIgG抗体は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖とを含むテトラマーである。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略記される）と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2、及びCH3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略記される）と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLで構成される。VH及びVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存された領域が介在する相補性決定領域（CDR）と称される超可変性領域にさらに細分可能である。各VH及びVLは、アミノ末端からカルボキシル末端へ次の順序で配置された3つのCDR及び4つのFR、すなわち、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4で構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の各種細胞（たとえばエフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分（C1q）をはじめとする宿主組織又は因子へのイムノグロブリンの結合を媒介可能である。

【0052】

「抗体」という用語は、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び抗イディオタイプ（抗Id）抗体を含む。抗体は、いずれかのアイソタイプ／クラス（たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）又はサブクラス（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）でありうる。

【0053】

いくつかの実施形態では、抗OX40抗体は、少なくとも1つの抗原結合性部位又は少なくとも可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗OX40抗体は、本明細書に記載のOX40抗体由来の抗原結合性フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗OX40抗体は、単離されているか又は組換えである。

【0054】

本明細書中の「モノクローナル抗体」又は「mAb」又は「Mab」という用語は、実質的に均一な抗体の集団を意味する。すなわち、集団に含まれる抗体分子は、マイナー量で存在しうる天然に存在する可能性のある突然変異を除いてアミノ酸配列が同一である。これとは対照的に、従来（ポリクローナル）抗体調製物は、典型的には、その可変ドメインに、とくに、異なるエпитープに対して特異的であることの多いその相補性決定領域（CDR）に、異なるアミノ酸配列を有する多種多様な抗体を含む。「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特性を意味し、いかなる特定の方法による抗体の産生も必要とみなされるべきではない。モノクローナル抗体（mAb）は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。たとえば、Kohler et al., Nature 1975 256: 495-497、米国特許第4,376,110号明細書、Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992、Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory 1988、及びColligan

et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993を参照されたい。本明細書に開示される抗体は、IgG、IgM、IgD、IgE、IgAを含むいずれかのイムノグロブリンクラス、及びIgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのそれらのいずれかのサブクラスでありうる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、in vitro又はin vivoで培養可能である。高力価のモノクローナル抗体は、in vivo産生で得ることが可能であり、この場合、個別ハイブリドーマ由来の細胞は、高濃度の所望の抗体を含有する腹水を生成するプリスティンブライムBalb/cマウスなどのマウスに腹腔内注射される。アイソタイプIgM又はIgGのモノクローナル抗体は、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を用いてかかる腹水から又は培養上清から精製可能である。

10

【0055】

一般的には、基本抗体構造単位はテトラマーを含む。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一対を含み、各対は、1本の「軽鎖」(約25kDa)と1本の「重鎖」(約50~70kDa)とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約100~110アミノ酸又はそれ以上の可変領域を含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を定義可能である。典型的には、ヒト軽鎖は、カッパ及びラムダ軽鎖として分類される。さらに、ヒト重鎖は、典型的には、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、又は μ として分類され、且つ抗体のアイソタイプをそれぞれIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMとして定義する。軽鎖内及び重鎖内では、可変領域及び定常領域は、約12アミノ酸又はそれ以上の「J」領域により接合され、重鎖は、約10アミノ酸以上の「D」領域も含む。

20

【0056】

各軽鎖／重鎖(VL／VH)対の可変領域は、抗体結合性部位を形成する。そのため、一般的には、インタクト抗体は2つの結合性部位を有する。二機能性抗体又は二重特異的抗体以外は、2つの結合性部位は一般的には同一である。

【0057】

典型的には、重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)間に位置する「相補性決定領域」(CDR)とも呼ばれる3つの超可変領域を含む。CDRは、通常はフレームワーク領域によりアライメントされ、特異的エピトープへの結合を可能にする。一般的には、N末端からC末端へ、軽鎖及び重鎖可変ドメインは両方とも、FR-1(又はFR1)、CDR-1(又はCDR1)、FR-2(FR2)、CDR-2(CDR2)、FR-3(又はFR3)、CDR-3(CDR3)、及びFR-4(又はFR4)を含む。CDR及びフレームワーク領域の位置は、当技術分野での周知の各種定義、たとえば、Kabata、Chothia、及びAbMを用いて決定可能である(たとえば、Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206(2001)、Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917(1987)、Chothia et al., Nature, 342:877-883(1989)、Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817(1992)、Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-748(1997)を参照されたい)。抗原結合性部位の定義もまた、次のRuiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221(2000)、及びLefranc, M. P., Nucleic Acids Res., 29:207-209(2001)、MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745(1996)、及びMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272(1989)、Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153(1991)、及びRees et al., In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172(1996)に記載されている。

30

40

50

組合せ Kabat 及び Chothia 番号付けスキームでは、いくつかの実施形態では、CDR は、Kabat CDR、Chothia CDR、又はその両方の一部であるアミノ酸残基に対応する。たとえば、CDR は、VH、たとえば哺乳動物 VH、たとえばヒト VH では、アミノ酸残基 26～35 (HC CDR1)、50～65 (HC CDR2)、及び 95～102 (HC CDR3)、並びに VL、たとえば哺乳動物 VL、たとえばヒト VL では、アミノ酸残基 24～34 (LC CDR1)、50～56 (LC CDR2)、及び 89～97 (LC CDR3) に対応する。

【0058】

「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「CDR」由来のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインの VL-CDR1、VL-CDR2、及び VL-CDR3、並びに重鎖可変ドメインの VH-CDR1、VH-CDR2、及び VH-CDR3 及び）を含む。Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (配列により抗体の CDR 領域を定義する) を参照されたい。また、Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 (構造により抗体の CDR 領域を定義する) も参照されたい。「フレームワーク」又は「FR」残基という用語は、CDR 残基として本明細書で定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【0059】

とくに指示がない限り、「抗原結合性フラグメント」とは、抗体の抗原結合性フラグメント、すなわち、全長抗体により結合される抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体フラグメント、たとえば、1つ以上の CDR 領域を保持するフラグメントを意味する。抗原結合性フラグメントの例としては、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、及び Fv フラグメント、ダイアボディー、線状抗体、一本鎖抗体分子、たとえば、一本鎖 Fv (ScFv)、ナノボディー、並びに抗体フラグメントから形成される多重特異的抗体が挙げられる。

【0060】

抗体は、標的タンパク質に「特異的に結合する」。つまり、抗体は、他のタンパク質と比較して、その標的への優先的結合を呈する。ただし、この特異性は、絶対的結合特異性を必要とするわけではない。抗体は、その結合がサンプル中の標的タンパク質の存在の決定因子であれば、たとえば、偽陽性などの望ましくない結果を生じることがなければ、その意図される標的に対して「特異的である」とみなされる。本開示に有用な抗体又はその抗原結合性フラグメントは、非標的タンパク質との親和性の少なくとも 2 倍、好ましくは少なくとも 10 倍、より好ましくは少なくとも 20 倍、最も好ましくは少なくとも 100 倍の親和性で標的タンパク質に結合するであろう。本明細書中の抗体は、それが所与のアミノ酸配列を含むポリペプチドには結合するが、その配列の欠如したタンパク質には結合しないならば、所与のアミノ酸配列、たとえば、ヒト OX40 分子のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合するといわれる。

【0061】

本明細書中の「ヒト抗体」という用語は、ヒトイムノグロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。ヒト抗体は、マウスで、マウス細胞で、又はマウス細胞に由来するハイブリドーマで産生されるのであれば、ネズミ炭水化物鎖を含有可能である。同様に、「マウス抗体」又は「ラット抗体」とは、それぞれ、マウス又はラットのイムノグロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。

【0062】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（たとえばネズミ）抗体さらにはヒト抗体に由来する配列を含有する抗体の形態を意味する。かかる抗体は、非ヒトイムノグロブリンに由来する最小限の配列を含有する。一般的には、ヒト化抗体は、超可変ループのすべて又は

10

20

30

40

50

実質的にすべてが非ヒトイムノグロブリンものに対応し、且つFR領域のすべて又は実質的にすべてがヒトイムノグロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むであろう。ヒト化抗体はまた、任意に、イムノグロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒトイムノグロブリンのものを含むであろう。接頭辞「hum」、「hu」、「Hu」、又は「h」は、親齧歯動物抗体からヒト化抗体を区別する必要があるときに抗体クローン指定に付加される。齧歯動物抗体のヒト化形態は、一般に、親齧歯動物抗体と同一のCDR配列を含むであろうが、ヒト化抗体の親和性の増加、安定性の増加、翻訳後修飾の除去のために、又は他の理由で、ある特定のアミノ酸置換を含むことが可能である。

【0063】

本明細書で用いられる場合、「非競合」という用語は、抗体がレセプターに結合し得、且つこのレセプターへの同族リガンドの結合を妨げないことを意味する。

【0064】

「対応するヒト生殖系配列」という用語は、ヒト生殖系イムノグロブリン可変領域配列によりコードされるすべての他の既知の可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列又はサブ配列に対して最高の決定されたアミノ酸配列同一性を共有するヒト可変領域アミノ酸配列又はサブ配列をコードする核酸配列を意味する。対応するヒト生殖系配列はまた、すべての他の評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列又はサブ配列に対して最高アミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列又はサブ配列も意味する。対応するヒト生殖系配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワーク及び相補性決定領域、可変セグメント（以上に定義される）、又は可変領域を構成する配列又はサブ配列の他の組合せでありうる。配列同一性は、本明細書に記載の方法を用いて、たとえば、BLAST、ALIGN、又は当技術分野で公知の他のアライメントアルゴリズムを用いて2つの配列をアライメントすることにより決定可能である。対応するヒト生殖系核酸又はアミノ酸配列は、参照可変領域核酸又はアミノ酸配列に対して、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有することが可能である。

【0065】

「平衡解離定数」(K_D 、M)という用語は、解離速度定数(k_d 、時間 $^{-1}$)を会合速度定数(k_a 、時間 $^{-1}$ 、M $^{-1}$)で除算したものを意味する。平衡解離定数は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定可能である。本開示の抗体は、一般に、約 10^{-7} 又は 10^{-8} M未満、たとえば、約 10^{-9} M又は 10^{-10} M未満、いくつかの態様では、約 10^{-11} M、 10^{-12} M、又は 10^{-13} M未満の平衡解離定数を有するであろう。

【0066】

本明細書中の「癌」又は「腫瘍」という用語は、当技術分野で理解される最広義の意味を有し、典型的には無制御の細胞成長により特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を意味する。本開示との関連では、癌は、ある特定のタイプ又は位置に制限されない。

【0067】

「組合せ療法」という用語は、本開示に記載の治療対象の病態又は障害を治療するために2種以上の治療剤を投与することを意味する。かかる投与は、実質的に同時のこれらの治療剤の共投与を包含する。かかる投与はまた、複数回での又は各活性成分に対して個別容器（たとえば、カプセル剤、粉末剤、及び液体剤）での共投与を包含する。粉末剤及び／又は液体剤は、投与前に所望の用量に再構成又は希釈することが可能である。そのほか、かかる投与はまた、およそ同時又は異なる時点のどちらかの各タイプの治療剤の逐次的使用を包含する。どの場合でも、治療レジメンは、本明細書に記載の病態又は障害を治療するうえで薬剤の組合せの有益な効果を提供するのである。本明細書で用いられる場合、「～との組合せで」という語句は、抗OX40抗体が、追加の治療剤の投与と同時に、その直前に、又はその直後に対象に投与されることを意味する。ある特定の実施形態では

10

20

30

40

50

、この追加の治療剤は、抗 O X 4 0 抗体との共製剤として投与される。

【 0 0 6 8 】

本開示との関連では、アミノ酸配列を参照するとき、「保存的置換」という用語は、抗体又はフラグメントの化学性、物理性、及び／又は機能性、たとえば、O X 4 0 へのその結合親和性を実質的に変更しない新しいアミノ酸による元のアミノ酸の置換を意味する。具体的には、アミノ酸の通常の保存的置換は、以下の表に示され、当技術分野で周知である。

【 0 0 6 9 】

【表 1】

模式的保存的アミノ酸置換

元のアミノ酸残基	1 文字及び 3 文字コード	保存的置換
アラニン	A 又は Ala	Gly; Ser
アルギニン	R 又は Arg	Lys; His
アスパラギン	N 又は Asn	Gln; His
アスパラギン酸	D 又は Asp	Gln; Asn
システイン	C 又は Cys	Ser; Ala
グルタミン	Q 又は Gln	Asn
グルタミン酸	E 又は Glu	Asp; Gln
グリシン	G 又は Gly	Ala
ヒスチジン	H 又は His	Asn; Gln
イソロイシン	I 又は Ile	Leu; Val
ロイシン	L 又は Leu	Ile; val
リシン	K 又は Lys	Arg; His
メチオニン	M 又は Met	Leu; Ile; Tyr
フェニルアラニン	F 又は Phe	Tyr; Met; Leu
プロリン	P 又は Pro	Ala
セリン	S 又は Ser	Thr
トレオニン	T 又は Thr	Ser
トリプトファン	W 又は Trp	Tyr; Phe
チロシン	Y 又は Tyr	Trp; Phe
バリン	V 又は Val	Ile; Leu

【 0 0 7 0 】

パーセント配列同一性及び配列類似性の決定に好適なアルゴリズムの例としては、B L A S T アルゴリズムが挙げられ、それぞれ、A l t s c h u l e t a l , N u c . A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 , 1 9 7 7、及び A l t s c h u l e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 , 1 9 9 0 に記載されている。B L A S T 解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r

10

20

30

40

50

mat ion) を介して一般公開されている。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同一長さのワードにアライメントとしたときになんらかの正值の閾値スコア T にマッチするか又はそれを満足するかのどちらかであるクエリー配列中の長さ W のショートワードを同定することにより、高スコアリング配列対 (HSP) を同定することが関与する。T は、近傍ワードスコア閾値といわれる。これらの初期近傍ワードヒットは、それらを含むより長い HSP を見いだす検索を開始するための値として作用する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加可能である限り、各配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列では、パラメーター M (マッチング残基対に対するリワードスコア、常に > 0) 及び N (ミスマッチング残基に対するペナルティスコア、常に < 0) を用いて計算される。アミノ酸配列では、累積スコアを計算するためにスコアリングマトリックスが使用される。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量 X だけ低下したとき、1 つ以上の負スコアリング残基アラインメントの蓄積に起因して累積スコアがゼロ以下に移行したとき、又はどちらの配列も末端に達したとき、停止される。BLAST アルゴリズムパラメーター W、T、及び X は、アライメントの感度及びスピードを決定する。BLASTN プログラム (ヌクレオチド配列に対して) は、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして用いる。アミノ酸配列では、BLAST プログラムは、ワード長 3、及び期待値 (E) 10、並びに BLOSUM62 スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 を参照されたい) アライメント (B) 50、期待値 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。

10

20

30

40

50

【0071】

BLAST アルゴリズムはまた、2 つの配列間の類似性の統計解析も実施する (たとえば、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993 を参照されたい)。BLAST アルゴリズムにより提供される類似性の 1 つの尺度は、2 つのヌクレオチド配列間又はアミノ酸配列間のマッチが偶然に発生する確率の指標を提供する最小和確率 ($P(N)$) である。たとえば、試験核酸と参照核酸との比較の最小和確率が約 0.2 未満、より好ましくは約 0.01 未満、最も好ましくは約 0.001 未満であれば、核酸は参照配列に類似してみなされる。

【0072】

2 つのアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、PAM120 重み残基表、ギャップ長ペナルティー 12、及びギャップペナルティー 4 を用いて、ALIGN プログラム (バージョン 2.0) に組み込まれた E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, (1988) のアルゴリズムにより決定可能である。そのほか、2 つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、BLOSUM62 マトリックス又は PAM250 マトリックスのどちらか、並びにギャップ重み 16、14、12、10、8、6、又は 4、及び長さ重み 1、2、3、4、5、又は 6 を用いて、GCG ソフトウェアパッケージ中の GAP プログラムに組み込まれた Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970) アルゴリズムにより決定可能である。

【0073】

「核酸」という用語は、本明細書では「ポリヌクレオチド」という用語と互換的に用いられ、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及び一本鎖又は二本鎖のどちらかの形態のそれらのポリマーを意味する。この用語は、合成の、天然に存在する、及び天然に存在しない、参照核酸と類似の結合性を有する、並びに参照ヌクレオチドに類似した形で代謝される、公知のヌクレオチドアナログ又は修飾骨格残基又は連結を含む核酸を包含する。かかるアナログの例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-M

チルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）が挙げられる。

【0074】

核酸との関連での「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上のポリヌクレオチド（たとえばDNA）セグメント間の機能的関係を意味する。典型的には、それは、転写配列に対する転写レギュラトリ配列の機能的関係を意味する。たとえば、プロモーター配列又はエンハンサー配列は、それが適切な宿主細胞又は他の発現システムでコード配列の転写を刺激又はモジュレートするならば、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、転写配列に作動可能に結合されたプロモーター転写レギュラトリ配列は、転写配列に物理的に連続する。すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写レギュラトリ配列は、その転写を増強するコード配列に物理的に連続する必要もなければ密に近接して位置する必要もない。

10

【0075】

いくつかの態様では、本開示は、組成物、たとえば、少なくとも1種の薬学的に許容可能な賦形剤と一緒に製剤化された、本明細書に記載の抗OX40抗体を含む薬学的に許容可能な組成物を提供する。本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容可能な賦形剤」という用語は、生理学的に適合可能であるいかなる溶媒、分散媒、等張化剤、及び吸収遅延剤もすべて含む。賦形剤は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、直腸投与、脊髄投与、又は表皮投与（たとえば、注射又は注入による）に好適でありうる。

【0076】

本明細書に開示される組成物は、さまざまな形態でありうる。こうしたものとしては、たとえば、液状、半固形、及び固形製剤、たとえば、液状溶液剤（たとえば、注射用及び注入用溶液剤）、ディスパージョン剤又はサスペンション剤、リポソーム剤、及び坐剤が挙げられる。好適な形態は、意図される投与モード及び治療用途に依存する。典型的な好適な組成物は、注射用又は注入用溶液剤の形態である。1つの好適な投与モードは非経口である（たとえば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）。いくつかの実施形態では、抗体は、静脈内注入又は注射により投与される。ある特定の実施形態では、抗体は、筋肉内又は皮下注射により投与される。

20

【0077】

本明細書で用いられる「治療有効量」という用語は、疾患、又は疾患若しくは障害の臨床症状の少なくとも1つを治療するために対象に投与された場合に、この疾患、障害、又は症状に対してかかる治療を行なうのに十分な抗体の量又は抗体と別の治療剤との組合せの量を指す。「治療有効量」は、抗体、抗体と別の治療剤との組合せ、疾患、障害、及び／又は疾患若しくは障害の症状、疾患、障害、及び／又は疾患若しくは障害の症状の重症度、治療される対象の年齢、及び／又は治療される対象の体重により異なり得る。いずれの所与の場合の適切量も、当業者には明らかであり得るか、又はルーチンの実験により決定され得る。組合せ療法の場合には、「治療有効量」は、疾患、障害、又は病態の有効治療に見合った組合せ対象物の合計量を指す。

30

【0078】

本明細書で用いられる場合、「FOLFEX」という用語は、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、及びオキサリプラチンの組合せ化学療法レジメンを指す。

40

【0079】

詳細な説明

本開示は、ヒトOX40に特異的に結合する抗体、抗原結合性フラグメントを提供する。さらに、本開示は、望ましい薬動学的特性及び他の望ましい属性を有し、ひいては癌の可能性を減少させるために又は癌を治療するために使用可能である、抗体を提供する。本開示は、前記抗体を含む医薬組成物、並びに癌及び関連障害の予防及び治療のためにかかる医薬組成物を作製及び使用する方法、をさらに提供する。

【0080】

抗OX40抗体

本開示は、OX40に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供す

50

る。本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、以下に記載のように発生させた抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。

【0081】

本開示は、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗体フラグメント（たとえば抗原結合性フラグメント）が、配列番号14、20、又は26のアミノ酸配列を有するVHドメイン（表3）を含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。本開示はまた、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表3に列挙されるVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。一態様では、本開示は、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、表3に列挙されるVH CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3、又はそれ以上のVH CDRを含む（又は代替的にそれからなる）、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。

10

【0082】

本開示は、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、配列番号16、22、又は28のアミノ酸配列を有するVLドメイン（表3）を含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。本開示はまた、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表3に列挙されるVL CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDRを含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。特定的には、本開示は、OX40に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表3に列挙されるVL CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3、又はそれ以上のVL CDRを含む（又は代替的にそれからなる）、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。

20

【0083】

本開示の他の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、突然変異されているが、表3に記載の配列に表されるCDR領域に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、又は99%のCDR領域パーセント同一性を有する、アミノ酸を含む。いくつかの態様では、それは、表3に記載の配列に表されるCDR領域と比較したときにCDR領域で1、2、3、4、又は5アミノ酸以下が突然変異されている、突然変異体アミノ酸配列を含む。

30

【0084】

本開示の他の抗体は、アミノ酸又はアミノ酸をコードする核酸が突然変異されているが、表3に記載の配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、又は99%のパーセント同一性を有するものを含む。いくつかの態様では、それは、実質的に同一の治療的活性を保持しつつ、表3に記載の配列に表される可変領域と比較したときに可変領域で1、2、3、4、又は5アミノ酸以下が突然変異されている、突然変異体アミノ酸配列を含む。

【0085】

本開示はまた、OX40に特異的に結合する抗体のVH、VL、全長重鎖、及び全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。かかる核酸配列は、哺乳動物細胞で発現させるように最適化可能である。

40

【0086】

エピトープ及び同一エピトープに結合する抗体の同定

本開示は、ヒトOX40のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合性フラグメントを提供する。ある特定の態様では、抗体及び抗原結合性フラグメントは、OX40の同一エピトープに結合可能である。

【0087】

本開示はまた、表3に記載の抗OX40抗体が結合するのと同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合性フラグメントを提供する。したがって、追加の抗体及びその抗

50

原結合性フラグメントは、結合アッセイで他の抗体と交差競合する（たとえば、統計的に有意にその結合を競合阻害する）それらの能力に基づいて同定可能である。OX40への本開示の抗体及びその抗原結合性フラグメントの結合を阻害する試験抗体の能力は、OX40への結合に関してその抗体又はその抗原結合性フラグメントと試験抗体が競合可能であることを実証する。かかる抗体は、いかなる一理論にも拘束されるものではないが、それが競合する抗体又は抗原結合性フラグメントとOX40上の同一の又は関連する（たとえば、構造的に類似した又は空間的に近接した）エピトープに結合可能である。ある特定の態様では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントとOX40上の同一のエピトープに結合する抗体は、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体である。

かかるヒト又はヒト化モノクローナル抗体は、本明細書に記載のように調製及び単離が可能である。

10

【0088】

Fc領域のフレームワークのさらなる改変

さらに他の態様では、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を改変するために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置き換えることにより改変される。たとえば、抗体がエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有するが親抗体の抗原結合能を保持するように、1つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基と置き換えることが可能である。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、たとえば、Fcレセプター又はC1補体成分でありうる。このアプローチは、たとえば、両方ともWinterらにより米国特許第5,624,821号明細書及び同第5,648,260号明細書に記載されている。

20

【0089】

他の一態様では、抗体が改変されたC1q結合及び／又は低減若しくは消失された補体依存細胞傷害性(CDC)を有するように、1つ以上のアミノ酸残基を1つ以上の異なるアミノ酸残基と置き換えることが可能である。このアプローチは、たとえば、Idusogierらにより米国特許第6,194,551号明細書に記載されている。

【0090】

さらに他の一態様では、1つ以上のアミノ酸残基を改変することにより、補体を固定する抗体の能力を改変する。このアプローチは、たとえば、BodmerらによりPCT国際公開第94/29351号パンフレットに記載されている。具体的態様では、IgG1サブクラス及びカッパアイソタイプに対して、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントの1つ以上のアミノ酸を1つ以上のアロタイプアミノ酸残基と置き換える。アロタイプアミノ酸残基はまた、限定されるものではないが、Jefferies et al., MAbs. 1:332-338 (2009)に記載されるように、IgG1、IgG2、及びIgG3サブクラスの重鎖の定常領域、さらにはカッパアイソタイプの軽鎖の定常領域を含む。

30

【0091】

他の一態様では、抗体依存細胞性細胞傷害性(ADCC)を媒介する抗体の能力を増加させるために及び／又はFcγレセプターに対する抗体の親和性を増加させるために、1つ以上のアミノ酸を修飾することによりFc領域を修飾する。このアプローチは、たとえば、PrestaによりPCT国際公開第00/42072号パンフレットに記載されている。そのうえ、FcγRI、FcγRII、FcγRIII、及びFcRnに対するヒトIgG1上の結合性部位がマッピングされており、改善された結合を有する変異体が記載されている(Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001を参照されたい)。

40

【0092】

さらに他の一態様では、抗体のグリコシル化が修飾される。たとえば、アグリコシル化抗体を作製可能である(すなわち、抗体は、グリコシル化を欠如するか、又は低減されたグリコシル化を有する)。グリコシル化は、たとえば、「抗原」への抗体の親和性を増加させるように改変可能である。かかる炭水化物修飾は、たとえば、抗体配列内の1つ以上

50

のグリコシル化部位を改変することにより、達成可能である。たとえば、1つ以上のアミノ酸置換を行って、結果として、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位を排除することにより、その部位でグリコシル化を排除することが可能である。かかるアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることが可能である。かかるアプローチは、たとえば、C o らにより米国特許第 5, 7 1 4, 3 5 0 号明細書及び同第 6, 3 5 0, 8 6 1 号明細書に記載されている。

【0093】

追加的又は代替的に、低減量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体や増加した二分岐化 G l c N a c 構造を有する抗体などの改変タイプのグリコシル化を有する抗体を作製可能である。かかる改変グリコシル化パターンは、抗体の A D C C 能を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、たとえば、改変グリコシル化機構を有する宿主細胞内で抗体を発現することにより達成可能である。改変グリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野で記載されており、組換え抗体を発現させることにより改変グリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用可能である。たとえば、H a n g らによる欧州特許第 1, 1 7 6, 1 9 5 号明細書には、フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が機能的に破壊された細胞系が記載されており、その結果として、かかる細胞系で発現される抗体は低フコシル化を呈する。P r e s t a による P C T 国際公開第 0 3 / 0 3 5 8 3 5 号パンフレットには、A s n (2 9 7) 連結炭水化物にフコースを装着する能力が低減された変異体 C H O 細胞系 L e c l 3 細胞が記載されており、これもまた、その宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化をもたらす (S h i e l d s e t a l . , (2 0 0 2) J . B i o l . C h e m . 2 7 7 : 2 6 7 3 3 - 2 6 7 4 0 も参照されたい)。U m a n a らによる P C T 国際公開第 9 9 / 5 4 3 4 2 号パンフレットには、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ (たとえば、ベータ (1 , 4) - N アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I (G n T I I I)) を発現するように工学操作された細胞系が記載されており、その結果として、工学操作細胞系で発現される抗体は、抗体の A D C C 活性の増加をもたらす増加した二分岐化 G l c N a c 構造を呈する (U m a n a e t a l . , N a t . B i o t e c h . 1 7 : 1 7 6 - 1 8 0 , 1 9 9 9 も参照されたい)。

【0094】

他の一態様では、A D C C の低減が望まれる場合、ヒト抗体サブクラス I g G 4 は、ごく限られた A D C C を有し且つほとんど C D C エフェクター機能を有しないことが多くの既報で示された (M o o r e G L , e t a l . 2 0 1 0 M A b s , 2 : 1 8 1 - 1 8 9) 。一方、天然 I g G 4 は、酸性緩衝液中や昇温下などのストレス条件でそれほど安定でないことが判明した (A n g a l , S . 1 9 9 3 M o l I m m u n o l , 3 0 : 1 0 5 - 1 0 8 , D a l l ' A c q u a , W . e t a l , 1 9 9 8 B i o c h e m i s t r y , 3 7 : 9 2 6 6 - 9 2 7 3 , A a l b e r s e e t a l . 2 0 0 2 I m m u n o l , 1 0 5 : 9 - 1 9) 。A D C C の低減は、低減された若しくはヌルの F c γ R 結合又は C 1 q 結合活性を有する改変の組合せにより A D C C 及び C D C エフェクター機能を低減又は排除するように工学操作された I g G 4 に抗体を作動可能に連結することにより達成可能である。生物学的薬剤として抗体の物理化学的性質を考慮すると、それほど望ましくない I g G 4 固有の性質の 1 つは、半抗体を形成する溶液中でのその 2 本の重鎖の動的分離であり、これは「F a b アーム交換」と呼ばれるプロセスを介して i n v i v o で発生する二重特異的抗体をもたらす (V a n d e r N e u t K o l f s c h o t e n M , e t a l . 2 0 0 7 S c i e n c e , 3 1 7 : 1 5 5 4 - 1 5 7) 。位置 2 2 8 (E U 番号付けシステム) でのセリンからプロリンへの突然変異は、I g G 4 重鎖分離に対して阻害的であるように思われた (A n g a l , S . 1 9 9 3 M o l I m m u n o l , 3 0 : 1 0 5 - 1 0 8 , A a l b e r s e e t a l . 2 0 0 2 I m m u n o l , 1 0 5 : 9 - 1 9) 。ヒンジ及び γ F c 領域のアミノ酸残基のいくつかは、F c γ レセプターとの抗体相互作用に影響を及ぼすと報告された (C h a p p e l S M , e t a l . 1 9 9 1 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 8 :

9036-9040、Mukherjee, J. et al., 1995 FASEB J, 9:115-119、Armour, K. L. et al. 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624、Clynes, R. A. et al, 2000 Nature Medicine, 6:443-446、Arnold J. N., 2007 Annu Rev Immunol, 25:21-50)。さらに、ヒト集団で稀に発生するいくつかIgG4アイソフォームもまた、異なる物理化学的性質を誘発可能である(Brusco, A. et al. 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55、Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19)。低いADCC、CDC、及び不安定性を有するOX40抗体を発生させるために、ヒトIgG4のヒンジ及びFc領域を修飾し、いくつかの改変を導入することが可能である。これらの修飾IgG4 Fc分子は、配列番号83~88、Liらに付与された米国特許第8,735,553号明細書に見いだされうる。

10

【0095】

OX40抗体産生

抗OX40抗体及びその抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、組換え発現、化学合成、及び抗体テトラマーの酵素消化をはじめとする当技術分野で公知のいずれかの手段により産生可能であり、一方、全長モノクローナル抗体は、たとえば、ハイブリドーマ又は組換え産生により得ることが可能である。組換え発現は、当技術分野で公知のいずれかの適切な宿主細胞、たとえば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、虫宿主細胞などから行いうる。

20

【0096】

本開示は、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、たとえば、本明細書に記載の相補性決定領域を含む重鎖又は軽鎖の可変領域又はセグメントをコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。いくつかの態様では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号15、21、又は27からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の核酸配列同一性を有する。いくつかの態様では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号17、23、又は29からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の核酸配列同一性を有する。

30

【0097】

本開示のポリヌクレオチドは、抗OX40抗体の可変領域配列をコード可能である。それはまた、抗体の可変領域及び定常領域の両方をコード可能である。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、例証された抗OX40抗体の1つの重鎖及び軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。いくつかの他のポリヌクレオチドは、ネズミ抗体の1つの重鎖及び軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同等の2つのポリペプチドセグメントをコードする。

【0098】

本開示ではまた、抗OX40抗体を産生するための発現ベクター及び宿主細胞も提供される。発現ベクターの選択は、ベクターが発現されることが意図される宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、抗OX40抗体鎖又は抗原結合性フラグメントをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター及び他のレギュラトリー配列(たとえばエンハンサー)を含有する。いくつかの態様では、誘導条件の制御下以外では挿入配列の発現を防止するように、誘導性プロモーターが採用される。誘導性プロモーターは、たとえば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーター、又は熱ショックプロモーターを含む。トランスフォーム生物の培養物は、宿主細胞が発現産物に十分な耐容性のあるコード配列の集団をバイアスすることなく非誘導条件下で拡大可能である。プロモーターのほか、他のレギュラトリーエレメントもまた、抗OX40抗体又は抗原結合性フラグメントの効率的発現のために必要とされたり又は望まれたりすることがあ

