



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0103105
(43) 공개일자 2022년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7015822
(22) 출원일자(국제) 2020년11월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월11일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/130003
(87) 국제공개번호 WO 2021/098758
국제공개일자 2021년05월27일
(30) 우선권주장
PCT/CN2019/120040 2019년11월21일 중국(CN)

(71) 출원인
베이진 엘티디
케이맨 제도, 케이맨 제도, 그랜드 케이맨 케이와
이1-1108, 카마나 베이, 솔라리스 에비뉴 94, 무
런트 오자네스 코포레이티드 서비스즈 (케이맨)
리미티드 내
(72) 발명자
지양, 베이베이
중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이
언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30
류, 예
중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이
언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30
송, 샤오민
중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이
언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **항-TIM3 항체와 병용하여 항-OX40 항체를 사용한 암 치료 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 인간 OX40(ACT35, CD134 또는 TNFRSF4)에 결합하는 비경쟁적, 작용제 항-OX40 항체 및 그의 항원-결합 단편을 사용하여 암을 치료하거나 면역 반응을 증가, 향상 또는 자극하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암 치료 방법으로서,

유효량의 비경쟁적 항-OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 OX40 항체가 인간 OX40에 특이적으로 결합하고,

(i) (a) 서열번호: 3의 HCDR(중쇄 상보성 결정 영역) 1, (b) 서열번호: 24의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (d) 서열번호: 25의 LCDR(경쇄 상보성 결정 영역) 1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(ii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 18의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(iii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 13의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

(iv) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 4의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 OX40 항체 또는 항원-결합이,

(i) 서열번호: 26을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 28을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

(ii) 서열번호: 20을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 22를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

(iii) 서열번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 16을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 또는

(iv) 서열번호: 9를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 11을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)

을 포함하는, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 32의 HCDR1, 서열번호: 33의 HCDR2, 및 서열번호: 34의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 35의 LCDR1, 서열번호: 36의 LCDR2, 및 서열번호: 37의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 항-TIM3 항체는 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 38의 아

미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 항-OX40 항체 또는 항원 결합 단편이 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인, 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 항-TIM3 항체 또는 항원 결합 단편이 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인, 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 암이 유방암, 결장암, 두경부암, 위암, 신장암, 간암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 난소암, 피부암, 중피종, 림프종, 백혈병, 골수종 또는 육종인, 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 유방암이 전이성 유방암인, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 치료가 치료 중단 후 대상체에서 지속적인 항암 반응을 일으키는, 방법.

청구항 11

면역 반응 또는 기능을 증가, 향상 또는 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 비경쟁적 항-OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 OX40 항체가 인간 OX40에 특이적으로 결합하고,

(i) (a) 서열번호: 3의 HCDR(중쇄 상보성 결정 영역) 1, (b) 서열번호: 24의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (d) 서열번호: 25의 LCDR(경쇄 상보성 결정 영역) 1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(ii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 18의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(iii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 13의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

(iv) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 4의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄

가변 영역

을 항-TIM3 항체와 조합하여 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편이

- (i) 서열번호: 26을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 28을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- (ii) 서열번호: 20을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 22를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- (iii) 서열번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 16을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 또는
- (iv) 서열번호: 9를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 11을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)

을 포함하는, 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 32의 HCDR1, 서열번호: 33의 HCDR2, 및 서열번호:34의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 35의 LCDR1, 서열번호: 36의 LCDR2, 및 서열번호: 37의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 15

청구항 11에 있어서,

상기 항-TIM3 항체는 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호:40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 방법.

청구항 16

청구항 11에 있어서,

상기 항-OX40 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인, 방법.

청구항 17

청구항 11에 있어서,

상기 항-TIM3 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인, 방법.

청구항 18

청구항 11에 있어서,

상기 면역 반응을 자극하는 방법은 T 세포, NK 세포 및 대식세포와 관련된, 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 자극된 면역 반응은 항원 자극에 대한 증가된 반응성을 특징으로 하는, 방법.

청구항 20

청구항 18에 있어서,

상기 T 세포는 증가된 사이토카인 분비, 증식 또는 세포용해 활성을 갖는, 방법.

청구항 21

청구항 18 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포가 CD4+ 및 CD8+ T 세포인, 방법.

청구항 22

청구항 11 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

상기 투여는 치료 중단 후 대상체에서 지속적인 면역 반응을 초래하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 인간 TIM3에 결합하는 항체 또는 항원-결합과 조합하여 인간 OX40에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 암을 치료하는 방법이 본원에 개시되어 있다.

배경 기술

[0002] OX40(ACT35, CD134 또는 TNFRSF4로도 알려짐)은 대략 50 KD I형 막관통 당단백질이며, 종양 피사 인자 수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF)의 구성원이다(Croft, 2010; Gough 및 Weinberg, 2009). 성숙한 인간 OX40은 37개의 AA 세포질 꼬리와 185개의 AA 세포외 영역과 함께 249개의 아미노산(AA) 잔기로 구성된다. OX40의 세포외 도메인은 3개의 완전한 시스테인-풍부 도메인(CRD)과 1개의 불완전한 시스테인-풍부 도메인을 함유한다. OX40의 세포내 도메인에는 TRAF2, TRAF3 및 TRAF5를 포함한 여러 TNFR-관련 인자(TRAF)에 대한 결합을 매개하는 하나의 보존된 신호전달-관련 QEE 모티프가 함유되어 있어, OX40이 세포내 키나제에 연결되도록 한다(Arch 및 Thompson, 1998; Willoughby 등, 2017).

[0003] OX40은 활성화된 랫트 CD4⁺ T 세포에서 처음에 발견되었고, 무린과 인간 상동체는 이후에 T 세포로부터 클로닝되었다(al-Shamkhani 등, 1996; Calderhead 등, 1993). T 헬퍼(Th) 1 세포, Th2 세포, Th17 세포 및 조절 T(Treg) 세포를 포함한, 활성화된 CD4⁺ T 세포에서의 발현 외에도, OX40 발현은 활성화된 CD8⁺ T 세포, 자연 살해(NK) T 세포, 호중구 및 NK 세포의 표면에서도 발견되었다(Croft, 2010). 대조적으로, 낮은 OX40 발현은 나이브 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포뿐만 아니라 대부분의 휴지기 기억 T 세포에서 발견된다(Croft, 2010; Soroosh 등, 2007). 나이브 T 세포에서 OX40의 표면 발현은 일시적이다. TCR 활성화 후 T 세포의 OX40 발현은 24시간 이내에 크게 증가하고, 2~3일에 최고조에 달하여 5~6일 동안 지속된다(Gramaglia 등, 1998).

[0004] OX40에 대한 리간드(OX40L, gp34, CD252 또는 TNFSF4로도 알려짐)는 OX40에 대한 유일한 리간드이다. 다른 TNFSF(종양 피사 인자 슈퍼패밀리) 구성원과 유사하게, OX40L은 23개 AA 세포내 도메인과 133개 AA 세포외 도메인을 함유하는 183개 AA를 함유하는 II형 당단백질이다(Croft, 2010; Gough 및 Weinberg, 2009). OX40L은 자연적으로 세포 표면에 동중 삼량체 복합체를 형성한다. 리간드 삼량체는 리간드 단량체-단량체 경계면에서 대부분 수용체의 CRD1, CRD2 및 부분적 CRD3 영역을 통해 OX40의 3개 사본과 상호작용하지만 CRD4는 관여하지 않는다(Compaan 및 Hymowitz, 2006). OX40L은 활성화된 B 세포(Stuber 등, 1995), 성숙한 기존 수지상 세포(DC)(Ohshima 등, 1997), 형질세포형 DC(pDC)(Ito 등, 2004), 대식세포(Weinberg 등, 1999) 및 랑게르한스(Langerhans) 세포(Sato 등, 2002)를 포함하는 활성화된 항원 제시 세포(APC)에서 주로 발현된다. 또한, OX40L은 NK 세포, 비만 세포, 활성화된 T 세포의 하위집합, 뿐만 아니라 혈관 내피 세포 및 평활근 세포와 같은 다른 세포 유형에서 발현되는 것으로 밝혀졌다(Croft, 2010; Croft 등, 2009).

[0005] 삼량체 OX40L에 의한 결합을 통한 OX40 삼량체화 또는 작용성 항체에 의한 이량체화는 어댑터 분자 TRAF2, TRAF3 및/또는 TRAF5의 세포내 QEE 모티프의 모집 및 도킹에 기여한다(Arch 및 Thompson, 1998; Willoughby 등, 2017). TRAF2 및 TRAF3의 모집 및 도킹은 T 세포의 생존, 분화, 확장, 사이토카인 생산 및 이펙터 기능의 조절에 중요한 역할을 하는 표준 NF-κB1 및 비표준 NF-κB2 경로 모두의 활성화로 이어질 수 있다(Croft, 2010; Gramaglia 등, 1998; Huddlestone 등, 2006; Rogers 등, 2001; Ruby 및 Weinberg, 2009; Song 등,

2005a; Song 등, 2005b; Song 등, 2008).

[0006] 정상 조직에서, OX40 발현은 낮고 주로 림프 기관의 림프구에 존재한다(Durkop 등, 1995). 그러나 면역 세포 상에서의 OX40 발현의 상향조절은 병리학적 상태(Redmond 및 Weinberg, 2007), 예컨대 자가면역 질환(Carboni 등, 2003; Jacquemin 등, 2015; Szypowska 등, 2014) 및 암(Kjaergaard 등, 2000; Vetto 등, 1997; Weinberg 등, 2000)을 갖는 동물 모델과 인간 환자 모두에서 자주 관찰되었다. 특히, OX40의 증가된 발현은 결장직장암 및 피부 흑색종 환자에서 더 긴 생존 기간과 관련이 있으며, 원격 전이 및 더 진행된 종양 특징의 발생과 역의 상관관계가 있다(Ladanyi 등, 2004; Petty 등, 2002; Sarff 등, 2008). 또한 항-OX40 항체 치료가 다양한 마우스 모델에서 항종양 효능을 이끌어낼 수 있는 것으로 나타났으며(Aspesslagh 등, 2016), 이는 면역치료 표적으로서 OX40의 잠재력을 나타낸다. Curti 등이 수행한 암 환자에 대한 첫 번째 임상 시험에서, 항종양 효능의 증거와 종양-특이적 T 세포의 활성화가 작용성 항-OX40 단일클론 항체로 관찰되었으며, 이는 OX40 항체가 항-종양 T-세포 반응을 높이는데 유용하다(Curti 등, 2013).

[0007] 항종양 효능을 매개하는 작용성 항-OX40 항체의 작용 기전은 주로 마우스 종양 모델에서 연구되었다(Weinberg 등, 2000). 최근까지 종양에서 작용성 항-OX40 항체의 작용 기전은 Treg 세포의 분화 및 기능에 대한 억제 효과뿐만 아니라 이펙터 T 세포에서 공동자극 신호전달 경로를 촉발하는 능력에 기인한다(Aspesslagh 등 al., 2016; Ito 등, 2006; St Rose 등, 2013; Voo 등, 2013). 최근 연구에 따르면, 동물 종양 모델과 암 환자 모두에서 종양 침윤 Treg가 이펙터 T 세포(CD4⁺ 및 CD8⁺ 모두) 및 말초 Tregs보다 더 높은 수준의 OX40을 발현하는 것으로 나타났다(Lai 등, 2016; Marabelle 등, 2013b; Montler 등, 2016; Soroosh 등, 2007; Timperi 등, 2016). 따라서, 항-OX40 항체가 항-종양 반응을 유발하는 2차 효과는 항체-의존성 세포독성(ADCC) 및/또는 항체-의존성 세포 포식작용(ADCP)을 통해 종양내 OX40⁺ Treg 세포를 고갈시키는 Fc-매개 이펙터 기능에 의존한다(Aspesslagh 등, 2016; Bulliard 등, 2014; Marabelle 등, 2013a; Marabelle 등, 2013b; Smyth 등, 2014). 이 연구는 Fc-매개 이펙터 기능을 갖는 작용성 항-OX40 항체가 종양 미세환경(TME)에서 종양내 Treg를 우선적으로 고갈시키고 CD8⁺ 이펙터 T 세포 대 Treg의 비율을 개선하여, 항종양 면역 반응을 개선시키고, 종양 퇴행을 증가시키고, 생존을 개선시킬 수 있음을 입증한다(Bulliard 등, 2014; Carboni 등, 2003; Jacquemin 등, 2015; Marabelle 등, 2013b). 이러한 발견에 기초하여, 작용성 활성화 및 Fc-매개 이펙터 기능을 모두 갖는 작용성 항-OX40 항체를 개발해야 하는 충족되지 않은 의학적 요구가 있다.

[0008] 현재까지 임상에서 작용성 항-OX40 항체는 대부분 OX40-OX40L 상호작용을 차단하는 리간드-경쟁 항체(예를 들어, WO2016196228A1)이다. OX40-OX40L 상호작용은 효과적인 항종양 면역력 강화에 필수적이기 때문에, OX40-OX40L의 차단은 이러한 리간드-경쟁 항체의 효능을 제한한다. 따라서, OX40L과 상호작용하는 OX40을 방해하지 않으면서 OX40에 특이적으로 결합하는 OX40 작용제 항체는 암 및 자가면역 장애의 치료에 유용하다.

[0009] 암 및 바이러스 감염에서, TIM3 신호전달의 활성화는 면역 세포 기능장애를 촉진하여 암 증식 또는 연장된 바이러스 감염을 초래한다. 종양-침윤 림프구(TIL), 대식세포 및 종양 세포에서 TIM3 발현의 상향조절은 폐(Zhuang X, 등, Am J Clin Pathol 2012 137: 978-985), 간(Li H, 등, Hepatology 2012 56: 1342-1351), 위(Jiang 등, PLoS One 2013 8: e81799), 신장(Komohara 등, Cancer Immunol Res. 2015 3: 999-1000), 유방(Heon EK, 등, 2015 Biochem Biophys Res Commun. 464: 360-6), 결장(Xu 등, Oncotarget 2015), 멜라닌 세포(Gros A, 등, 2014 J Clin Invest. 2014 124: 2246-2259) 및 자궁경부암(Cao 등, PLoS One 2013 8: e53834)과 같은 많은 유형의 암에서 보고된 바 있다. 이러한 암에서 TIM3의 증가된 발현은 환자 생존 결과의 불량한 예후와 관련이 있다. TIM3 신호전달의 상향 조절은 암뿐만 아니라 만성 바이러스 감염에 대한 면역 내성에 중요한 역할을 한다. HIV 및 HCV 감염 동안 T 세포 상에서의 TIM3의 발현은 건강한 사람에 비해 상당히 높았고 바이러스 부하 및 질환 진행과 양의 상관관계가 있었다(Jones RB, 등, 2008 J Exp Med. 205: 2763-79; Sakhdari A, 등, 2012 PLoS One 7: e40146, Golden-Mason L, 등, 2009 J Virol. 83: 9122-30, 2012 Moorman JP, 등, J Immunol. 189: 755-66). 또한 TIM3 수용체 단독 또는 PD-1/PD-L1 차단과 조합하여 차단하면 시험관 내 및 생체 내 모두에서 기능적으로 "소진된" T 세포를 구제할 수 있다(Dietze KK, 등, 2013 PLoS Pathog 9: e1003798; Golden-Mason L, 등, 2009 J Virol. 83: 9122-30). 따라서, 치료제에 의한 TIM3 신호전달의 조절은 면역 세포, 예를 들어 T 세포, NK 세포 및 대식세포를 내성으로부터 구제하여 종양 또는 만성 바이러스 감염을 근절하기 위한 효율적인 면역 반응을 유도할 수 있다.

발명의 내용

[0010] **개시내용의 개요**

- [0011] 본 개시내용은 작용성 항-OX40 항체와 항원 결합 단편 및 항-TIM3 항체와 항원-결합 단편의 조합 및 암 치료에서 이들 항체의 조합을 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0012] 한 실시형태에서, 본 개시내용은 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합된 작용성 항-OX40 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 개시내용의 OX40 항체는 OX40L과 경쟁하지 않거나, OX40이 그의 리간드 OX40L에 결합하는 것을 방해하지 않는다.
- [0013] 본 개시내용은 이하의 실시형태를 포함한다.
- [0014] 암 치료 방법으로서, 유효량의 비경쟁적 항-OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0015] 상기 방법으로서, OX40 항체가 인간 OX40에 특이적으로 결합하고,
- [0016] (i) (a) 서열번호: 3의 HCDR(중쇄 상보성 결정 영역) 1, (b) 서열번호: 24의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (d) 서열번호: 25의 LCDR(경쇄 상보성 결정 영역) 1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0017] (ii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 18의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0018] (iii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 13의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0019] (iv) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 4의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0020] 을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 포함하는, 방법.
- [0021] 상기 방법으로서, OX40 항체 또는 항원-결합이:
- [0022] (i) 서열번호: 26을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 28을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- [0023] (ii) 서열번호: 20을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 22를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- [0024] (iii) 서열번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 16을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 또는
- [0025] (iv) 서열번호: 9를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 11을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)
- [0026] 을 포함하는 방법.
- [0027] 상기 방법으로서, 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 32의 HCDR1, 서열번호: 33의 HCDR2, 및 서열번호: 34의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 35의 LCDR1, 서열번호: 36의 LCDR2, 및 서열번호: 37의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.
- [0028] 상기 방법으로서, 항-TIM3 항체는 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 방법.
- [0029] 상기 방법으로서, 항-OX40 항체 또는 항원 결합 단편이 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인, 방법.
- [0030] 상기 방법으로서, 항-TIM3 항체 또는 항원-결합 단편이 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인, 방법.
- [0031] 상기 방법으로서, 상기 암이 유방암, 결장암, 두경부암, 위암, 신장암, 간암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 난소암, 피부암, 중피종, 림프종, 백혈병, 골수종 또는 육종인, 방법.
- [0032] 상기 방법으로서, 상기 유방암이 전이성 유방암인, 방법.

- [0033] 상기 방법으로서, 상기 치료는 치료 중단 후 대상체에서 지속적인 항암 반응을 일으키는, 방법.
- [0034] 면역 반응 또는 기능을 증가, 향상 또는 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 비경쟁적 항-OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0035] 상기 방법으로서, 상기 OX40 항체가 인간 OX40에 특이적으로 결합하고,
- [0036] (i) (a) 서열번호: 3의 HCDR(중쇄 상보성 결정 영역) 1, (b) 서열번호: 24의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (d) 서열번호: 25의 LCDR(경쇄 상보성 결정 영역) 1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0037] (ii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 18의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 19의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0038] (iii) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 13의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0039] (iv) (a) 서열번호: 3의 HCDR1, (b) 서열번호: 4의 HCDR2, 및 (c) 서열번호: 5의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (d) 서열번호: 6의 LCDR1, (e) 서열번호: 7의 LCDR2, 및 (f) 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0040] 을 항-TIM3 항체와 조합하여 포함하는, 방법.
- [0041] 상기 방법으로서, 상기 OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편이
- [0042] (i) 서열번호: 26을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 28을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- [0043] (ii) 서열번호: 20을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 22를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- [0044] (iii) 서열번호: 14를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 16을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL); 또는
- [0045] (iv) 서열번호: 9를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열번호: 11을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)
- [0046] 을 포함하는, 방법.
- [0047] 상기 방법으로서, 상기 항-TIM3 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 32의 HCDR1, 서열번호: 33의 HCDR2, 및 서열번호: 34의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 35의 LCDR1, 서열번호: 36의 LCDR2, 및 서열번호: 37의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.
- [0048] 상기 방법으로서, 상기 항-TIM3 항체는 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고, 서열번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 방법.
- [0049] 상기 방법으로서, 상기 항-OX40 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인, 방법.
- [0050] 상기 방법으로서, 상기 항-TIM3 항체 또는 항원-결합 단편은 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인, 방법.
- [0051] 상기 방법으로서, 상기 면역 반응을 자극하는 방법은 T 세포, NK 세포 및 대식세포와 관련된, 방법.
- [0052] 상기 방법으로서, 상기 자극된 면역 반응은 항원 자극에 대한 증가된 반응성을 특징으로 하는, 방법.
- [0053] 상기 방법으로서, 상기 T 세포는 증가된 사이토카인 분비, 증식 또는 세포용해 활성을 갖는, 방법.
- [0054] 상기 방법으로서, 상기 T 세포가 CD4+ 및 CD8+ T 세포인, 방법.
- [0055] 상기 방법으로서, 상기 투여는 치료 중단 후 대상체에서 지속적인 면역 반응을 초래하는, 방법.
- [0056] 한 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6, 서열

번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 13, 서열번호: 18, 서열번호: 19, 서열번호: 24 및 서열번호: 25로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

- [0057] 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 (a) 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 13, 서열번호: 18, 서열번호: 24 및 서열번호: 5로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열번호: 6, 서열번호: 25, 서열번호: 7, 서열번호: 19 및 서열번호: 8로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0058] 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 (a) 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1; 서열번호: 4, 서열번호: 13, 서열번호: 18, 또는 서열번호: 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2; 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3인, 3개의 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열번호: 6 또는 서열번호: 25의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1; 서열번호: 7 또는 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2; 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3인, 3개의 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0059] 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 또는 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 또는 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3; 또는 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3인 3개의 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3; 또는 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3; 또는 서열번호: 25의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3인 3개의 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0060] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0061] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0062] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0063] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열번호: 24의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 및 서열번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 25의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0064] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 (a) 서열번호: 9, 서열번호: 14, 서열번호: 20 또는 서열번호: 26의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 9, 서열번호: 14, 서열번호: 20 또는 서열번호: 26 중 어느 하나와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열번호: 11, 서열번호: 16, 서열번호: 22 또는 서열번호: 28의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 11, 서열번호: 16, 서열번호: 22 또는 서열번호: 28 중 어느 하나와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0065] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 (a) 서열번호: 9, 서열번호: 14, 서열

