



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201619200 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：104132442 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 01 日

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

(30) 優先權：2014/10/10 美國 62/062,431

(71) 申請人：麥迪紐有限責任公司 (美國) MEDIMMUNE, LLC (US)
 美國

(72) 發明人：漢蒙德 史考特 HAMMOND, SCOTT (US)；歐柏斯特 麥可 OBERST, MICHAEL
 (US)；杜 群 DU, QUN (US)；丹舒羅德 梅麗莎 DAMSCHRODER, MELISSA
 (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：70 項 圖式數：46 共 289 頁

(54) 名稱

人類化抗-OX40 抗體及其用途

HUMANIZED ANTI-OX40 ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明提供人類化抗-OX40 抗體。亦提供製造此等抗體之方法及使用(例如治療癌症)之方法。

The disclosure provides humanized anti-OX40 antibodies. Also provided are methods of making such antibodies, and methods of use, e.g., treatment of cancer.

指定代表圖：

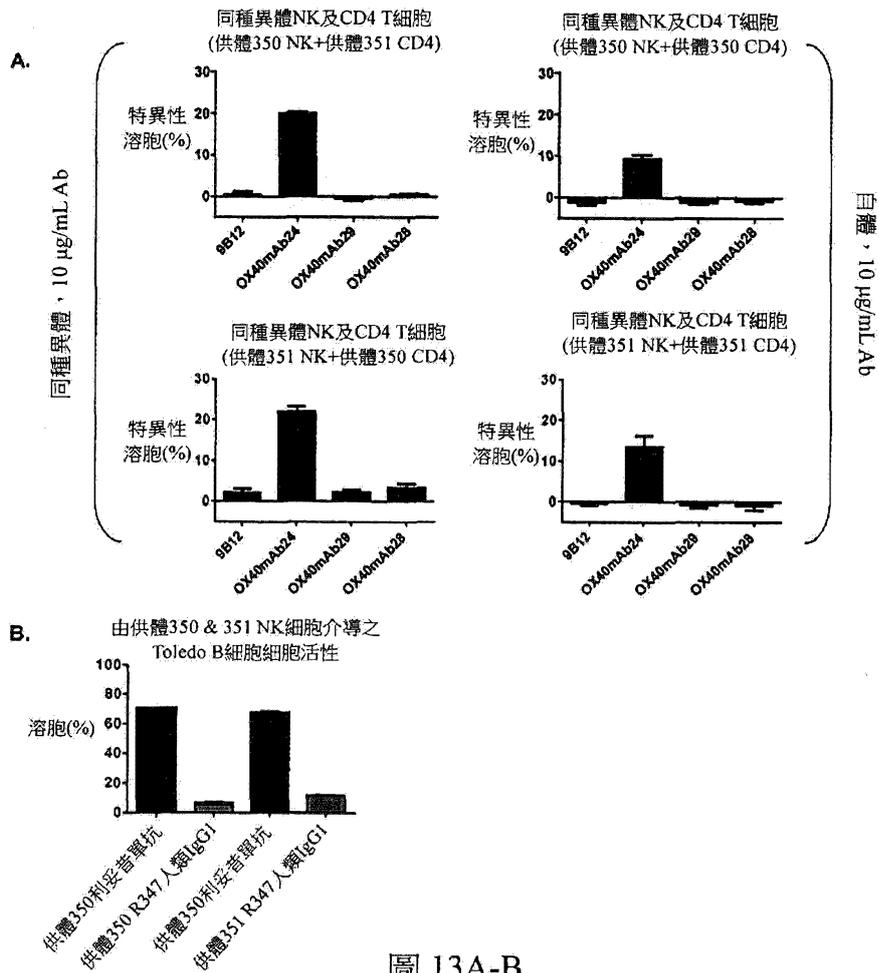


圖 13A-B

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

人類化抗-OX40抗體及其用途

HUMANIZED ANTI-OX40 ANTIBODIES AND USES THEREOF

【先前技術】

OX40(CD134 ; TNFRSF4)為主要發現於活化之CD4⁺及CD8⁺ T細胞、調節性T(Treg)細胞及自然殺手(NK)細胞上之腫瘤壞死因子受體(Croft等人, 2009, *Immunol Rev.* 229:173-91)。OX40具有一種已知的內源性配體OX40配體(OX40L ; CD152 ; TNFSF4)，其以三聚形式存在並可群聚OX40，從而在T細胞內產生有效細胞信號傳導事件。Id.通過活化之CD4⁺及CD8⁺ T細胞上的OX40之信號傳導導致經增強之細胞介素產生、顆粒酶及穿孔蛋白釋放及效應子和記憶T細胞池之擴增(Jensen等人, 2010, *Semin Oncol.* 37:524-32)。此外，於Treg細胞上之OX40信號傳導抑制Treg之擴增，關閉Treg之誘導並阻斷Treg抑制功能(Voo等人, 2013, *J Immunol.* 191:3641-50; Vu等人, 2007, *Blood.* 110:2501-10)。

免疫組織化學研究及早期的流式細胞計數法分析顯示OX40在浸潤寬廣範圍之人類癌症的T細胞上表現(Baruah等人, 2011, *Immunobiology* 217:668-675; Curti等人, 2013, *Cancer Res.* 73:7189-98; Ladanyi等人, 2004, *Clin Cancer Res.* 10:521-30; Petty等人, 2002, *Am J Surg.* 183:512-8; Ramstad等人, 2000, *Am J Surg.* 179:400-6; Sarff等人, 2008, *Am J Surg.* 195:621-5; discussion 625; Vetto等人, 1997, *Am J Surg.* 174:258-65)。雖然不希望受理論限制，但腫瘤浸潤淋巴細胞上的OX40表現與數種人類癌症之較長的存活期相關聯，表明OX40信號

可在建立抗腫瘤免疫反應上發揮作用(Ladanyi等人, 2004, *Clin Cancer Res.* 10:521-30; Petty等人, 2002, *Am J Surg.* 183:512-8)。

在多種非臨床小鼠腫瘤模型中，已成功地使用OX40之促效劑(包括抗體及OX40配體融合蛋白)，且結果具前景性(Kjaergaard等人, 2000, *Cancer Res.* 60:5514-21; Ndhlovu等人, 2001, *J Immunol.* 167:2991-9; Weinberg等人, 2000, *J Immunol.* 164:2160-9)。透過OX40共刺激T細胞促進抗腫瘤活性在一些情況中係持久的，提供對抗後續腫瘤激發(tumor challenge)之持久保護(Weinberg等人, 2000, *J Immunol.* 164:2160-9)。顯示Treg細胞抑制及效應T細胞之共刺激為OX40促效劑之腫瘤生長抑制所必需(Piconese等人, 2008, *J Exp Med.* 205:825-39)。已探索許多策略及科技透過組合疫苗、化學療法、放射療法及免疫療法以增強OX40促效劑療法之抗腫瘤效應(Jensen等人, 2010, *Semin Oncol.* 37:524-32; Melero等人, 2013, *Clin Cancer Res.* 19:997-1008)。

【發明內容】

本發明提供結合至OX40(例如人類OX40)之抗體。在某些態樣中，所提供之抗體為人類化抗體。例如，本發明提供一種包含人類化重鏈可變區(VH)及人類化輕鏈可變區(VL)之抗體或其抗原結合片段，其中該VH包含具有下式之胺基酸序列：

HF_W1-HCDR1-HF_W2-HCDR2-HF_W3-HCDR3-HF_W4，

其中HF_W1為SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7，HCDR1為SEQ ID NO:8，HF_W2為SEQ ID NO:9(WIRX₃₉HPGKGGLEX₄₇X₄₈G；其中X₃₉為Q或K，X₄₇為W或Y，及X₄₈為I或M)，HCDR2為SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16，HF_W3為SEQ ID NO:17(RITINX₇₁DTSKNQX₇₈SLQLNSVTPEDTAVYX₉₁CAR；其中X₇₁為P或R，X₇₈為F或Y，及X₉₁為Y或F，HCDR3為SEQ ID NO:25、SEQ

ID NO:26或SEQ ID NO:27)，及HFW4為SEQ ID NO:28，其中該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32；及其中該抗體或其片段可特異性地結合至人類OX40。在某些態樣中，該HFW2之胺基酸序列為SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:1，及在某些態樣中，該HFW3之胺基酸序列為SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。

在某些態樣中，該所提供的抗體或其片段之VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67。在某些態樣中，該所提供的抗體或其片段之VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:29及該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:59。

在某些態樣中，該所提供的抗體或其片段進一步包含融合至VL的C端之輕鏈恆定區或其片段，例如，人類 κ 恆定區或人類 λ 恆定區。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段進一步包含融合至VH的C端之重鏈恆定區或其片段，例如，人類IgG1恆定區、人類IgG4P恆定區、人類IgG1TM恆定區或鼠類IgG1恆定區。在某些態樣中，該重鏈恆定區為人類IgG1恆定區。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段包含重鏈胺基酸序列SEQ ID NO:71及輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO:30。如本發明所提供的抗體之抗原結合片段可為(例如)Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段或sc(Fv)₂片段或其任何組合。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可特異性地結合至人

類、馬來猴或恆河猴OX40，例如，可特異性地結合至如表現於Jurkat細胞，表現於人類、馬來猴、恆河猴之初代活化CD4⁺或CD8⁺ T細胞上之OX40，或其任何組合。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段不結合至鼠類或大鼠OX40。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段不與相關TNFRSF蛋白質交叉反應。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可具有約250 pM至約370 pM(例如，約312 pM)之對於初代活化人類CD4⁺ T細胞上表現之人類OX40之結合親和力，如藉由流式細胞計數法測得。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可達成初代活化人類CD4⁺ T細胞上的20%受體佔有率(EC₂₀)在約63至約93 pM、初代活化人類CD4⁺ T細胞上的50%受體佔有率(EC₅₀)在約250至約370 pM及初代活化人類CD4⁺ T細胞上的90%受體佔有率(EC₉₀)在約2290至約3330 pM，如藉由流式細胞計數法測得。例如，在某些態樣中，EC₂₀為約78 pM，EC₅₀為約312 pM，及EC₉₀為約2810 pM。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可具有如藉由流式細胞計數法測得約250 pM至約600 pM，例如，約424 pM之對於OX40過度表現Jurkat細胞上表現之人類OX40之結合親和力。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可達成OX40過度表現Jurkat細胞上的EC₂₀在約60至約150 pM、OX40過度表現Jurkat細胞上的EC₅₀在約250至約600 pM及OX40過度表現Jurkat細胞上的EC₉₀在約2260至約4380 pM，如藉由流式細胞計數法測得。例如，在某些態樣中，EC₂₀為約106 pM，EC₅₀為約424 pM，及EC₉₀為約3820 pM。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可具有約340 pM至約820 pM，例如，約580 pM之對於初代活化馬來猴CD4⁺ T細胞上表現之馬來猴OX40之結合親和力，如藉由流式細胞計數法測得。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可具有如藉由流式細胞計數法測得之約