40

50

る。こうしたエレメントは、典型的には、ATG開始コドン及び近接リボソーム結合部位又は他の配列を含む。そのほか、発現の効率、使用時に細胞システムに適したエンハンサーを含めることにより増強可能である（たとえば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994、及びBittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987を参照されたい）。たとえば、SV40エンハンサー又はCMVエンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞内での発現を増加させることが可能である。

【0099】

抗OX40抗体鎖を保有及び発現するための宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞のどちらかでありうる。E. コリ (E. coli) は、本開示のポリヌクレオチドのクローニング及び発現に有用な原核宿主の1つである。使用に好適な他の微生物宿主としては、桿菌、たとえば、バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) 及び他のエンテロバクテリア科細菌、たとえば、サルモネラ属 (Salmonella)、セラチア属 (Serratia)、及び各種シュードモナス属 (Pseudomonas) の種が挙げられる。こうした原核宿主では、典型的には宿主細胞に適合可能な発現制御配列（たとえば複製起点）を含有する発現ベクターを作製することも可能である。そのほか、いずれかの数のさまざまな周知のプロモーター、たとえば、ラクトースプロモーターシステム、トリプトファン (trp) プロモーターシステム、ベータラクタマーゼプロモーターシステム、又はファージラムダ由来のプロモーターシステムが存在するであろう。プロモーターは、典型的には、任意にオペレーター配列とともに発現を制御し、転写及び翻訳を開始及び終了するためのリボソーム結合部位配列を有する。他の微生物たとえば酵母もまた、抗OX40ポリペプチドを発現するように採用可能である。バキュロウイルスベクターとの組合せで昆虫細胞を使用することも可能である。

【0100】

他の態様では、本開示の抗OX40ポリペプチドを産生するために、哺乳動物宿主細胞が使用される。たとえば、それは、内因性イムノグロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞系又は外因性発現ベクターを保有する哺乳動物細胞系のどちらかでありうる。こうしたものとしては、いずれかの正常可死性又は異常若しくは正常不死性の動物細胞又はヒト細胞が挙げられる。たとえば、CHO細胞系、各種COS細胞系、HEK293細胞、骨髄腫細胞系、トランスフォームB細胞、及びハイブリドーマを含めて、インタクトイムノグロブリンを分泌する能力のあるいくつかの好適な宿主細胞系が開発されてきた。ポリペプチドを発現するための哺乳動物組織細胞培養の使用は、たとえば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987で一般に考察されている。哺乳動物宿主細胞用の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列（たとえば、Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986を参照されたい）、及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写ターミネーター配列などの必要な情報処理部位を含みうる。こうした発現ベクターは、通常、哺乳動物遺伝子又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。好適なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、ステージ特異的、及び／又はモジュレート可能若しくはレギュレート可能でありうる。有用なプロモーターとしては、限定されるものではないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP polIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター（たとえばヒト前初期CMVプロモーター）、構成的CMVプロモーター、及び当技術分野で既知のプロモーター-エンハンサーの組合せが挙げられる。

【0101】

検出及び診断の方法

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、OX40の検出方法をはじめとするさまざまな用途に有用である。一態様では、抗体又は抗原結合性

フラグメントは、生物学的サンプル中のOX40の存在を検出するのに有用である。本明細書で用いられる「detecting（～を検出すること）」という用語は、定量的又は定性的な検出を含む。ある特定の態様では、生物学的サンプルは、細胞又は組織を含む。他の態様では、かかる組織は、他の組織と比べてより高レベルのOX40を発現する正常組織及び／又は癌性組織を含む。

【0102】

一態様では、本開示は、生物学的サンプル中のOX40の存在を検出する方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、抗原への抗体の結合を許容する条件下で生物学的サンプルと抗OX40抗体とを接触させることと、抗体と抗原との間に複合体が形成されるかを検出することと、を含む。生物学的サンプルとしては、限定されるものではないが、尿又は血液サンプルが挙げられる。

10

【0103】

また、OX40の発現に関連する障害を診断する方法も含まれる。ある特定の態様では、本方法は、試験細胞と抗OX40抗体とを接触させることと、OX40ポリペプチドへの抗OX40抗体の結合を検出することにより、試験細胞中のOX40の発現レベル（定量的又は定性的のどちらかで）を決定することと、試験細胞中の発現レベルと対照細胞（たとえば、試験細胞と同一の組織起源の正常細胞又は非OX40発現細胞）中のOX40発現レベルとを比較することと、を含み、コントロール細胞と比較して試験細胞中のより高レベルのOX40発現が、OX40の発現に関連する障害の存在の指標となる。

【0104】

治療方法

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、OX40関連障害又は疾患の治療方法をはじめとするさまざまな用途に有用である。一態様では、OX40関連障害又は疾患は癌である。

20

【0105】

一態様では、本開示は、癌を治療する方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、有効量の抗OX40抗体又は抗原結合性フラグメントを必要とされる患者に投与することを含む。癌は、限定されるものではないが、乳癌、頭頸部癌、胃癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫、及び肉腫を含みうる。

30

【0106】

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、非経口、肺内、及び鼻内、並びに局所治療が望まれる場合には病変内投与を含めて、いずれかの好適な手段により投与可能である。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投与は、部分的には投与が短期であるか長期であるかに依存して、いずれかの好適な経路、たとえば、静脈内注射や皮下注射などの注射によることが可能である。限定されるものではないが、単回投与又は各種時間点にわたる複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入をはじめとする各種投与スケジュールが本明細書で企図される。

【0107】

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、適正医療規範に準拠して、製剤化、用量設定、及び投与されるであろう。これとの関連での考慮因子としては、治療される特定障害、治療される特定哺乳動物、個々の患者の臨床病態、障害の原因、作用剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュールリング、及び医師に公知の他の因子が挙げられる。抗体は問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている1種以上の作用剤とともにである必要はないが任意選択的に製剤化される。かかる他の作用剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療のタイプ、及び以上で考察された他の因子に依存する。これらは、本明細書に記載のものと同一の投与量及び投与経路で、又は本明細書に記載の投与量の約1～99%で、又は経験的／臨床的に適切であると決定されたいずれかの投与量及びいずれかの経路で、一般に使用される。

40

【0108】

50

疾患の予防又は治療では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントの適切投与量は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的又は治療目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床歴及び抗体に対する反応、並びに担当医の自由裁量に依存するであろう。抗体は、好適には、1回で又は一連の治療にわたり患者に投与される。たとえば、1回以上の個別投与によるか又は連続注入によるかにもかかわらず、疾患のタイプ及び重症度に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ の抗体は、患者に投与するための初期候補投与量でありうる。典型的な一日投与量は、以上に挙げた因子に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲内でありうる。数日間以上にわたる繰返し投与では、病態に依存して、治療は、一般に疾患症状の所望の抑制を生じるまで継続されるであろう。かかる用量は、断続的に、たとえば、週1回又は3週間に1回投与可能である（たとえば、患者が約2～約20用量又はたとえば6用量の抗体を摂取するように）。初期の高ローディング用量、続いて1回以上のより低用量を投与可能である。しかしながら、他の投与レジメンが有用でありうる。この治療の進行状況は、従来の技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

10

【0109】

組合せ療法

一態様では、本開示のOX40抗体を、他の治療薬との組合せで使用し得る。本開示のOX40抗体と共に使用され得る他の治療薬として、たとえば下記が挙げられるが、これらに限定されるものではない：化学療法剤であるオキサリプラチン（ELOXATIN（登録商標））、オキサリプラチン治療レジメンを含むオキサリプラチン（FOLFOX）
、パクリタキセル、又はパクリタキセル剤；（たとえばAbraxane（登録商標））
、ドセタキセル；カルボプラチン；トポテカン；シスプラチン；イリノテカン、ドキシソ
ルビシン、レナリドマイド、5-アザシチジン、イホスファミド、ペメトレキセドニナトリ
ウム、シクロホスファミド、エトポシド、デシタビン、フルダラビン、ビンクリスチン、
ベンダムスチン、クロラムブシル、ブスルファン、ゲムシタビン、メルファラン、ペント
スタチン、ミトキサントロン、ペメトレキセドニナトリウム）、チロシンキナーゼ阻害剤
（たとえばEGFR阻害剤（たとえばエルロチニブ）、マルチキナーゼ阻害剤（たとえば
、MGCD265、RGB-286638）、CD-20標的化剤（たとえば、リツキシ
マブ、オファツムマブ、RO5072759、LFB-R603）、CD52標的化剤（
たとえばアレムツズマブ））、プレドニゾロン、ダルベポエチンアルファ、レナリドマイ
ド、Bcl-2阻害剤（たとえばオブリマーセンナトリウム）、オーロラキナーゼ阻害剤
（たとえば、MLN8237、TAK-901）、プロテアソーム阻害剤（たとえばボル
テゾミブ）、CD-19標的化剤（たとえば、MEDI-551、MOR208）、ME
K阻害剤（たとえばABT-348）、JAK-2阻害剤（たとえばINCB01842
4）、mTOR阻害剤（たとえばテムシロリムス、エベロリムス）、BCR/ABL阻害
剤（たとえばイマチニブ）、ET-Aレセプターアンタゴニスト（たとえばZD4054
）、TRAILレセプター2（TR-2）アゴニスト（たとえばCS-1008）、HGF/SF阻害剤（た
とえばAMG102）、EGEN-001、Pollo様キナーゼ1阻害剤（たとえばBI672）。

20

30

【0110】

一実施形態では、本開示のOX40抗体を、オキサリプラチンとの組合せで使用し得るか、又は5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、及びオキサリプラチン（FOLFOX）との組合せで使用し得る。FOLFOX治療は、 $50\sim 100\text{mg}/\text{m}^2$ （たとえば、50、60、75、85、又は $100\text{mg}/\text{m}^2$ ）のオキサリプラチンの投与を含み得、且つ $200\sim 500\text{mg}/\text{m}^2$ （たとえば、200、300、400、又は $500\text{mg}/\text{m}^2$ ）のロイコボリンの投与を含み得、且つ200、300、400、又は $500\text{mg}/\text{m}^2$ での初期ボラースとしての、続いて $1600\sim 3000\text{mg}/\text{m}^2$ の24～48時間にわたるより長いIV注入（たとえば、IVにより46～48時間にわたり投与される 1600 、 2000 、 2400 、又は $3000\text{mg}/\text{m}^2$ ）としての5-FUの投与を含み得る。FOLFOXが投与されるいくつかの実施形態では、オキサリプラチン

40

50

は、 85 mg/m^2 で投与される。FOLFFOXが投与されるいくつかの実施形態では、ロイコボリンは、 400 mg/m^2 で投与される。FOLFFOXが投与されるいくつかの実施形態では、5-FUは、 400 mg/m^2 のボラスとして、続いて46時間にわたる 2400 mg/m^2 のIV注入として投与される。いくつかの実施形態では、FOLFFOXレジメンは、 85 mg/m^2 のオキサリプラチン、 400 mg/m^2 のロイコボリン、 400 mg/m^2 のボラスの5-FU、続いて46時間にわたる注入による 2400 mg/m^2 の5-FUであり、全てを2週間毎である。

【0111】

医薬組成物及び製剤

また、抗OX40抗体若しくは抗原結合性フラグメントを含む医薬製剤又は抗OX40抗体若しくは抗原結合性フラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドを含めて、組成物も提供される。ある特定の実施形態では、組成物は、OX40に結合する1種以上の抗体若しくは抗原結合性フラグメント、又はOX40に結合する1種以上の抗体若しくは抗原結合性フラグメントをコードする配列を含む1種以上のポリヌクレオチドを含む。こうした組成物は、好適な担体、たとえば、当技術分野で周知の緩衝剤を含む薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む。

【0112】

本明細書に記載のOX40抗体又は抗原結合性フラグメントの医薬製剤は、所望の純度を有するかかる抗体又は抗原結合性フラグメントと、1種以上の任意の薬学的に許容可能な担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と、を混合することにより、凍結乾燥製剤又は水性溶液剤の形態で調製される。薬学的に許容可能な担体は、採用された投与量及び濃度でレシピエントに対して一般に非毒性であり、限定されるものではないが、緩衝剤、たとえば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸、抗酸化剤 (アスコルビン酸及びメチオニンを含む)、保存剤 (たとえば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ヘキサメトニウムクロライド、ベンザルコニウムクロライド、ベンゼトニウムクロライド、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール、アルキルパラベン、たとえば、メチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール)、低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド、タンパク質、たとえば、血清アルブミン、ゼラチン、又はイムノグロブリン、親水性ポリマー、たとえば、ポリビニルピロリドン、アミノ酸、たとえば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン、単糖、二糖、及び他の炭水化物 (グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む)、キレート化剤、たとえば、EDTA、糖、たとえば、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール、塩形成性カウンターイオン、たとえば、ナトリウム、金属複合体 (たとえばZnタンパク質複合体)、及び／又は非イオン性界面活性剤、たとえば、ポリエチレングリコール (PEG) を含む。本明細書中の模範的な薬学的に許容可能な担体としては、間質薬剤分散剤、たとえば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、たとえば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、たとえば、rHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) がさらに挙げられる。rHuPH20を含むある特定の模範的sHASEGP及び使用方法は、米国特許第7,871,607号明細書及び米国特許出願公開第2006/0104968号明細書に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1種以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0113】

模範的凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号明細書に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第6,171,586号明細書及び国際公開第2006/044908号パンフレットに記載のものを含み、後者の製剤は、ヒスチジン酢酸緩衝剤を含む。

【0114】

10

20

30

40

50

持続放出製剤を調製可能である。持続放出製剤の好適例は、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、フィルムや又はマイクロカプセルなどの造形品の形態である。

【0115】

in vivo 投与に使用される製剤は、一般に無菌である。無菌性は、たとえば、滅菌濾過膜に通して濾過することによる簡単に達成可能である。

【実施例】

【0116】

実施例1： 抗OX40モノクローナル抗体の発生

マイナー変更を施して従来のハイブリドーマ融合技術 (de St Groth and Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1、Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1) に基づいて、抗OX40モノクローナル抗体を発生させた。酵素連結イムノソルベントアッセイ (ELISA) 及び蛍光活性化細胞選別 (FACS) アッセイで高い結合活性を有する抗体を選択し、さらなる特徴付けに供した。

【0117】

免疫化及び結合アッセイのためのOX40組換えタンパク質

GenBank 配列 (アクセッション番号: X75962.1) に基づいて、全長ヒトOX40をコードするcDNA (配列番号1) をSino Biological (Beijing, China) により合成した。OX-40のアミノ酸 (AA) 1~216 (配列番号2) からなるシグナルペプチド及び細胞外ドメイン (ECD) のコード領域をPCR増幅し、マウスIgG2aのFcドメイン、ヒトIgG1野生型重鎖のFcドメイン、又はHisタグに融合されたC末端とともにインハウス開発発現ベクター中にクローニングし、それぞれ、3つの組換え融合タンパク質発現プラスミドOX40-mIgG2a、OX40-huIgG1、及びOX40-Hisを得た。OX40融合タンパク質の模式図は図1に示される。組換え融合タンパク質産生のために、OX40-mIgG2a、OX40-huIgG1、及びOX40-Hisの発現プラスミドを293G細胞に一過的にトランスフェクトし、回転シェーカーを備えたCO₂インキュベーターで7日間培養した。組換えタンパク質を含有する上清を捕集し、遠心分離により清澄化した。プロテインAカラム (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences) を用いて、OX40-mIgG2a及びOX40-huIgG1を精製した。Niセファロースカラム (Cat: 17-5318-02, GE Life Science) を用いてOX40-Hisを精製した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対してOX40-mIgG2a、OX40-huIgG1、及びOX40-Hisタンパク質を透析し、少量のアリコートで-80℃フリーザーに保存した。

【0118】

安定発現細胞系

全長ヒトOX40 (OX40) 又はカニクイザルOX40 (cynoOX40) を発現する安定細胞系を発生させるために、これらの遺伝子をレトロウイルスベクターpFB-Neo (Cat: 217561, Agilent, USA) にクローニングした。以上に記載のプロトコルに基づいてレトロウイルストランスダクションを実施した (Zhang et al., 2005)。HuT78及びHEK293細胞を、それぞれ、ヒトOX40又はcynoOX40を含有するウイルスを用いてレトロウイルスによりトランスデュースし、HuT78/OX40、HEK293/OX40、及びHuT78/cynoOX40細胞系を発生させた。