번호: 20 또는 서열번호: 26의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 9, 서열번호: 14, 서열번호: 20 또는 서열번호: 26의 아미노산 서열에서 1, 2, 또는 3개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열번호: 11, 서열번호: 16, 서열번호: 22 또는 서열번호: 28의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 11, 서열번호: 16, 서열번호: 22 또는 서열번호: 28의 아미노산에서 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

- [0066] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0067] (a) 서열번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0068] (b) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 16의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0069] (c) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호: 22의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0070] (d) 서열번호: 26의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 28의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역.
- [0071] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 야생형 인간 IgG1(인간 IgG1wt 또는 huIgG1로도 지칭됨) 또는 IgG2의 Fc 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 (EU 넘버링 시스템에 따라) S228P 및/또는 R409K 치환을 갖는 인간 IgG4의 Fc 도메인을 포함한다.
- [0072] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 1×10^{-6} M 내지 1×10^{-10} M의 결합 친화도(K_D)로 OX40에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 약 1×10^{-6} M, 약 1×10^{-7} M, 약 1×10^{-8} M, 약 1×10^{-9} M 또는 약 1×10^{-10} M의 결합 친화도(K_D)로 OX40에 결합한다.
- [0073] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-인간 OX40 항체는 시노몰구스 OX40에 대한 중간 결합 활성을 나타낸다.
- [0074] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항-OX40 항체는 OX40-OX40L 상호작용 계면 외부의 인간 OX40의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항-OX40 항체는 OX40에 결합하는 OX40 리간드와 경쟁하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 항-OX40 항체는 OX40과 그의 리간드 OX40L 사이의 상호작용을 차단하지 않는다.
- [0075] 본 개시내용의 항체는 작용성이며 면역 반응을 상당히 향상시킨다. 본 발명은 항-OX40 항체의 작용성 능력을 시험하는 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 1차 T 세포를 유의하게 자극하여 혼합 림프구 반응(MLR) 검정에서 IL-2를 생성하도록 할 수 있다.
- [0076] 한 실시형태에서, 본 개시내용의 항체는 강한 Fc-매개 이펙터 기능을 갖는다. 항체는 NK 세포에 의해 조절 T 세포(Treg 세포)와 같은 OX40^{hi} 표적 세포에 대한 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 매개한다. 한 양태에서, 본 개시내용은 상이한 OX40 발현 수준에 기초하여 특정 T-세포 서브세트의 항-OX40 항체-매개 시험관내 고갈을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0077] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 OX40-OX40L 상호작용을 차단하지 않는다. 또한, OX40 항체는 동물 모델에서 나타난 바와 같이 생체 내에서 용량-의존적 항종양 활성을 나타낸다. 용량-의존적 활성은 OX40-OX40L 상호작용을 차단하는 항-OX40 항체의 활성 프로파일과 구별된다.
- [0078] 본 개시내용은 항체 또는 항원-결합 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 한 실시형태에서, 단리된 핵산은 서열번호: 10, 서열번호: 15, 서열번호: 21, 또는 서열번호: 27의 VH 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호: 10, 서열번호: 15, 서열번호: 21, 또는 서열번호: 27에 대한 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편의 VH 영역을 코딩한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단리된 핵산은 서열번호: 12, 서열번호: 17, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 29의 VL 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호: 12, 서열번호: 17, 서열번호:

23, 또는 서열번호: 29에 대한 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편의 VL 영역을 코딩한다.

[0079] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0080] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 OX40 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 OX40 항체 약제학적 조성물을 치료적 유효량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편에 의해 치료될 질환은 암 또는 자가면역 질환이다.

[0081] 본 개시내용은 암 또는 자가면역 질환과 같은 질환을 치료하기 위한 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 OX40 항체 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0082] **도 1**은 OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 및 OX40-His 작제물의 개략도이다. OX40 ECD: OX40 세포의 도메인. N: N-말단. C: C-말단.

도 2는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의한 정제된 키메라(ch445) 및 인간화(445-1, 445-2, 445-3 및 445-3 IgG4) 항-OX40 항체의 친화도 측정을 보여준다.

도 3은 유세포 분석에 의한 OX40 결합의 결정을 입증한다. OX40-양성 HuT78/OX40 세포는 다양한 항-OX40 항체(항체 ch445, 445-1, 445-2, 445-3 및 445-3 IgG4)와 함께 인큐베이션되고 FACS 분석되었다. 결과는 평균 형광강도(MFI, Y-축)로 표시된다.

도 4는 유세포 분석에 의한 OX40 항체의 결합을 보여준다. HuT78/OX40 및 HuT78/cynoOX40 세포는 항체 445-3으로 염색되고 평균 형광 강도(MFI, Y-축으로 표시)가 유세포 분석에 의해 결정되었다.

도 5는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의한 OX40 야생형 및 점 돌연변이에 대한 445-3 Fab의 친화도 결정을 도시한다.

도 6은 OX40에 대한 항체 445-3과 이의 에피토프 사이의 상세한 상호작용을 보여준다. 항체 445-3과 OX40은 각각 옅은 회색과 검정색으로 표시된다. 수소 결합 또는 염 브릿지, 파이-파이 스택킹 및 반 데르 발스(VDW) 상호작용은 각각 점선, 이중 점선 및 실선으로 표시된다.

도 7은 항체 445-3이 OX40L 결합을 방해하지 않는다는 것을 입증한다. HEK293/OX40L 세포를 염색하기 전에, OX40-마우스 IgG2a(OX40-mIgG2a) 융합 단백질을 인간 IgG(+HuIgG), 항체 445-3(+445-3) 또는 항체 1A7.gr1(+1A7. gr1, US 2015/0307617 참조), 1:1의 몰비로. OX40-mIgG2a/항-OX40 항체 복합체에 대한 OX40L의 결합은 HEK293/OX40L 세포 및 OX40-mIgG2a/항-OX40 항체 복합체의 공동 인큐베이션 후 항-마우스 IgG 2차 Ab와의 반응 및 유세포 분석에 의해 결정되었다. 결과는 중복의 평균±SD로 표시되었다. 통계적 유의도: *: P<0.05; **: P<0.01.

도 8은 보고된 OX40/OX40L 복합체(PDB 코드: 2HEV)를 갖는 OX40/445-3 Fab의 구조적 정렬을 보여준다. OX40L은 흰색, 445-3 Fab는 회색, OX40은 검은색으로 표시된다.

도 9a-9b는 항-OX40 항체 445-3이 TCR 자극과 함께 IL-2 생산을 유도함을 보여준다. OX40-양성 HuT78/OX40 세포(도 9a)를 항-OX40 항체의 존재 하에 밤새 인공 항원-제시 세포(APC) 라인(HEK293/OS8^{Low}-FcγRI)과 공동 배양하고 IL-2 생산을 다음과 같이 사용하였다. T 세포 자극에 대한 판독(도 9b). 배양 상청액에서 IL-2를 ELISA로 검출하였다. 결과는 삼중의 평균±SD로 표시된다.

도 10은 항-OX40 항체가 MLR 반응을 향상시킨다는 것을 나타낸다. 시험관내 분화된 수지상 세포(DC)를 2일 동안 항-OX40 항체(0.1-10μg/ml)의 존재 하에 동종이계 CD4+ T 세포와 공동-배양하였다. 상층액의 IL-2는 ELISA에 의해 검출되었다. 모든 테스트는 4회 수행되었으며 결과는 평균±SD로 표시되었다. 통계적 유의도: *: P<0.05; **: P<0.01.

도 11은 항-OX40 항체 445-3이 ADCC를 유도함을 입증한다. ADCC 검정은 항-OX40 항체(0.004~3 μg/ml) 또는 대조군의 존재 하에 이펙터 세포로서 NK92MI/CD16V 세포 및 표적 세포로서 HuT78/OX40 세포를 사용하여 수행하였다. 동일한 수의 이펙터 세포와 표적 세포를 5시간 동안 공동 배양한 후, 젓산 탈수소효소(LDH) 방출을 검출하

였다. 세포독성의 백분율(Y-축)은 실시예 12에 기술된 바와 같이 제조사의 프로토콜에 기초하여 계산되었다. 결과는 삼중 반복의 평균±SD로 표시된다.

도 12a~12c는 NK 세포와 조합된 항-OX40 항체 445-3이 시험관내에서 활성화된 PBMC에서 Treg에 대한 CD8⁺ 이펙터 T 세포의 비율을 증가시킨다는 것을 보여준다. 인간 PBMC는 PHA-L(1 μg/ml)에 의해 사전 활성화된 다음 항-OX40 항체 또는 대조군의 존재 하에 NK92MI/CD16V 세포와 공동 배양되었다. 상이한 T-세포 서브세트의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정되었다. Treg에 대한 CD8⁺ 이펙터 T 세포의 비율이 추가로 계산되었다. 도 12a는 CD8+/총 T 세포의 비율을 보여준다. 도 12b는 Treg/총 T 세포 비율이다. 도 12c는 CD8+/Treg 비율을 보여준다. 데이터는 증복의 평균±SD로 표시된다. 표시된 농도에서 445-3과 1A7.gr1 사이의 통계적 유의도가 표시된다. *: P<0.05; **: P<0.01.

도 13a~13b는 1A7.gr1이 아닌 항-OX40 항체 445-3이 OX40-인간화 마우스에서 MC38 결장직장암 동계 모델에서 용량-의존적 항종양 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. MC38 무린 결장암 세포(2×10⁷)를 암컷 인간 OX40 형질 전환 마우스에 피하 이식하였다. 종양 부피에 따른 무작위화 후, 동물에게 항-OX40 항체 또는 이소형 대조군이 지시된 대로 3회 동안 주 1회 복강내 주사되었다. 도 13a는 445-3 항체의 용량 증가와 1A7.gr1 항체의 용량 증가 및 종양 성장의 감소를 비교한다. 도 13b는 특정 용량으로 처리된 모든 마우스에 대한 데이터를 제시한다. 데이터는 그룹당 6마리 마우스의 평균 종양 부피±평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다. 통계적 유의도: *: P<0.05 대 이소형 대조군.

도 14a~14b는 OX40 항체에서 제조된 아미노산 변경의 표이다.

도 15는 전이성 유방암의 마우스 모델에서 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체의 효능을 보여준다.

도 16은 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체가 신장암의 마우스 모델에서 효과적임을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 정의

[0084] 이 문서의 다른 곳에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 다른 기술 및 과학 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다.

[0085] 첨부된 청구범위를 포함하여 본원에 사용된 바와 같이, "a", "an" 및 "the"와 같은 단어의 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 대응하는 복수 참조를 포함한다.

[0086] 용어 "또는"은 문맥에서 달리 명백하게 지시하지 않는 한 용어 "및/또는"을 의미하는 데 사용되며, 그와 상호교환적으로 사용된다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "항암제"는 세포독성제, 화학치료제, 방사선요법 및 방사선치료제, 표적화된 항암제 및 면역치료제를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 암과 같은 세포 증식성 장애를 치료하는 데 사용될 수 있는 임의의 제제를 지칭한다.

[0088] 용어 "OX40"은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원인 대략 50 KD I형 막관통 당단백질을 지칭한다. OX40은 ACT35, CD134 또는 TNFRSF4로도 알려져 있다. 인간 OX40의 아미노산 서열(서열번호: 1)은 또한 수탁 번호 NP_003318에서 찾을 수 있으며, OX40 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 수탁 번호: X75962.1이다. 용어 "OX40 리간드" 또는 "OX40L"은 OX40의 단독 리간드를 나타내며, gp34, CD252 또는 TNFSF4와 상호교환 가능하다.

[0089] 본원에서 용어 "투여", "투여하는", "치료하는" 및 "치료"는 동물, 인간, 실험 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용될 때, 동물, 인간, 대상체, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 대한 외인성 약제, 치료제, 진단제 또는 조성물의 접촉을 의미한다. 세포의 치료는 세포에 대한 시약의 접촉뿐만 아니라 유체가 세포와 접촉하는, 유체에 대한 시약의 접촉을 포함한다. 용어 "투여" 및 "치료"는 또한 시약, 진단, 결합 화합물에 의한, 또는 또 다른 세포에 의한 세포의 시험관내 및 생체의 치료를 의미한다. 본원에서 용어 "대상체"는 임의의 유기체, 바람직하게는 동물, 보다 바람직하게는 포유동물(예를 들어, 래트, 마우스, 개, 고양이, 토끼) 및 가장 바람직하게는 인간을 포함한다. 임의의 질환 또는 장애를 치료하는 것은 한 양태에서 질환 또는 장애를 개선하는 것(즉, 질환 또는 그의 임상 증상 중 적어도 하나의 발달을 늦추거나 저지하거나 감소시키는 것)을 지칭

한다. 또 다른 양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 환자가 식별할 수 없는 것을 포함하는 적어도 하나의 물리적 매개변수를 경감 또는 개선하는 것을 지칭한다. 또 다른 양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애를 물리적으로(예를 들어, 식별 가능한 증상의 안정화), 생리학적으로(예를 들어, 물리적 매개변수의 안정화), 또는 둘다 조절하는 것을 지칭한다. 또 다른 양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애의 발병 또는 발달 또는 진행을 예방하거나 지연시키는 것을 지칭한다.

[0090] 본 개시내용의 맥락에서 용어 "대상체"는 포유동물, 예를 들어, 영장류, 바람직하게는 고등 영장류, 예를 들어, 인간(예를 들어, 본원에 기재된 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 환자)이다.

[0091] 본원에 사용된 용어 "친화도"는 항체와 항원 사이의 상호작용의 강도를 지칭한다. 항원 내에서, 항체 "아암"의 가변 영역은 수많은 부위에서 항원과 비공유력을 통해 상호작용하며, 상호작용이 많을수록 친화도는 강해진다.

[0092] 본원에 사용된 용어 "항체"는 상응하는 항원에 비공유적으로, 가역적으로, 그리고 특정 방식으로 결합할 수 있는 면역글로불린 패밀리 폴리펩타이드를 지칭한다. 예를 들어, 천연 발생 IgG 항체는 이황화 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 사량체이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 더 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카르복실-말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 비롯한 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0093] 용어 "항체"는 단일클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 항체는 임의의 이소형/부류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 또는 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)일 수 있다.

[0094] 일부 실시형태에서, 항-OX40 항체는 적어도 하나의 항원-결합 부위, 또는 적어도 하나의 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-OX40 항체는 본원에 기재된 OX40 항체로부터의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-OX40 항체는 단리되거나 재조합된다.

[0095] 본원에서 용어 "단일클론 항체" 또는 "mAb" 또는 "Mab"는 실질적으로 균질한 항체의 집단을 의미하며, 즉 집단에 포함된 항체 분자는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 아미노산 서열이 동일하다. 대조적으로, 종래의(다클론) 항체 제제는 전형적으로 가변 도메인, 특히 종종 상이한 에피토프에 특이적인 상보성 결정 영역(CDR)에 상이한 아미노산 서열을 갖는 다수의 상이한 항체를 포함한다. 수식어 "단일클론"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 취득되는 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 단일클론 항체(mAb)는 당업자에게 공지된 방법에 의해 취득될 수 있다. 예를 들어, Kohler 등, Nature 1975 256:495-497; 미국 특허 제4,376,110호; Ausubel 등, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992; Harlow 등, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; 및 Colligan 등, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993을 참조한다. 본원에 개시된 항체는 IgG, IgM, IgD, IgE, IgA, 및 이들의 임의의 하위부류, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4를 포함하는 임의의 면역글로불린 부류일 수 있다. 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마는 시험관내 또는 생체내에서 배양될 수 있다. 개별 하이브리도마로부터의 세포가 고유하게-프라이밍된 Balb/c 마우스와 같은 마우스에 복강내 주사되어, 원하는 항체의 고농도를 함유하는 복수액을 생성하는, 생체내 생산에서 높은 역가의 단일클론 항체가 취득될 수 있다. 이소형 IgM 또는 IgG의 단일클론 항체는 당업자에게 잘 알려진 컬럼 크로마토그래피 방법을 사용하여 이러한 복수액으로부터, 또는 배양 상청액으로부터 정제될 수 있다.

[0096] 일반적으로 기본 항체 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄 쌍을 포함하며, 각 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50~70 kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 중쇄의 카르복시-말단 부분은 주로 이펙터 기능을 담당하는 불변 영역을 정의할 수 있다. 전형적으로, 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 또한, 인간 중쇄는 전형적으로 α , δ , ϵ , γ 또는 μ 로 분류되며, 항체의 이소형을 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다.

- [0097] 각 경쇄/중쇄(VL/VH) 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 일반적으로 온전한 항체에는 2개의 결합 부위가 있다. 이관능 또는 이중특이성 항체를 제외하고, 두 결합 부위는 일반적으로 동일하다.
- [0098] 전형적으로, 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인은 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR) 사이에 위치하는 "상보성 결정 영역(CDR)"이라고도 하는 3개의 추가변 영역을 포함한다. CDR은 일반적으로 프레임워크 영역에 의해 정렬되어, 특정 에피토프에 결합할 수 있게 된다. 일반적으로, N-말단에서 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 모두 FR-1(또는 FR1), CDR-1(또는 CDR1), FR-2(FR2), CDR-2(CDR2), FR-3(또는 FR3), CDR-3(CDR3), 및 FR-4(또는 FR4)를 포함한다. CDR 및 프레임워크 영역의 위치는 당업계에 널리 알려진 다양한 정의, 예를 들어 Kabat, Chothia 및 AbM을 사용하여 결정될 수 있다(예를 들어, Johnson 등, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia 및 Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia 등, *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia 등, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani 등, *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997) 참조). 항원 결합 부위의 정의는 또한 하기에 기재되어 있다: Ruiz 등, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); 및 Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum 등, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); 및 Martin 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin 등, *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); 및 Rees 등, In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996). 조합된 Kabat 및 Chothia 넘버링 방식에서, 일부 실시형태에서, CDR은 Kabat CDR, Chothia CDR, 또는 둘 모두의 일부인 아미노산 잔기에 상응한다. 예를 들어, CDR은 VH, 예를 들어 포유동물 VH, 예를 들어 인간 VH에서 아미노산 잔기 26-35(HC CDR1), 50-65(HC CDR2), 및 95-102(HC CDR3); 및 VL, 예를 들어 포유동물 VL, 예를 들어 인간 VL에서 아미노산 잔기 24-34(LC CDR1), 50-56(LC CDR2), 및 89-97(LC CDR3)에 상응한다.
- [0099] 용어 "추가변 영역"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 추가변 영역은 "CDR"(즉, 경쇄 가변 영역의 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 및 중쇄 가변 영역의 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3)로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. Kabat 등 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(항체의 CDR 영역을 서열로 정의)를 참조하며; 또한, Chothia 및 Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917(항체의 CDR 영역을 구조로 정의)을 참조한다. 용어 "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 CDR 잔기로서 본원에 정의된 추가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 의미한다.
- [0100] 달리 지시되지 않는 한, "항원-결합 단편"은 항체의 항원-결합 단편, 즉 전장 항체, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 영역을 보유하는 단편에 의해 결합된 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편을 의미한다. 항원-결합 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자, 예를 들어, 단일 사슬 Fv(ScFv); 나노바디 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0101] 항체는 표적 단백질에 "특이적으로 결합"하는데, 이는 항체가 다른 단백질과 비교하여 그 표적에 대한 우선적인 결합을 나타내지만, 이러한 특이성은 절대적인 결합 특이성을 요구하지 않는다는 것을 의미한다. 항체의 결합이 샘플에서 표적 단백질의 존재를 결정하는 경우, 예를 들어 가양성과 같은 원하지 않는 결과를 생성하지 않으면서, 항체는 의도된 표적에 대해 "특이적"인 것으로 간주된다. 본 개시내용에서 유용한 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 비표적 단백질과의 친화도보다 적어도 2배 큰, 바람직하게는 적어도 10배 큰, 보다 바람직하게는 적어도 20배 큰, 및 가장 바람직하게는 적어도 100배 큰 친화도로 표적 단백질에 결합할 것이다. 본원에서 항체는 그 서열을 포함하는 폴리펩타이드에 결합하지만 그 서열이 결합된 단백질에는 결합하지 않는 경우, 주어진 아미노산 서열, 예를 들어 인간 OX40 분자의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다.
- [0102] 본원에서 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 단백질 서열만을 포함하는 항체를 의미한다. 인간 항체는 마우스, 마우스 세포 또는 마우스 세포에서 유래한 하이브리도마에서 생산되는 경우 무린 탄수화물 사슬을 함유할 수 있다. 유사하게, "마우스 항체" 또는 "랫트 항체"는 각각 마우스 또는 랫트 면역글로불린 단백질 서열만을 포함하는 항체를 의미한다.
- [0103] 용어 "인간화 항체"는 인간 항체뿐만 아니라 비인간(예를 들어, 무린) 항체로부터의 서열을 함유하는 항체의 형태를 의미한다. 이러한 항체는 비인간 면역글로불린에서 유래한 최소 서열을 함유한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 루프에 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 루프에 상응한다. 인간화 항체는 또한 선택적으로 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도

일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 인간화 항체를 모 설치류 항체와 구별하기 위해 필요한 경우 접두사 "hum", "hu", "Hu" 또는 "h"가 항체 클론 칭호에 추가된다. 설치류 항체의 인간화 형태는 일반적으로 모 설치류 항체의 동일한 CDR 서열을 포함할 것이지만, 특정 아미노산 치환이 친화도를 증가시키기 위해, 인간화 항체의 안정성을 증가시키기 위해, 번역후 변형을 제거하기 위해 또는 다른 이유로 포함될 수 있다.