130 pM至約600 pM，例如，約370 pM之對表現於初代活化恆河猴CD4⁺ T細胞上之恆河猴OX40之結合親和力。

在某些態樣中，在基於板之分析法中，所提供的抗體或其片段可誘導活化CD4⁺ T細胞之劑量依賴性增殖及初代活化CD4⁺ T細胞中之劑量依賴性細胞介素釋放。例如，在某些態樣中，20%最大增殖反應(EC₂₀)可在初代活化人類CD4⁺ T細胞中於約14 pM至約28 pM之抗體濃度下達成，50%最大增殖反應(EC₅₀)可在初代活化人類CD4⁺ T細胞中於約0.3 pM至約130 pM之抗體濃度下達成，及90%最大增殖反應(EC₉₀)可在初代活化人類CD4⁺ T細胞中於約50 pM至約90 pM之抗體濃度下達成，均如流式細胞計數法測得。在某些態樣中，EC₂₀為約21 pM，EC₅₀為約28 pM，及EC₉₀為約72 pM。初代活化人類CD4⁺ T細胞中所釋放的細胞介素在不受到限制的情況下可為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 或其任何組合中之一者、兩者、三者或更多者，例如，IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13或其任何組合。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可在初代活化馬來猴CD4⁺ T細胞及在初代活化恆河猴CD4⁺ T細胞中達成CD4⁺ T細胞增殖及細胞介素釋放。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可在Fc γ R表現細胞存在下活化OX40表現T細胞中之NF κ B路徑。例如，OX40表現T細胞可為OX40過度表現Jurkat NF κ B螢光素酶報導細胞，其對於NF κ B信號傳導路徑之刺激反應產生螢光素酶。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可觸發對抗OX40表現細胞之補體依賴性或抗體依賴性細胞毒性。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可結合至人類C1q且觸發對抗OX40表現細胞之NK介導的抗體依賴性細胞毒性。

在某些態樣中，對需要癌症治療的個體投與有效劑量之所提供的抗體或其片段可抑制個體中之腫瘤生長。例如，腫瘤生長抑制可在

T細胞存在下達成。在某些態樣中，與投與同型匹配的對照抗體或其片段相比，抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%之腫瘤生長。

本發明進一步提供一種組合物，其包含如上所述之抗體或其片段及載劑之。

本發明進一步提供一種多核苷酸，其包含編碼所提供的抗體或其片段或編碼所提供的抗體或其片段之多肽次單位之核酸。在某些態樣中，所提供的多核苷酸包含SEQ ID NO:60之核酸、SEQ ID NO:31之核酸、SEQ ID NO:72之核酸或其任何組合。本發明進一步提供一種宿主細胞，其包含所提供的多核苷酸之載體及包含所提供的多核苷酸或所提供的載體。在另一態樣中，本發明提供一種製造抗體或其片段之方法，其中該方法包含所提供的宿主細胞在該多核苷酸編碼的抗體或其片段表現之條件下培養，及回收該抗體或其片段。

在其他態樣中，本發明提供一種促進活化T細胞之存活或增殖之方法，其中該方法包括使活化T細胞與所提供的抗體或其片段接觸，及其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。

在其他態樣中，本發明提供一種誘導由活化T細胞釋放細胞介素之方法，其中該方法包括使活化T細胞與所提供的抗體或其片段接觸，及其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。在某些態樣中，釋放的細胞介素在不受到限制的情況下可為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 或其任何組合中之一者、兩者、三者或更多者，例如，IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13或其任何組合。在某些態樣中，活化T細胞為活化CD4⁺ T細胞、活化CD8⁺ T細胞或其組合。在某些態樣中，活化CD4⁺ T細胞為人類CD4⁺ T細胞、馬來猴CD4⁺ T細胞、恆河猴CD4⁺ T細胞或其組合。

在其他態樣中，本發明提供一種促進T細胞活化之方法，其中該方法包括使T細胞與所提供的抗體或其片段接觸，其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。在某些態樣中，可經由NF κ B信號轉導路徑之刺激測量T細胞活化。在某些態樣中，T細胞為活化CD4⁺ T細胞、活化CD8⁺ T細胞或其組合。在某些態樣中，活化CD4⁺ T細胞為人類CD4⁺ T細胞、馬來猴CD4⁺ T細胞、恆河猴CD4⁺ T細胞或其組合。在某些態樣中，該接觸包括對個體投與有效量之該抗體或其片段。

在其他態樣中，本發明提供一種治療個體癌症之方法，其中該方法包括對需要治療的個體投與有效量之所提供的抗體或其片段或所提供的組合物。在某些態樣中，癌症為實體腫瘤。在某些態樣中，投與該抗體或其片段或組合物可抑制腫瘤生長，可促進腫瘤縮小，或兩者。在某些態樣中，腫瘤生長抑制係在T細胞存在下達成。

在其他態樣中，本發明提供一種提高個體免疫反應之方法，其中該方法包括對有此需要的個體投與治療有效量之所提供的抗體或其片段或所提供的組合物。

在本發明所提供的治療方法中，意欲治療的個體可為人類個體。

在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可結合至人類OX40之抗原決定基，其係落在SEQ ID NO:91之胺基酸108至146中。在某些態樣中，抗原決定基包含SEQ ID NO:91之至少胺基酸白胺酸116(L116)及丙胺酸126(A126)。在某些態樣中，所提供的抗體或其片段可結合至具有SEQ ID NO:92之胺基酸序列但Q113L突變及V124A突變之小鼠OX40變體。

本發明進一步提供由100個或更少胺基酸組成之分離肽，其中該肽可特異性地結合所提供的抗體或其片段。在某些態樣中，該肽包含

SEQ ID NO:91之胺基酸116至126。在某些態樣中，該肽包含SEQ ID NO:91之胺基酸108至146，但在除L116及A126外之任何位置一個、兩個、三個、四個、五個或六個單胺基酸代換、缺失或插入。

【圖式簡單說明】

圖1. 人類化9B12 VH區中之突變：純系暱稱中的數字代表胺基酸在VH中的位置，係依Kabat編號。Mab 1、2、5及8為與人類化VL配對之VH嵌合變體。Mab 10至17為具有小鼠回復突變之人類化VH變體。Mab 18至27為經改造以移除潛在序列缺陷之變體。Mab24及mAb27之可變區經接枝至不同重恆定區上以分別產生命名為mAb28-30及mAb31-32、mAb37之同型物變體。

圖2A至D. OX40mAb24及9B12與表現於初代活化人類CD4⁺ T細胞表面上之OX40之結合。MFI=初代人類CD4⁺ T細胞上經AlexaFluor® 647標記之二級抗人類抗體與OX40mAb24(2A-B)之結合或經AlexaFluor® 488標記之抗小鼠二級抗體與9B12(2C-D)之結合之平均螢光強度。

圖3A至F. OX40mAb24及9B12與表現於Jurkat T細胞上之人類OX40之結合。MFI=Jurkat T細胞上經AlexaFluor® 647標記之二級抗人類抗體與OX40mAb24 (3A-C)之結合或經AlexaFluor® 488標記之抗小鼠二級抗體與9B12(3D-F)之結合之平均螢光強度。

圖4A至B. OX40mAb24與TNFRSF表現HEK293細胞及OX40表現Jurkat T細胞之結合。(4A)TNFRSF成員在HEK293細胞中之暫態表現，如直方圖左側所示，及與TNFRSF特異性mAb或與OX40mAb24之結合，如直方圖上方所示。灰度直方圖，螢光染料共軛同型物對照抗體對TNFRSF特異性mAb之結合或山羊抗人類AlexaFluor® 647二級抗體對OX40mAb24之對照結合；開放直方圖，TNFRSF特異性mAb或OX40mAb24結合。(4B)：OX40mAb24與OX40表現Jurkat結合作為陽

性對照組。灰度直方圖，山羊抗人類AlexaFluor® 647二級抗體對照結合；開放直方圖，OX40mAb24結合。

圖 5A 至 B. 依據 ELISA 之 OX40mAb24(OX40mAb29)(互補決定區) CDR 及 9B12 與重組人類 TNFRSF 成員之結合。ELISA 分析之結果證實 OX40mAb29(5A) 及 9B12(5B) 特異性結合 OX40。OX40mAb29 包含 OX40mAb24 之 CDR。將抗體與 OX40 之結合與和其他的人類 TNFRSF 蛋白質之結合進行比較。

圖 6. OX40mAb24 板結合生物活性分析法之示意圖。
Q=OX40mAb24；Y=抗人類 CD3 抗體純系 OKT3。

圖 7A 至 C. 對 OX40mAb24 及 9B12 反應之人類 CD4⁺ T 細胞增殖。(7A) 由板固定化 OX40mAb24 組合亞有絲分裂 TCR 刺激(抗-CD3)介導的四種獨立供體之 CD4 T 細胞增殖。在繪圖前將資料點與原始數據曲線之較小無症狀值標準化以提高對每次反應之動態範圍之目測。(7B) 供體 651 之代表性原始數據顯示藉由 OX40mAb24 加上亞有絲分裂 TCR 刺激(抗-CD3)驅動之增殖但相對缺失由 R347 人類 IgG1 對照 mAb、可溶性 OX40mAb24 在存在或不存在同時發生的 TCR 信號傳達下、僅由抗-CD3 mAb 在無 OX40mAb24 下及由板固定化 OX40mAb24 在不存在抗-CD3 mAb 下介導之增殖。(7C) 由板固定化 9B12 組合亞有絲分裂 TCR 刺激介導之四種獨立供體之 CD4 T 細胞增殖。符號，平均值；誤差槓，平均值標準偏差；n=3，OX40mAb24、R347 人類 IgG1 對照 mAb 及 9B12 同時組合抗-CD3 之技術性重複次數；n=2，可溶性 OX40mAb24 及不存在 OX40mAb24 之 CD3、無抗-CD3 之板結合 OX40mAb24 及無抗-CD3 之可溶性 OX40mAb24 之技術性重複次數。