【0119】

免疫化、ハイブリドーマ融合、及びクローニング

10 µgのOX40-mIgG2a及びQuick-Antibody Immuno-Adjuvant (Cat: KX0210041, KangBiQuan, Beijing, China) を含有する200 µLの混合物抗原で8~12週齢のBalb/cマ

10

20

30

40

50

ウス (HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Beijing, China 製) に腹腔内免疫した。手順を3週間繰り返した。2回目の免疫化の2週間後、ELISA 及びFACSによりOX40結合に関してマウス血清を評価した。血清スクリーニングの10日後、最高抗OX40抗体血清中力価を有するマウスを10 µgのOX40-mIgG2aでi.p.注射によりブーストした。ブースティングの3日後、脾細胞を単離し、標準的技術 (Somat Cell Genet, 1977 3:231) を用いてネズミ骨髓腫細胞系SP2/0細胞 (ATCC, Manassas VA) に融合した。

【0120】

ELISA及びFACSによる抗体のOX40結合活性のアセスメント

いくつかの修正を加えて (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52) に記載のように、ハイブリドーマクローンの上清をELISAにより最初にスクリーニングした。簡潔に述べると、OX40-Hisタンパク質を96ウェルプレートに4℃で一晩コーティングした。PBS/0.05% Tween-20で洗浄後、プレートを2時間にわたりPBS/3% BSAにより室温でブロックした。続いて、プレートをPBS/0.05% Tween-20で洗浄し、細胞上清とともに室温で1時間インキュベートした。HRP連結抗マウスIgG抗体 (Cat: 115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcy fragment specific) 及び基質 (Cat: 00-4201-56, eBioscience, USA) を用いて450nmの波長で色吸光度シグナルを発生させ、それをプレートリーダー (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/HERAstar, BMG LABTECH) を用いることにより測定した。間接ELISAによる融合スクリーニングから陽性親クローンを取り出した。以上に記載のHuT78/OX40及びHuT78/cynoOX40細胞を用いてFACSによりELISA陽性クローンをさらに検証した。OX40発現細胞 (10⁵細胞/ウェル) をELISA陽性ハイブリドーマ上清とともにインキュベートし、続いて、抗マウスIgG eFluor (登録商標) 660抗体 (Cat: 50-4010-82, eBioscience, USA) を結合させた。細胞蛍光をフローサイトメーター (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, USA) を用いて定量した。

【0121】

ヒト免疫細胞ベースアッセイで良好な機能活性を有する抗体を同定するために、ELISA及びFACSスクリーニングの両方で陽性シグナルを示したハイブリドーマからの馴化培地を機能アッセイに付した (以下のセクションを参照されたい)。所望の機能活性を有する抗体をさらにサブクロニングし、特徴付けた。

【0122】

ハイブリドーマのサブクロニング及び血清フリー培地又は低血清培地への適応

以上に記載のELISA、FACS、及び機能アッセイによる一次スクリーニングの後、クローン性を確保するために限界希釈により陽性ハイブリドーマクローンをサブクロニングした。トップ抗体サブクローンを機能アッセイにより検証し、3% FBSを有するCDM4MAb培地 (Cat: SH30801.02, Hyclone, USA) での成長に適合化させた。

【0123】

モノクローナル抗体の発現及び精製

トップ抗体クローンを発現するハイブリドーマ細胞をCDM4MAb培地 (Cat: SH30801.02, Hyclone) で培養し、37℃で5~7日間にわたりCO₂インキュベーターでインキュベートした。遠心分離を介して馴化培地を捕集し、0.22 µm膜に通して濾過してから精製した。製造業者の説明書に従って上清中のネズミ抗体をプロテインAカラム (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences) に適用し結合させた。手順は、通常、純度90%超で抗体を生成した。プロテインA親

和性精製抗体は、PBSに対して透析されたか、又は必要であれば、凝集物を除去するためにHiLoad 16/60 Superdex 200カラム (Cat: 28-9893-35, GE Life Sciences) を用いてさらに精製された。タンパク質濃度は、280nmで吸光度を測定することにより決定された。最終的抗体調製物は、-80℃フリーザー中にアリコートで貯蔵された。

【0124】

実施例2： 抗OX40抗体のクローニング及び配列解析

ネズミハイブリドーマクローンを採取し、製造業者のプロトコルに基づいてUltra pure RNAキット (Cat: 74104, QIAGEN, Germany) を用いて全細胞RNAを調製した。Invitrogen製のcDNA合成キット (Cat: 18080-051) を用いて第一鎖cDNAを合成し、PCRキット (Cat: CW0686, CWBio, Beijing, China) を用いてハイブリドーマ抗体のVH及びVLのPCR増幅を実施した。重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) の抗体cDNAクローニングに用いたオリゴプライマーは、既報の配列 (Brock et al. 2001 Mol Med 7: 461) に基づいてInvitrogen (Beijing, China) により合成された。PCR産物は、シーケンシングに直接使用されたか、又はpEASY-BLUNTクローニングベクター (Cat: CB101 TransGen, China) にサブクローニングされてからGenewiz (Beijing, China) によりシーケンシングされた。VH及びVL領域のアミノ酸配列は、DNAシーケンシング結果から推測された。

【0125】

ネズミ抗体の相補性決定領域 (CDR) は、配列アノテーションにより及びコンピュータプログラム配列解析によりKabats (Wu and Kabat 1970 J. Exp. Med. 132: 211-250) システムに基づいて定義された。代表的トピッククローンMu445 (VH及びVL) のアミノ酸配列は、表1 (配列番号9及び11) に列挙された。Mu445のCDR配列は、表2 (配列番号3～8) に列挙された。

【0126】

【表2】

表1. Mu445 VH 及び VL 領域のアミノ酸配列

Mu445 VH	配列番号 9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYII HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCARG YYGSSYAMDYWGQGTSVTVSS
Mu445 VL	配列番号 11	DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLN WYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSG TDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGT KLEKK

【0127】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 2. マウスモノクローナル抗体 Mu445 VH 及び VL 領域の CDR 配列(アミノ酸)

抗体	配列番号	CDR	配列
Mu445	配列番号 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号 4	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	配列番号 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	配列番号 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

10

【0128】

実施例 3： ネズミ抗ヒト OX40 抗体 445 のヒト化

抗体ヒト化及び工学操作

Mu445 のヒト化のために、IMGT のヒトイムノグロブリン遺伝子データベースに対する配列比較により Mu445 可変領域の cDNA 配列に対して高度の相同性を共有する配列に関して、ヒト生殖系 IgG 遺伝子を探索した。高頻度でヒト抗体レパートリーに存在し (Glanville et al., 2009 PNAS 106:20216-20221) 且つ高度に Mu445 に相同的であるヒトIGHV 及び IGKV 遺伝子をヒト化のためのテンプレートとして選択した。

20

【0129】

CDR 移植によりヒト化を行い (Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods and Protocols, Vol 248: Humana Press)、インハウス開発現ベクターを用いることによりヒト IgG1 野生型フォーマットとしてヒト化抗体を工学操作した。ヒト化の初期ラウンドでは、シミュレート 3D 構造解析によりフレームワーク領域でネズミからヒトアミノ酸残基への突然変異をガイドし、CDR のカノニカル構造を維持する構造重要性を有するネズミフレームワーク残基をヒト化抗体 445 の最初のバージョンで保持した (表 3 の 445-1 を参照されたい)。445-1 の 6 つの CDR は、HCDR1 (配列番号 3)、HCDR2 (配列番号 13)、HCDR3 (配列番号 5)、並びに LCDR1 (配列番号 6)、LCDR2 (配列番号 7)、及び LCDR3 (配列番号 8) のアミノ酸配列を有する。445-1 の重鎖可変領域は、配列番号 15 のヌクレオチド配列によりコードされる (VH) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域は、配列番号 17 のヌクレオチド配列によりコードされる (VL) 配列番号 16 のアミノ酸配列を有する。具体的には、Mu445 の LCDR (配列番号 6~8) は、ヒト生殖系可変遺伝子 IGVK1-39 のフレームワークに移植され、2 つのネズミフレームワーク残基 (I44 及び Y71) は保持された (配列番号 16)。HCDR1 (配列番号 3)、HCDR2 (配列番号 13)、及び HCDR3 (配列番号 5) は、ヒト生殖系可変遺伝子 IGHV1-69 のフレームワークに移植され、2 つのネズミフレームワーク (L70 及び S72) 残基は保持された (配列番号 14)。N 末端側半分のみがシミュレート 3D 構造に従って抗原結合に重要であると予測されたので、445 ヒト化変異体 (445-1) では、Kabat HCDR2 の N 末端側半分のみが移植された。

30

40

【0130】

445-1 は、容易適応サブクローニング部位をそれぞれ有するヒト野生型 IgG1 (IgG1wt) 及びカッパ鎖の定常領域を含有するインハウス開発現ベクターを用いて、ヒト化全長抗体として構築された。445-1 抗体は、293G 細胞への以上の 2 つの

50

構築物の共トランスフェクションにより発現され、プロテインAカラム（Cat：17-5438-02，GE Life Sciences）を用いて精製された。精製抗体は、PBS中で0.5～10mg/mLに濃縮され、-80℃フリーザーにアリコートで保存された。

【0131】

445-1抗体を用いて、VL中のI44P及びY71F並びにVH中のL70I及びS72Aなど、いくつかの単一アミノ酸変化を行って、VH及びVLのフレームワーク領域中の保持ネズミ残基を対応するヒト生殖系残基に変換した。そのほか、潜在的異性化リスクを低減するために及びヒト化レベルを増加させるために、CDRでいくつかの単一アミノ酸変化を行った。たとえば、LCDR2でT51A及びD50Eの改変を行い、且つHCDR2でD56E、G57A、及びN61Aの改変を行った。ヒト化変化はすべて、特異的位置に突然変異を含有するプライマー及び部位指向突然変異誘発キットを用いて行われた（Cat：AP231-11，TransGen，Beijing，China）。所望の変化は、シーケンシングにより検証された。

10

【0132】

445-1抗体中のアミノ酸変化は、OX40への結合及び熱安定性に関して評価された。配列番号3のHCDR1、配列番号18のHCDR2、配列番号5のHCDR3、配列番号6のLCDR1、配列番号19のLCDR2、及び配列番号8のLCDR3を含む抗体445-2（表3参照）は、以上に記載の特異的变化の組合せから構築された。2つの抗体を比較すると、結果は、抗体445-2及び445-1の両方が同程度の結合親和性を呈すること示した（以下の表4及び表5を参照されたい）。

20

【0133】

445-2抗体から始めて、結合親和性／速度論をさらに改善するために、VLのフレームワーク領域でいくつかの追加のアミノ酸変化、たとえば、アミノ酸G41D及びK42Gの改変を行った。そのほか、免疫原性リスクを低下させるために及び熱安定性を増加させるために、VH及びVLの両方のCDRでいくつかの単一アミノ酸変化、たとえば、LCDR1中のS24R及びHCDR2中のA61Nを行った。得られた変化は、445-2と比較して改善された結合活性又は熱安定性のどちらかを示した。

【0134】

ヒト化445抗体は、ヒトにおける治療的使用に関する分子的及び生物物理学的性質を改善するために、CDR及びフレームワーク領域で特異的アミノ酸変化を導入することによりさらに工学操作された。考慮点には、結合活性を維持しつつ、有害な翻訳後修飾の除去、熱安定性（ T_m ）、表面疎水性、及び等電点（ pI ）の改善を行うことが含まれていた。

30

【0135】

配列番号3のHCDR1、配列番号24のHCDR2、配列番号5のHCDR3、配列番号25のLCDR1、配列番号19のLCDR2、及び配列番号8のLCDR3を含むヒト化モノクローナル抗体445-3（表3参照）は、以上に記載の成熟プロセスから構築され、詳細に特徴付けられた。抗体445-3は、ヒトIgG2の野生型重鎖のFcドメインを含むIgG2バージョン（445-3IgG2）、並びにS228P及びR409Kの突然変異を有するヒトIgG4のFcドメインを含むIgG4バージョン（445-3IgG4）も作製された。結果は、445-3及び445-2が同程度の結合親和性を呈すること示した（表4及び表5を参照されたい）。

40

【0136】

【表 4】

表 3. 445 抗体配列

抗体	配列番号		配列
445-1	配列番号 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号 13	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	配列番号 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	配列番号 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRY NQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号 16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

445-2	配列番号 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号 18	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	配列番号 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	配列番号 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号 20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY AQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号 22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK
445-3	配列番号 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号 24	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	配列番号 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号 25	LCDR1 (Kabat)	RASQGISNYLN
	配列番号 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	配列番号 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY NQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNY LNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

10

20

30

40

【0138】

実施例 4： SPR による抗 OX40 抗体の結合速度論及び親和性決定

抗 OX40 抗体は、BIAcore（商標）T-200（GE Life Sciences）を用いて SPR アッセイによりその結合速度論及び親和性に関して特徴付けられた。簡潔に述べると、抗ヒト IgG 抗体は、活性化 CM5 バイオセンサーチップ（Cat：BR100530，GE Life Sciences）上に固定された。ヒト IgG Fc 領域を有する抗体は、チップ表面上で流動され、抗ヒト IgG 抗体によりキャプチャーされた。次いで、His タグを有する組換え OX40 タンパク質（Cat：10481-H08H，Sino Biological）の段階希釈物は、チップ表面上で流動さ

50

れ、表面プラズモン共鳴シグナルの変化は、1対1ラングミュア結合モデル（BIA Evaluation Software, GE Life Sciences）を用いることにより会合速度（ k_a ）及び解離速度（ k_d ）を計算すべく分析された。平衡解離定数（ K_D ）は、比 k_d / k_a として計算された。抗OX40抗体のSPR決定結合プロファイルの結果は、図2及び表4にまとめられる。抗体445-3の平均 K_D （9.47 nM）を有する結合プロファイルは、わずかに抗体445-2（13.5 nM）及び445-1（17.1 nM）よりも良好であり、ch445のものに類似していた。445-3 IgG4の結合プロファイルは445-3（IgG1Fcを有する）に類似していたことから、IgG4とIgG1との間のFcの変化は、445-3抗体の特異的結合を改変しないことが示唆された。

10

【0139】

【表6】

表4. SPRによる抗OX40抗体の結合親和性

試験パラメーター		ch445*	445-1	445-2	445-3	445-3 IgG4
試験1	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	1.74×10^5	1.56×10^5	2.76×10^5	1.82×10^5	1.61×10^5
	kd (s^{-1})	1.43×10^{-3}	2.77×10^{-3}	3.90×10^{-3}	1.67×10^{-3}	1.61×10^{-3}
	K_D (nM)	8.26	17.8	14.2	9.16	10.0
	K_A (M^{-1})	1.22×10^8	0.56×10^8	0.71×10^8	1.09×10^8	1.00×10^8
試験2	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	2.65×10^5	2.37×10^5	2.06×10^5	1.63×10^5	—
	kd (s^{-1})	1.67×10^{-3}	3.89×10^{-3}	2.64×10^{-3}	1.59×10^{-3}	—
	K_D (nM)	6.3	16.4	12.8	9.77	—
	K_A (M^{-1})	1.59×10^8	0.61×10^8	0.78×10^8	1.03×10^8	—
平均	K_D (nM)	7.28	17.1	13.5	9.47	10.0
	K_A (M^{-1})	1.41×10^8	0.59×10^8	0.75×10^8	1.06×10^8	1.00×10^8

20

*ch445 は、ヒトIgG1wt/カップ定常領域に融合された Mu445 可変ドメインで構成される

30

【0140】

実施例5：HuT78細胞上に発現されるOX40への抗OX40抗体の結合親和性の決定

生細胞の表面上に発現されるOX40に結合する抗OX40抗体の結合活性を評価するために、HuT78細胞を実施例1に記載のヒトOX40でトランスフェクトし、OX40発現系を生成した。生存HuT78/OX40細胞を96ウェルプレートに播種し、各種抗OX40抗体の段階希釈物とともにインキュベートした。細胞表面への抗体結合を検出するために、ヤギ抗ヒトIgG-FITC（Cat：A0556，Beyotime）を二次抗体として使用した。ヒトOX40への用量依存結合のEC₅₀値は、Graph Pad Prismで用量-反応データを4パラメーターロジスティックモデルに当てはめることにより決定された。図3及び表5に示されるように、OX40抗体は、OX40への高い親和性を有していた。本開示のOX40抗体は、フローサイトメトリーにより測定された比較的高いトップレベルの蛍光強度を有していたことから（表5の最後のカラムを参照されたい）、望ましい結合プロファイルであるOX40からの抗体のより遅い解離が示唆されることも判明した。