[0104] 본원에 사용된 용어 "비경쟁적"은 항체가 수용체에 결합할 수 있고 리간드가 수용체에 결합하는 것을 방해하지 않는다는 것을 의미한다.

[0105] 용어 "상응하는 인간 생식계열 서열"은 인간 생식계열 면역글로불린 가변 영역 서열에 의해 코딩되는 모든 다른 공지된 가변 영역 아미노산 서열과 비교하여 기준 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열과 가장 높은 결정된 아미노산 서열 동일성을 공유하는 인간 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열을 코딩하는 핵산 서열을 지칭한다. 상응하는 인간 생식계열 서열은 또한 모든 다른 평가된 가변 영역 아미노산 서열과 비교하여 기준 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열과 가장 높은 아미노산 서열 동일성을 갖는 인간 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열을 지칭할 수 있다. 상응하는 인간 생식계열 서열은 프레임워크 영역 단독, 상보성 결정 영역 단독, 프레임워크 및 상보성 결정 영역, 가변 세그먼트(상기 정의된 바와 같음), 또는 가변 영역을 포함하는 서열 또는 하위서열의 다른 조합일 수 있다. 서열 동일성은 본원에 기재된 방법을 사용하여, 예를 들어 BLAST, ALIGN, 또는 당업계에 알려진 다른 정렬 알고리즘을 사용하여 2개의 서열을 정렬함으로써 결정될 수 있다. 상응하는 인간 생식계열 핵산 또는 아미노산 서열은 참조 가변 영역 핵산 또는 아미노산 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0106] 용어 "평형 해리 상수(K_D , M)"는 해리 속도 상수(k_d , time^{-1})를 결합 속도 상수(k_a , time^{-1} , M^{-1})로 나눈 것을 의미한다. 평형 해리 상수는 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 본 개시내용의 항체는 일반적으로 약 10^{-7} 또는 10^{-8} M 미만, 예를 들어 약 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만, 일부 양태에서 약 10^{-11} M, 10^{-12} M 또는 10^{-13} M 미만의 평형 해리 상수를 가질 것이다.

[0107] 본원에서 용어 "암" 또는 "종양"은 당업계에서 이해되는 바와 같이 가장 넓은 의미를 가지며, 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭한다. 본 개시내용의 맥락에서, 암은 특정 유형 또는 위치에 제한되지 않는다.

[0108] 용어 "병용 요법"은 본 개시내용에 기재된 치료적 상태 또는 장애를 치료하기 위한 2개 이상의 치료제의 투여를 지칭한다. 이러한 투여는 실질적으로 동시적인 방식으로 이들 치료제의 동시-투여를 포함한다. 이러한 투여는 또한 각각의 활성 성분에 대해 다중 또는 개별 용기(예를 들어, 캡슐, 분말 및 액체)에서의 동시-투여를 포함한다. 분말 및/또는 액체는 재구성되거나 투여 전에 원하는 용량으로 희석될 수 있다. 추가로, 이러한 투여는 또한 대략 동일한 시간 또는 상이한 시간에 순차적 방식으로 각 유형의 치료제를 사용하는 단계를 포함한다. 어느 경우든, 치료 요법은 본원에 기술된 상태 또는 장애를 치료하는데 있어서 약물 조합의 유익한 효과를 제공할 것이다.

[0109] 본 개시내용의 맥락에서, 아미노산 서열이 언급될 때, 용어 "보존적 치환"은 항체 또는 단편의 화학적, 물리적 및/또는 기능적 특성, 예를 들어 OX40에 대한 결합 친화도를 실질적으로 변경하지 않는 새로운 아미노산에 의한 원래 아미노산의 치환을 의미한다. 구체적으로, 아미노산의 일반적인 보존적 치환은 하기 표에 나타나 있으며, 당업계에 잘 알려져 있다.

[0110] 예시적인 보존적 아미노산 치환

원래의 아미노산 잔기	1 문자 및 3 문자 코드	보존적 치환
알라닌	A 또는 Ala	Gly; Ser
아르기닌	R 또는 Arg	Lys; His
아스파라긴	N 또는 Asn	Gln; His
아스파르트산	D 또는 Asp	Gln; Asn
시스테인	C 또는 Cys	Ser; Ala
글루타민	Q 또는 Gln	Asn
글루탐산	E 또는 Glu	Asp; Gln
글리신	G 또는 Gly	Ala
히스티딘	H 또는 His	Asn; Gln
이소류신	I 또는 Ile	Leu; Val
류신	L 또는 Leu	Ile; val
리신	K 또는 Lys	Arg; His
메티오닌	M 또는 Met	Leu; Ile; Tyr
페닐알라닌	F 또는 Phe	Tyr; Met; Leu
프롤린	P 또는 Pro	Ala
세린	S 또는 Ser	Thr
트레오닌	T 또는 Thr	Ser
트립토판	W 또는 Trp	Tyr; Phe
티로신	Y 또는 Tyr	Trp; Phe
발린	V 또는 Val	Ile; Leu

[0111]

[0112]

퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 Altschul 등, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; 및 Altschul 등, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990에 각각 기재되어 있는 BLAST 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터를 통해 공개적으로 입수가 가능하다. 이 알고리즘은 먼저 쿼리 서열에서 길이 W의 짧은 단어를 식별하여 고득점 서열 쌍(HSP)을 식별하는 단계를 포함하며, 이는 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양의 임계값 스코어 T와 일치하거나 충족한다. T는 이웃 단어 스코어 임계값이라고 한다. 이러한 초기 이웃 단어 히트는 검색을 시작하여 이를 포함하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 값으로 작동한다. 누적 정렬 스코어가 증가할 수 있는 한 단어 히트는 각 서열을 따라 양방향으로 확장된다. 누적 스코어는 뉴클레오타이드 서열의 경우 매개변수 M(일치하는 잔기 쌍에 대한 보상 스코어, 항상 0 초과) 및 N(일치하지 않는 잔기에 대한 벌점 스코어, 항상 0 미만)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 스코어링 매트릭스를 사용하여 누적 스코어를 계산한다. 누적 정렬 스코어가 최대 달성 값에서 수량 X만큼 떨어지는 경우; 하나 이상의 음의-스코어링 잔기 정렬의 누적으로 인해 누적 스코어가 0 이하가 되는 경우; 또는 서열의 끝에 도달하는 경우 각 방향의 단어 히트 확장이 중단된다. BLAST 알고리즘 매개변수 W, T 및 X는 정렬의 민감도와 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열용)은 디폴트로 단어 길이 (W) 11, 기대값(E) 또는 10, M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLAST 프로그램은 디폴트로 단어 길이 3, 기대값(E) 10, BLOSUM62 스코어링 매트릭스(Henikoff 및 Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915) 정렬(B) 50, 기대값(E) 10, M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다.

[0113]

BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 사이의 유사도에 대한 통계적 분석을 수행한다(예를 들어, Karlin 및 Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사도의 한 척도는 최소합 확률(P(N))이며, 이는 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 일치나 우연히 발생할 확률의 표시를 제공한다. 예를 들어, 시험 핵산과 기준 핵산의 비교에서 최소합 확률이 약 0.2 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우 핵산은 기준 서열과 유사한 것으로 간주된다.

- [0114] 2개의 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 E. Meyers 및 W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17, (1988)의 알고리즘을 사용하여 측정될 수도 있으며, 이는 PAM120 가중치 잔여 테이블, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합되었다. 또한, 2개의 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 Needleman 및 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, (1970) 알고리즘을 사용하여 측정될 수 있으며, 이는 BLOSUM62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 통합되었다.
- [0115] 용어 "핵산"은 본원에서 용어 "폴리뉴클레오타이드"와 상호교환적으로 사용되며, 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 중합체를 지칭한다. 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 기준 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 합성, 자연 발생 및 비천연 발생인 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 연결을 함유하는 핵산을 포함한다. 이러한 유사체의 예는 제한 없이 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 펩타이드-핵산(PNA)을 포함한다.
- [0116] 핵산과 관련하여 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA) 세그먼트 사이의 기능적 관계를 지칭한다. 전형적으로 전사 조절 서열과 전사된 서열의 기능적 관계를 나타낸다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 서열은 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 전사된 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 전사 조절 서열은 전사된 서열에 물리적으로 인접하며, 즉, 시스-작용성이다. 그러나, 인핸서와 같은 일부 전사 조절 서열은 물리적으로 인접할 필요가 없거나 그들이 전사를 향상시키는 코딩 서열에 매우 근접하게 위치할 필요가 없다.
- [0117] 일부 양태에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제형화된 본원에 기재된 항-OX40 항체를 포함하는 조성물, 예를 들어 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 생리학적으로 양립가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 부형제는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 직장, 척수 또는 표피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입)에 적합할 수 있다.
- [0118] 본원에 개시된 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 여기에는 예를 들어 액체 용액(예를 들어, 주사 및 주입 용액), 분산액 또는 현탁액, 리포솜 및 좌약과 같은 액체, 반고체 및 고체 투여 형태가 포함된다. 적합한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 용도에 의존한다. 전형적인 적합한 조성물은 주사 또는 주입 용액의 형태이다. 하나의 적합한 투여 방식은 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 일부 실시형태에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 특정 실시형태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.
- [0119] 본원에 사용된 용어 "치료적 유효량"은 질환, 또는 질환 또는 장애의 임상 증상들 중 적어도 하나를 치료하기 위해 대상체에게 투여될 때 질환, 장애 또는 증상에 대한 그러한 치료 효과에 충분한 항체의 양을 지칭한다. "치료적 유효량"은 항체, 질환, 장애 및/또는 질환 또는 장애의 증상, 질환, 장애 및/또는 질환 또는 장애의 증상의 중증도, 치료받는 대상체의 연령, 및/또는 치료받는 대상체의 체중에 따라 달라질 수 있다. 임의의 주어진 경우에 적절한 양은 당업자에게 명백할 수 있거나, 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있다. 병용 요법의 경우, "치료적 유효량"은 질환, 장애 또는 상태의 효과적인 치료를 위한 병용 대상의 총량을 의미한다.
- [0120] 본원에 사용된 어구 "~와 조합하여"는 항-OX40 항체가 항-TIM3 항체의 투여와 동시에, 투여 전 또는 후에 대상체에게 투여됨을 의미한다. 특정 실시형태에서, 항-TIM3 항체는 항-OX40 항체와 동시-제형으로 투여된다.
- [0121] **발명의 상세한 설명**
- [0122] **항-TIM3 항체**
- [0123] T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3(TIM3, HAVCR2, 또는 CD366)은 만성 바이러스 감염 및 면역 감시로부터의 종양 탈출 모두에서 T-세포 고갈을 촉진하는데 있어서 중요한 역할을 하는 T-세포 면역글로불린-함유 및 뮤신-도메인-함유 패밀리의 구성원인 33 KD I형 막관통 당단백질이다(Monney 등, 2002 *Nature* 415:536-541; Sanchez-Fueyo A, 등, 2003 *Nat Immunol.* 4:1093-101; Sabatos CA, 등, 2003 *Nat Immunol.* 4:1102-10; Anderson 등, 2006 *Curr Opin Immunol.* 18:665-669). TIM3을 코딩하는 유전자 및 cDNA를 마우스 및 인간에서 클로닝하고 특성화하였다(Monney 등, 2002 *Nature* 415:536-541; McIntire 등, 2001 *Nat. Immunol.* 2:1109-1116). 성숙한 인간 TIM3에는 280개의 아미노산 잔기가 함유되어 있다(NCBI 수탁 번호: NP_116171.3). 그것의 세포외 도메인은 아미노산 잔기 1~181로 구성되고, 막관통 도메인과 세포질 C-말단 꼬리는 잔기 182~280을 포함

한다. 세포질 도메인에서 발견되는 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프(ITIM) 및 티로신 스위치 모티프(ITSM)와 같은 알려진 억제 신호전달 모티프는 없다.

[0124] 본 개시내용의 항-TIM3 항체는 WO2018/036561에서 찾을 수 있다. 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하고 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH): 서열번호: 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 33에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 34에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 및 서열번호: 35에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 항-TIM3 항체가 또한 본원에 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 항-TIM3 항체는 인간 TIM3에 특이적으로 결합하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하며, 서열번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0125] **항-OX40 항체**

[0126] 본 개시내용은 인간 OX40에 특이적으로 결합하는 항체, 항원-결합 단편을 제공한다. 또한, 본 개시내용은 바람직한 약동학적 특징 및 기타 바람직한 속성을 갖고, 따라서 암의 가능성을 감소시키거나 암을 치료하는데 사용될 수 있는 항체를 제공한다. 본 개시내용은 항체를 포함하는 약제학적 조성물 및 암 및 관련 장애의 예방 및 치료를 위한 이러한 약제학적 조성물의 제조 및 사용 방법을 추가로 제공한다.

[0127] 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 하기에 기재된 바와 같이 생성된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0128] 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 항체 단편(예를 들어, 항원-결합 단편)은 서열번호: 14, 20 또는 26의 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함한다(표 3). 본 개시내용은 또한 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 표 3에 열거된 VH CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR을 포함한다. 한 양태에서, 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체는 표 3에 열거된 VH CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 VH CDR을 포함한다(또는 대안적으로 이로 구성된다).

[0129] 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호: 16, 22 또는 28의 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다(표 3). 본 개시내용은 또한 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 표 3에 열거된 VL CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR을 포함한다. 특히, 본 개시내용은 OX40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 표 3에 열거된 VL CDR 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 VL CDR을 포함한다(또는 대안적으로 이로 구성된다).

[0130] 본 개시내용의 다른 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 돌연변이되었지만 표 3에 기재된 서열에 도시된 CDR 영역에서 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 퍼센트 동일성을 갖는 아미노산을 포함한다. 일부 양태에서, 이는 표 3에 기재된 CDR과 비교할 때 CDR 영역에서 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 아미노산이 돌연변이된 돌연변이체 아미노산 서열을 포함한다.

[0131] 본 개시내용의 다른 항체는 아미노산 또는 아미노산을 코딩하는 핵산이 돌연변이되었지만, 표 3에 기재된 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 퍼센트 동일성을 갖는 항체를 포함한다. 일부 양태에서, 이는 돌연변이체 아미노산 서열을 포함하며, 1, 2, 3, 4 또는 5개 미만의 아미노산이 표 3에 기재된 서열에 도시된 가변 영역과 비교할 때 가변 영역에서 돌연변이되었지만 실질적으로 동일한 치료 활성을 유지한다.

[0132] 본 개시내용은 또한 OX40에 특이적으로 결합하는 항체의 VH, VL, 전장 중쇄 및 전장 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 이러한 핵산 서열은 포유동물 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다.

[0133] **동일한 에피토프에 결합하는 에피토프 및 항체의 동정**

[0134] 본 개시내용은 인간 OX40의 에피토프에 결합하는 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 양태에서, 항체 및 항원-결합 단편은 OX40의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0135] 본 개시내용은 또한 표 3에 기재된 항-OX40 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 그의 항원-결합 단편을

제공한다. 따라서 추가의 항체 및 그의 항원-결합 단편은 결합 분석에서 다른 항체와 교차 경쟁(예를 들어, 통계적으로 유의한 방식으로 결합을 경쟁적으로 억제)하는 그의 능력에 기반하여 확인될 수 있다. OX40에 대한 본 개시내용의 항체 및 그의 항원-결합 단편의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 OX40에 대한 결합에 대해 그 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 경쟁할 수 있음을 입증한다. 이러한 항체는 어느 한 이론에 얽매이지 않으면서 그것이 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편과, OX40 상의 동일하거나 관련된(예를 들어, 구조적으로 유사하거나 공간적으로 근접한) 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 단편과, OX40 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 또는 인간화 단일클론 항체이다. 이러한 인간 또는 인간화 단일클론 항체는 본원에 기재된 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.

[0136] **Fc 영역의 프레임워크의 추가 변경**

[0137] 또 다른 양태에서, Fc 영역은 항체의 이펙터 기능을 변경하기 위해 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체함으로써 변경된다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 항체가 이펙터 리간드에 대해 변경된 친화도를 갖지만 모 항체의 항원-결합 능력을 유지하도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 친화도가 변경된 이펙터 리간드는 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이 접근법은 예를 들어 Winter 등의 미국 특허 제5,624,821호 및 제5,648,260호에 기재되어 있다.

[0138] 또 다른 양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소 또는 폐지된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 갖도록 하나 이상의 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이 접근법은 예를 들어 Idusogie 등의 미국 특허 제6,194,551호에 기재되어 있다.

[0139] 또 다른 양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 변경되어 보체를 고정하는 항체의 능력을 변경시킨다. 이 접근법은 예를 들어 Bodmer 등의 PCT 공개 WO 94/29351에 기재되어 있다. 특정 양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 하나 이상의 아미노산은 IgG1 하위부류 및 카파 이소형에 대해 하나 이상의 동종이형 아미노산 잔기로 대체된다. 동종이형 아미노산 잔기는 또한 Jefferis 등, MAbs. 1:332-338 (2009)에 의해 기재된 바와 같이 IgG1, IgG2 및 IgG3 하위부류의 중쇄 불변 영역 뿐만 아니라 카파 이소형의 경쇄 불변 영역을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0140] 또 다른 양태에서, Fc 영역은 하나 이상의 아미노산을 변형함으로써 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 항체의 능력을 증가시키고/시키거나 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시키도록 변형된다. 이 접근법은 예를 들어 Presta의 PCT 공개 WO 00/42072에 설명되어 있다. 더욱이, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1의 결합 부위가 맵핑되었고 결합이 개선된 변이체가 기재되어 있다(Shields 등, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001 참조).

[0141] 또 다른 양태에서, 항체의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어, 비글리코실화된 항체가 만들어질 수 있다(즉, 항체가 글리코실화가 없거나 감소됨). 예를 들어, "항원"에 대한 항체의 친화도를 증가시키기 위해 글리코실화가 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어 항체 서열 내 글리코실화의 하나 이상의 부위를 변경함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위를 제거하여 그 부위에서 글리코실화를 제거하는 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 이러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 예를 들어 Co 등의 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 기재되어 있다.

[0142] 추가로, 또는 대안적으로, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화된 항체 또는 이등분 GlcNac 구조가 증가된 항체와 같은 변경된 유형의 글리코실화를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현함으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 당업계에 기재되어 있고, 제조할 항체를 발현하여 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생성하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, Hang 등의 EP 1,176,195는 기능적으로 파괴된 FUT8 유전자를 가진 세포주를 설명하며, 이는 푸코실 트랜스퍼라제를 인코딩하여 이러한 세포주에서 발현된 항체가 저푸코실화를 나타내도록 한다. Presta의 PCT 공개 WO 03/035835는 Asn(297)-연결된 탄수화물에 푸코스를 부착하는 능력이 감소되어 숙주 세포에서 발현된 항체의 푸코실화를 초래하는 변이 CHO 세포주 Lec13 세포를 설명한다(또한, Shields 등, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740 참조). Umana 등의 PCT 공개 WO 99/54342는 조작된 세포주에서 발현된 항체가 증가된 이등분 GlcNac 구조를 나타내어, 이것이 항체의 ADCC 활성을 증가시키도록 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제(예를 들어, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 설명한다(Umana 등, Nat. Biotech. 17:176-180, 1999 참조).

[0143] 또 다른 양태에서, ADCC의 감소가 필요한 경우, 인간 항체 하위부류 IgG4는 많은 이전 보고서에서 중간 정도의 ADCC만을 갖고 CDC 이펙터 기능이 거의 없는 것으로 나타났다(Moore G L, 등 2010 MAb, 2:181-189). 반면, 천연 IgG4는 산성 완충액에서 또는 증가하는 온도하에서와 같은 스트레스 조건에서 덜 안정한 것으로 밝혀졌다(Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall'Acqua, W. 등, 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse 등 2002 Immunol, 105:9-19). 감소된 ADCC는 Fc γ R 결합 또는 C1q 결합 활성이 감소되거나 무효가 되도록 변형의 조합으로 조작된 IgG4에 항체를 작동가능하게 연결함으로써 달성될 수 있으며, 이로써 ADCC 및 CDC 이펙터 기능을 감소시키거나 제거할 수 있다. 생물학적 약물로서 항체의 물리화학적 특성을 고려할 때, IgG4의 덜 바람직한 고유 특성들 중 하나는 용액에서 그의 2개의 중쇄를 동적으로 분리하여 반항체를 형성하는 것이며, 이는 "Fab 아암 교환"이라는 프로세스를 통해 생체내에서 이중특이성 항체를 생성시킨다(Van der Neut Kofschoten M, 등 2007 Science, 317:1554-157). 위치 228(EU 넘버링 시스템)에서 세린의 프롤린으로의 돌연변이는 IgG4 중쇄 분리를 억제하는 것으로 나타났다(Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse 등 2002 Immunol, 105:9-19). 힌지 및 γ Fc 영역의 일부 아미노산 잔기는 Fc γ 수용체와의 항체 상호작용에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Chappel S M, 등 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee, J. 등, 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour, K. L. 등 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes, R. A. 등, 2000 Nature Medicine, 6:443-446; Arnold J. N., 2007 Annu Rev Immunol, 25:21-50). 또한, 인간 집단에서 드물게 발생하는 일부 IgG4 이소형은 또한 상이한 물리화학적 특성을 유발할 수 있다(Brusco, A. 등 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse 등 2002 Immunol, 105:9-19). ADCC, CDC 및 불안정성이 낮은 OX40 항체를 생성하기 위해, 인간 IgG4의 힌지 및 Fc 영역을 변형시키고 다수의 변경을 도입하는 것이 가능하다. 이들 변형된 IgG4 Fc 분자는 서열번호: 83-88, Li 등의 미국 특허 제8,735,553호에서 찾을 수 있다.