圖 8A 至 E. 人類 CD4⁺ T 細胞對 OX40mAb24 反應之細胞介素釋放。供體 651 之代表性 OX40mAb24 誘發人類 CD4 T 細胞之細胞介素釋放，包括 (8A)IFN γ 、(8B)TNF α 、(8C)IL-10、(8D)IL-13 及 (8E)IL-5。

符號，平均值；誤差槓，平均值標準偏差；n=3，OX40mAb24及R347人類IgG1對照mAb均組合抗-CD3之技術性重複次數；n=2，可溶性OX40mAb24、無抗-CD3之可溶性OX40mAb24及不存在OX40mAb24之抗-CD3之技術性重複次數。

圖9A至E. 人類CD4⁺ T細胞對9B12反應之細胞介素釋放。供體651之代表性9B12誘發人類CD4⁺ T細胞之細胞介素釋放，包括(9A)IFN γ 、(9B)TNF α 、(9C)IL-10、(9D)IL-13及(9E)IL-5。符號，平均值；誤差槓，平均值標準偏差；n=3，9B12及小鼠IgG1對照mAb均組合抗-CD3之技術性重複次數；n=2，可溶性9B12、無抗-CD3之可溶性9B12及不存在9B12之抗-CD3之技術性重複次數。

圖10為說明用於測量OX40mAb24及9B12生物活性之細胞系統之示意圖。經Fc γ R表現細胞交聯之OX40mAb24介導OX40表現Jurkat NF κ B螢光素酶報導細胞系的細胞表面上OX40之叢集及活化，導致經NF κ B介導產生可測量為用於OX40活化之替代物之螢光素酶。Fc γ R=可結晶片段 γ 受體；NF κ B=核因子 κ B。

圖11A至D. 存在及不存在藉由Fc γ R之交聯下OX40表現Jurkat NF κ B報導細胞中OX40mAb24之生物活性。2-細胞生物分析法中OX40mAb24藉由表現於Jurkat NF κ B-螢光素酶報導細胞系之細胞表面上之人類OX40誘導信號傳導之濃度依賴性活性(單位為RLU)。OX40mAb24經(11A)CD32A表現HEK293細胞及HEK293親代細胞(HEK)或在存在(11B)CD32B表現HEK293細胞、(11C)Raji B細胞或(11D)從初代肺腫瘤分離的CD45⁺細胞交聯之後的報導子活性。數據表示表5-2中見到的其他結果。mAb=單株抗體，RLU=相對光單位。

圖12A至D. 2-細胞生物活性分析法中利用藉由不同細胞類型之Fc γ R交聯下OX40表現Jurkat NF κ B報導細胞中9B12之生物活性。2-細胞生物分析法中9B12藉由表現於Jurkat NF κ B螢光素酶報導細胞系之

細胞表面上之人類OX40誘導信號傳導之濃度依賴性活性(單位為RLU)。9B12經(12A)CD32A表現HEK293細胞、(12B)CD32B表現HEK293細胞、(12C)Raji B細胞或(12D)從初代肺腫瘤分離的CD45⁺細胞交聯之後的報導子活性。數據表示表5-3中見到的其他結果。mAb=單株抗體；RLU=相對光單位。

圖13A至B. OX40mAb24之自然殺手細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性，實驗1。(13A)藉由源自同種異體(左側)或自體(右側)NK及CD4⁺ T細胞供體對之人類NK細胞使用10 μ/mL 9B12、OX40mAb24或IgG1三重突變體(mAb29)或OX40mAb24之人類IgG4P(mAb28)變型特異性殺死OX40表現活化CD4⁺ T細胞。(13B)藉由源自供體350及351之NK細胞在存在利妥昔單抗(rituximab)而非R347人類IgG1同型對照抗體下使Toledo B細胞溶胞。進行技術性複製重複三次。誤差槓表示平均值標準誤差。ADCC=抗體-藥物依賴性細胞毒性；mAb=單株抗體；NK=自然殺手。

圖14A至B. OX40mAb24之自然殺手細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性，實驗2。(14A)藉由源自同種異體(左側)或自體(右側)NK及CD4 T細胞供體對之人類NK細胞使用10 μ/mL對照R347人類IgG1、9B12、OX40mAb24、人類IgG4P(mAb28)或OX40mAb24之IgG1三重突變體(mAb29)變型特異性殺死OX40表現活化CD4 T細胞。(14B)藉由源自供體558及589之NK細胞在存在利妥昔單抗而非R347人類IgG1同型對照抗體下使Toledo B細胞溶胞。進行技術性複製重複三次。誤差槓表示平均值標準誤差。ADCC=抗體-藥物依賴性細胞毒性；mAb=單株抗體；NK=自然殺手。

圖15A至D. OX40mAb24及9B12之自然殺手細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性之評估，實驗3。(15A至B)使用源自兩種指定的個別供體之初代人類NK細胞特異性殺死由OX40mAb24而非9B12介導之

OX40表現人類CD4 T細胞。(15C至D)源自供體363及504之NK細胞在存在利妥昔單抗而非R347人類IgG1同型對照抗體下使Toledo B細胞溶胞。進行技術性複製重複兩次。誤差槓表示平均值標準誤差。ADCC=抗體-藥物依賴性細胞毒性；mAb=單株抗體；NK=自然殺手。

圖16A至D. OX40mAb24之自然殺手細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性之評估，實驗4。(16A至B)使用源自兩種指定的個別供體之初代人類NK細胞特異性殺死由OX40mAb24介導之OX40表現人類CD4 T細胞。(16C至D)藉由源自供體464及532之NK細胞在存在利妥昔單抗而非R347人類IgG1同型對照抗體下使Toledo B細胞溶胞。進行技術性複製重複兩次。誤差槓表示平均值標準誤差。ADCC=抗體-藥物依賴性細胞毒性；mAb=單株抗體；NK=自然殺手。

圖17A至B. OX40mAb24之自然殺手細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性之評估，實驗5。使用源自指定的供體601(板A)及602(板B)之初代人類NK細胞特異性殺死由OX40mAb24介導之OX40表現人類CD4⁺ T細胞。誤差槓表示平均值標準誤差。ADCC=抗體-藥物依賴性細胞毒性；mAb=單株抗體；NK=自然殺手。

圖18A至B. OX40mAb24及9B12與純化人類C1q蛋白質之結合之評估。將指定濃度之純化人類C1q蛋白質注射至生物感測器晶片上。空白表示僅注射PBS/0.005%吐溫(Tween)20媒劑。板A：OX40mAb24與純化人類C1q之結合。板B：9B12與純化人類C1q之結合。

圖19A至B. 馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶純系B2及LCL8664恆河猴B-細胞生物活性分析法中的OX40mAb24活性。組合恆河猴B細胞系LCL8664之馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶報導細胞系中之由OX40mAb24濃度依賴性誘導之NFκB活性(單位為RLU)。顯示2種非相關性分析法之數據，每個數據點重複4次。誤差槓表示平均值標準誤差由於標度而致不可見。RLU=相對光

單位。

圖20A至B. 馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NF κ B螢光素酶純系B2及LCL8664恆河猴B細胞生物活性分析法中的9B12活性。組合恆河猴B細胞系LCL8664之馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NF κ B螢光素酶報導細胞系中之9B12針對NF κ B活性之濃度依賴性誘導(單位為RLU)。顯示2種非相關性分析法之數據，每個數據點重複4次。誤差槓表示平均值標準誤差。RLU=相對光單位。

圖21A至B. 馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NF κ B螢光素酶純系B2及Fc γ 受體表現恆河猴免疫細胞生物活性分析法中的OX40mAb24及9B12活性。馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NF κ B螢光素酶受體細胞系組合Fc γ 受體表現恆河猴免疫細胞中之藉由OX40mAb24(板A)及9B12(板B)之NF κ B活性之濃度依賴性誘導(單位為RLU)。每個數據點重複兩次。RLU=相對光單位。

圖22A至D. OX40mAb24及9B12引起初代恆河猴CD4⁺ T細胞之增殖。OX40mAb24(22A至B)及9B12(22C至D)誘導初代活化恆河猴CD4⁺ T細胞中之細胞分裂。顯示2種非相關性分析法之三重複孔之數據。誤差槓表示平均值標準誤差。

圖23A至B. 小鼠異種移植模型中OX40mAb24及9B12對A375細胞之生長的效應-實驗1。在第1天將以1:6之E:T比率與同種異體反應性人類CD4⁺及CD8⁺ T細胞系混合之A375細胞SC植入各組中六隻NOD/SCID小鼠內。在第3天、第5天、第7天、第10天及第12天IP投與OX40mAb24(23A)及9B12(23B)及同型對照(23A至B)。顯示腫瘤體積之平均值。分別在第25天及第18天於經OX40mAb24治療(23A)或經9B12治療(23B)與經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由曼-惠特尼秩和檢定(Mann-Whitney rank sum test)分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：與同型對照組相比，TGI >

68%， $P \leq 0.05$ 。E:T=效應子對靶比率；IP係腹膜內；NOD/SCID=非肥胖型糖尿病/重症聯合免疫缺陷；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖24A至B. 小鼠異種移植模型中OX40mAb24及9B12對A375細胞之生長之效應-實驗2。在第1天將以1:6之E:T比率與同種異體反應性人類 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T細胞系混合之A375細胞SC植入各組中六隻NOD/SCID小鼠內。在第3天、第5天、第7天、第10天及第12天IP投與OX40mAb24(24A)及9B12(24B)及同型對照(24A至B)。顯示腫瘤體積之平均值。在第18天於經OX40mAb24治療(12A)或經9B12治療(12B)與經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由曼-惠特尼秩和檢定分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。#：與同型對照組相比， $TGI \geq 75\%$ ， $P \leq 0.0004$ 。*：與同型對照組相比， $TGI = 53\%$ ， $P \leq 0.05$ 。E:T=效應子對靶比率；IP=腹膜內；NOD/SCID=非肥胖型糖尿病/重症聯合免疫缺陷；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖25. 小鼠異種移植模型中OX40mAb24對A375細胞之生長之效應-實驗3。在第1天將以1:6之E:T比率與同種異體反應性人類 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T細胞系混合之A375細胞SC植入各組中六隻NOD/SCID小鼠內。在第3天、第6天、第8天、第10天及第13天IP投與OX40mAb24。顯示腫瘤體積之平均值。在第28天將經OX40mAb24治療與經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由曼-惠特尼秩和檢定分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：與同型對照組相比， $TGI = 75\%$ ， $P \leq 0.05$ ；E:T=效應子對靶比率；IP=腹膜內；NOD/SCID=非肥胖型糖尿病/重症聯合免疫缺陷；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖26A至B. 小鼠同基因模型中OX86 mIgG2a對CT26細胞系之生長之效應。在第1天將CT26細胞SC接種各組中十隻BALB/c小鼠。在