40

【0141】

50

【表 7】

表 5. OX40 へのヒト化 445 変異体の用量依存結合の EC₅₀

抗体	EC ₅₀ (μg/mL)			トップ(MFI)
	試験 1	試験 2	平均	平均
ch445	0.321	0.277	0.299	725
445-1	0.293	0.278	0.285	525
445-2	0.323	0.363	0.343	620
445-3	0.337	0.319	0.328	910
445-3 IgG4	0.263	N/A	0.263	892

10

【0142】

実施例 6： 抗 OX40 抗体の交差反応性の決定

ヒト及びカニクイザル (cyno) サル OX40 への抗体 445-3 の交差反応性を評価するために、ヒト OX40 (HuT78/OX40) 及び cyno OX40 (HuT78/cyno OX40) を発現する細胞を 96 ウェルプレートに播種し、OX40 抗体の一連の希釈物とともにインキュベートした。ヤギ抗ヒト IgG-FITC (Cat: A0556, Beyotime) を検出用二次抗体として使用した。GraphPad Prism で用量-反応データを 4 パラメーターロジスティックモデルに当てはめることにより、ヒト及びカニクイザル天然 OX40 への用量依存結合の EC₅₀ 値を決定した。結果は、図 4 及び以下の表 6 に示される。抗体 445-3 は、以下に示されるように、ヒト及びカニクイザル OX40 の両方と類似の EC₅₀ 値で交差反応する。

20

【0143】

【表 8】

表 6. ヒト及びカニクイザル OX40 への抗体 445-3 結合の EC₅₀

細胞系	445-3 の EC ₅₀ (ug/mL)	トップ(MFI)
HuT78/OX40	0.174	575
HuT78/cynoOX40	0.171	594

30

【0144】

実施例 7： OX40 と 445-3 Fab との共結晶化及び構造決定

本開示の抗体への OX40 の結合機序を理解するために、OX40 と 445-3 の Fab との共結晶構造を解明した。OX40 のグリコシル化をブロックし、タンパク質の均一性を改善するために、残基 T148 及び N160 に突然変異を導入した。突然変異体ヒト OX40 (2 つの突然変異部位 T148A 及び N160A を有する残基 M1-D170) をコードする DNA をヘキサヒスタグを含めて発現ベクターにクローニングし、この構築物を 293G 細胞に一過的にトランスフェクトし、37℃で7日間にわたりタンパク質発現に供した。細胞を採取し、上清を捕集し、4℃で1時間にわたりヒスタグ親和性樹脂とともにインキュベートした。20mM Tris、pH8.0、300mM NaCl、及び30mMイミダゾールを含有する緩衝液で樹脂を3回濯いだ。次いで、20mM Tris、pH8.0、300mM NaCl、及び250mMイミダゾールを含有する緩衝液で OX40 タンパク質を溶出させ、続いて、20mM Tris、pH8.0、1

40

50

00mM NaClを含有する緩衝液中でSuperdex 200 (GE Healthcare) によりさらなる精製に供した。

【0145】

重鎖のC末端にヘキサヒスタグを含めて445-3Fabの重鎖及び軽鎖のコード配列を発現ベクターにクローニングし、これを一過的に293G細胞にコトランスフェクトし、37℃で7日間にわたりタンパク質発現に供した。445-3Fabの精製工程は、以上の突然変異体OX40タンパク質に用いたものと同一であった。

【0146】

精製されたOX40及び445-3Fabを1:1のモル比で混合し、氷上で30分間インキュベートし、続いて、20mM Tris、pH8.0、100mM NaClを含有する緩衝剤中でSuperdex 200 (GE Healthcare) によりさらなる精製に供した。複合ピークを捕集し、およそ30mg/mlに濃縮した。

【0147】

タンパク質複合体とリザーバー溶液とを1:1の体積比で混合することにより、共結晶スクリーンを実施した。0.1M HEPES、pH7.0、1%PEG2,000MM E、及び0.95Mナトリウムスクシネートを含むリザーバー溶液を用いて蒸気拡散により20℃で培養されたハンギングドロップから共結晶を得た。

【0148】

ナイロンループを用いて共結晶を採取し、20%グリセロールが補充されたリザーバー溶液中に結晶を10秒間浸漬した。BL17U1, Shanghai Synchrotron Radiation Facilityで回折データを収集し、XDSプログラムで処理した。分子置換検索モデルとしてIgG Fabの構造(PDB:5CZXの鎖C及びD)とOX40の構造(PDB:2HEVの鎖R)とを用いて、プログラムPHASERにより相を解明した。Phenix.refineグラフィカルインターフェースを用いてX線データに対して剛体TLS及び拘束リファインメントを実施し、続いて、COOTプログラムで調整し、そしてPhenix.refineプログラムでさらにリファインメントを行った。X線データ収集及びリファインメント統計は、表7にまとめられる。

【0149】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 7. データ収集及びリファインメント統計

データ収集	
ビームライン	BL17U1, SSRF
空間群	P 31 2 1
セル寸法(Å)	a=183.96 b=183.96 c=79.09
角度(°)	α =90.00 β =90.00 γ =120.00
分解能(Å)	159.3-2.55 (2.63-2.55)
合計反射数	988771 (81305)
ユニーク反射数	50306 (4625)
完全性(%)	99.9 (99.9)
平均冗長性	19.7 (17.6)
Rmerge ^a	0.059 (0.962)
I/シグマ(I)	29.4 (3.5)
ウィルソン B 因子(Å)	73.9
リファインメント	
分解能(Å)	60.22-2.55
反射数	50008
rmsd 結合長(Å)	0.010
rmsd 結合角(°)	0.856
R _{work} ^b (%)	19.27
R _{free} ^c (%)	21.60
タンパク質の平均 B 因子	97.10
ラマチャンドラプロット(%)	
有利値	96.34
許容値	3.48
外れ値	0.17

括弧内の値は最高分解能シェルを意味する。

^a Rmerge= $\sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_i I(h)_i$ 、式中、 $\langle I(h) \rangle$ は等価なものの平均強度である。

^b R_{work}= $\sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$ 、式中、F_o 及び F_c は、それぞれ、観測及び計算された構造因子振幅である。

^c R_{free}= $\sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$ 、観測された反射から合計データの 5%がランダムに選択された試験データセットを用いて計算される。

【 0 1 5 0 】

実施例 8： S P R による抗体 4 4 5 - 3 のエピトープ同定

O X 4 0 及び抗体 4 4 5 - 3 F a b の共結晶構造によりガイドして、ヒト O X 4 0 タンパク質中の一連の単一突然変異を選択及び発生し、本開示の抗 O X 4 0 抗体の主要エピトープをさらに同定した。部位指向突然変異誘発キット (C a t : A P 2 3 1 - 1 1 , T r a n s G e n) を用いてヒト O X 4 0 / I g G 1 融合構築物に単一点突然変異を行った。シーケンシングにより所望の突然変異を検証した。2 9 3 G 細胞へのトランスフェクションにより O X 4 0 突然変異体の発現及び調製を達成し、プロテイン A カラム (C a t : 1 7 - 5 4 3 8 - 0 2 , G E L i f e S c i e n c e s) を用いて精製した。

【0151】

BIAcore 8K (GE Life Sciences) を用いて、445-3 Fab への OX40 点突然変異体の結合親和性を SPR アッセイにより特徴付けした。簡潔に述べると、EDC 及び NHS を用いて CM5 バイオセンサーチップ (Cat: BR100530, GE Life Sciences) 上に OX40 突然変異体及び野生型 OX40 を固定した。次いで、180 秒の接触時間及び 600 秒の解離時間を用いて 30 μ l / 分で HBS-EP + 緩衝液 (Cat: BR-1008-26, GE Life Sciences) 中の 445-3 Fab の段階希釈物をチップ表面上で流動させた。表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析し、1対1ラングミュア結合モデル (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences) を用いることにより会合速度 (k_a) 及び解離速度 (k_d) を計算した。平衡解離定数 (K_D) は、比 k_d / k_a として計算された。突然変異体の K_D シフト倍率を突然変異体 $K_D / WT K_D$ 比として計算した。SPR により決定されたエピトープ同定のプロファイルは、図 5 及び表 8 にまとめられる。OX40 中の残基 H153、I165、及び E167 からアラニンへの突然変異は、OX40 への抗体 445-3 結合を有意に低減し、且つ残基 T154 及び D170 からアラニンへの突然変異は、OX40 への抗体 445-3 結合の中程度の低減を有していたことが、結果から示唆された。

10

【0152】

抗体 445-3 と X40 の残基 H153、T154、I165、OE167、及び D170 との間の詳細な相互作用は、図 6 に示される。OX40 上の H153 の側鎖は、相互作用界面上の 445-3 の小さなポケットに取り囲まれ、heavy S31 及び heavy G102 との水素結合並びに heavy Y101 とのパイ-パイスタッキングを形成する。E167 の側鎖は、heavy Y50 及び heavy N52 と水素結合を形成し、一方、D170 は、heavy S31 及び heavy K28 とそれぞれ水素結合及び塩ブリッジを形成し、複合体をさらに安定化させることが可能である。T154 と heavy Y105 及び I165 と heavy R59 のファンデルワールス (VDW) 相互作用は、OX40 への抗体 445-3 の高親和性に寄与した。

20

【0153】

結論として、OX40 の残基 H153、I165、及び E167 は、抗体 445-3 と相互作用するための重要な残基として同定された。そのほか、OX40 のアミノ酸 T154 及び D170 もまた、抗体 445-3 に対する重要な接触残基である。抗体 445-3 のエピトープは、OX40 の残基 H153、T154、I165、E167、及び D170 であることが、このデータから示唆された。これらのエピトープは、配列

30

【化1】

HTLQPASNSSDAICEDRD (配列番号30)

の中に存在し、重要な接触残基は、下線付き太字で示される。

【0154】

40

50

【表 10】

表 8. SPR により決定された抗体 445-3 のエピトープ同定

突然変異体	突然変異体 $K_D/WT K_D$
H153A	結合は検出されなかった
T154A	8
Q156A	1.9
S161A	1.1
S162A	0.6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

有意な影響: 結合は検出されなかったか、又は突然変異体 $K_D/WT K_D$ の値は 10 超であった。

中程度の影響: 突然変異体 $K_D/WT K_D$ は 5~10 の値であった。非有意な影響: 突然変異体 $K_D/WT K_D$ の値は 5 未満であった。

10

20

【0155】

実施例 9: 抗 OX40 抗体 445-3 は OX40-OX40L 相互作用をブロックしない。

抗体 445-3 が OX40-OX40L 相互作用に干渉するかを決定するために、細胞ベースフローサイトメトリーアッセイを確立した。このアッセイでは、ネズミ IgG2a Fc とのヒト OX40 融合タンパク質 (OX40-mIgG2a) とともに、抗体 445-3、参照抗体 1A7、gr1、コントロール huIgG、又は培地単独をプレインキュベートした。次いで、抗体及び融合タンパク質複合体を OX40L 発現 HEK293 細胞に添加した。OX40 抗体が OX40-OX40L 相互作用に干渉しなければ、OX40 抗体-OX40 mIgG2a 複合体は、依然として表面 OX40L に結合するであろうから、この相互作用は、抗マウス Fc 二次抗体を用いて検出可能である。

30

【0156】

図 7 に示されるように、抗体 445-3 は、高濃度でさえも、OX40L への OX40 の結合を低減しなかったことから、445-3 は、OX40-OX40L 相互作用に干渉しないことが示唆される。このことから、445-3 は、OX40L 結合性部位に結合しないか、又は OX40L 結合を立体障害するのに十分な程度に近づいて結合しないことが示唆される。これとは対照的に、陽性コントロール抗体 1A7、gr1 は、図 7 に示されるように OX40L への OX40 結合を完全にブロックする。

【0157】

そのほか、445-3 Fab との複合体での OX40 の共結晶構造を解明し、図 8 に示されるように OX40/OX40L 複合体 (PDBコード: 2HEV) でアライメントした。OX40 リガンドトリマーは、主に、OX40 の CRD1 (システインリッチドメイン)、CRD2、及び部分的 CRD3 領域を介して OX40 と相互作用し (Compagnon and Hymowitz, 2006)、一方、抗体 445-3 は、CRD4 領域のみを介して OX40 と相互作用する。まとめると、445-3 抗体及び OX40L トリマーは、OX40 のそれぞれ異なる領域に結合し、抗体 445-3 は、OX40/OX40L 相互作用に干渉しない。この結果は、以上の実施例に記載のエピトープマッピングデータに相関する。OX40 の CRD4 は、アミノ酸 127~167 にあり、抗体 445-3 のエピトープは、この領域に部分的にオーバーラップする。OX40 CRD4 の配列 (

40

50

アミノ酸 127～167) は、以下に示されており、445-3 エピトープの部分的オーバーラップは、下線付き太字で示される。

【化 2】

PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE (配列番号31)

【0158】

実施例 10： 抗 OX40 抗体 445-3 のアゴニスティック活性

抗体 445-3 のアゴニスティック機能を調べるために、445-3 又は 1A7. gr 1 の存在下又は不在下で OX40 陽性 T 細胞系 HuT78/OX40 を人工抗原提示細胞 (APC) 系 (HEK293/OS8^{Low}-FcγRI) とともに一晩共培養し、T 細胞刺激に対するリードアウトとして IL-2 産生を使用した。HEK293/OS8^{Low}-FcγRI 細胞では、膜結合抗 CD3 抗体 OKT3 (OS8) (米国特許第 8,735,553 号明細書に開示される) 及びヒト FcγRI (CD64) をコードする遺伝子は、HEK293 細胞に安定的にコトランスデュースされた。抗 OX40 抗体誘発免疫活性化は、抗体架橋に依存するので (Voo et al., 2013)、HEK293/OS8^{Low}-FcγRI 上の FcγRI は、OX40 及び FcγRI の両方への抗 OX40 抗体のデュアルエンゲージメントによる OX40 の抗 OX40 抗体媒介架橋の基礎を提供する。図 9 に示されるように、抗 OX40 抗体 445-3 は、0.06 ng/ml の EC₅₀ で用量依存的に TCR シグナリングを増強する効力が高い。参照 Ab 1A7. gr 1 のわずかに弱い活性も観測された。これとは対照的に、コントロールヒト IgG (10 μg/ml) 又はブランクは、IL-2 産生に影響を示さなかった。

【0159】

実施例 11： 抗 OX40 抗体 445-3 は混合リンパ球反応 (MLR) アッセイで免疫反応を促進した

抗体 445-3 が T 細胞活性化を刺激可能であることを決定するために、混合リンパ球反応 (MLR) アッセイを構築した (Tourkova et al., 2001)。簡潔に述べると、GM-CSF 及び IL-4 とともに培養してから LPS 刺激を行うことにより、ヒト PBMC 誘導 CD14⁺ ミエロイド細胞から成熟 DC を誘導した。その次に、抗 OX40 445-3 抗体 (0.1～10 μg/ml) の存在下で、同種異系 CD4⁺ T 細胞とともにマイトマイシン C 処理 DC を 2 日間共培養した。MLR 反応のリードアウトとして共培養での IL-2 産生を ELISA により検出した。

【0160】

図 10 に示されるように、抗体 445-3 は、IL-2 産生を有意に促進したことから、CD4⁺ T 細胞を活性化する 445-3 の能力が示唆される。これとは対照的に、参照抗体 1A7. gr 1 は、MLR アッセイで有意に (P<0.05) より弱い活性を示した。