[0144] **OX40 항체 생산**

[0145] 항-OX40 항체 및 그의 항원-결합 단편은 재조합 발현, 화학적 합성 및 항체 사량체의 효소적 소화를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 수단에 의해 생성될 수 있는 반면, 전장 단일클론 항체는 예를 들어 하이브리도마 또는 재조합 생산에 의해 얻어질 수 있다. 재조합 발현은 당업계에 알려진 임의의 적절한 숙주 세포, 예를 들어 포유동물 숙주 세포, 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포 등에서 유래할 수 있다.

[0146] 본 개시내용은 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역을 포함하는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 세그먼트를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 제공한다. 일부 양태에서, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호: 15, 21 또는 27로 구성된 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와의 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 핵산 서열 동일성을 갖는다. 일부 양태에서, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호: 17, 23 또는 29로 구성된 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드와의 적어도 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 핵산 서열 동일성을 갖는다.

[0147] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 항-OX40 항체의 가변 영역 서열을 코딩할 수 있다. 그들은 또한 항체의 가변 영역과 불변 영역을 모두 코딩할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열 중 일부는 예시된 항-OX40 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄 모두의 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩한다. 일부 다른 폴리뉴클레오타이드는 무관 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역과 각각 실질적으로 동일한 2개의 폴리펩타이드 세그먼트를 코딩한다.

[0148] 또한 본 개시내용은 항-OX40 항체를 생산하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 발현 벡터의 선택은 벡터가 발현되는 의도된 숙주 세포에 따라 달라진다. 전형적으로, 발현 벡터는 항-OX40 항체 사슬 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터 및 기타 조절 서열(예를 들어, 인헨서)을 함유한다. 일부 양태에서, 유도성 프로모터는 유도 조건의 제어 하에서 제외하고 삽입된 서열의 발현을 방지하기 위해 사용된다. 유도성 프로모터는 예를 들어 아라비노스, lacZ, 메탈로티오네인 프로모터 또는 열 충격 프로모터를 포함한다. 형질전환된 유기체의 배양물은 발현 생성물이 숙주 세포에 의해 더 잘 용인되는 코딩 서열에 대한 집단을 편향시키지 않으면서 비유도 조건 하에서 확장될 수 있다. 프로모터에 더하여, 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편의 효율적인 발현을 위해 다른 조절 요소가 또한 필요하거나 바람직할 수 있다. 이러한 요소는 전형적으로 ATG 개시 코돈 및 인접 리보솜 결합 부위 또는 기타 서열을 포함한다. 또한, 발현 효율은 사용 중인 세포 시스템에 적절한 인헨서를 포함함으로써 향상될 수 있다(예를 들어, Scharf 등, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; 및 Bittner 등, Meth. Enzymol., 153:516, 1987 참조). 예를 들어, SV40 인헨서 또는 CMV 인헨서는 포유동물 숙주 세포에서 발현을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

[0149] 항-OX40 항체 사슬을 보유하고 발현하기 위한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있다. *이. 콜라이(E. coli)*는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 클로닝하고 발현하는데 유용한 하나의 원핵 숙주이다. 사용하기에 적합한 다른 미생물 숙주는 간균, 예컨대 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 기타 장내세균, 예컨대 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*) 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함한다. 이러한 원핵 숙주에서, 전형적으로 숙주 세포(예를 들어, 복제 기점)와 양립가능한 발현 조절 서열을 함유하는 발현 벡터를 만들 수도 있다. 또한, 락토스 프로모터 시스템, 트립토판(*trp*) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템, 또는 파지 람다로부터의 프로모터 시스템과 같은 임의의 수의 다양한 잘 알려진 프로모터가 존재할 것이다. 프로모터는 전형적으로 선택적으로 오퍼레이터 서열과 함께 발현을 제어하고, 전사 및 번역을 개시하고 완료하기 위한 리보솜 결합 부위 서열 등을 갖는다. 효모와 같은 다른 미생물도 항-OX40 폴리펩타이드를 발현하는 데 사용될 수 있다. 배큘로바이러스 벡터와 함께 곤충 세포도 사용할 수 있다.

[0150] 다른 양태에서, 포유동물 숙주 세포는 본 개시내용의 항-OX40 폴리펩타이드를 발현 및 생산하는데 사용된다. 예를 들어, 이들은 내인성 면역글로불린 유전자를 발현하는 하이브리도마 세포주 또는 외인성 발현 벡터를 보유하는 포유동물 세포주일 수 있다. 여기에는 임의의 정상적인 필사 또는 정상적 또는 비정상 불사 동물 또는 인간 세포가 포함된다. 예를 들어, CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HEK 293 세포, 골수종 세포주, 형질전환된 B-세포 및 하이브리도마를 포함하여 온전한 면역글로불린을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 개발되었다. 폴리펩타이드를 발현하기 위한 포유동물 조직 세포 배양물의 사용은 일반적으로 예를 들어 Winnacker, *From Genes to Clone*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987에서 논의된다. 포유동물 숙주 세포에 대한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예컨대 복제 기원, 프로모터 및 인핸서(예를 들어, Queen 등, *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986 참조), 및 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결자 서열과 같은 필요한 프로세싱 정보 부위를 포함할 수 있다. 이들 발현 벡터는 일반적으로 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터를 함유한다. 적합한 프로모터는 구성적, 세포 유형-특이적, 단계-특이적 및/또는 조절가능하거나 조정가능할 수 있다. 유용한 프로모터는 메탈로티오네인 프로모터, 구성적 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 텍사메타손-유도성 MMTV 프로모터, SV40 프로모터, MRP *polIII* 프로모터, 구성적 MPSV 프로모터, 테트라사이클린-유도성 CMV 프로모터(예컨대, 인간 즉시-초기 CMV 프로모터), 구성적 CMV 프로모터, 및 당업계에 알려진 프로모터-인핸서 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0151] **검출 및 진단 방법**

[0152] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 OX40의 검출을 위한 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 용도에 유용하다. 한 양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 생물학적 샘플에서 OX40의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 다른 양태에서, 이러한 조직은 다른 조직에 비해 더 높은 수준으로 OX40을 발현하는 정상 및/또는 암 조직을 포함한다.

[0153] 한 양태에서, 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 OX40의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 방법은 항원에 대한 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 항-OX40 항체와 접촉시키는 단계 및 항체와 항원 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 생물학적 샘플에는 소변 또는 혈액 샘플이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0154] OX40의 발현과 관련된 장애를 진단하는 방법도 포함된다. 특정 양태에서, 방법은 시험 세포를 항-OX40 항체와 접촉시키는 단계; OX40 폴리펩타이드에 대한 항-OX40 항체의 결합을 검출함으로써 시험 세포에서 OX40의 발현 수준(정량적으로 또는 정성적으로)을 결정하는 단계; 및 시험 세포에서의 발현 수준을 대조군 세포(예를 들어, 시험 세포와 동일한 조직 기원의 정상 세포 또는 비-OX40 발현 세포)에서의 OX40 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 대조군 세포와 비교하여 더 높은 수준의 OX40 시험 세포에서의 발현은 OX40의 발현과 관련된 장애의 존재를 나타낸다.

[0155] **치료 방법**

[0156] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 OX40-관련 장애 또는 질환의 치료 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 용도에 유용하다. 한 양태에서, OX40-관련 장애 또는 질환은 암이다.

[0157] 한 양태에서, 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 상기 방법은 유효량의 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 암은 유방암, 결장암, 두경부암, 위암, 신장암, 간암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 난소암, 피부암, 중피종, 림프종, 백혈병, 골수종 및

육종을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0158] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있으며, 국소 치료를 위해 원하는 경우 병변내 투여가 가능하다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 투여는 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 부분적으로 투여가 단기인지 만성인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 이루어질 수 있다. 다양한 시점에 걸친 단일 또는 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 투여 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0159] 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편은 우수한 의료 관행과 일치하는 방식으로 제형화, 투약 및 투여될 것이다. 이 맥락에서 고려해야 할 요소에는 치료 중인 특정 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 약제 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 알려진 기타 요인이 포함된다. 항체는 문제의 장애를 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 함께 제형화될 필요는 없지만 선택적으로 제형화된다. 이러한 다른 제제의 유효량은 제형에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 위에서 논의된 기타 요인에 따라 다르다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 경험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0160] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 개시내용의 항체 또는 항원-결합 단편의 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 항체는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어, 1회 이상의 개별 투여 또는 연속 주입에 의해 항체 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg이 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 용량이 될 수 있다. 하나의 전형적인 일일 투여량은 위에서 언급한 요인에 따라 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상 범위일 수 있다. 수일 이상 반복 투여하는 경우, 상태에 따라 일반적으로 원하는 질환 증상의 역제가 나타날 때까지 치료를 지속한다. 이러한 용량은 간헐적으로 예를 들어, 매주 또는 3주마다 (예를 들어, 환자가 약 2 내지 약 20 회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체를 받도록) 투여될 수 있다. 초기에 더 높은 부하 용량을 투여한 후 하나 이상의 더 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이 요법의 진행 상황은 기존 기술과 분석으로 쉽게 모니터링된다.

[0161] **병용 요법**

[0162] 한 양태에서, 본 개시내용의 OX40 항체는 다른 치료제, 예를 들어 항-TIM3 항체와 조합하여 사용될 수 있다. 본 개시내용의 OX40 항체와 함께 사용될 수 있는 다른 치료제에는 화학요법제(예를 들어, 파클리탁셀 또는 파클리탁셀제; (예를 들어, Abraxane®), 도세탁셀, 카르보플라틴, 토포테칸, 시스플라틴, 이리노테칸, 독소루비신, 레날리도마이드, 5-아자시딘, 이포스파미드, 옥살리플라틴, 페메트렉시드 이나트륨, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 데시타빈, 플루다라빈, 빈크리스틴, 벤다무스틴, 클로람부실, 부셀판, 켄시타빈, 멜팔란, 펜토스타틴, 미톡산트론, 페메트렉세드 이나트륨), 티로신 키나제 억제제(예를 들어, EGFR 억제제(예를 들어, 에를로티닙), 멀티키나제 억제제(예를 들어, MGCD265, RGB-286638), CD-20 표적화제(예를 들어, 리툭시맙, 오파투무맙, R05072759, LFB-R603), CD52 표적화제(예를 들어, 알렘투주맙), 프레드니솔론, 다베포에틴 알파, 레날리도마이드, Bcl-2 억제제(예를 들어, 오블리머센 나트륨), 오로라 키나제 억제제(예를 들어, MLN8237, TAK-901), 프로테아좀 억제제(예를 들어, 보르테조미드), CD-19 표적화제(예를 들어, MEDI-551, MOR208), MEK 억제제(예를 들어, ABT-348), JAK-2 억제제(예를 들어, INCB018424), mTOR 억제제(예를 들어, 템시롤리무스, 에베롤리무스), BCR/ABL 억제제(예를 들어, 이마티닙), ET-A 수용체 길항제(예를 들어, ZD4054), TRAIL 수용체 2(TR-2) 작용제(예를 들어, CS-1008), HGF/SF 억제제(예를 들어, AMG 102), EGEN-001, Polo-유사 키나제 1 억제제(예를 들어, BI 672)가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0163] 본원에 개시된 바와 같은 항-TIM3 항체와 조합된 항-OX40 항체는 경구, 국소, 직장, 비경구, 흡입 스프레이 또는 이식된 저장소와 같은 다양한 공지된 방식으로 투여될 수 있지만, 주어진 경우에 가장 적합한 경로는 특정 숙주, 활성 성분이 투여되는 상태의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 폐내, 정맥내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활액내, 흉골내, 척추강내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0164] 항-OX40 항체 및 항-TIM3 항체의 조합은 상이한 경로를 통해 투여될 수 있다. 각각의 항체는 다른 항체와 독립적으로 피하, 폐내, 정맥내 또는 복강내와 같은 비경구적으로 투여될 수 있다.

- [0165] 한 실시형태에서, 항-OX40 항체 또는 항-TIM3 항체는 환자의 필요에 따라 1주일에 한번(1일 1회, QD), 1일에 두 번(1일 2회, BID), 1일 3회, 1일 4회, 또는 1일 5회 투여된다.
- [0166] **약제학적 조성물 및 제형**
- [0167] 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 항-OX40 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 제형을 비롯한 조성물이 또한 제공된다. 특정 실시형태에서, 조성물은 OX40에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 OX40에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이들 조성물은 당업계에 널리 알려진 완충제를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 부형제와 같은 적합한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0168] 본원에 기재된 바와 같은 OX40 항체 또는 항원-결합 단편의 약제학적 제형은 원하는 순도를 갖는 이러한 항체 또는 항원-결합 단편을 동결건조 제형 또는 수용액 형태로 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합함으로써 제조된다(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 약제학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 사용되는 용량 및 농도에서 수혜자에게 무독성이며, 이는 완충액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류 및 글루코사이드, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용가능한 담체는 간질 약물 분산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20(HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는 특정 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 제7,871,607호 및 2006/0104968에 설명되어 있다. 한 양태에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가 글리코사미노글리카나제와 조합된다.
- [0169] 예시적인 동결건조된 항체 제형은 미국 특허 제6,267,958호에 기재되어 있다. 수성 항체 제형은 미국 특허 제6,171,586호 및 W02006/044908호에 기재된 것을 포함하며, 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.
- [0170] 서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 이러한 매트릭스는 성형품을 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태로 있다.
- [0171] 생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 무균이다. 무균은 예를 들어 무균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성될 수 있다.
- [0172] **실시예**
- [0173] **실시예 1: 항-OX40 단일클론 항체의 생성**
- [0174] 항-OX40 단일클론 항체는 약간의 변형이 있는 통상적인 하이브리도마 융합 기술(de St Groth 및 Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1)을 기반으로 생성되었다. 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA) 및 형광-활성화 세포 분류(FACS) 분석에서 높은 결합 활성을 갖는 항체를 추가 특성화를 위해 선택하였다.
- [0175] **면역화 및 결합 분석을 위한 OX40 재조합 단백질**
- [0176] 전장 인간 OX40(서열번호: 1)을 코딩하는 cDNA는 GenBank 서열(수탁 번호: X75962.1)을 기반으로 Sino Biological(중국, 베이징)에 의해 합성되었다. OX-40(서열번호: 2)의 아미노산(AA) 1~216으로 구성된 신호 펩타이드 및 세포외 도메인(ECD)의 코딩 영역을 PCR-증폭하고, 마우스 IgG2a의 Fc 도메인, 인간 IgG1 야생형 중쇄의 Fc 도메인 또는 His-tag에 융합된 C-말단을 갖는 자체 개발된 발현 벡터로 클로닝되어, 각각 OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 및 OX40-His라는 3개의 재조합 융합 단백질 발현 플라스미드를 생성했다. OX40 융합 단백질의 개략도는 도 1에 도시되어 있다. 재조합 융합 단백질 생산을 위해 OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 및 OX40-His 발현 플

라스미드를 293G 세포에 일시적으로 형질감염시키고 회전 셰이커가 장착된 CO₂ 인큐베이터에서 7일 동안 배양하였다. 재조합 단백질을 함유하는 상청액을 수집하고 원심분리에 의해 제거하였다. OX40-mIgG2a 및 OX40-huIgG1은 단백질 A 컬럼(Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences)을 사용하여 정제하였다. OX40-His는 Ni 세파로스 컬럼(Cat: 17-5318-02, GE Life Science)을 사용하여 정제하였다. OX40-mIgG2a, OX40-huIgG 및 OX40-His 단백질을 인산완충식염수(PBS)에 대해 투석하고, -80℃ 냉동고에 소량씩 보관했다.

[0177] *안정한 발현 세포주*

[0178] 전장 인간 OX40(OX40) 또는 시노몰구스 OX40(cynoOX40)을 발현하는 안정한 세포주를 생성하기 위해, 이들 유전자를 레트로바이러스 벡터 pFB-Neo(Cat: 217561, Agilent, USA)에 클로닝하였다. 레트로바이러스 형질도입은 이전에 설명한 프로토콜을 기반으로 수행하였다(Zhang 등, 2005). HuT78 및 HEK293 세포를 각각 인간 OX40 또는 cynoOX40을 함유하는 바이러스로 레트로바이러스 형질도입하여 HuT78/OX40, HEK293/OX40 및 HuT78/cynoOX40 세포주를 생성하였다.

[0179] *면역화, 하이브리도마 융합 및 클로닝*

[0180] 8주 내지 12주령 Balb/c 마우스(HFK BIOSCIENCE CO., LTD, 베이징, 중국)는 OX40-mIgG2a 및 퀵-항체 면역-보조제(Quick-Antibody Immuno-Adjuvant)(Cat: KX0210041, KangBiQuan, 베이징, 중국) 10 µg을 함유하는 혼합 항원 200 µl로 복강내 면역화시켰다. 절차는 3주 동안 반복되었다. 2차 면역화 2주 후, 마우스 혈청을 ELISA 및 FACS에 의해 OX40 결합에 대해 평가하였다. 혈청 스크리닝 10일 후, OX40-mIgG2a 10 µg으로 복강내 주입하여, 항-OX40 항체 혈청 역가가 가장 높은 마우스를 복강내 주입을 통해 부스팅하였다. 부스팅 3일 후, 표준 기술(Somat Cell Genet, 1977 3:231)을 사용하여 비장세포를 분리하고 뮤린 골수종 세포주 SP2/0 세포(ATCC, Manassas VA)에 융합했다.

[0181] *ELISA 및 FACS에 의한 항체의 OX40 결합 활성 평가*

[0182] 하이브리도마 클론의 상청액은 일부 변형을 포함하여 (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52)에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 초기에 스크리닝하였다. 요약하면, OX40-His 단백질을 4℃에서 밤새 96-웰 플레이트에 코팅하였다. PBS/0.05% Tween-20으로 세척한 후, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 PBS/3% BSA로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 PBS/0.05% Tween-20으로 세척하고 세포 상청액과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. HRP-연결된 항-마우스 IgG 항체(Cat: 115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ 단편 특이적) 및 기질(Cat: 00-4201-56, eBioscience, USA)을 사용하여 450 nm 파장에서 색 흡광도 신호를 발생시켰으며, 이는 플레이트 리더(SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/PheraStar, BMG LABTECH)를 사용하여 측정하였다. 간접 ELISA를 사용한 융합 스크리닝에서 양성 모클론을 선택했다. ELISA-양성 클론은 위에서 설명한 HuT78/OX40 및 HuT78/cynoOX40 세포를 사용하여 FACS에 의해 추가로 확인되었다. OX40-발현 세포(10⁵ 개 세포/웰)를 ELISA-양성 하이브리도마 상청액과 함께 인큐베이션한 후 항-마우스 IgG eFluor® 660 항체(Cat: 50-4010-82, eBioscience, USA)와 결합했다. 세포 형광은 유세포 분석기(Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[0183] ELISA 및 FACS 스크리닝 모두에서 양성 신호를 보인 하이브리도마로부터의 조건화된 배지를 기능적 분석에 적용하여 인간 면역 세포-기반 분석에서 우수한 기능적 활성을 갖는 항체를 확인하였다(다음 섹션 참조). 원하는 기능적 활성을 갖는 항체를 추가로 서브클로닝하고 특성화하였다.

[0184] *무혈청 또는 저혈청 배지에 대한 하이브리도마의 서브클로닝 및 적응*

[0185] 상기 기재된 바와 같이 ELISA, FACS 및 기능적 분석에 의한 1차 스크리닝 후, 양성 하이브리도마 클론을 제한 희석에 의해 서브-클로닝하여 클론성을 보장하였다. 상위 항체 서브클론은 기능 분석에 의해 확인되었고, 3% FBS가 포함된 CDM4MAb 배지(Cat: SH30801.02, Hyclone, USA)에서 성장에 적합했다.

[0186] *단일클론 항체의 발현 및 정제*

[0187] 상부 항체 클론을 발현하는 하이브리도마 세포를 CDM4MAb 배지(Cat: SH30801.02, Hyclone)에서 배양하고, CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 5 내지 7일 동안 인큐베이션하였다. 조건화된 배지를 원심분리를 통해 수집하고, 정제 전에 0.22 µm 막을 통과시켜 여과하였다. 상청액의 뮤린 항체를 적용하고 제조사 가이드에 따라 단백질 A 컬럼(Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences)에 결합하였다. 절차는 일반적으로 90% 이상의 순도에서 항체를 산출했다. 단백질 A-친화도 정제된 항체를 PBS에 대해 투석하거나 필요한 경우 HiLoad 16/60 Superdex 200 컬럼

(Cat: 28-9893-35, GE Life Sciences)을 사용하여 추가 정제하여 응집체를 제거하였다. 단백질 농도는 280 nm 에서 흡광도를 측정하여 결정되었다. 최종 항체 제제는 -80℃ 냉동고에서 분취량으로 저장하였다.