第9天及第12天((26A)中的箭頭)IP投與對照(陰性對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。顯示腫瘤體積之平均值(26A)及個別值(26B)。於經OX86 mIgG2a治療及經陰性對照治療之動物間進行比較，及藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：在第21天，與同型對照組相比，TGI > 50%， $P \leq 0.0001$ 。IP=腹膜內；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖27A至B. 小鼠同基因模型中OX86 mIgG2a對CT26細胞系之生長之效應。在第1天將CT26細胞SC接種各組中十二隻BALB/c小鼠。在第13天及第16天((27A)中的箭頭)IP投與測試物(OX86 mIgG2a)。顯示腫瘤體積之平均值(27A)及個別值(27A)。於經OX86 mIgG2a治療及未經治療對照之動物間進行比較，及藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：在第24天，與未經治療對照組相比，TGI > 50%， $P \leq 0.0001$ 。IP=腹膜內；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖28A至B. 小鼠同基因模型中OX86 mIgG2a對MCA205細胞系之生長之效應。在第1天將MCA205細胞SC接種各組中十四隻C57BL/6小鼠。在第11天及第14天IP投與對照物(同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。顯示腫瘤體積之平均值(28A)及個別值(28B)。於經OX86 mIgG2a治療及經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：在第27天，與同型對照組相比，TGI > 50%， $P \leq 0.0001$ 。IP=腹膜內；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖29A至B. 小鼠同基因模型中OX86 mIgG2a對4T1細胞系之生長之效應。在第1天將4T1細胞S接種各組中十二隻BALB/c小鼠。在第13天、第16天、第20天及第23天IP投與對照物(同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。顯示腫瘤體積之平均值(29A)及個別值(29B)。於經

OX86 mIgG2a治療及經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。IP=腹膜內；SC=皮下；TGI=腫瘤生長抑制。

圖30. 人類及小鼠OX40分子之胞外域之胺基酸比對。人類OX40(NCBI參照序列NP_003318.1)與小鼠OX40(NCBI參照序列NP_035789.1)共有60%序列同一性。使用Clustal W方法進行比對。OX40之胞外域以不同顏色顯示：CRD1域以藍色顯示，CRD2域以綠色顯示，CDR3域以品紅色顯示，及CRD4域以紅色顯示。用箭頭顯示人類及小鼠間在CRD3域中具差異性之胺基酸。此兩關鍵的抗原決定基L116及A126以紅色框出。CRD=富半胱胺酸域。

圖31A至B. 嵌合人類/小鼠OX40變體之命名法及略圖。藉由將小鼠OX40(空心)之各種域或殘基換入至人類(實心)中(KO)或將人類OX40胺基酸之各種域或殘基換出至小鼠OX40中(KI)來建構嵌合人類/小鼠OX40變體。個別胺基酸或組合之突變用紅色(KO)及綠色(KI)箭頭顯示。CRD=富半胱胺酸域；KI=敲入；KO=敲出；TM=跨膜域。

圖32A至C. OX40mAb24結合至嵌合人類/小鼠OX40變體之FACS分析。利用具結合特徵之293F細胞暫態表現所有變體且使用OX40mAb24及其親代小鼠mAb(9B12)進行FACS分析。使用抗人類及小鼠OX40多株抗體監測表現水平。(A)使用經域交換嵌合變體，CRD3域經識別為含抗原決定基域。OX40mAb24及9B12不結合編碼小鼠CRD3域(KO_CRD3及KO_CRD3+4)之KO變體，但識別編碼人類CRD3域之KI變體(KI_CRD3)。(B)另外，藉由突變人類及小鼠間在CRD3域中具差異性之個別胺基酸或其組合確定關鍵的抗原決定基殘基為CRD3域中之L116及A126(圖11-1)。OX40mAb24及9B12之結合當在人類殘基L116及A126改由小鼠對應物(KO_L116+A126)替代時消

除。(C)KI/獲得功能(gain-of-function)變體證實此兩關鍵殘基之重要性。將L116、A126或其組合接枝至小鼠OX40引起OX40mAb24及9B12之結合。

圖33A至D. 投與OX86 mIgG2a至未經治療的小鼠(Naïve Mice)後周邊血液及脾臟CD4⁺ T細胞上Ki67及ICOS之表現水平。在第1天將指定劑量程度下之對照物(鹽水及NIP228 IgG2a同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)經腹膜內接種各組中七隻未經治療的BALB/c小鼠。在指定的天數收集血液(板A及C)及在第10天分離五個組的脾臟。藉由流式細胞計數法測量CD4⁺ T細胞上Ki67(板A及B)及ICOS(板C及D)之表現水平。顯示各個組的血液中表現Ki67(板A)及ICOS(板C)之CD4細胞之百分率的平均值。繪製個別組中每隻動物的脾臟中表現Ki67(板B)及ICOS(板D)之CD4細胞之百分率。誤差槓表示平均值標準誤差。* : P≤0.05在板A及C中顯著；列出各個組的P值，板B及D中具顯著性。

圖34A至B. 投與OX86 mIgG2a至未經治療的小鼠後周邊血液及脾臟CD4⁺ T細胞上之Ki67及ICOS表現之關聯性。在經指定劑量程度下的對照物(鹽水及NIP228 IgG2a同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)治療10天後於圖12-1中所顯示的從個別動物的周邊血液(板A)及脾臟(板B)分離得的Ki67及ICOS陽性CD4 T細胞之百分率間進行比較。將個別小鼠的測量值製圖。使用GraphPad Prism 6.0軟體對所得的數據集組進行線性回歸分析以確定資料之最佳擬合線。提供各圖的決定係數(r²)及斜率為非零之顯著性(P值)。

圖35A至D. 投與 OX86 mIgG2a至未經治療的小鼠後周邊血液及脾臟CD8⁺ T細胞上Ki67及ICOS之表現水平。在第1天將指定劑量程度下之對照物(鹽水及NIP228 IgG2a同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)經腹膜內接種各組中七隻未經治療的BALB/c小鼠。在指定的天數收集血液(板A及C)及在第10天分離五個組的脾臟。藉由流式細胞計數法

測量CD8⁺ T細胞上Ki67(板A及B)及ICOS(板C及D)之表現水平。顯示各個組的血液中表現Ki67(板A)及ICOS(板C)之CD8細胞之百分率的平均值。繪製個別組中每隻動物的脾臟中表現Ki67(板B)及ICOS(板D)之CD8細胞之百分率。誤差槓表示平均值標準誤差。*：P≤0.05在板A及C中顯著；列出各個組的P值，板B及D中具顯著性。

圖36A至B. 投與OX86 mIgG2a至未經治療的小鼠後周邊血液及脾臟CD8⁺ T細胞上之Ki67及ICOS表現之關聯性。在經指定劑量程度下的對照物(鹽水及NIP228 IgG2a同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)治療10天後於圖12-1中所顯示的從個別動物的周邊血液(板A)及脾臟(板B)分離得的Ki67及ICOS陽性CD8⁺ T細胞之百分率間進行比較。將個別小鼠的測量值製圖。使用GraphPad Prism 6.0軟體對所得的數據集組進行線性回歸分析以確定資料之最佳擬合線。提供各圖的決定係數(r²)及斜率為非零之顯著性(P值)。

圖37A至D. 缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fcγ受體之同基因小鼠模型中小鼠OX86 IgG2a對CT26細胞系之生長之效應。在第1天將CT26細胞SC接種八隻經基因改造以缺少抑制性Fcγ受體Iib(Fcgr2b^{-/-}；板A及B)或活化性Fcγ受體(Fcer1g^{-/-}；板C及D)之Balb/c小鼠的組。在第4天及第7天IP投與對照物(鹽水/未經治療及OX86 mIgG1 D265A突變/同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。顯示腫瘤體積之平均值(板A及C)及個別值(板B及D)。在經OX86 mIgG2a治療及未經治療及經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。SC=皮下；IP=腹膜內；TGI=腫瘤生長抑制

圖38A至D. 缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fcγ受體之同基因小鼠模型中小鼠OX86 IgG2a對MCA205細胞系之生長之效應。在第1天將MCA205細胞SC接種八隻經基因突變以缺少抑制性Fcγ受體

I1b(Fcgr2b^{-/-} ; 板 A 及 B)或活化性 Fc γ 受體 (Fcer1g^{-/-} ; 板 C 及 D)之 C57BL/6 小鼠的組。在第 4 天及第 7 天 IP 投與對照物(鹽水/未經治療及 OX86 mIgG1 D265A 突變/同型對照)及測試物(mOX40L FP)。顯示腫瘤體積之平均值(板 A 及 C)及個別值(板 B 及 D)。在經 mOX40L FP 治療及未經治療及經同型對照治療之動物間進行比較，及藉由單向 ANOVA 使用 GraphPad Prism 6.0 軟體分析組間差異之統計顯著性。誤差槓表示平均值標準誤差。*：在研究的第 20 天，與未經治療組及同型對照組相比，TGI \geq 95%，P \leq 0.023。SC=皮下；IP=腹膜內；TGI=腫瘤生長抑制

圖 39A 至 B. 投與 OX86 小鼠 IgG2a 至缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fc γ 受體之小鼠後從周邊血液、脾臟及 CT26 腫瘤分離得的 CD4⁺ T 細胞中 Ki67 之表現水平。在第 1 天將 CT26 細胞 SC 接種四隻經基因改造以缺少抑制性 Fc γ 受體 I1b(Fcgr2b^{-/-} ; 板 A)或活化性 Fc γ 受體 (Fcer1g^{-/-} ; 板 B)之 Balb/c 小鼠的組；此研究獨立於圖 12-5 中所呈現的研究，但類似於其進行。在第 4 天及第 7 天 IP 投與對照物(鹽水/未經治療及 OX86 mIgG1 D265A 突變/同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。在第 14 天分離板 A 及在第 13 天分離板 B 之血液、脾臟及腫瘤。藉由流式細胞計數法測量 CD4⁺ T 細胞中 Ki67 之表現水平。符號表示個別小鼠各組織之 Ki67 陽性 CD4⁺ T 細胞百分率；水平槓表示各個組的平均值。藉由單向 ANOVA 使用 GraphPad Prism 6.0 軟體分析組間差異之統計顯著性，及以水平槓用 P 值計算值指示。SC=皮下；IP=腹膜內