【0161】

実施例 12： 抗 OX40 抗体 445-3 は ADCC 活性を示した

抗体 445-3 が OX40^{Hi} 発現標的細胞を死滅させることができるかを調べるために、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出ベース ADCC アッセイを構成した。CD16v158 (V158 対立遺伝子) 及び FcγR 遺伝子を NK 細胞系 NK92MI (ATCC, Manassas VA) にコトランスデュースすることにより、NK92MI/CD16V 細胞系をエフェクター細胞として発生させた。OX40 発現 T 細胞系 HuT78/OX40 を標的細胞として使用した。等しい数 (3×10⁴) の標的細胞及びエフェクター細胞を抗 OX40 抗体 (0.004～3 μg/ml) 又はコントロール Ab の存在下で 5 時間共培養した。Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay キット (Promega, Madison, WI) を用いて LDH 放出により細胞傷害性を評価した。以下に示される式により特異的ライシスを計算した。

【数 1】

$$\% \text{特異的ライシス} = \frac{\text{実験値} - \text{エフェクター自然値} - \text{標的自然値}}{\text{標的最大値} - \text{標的自然値}} \times 100$$

【0162】

図 11 に示されるように、抗体 445-3 は、ADCC を介して OX40^{Hi} 標的を用量依存的に死滅させる高い効力を示した (EC₅₀: 0.027 μg/mL)。抗体 445-3 の ADCC 作用は、1A7. gr1 コントロール抗体のものに類似していた。これとは対照的に、S228P 及び R409K 突然変異を有する IgG4 Fc フォーマットの 445-3 (445-3-IgG4) は、コントロールヒト IgG 又はブランクと比較してなんら有意な ADCC 作用を示さなかった。結果は、IgG4 Fc が ADCC に対して弱い又はサイレントであるという従来知見と一致する (An Z, et al. m Abs 2009)。

【0163】

実施例 13: 抗 OX40 抗体 445-3 は *in vitro* で優先的に CD4⁺Treg を枯渇させて CD8⁺Teff/Treg 比を増加させる

いくつかの動物腫瘍モデルでは、抗 OX40 抗体は、腫瘍浸潤 OX40^{Hi}Treg を枯渇させて CD8⁺T 細胞対 Treg 比を増加させることが示されている (Bullard et al., 2014, Carboni et al., 2003, Jacquemin et al., 2015, Marabelle et al., 2013b)。

【0164】

in vitro 活性化又は腫瘍内 CD4⁺Foxp3⁺Treg が他の T 細胞サブセットよりも優先的に OX40 を発現するという事実を考慮して (Lai et al., 2016, Marabelle et al., 2013b, Montler et al., 2016, Soroosh et al., 2007, Timperi et al., 2016)、OX40^{Hi} 細胞とくに Treg を死滅させる抗体 445-3 の能力を調べるために、ヒト PBMC ベースアッセイを構成した。簡潔に述べると、OX40 発現の誘導のために PHA-L (1 μg/mL) により PBMC をあらかじめ 1 日間活性化し、標的細胞として使用した。次いで、抗 OX40 抗体 (0.001~10 μg/mL) 又はプラセボの存在下で等しい数の標的細胞とともにエフェクター NK92MI/CD16V 細胞 (実施例 12 に記載の通り、5×10⁴) を一晩共培養した。フローサイトメトリーにより各 T 細胞サブセットのパーセンテージを決定した。図 12A 及び 12B に示されるように、抗体 445-3 による処理は、CD8⁺T 細胞のパーセンテージの増加及び CD4⁺Foxp3⁺Treg のパーセンテージの減少を用量依存的に誘発した。結果として、CD8⁺T 細胞対 Treg 比は大きく改善された (図 12C)。1A7. gr1 処理ではより弱い結果が得られた。この結果は、CD8⁺T 細胞機能をブーストするが Treg 媒介免疫寛容を制限することにより抗腫瘍免疫を誘発する 445-3 の治療用途を実証する。

【0165】

実施例 14: 抗 OX40 抗体 445-3 はマウス腫瘍モデルで用量依存抗腫瘍活性を発揮する

抗 OX40 抗体 445-3 の効能は、マウス腫瘍モデルで示された。ヒト OX40 が導入されたトランスジェニック C57 マウスの皮下にネズミ MC38 結腸腫瘍細胞を植え込んだ (Biocytogen, Beijing China)。腫瘍細胞の植込み後、腫瘍体積を週 2 回測定し、式: $V = 0.5(a \times b^2)$ (式中、a 及び b は、それぞれ、腫瘍の長直径及び短直径であった) を用いて mm³ 単位で計算した。腫瘍がおおよそ 190 mm³ サイズの平均体積に達したとき、マウスをランダムに 7 群に割り付け、週 1 回で 3

10

20

30

40

50

週間にわたり 445-3 又は 1A7.gr1 抗体のどちらかで腹腔内注射した。アイソタイプコントロールとしてヒト IgG を投与した。部分退縮 (PR) は、3 回連続測定で投与の初日の開始腫瘍体積の 50% 未満の腫瘍体積として定義された。腫瘍成長阻害 (TGI) は、下記式を用いて計算された。

【数 2】

$$\% \text{成長阻害} = 100 \times \left(1 - \frac{\left(\frac{\text{治療}_t}{\text{プラセボ}_t} \right) - \left(\frac{\text{治療}_{t_0}}{\text{プラセボ}_{t_0}} \right)}{\left(\frac{\text{治療}_t}{\text{プラセボ}_t} \right) - \left(\frac{\text{治療}_{t_0}}{\text{プラセボ}_{t_0}} \right)} \right)$$

処置_t = 時間_tの治療腫瘍体積

処置_{t₀} = 時間₀の治療腫瘍体積

プラセボ_t = 時間_tのプラセボ腫瘍体積

プラセボ_{t₀} = 時間₀のプラセボ腫瘍体積

10

【0166】

445-3 は、0.4 mg/kg、2 mg/kg、及び 10 mg/kg の用量の腹腔内注射として用量依存抗腫瘍効能を有することが、結果から実証された。445-3 の投与は、53% (0.4 mg/kg)、69% (2 mg/kg)、及び 94% (10 mg/kg) 腫瘍成長阻害をもたらし、ベースラインからの 0% (0.4 mg/kg)、17% (2 mg/kg)、及び 33% (10 mg/kg) 部分退縮をもたらした。これとは対照的に、抗体 1A7.gr1 による部分退縮は観測されなかった。リガンド非ブロッキング抗体 445-3 は、OX40-OX40L ブロッキング抗体 1A7.gr1 よりも抗腫瘍療法に好適であることが、in vivo データから示唆される (図 13A 及び 13B、表 9)。

20

【0167】

【表 11】

表 9. ネズミ MC38 結腸腫瘍マウスモデルにおける 445-3 及び 1A7.gr1 の効能

治療	QW 用量 (mg/kg)	N	部分縮退率	21 日目の平均腫瘍 体積(mm ³)	21 日目の TGI (%)
445-3	0.4	6	0%	953	53
	2	6	17%	696	69
	10	6	33%	280	94
1A7.gr1	0.4	6	0%	886	57
	2	6	0%	1163	41
	10	6	0%	1030	49

30

40

【0168】

実施例 15: 抗 OX40 抗体のアミノ酸改変

OX40 抗体の改善のために、改変に供されるいくつかのアミノ酸を選んだ。親和性を改善するために又はヒト化を増加させるために、アミノ酸変化を行った。適切なアミノ酸改変が行われるように PCR プライマーセットを設計し、合成し、そして抗 OX40 抗体を修飾するために使用した。たとえば、重鎖での K28T 及び軽鎖での S24R の改変は、FACS により決定される EC₅₀ を元の 445-2 抗体の 1.7 倍に増加させた。重

50

鎖での Y 2 7 G 及び軽鎖での S 2 4 R の改変は、B i a c o r e により決定され K_D を元の 4 4 5 - 2 抗体の 1 . 7 倍に増加させた。これらの変化は、図 1 4 A ~ 1 4 B にまとめられる。

【 0 1 6 9 】

実施例 1 6 : C T 2 6 W T 同系マウスモデルにおけるオキサリプラチンとの組合せの抗 O X 4 0 抗体

雌 B A L B / c マウスにおいて $150\mu\text{L}$ P B S 中 1×10^5 C T 2 6 W T 細胞 (ネズミ結腸癌細胞系) を右側腹部で皮下に植え込んだ。接種後、マウスを各群 2 0 匹の動物で 4 群にランダム化した。マウスは、コントロールとして媒体で治療された。

【 0 1 7 0 】

O X 8 6 は、国際公開第 2 0 1 6 / 0 5 7 6 6 7 号パンフレットにすでに開示されているラット抗マウス O X 4 0 抗体であり、これは、その免疫原性を低減するために、さらにはマウス試験でその F c 媒介機能を保つために、マウス I g G 2 a 定常領域でさらに工学操作された。O X 8 6 の V H 及び V L 領域は、以下に提供される。科学文献ですでに報告されているように、O X 8 6 は、O X 4 0 と O X 4 0 リガンドとの相互作用をブロックしないという点で、抗体 4 4 5 - 3 に類似した作用機序を有する (a l - S h a m k h a n i A l , e t a l . , E u r o J . I m m u n o l (1 9 9 6) 2 6 (8) , 1 6 9 5 - 9 , Z h a n g , P . e t a l . C e l l R e p o r t s 2 7 , 3 1 1 7 - 3 1 2 3) 。単独療法として、O X 8 6 を腹腔内 (i . p .) 注射により $0.08\text{mg} / \text{kg}$ で週 1 回 (Q W) 投与した。

【 0 1 7 1 】

【表 1 2】

OX86VH	配列番号 32	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGR MRYDGDITYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDDTAIYYCTRDGRG DSFDYWGGVMVTSS
OX86VL	配列番号 33	DIVMTQGALPNPVPSPGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWNFLQRPQGSPQLLT YWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISRVR AEDAGVYYCQVREYPFTFGS GTKLEIK

【 0 1 7 2 】

オキサプラチン (O x a p l a t i n) / 5 - フルオロウラシル (5 - F u) を、単剤としてマウスに投与した。オキサプラチン (O x a p l a t i n) / 5 - F u との組合せでの O X 8 6 抗体を、組合せ療法として投与した。O X 8 6 ($0.08\text{mg} / \text{kg}$) を、腹腔内 (i . p .) 注射により 1 週間に 1 回投与した。オキサプラチン (O x a p l a t i n) ($1.5\text{mg} / \text{kg}$) も、1 週間に 1 回 (Q W) 腹腔内投与し、5 - F u を、i . p . 注射により 1 週間当たり 5 日連続で 1 日に 1 回 $15\text{mg} / \text{kg}$ にて投与した。これらの各用量を、単剤治療及び組合せ治療に使用した。腫瘍体積を、キャリパーを用いて 2 寸法で 1 週間に 2 回決定し、式: $V = 0.5 (a \times b^2)$ (式中、a 及び b は、それぞれ、腫瘍の長直径及び短直径である) を用いて mm^3 単位で表した。データを、平均腫瘍体積 $\pm$ 平均の標準誤差 (S E M) として表す。腫瘍成長阻害 (T G I) を、下記式:

【数 3】

10

20

30

40

50

$$\% \text{成長阻害} = 100 \times \left(1 - \frac{\left(\frac{\text{治療}t}{\text{プラセボ}t} \right) - \left(\frac{\text{治療}t_0}{\text{プラセボ}t_0} \right)}{\left(\frac{\text{治療}t}{\text{プラセボ}t} \right) - \left(\frac{\text{治療}t_0}{\text{プラセボ}t_0} \right)} \right)$$

処置 t = 時間 t の治療腫瘍体積

処置 t_0 = 時間 0 の治療腫瘍体積

プラセボ t = 時間 t のプラセボ腫瘍体積

プラセボ t_0 = 時間 0 のプラセボ腫瘍体積

10

を用いて計算する。

【0173】

オキサプラチン (Oxaplatin) / 5-Fu 治療との組合せでの OX86 の治療に対する CT26WT 同種同系モデルの反応を、図15及び下記の表10に示す。11日目に、単剤としての OX86 (0.08 mg/kg QW×2)、オキサプラチン (Oxaplatin) / 5-Fu、及びオキサプラチン (Oxaplatin) / 5-Fu との組合せでの OX86 は、それぞれ、48%、51%、及び76%の腫瘍成長阻害をもたらした。次いで、媒体群のマウス又は2000 mm³ 超の腫瘍体積を有するマウスを殺し、残りの動物を、腫瘍成長のさらなるモニタリングのために飼育した。この試験の終了時に、単剤としての OX86 (0.08 mg/kg QW×3) と、オキサプラチン (Oxaplatin) / 5-Fu との組合せでの OX86 との間に、有意差 (P<0.001) を観察した。この試験により、オキサプラチン (Oxaplatin) / 5-Fu 等の化学療法剤との組合せでの OX40 抗体の効能の改善が実証された。この試験の過程に、あらゆる動物で毒性の徴候を観察しなかった。

20

【0174】

【表13】

表 10. CT26WT 同種同系モデルにおける OX86 及びオキサプラチン(Oxaplatin)/5-Fu の組合せ効能

試験品	用量(mg/kg)	N	11 日目の TGI (%)	11 日目の平均腫瘍体積 (mm ³ ;平均 ± SEM)
媒体	0	20	-	1698.5 ± 230.5
OX86	0.08	20	48	969.2 ± 229.0
オキサプラチン (Oxaplatin)/5-Fu	1.5 + 15	20	51	936.5 ± 92.0
OX86 + オキサプラチン (Oxaplatin)/5-Fu	0.08 + 1.5 + 15	20	76	559.1 ± 93.0

30

40

【0175】

参考文献

1. al-Shamkhani, A., Birkeland, M. L., Puklavac, M., Brown, M. H., James, W., and Barclay, A. N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. European journal of immunology 26, 1695-1

50

699.

2. An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. (2009). IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. *MAbs*. 1, 572–579.
3. Arch, R. H., and Thompson, C. B. (1998). 4–1 BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)–nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor–associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and cellular biology* 18, 558–565. 10
4. Aspeslagh, S., Postel–Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J. C., Zitvogel, L., and Marabelle, A. (2016). Rationale for anti–OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 52, 50–66.
5. Bulliard, Y., Jolicoeur, R., Zhang, J., Dranoff, G., Wilson, N. S., and Brogdon, J. L. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγmRs, leading to antitumor efficacy. *Immunology and cell biology* 92, 475–480. 20
6. Calderhead, D. M., Buhlmann, J. E., van den Eertwegh, A. J., Claassen, E., Noelle, R. J., and Fell, H. P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T–B cell interactions. *J Immunol* 151, 5261–5271. 30
7. Carboni, S., Aboul–Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., and Pena–Rossi, C. (2003). CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 145, 1–11.
8. Compaan, D. M., and Hymowitz, S. G. (2006). The crystal structure of the costimulator OX40–OX40L complex. *Structure* 14, 1321–1330. 40
9. Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR–related molecule OX40 (CD134). *Annual review of immunology* 28, 57–78.
10. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T–cell biology and immune disease. *Immunological reviews* 229, 173–191.
11. Curti, B. D., Kovacsovics–Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K. 50

- , Walker, J. , Gonzalez, I. , Meeuwssen, T. , Fox, B. A. , et al. (2013) . OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. Cancer research 73, 7189-7198.
12. Durkop, H. , Latza, U. , Himmelreich, P. , and Stein, H. (1995) . Expression of the Human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. British journal of Haematology 91, 927-931.
13. Gough, M. J. , and Weinberg, A. D. (2009) . OX40 (CD134) and OX40L. Advances in experimental medicine and biology 647, 94-107. 10
14. Gramaglia, I. , Weinberg, A. D. , Lemon, M. , and Croft, M. (1998) . Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. J Immunol 161, 6510-6517.
15. Guo, Z. , Cheng, D. , Xia, Z. , Luan, M. , Wu, L. , Wang, G. , and Zhang, S. (2013) . Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. Journal of translational medicine 11, 215. 20
16. Hori, S. , Nomura, T. , and Sakaguchi, S. (2003) . Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299, 1057-1061.
17. Huddleston, C. A. , Weinberg, A. D. , and Parker, D. C. (2006) . OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. European journal of immunology 36, 1093-1103. 30
18. Ito, T. , Amakawa, R. , Inaba, M. , Hori, T. , Ota, M. , Nakamura, K. , Takebayashi, M. , Miyaji, M. , Yoshimura, T. , Inaba, K. , and Fukuhara, S. (2004) . Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. J Immunol 172, 4253-4259.
19. Ito, T. , Wang, Y. H. , Duramad, O. , Hanabuchi, S. , Perng, O. A. , Gilliet, M. , Qin, F. X. , and Liu, Y. J. (2006) . OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 13138-13143. 40
20. Jacquemin, C. , Schmitt, N. , Contin-Bordes, C. , Liu, Y. , Narayanan, P. , Seneschal, J. , Maouard, T. , Dougall, D. , Davizon, E. S. , Dumortier, H. , et al. (2015) . OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promo 50

ting T FollicularHelper Response. *Immunity* 42, 1159–1170.