[0188] **실시예 2: 항-OX40 항체의 클로닝 및 서열 분석**

[0189] 무린 하이브리도마 클론을 수확하여 제조사의 프로토콜에 따라 Ultrapure RNA 키트(Cat: 74104, QIAGEN, Germany)를 사용하여 전체 세포 RNA를 제조하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 Invitrogen의 cDNA 합성 키트(Cat: 18080-051)를 사용하여 합성하고 하이브리도마 항체의 VH 및 VL의 PCR 증폭은 PCR 키트(Cat: CW0686, CWBio, 베이징, 중국)를 사용하여 수행하였다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 항체 cDNA 클로닝에 사용된 올리고 프라이머는 이전에 보고된 서열을 기반으로 Invitrogen(베이징, 중국)에 의해 합성되었다(Brocks 등 2001 Mol Med 7:461). PCR 산물은 시퀀싱에 직접 사용되거나 pEASY-Blunt 클로닝 벡터(Cat: CB101 TransGen, China)로 서브클로닝된 다음, Genewiz(베이징, 중국)에 의해 시퀀싱되었다. VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 DNA 시퀀싱 결과로부터 추론되었다.

[0190] 무린 항체의 상보성 결정인자 영역(CDR)은 서열 주석 및 컴퓨터 프로그램 서열 분석에 의해 Kabat(Wu 및 Kabat 1970 J. Exp. Med. 132:211-250) 시스템에 기초하여 정의되었다. 대표적인 상위 클론 Mu445(VH 및 VL)의 아미노산 서열을 표 1(서열번호: 9 및 11)에 나열하였다. Mu445의 CDR 서열은 표 2(서열번호: 3~8)에 나열하였다.

표 1

Mu445 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열

Mu445 VH	서열번호: 9	EVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYII HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVVYVCARG YYGSSYAMDYWGQGSVTVSS
Mu445 VL	서열번호: 11	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLN WYQQKPDGFIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSG TDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGT KLEKK

[0191]

표 2

마우스 단일클론 항체 **Mu445 VH** 및 **VL** 영역의 **CDR** 서열(아미노산)

항체	서열번호	CDR	서열
Mu445	서열번호: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	서열번호: 4	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	서열번호: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	서열번호: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	서열번호: 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	서열번호: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

[0192]

[0193] **실시예 3: 무린 항-인간 OX40 항체 445의 인간화**

[0194] **항체 인간화 및 조각**

[0195] Mu445의 인간화를 위해, 인간 생식계열 IgG 유전자는 IMGT의 인간 면역글로불린 유전자 데이터베이스에 대한 서열 비교에 의해 Mu445 가변 영역의 cDNA 서열과 높은 정도의 상동성을 공유하는 서열을 검색하였다. 인간 항체 레퍼토리에 높은 빈도로 존재하고(Glanville 등, 2009 PNAS 106:20216-20221) Mu445와 고도로 상동성인 인간IGHV 및 IGHV 유전자가 인간화를 위한 주형으로 선택되었다.

[0196] 인간화는 CDR-그래프팅(Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods 및 Protocols, Vol 248: Humana Press)에 의해 수행하였으며, 인간화 항체는 자체 개발된 발현 벡터를 사용하여 인간 IgG1 야생형

포맷으로 조작하였다. 인간화의 초기 라운드에서 뮤린으로부터 프레임워크 영역의 인간 아미노산 잔기로의 돌연 변이는 시뮬레이션된 3D 구조 분석에 의해 안내되었으며, CDR의 표준 구조를 유지하는 데 구조적으로 중요한 뮤린 프레임워크 잔기는 인간화 항체 445의 제1 버전에서 유지되었다(445-1, 표 3 참조). 445-1의 6개 CDR은 HCDR1(서열번호: 3), HCDR2(서열번호: 13), HCDR3(서열번호: 5) 및 LCDR1(서열번호: 6), LCDR2(서열번호: 7), 및 LCDR3(서열번호: 8)의 아미노산 서열을 가지고 있다. 445-1의 중쇄 가변영역은 서열번호: 15의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 (VH) 서열번호: 14의 아미노산 서열을 갖고, 경쇄 가변영역은 서열번호: 17의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 (VL) 서열번호: 16의 아미노산 서열을 갖는다. 구체적으로, Mu445(서열번호: 6-8)의 LCDR은 2개의 뮤린 프레임워크 잔기(I₄₄ 및 Y₇₁)가 보유된(서열번호: 16) 인간 생식계열 가변 유전자 IGVK1-39의 프레임워크에 이식되었다. HCDR1(서열번호: 3), HCDR2(서열번호: 13) 및 HCDR3(서열번호: 5)을 2개의 뮤린 프레임워크(L₇₀ 및 S₇₂) 잔기가 보유된(서열번호: 14) 인간 생식계열 가변 유전자 IGHV1-69의 프레임워크에 이식되었다. 445개의 인간화 변이체(445-1)에서, 시뮬레이션된 3D 구조에 따라 N-말단 절반만이 항원-결합에 중요할 것으로 예측되었기 때문에 Kabat HCDR2의 N-말단 절반만 이식되었다.

[0197] 445-1은 적용하기 쉬운 서브-클로닝 부위를 갖는, 인간 야생형 IgG1(IgG1wt) 및 카파 사슬의 불변 영역을 각각 함유하는 자체 개발된 발현 벡터를 사용하여 인간화 전장 항체로 작제되었다. 445-1 항체는 293G 세포에 위의 두 작제물을 공동 형질감염시켜 발현시키고, 단백질을 A 컬럼(Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences)을 사용하여 정제하였다. 정제된 항체를 PBS에서 0.5-10 mg/mL로 농축하고, -80°C 냉동고에서 분취량으로 저장하였다.

[0198] 445-1 항체를 사용하여, VH 및 VL의 프레임워크 영역에 보유된 뮤린 잔기를 상응하는 인간 생식계열 잔기, 예컨대 VL의 I44P 및 Y71F 및 VH의 L70I 및 S72A로 전환시키는 몇 가지 단일 아미노산 변화가 이루어졌다. 또한 잠재적인 이성질체화 위험을 감소시키고 인간화 수준을 높이기 위해 CDR에서 몇 가지 단일 아미노산 변경이 이루어졌다. 예를 들어, T51A 및 D50E의 변경은 LCDR2에서 이루어졌으며, 변경 D56E, G57A 및 N61A는 HCDR2에서 이루어졌다. 모든 인간화 변경은 특정 위치에 돌연변이를 포함하는 프라이머와 부위 지정 돌연변이 유발 키트(Cat: AP231-11, TransGen, 베이징, 중국)를 사용하여 이루어졌다. 원하는 변경 사항을 시퀀싱으로 확인하였다.

[0199] 445-1 항체의 아미노산 변화를 OX40에 대한 결합 및 열 안정성에 대해 평가하였다. 서열번호: 3의 HCDR1, 서열번호: 18의 HCDR2, 서열번호: 5의 HCDR3, 서열번호: 6의 LCDR1, 서열번호: 19의 LCDR2 및 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 항체 445-2(표 3 참조)를 위에서 설명한 특정 변경사항의 조합으로 구성되었다. 2개의 항체를 비교함에 있어서 결과는 2개의 항체 445-2 및 445-1이 필적할만한 결합 친화도를 나타내었음을 보여주었다(하기 표 4 및 표 5 참조).

[0200] 445-2 항체를 시작으로, VL의 프레임워크 영역에서 몇 가지 추가 아미노산 변화가 이루어져서 결합 친화도/동역학, 예를 들어 아미노산 G41D 및 K42G의 변경이 추가로 개선되었다. 또한, 면역원성 위험을 낮추고 열 안정성을 증가시키기 위해 VH 및 VL 모두의 CDR에서, 예를 들어 LCDR1의 S24R 및 HCDR2의 A61N에서 몇 가지 단일 아미노산 변화가 이루어졌다. 결과적인 변화는 445-2와 비교하여 개선된 결합 활성 또는 열적 안정성을 보여주었다.

[0201] 인간화된 445 항체는 CDR 및 프레임워크 영역에 특정 아미노산 변화를 도입함으로써 추가로 조작하여 인간에서 치료적 용도를 위한 분자 및 생물물리학적 특성을 개선하였다. 고려사항에는 결합 활성을 유지하면서 유해한 변역 후 변형 제거, 열 안정성(T_m) 개선, 표면 소수성 및 등전자점(pI)이 포함되었다.

[0202] 서열번호: 3의 HCDR1, 서열번호: 24의 HCDR2, 서열번호: 5의 HCDR3, 서열번호: 25의 LCDR1, 서열번호: 19의 LCDR2 및 서열번호: 8의 LCDR3을 포함하는 인간화 단일클론 항체, 445-3(표 3 참조)은 상술한 성숙 과정으로부터 구축되었으며, 상세하게 특징화되었다. 항체 445-3은 또한 인간 IgG2의 야생형 중쇄의 Fc 도메인을 포함하는 IgG2 버전(445-3 IgG2), 및 S228P 및 R409K 돌연변이를 갖는 인간 IgG4의 Fc 도메인을 포함하는 IgG4 버전(445-3 IgG4)으로 제조되었다. 결과는 445-3 및 445-2가 필적할만한 결합 친화도를 나타내었음을 보여주었다(표 4 및 표 5 참조).

표 3

445 항체 서열

항체	서열번호		서열
445-1	서열번호: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	서열번호: 13	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	서열번호: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	서열번호: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	서열번호: 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	서열번호: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	서열번호: 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRY NQKFQGRVLTSDKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
서열번호: 16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYYCQQYSKLP YTFGGGTKEIK	
445-2	서열번호: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	서열번호: 18	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	서열번호: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	서열번호: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	서열번호: 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	서열번호: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

[0203]

	서열번호: 20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY AQKFQGRVILTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	서열번호: 22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK
445-3	서열번호: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	서열번호: 24	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYNQKFOG
	서열번호: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	서열번호: 25	LCDR1 (Kabat)	RASQGISNYLN
	서열번호: 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	서열번호: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	서열번호: 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY NQKFQGRVILTADKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	서열번호: 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNY LNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

[0204]

[0205]

실시예 4: SPR에 의한 항-OX40 항체의 결합 동역학 및 친화도 측정

[0206]

항-OX40 항체는 BIAcore™ T-200(GE Life Sciences)을 사용한 SPR 분석에 의해 결합 동역학 및 친화도에 대해 특성화되었다. 요약하면, 항-인간 IgG 항체를 활성화된 CM5 바이오센서 칩(Cat: BR100530, GE Life Sciences)에 고정화하였다. 인간 IgG Fc 영역을 갖는 항체를 칩 표면 위로 흐르게 하고, 항-인간 IgG 항체에 의해 포획하였다. 그런 다음, His 태그(Cat: 10481-H08H, Sino Biological)를 갖는 재조합 OX40 단백질의 연속 희석액을 칩 표면 위로 흐르게 하고, 표면 플라즈몬 공명 신호의 변화를 분석하여, 일대일 Langmuir 바인딩 모델(BIA 평가 소프트웨어, GE Life Sciences)을 사용하여 결합 속도(ka)와 해리 속도(kd)를 계산하였다. 평형 해리 상수(K_d)는 비율 kd/ka로 계산하였다. 항-OX40 항체의 SPR-결정된 결합 프로파일의 결과는 도 2 및 표 4에 요약되어 있다. 항체 445-3(9.47 nM)의 평균 K_d를 갖는 결합 프로파일은 항체 445-2(13.5 nM) 및 445-1(17.1 nM)보다 약간 더 양호했으며, ch445와 유사했다. 445-3 IgG4의 결합 프로파일은 445-3(IgG1 Fc 포함)과 유사했으며, 이는 IgG4와 IgG1 간의 Fc 변화가 445-3 항체의 특이적 결합을 변경하지 않았음을 나타낸다.

표 4

SPR 에 의한 항-OX40 항체의 결합 친화도

시험 매개변수	ch445*	445-1	445-2	445-3	445-3 IgG4	
시험 1	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	1.74×10^5	1.56×10^5	2.76×10^5	1.82×10^5	1.61×10^5
	k_d (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
시험 2	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	2.65×10^5	2.37×10^5	2.06×10^5	1.63×10^5	-
	k_d (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	-
평균	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

*ch445 는 인간 IgG1wt/kappa 불변 영역에 융합된 Mu445 가변 도메인으로 구성됨

[0207]

[0208]

실시예 5: HuT78 세포에서 발현된 OX40에 대한 항-OX40 항체의 결합 친화도 측정

[0209]

살아있는 세포의 표면에 발현된 OX40에 대한 항-OX40 항체의 결합 활성을 평가하기 위해, HuT78 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 인간 OX40으로 형질감염시켜 OX40 발현 라인을 생성하였다. 살아있는 HuT78/OX40 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고 다양한 항-OX40 항체의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 염소 항-인간 IgG-FITC(Cat: A0556, Beyotime)를 2차 항체로 사용하여 세포 표면에 결합하는 항체를 검출하였다. 인간 OX40에 대한 용량-의존적 결합에 대한 EC_{50} 값은 용량-반응 데이터를 GraphPad Prism을 사용하여 4개-매개변수 로지스틱 모델에 피팅함으로써 결정되었다. 도 3 및 표 5에 나타난 바와 같이, OX40 항체는 OX40에 대해 높은 친화도를 가졌다. 또한, 본 개시내용의 OX40 항체는 유세포분석에 의해 측정된 형광 강도의 상위 수준이 상대적으로 더 높았으며(표 5의 마지막 컬럼 참조), 이는 보다 바람직한 결합 프로파일인, OX40으로부터 항체의 더 느린 해리를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

표 5

OX40 에 대한 인간화된 445 변이체의 용량-의존적 결합의 EC_{50}

항체	EC_{50} ($\mu g/mL$)			상위(MFI)
	시험 1	시험 2	평균	평균
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

[0210]

[0211]

실시예 6: 항-OX40 항체의 교차 반응성 측정

[0212]

인간 및 시노몰구스(cyno) 원숭이 OX40에 대한 항체 445-3의 교차 반응성을 평가하기 위해, 인간 OX40(HuT78/OX40) 및 cyno OX40(HuT78/cynoOX40)을 발현하는 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고 OX40 항체의 일련의 희석과 함께 인큐베이션하였다. 염소 항-인간 IgG-FITC(Cat: A0556, Beyotime)를 검출을 위한 2차 항체로 사용하였다. 인간 및 시노몰구스 원숭이 고유 OX40에 대한 용량-의존적 결합을 위한 EC_{50} 값은 용량-반응 데

이터를 GraphPad Prism을 사용하여 4개-매개변수 로지스틱 모델에 피팅함으로써 결정되었다. 그 결과를 하기 도 4 및 표 6에 나타내었다. 항체 445-3은 인간 및 시노물구스 원숭이 OX40 모두와 교차 반응하며, 아래 표시된 것과 유사한 EC₅₀ 값을 나타낸다.

표 6

인간 및 시노물구스 원숭이 OX40 에 대한 항체 445-3 결합의 EC₅₀

세포주	445-3 의 EC ₅₀ (ug/mL)	상위(MFI)
HuT78/OX40	0.174	575
HuT78/cynoOX40	0.171	594

[0213]

[0214] **실시예 7: 445-3 Fab를 사용한 OX40의 공결정화 및 구조적 결정**

[0215] 본 개시내용의 항체에 대한 OX40의 결합 메커니즘을 이해하기 위해, OX40 및 445-3의 Fab의 공결정 구조를 해결하였다. 잔기 T148 및 N160에서의 돌연변이를 도입하여 OX40의 글리코실화를 차단하고 단백질의 균질성을 개선하였다. 돌연변이 인간 OX40을 코딩하는 DNA(2개의 돌연변이 부위, T148A 및 N160A가 있는 잔기 M1-D170)를 hexa-His 태그가 포함된 발현 벡터에 클로닝하고, 이 작제물을 37°C에서 7일 동안 단백질 발현을 위해 293G 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 수확하고 상청액을 수집하고 His 태그 친화성 수지와 함께 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 수지를 20 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl 및 30 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 3회 세정하였다. 그런 다음 OX40 단백질을 20 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl 및 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 용출한 다음, 20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl을 함유하는 완충액에서 Superdex 200(GE Healthcare)으로 추가 정제하였다.

[0216] 445-3 Fab의 중쇄 및 경쇄의 코딩 서열은 중쇄의 C-말단에 hexa-His 태그가 포함된 발현 벡터에 클로닝되었고, 이들은 7일 동안 37°C에서 단백질 발현을 위한 293G 세포로 일시적으로 동시 형질감염되었다. 445-3 Fab의 정제 단계는 상기 돌연변이 OX40 단백질에 사용된 것과 동일했다.

[0217] 정제된 OX40 및 445-3 Fab를 1:1의 물비로 혼합하고, 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션한 후 20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl을 함유하는 완충액에서 Superdex 200(GE Healthcare)로 추가 정제하였다. 복합 피크를 수집하고, 대략 30 mg/ml로 농축했다.

[0218] 단백질 복합체와 저장액을 1:1의 부피비로 혼합하여 공결정 스크리닝을 수행하였다. 0.1 M HEPES, pH 7.0, 1% PEG 2,000 MME 및 0.95 M 숙신산 나트륨을 함유하는 저장액으로 증기 확산에 의해 20°C에서 배양된 행잉 드롭(hanging drops)으로부터 공결정을 수득하였다.

[0219] 나일론 루프를 사용하여 공결정을 수확하고, 결정을 20% 글리세롤이 보충된 저장액에 10초 동안 침지시켰다. 회절 데이터는 BL17U1, Shanghai Synchrotron Radiation Facility에서 수집되었으며, XDS 프로그램으로 처리하였다. 이 단계는 IgG Fab의 구조(PDB의 사슬 C 및 D: 5CX)와 OX40의 구조(PDB의 사슬 R: 2HEV)를 분자 대체 검색 모델로 사용하는 프로그램 PHASER로 해결하였다. Phenix.refine 그래픽 인터페이스를 사용하여 강제, TLS 및 X선 데이터에 대한 통제된 미세조정을 수행한 후 COOT 프로그램으로 조정하고 Phenix.refine 프로그램에서 추가 미세조정을 수행하였다. X-선 데이터 수집 및 정제 통계는 표 7에 요약되어 있다.

표 7

데이터 수집 및 정제 통계

데이터 수집	
빔라인	BL17U1, SSRF
스페이스 그룹	P 31 2 1
세포 치수(Å)	a=183.96 b=183.96 c=79.09
각도(°)	α=90.00 β=90.00 γ=120.00
해상도(Å)	159.3-2.55 (2.63-2.55)
총 반사 횟수	988771 (81305)
고유 반사 횟수	50306 (4625)
완성도(%)	99.9 (99.9)
평균 중복	19.7 (17.6)
Rmerge ^a	0.059 (0.962)
I/시그마(I)	29.4 (3.5)
윌슨 B 인자(Å)	73.9
정제	
해상도(Å)	60.22-2.55
반사 횟수	50008
rmsd 결합 길이(Å)	0.010
rmsd 결합 각도(°)	0.856
R _{work} ^b (%)	19.27
R _{free} ^c (%)	21.60
단백질의 평균 B-인자	97.10
라마잔드란(Ramachandran) 플롯(%)	
선호됨	96.34
허용됨	3.48
이상치	0.17

괄호 안의 값은 가장 높은 해상도의 셀을 나타냄.

^aRmerge= $\sum \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum \sum_i I(h)_i$, 여기서 $\langle I(h) \rangle$ 는 등가물의 평균 강도임.

^bR_{work}= $\sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$, 여기서 F_o 및 F_c는 각각 관찰 및 계산된 구조 요인 진폭임.

^cR_{free}= $\sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|$, 테스트 데이터 세트를 사용하여 계산됨, 전체 데이터의 5%는 관찰된 반사에서 무작위로 선택됨.

[0220]

[0221]

실시예 8: SPR에 의한 항체 445-3의 에피토프 확인

[0222]

OX40 및 항체 445-3 Fab의 공결정 구조에 따라, 본 개시내용의 항-OX40 항체의 주요 에피토프를 추가로 확인하기 위해 인간 OX40 단백질에서 일련의 단일 돌연변이를 선택하고 생성했다. 단일 점 돌연변이는 부위-지정 돌연변이 유발 키트(Cat: AP231-11, TransGen)를 사용하여 인간 OX40/IgG1 융합 작제물에 만들어졌다. 원하는 돌연변이를 시퀀싱으로 확인하였다. OX40 돌연변이체의 발현 및 제조는 293G 세포로의 형질감염에 의해 달성되었고, 단백질 A 컬럼(Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences)을 사용하여 정제되었다.

[0223]

445-3 Fab에 대한 OX40 점 돌연변이체의 결합 친화도는 BIAcore 8K(GE Life Sciences)를 사용한 SPR 분석에 의해 특성화하였다. 요약하면, OX40 돌연변이체 및 야생형 OX40은 EDC 및 NHS를 사용하여 CM5 바이오센서 칩(Cat: BR100530, GE Life Sciences)에 고정화하였다. 그런 다음, HBS-EP+ 완충액(Cat: BR-1008-26, GE Life Sciences)에서 445-3 Fab의 연속 희석액을 30 μl/분으로 180초의 접촉 시간과 600초의 해리 시간을 사용하여 칩

표면 위로 흘렀다. 표면 플라즈몬 공명 신호의 변화를 분석하여 결합율(ka)과 해리율(kd)을 1:1 Langmuir 결합 모델(BIA 평가 소프트웨어, GE Life Sciences)을 이용하여 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)는 비율 kd/ka로 계산하였다. 돌연변이체의 K_D 시프트 폴드(shift fold)는 돌연변이체 K_D /WT K_D 의 비율로 계산하였다. SPR에 의해 결정된 에피토프 확인의 프로파일은 도 5 및 표 8에 요약되어 있다. 결과는 OX40에서 잔기 H153, I165 및 E167의 알라닌으로의 돌연변이가 OX40에 대한 항체 445-3 결합을 유의하게 감소시키고, 잔기 T154 및 D170의 알라닌으로의 돌연변이가 OX40에 대한 항체 445-3 결합의 적당한 감소를 가졌다.