圖 40A 至 B. 投與 OX86 小鼠 IgG2a 至缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fc γ 受體之小鼠後從周邊血液、脾臟及 CT26 腫瘤分離得的 CD8⁺ T 細胞中 Ki67 之表現水平。在第 1 天將 CT26 細胞 SC 接種四隻經基因改造以缺少抑制性 Fc γ 受體 I1b(Fcgr2b^{-/-} ; 板 A)或活化性 Fc γ 受體 (Fcer1g^{-/-} ; 板 B)之 Balb/c 小鼠的組；此研究獨立於圖 12-5 中所呈現的

研究，但類似於其進行。在第4天及第7天IP投與對照物(鹽水/未經治療及OX86 mIgG1 D265A突變/同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。在第14天分離板A及在第13天分離板B之血液、脾臟及腫瘤。藉由流式細胞計數法測量CD8⁺ T細胞上Ki67之表現水平。符號表示個別小鼠各組織之Ki67陽性CD8⁺ T細胞之百分率；水平槓表示平均值。藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計差異性，及以水平槓用P值計算值指示。SC=皮下；IP=腹膜內

圖41A至B. 投與OX86小鼠IgG2a至缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fc γ 受體之小鼠後從引流淋巴結、脾臟及MCA205腫瘤分離得的CD4 T細胞中Ki67之表現水平。在第1天將MCA205細胞SC接種四隻經基因改造以缺少抑制性Fc γ 受體IIb(Fcgr2b^{-/-}；板A)或活化性Fc γ 受體(Fcer1g^{-/-}；板B)之C57BL/6小鼠的組；研究獨立於圖12-6中所呈現的研究，但類似於其進行。在第4天及第7天IP投與對照物(鹽水/未經治療及OX86 mIgG1 D265A突變/同型對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。在第20天分離板B之引流淋巴結、脾臟及腫瘤。藉由流式細胞計數法測量CD4⁺ T細胞中Ki67之表現水平。符號表示個別小鼠各組織之Ki67陽性CD4⁺ T細胞之百分率；水平槓表示平均值。藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計差異性，及以水平槓用P值計算值指示。SC=皮下；IP=腹膜內

圖42A至B. 投與OX86小鼠IgG2a至缺少抑制性(Fcgr2b^{-/-})或活化性(Fcer1g^{-/-}) Fc γ 受體之小鼠後從引流淋巴結、脾臟及MCA205腫瘤分離得的CD8 T細胞中Ki67之表現水平。在第1天將MCA205細胞SC接種四隻經基因改造以缺少抑制性Fc γ 受體IIb(Fcgr2b^{-/-}；板A)或活化性Fc γ 受體(Fcer1g^{-/-}；板B)之C57BL/6小鼠的組；此研究獨立於圖12-6中所呈現的研究，但類似於其進行。在第4天及第7天IP投與對照物(鹽水及mOX40L FP D265A突變對照)及測試物(OX86 mIgG2a)。在第

20天分離引流淋巴結、脾臟及腫瘤。藉由流式細胞計數法測量CD8⁺ T細胞上Ki67之表現水平。符號表示個別小鼠各組織之Ki67陽性CD8⁺ T細胞之百分率；水平槓表示平均值。藉由單向ANOVA使用GraphPad Prism 6.0軟體分析組間差異之統計差異性，及以水平槓用P值計算值指示。SC=皮下；IP=腹膜內

圖43A至B. 藉由OX40mAb24減少調節性T細胞。板A：在KLH免疫接種及經NIP228 huIgG1對照(huIgG1)或OX40mAb24治療之前植入人類免疫細胞之小鼠周邊血液中測得之人類CD4⁺Foxp3⁺ Treg細胞之百分率。無mAb指示未免疫接種及未進行mAb治療。板B：免疫接種及經mAb治療之後相同組小鼠周邊血液中人類CD4⁺FoxP3⁺ Treg細胞之百分率。從單向ANOVA獲得統計p值。Hu=人類；mAb=單株抗體；Treg=調節性T細胞

圖44A至D. OX40mAb24治療之後效應子及記憶CD4 T細胞相對調節性T細胞之擴增。用KLH免疫接種然後NIP228 huIgG1 mAb (huIgG1)或OX40mAb24治療前(左側)或治療後(右側)之以人類免疫細胞接枝之小鼠周邊血液中之人類CD4⁺ T細胞對人類Treg細胞之比率，如指示，關於總CD4⁺(板A)；CD4⁺效應子(Teff)(板B)；CD4⁺效應子記憶(Tem)(板C)；及CD4⁺中樞記憶T細胞(Tcm)(板D)。無mAb指示未免疫接種及無mAb治療。從單向ANOVA獲得統計p值。Hu=人類；mAb=單株抗體；Tcm=中樞記憶T細胞；Teff=效應T細胞；Tem=效應子記憶T細胞

圖45A至B. 經OX40mAb24治療之小鼠中提高的CD8⁺效應子對調節性T細胞比率。用KLH免疫接種然後NIP228 huIgG1 mAb (huIgG1)或OX40mAb24治療前(左側)或治療後(右側)之以人類免疫細胞接枝之小鼠周邊血液中人類CD8⁺效應T細胞對人類Treg細胞之比率，如指示。無mAb指示未免疫接種及無mAb治療。指示在所有組間比較之從

單向ANOVA獲得之統計p值。Hu=人類；mAb=單株抗體；Teff=效應T細胞；Treg=調節性T細胞

圖46A至C. 經OX40mAb24治療之小鼠中CD8⁺ T細胞上之提高的CD25(IL-2受體)水平。無治療，或KLH免疫接種接著NIP228 huIgG1 mAb (huIgG1)或OX40MAB24之治療後(左側)或治療前(右側)的小鼠周邊血液中人類CD25(IL-2受體)陽性細胞佔人類CD8⁺ T細胞之百分率，如指示(A)總CD8⁺、(B)CD8⁺效應子(Teff)、(C)CD8⁺效應子記憶(Tem) T細胞。無mAb指示未免疫接種及無mAb治療。從單向ANOVA獲得統計p值。Hu=人類；mAb=單株抗體；Teff=效應T細胞；Tem=效應子記憶T細胞。

【實施方式】

在藉由抗原初免期間或之後不久，T細胞(例如，CD4⁺ T細胞)上OX40受體之結合會導致T細胞(例如，CD4⁺ T細胞)對該抗原之反應增加。在本發明背景內容中，術語「接合」係指結合至OX40受體並刺激藉由OX40受體介導之至少一種活性。例如，與單獨對抗原之反應相比，抗原特異性T細胞(例如，CD4⁺ T細胞)上OX40受體之接合會導致增加之T細胞增殖增加及細胞介素產生增加。對抗原反應升高可保持一段大體上長於缺少OX40受體接合之時間。因此，經由OX40受體之刺激藉由加強抗原(例如，腫瘤抗原)之T細胞識別增強抗原特異性免疫反應。

當藉由抗原初免T細胞期間或之後不久向個體(諸如人類個體)投與OX40促效劑時，OX40促效劑可增強該個體之抗原特異性免疫反應。OX40促效劑包含OX40配體(「OX40L」)，諸如可溶性OX40L融合蛋白及抗OX40抗體或其片段。一特定實例為特異性結合至OX40由此引起信號傳導之人類化抗體。本發明提供人類化抗OX40單株抗體之收集。亦描述核酸，其等包含編碼此抗體之多核苷酸序列。本發明

亦提供使用人類化抗OX40單株抗體以增強個體之抗原特異性免疫反應之方法。

定義

應注意的是，術語「一」(「a」或「an」)實體係指一或多個該實體；例如，「結合分子」理解為表示一或多個結合分子。因此，本文中可互換使用術語「一」(或「一個」)、「一或多個」及「至少一個」。

此外，本文中使用的「及/或」之處特定揭示兩種所指明特徵或組分中各者，連同或不連同另一者。因此，如本文中詞語諸如「A及/或B」中使用之術語「及/或」意欲包含「A及B」、「A或B」、(僅)「A」及(僅)「B」。同樣地，如詞語諸如「A、B及/或C」中使用之術語「及/或」意欲包含以下實施例之各者：A、B及C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；(僅)A；(僅)B；及(僅)C。

除非另有定義，否則本文中使用的技術性及科學性術語具有如本發明相關之技術一般人員通常瞭解之相同意義。例如，the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press；The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press；及 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press為熟悉此項技術者提供本發明中使用之許多術語的通用字典。

單位、前綴及符號以其等國際單位制(SI)可接受之形式表示。數值範圍包含界定該範圍之數字。除非另作說明，否則以胺基至羧基之方向自左向右書寫胺基酸序列。本文中所提供之標題不是對各種態樣或本發明之態樣之限制，其可藉由整體上參考本說明書之方式獲得。因此，藉由參考說明書之全部內容更充分地定義緊接下文定義之術語。

如本文中所使用，術語「非自然生成之」物質、組合物、實體及/或物質、組合物或實體之任何組合或其任何語法變體為明確排除但僅排除由或可在任何時候由判定者或管理者或判定機構確定或解釋為「自然生成」的物質、組合物、實體之其等形式及/或物質、組合物或實體之任何組合的條件術語。

如本文中所使用，術語「多肽」意欲包含單數個「多肽」及複數個「多肽」且係指由以醯胺鍵(亦稱作肽鍵)線性連接之單體(胺基酸)組成之分子。術語「多肽」係指具有兩個或更多個胺基酸之任一鏈或多個鏈，而非指特定長度之產物。因此，用於指兩個或更多個胺基酸之一或多個鏈之肽、二肽、三肽、寡肽、「蛋白」、「胺基酸鏈」或任何其他術語係包含於「多肽」之定義內且可使用術語「多肽」替代此等術語中之任何一者或與此等術語中之任何一者互換使用。術語「多肽」亦意欲指多肽之表現後修飾之產物，該等表現後修飾包括(但不限於)醯化、乙醯化、磷酸化、醯胺化及藉由已知保護基/阻斷基衍生化、蛋白酶切割或藉由非自然生成之胺基酸修飾。多肽可衍生自生物源或藉由重組技術產生，但未必係轉譯自指定核酸序列。其可以任何方式產生，包括藉由化學合成。

如本文中所揭示之多肽可具有約3個或更多個；5個或更多個；10個或更多個；20個或更多個；25個或更多個；50個或更多個；75個或更多個；100個或更多個；200個或更多個；500個或更多個；1,000個或更多個；或2,000個或更多個胺基酸之大小。多肽可具有指定三維結構，然而其等並非必需具有此類結構。具有指定三維結構之多肽稱為折疊式多肽，而不具有指定三維結構但相反可接受大量不同之構形之多肽稱為未折疊多肽。如本文中所使用，術語醯蛋白係指偶聯至至少一個經胺基酸(例如，絲胺酸或天冬醯胺酸)之含氧或含氮側鏈連接至蛋白質之碳水化合物部分之蛋白質。