21. Kjaergaard, J., Tanaka, J., Kim, J. A., Rothchild, K., Weinberg, A., and Shu, S. (2000). Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer research* 60, 5514–5521.

22. Ladanyi, A., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I., and Timar, J. (2004). T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 521–530.

23. Lai, C., August, S., Albibas, A., Behar, R., Cho, S. Y., Polak, M. E., Theaker, J., MacLeod, A. S., French, R. R., Glennie, M. J., et al. (2016). OX40+ Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 4236–4248.

24. Marabelle, A., Kohrt, H., and Levy, R. (2013a). Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5261–5263.

25. Marabelle, A., Kohrt, H., Sagiv-Barfi, I., Ajami, B., Axtell, R. C., Zhou, G., Rajapaksa, R., Green, M. R., Torchia, J., Brody, J., et al. (2013b). Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of clinical investigation* 123, 2447–2463.

26. Montler, R., Bell, R. B., Thalhoffer, C., Leidner, R., Feng, Z., Fox, B. A., Cheng, A. C., Bui, T. G., Tucker, C., Hoen, H., and Weinberg, A. (2016). OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in Head and neck cancer. *Clinical & translational immunology* 5, e70.

27. Morris, N. P., Peters, C., Montler, R., Hu, H. M., Curti, B. D., Urbani, W. J., and Weinberg, A. D. (2007). Development and characterization of recombinant Human Fc:OX40L fusion p

10

20

30

40

50

rotein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.

28. Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on Human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-3848.

29. Petty, J. K., He, K., Corless, C. L., Vetto, J. T., and Weinberg, A. D. (2002). Survival in Human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *American journal of surgery* 183, 512-518.

30. Redmond, W. L., and Weinberg, A. D. (2007). Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Critical reviews in immunology* 27, 415-436.

31. Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.

32. Ruby, C. E., and Weinberg, A. D. (2009). OX40-enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age. *J Immunol* 182, 1481-1489.

33. Sarff, M., Edwards, D., Dhungel, B., Wegmann, K. W., Corless, C., Weinberg, A. D., and Vetto, J. T. (2008). OX40 (CD134) expression in sentinel lymph nodes correlates with prognostic features of primary melanomas. *American journal of surgery* 195, 621-625; discussion 625.

34. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L. C., and Sugamura, K. (2002). Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *European journal of immunology* 32, 3326-3335.

35. Smyth, M. J., Ngiew, S. F., and Teng, M. W. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. *Immunology and cell biology* 92, 473-474.

36. Song, A., Tang, X., Harms, K. M., and Croft, M. (2005a). OX40 and Bcl-xL promote the persistence of CD8 T cells to recall tumor-associated antigen. *J Immunol* 175, 3534-3541.

10

20

30

40

50

37. Song, J. , So, T. , Cheng, M. , Tang, X. , and Croft, M. (2005b) . Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* 22, 621–631.
38. Song, J. , So, T. , and Croft, M. (2008) . Activation of NF- κ B1 by OX40 contribute s to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol* 180, 7240–7248.
39. Soroosh, P. , Ine, S. , Sugamura, K. , and Ishii, N. (2007) . Differential requirements f or OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *J Immunol* 179, 5014–5023. 10
40. St Rose, M. C. , Taylor, R. A. , Bandyopadhy ay, S. , Qui, H. Z. , Hagymasi, A. T. , Vella, A. T. , and Adler, A. J. (2013) . CD134/CD137 dual co stimulation-elicited IFN- γ maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and cell biology* 91 , 173–183. 20
41. Stuber, E. , Neurath, M. , Calderhead, D. , Fell, H. P. , and Strober, W. (1995) . Cross-link ing of OX40 ligand, a member of the TNF/NG F cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507–521.
42. Szybowska, A. , Stelmaszczyk-Emmel, A. , Demkow, U. , and Luczynski, W. (2014) . High exp ression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) mo lecules on CD4 (+) CD25 (high) cells in chil dren with type 1 diabetes. *Advances in me dical sciences* 59, 39–43. 30
43. Timperi, E. , Pacella, I. , Schinzari, V. , Focaccetti, C. , Sacco, L. , Farelli, F. , Caronna, R. , Del Bene, G. , Longo, F. , Ciardi, A. , et al . (2016) . Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor ac tivities accumulate in Human colorectal c ancer. *Oncoimmunology* 5, e1175800. 40
44. Tourkova, I. L. , Yurkovetsky, Z. R. , Shurin, M. R. , and Shurin, G. V. (2001) . Mechanisms of dendritic cell-induced T cell prolifera tion in the primary MLR assay. *Immunolo gy letters* 78, 75–82.
45. Vetto, J. T. , Lum, S. , Morris, A. , Sicotte, M. , Davis, J. , Lemon, M. , and Weinberg, A. (199 7) . Presence of the T-cell activation mar ker OX-40 on tumor infiltrating lymphocy tes and draining lymph node cells from pa 50

tients with melanoma and Head and neck cancers. American journal of surgery 174, 258–265.

46. Voo, K. S., Bover, L., Harline, M. L., Vien, L. T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L. W., and Liu, Y. J. (2013). Antibodies targeting Human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. J Immunol 191, 3641–3650.

47. Weinberg, A. D., Rivera, M. M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J. T., Urba, W. J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. J Immunol 164, 2160–2169.

48. Weinberg, A. D., Wegmann, K. W., Funatake, C., and Whitham, R. H. (1999). Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 162, 1818–1826.

49. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M. S. (2017). OX40: Structure and function—What questions remain? Molecular immunology 83, 13–22.

50. Zander, R. A., Obeng-Adjei, N., Guthmiller, J. J., Kulu, D. I., Li, J., Ongoiba, A., Traore, B., Crompton, P. D., and Butler, N. S. (2015). PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk Regulates Helper T Cell Differentiation and Anti-Plasmodium Humoral Immunity. Cell Host & microbe 17, 628–641.

51. Zhang, T., Lemoi, B. A., and Sentman, C. L. (2005). Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. Blood 106, 1544–1551.

52. Zhang, P., e. H. G. e. J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., Yik Andy Yeung Y. A. (2019) Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. Cell Reports 27, 3117–3123.

10

20

30

40

【図面】
【図 1】

【図 2】

図 1

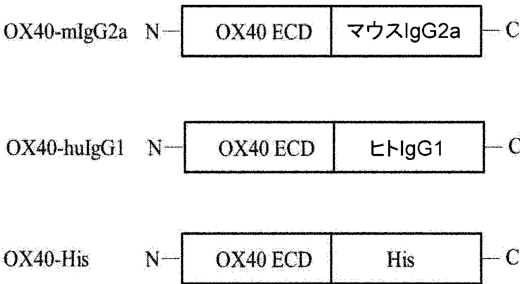
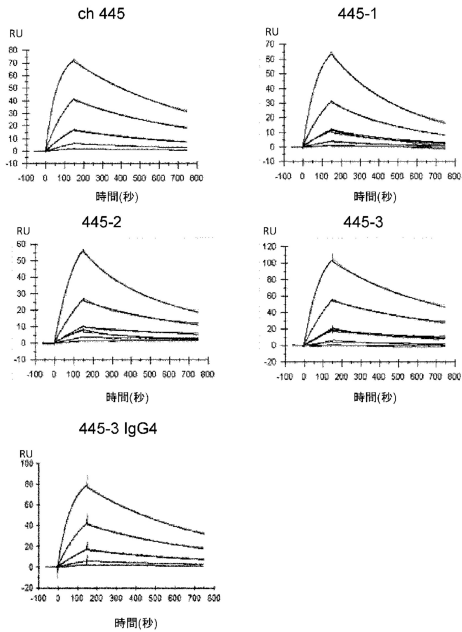


図 2



【図 3】

【図 4】

図 3

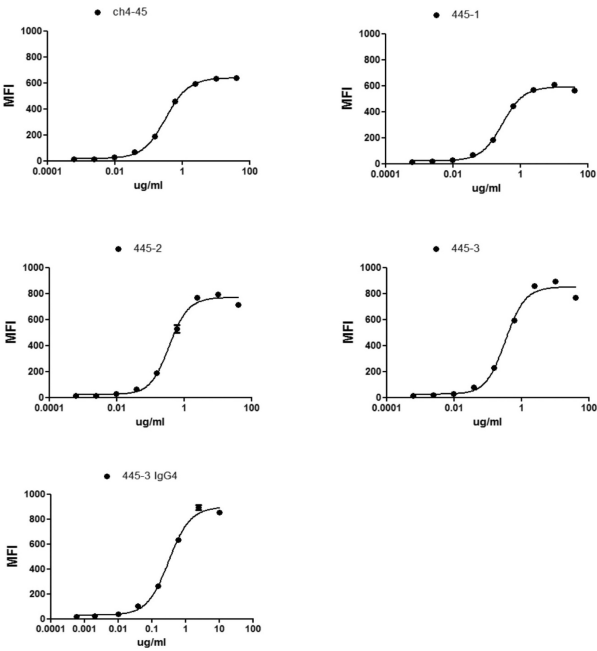
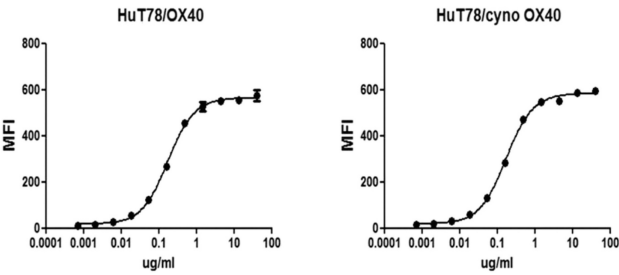


図 4



10

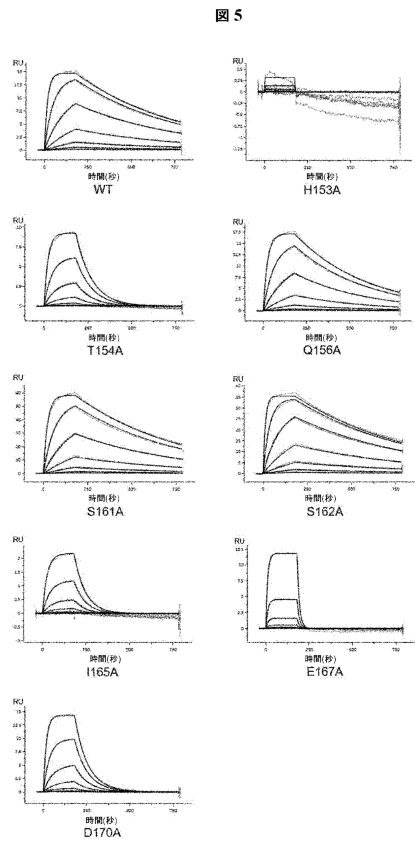
20

30

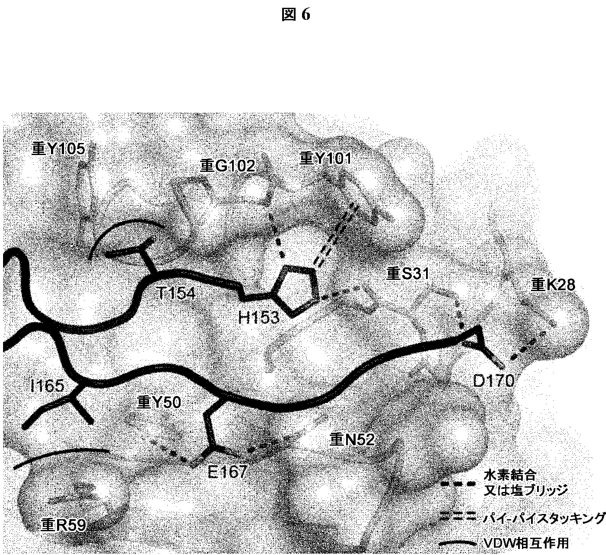
40

50

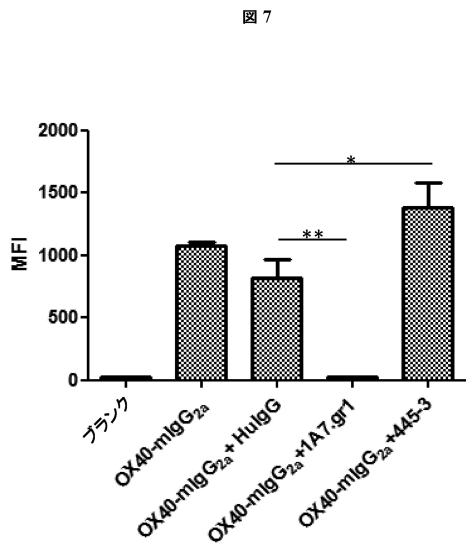
【 図 5 】



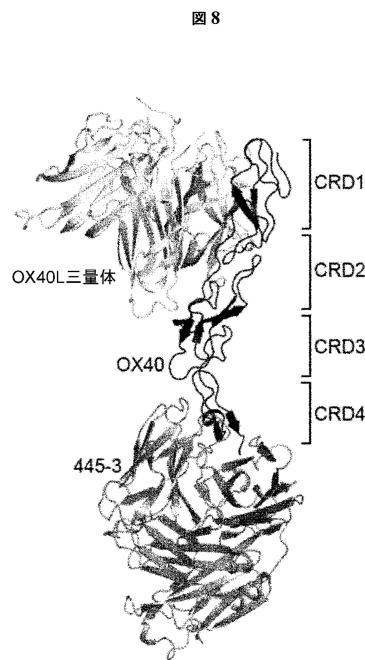
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



10

20

30

40

50

【 図 9 】

【 図 1 0 】

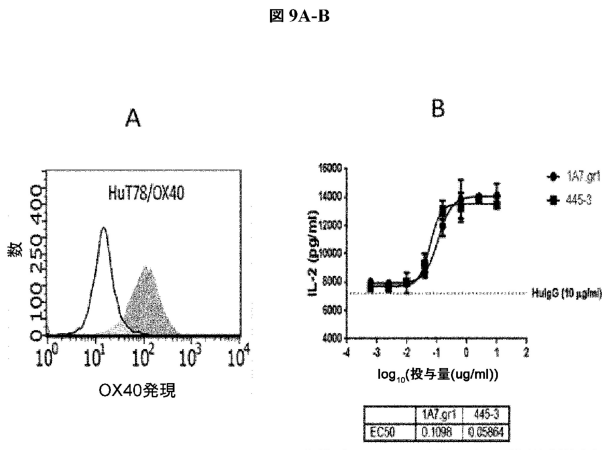
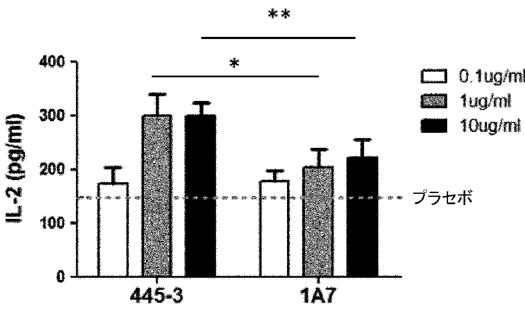