[0224] 항체 445-3과 OX40의 잔기 H153, T154, I165, E167 및 D170 사이의 상세한 상호작용을 도 6에 나타내었다. OX40 상의 H153의 측쇄는 상호작용 계면 상의 445-3의 작은 포켓으로 둘러싸여, heavyS31 및 heavyG102와 수소 결합을 형성하고 heavyY101과 파이-파이 스택킹하였다. E167의 측쇄는 heavyY50 및 heavyN52와 수소 결합을 형성하고, D170은 각각 heavyS31 및 heavyK28과 수소 결합 및 염 브릿지를 형성하여 복합체를 더욱 안정화할 수 있다. T154와 heavyY105, I165 및 heavyR59 사이의 반 데르 발스(VDW) 상호작용은 OX40에 대한 항체 445-3의 높은 친화도에 기여했다.

[0225] 결론적으로, OX40의 잔기 H153, I165 및 E167은 항체 445-3과 상호작용하는 중요한 잔기로 확인되었다. 또한, OX40의 아미노산 T154 및 D170도 항체 445-3에 대한 중요한 접촉 잔기이다. 이 데이터는 항체 445-3의 에피토프가 OX40의 잔기 H153, T154, I165, E167 및 D170임을 나타내었다. 이들 에피토프는 진하게 표시되고 밑줄이 그어진 중요한 접촉 잔기와 함께 서열 HTLQPASNSSDAICEDRD(서열번호: 30)에 존재한다.

표 8

SPR에 의해 측정된 항체 445-3의 에피토프 확인

돌연변이체	돌연변이체 K_D /WT K_D
H153A	결합이 검출되지 않음
T154A	8
Q156A	1.9
S161A	1.1
S162A	0.6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

유의한 영향: 결합이 검출되지 않았거나, 돌연변이체 K_D /WT K_D 의 값이 10 보다 컸음. 중간 영향: 돌연변이체 K_D /WT K_D 의 값이 5 내지 10 이었음. 유의하지 않은 영향: 돌연변이체 K_D /WT K_D 의 값이 5 보다 작았음.

[0226]

[0227] **실시예 9: 항-OX40 항체 445-3은 OX40-OX40L 상호작용을 차단하지 않는다.**

[0228] 항체 445-3이 OX40-OX40L 상호작용을 차단하는지 여부를 결정하기 위해, 세포-기반 유세포 분석법을 확립하였다. 이 분석법에서, 항체 445-3, 기준 항체 1A7.gr1, 대조군 huIgG 또는 배지 단독을 무린 IgG2a Fc(OX40-mIgG2a)를 갖는 인간 OX40 융합 단백질과 함께 사전 인큐베이션하였다. 그런 다음, 항체 및 융합 단백질을 복합체를 OX40L-발현 HEK293 세포에 첨가하였다. OX40 항체가 OX40-OX40L 상호작용을 방해하지 않는다면, OX40 항체-OX40 mIgG2a 복합체는 여전히 표면 OX40L에 결합할 것이고, 이 상호작용은 항-마우스 Fc 2차 항체를 사용하여 검출할 수 있다.

[0229] 도 7에 도시된 바와 같이, 항체 445-3은 고농도에서도 OX40의 OX40L에 대한 결합을 감소시키지 않았으며, 이는 445-3이 OX40-OX40L 상호작용을 방해하지 않는다는 것을 나타낸다. 이것은 445-3이 OX40L 결합 부위에 결합하지 않거나 OX40L 결합을 입체적으로 방해할 만큼 충분히 가깝게 결합한다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 양성 대조군 항체인 1A7.gr1은 도 7에 도시된 바와 같이 OX40L에 대한 OX40 결합을 완전히 차단한다.

[0230] 또한, 445-3 Fab와의 복합체에서 OX40의 공결정 구조는 도 8에 도시된 바와 같이 해결되고, OX40/OX40L 복합체

(PDB 코드: 2HEV)와 함께 정렬되었다. OX40 리간드 삼량체는 대부분 OX40의 CRD1(시스테인이 풍부한 도메인), CRD2 및 부분적인 CRD3 영역을 통해 OX40과 상호작용하는 반면(Compaan 및 Hymowitz, 2006), 항체 445-3은 CRD4 영역을 통해서만 OX40과 상호작용한다. 요약하면, 445-3 항체와 OX40L 삼량체는 OX40의 서로 다른 각각의 영역에서 결합하고 항체 445-3은 OX40/OX40L 상호작용을 방해하지 않는다. 이 결과는 위의 실시예에서 설명된 에피토프 매핑 데이터와 상관관계가 있다. OX40의 CRD4는 아미노산 127-167에 있으며, 항체 445-3의 에피토프는 이 영역과 부분적으로 중첩된다. OX40 CRD4(아미노산 127-167)의 서열이 아래에 개시되어 있으며, 445-3 에피토프의 부분 중첩은 진한 글씨체로 밑줄이 그어져 있다: PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE(서열번호: 31).

[0231] 실시예 10: 항-OX40 항체 445-3의 작용 활성

[0232] 항체 445-3의 작용성 기능을 조사하기 위해, 445-3 또는 1A7.gr1의 존재 또는 부재하에 하룻밤동안 OX40-양성 T-세포주인 HuT78/OX40을 인공항원-제시 세포(APC)주(HEK293/OS8^{Low}-FcγRI)와 공배양하고, IL-2 생성을 T-세포 자극에 대한 판독값으로 사용하였다. HEK293/OS8^{Low}-FcγRI 세포에서, 막-결합 항-CD3 항체 OKT3(OS8)(미국 특허 제8,735,553호에 개시됨) 및 인간 FcγRI(CD64)를 코딩하는 유전자를 HEK293 세포에 안정적으로 공동 형질도입 하였다. 항-OX40 항체-유도 면역 활성화는 항체 가교에 의존하기 때문에(Voo 등, 2013), HEK293/OS8^{Low}-FcγRI의 FcγRI는 항-OX40 및 FcγRI 둘 다에 대한 항-OX40 항체의 이중 결합시 OX40의 항-OX40 항체-매개 교차-결합에 대한 기초를 제공한다. 도 9에 도시된 바와 같이, 항-OX40 항체 445-3은 0.06 ng/ml의 EC₅₀을 사용하여 용량-의존적 방식으로 TCR 신호전달을 향상시키는 데 매우 강력했다. 기준 Ab 1A7.gr1의 약간 더 약한 활성도 관찰되었다. 대조적으로, 대조군 인간 IgG(10 μg/mL) 또는 블랭크는 IL-2 생산에 영향을 미치지 않았다.

[0233] 실시예 11: 혼합 림프구 반응(MLR) 분석에서 항-OX40 항체 445-3은 면역 반응을 촉진시킴

[0234] 항체 445-3이 T 세포 활성화를 자극할 수 있는지 확인하기 위해, 혼합 림프구 반응(MLR) 분석을 이전에 설명한 대로 설정하였다(Tourkova 등, 2001). 간단히 말해서, 성숙한 DC는 GM-CSF 및 IL-4와 배양한 후 LPS 자극에 의해 인간 PBMC-유래 CD14⁺ 골수 세포로부터 유도하였다. 다음으로, 미토마이신 C-처리된 DC를 2일 동안 항-OX40 445-3 항체(0.1-10 μg/ml)의 존재 하에 동종이형 CD4⁺ T 세포와 공동 배양하였다. 공동 배양에서 IL-2 생산은 MLR 반응의 판독값으로 ELISA에 의해 검출되었다.

[0235] 도 10에 도시된 바와 같이, 항체 445-3은 IL-2 생산을 유의하게 촉진하여, CD4⁺ T-세포를 활성화시키는 445-3의 능력을 나타낸다. 대조적으로, 기준 항체 1A7.gr1은 MLR 분석법에서 유의하게($P < 0.05$) 더 약한 활성을 나타내었다.

[0236] 실시예 12: 항-OX40 항체 445-3은 ADCC 활성을 나타냄

[0237] 젖산 탈수소효소(LDH) 방출-기반 ADCC 분석을 설정하여 항체 445-3이 OX40^{Hi} 발현 표적 세포를 사멸시킬 수 있는지 여부를 조사했다. NK92MI/CD16V 세포주는 *CD16v158*(V158 대립유전자) 및 *FcγRγ* 유전자를 NK 세포주인 NK92MI(ATCC, Manassas VA)에 공동 형질도입함으로써 이펙터 세포로 생성되었다. OX40-발현 T-세포주 HuT78/OX40을 표적 세포로 사용하였다. 동일한 수(3×10^4)의 표적 세포 및 이펙터 세포를 항-OX40 항체(0.004-3 μg/ml) 또는 대조군 Ab의 존재 하에 5시간 동안 공동 배양하였다. 세포독성은 CytoTox 96 비-방사성 세포독성 분석 키트(Promega, Madison, WI)를 사용하여 LDH 방출에 의해 평가하였다. 특이적 용해는 하기 식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ 특이적 용해} = \frac{\text{실험적} - \text{이펙터 자발적} - \text{표적 자발적}}{\text{표적 최대} - \text{표적 자발적}} \times 100$$

[0238] 도 11에 나타낸 바와 같이, 항체 445-3은 용량-의존적 방식으로 ADCC를 통해 OX40^{Hi} 표적을 사멸시키는 높은 효능을 나타내었다(EC₅₀: 0.027 μg/mL). 항체 445-3의 ADCC 효과는 1A7.gr1 대조군 항체의 효과와 유사하였다. 대조적으로, S228P 및 R409K 돌연변이가 있는 IgG4 Fc 포맷을 갖는 445-3(445-3-IgG4)은 대조군 인간 IgG 또는 블랭크와 비교하여 어떠한 유의미한 ADCC 효과도 나타내지 않았다. 결과는 IgG4 Fc가 ADCC에 대해 약하거나 침묵하다는 이전 발견과 일치한다(An Z, 등 mAb 2009).

[0240] 실시예 13: 항-OX40 항체 445-3은 시험관 내에서 CD4⁺ Treg를 우선적으로 고갈시키고 CD8⁺ Teff/Treg 비율을 증가시킨다

[0241] 여러 동물 종양 모델에서 항-OX40 항체가 종양-침윤성 OX40^{hi} Treg를 고갈시키고 CD8⁺ T 세포 대 Treg의 비율을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다(Bulliard 등, 2014; Carboni 등, 2003; Jacquemin 등, 2015, Marabelle 등, 2013b). 결과적으로, 면역 반응이 향상되어 종양 퇴행과 생존율이 향상되었다.

[0242] 시험관내 활성화 또는 종양내 CD4⁺Foxp3⁺ Treg가 다른 T-세포 서브세트보다 OX40을 우선적으로 발현한다는 사실을 감안할 때(Lai 등, 2016; Marabelle 등, 2013b; Montler 등, 2016; Soroosh 등, 2007; Timperi 등, 2016), 인간 PBMC-기반 분석을 설정하여 OX40^{hi} 세포, 특히 Treg를 사멸시키는 항체 445-3의 능력을 조사하였다. 간단히 말해서, PBMC는 OX40 발현 유도를 위해 PHA-L(1 µg/mL)에 의해 1일 동안 사전-활성화되었고 표적 세포로 사용하였다. 이펙터 NK92MI/CD16V 세포(실시예 12에 기재된 바와 같음, 5x10⁴)를 항-OX40 항체(0.001~10 µg/mL) 또는 위약의 존재 하에 동일한 수의 표적 세포와 밤새 공동-배양하였다. 각 T-세포 서브세트의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정되었다. 도 12a 및 12b에 도시된 바와 같이, 항체 445-3 처리는 용량-의존적 방식으로 CD8⁺ T 세포의 백분율 증가 및 CD4⁺Foxp3⁺ Treg의 백분율 감소를 유도하였다. 그 결과, Treg에 대한 CD8⁺ T 세포의 비율이 크게 개선되었다(도 12c). 1A7.gr1 처리로 더 약한 결과를 얻었다. 이 결과는 CD8⁺ T 세포 기능을 증가시키지만 Treg-매개 면역 관용을 제한함으로써 항종양 면역을 유도하는 445-3의 치료적 용도를 입증한다.

[0243] 실시예 14: 항-OX40 항체 445-3은 마우스 종양 모델에서 용량-의존적 항종양 활성을 발휘함

[0244] 항-OX40 항체 445-3의 효능은 마우스 종양 모델에서 나타났다. 무린 MC38 결장 종양 세포를 인간 OX40에 대해 형질전환된 C57 마우스(BiocytoGen, Beijing China)에 피하 이식하였다. 종양 세포를 이식한 후 종양 부피를 매주 2회 측정하고, 식: $V = 0.5(a \times b^2)$ 을 사용하여 mm³로 계산했으며, 여기서 a와 b는 각각 종양의 장경 및 단경이다. 종양 크기가 약 190 mm³의 평균 부피에 도달했을 때, 마우스를 7개 그룹으로 무작위로 할당하고 3주 동안 매주 1회 445-3 또는 1A7.gr1 항체를 복강내 주사하였다. 인간 IgG를 이소형 대조군으로 투여하였다. 부분 회귀(PR)는 3회의 연속 측정에서 투여 첫날 시작 종양 부피의 50%보다 작은 종양 부피로 정의되었다. 종양 성장 억제(TGI)는 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0245]
$$\% \text{ 성장 억제} = 100 \times \left(1 - \frac{(\text{처리된 } t) - (\text{처리된 } t_0)}{(\text{위약 } t) - (\text{위약 } t_0)} \right)$$

[0246] 처리된 t = 시간 t에서 처리된 종양 부피

[0247] 처리된 t₀ = 시간 0에서 처리된 종양 부피

[0248] 위약 t = 시간 t에서의 위약 종양 부피

[0249] 위약 t₀ = 시간 0에서의 위약 종양 부피

[0250] 결과는 445-3이 0.4 mg/kg, 2 mg/kg 및 10 mg/kg의 용량으로 복강내 주사로서 용량-의존적 항종양 효능을 가짐을 입증하였다. 445-3의 투여는 53%(0.4 mg/kg), 69%(2 mg/kg) 및 94%(10 mg/kg) 종양 성장 억제를 가져왔고, 기준선에서 0%(0.4 mg/kg), 17%(2 mg/kg) 및 33%(10 mg/kg) 부분 회귀를 초래하였다. 대조적으로, 항체 1A7.gr1에 의한 부분 회귀는 관찰되지 않았다. 생체내 데이터는 리간드-비차단 항체 445-3이 OX40-OX40L 차단 항체 1A7.gr1보다 항종양 요법에 더 적합함을 나타낸다(도 13a 및 13b, 표 9).

표 9

뮤린 MC38 결장 종양 마우스 모델에서 445-3 및 1A7.gr1 의 효능

처리	QW 용량 (mg/kg)	N	부분적 회귀율	21 일차 평균 종양 부피(mm ³)	21 일차 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

[0251]

[0252] 실시예 15: 항-OX40 항체의 아미노산 변경

[0253] OX40 항체의 개선을 위한 변경을 위해 여러 아미노산을 선택하였다. 친화도를 향상시키거나 인간화를 증가시키기 위해 아미노산을 변경시켰다. 적당한 아미노산 변경을 위해 PCR 프라이머 세트를 설계하고, 합성하여 항-OX40 항체를 변형시키는 데 사용하였다. 예를 들어, 중쇄의 K28T 및 경쇄의 S24R의 변경은 원래의 445-2 항체에 비해 FACS에 의해 결정된 EC₅₀에 대해 1.7배 증가를 초래했다. 중쇄의 Y27G 및 경쇄의 S24R의 변경은 원래의 445-2 항체에 비해 Biacore에 의해 결정된 K_D에 대해 1.7배 증가를 초래했다. 이러한 변경 사항은 도 14a~14b에 요약되어 있다.

[0254] 실시예 16: MMTV-PyMT 동계 마우스 모델에서 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체

[0255] MMTV-PyMT는 유방암 전이의 마우스 모델이며, 여기서 MMTV-LTR은 유선에서 폴리오마바이러스 중간 T-항원을 과 발현하는데 사용된다. 마우스는 매우 전이성인 종양을 발생시키며, 이 모델은 일반적으로 유방암 진행을 연구하는 데 사용한다.

[0256] 암컷 FVB/N 마우스에 MMTV-PyMT 형질전환 마우스에서 자발적으로 발달된 종양으로부터 생성된 1 x 10⁶ MMTV-PyMT 종양 세포를 유방내 이식하였다. 8일 동안 접종한 후, 동물을 무작위로 4개 그룹으로 나누었으며, 각 그룹에는 15마리의 동물이 있었다. 그런 다음, 마우스를 양성 대조군으로 비히클(PBS)로 처리하였다.

[0257] OX86은 이전에 W02016/057667에 개시된 래트 항-마우스 OX40 항체이며, 마우스 연구에서 이의 면역원성을 감소시키고 또한 이의 Fc-매개 기능을 유지하기 위해 마우스 IgG2a 불변 영역으로 추가로 조작하였다. OX86의 VH 및 VL 영역은 하기에 제공된다. 과학 문헌에서 이전에 보고된 바와 같이, OX86은 OX40과 OX40 리간드 사이의 상호 작용을 차단하지 않는다는 점에서 항체 445-3과 유사한 작용 기전을 가지고 있다(al-Shamkhani Al, 등, Euro J. Immunol (1996) 26(8);1695-9, Zhang, P. 등 Cell Reports 27, 3117-3123).

[0258]

[0259] 뮤린 특이적 항-TIM3 항체(RMT3-23)는 Bioxcell(New Hampshire Cat #BP0115)에서 구입하고, 복강내 주사에 의해 일주일에 1회 3 mg/kg으로 투여하였다. RMT3-23과 조합된 OX86은 단독요법에 대해 위에 기술된 것과 동일한 용량으로 조합 요법으로서 투여되었다. 종양 부피와 체중은 캘리퍼스를 사용하여 2차원에서 매주 2회 측정하고, 식: $V = 0.5(a \times b^2)$ 을 사용하여 mm³로 계산했으며, 여기서 a와 b는 각각 종양의 장경 및 단경이다. 데이터는 평균 종양 부피±평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다. 종양 성장 억제(TGI)는 하기 식을 사용하여 계산하였다:

$$\% \text{성장 억제} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{처리된 } t) - (\text{처리된 } t_0)}{(\text{위약 } t) - (\text{위약 } t_0)} \right) \right)$$

[0260]

[0261]

[0262]

[0263]

[0264]

[0265]

[0266]

처리된 t = 시간 t에서 처리된 종양 부피

처리된 t₀ = 시간 0에서 처리된 종양 부피

위약 t = 시간 t에서의 위약 종양 부피

위약 t₀ = 시간 0에서의 위약 종양 부피

RMT3-23과 조합된 OX86의 치료에 대한 MMTV-PyMT 동계 모델의 반응은 도 15 및 표 10에 제시되어 있다. 21일째에, 각 단일 제제로서 투여된 OX86 및 RTM3-23은 각각 31% 및 -5%의 TGI로 종양 성장을 억제하였다. 대조적으로, RTM3-23과 조합된 OX86은 63%의 TGI로 항종양 활성을 유의하게 향상시켰고, 단일 제제로 투여했을 때 OX86에 비해 32% 증가했으며, RTM3-23 TGI의 명확한 증가를 보였으며, 이는 PBS 대조군과 유사하게 작용하였다(p < 0.001, 조합 대 비히클, p < 0.01, 조합 대 OX86 단독요법, p < 0.001, 조합 대 RMT3-23 단독요법).

이 데이터는 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체가 단독으로 투여된 제제보다 더 효과적임을 나타내었다. 병용 요법은 연구 전반에 걸쳐 모든 치료 그룹에서 동물 체중에 유의한 영향을 미치지 않았다.

표 10

뮤린 유방암 모델에서 항-OX40 및 항-TIM3 항체의 조합 효능

시험 물질	용량 (mg/Kg)	N	21 일차 TGI(%)	21 일차 평균 종양 부피(mm ³ ; 평균 ± SEM)	21 일차 p (대 조합 그룹)
비히클	0	15	-	587.3 ± 45.9	0.0000
OX86	0.4	15	31	404.7 ± 50.8	0.0046
RMT3-23	3	15	-5	614.6 ± 45.0	0.0000
OX86 + RMT3-23	0.4+3	15	63	219.7 ± 29.7	N/A ^b

^a 모든 용량은 1 주일에 1 회 투여됨. ^b 해당되지 않음

[0267]

[0268]

[0269]

[0270]

실시예 17: 마우스 신장암 모델에서 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체

암컷 BALB/c 마우스의 오른쪽 옆구리에 100 μL PBS 중 2×10⁵ 신장암(Renca) 세포를 피하 이식하였다. 8일 동안 접종한 후, 동물을 접종 순서에 따라 각 그룹에 동물 15마리씩 4개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 8일 동안 접종한 후, 동물을 각 그룹에 동물 15마리씩 동물 4개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 그런 다음 마우스를 대조군으로서 비히클(PBS)로 처리하였다. 단일 제제 요법으로서, 뮤린 특이적 항-OX40 항체(OX86)는 복강내 주사에 의해 주당 1회(QW) 0.4 mg/kg을 투여하였다. 뮤린 특이적 항-TIM3 항체(RMT3-23, 상기 기재됨)를 복강내 주사에 의해 3 mg/kg QW로 투여하였다. 조합 요법으로서, RMT3-23과 조합된 OX86 항체는 각각의 개별 항체에 대해 상기 기재된 바와 같은 동일한 용량 및 경로로 투여하였다. 마우스를 종양 부피 및 체중에 대해 매주 2회 검사하였다.