所謂「經分離之」多肽或其片段、變體或衍生物意指不在其自然環境中之多肽。無需特定程度的純化。例如，經分離之多肽可自其天然或自然環境移除。在宿主細胞中表現的重組產生之多肽及蛋白質視為如本文中所揭示分離，視為已藉由任何適宜技術分離、分餾或部分或實質上純化之天然或重組多肽。

如本文中所使用，術語「非自然生成之」多肽或其任何語法變體為排除包括但僅排除由或可在任何時候由判定者或管理者或判定機構確定或解釋為「自然生成」之多肽之其等形式的條件術語。

本文中所揭示之其他多肽為前述多肽之片段、衍生物、類似物或變體及其任何組合。如本文中所揭示之術語「片段」、「變體」、「衍生物」及「類似物」包括保留對應之天然抗體或多肽之至少某些性質(例如，特異性結合至抗原)之任何多肽。多肽之片段除了本文其他地方所述之特異性抗體片段外包括(例如)蛋白質分解片段及缺失片段。(例如)多肽之變體包括上述片段，及亦包括具有由於胺基酸代換、缺失或插入而致改變之胺基酸序列之多肽。在某些態樣中，變體可為非自然生成。可採用此項技術已知的突變技術來產生非自然生成之變體。變體多肽可包括保守性或非保守性胺基酸代換、缺失或增加。衍生物為已經過改變以便於展示未在原多肽上發現之額外特徵之多肽。實例包括融合蛋白質。本文中亦可將變體多肽稱為「多肽類似物」。如本文中所使用，多肽之「衍生物」亦可指具有一或多個藉由官能性側基之反應化學衍生得的胺基酸之主體多肽。亦包括呈「衍生物」之彼等含有一或多種二十個標準胺基酸之衍生物之肽。例如，4-羥基脯胺酸可替代脯胺酸；5-羥基離胺酸可替代離胺酸；3-甲基組胺酸可替代組胺酸；高絲胺酸可替代絲胺酸；及鳥胺酸可替代離胺酸。

「保守性胺基酸代換」為一個胺基酸經另一個具有類似側鏈之胺基酸置換之代換。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸家族，

包括鹼性側鏈(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如，天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電荷之極性側鏈(例如，天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如，甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β -分支側鏈(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。例如，苯丙胺酸替代酪胺酸為保守性替代。在某些實施例中，本發明之多肽及抗體之序列之保守性代換不會使得包含該胺基酸序列之多肽或抗體結合至結合分子所結合的抗原作用消除。確定不消除抗原結合之核苷酸及胺基酸保守性代換的方法係相關技術中所熟知的(參見，例如，Brummell 等人，*Biochem.*32:1180-1 187 (1993)；Kobayashi 等人，*Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999)；及 Burks 等人，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:.412-417 (1997))。

術語「多核苷酸」意欲包涵單數個核酸及複數個核酸，且係指經分離之核酸分子或結構，例如，信使RNA(mRNA)、cDNA或質體DNA (pDNA)。多核苷酸可包括習知的磷酸二酯鍵或非習知的鍵(例如，諸如發現於肽核酸(PNA)中之醯胺鍵)。術語「核酸」或「核酸序列」係指存於多核苷酸中之任何一或多個核酸片段，例如，DNA或RNA片段。

所謂「經分離之」核酸或多核苷酸意指自其天然環境分離得的核酸或多核苷酸之任何形式。例如，經凝膠純化之多核苷酸，或包含於載體中之編碼多肽的重組多核苷酸將被視為「經分離」。此外，已經過改造以具有選殖限制位點之多核苷酸片段(例如，PCR產物)被視為「經分離」。經分離之多核苷酸之其他實例包括保持在異源宿主細胞中之重組多核苷酸或在非天然溶液(諸如緩衝液或鹽水)中之經純化(部分或實質上)之多核苷酸。經分離之RNA分子包括多核苷酸之活體

內或活體外RNA轉錄本，其中該轉錄本並非將在自然中發現之轉錄本。經分離之多核苷酸或核酸進一步包括此類合成產生之分子。此外，多核苷酸或核酸可為或可包含調節元件，諸如啟動子、核糖體結合位點或轉錄終止子。

如本文中所使用，「非自然生成之」多核苷酸或其任何語法變體為明確排除但僅排除由或可在任何時候由判定者或管理者或判定機構確定或解釋為「自然生成」之多核苷酸之其等形式的條件定義。

如本文中所使用，「編碼區」為核酸之一部分，其由轉譯成胺基酸之密碼子組成。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但可將其視為編碼區之一部分，然而任何側翼序列(例如，啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子及類似物)為非編碼區域之一部分。兩個或更多個編碼區可存於單一多核苷酸建構物中，例如，在單一載體上或在各別多核苷酸建構物中，例如，在各別(不同)載體上。此外，任何載體可包含單一編碼區或可包含兩個或更多個編碼區，例如，單一載體可各別編碼免疫球蛋白重鏈可變區及免疫球蛋白輕鏈可變區。此外，載體、多核苷酸或核酸可包括融合或未融合至另一編碼區之異源編碼區。異源編碼區包含(但不限於)彼等編碼指定元件或基序者，諸如分泌信號肽或異源功能性域。

在某些實施例中，多核苷酸或核酸為DNA。在DNA之情況下，包括編碼多肽之核酸之多核苷酸通常可包含啟動子及/或其他可操作結合一或多個編碼區之轉錄或轉譯控制元件。可操作之結合係當將用於基因產物(例如多肽)之編碼區以使得該基因產物之表現受到一或多個調節序列之影響或控制下之方式與該(等)調節序列結合。若啟動子功能之誘導會導致編碼該所需基因產物之mRNA之轉錄及若兩個DNA片段之間之連接之性質不干擾表現調節序列引導該基因產物之表現之能力或干擾DNA模板轉錄之能力，則該兩DNA片段(諸如多肽編碼區

及與其結合之啟動子)係「可操作結合」的。因此，若啟動子可影響核酸之轉錄，則該啟動子區將可操作結合該編碼多肽之核酸。該啟動子可為在預定細胞內引導DNA之實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子外，其他轉錄控制元件(例如，強化子、操作子、抑制子及轉錄終止信號)可操作結合該多核苷酸以引導細胞特異性轉錄。

熟悉此項技術者已知各種轉錄控制區。此等包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用之轉錄控制區，諸如(但不限於)來自巨細胞病毒(即刻早期啟動子，其結合內含子-A)、猿猴病毒40(早期啟動子)及逆轉錄病毒(諸如勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))之啟動子及強化子區。其他轉錄控制區包含彼等衍生自脊椎動物基因(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 β -血球蛋白)者及可控制於真核細胞中之基因表現之其他序列。其他的適宜轉錄控制區包含組織特異性啟動子及強化子以及淋巴激素可誘導之啟動子(例如，可藉由干擾素或介白素誘導之啟動子)。

類似地，一般技術者已知各種轉譯控制元件。此等包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子及衍生自微小核糖核酸病毒(特別是內部核糖體進入位點或IRES，亦稱作CITE序列)之元件。

在其他實施例中，多核苷酸可為例如呈信使RNA(mRNA)、轉移RNA或核糖體RNA形式之RNA。

多核苷酸及核酸編碼區可結合其他的編碼分泌肽或信號肽之編碼區，該分泌肽或信號肽引導由如本文中所揭示之多核苷酸編碼之多肽之分泌。根據信號假說，藉由哺乳動物細胞分泌之蛋白具有信號肽或分泌引導序列，其是在引發輸出生長蛋白鏈跨過粗糙內質網時裂解自成熟蛋白。一般技術者知曉由脊椎動物細胞分泌之多肽可具有融合至該多肽之N端之信號肽，其係裂解自完整或「全長」多肽以產生分泌型或「成熟」形式之多肽。在某些實施例中，使用天然信號肽(例

如，免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽)或使用該序列之功能性衍生物，其保留引導與其可操作結合之多肽分泌之能力。或者，可使用異源哺乳動物信號肽或其功能性衍生物。例如，可以人類組織胞漿素原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡萄糖醛酸酶之引導序列替代野生型引導序列。

本文中揭示某些結合分子或其抗原結合片段、變體或衍生物。除非明確提及全長抗體，否則術語「結合分子」包涵全長抗體以及此等抗體之抗原結合次單位、片段、變體、類似物或衍生物，例如，以類似於抗體分子的方式結合抗原但使用不同骨架之經改造之抗體分子或片段。

如本文中所使用，術語「結合分子」在其最寬廣意義上指特定結合至受體之分子，例如，抗原決定基或抗原決定子。如本文中進一步所述，結合分子可包含一或多個本文中所述之「抗原結合域」。結合分子之一非限制性實例為保留抗原特異性結合之抗體或其片段。

如本文中所使用，術語「結合域」、「受體結合域」或「抗原結合域」係指必需且充分特定結合至抗原決定基之結合分子區。例如，「Fv」，例如，抗體之呈兩獨立多肽次單位或呈單鏈之可變重鏈及可變輕鏈視為「結合域」。其他結合域包含(但不限於)衍生自駱駝科物種之抗體之可變重鏈(VHH)或六個在異源架構(例如，不同生殖系或物種)或在不同骨架(例如，纖維黏連蛋白骨架(fibronectin scaffold))中表現之免疫球蛋白互補決定區(CDR)。「結合分子」如本文中所述可包含一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個或更多個「抗原結合域」。

本文中術語「抗體」及「免疫球蛋白」可互換使用。抗體(或其如本文中所述之片段、變體或衍生物)包含重鏈之至少可變域(就駱駝科物種而言)或重鏈及輕鏈之至少可變域。脊椎動物系統中之基本免疫球蛋白結構相對充分瞭解。參見，例如，Harlow等人，Antibodies:

A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988)。除非另外說明，否則術語「抗體」包涵範圍自抗體之小抗原結合片段至全長抗體之任何抗體，例如，包含兩條完整重鏈及兩條完整輕鏈之IgG抗體、包含四條完整重鏈及四條完整輕鏈且視需要包含J鏈及/或分泌元件之IgA抗體或包含十條或十二條完整重鏈及十條或十二條完整輕鏈且視需要包含J鏈之IgM抗體。