図 10



【 図 1 1 】

【 図 1 2 】

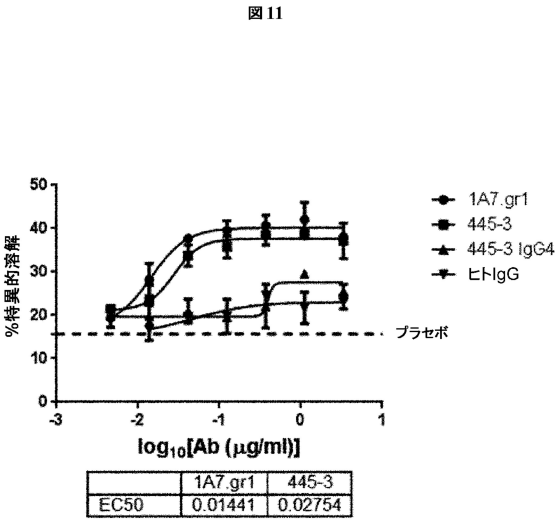
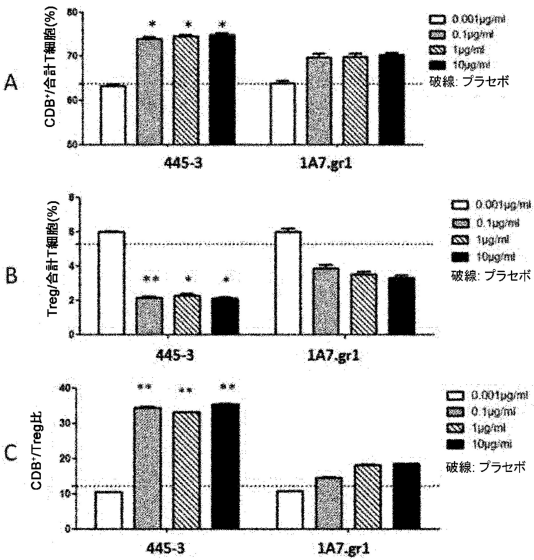


図 12A-12C



10

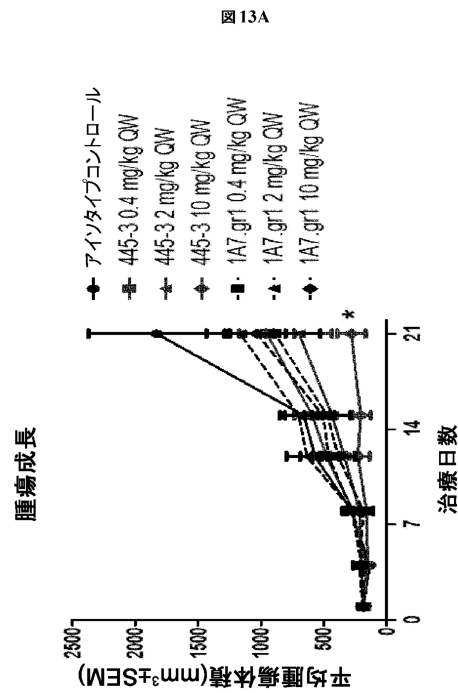
20

30

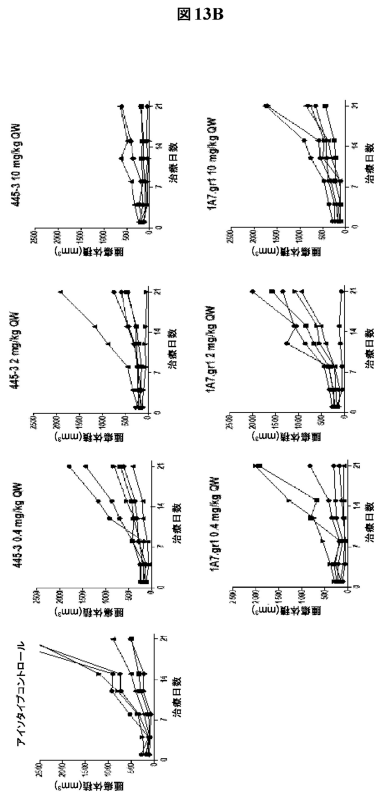
40

50

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 4 A】

図 14A

重鎖	軽鎖	特異性	FACS	Biacore
ID	CDRPR	ID	EC ₅₀ (ng/ml)	IC ₅₀ (nM)
445-VH	-	445-VL	356	1.64E-08
445-VH428T	FR2	445-VL	353	1.53E-08
445-VH	-	445-VL-S24R	307	1.62E-08
445-VH	-	445-VL-S24R-S24R	280	1.49E-08

【図 1 4 B】

図 14B

重鎖	軽鎖	特異性	FACS	Biacore
ID	CDRPR	ID	EC ₅₀ (ng/ml)	IC ₅₀ (nM)
445-VH	-	445-VL	397	2.06E-05
445-VH428T	CDR2	445-VL-S24R	318	1.87E-05
445-VH428T	CDR2	445-VL-S24R	303	1.94E-05
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	660	5.74E-03
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	755	6.23E-04
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	405	2.91E-05
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	462	1.73E-05
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	309	1.57E-05
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	483	1.61E-05
445-VH428T	CDR1	445-VL-S24R	337	2.12E-05

10

20

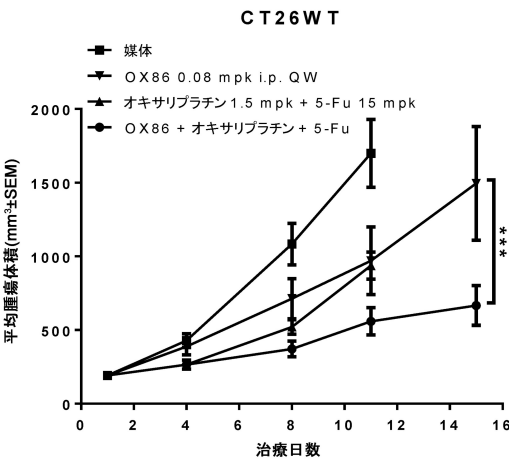
30

40

50

【図 15】

図 15



【配列表】

2023503031000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/129964
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P; C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, WANFANG, BAIDU, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL:SEQ ID Nos: 1-33, OX40, ACT35, CD134, TNFRSF4, antibody +, chemotherapeutic agent, non w competitive, Mu445, platinum, oxaliplatin, carboplatin, cisplatin, tetraplatin, FOLFOX, tumor, cancer, carcinoma.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013038191 A2 (BIOCEROS B. V. et al.) 21 March 2013 (2013-03-21) claims 1, 39 and 43-44, description page3, lines 2-4 and 15-16	1, 4-9
X	WO 2016200836 A1 (GENENTECH, INC. et al.) 15 December 2016 (2016-12-15) claims 1-42	1, 4-9
X	WO 2015153513 A1 (GENENTECH, INC. et al.) 08 October 2015 (2015-10-08) claims 1-74	1, 4-9
X	WO 2016073282 A1 (GENENTECH, INC. et al.) 12 May 2016 (2016-05-12) claims 1-188	1, 4-9
X	WO 2016081384 A1 (GENENTECH, INC. et al.) 26 May 2016 (2016-05-26) claims 1-124	1, 4-9
A	WO 2016057667 A1 (MEDIMMUNE, LLC) 14 April 2016 (2016-04-14) the whole document	1-9
A	US 2017015755 A1 (GENENTECH, INC.) 19 January 2017 (2017-01-19) the whole document	1-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 January 2021		Date of mailing of the international search report 19 February 2021
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer SHEN,Jingjing
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-53961944

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129964

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINCH, S. N. et al. "OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal" <i>FRONTIERS IN ONCOLOGY</i> , Vol. 5, 16 February 2015 (2015-02-16), Article 34, Pages 1-14	1-9
A	CHEN, M. S. et al. "Effect of PLGA nanoparticles conjugated with anti-OX40/anti-AFP mAbs on cytotoxicity of CTL cells against hepatocellular carcinoma" <i>Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology</i> , Vol. 30, No. 4, 31 December 2014 (2014-12-31), Abstract	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129964

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129964

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claims 1-9 relates to a method of treatment of the human by therapy and therefore does not warrant a search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the use of the anti-OX40 antibody or antigen-binding fragment in combination with an additional chemotherapeutic agent of treating a cancer in a subject in need for the manufacturing of a medicament reagent. 10
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013038191	A2	21 March 2013	MD	4612	C1	31 August 2019
				HK	1201852	A1	11 September 2015
				KR	20140069172	A	09 June 2014
				MD	4578	C1	28 February 2019
				JP	2014527814	A	23 October 2014
				EA	031006	B1	31 October 2018
				EC	SP14013259	A	31 May 2014
				CL	2014000631	A1	26 September 2014
				CO	7020859	A2	11 August 2014
				CR	20140146	A	02 July 2014
				PH	12019501115	A1	13 July 2020
				US	2015132288	A1	14 May 2015
				MX	352495	B	28 November 2017
				CL	2016002816	A1	28 April 2017
				MD	20140039	A2	30 September 2014
				AU	2017202564	A1	11 May 2017
				AU	2012308155	A1	03 April 2014
				SG	10201608872V	A	29 December 2016
				NZ	623840	A	29 April 2016
				IN	2535CHN2014	A	07 August 2015
				US	2017051069	A1	23 February 2017
				HK	1249909	A1	16 November 2018
				CA	2848847	A1	21 March 2013
				MD	20170082	A2	28 February 2018
				US	2018273632	A1	27 September 2018
				CN	104080809	A	01 October 2014
				GT	201400051	A	28 January 2016
				MD	4612	B1	31 January 2019
				AU	2012308155	B2	16 March 2017
				CN	104080809	B	17 May 2017
				EA	201490484	A1	30 September 2014
				PE	20141546	A1	13 November 2014
				BR	112014006158	A2	04 April 2017
				MD	4578	B1	31 July 2018
				IL	231540	D0	30 April 2014
				ZA	201401939	B	31 August 2016
				EP	2756001	A2	23 July 2014
				US	9475880	B2	25 October 2016
				NZ	718372	A	28 September 2018
				GB	201116092	D0	02 November 2011
				WO	2013038191	A3	18 July 2013
				UA	115316	C2	25 October 2017
				EA	201890934	A1	28 February 2019
				MX	2014003156	A	22 August 2014
				SG	11201400706S	A	30 October 2014
				EP	3409689	A1	05 December 2018
				CN	107722123	A	23 February 2018
				IL	266608	D0	31 July 2019
				JP	6212493	B2	11 October 2017
WO	2016200836	A1	15 December 2016	CA	2985483	A1	15 December 2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				KR	20180011839	A	02 February 2018
				MX	2017014740	A	15 August 2018
				US	2018346586	A1	06 December 2018
				HK	1252272	A1	24 May 2019
				JP	2018521019	A	02 August 2018
				CN	107810011	A	16 March 2018
				IL	255569	D0	31 January 2018
				AU	2016274585	A1	14 December 2017
				EP	3303399	A1	11 April 2018
				US	2016355597	A1	08 December 2016
				WO	2015153513	A1	08 October 2015
JP	2017514461	A	08 June 2017				
EP	3126394	B1	30 October 2019				
TW	I680985	B	01 January 2020				
AU	2015241037	A1	13 October 2016				
UA	121112	C2	10 April 2020				
PE	20161571	A1	07 February 2017				
SI	3126394	T1	31 January 2020				
SG	11201607969X	A	28 October 2016				
HU	E046767	T2	30 March 2020				
LT	3126394	T	27 January 2020				
DK	3126394	T3	13 January 2020				
WO	2015153513	A8	13 October 2016				
EA	201691974	A1	28 April 2017				
AU	2015241037	A9	03 November 2016				
BR	112016022658	A2	17 October 2017				
AU	2015241037	B2	15 October 2020				
CL	2016002462	A1	23 June 2017				
ES	2763898	T3	01 June 2020				
CA	2943262	A1	08 October 2015				
HR	P20192285	T1	06 March 2020				
RS	59738	B1	28 February 2020				
CN	106103486	A	09 November 2016				
EP	3126394	A1	08 February 2017				
EP	3632934	A1	08 April 2020				
PL	3126394	T3	18 May 2020				
PT	3126394	T	19 December 2019				
MX	2016012781	A	14 December 2016				
CN	106103486	B	21 April 2020				
JP	6637439	B2	29 January 2020				
JP	2020072678	A	14 May 2020				
IL	247898	D0	30 November 2016				
PH	12016501894	A1	09 January 2017				
CR	20160500	A	14 December 2016				
KR	20160145624	A	20 December 2016				
WO	2016073282	A1	12 May 2016	US	2016152720	A1	02 June 2016
				TW	201628650	A	16 August 2016
				SG	11201703376Q	A	30 May 2017
				RU	2017119428	A	06 December 2018
				AU	2015343494	A1	27 April 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				BR	112017008628 A2	30 January 2018
				US	2019194339 A1	27 June 2019
				JP	2017534633 A	24 November 2017
				CA	2963974 A1	12 May 2016
				CN	107073126 A	18 August 2017
				KR	20170072343 A	26 June 2017
				US	2019169304 A1	06 June 2019
				IL	251618 D0	29 June 2017
				RU	2017119428 A3	25 October 2019
				EP	3215536 A1	13 September 2017
				MX	2017005929 A	20 November 2017
				AR	102553 A1	08 March 2017
WO	2016081384	A1	26 May 2016	SG	11201703605Q A	29 June 2017
				US	2017290913 A1	12 October 2017
				EP	3221360 A1	27 September 2017
				CN	106999583 A	01 August 2017
				BR	112017010198 A2	26 December 2017
				US	2016166685 A1	16 June 2016
				SG	10201807625P A	30 October 2018
				MX	2017006320 A	10 August 2017
				AU	2015350242 A1	29 June 2017
				RU	2017121096 A3	17 October 2019
				IL	252251 D0	31 July 2017
				JP	2017537090 A	14 December 2017
				RU	2017121096 A	19 December 2018
				CA	2967368 A1	26 May 2016
				KR	20170096112 A	23 August 2017
WO	2016057667	A1	14 April 2016	US	2018072808 A1	15 March 2018
				CA	2963798 A1	14 April 2016
				BR	112017007170 A2	19 December 2017
				US	2016137740 A1	19 May 2016
				SG	11201702826X A	30 May 2017
				CN	107074953 A	18 August 2017
				CL	2017000885 A1	15 December 2017
				EP	3204422 A4	15 August 2018
				MX	2017004715 A	19 June 2017
				GB	201517855 D0	25 November 2015
				IL	251537 D0	29 May 2017
				EP	3204422 A1	16 August 2017
				US	2019169303 A1	06 June 2019
				KR	20170064550 A	09 June 2017
				RU	2017115662 A	13 November 2018
				US	10150815 B2	11 December 2018
				AU	2015328090 A1	27 April 2017
				TW	201619200 A	01 June 2016
				US	9738723 B2	22 August 2017
				RU	2017115662 A3	20 May 2019
				AR	102239 A1	15 February 2017
				GB	2536324 A	14 September 2016
				RU	2709742 C2	19 December 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				JP	2017532037	A	02 November 2017
US	2017015755	A1	19 January 2017	AU	2015241038	A1	13 October 2016
				EP	3126386	A1	08 February 2017
				IL	248004	D0	30 November 2016
				MX	2016012779	A	27 April 2017
				US	2018230227	A1	16 August 2018
				BR	112016022345	A2	10 October 2017
				KR	20160146747	A	21 December 2016
				JP	2017514795	A	08 June 2017
				CA	2943834	A1	08 October 2015
				RU	2016142476	A	07 May 2018
				US	9975957	B2	22 May 2018
				WO	2015153514	A8	10 November 2016
				CN	106132439	A	16 November 2016
				RU	2016142476	A3	06 December 2018
				US	2019062444	A1	28 February 2019
				SG	11201608106P	A	28 October 2016
				US	10730951	B2	04 August 2020
				US	2015307617	A1	29 October 2015
				JP	6588461	B2	09 October 2019
				WO	2015153514	A1	08 October 2015

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/243 (2019.01)	A 6 1 K 33/243	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
A 6 1 K 31/4375 (2006.01)	A 6 1 K 31/4375	
A 6 1 K 31/7072 (2006.01)	A 6 1 K 31/7072	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士法人坂本国際特許商標事務所

- (72)発明者 ジャン、ベイベイ
 中華人民共和国 ベイジン 1 0 2 2 0 6、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パ
 ーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 3 0
- (72)発明者 リウ、イー
 中華人民共和国 ベイジン 1 0 2 2 0 6、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パ
 ーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 3 0
- (72)発明者 ソン、シャオミン
 中華人民共和国 ベイジン 1 0 2 2 0 6、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パ
 ーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー 3 0

F ターム (参考) 4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
 4C085 AA14 BB01 EE03
 4C086 AA01 AA02 CB09 EA17 HA12 MA02 MA03 MA04 NA05 ZB26
 ZB27 ZC75
 4C206 AA01 AA02 JB16 MA02 MA03 MA04 NA05 ZB26 ZB27 ZC75
 4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74