RMT3-23 치료와 조합된 OX86에 대한 Renca 동계 마우스 모델의 반응은 도 16 및 표 11에 제시되어 있다. 17일째에, OX86 및 RTM3-23 단일요법은 각각 61% 및 2%의 TGI로 종양 성장을 억제하였다. 단일 제제로서의 RTM3-23 처리는 PBS 대조군과 매우 유사하였다. 대조적으로, RTM3-23과 조합된 OX86을 사용한 치료는 80%의 TGI(p < 0.001, 조합 대 비히클)로 유의하게 개선된 항종양 활성을 입증하였다. 이 데이터는 항-TIM3 항체와 조합된 OX40 항체가 이 마우스 신장암 모델에서 효과적임을 나타냈다. 연구 전반에 걸쳐 어떤 처리군에서도 동물 체중에 대한 유의한 영향은 관찰되지 않았다.

표 11

Renca 동계 모델에서 OX86 및 TIM3 항체의 조합 효능

시험 물품	용량 (mg/Kg)	N	17 일차 TGI(%)	17 일차 평균 종양 부피(mm ³ ; 평균 ± SEM)	17 일차 p (대 조합 그룹)
비히클	0	15	-	1255.6 ± 159.1	0.0001
OX86	0.4	15	61	495.4 ± 153.5	0.1466
RMT3-23	3	15	2	1224.4 ± 104.9	0.0000
OX86 + RMT3-23	0.4 + 3	15	80	245.6 ± 59.7	N/A ^b

^a모든 용량은 1 주일에 1 회 투여됨. ^b 해당되지 않음

[0271]

[0272]

참고문헌

[0273]

1. al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, 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, 1695-1699.

[0274]

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.

[0275]

3. Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB 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.

[0276]

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.

[0277]

5. Bulliard, Y., Jolicoeur, R., Zhang, J., Dranoff, G., Wilson, N.S., and Brogdon, J.L. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγR3s, leading to antitumor efficacy. *Immunology and cell biology* 92, 475-480.

[0278]

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.

[0279]

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.

[0280]

8. Compaan, D.M., and Hymowitz, S.G. (2006). The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* 14, 1321-1330.

[0281]

9. Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annual review of immunology* 28, 57-78.

[0282]

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.

[0283]

11. Curti, B.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwssen, T., Fox, B.A., 등 (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in

late-stage cancer patients. *Cancer research* 73, 7189-7198.

- [0284] 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.
- [0285] 13. Gough, M.J., and Weinberg, A.D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Advances in experimental medicine and biology* 647, 94-107.
- [0286] 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.
- [0287] 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.
- [0288] 16. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- [0289] 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.
- [0290] 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.
- [0291] 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.
- [0292] 20. Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., 등 (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159-1170.
- [0293] 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.
- [0294] 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.
- [0295] 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., 등 (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.
- [0296] 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.
- [0297] 25. Marabelle, A., Kohrt, H., Sagiv-Barfi, I., Ajami, B., Axtell, R.C., Zhou, G., Rajapaksa, R., Green, M.R., Torchia, J., Brody, J., 등 (2013b). Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of clinical investigation* 123, 2447-2463.
- [0298] 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.
- [0299] 27. Morris, N.P., Peters, C., Montler, R., Hu, H.M., Curti, B.D., Urba, W.J., and Weinberg, A.D.

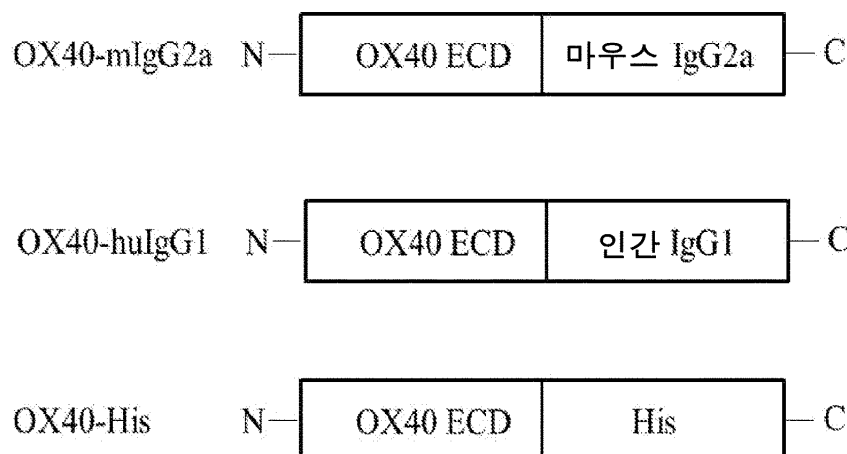
(2007). Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.

- [0300] 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.
- [0301] 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.
- [0302] 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.
- [0303] 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.
- [0304] 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.
- [0305] 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.
- [0306] 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.
- [0307] 35. Smyth, M.J., Ngiow, S.F., and Teng, M.W. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. *Immunology and cell biology* 92, 473-474.
- [0308] 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.
- [0309] 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.
- [0310] 38. Song, J., So, T., and Croft, M. (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol* 180, 7240-7248.
- [0311] 39. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *J Immunol* 179, 5014-5023.
- [0312] 40. St Rose, M.C., Taylor, R.A., Bandyopadhyay, S., Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Vella, A.T., and Adler, A.J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-gamma maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and cell biology* 91, 173-183.
- [0313] 41. Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., and Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507-521.
- [0314] 42. Szybowska, A., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Luczynski, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4(+)CD25(high) cells in children with type 1 diabetes. *Advances in medical sciences* 59, 39-43.
- [0315] 43. Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., Caronna, R., Del Bene, G., Longo, F., Ciardi, A., 등 (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 5, e1175800.
- [0316] 44. Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunology letters* 78, 75-82.

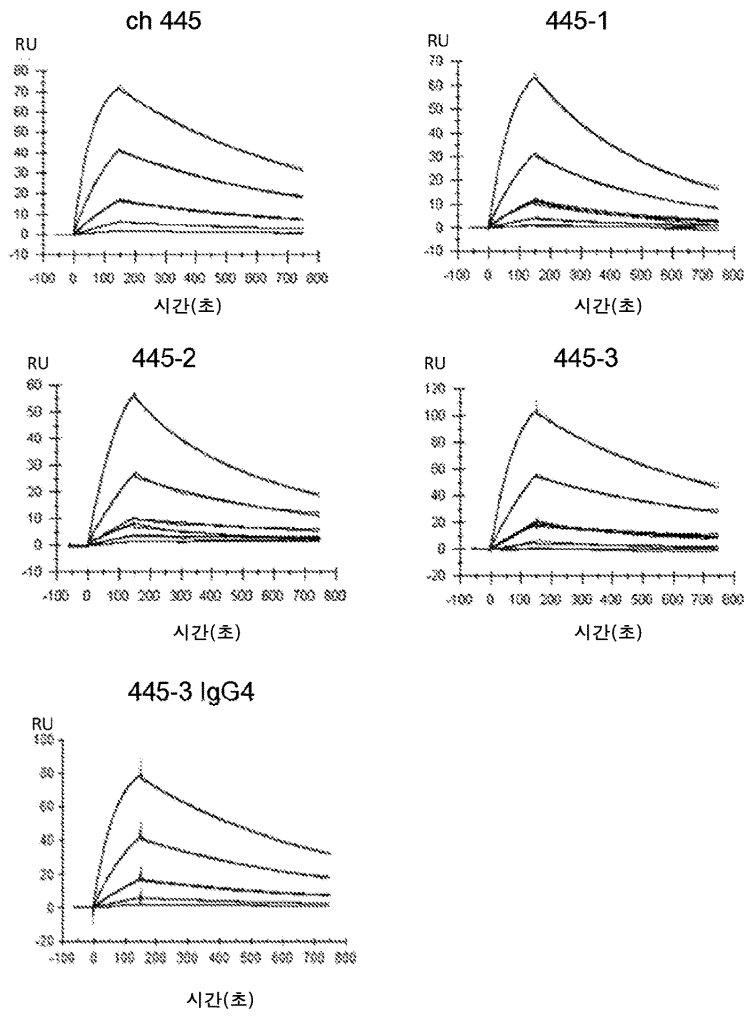
- [0317] 45. Vetto, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M., and Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *American journal of surgery* 174, 258-265.
- [0318] 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.
- [0319] 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.
- [0320] 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.
- [0321] 49. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M.S. (2017). OX40: Structure and function - What questions remain? *Molecular immunology* 83, 13-22.
- [0322] 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.
- [0323] 51. Zhang, T., Lemoi, B.A., and Sentman, C.L. (2005). Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood* 106, 1544-1551.
- [0324] 52. Zhang, P., Tu H. G., Wei. J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., 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.
- [0325] 53. al-Shamkhani Al, Birkeland ML, Puklavec M, Brown MH, James W, Barclay AN. (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(8):1695-9.