如將於下文更詳細地論述，術語「免疫球蛋白」包括各種寬廣類別之可以生物化學方式區分的多肽。熟悉此項技術者當明瞭重鏈被歸類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)及其中的一些子類別(例如， $\gamma 1$ - $\gamma 4$ 或 $\alpha 1$ - $\alpha 2$)。此鏈之性質在於決定抗體之「類別」分別為IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白子類別(同型)，例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂等經充分特徵鑑定且已知可賦予功能性特定化。此等類別及同型中之各者之改良版本可由熟悉此項技術者根據本發明輕易識別，且因此在本發明範圍內。

輕鏈被歸類為 κ 或 λ (κ 、 λ)。各重鏈類別可與 κ 或 λ 輕鏈結合。一般而言，輕鏈及重鏈彼此共價鍵結，及此兩重鏈之「尾」部當在免疫球蛋白由融合瘤、B細胞或經基因改造之宿主細胞產生時藉由共價雙硫鍵聯或非共價鍵聯彼此鍵結。在重鏈中，胺基酸序列係從Y構型叉端的N端至各鏈底部的C端。某些抗體(例如，IgG抗體)之基本結構包含經雙硫鍵共價連接形成「Y」結構(本文中亦稱為「H2L2」結構)之兩個重鏈次單位及兩個輕鏈次單位。

輕鏈及重鏈皆分成具結構性及功能性同源性之區。術語「恆定」及「可變」之使用係功能上的。在此點上，應瞭解可變輕(VL)及可變重(VH)鏈部分二者之可變域決定抗原識別及特異性。反之，輕鏈(CL)及重鏈(CH1、CH2或CH3)之恆定域賦予生物性質，諸如分泌、經胎盤遷移率、Fc受體結合、補體結合及類似者。根據慣例，恆定區

域之編號隨著其從抗體之抗原結合位點或胺基端變遠而增大。N端部為可變區及在C端部為恆定區；CH3(或CH4，在IgM之情況下)及CL域實際上分別包含重鏈及輕鏈之羧基端。

如上所示，結合域(例如，抗體可變區)使得結合分子選擇性地識別且特異性地結合受體、或抗原上之抗原決定基。換言之，結合分子(例如，抗體)之VL域及VH域或互補決定區(CDR)之子組組合以形成界定三維抗原結合位點之可變區。更具體言之，抗原結合位點係由VH及VL鏈各者上之三個CDR界定。某些抗體形成更大的結構。例如，IgA可形成包含兩個H2L2單元、J鏈及分泌元件之分子，其等均經雙硫鍵共價連接，及IgM可形成包含五個或六個H2L2單元且視需要包含經雙硫鍵共價連接之J鏈之五聚體或六聚體分子。

此六個存於抗體抗原結合域中之「互補決定區」或「CDR」為胺基酸之短、非連續序列，其特異性地定位以形成結合域，假設抗體在水性環境中為三維構形。結合域中之剩餘胺基酸(稱為「架構」或「FW」區)顯示更小的分子間可變性。架構區大程度上呈現β-片層構形及CDR形成連接β-片層結構之環路且在一些情況中形成其一部分。因此，架構區可形成提供用於藉由鏈間非共價鍵相互作用使CDR定位在正確位向之骨架。由經定位CDR形成之結合域界定與免疫反應性抗原上抗原決定基互補之表面。此互補表面促使抗體非共價結合至其同源抗原決定基。可由一般技術者輕易識別分別構成任何給定的重或輕鏈可變區之CDR及架構區之胺基酸，此乃因其已經過各種不同方法定義(參見，"Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E. 等人，U.S. Department of Health and Human Services, (1983)；及 Chothia及Lesk, J. Mol.Biol., 196:901-917 (1987)，其等係以其全文引用的方式併入本文中)。

在此項技術中所使用且/或接受之術語存在兩種或更多種定義之

情況中，除非明確陳述相反情況，否則如本文中所使用之術語之定義意欲包括所有此等含義。一特定實例係使用術語「互補決定區」(「CDR」)以描述在重及輕鏈多肽二者之可變區中發現之非連續抗原組合位點。此等特定區已例如由Kabat等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)及由Chothia等人, J. Mol.Biol.196:901-917 (1987)作出描述，其等係以引用方式併入本文中。Kabat及Chothia定義包括彼此比較時之胺基酸之重疊或子集。然而，除非另有說明，否則應用任一定義(或一般技術者已知的其他定義)來指稱抗體或其變體之CDR意欲在如本文中所定義及使用之術語之範圍內。如上文引用的各參考文獻所定義之適宜的包含CDR之胺基酸述於下表1中作為比較。包含特定CDR之準確胺基酸數將隨CDR之序列及大小改變。給出抗體之可變區胺基酸序列的話，熟悉此項技術者可依慣常確定哪些胺基酸包含特定CDR。

表1 CDR定義¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹表1中所有CDR定義之編號係依照Kabat等人(參見下文)所述之編號慣例。

Kabat等人亦界定抗體重鏈及輕鏈(例如，可應用於任何抗體之抗體可變域序列)之編號系統。一般技術者可明確指定此「Kabat編號」系統於任一可變域序列，無需依靠除其序列外之任何實驗數據。如本文中所使用，「Kabat編號」係指Kabat等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest"

(1983)所述之編號系統。除非明確註明使用Kabat編號系統，然而，本發明中之所有胺基酸序列使用連續編號。

結合分子，例如，抗體或其抗原結合片段、變體或衍生物包括(但不限於)多株、單株、人類、人類化或嵌合抗體、單鏈抗體、抗原決定基結合片段(例如，Fab、Fab'及F(ab')₂、Fd、Fvs、單鏈Fvs(scFv)、單鏈抗體、雙硫鍵連接之Fvs(sdFv)、包括VL或VH域之片段、藉由Fab表現庫產生之片段)。ScFv分子係此項技術中已知的並描述(例如)在美國專利案第5,892,019號中。本發明包涵的免疫球蛋白或抗體分子可係免疫球蛋白分子之任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。

所謂「特異性地結合」一般意指結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)經由其抗原結合域結合至抗原決定基，及該結合在抗原結合域與抗原決定基之間需一些互補性。根據此定義，當結合分子經由其抗原結合域結合至抗原決定基比其結合至無規、非相關抗原決定基更容易時，認為該結合分子「特異性地結合」至該抗原決定基。本文使用術語「特異性地」以限定特定結合分子結合至特定抗原決定基之相對親和力。例如，相較於結合分子「B」，結合分子「A」可視為對給定的抗原決定基具有更高特異性或結合分子「A」可認為相較於對相關抗原決定基「D」之結合可以更高特異性結合至抗原決定基「C」。

結合分子(例如，本文中所揭示之抗體或其片段、變體或衍生物)可認為以小於或等於(例如) $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-2} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-3} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-4} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 或 10^{-5} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-6} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ 或 10^{-7} sec^{-1} 之解離率(k(off))結合至標靶抗原。

結合分子(例如，本文中揭示之抗體或抗原結合片段、變體或衍

生物)可認為以大於或等於(例如) $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 或 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 之結合率($k(\text{on})$)結合至標靶抗原。

結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)認為競爭性地抑制參照抗體或抗原結合片段結合至給定的抗原決定基，假若其優先結合至該抗原決定基至其在某種程度上妨礙參照抗體或抗原結合片段結合至抗原決定基之程度。可由此項技術中已知的任何方法(例如，ELISA競爭分析法)來確定競爭性抑制。結合分子可認為競爭性地抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%之參照抗體或抗原結合片段結合至給定的抗原決定基。

如本文中所使用，術語「親和力」係指測量個別抗原決定基與(例如，免疫球蛋白分子之)一或多個結合域結合之強度之量度。參見，例如，Harlow等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988)，第27-28頁。如本文中所使用，術語「結合性」係指結合域群組及抗原間複合之總體穩定性。參見，例如，Harlow，第29-34頁。結合性係與該群組中的個別結合域對特定抗原決定基之親和力相關，及亦與免疫球蛋白及抗原之價數相關。例如，二價單株抗體與具有高重複抗原決定基結構之抗原(諸如聚合物)間之相互作用將係高結合性之相互作用。二價單株抗體與以高密度存於細胞表面上之受體間之相互作用將亦係高結合性。

結合分子或其如本文中所揭示之抗原結合片段、變體或衍生物亦可就其交叉反應性而言進行描述或說明。如本文中所使用，術語「交叉反應性」係指對一種抗原具有特異性之結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)與第二抗原反應之能力；係測量兩種不同抗原物質間相關性之量度。因此，假若結合分子結合至除了誘導其形

成之抗原決定基之外之抗原決定基，則其具交叉反應性。交叉反應性抗原決定基一般包含許多與誘導性抗原決定基相同的互補結構特徵，且在一些情況中，可實際上比初始抗原決定基配合地更好。

結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)亦可就其對抗原之結合親和力而言進行描述或說明。例如，結合分子可以不大於(例如) 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M或 10^{-15} M之解離常數或 K_D 結合至抗原。

包含單鏈抗體或其他結合域之抗體片段可單獨或組合以下中之一或多者存在：鉸鏈區、CH1、CH2、CH3或CH4域、J鏈或分泌元件。亦包含可包括可變區與鉸鏈區、CH1、CH2、CH3或CH4域、J鏈或分泌元件中之一或多者之任何組合之抗原結合片段。結合分子(例如，抗體或其抗原結合片段)可源自於任何動物，包括鳥類及哺乳動物。該等抗體可為人類、鼠類、驢、兔、山羊、天竺鼠、駱駝、美洲駝(llama)、馬或雞抗體。在另一實施例中，可變區可源於軟骨類動物(例如，來自鯊魚)。如本文中所使用，「人類」抗體包括具有人類免疫球蛋白之胺基酸序列之抗體且包括從人類免疫球蛋白庫或從對一或多種人類免疫球蛋白轉殖基因之動物分離得的抗體及可在一些情況中表現內源性免疫球蛋白而有些不表現，如下文及例如美國專利第5,939,598號(Kucherlapati等人)所述。

如本文中所使用，術語「重鏈次單位」包含衍生自免疫球蛋白重鏈之胺基酸序列，結合分子(例如，包含重鏈次單位之抗體)包含以下中之至少一者：VH域、CH1域、鉸鏈(例如，上、中及/或下鉸鏈區)域、CH2域、CH3域、CH4域或其變體或片段。例如，除了VH域