도면

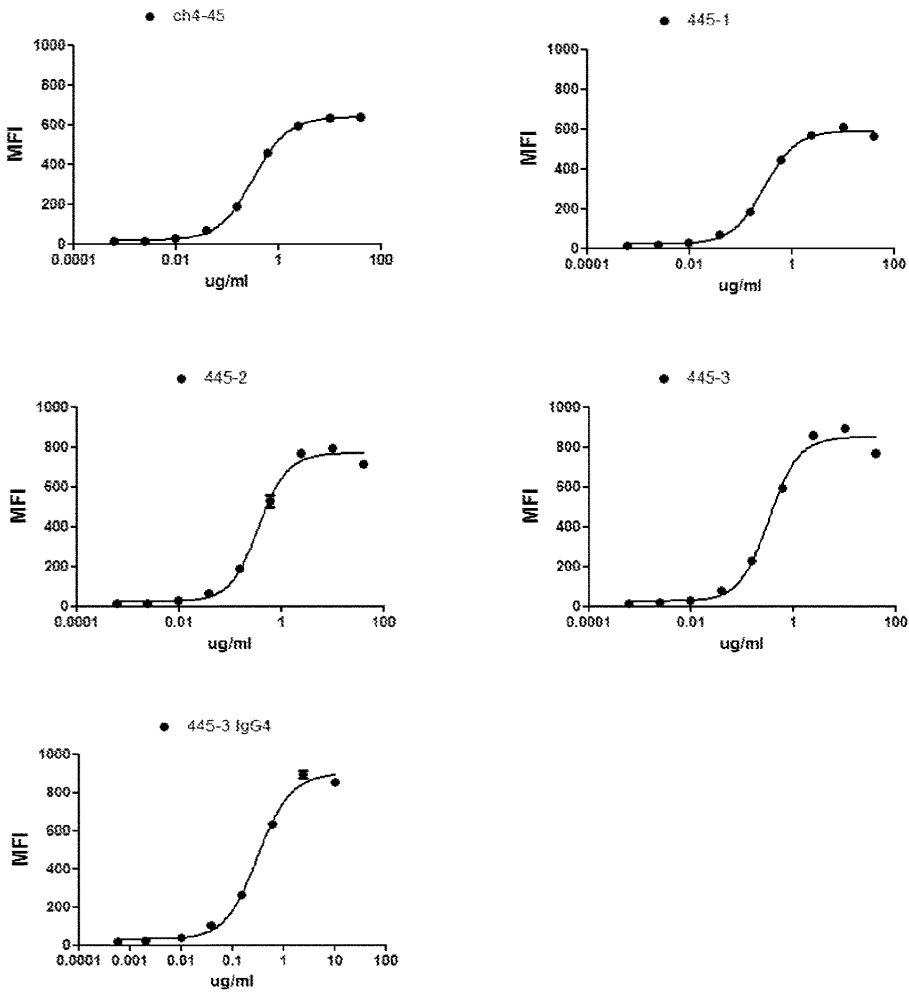
도면1



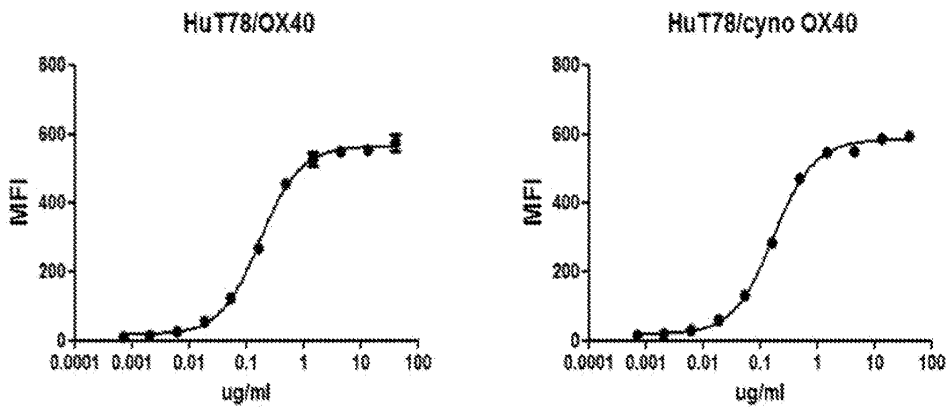
도면2



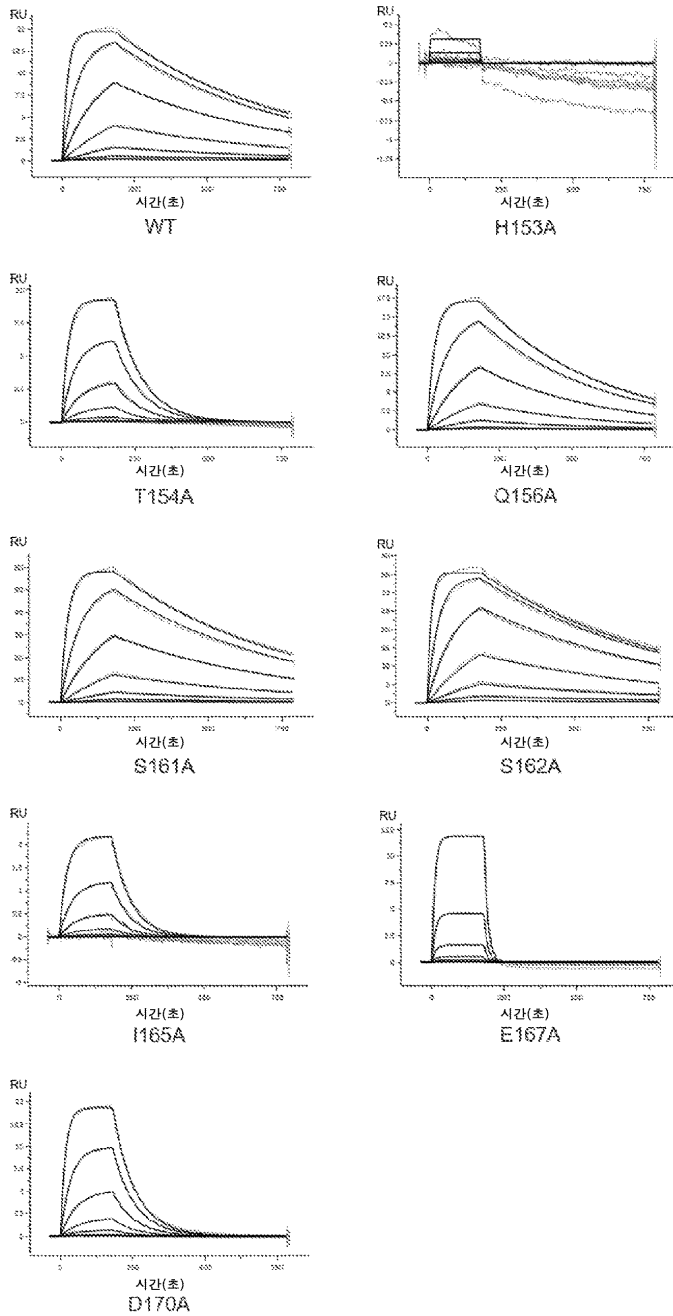
도면3



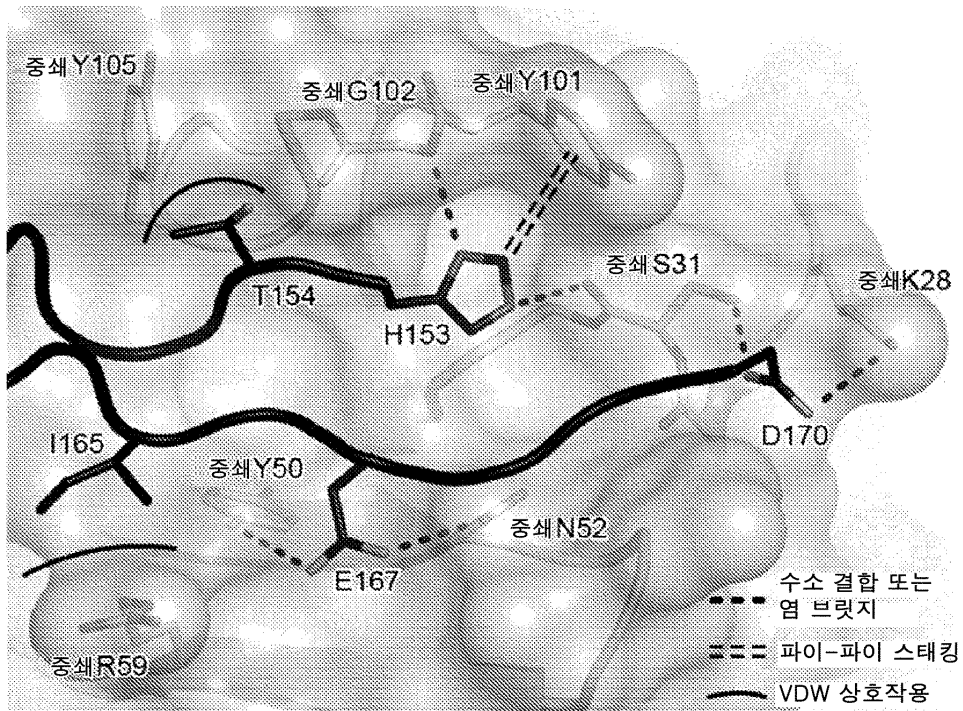
도면4



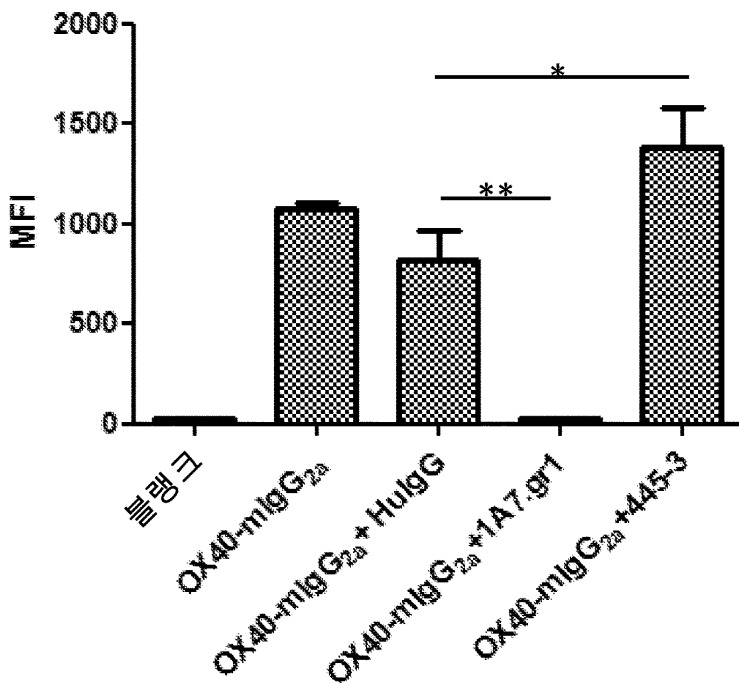
도면5



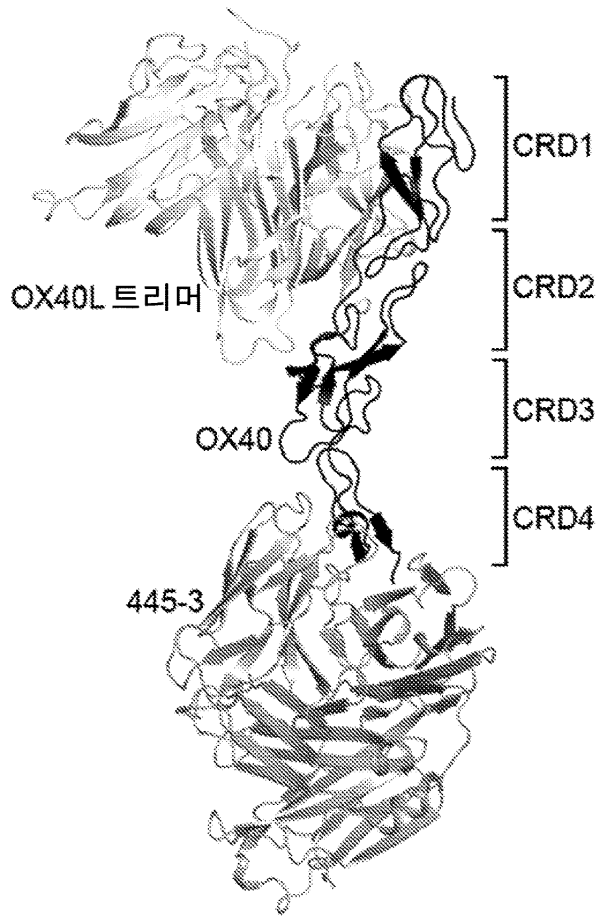
도면6



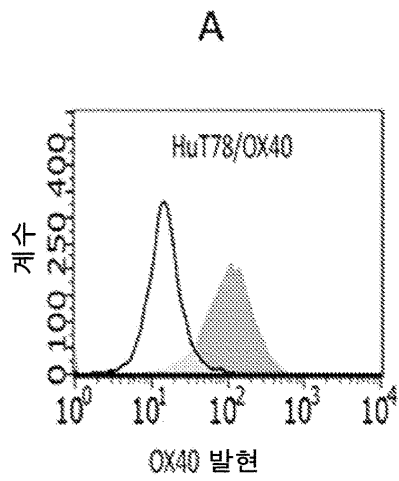
도면7



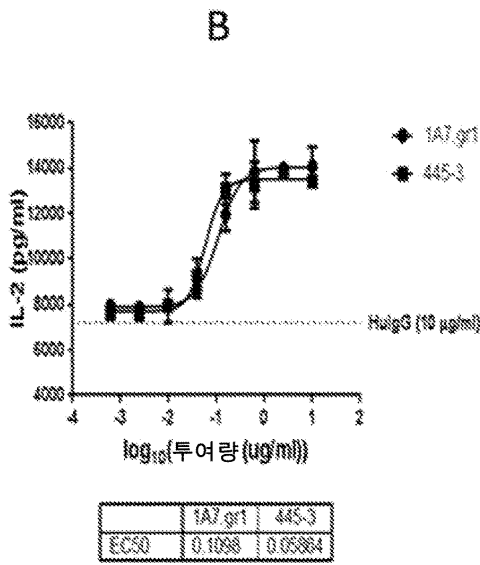
도면8



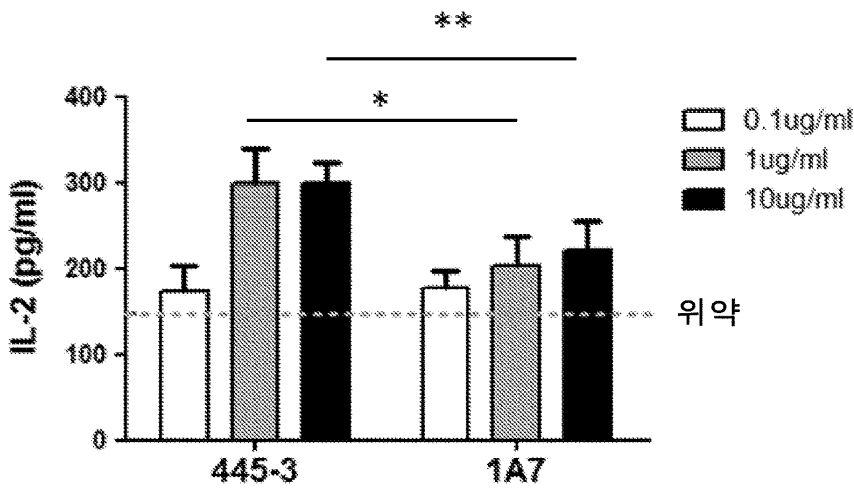
도면9a



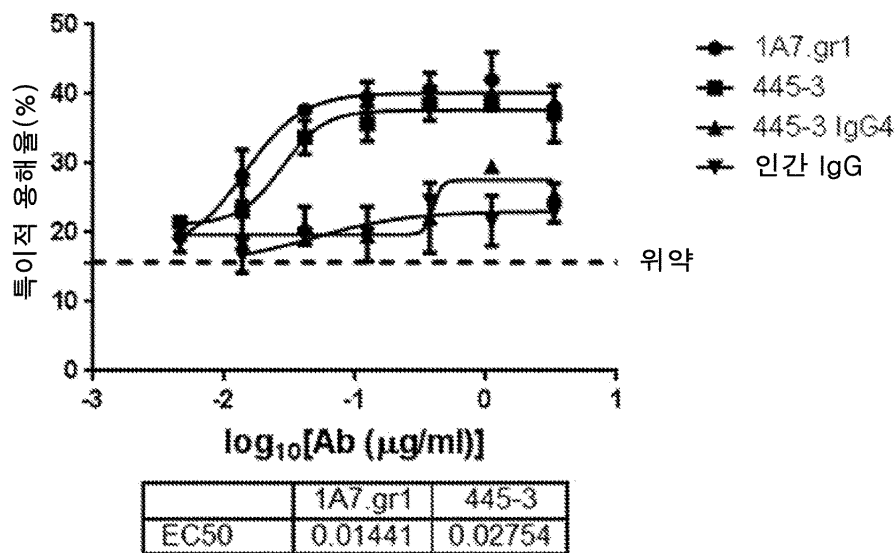
도면9b



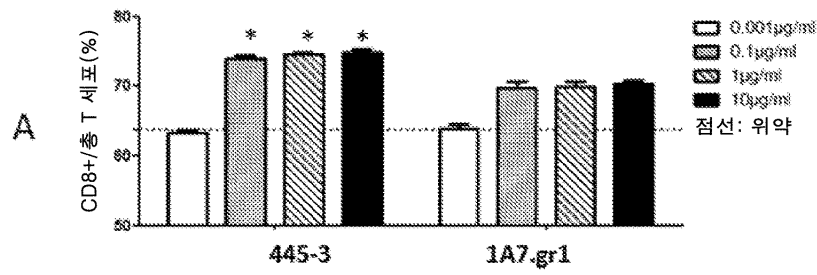
도면10



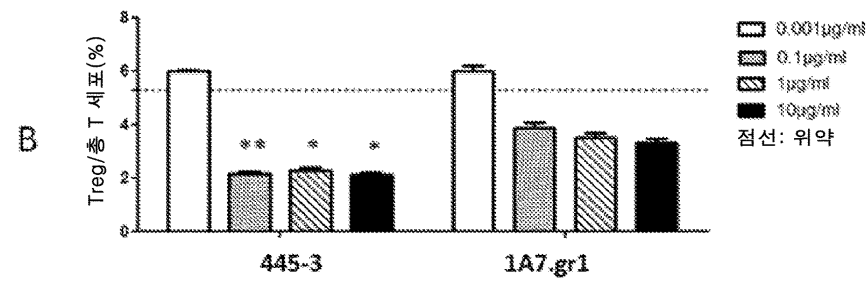
도면11



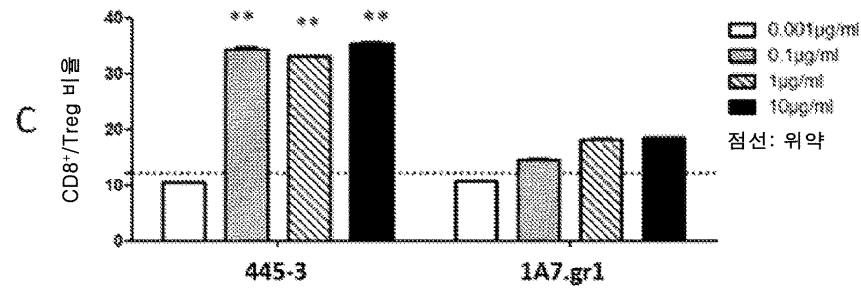
도면12a



도면12b

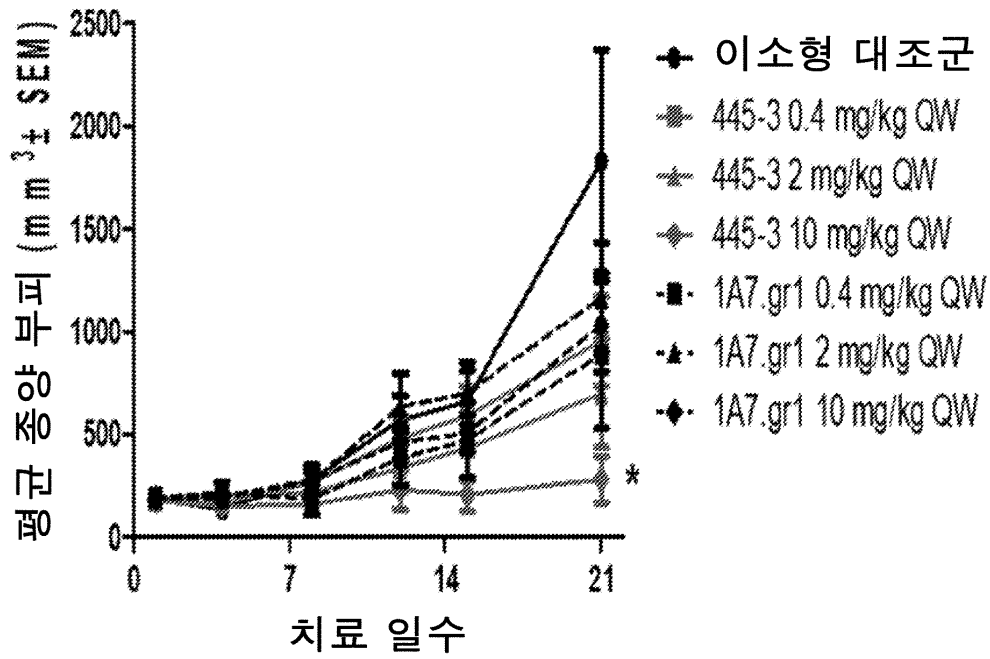


도면12c

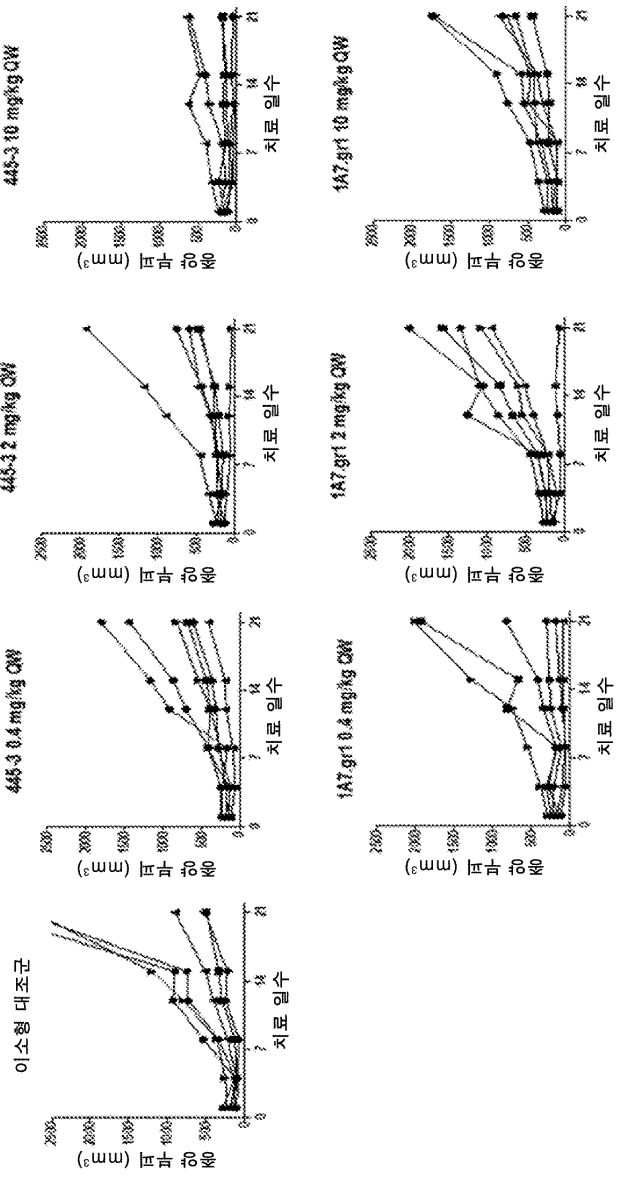


도면13a

종양 성장



도면13b



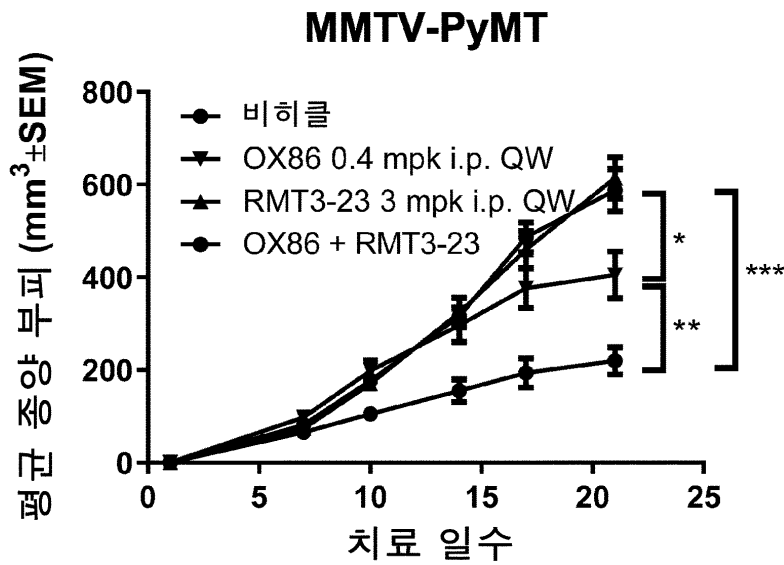
도면14a

중쇄		경쇄		중쇄와 경쇄에 의한 동시항결집염		FACS		Biacore	
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC ₅₀ (ng/ml)	Top(MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)
445-1VH	-	445-1VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.89E+03	1.64E-08
445-1VH-M48I	FR2	445-1VL	-	445-2(M48I)-1 (VH 상에 M48I 돌연변이를 갖는 445-1)	353	480	2.30E+05	3.56E+03	1.55E-08
445-1VH	-	445-1VL-S24G	CDR1	445-1-2(S24G) (VL 상에 S24G 돌연변이를 갖는 445-1)	307	470	2.22E+05	3.60E+03	1.62E-08
445-1VH	-	445-1VL-S10T/EB1D/D70E	FR1/FR3	445-1-2(S10T/EB1D/D70E) (VL 상에 S10T, EB1D 및 D70E 돌연변이를 갖는 445-1)	280	510	2.28E+05	3.40E+03	1.49E-08

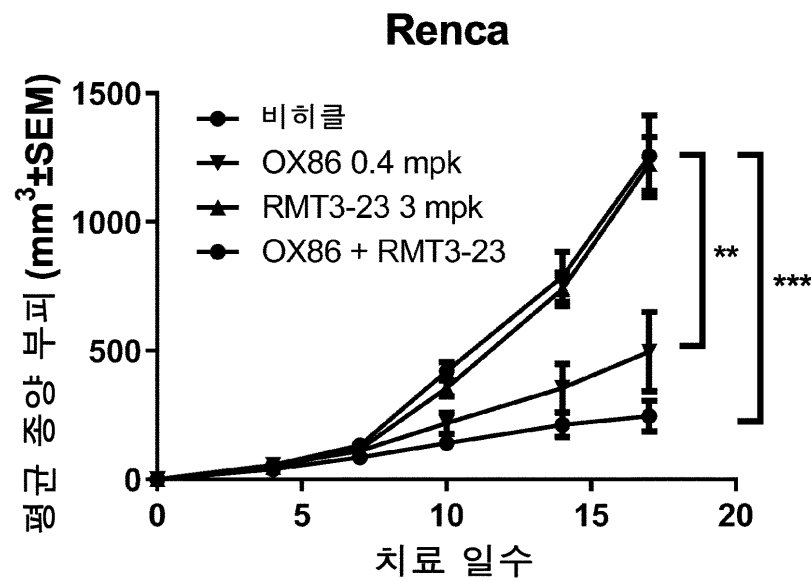
도면14b

중쇄		경쇄		중쇄와 경쇄에 의한 동시형질감염	FACS		Biacore	
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR		EC ₅₀ (ng/ml)	Top0(MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd (M)
445-2VH	-	445-2VL	-	445-2	397	760	2.06E+05	2.64E-03
445-2VH-Q62E-Q65K	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E/Q65K)-3(S24R) (VH 상에 Q62E 및 Q65K 돌연변이를 갖고 VL 상에 S24R 돌연변이를 갖는 445-2)	318	790	1.87E+05	2.32E-03
445-2VH-Q62E	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E)-3(S24R) (VH 상에 Q62E 돌연변이를 갖고 VL 상에 S24R 돌연변이를 갖는 445-2)	363	760	1.94E+05	2.27E-03
445-2VH-K28T	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(K28T)-3(S24R) (VH 상에 K28T 돌연변이를 갖고 VL 상에 S24R 돌연변이를 갖는 445-2)	660	750	4.44E+05	5.74E-03
445-2VH-Y27G	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Y27G)-3(S24R) (VH 상에 Y27G 돌연변이를 갖고 VL 상에 S24R 돌연변이를 갖는 445-2)	755	630	6.23E+04	1.35E-03
445-2VH-T30S	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(T30S)-3(S24R) (VH 상에 T30S 돌연변이를 갖고 VL 상에 S24R 돌연변이를 갖는 445-2)	405	800	2.91E+05	3.81E-03
445-3VH	-	445-3VL	-	445-3	462	990	1.74E+05	1.48E-03
445-2VH-A61N-K28R	CDR2/FR1	445-3VL	-	445-3(A61N/K28R)-3 (A61N 및 K28R 돌연변이를 갖는 445-2 VH 및 445-3 VL)	369	1080	1.57E+05	1.15E-03
445-2VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N/K63R)-3 (A61N 및 K63R 돌연변이를 갖는 445-2 VH 및 445-3 VL)	483	1100	1.61E+05	1.55E-03
445-3VH	-	445-2VL-GH-ID-K42G-S24R-K93R	FR2/CDR1/CDR3	445-3-3(CH-ID-K42G-S24R-K93R) (G41D, K42G, S24R 및 K93R 돌연변이를 갖는 445-3 VH 및 445-2 VL)	337	1050	2.12E+05	1.68E-03

도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BeiGene, Ltd.
 Jiang, Beibei
 Liu, Ye,
 Song, Xiaomin

<120> METHODS OF CANCER TREATMENT USING ANTI-OX40 ANTIBODIES IN COMBINATION WITH ANTI-TIM3 ANTIBODIES

<130> BGB22305-00PCT

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val

20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro

35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

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

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro

165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu

195 200 205
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala

210 215

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

Ser Tyr Ile Ile His
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Ile Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

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

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

 Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-1 VH DNA

<400> 15

caggtgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
 ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgacgg cacacggtac 180
 aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acaagcgata agtctaccag cacagcctat 240

atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300
 tatggctcct cttacgcat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc 360

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-1 VK pro

<400> 16

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210

> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-1 VK DNA

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgct ctgtggcgga tagggtagacc 60

atcacatgca ggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120

ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac acctctacac tgtatagcgg cgtgcctcc 180

agattctctg gcagcggctc cggaaccgac tacaccctga caatctctag cctgcagccc 240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300

ggcacaagg tggagatcaa g 321

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 HCDR2

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 LCDR2

<400> 19

Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser

1 5

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 VH pro

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 VH DNA

<400> 21

caggtgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac 180

gcccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat 240

atggagctgt ctacgctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300

tatggctcct cttacgcat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc 360

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 VK pro

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-2 VK DNA

<400> 23

gacatccaga tgacccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc 60

atcacatgca ggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120

ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc 180

agattctctg gcagcgctc cggaaccgac ttcacctga caatctctag cctgcagccc 240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300

ggcacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 HCDR2

<400> 24

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

1

5

10

15

Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 LCDR1

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1

5

10

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 VH pro

<400> 26

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

 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 VH DNA

<400> 27

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca 120
 ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac 180
 aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat 240
 atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac 300

 tatggctcct cttacgcat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc 360

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 VK pro

<400> 28

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Ile Lys Leu Leu Ile

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 29

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 445-3 VK DNA

<400> 29

gacatccaga tgaccagtc tccagctcc ctgtccgct ctgtgggcga tagggtgacc 60

atcacatgcc gggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca 120

gacggcgcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgcctcc 180

agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttcacctga caatctctag cctgcagccc 240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc 300

ggcacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp

1 5 10 15

Arg Asp

<210> 31

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys

1 5 10 15

Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala

 20 25 30

Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu

 35 40

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 32

Arg Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-2 HCDR2

<400> 33

Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 34

Gly Arg Glu Ala Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 35

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 36

Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-2 LCDR3

<400> 37

Gln Gln Ser Leu Lys Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-2 VH pro

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Arg Glu Ala Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-2 VH DNA

<400> 39

gaagtgcagc tggtcgaatc aggggggggg ctggtgcagc ctggaggcag cctgagactg 60

tcctgcgcc ctctggctt cacctttagc agatacgcca tgtctgggt gcggcaggct 120

cctggcaagg gactggagtg ggtggccgct atcagctccg gcggtccct gtactatccc 180

gattccgtga agggccggtt caccatcagc agggacaacg ccaagaacac actgtatctg 240

cagatgaact ctctgagggc cgaggataca gccgtgtact attgcgctcg gggcagagaa 300

gcagatggcg gctacttcga ctattggggc cagggcaccc tgggtacagt gtctagc 357

<210> 40

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-3b VK pro

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Ile Pro Ala

 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

<210> 41

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu425-2-3b VK DNA

<400> 41

gagatcgtcc tgactcagtc ccctgccact ctgtcagtga gcccaggaga gcgagctacc 60

ctgtcctgca gagcatccga gtctgtcgaa tactatggca cctctctgat gcagtggtac 120

cagcagaagc cagggcaggc tcccaggctg ctgatctatg ccgcttctaa cgtggagagt 180

ggcatcccag cacgcttcag tggctcaggg agcggaacag agtttacct gacaattagc 240

tcctgcaga gtgaagattt gcacctgtac tattgccagc agagcctgaa ggtcccctg 300

acatttggcg ggggaactaa ggtggagatc aaa 333

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 42

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Arg Met Arg Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Val Leu Lys

 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr

 85 90 95

Arg Asp Gly Arg Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met

 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 43

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Asp Gly Gln Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