外，結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)可包含CH1域；CH1域、鉸鏈及CH2域；CH1域及CH3域；CH1域、鉸鏈及CH3域；或CH1域、鉸鏈域、CH2域及CH3域。在某些態樣中，除了VH域外，結合分子(例如，抗體或其片段、變體或衍生物)可包含CH3域及CH4域；或CH3域、CH4域及J鏈。另外，用於本發明中之結合分子可缺少某些恆定區部分，例如，全部或部分CH2域。一般技術者應明瞭可改變此等域(例如，重鏈次單位)使得其胺基酸序列與初始免疫球蛋白分子不同。

結合分子(例如，抗體或其片段)之重鏈次單位可包含衍生自不同免疫球蛋白分子之域。例如，多肽之重鏈次單位可包含衍生自IgG1分子之CH1域及衍生自IgG3分子之鉸鏈區。在另一實例中，重鏈次單位可包含部分地衍生自IgG1分子且部分地衍生自IgG3分子之鉸鏈區。在另一實例中，重鏈次單位可包含部分地衍生自IgG1分子且部分地衍生自IgG4分子之嵌合鉸鏈。

如本文中所使用，術語「輕鏈次單位」包含衍生自免疫球蛋白輕鏈之胺基酸序列。輕鏈次單位包含VL或CL(例如，C κ 或C λ)域中之至少一者。

結合分子(例如，抗體或其抗原結合片段、變體或衍生物)可就抗原之使得結合分子識別或特異性地結合之抗原決定基或部分而言進行描述或說明。標靶抗原之與抗體之抗原結合域特異性地相互作用之部分為「抗原決定基」或「抗原決定子」。標靶抗原可包含單一抗原決定基或至少兩個抗原決定基，且可包含任何數目之抗原決定基，根據抗原的大小、構形及類型而改變。

如前面所示，已知各種免疫球蛋白類別之恆定區之次單位結構及三維構形。如本文中所使用，術語「VH域」包含免疫球蛋白重鏈之胺基端可變域及術語「CH1域」包含免疫球蛋白重鏈之第一(大部

分胺基端)恆定區域。CH1域與VH域相鄰且胺基在典型免疫球蛋白重鏈分子之鉸鏈區末端。

如本文中所使用，術語「CH2域」包含重鏈分子之部分，其(例如)使用習知的編號方法自IgG抗體之約胺基酸244延伸至胺基酸360(胺基酸244至360，Kabat編號系統；及胺基酸231-340，EU編號系統；參見Kabat EA等人上文所引著作(*op. cit.*))。CH3域自IgG分子之CH2域延伸至C端且包含約108個胺基酸。某些免疫球蛋白類別(例如IgM)進一步包含CH4區。

如本文中所使用，術語「鉸鏈區」包含重鏈分子之連接CH1域至CH2域之部分。此鉸鏈區包含約25個胺基酸且係可撓的，因此容許兩個N端抗原結合區獨立地移動。

如本文中所使用，術語「雙硫鍵」包含形成於兩個硫原子之間之共價鍵。胺基酸半胱胺酸包含可與第二硫醇基形成雙硫鍵或橋之硫醇基。在某些IgG分子中，CH1及CL區由雙硫鍵連接及兩條重鏈由兩個雙硫鍵在使用Kabat編號系統對應於239及242之位置(位置226或229，EU編號系統)連接。在本文中所提供之某些態樣中，人類IgG4 Fc域可於鉸鏈區中突變以確保兩個鉸鏈區間的雙硫鍵形成，特別係在位置228(根據EU編號)絲胺酸突變成脯胺酸。本文中將包含該S228P突變之人類IgG4 Fc域稱為「IgG4P Fc域」。

如本文中所使用，「Fc-TM區」為包含依如Kabat中所述之EU標誌編號為L234F、L235E及P331S之胺基酸代換且展現經減小或切除之效應子(ADCC及/或CDC)功能、經減小或切除之與Fc受體之結合及/或經減小或切除之毒性之人類IgG Fc區。參見，例如，美國專利申請公開案第2011/0059078號，其係以其全文引用的方式併入本文中。

如本文中所使用，術語「嵌合抗體」係指免疫反應性區或位點獲自或衍生自第一物種而恆定區(其可係完整、部分或經過改變)獲自

第二物種之抗體。在一些實施例中，標靶結合區或位點將源自於非人類(例如小鼠或靈長類動物)而恆定區為人類。

術語「多特異性抗體」或「雙特異性抗體」係指在單一抗體分子中具有針對兩個或更多個不同抗原決定基之結合域之抗體。除了典型抗體結構外之其他結合分子可經建構為具有兩種結合特異性。雙特異性或多特異性抗體之抗原決定基結合可同時或可連續。三體瘤及雜交融合瘤為可分泌雙特異性抗體之細胞系的兩個實例。雙特異性抗體亦可由重組方法建構。(Ströhlein及Heiss, *Future Oncol.* 6:1387-94 (2010); Mabry及Snavey, *IDrugs.*13:543-9 (2010))。雙特異性抗體亦可為雙鏈抗體。

如本文中所使用，術語「經改造之抗體」係指重鏈及輕鏈任一者或二者中之可變域藉由至少部分置換CDR或架構區任一者中之一或多個胺基酸而改變之抗體。在某些態樣中，來自已知特異性之抗體之全部CDR可接枝至異源抗體之架構區中。雖然替代CDR可衍生自與衍生架構區的抗體相同類別或甚至子類之抗體，CDR亦可衍生自不同類別之抗體，例如，衍生自來自不同物種之抗體。一或多個來自已知特異性之非人類抗體之「供體」CDR接枝至人類重鏈或輕鏈架構區中之經改造之抗體在本文中稱為「人類化抗體」。在某些態樣中，並非全部CDR經來自供體可變區之完整CDR置換而供體之抗原結合能力仍可轉移給接受者可變域。給出述於例如美國專利第5,585,089號、第5,693,761號、第5,693,762號及第6,180,370號中之說明，熟悉此項技術者有能力藉由進行例行實驗或藉由試驗及錯誤測試以獲得功能性經改造或人類化抗體。

如本文中所使用，術語「經改造」包括藉由合成方法(例如，藉由重組技術、活體外肽合成、藉由肽之酶促或化學偶聯或此等技術之某種組合)操控核酸或多肽分子。

如本文中所使用，術語「連接」、「融合(fused或fusion)」或其他語法等效詞可互換使用。此等術語係指藉由包括化學結合或重組方式的方式將兩個以上之元件或組件接合在一起。「框內融合」係指以保持原始ORF之轉譯讀框之方式接合兩個或更多個多核苷酸開放讀框(ORF)以形成連續較長ORF。因此，重組融合蛋白為包含兩個或更多個對應於由原始ORF(其區段在自然中通常不如此接合)編碼之多肽之區段之單一蛋白。儘管在整個融合區段中如此連續製造該讀框，但可藉由(例如)框內連接子序列物理地或空間地分開該等區段。例如，編碼免疫球蛋白可變區之CDR之多核苷酸可融合(框內)，但係藉由編碼至少一個免疫球蛋白架構區或其他CDR區之多核苷酸分開，只要「融合」CDR經共轉譯為連續多肽之部分。

在多肽背景內容中，「線性序列」或「序列」係胺基酸以胺基端至羧基端之方向於多肽中之順序，其中在該序列中彼此相鄰之胺基酸在多肽之初級結構中係鄰接的。多肽之係多肽之另一部分的「胺基端」或「N端」之部分為該較早出現在連續多肽鏈中之部分。類似地，多肽之係多肽之另一部分的「羧基端」或「C端」之部分為該較晚出現在連續多肽鏈中之部分。例如，在典型抗體中，可變域為恆定區之「N端」，且該恆定區為可變域之「C端」。

如本文中所使用，術語「表現」係指基因產生生化物(例如多肽)之過程。該過程包括基因於細胞內之任何功能性呈現之操作，包括(但不限於)基因敲低(gene knockdown)及暫態表現及穩態表現兩者。其包括(但不限於)基因轉錄成信使RNA (mRNA)及此類mRNA轉譯成多肽。若最終所需產物為生化物，則表現包括該生化物及任何前驅物之產生。基因之表現產生「基因產物」。如本文中所使用，基因產物可為核酸(例如，藉由基因之轉錄產生之信使RNA)或轉譯自轉錄本之多肽。本文中所描述之基因產物進一步包含經轉錄後修飾(例如，聚

腺核苷酸化)之核酸或經轉譯後修飾(例如，甲基化、醯化、脂質加成、與其他蛋白質次單位結合、蛋白酶切割及類似者)之多肽。

術語諸如「治療」或「療法」或「以治療」或「減緩」或「以減緩」係指治愈、減慢、減輕原有的確診病理病況或病症之症狀及/或阻止或減慢原有的確診病理病況或病症之進展之治療性措施。術語諸如「防止」、「預防」、「避免」、「制止」及類似詞係指防止未經確診之標靶病理病況或病症發展之預防性(prophylactic/preventative)措施。因此，「彼等需要治療者」可包括彼等已經患有病症者；彼等易於罹患病症者；及彼等欲預防病症者。

OX40或「OX40受體」為表現於活化T細胞(例如， $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T細胞)及 $Foxp3^+CD4^+$ 調節性T細胞(Treg)之表面上之蛋白質(亦稱為CD134，腫瘤壞死因子受體超家族成員4，及ACT-35)。天然 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T細胞不表現OX40 (Croft, M., (2010) *Ann Rev Immunol* 28:57-78)。

「OX40配體」(「OX40L」)(亦稱為腫瘤壞死因子配體超家族成員4、gp34、TAX轉錄活化之醯蛋白-1及CD252)主要發現於抗原呈現細胞(APC)上，且可於活化B細胞、樹突細胞(DC)、蘭格漢氏細胞、類漿DC及巨噬細胞(*Id.*)上進行誘導。包含活化T細胞、NK細胞、肥大細胞、內皮細胞及平滑肌細胞之其他細胞可表現OX40L以對發炎細胞介素反應(*Id.*)。OX40L特異性地結合至OX40受體。人類蛋白質述於PCT公開案第WO 95/21915號中。小鼠OX40L述於美國專利第5,457,035號中。OX40L表現於細胞之表面上且包含胞內、跨膜及胞外受體結合域。可藉由刪除胞內域及跨膜域產生OX40L之功能性活性可溶性形式，如例如美國專利第5,457,035號及第6,312,700號及WO 95/21915中所述，該等案件之揭示內容係針對於所有目的併入本文中。OX40L之功能活性形式為保留特異性結合至OX40之能力之形

式，即，其具有OX40「受體結合域」。下文討論判定OX40L分子或衍生物特異性結合至OX40之能力的方法。製造及使用OX40L及其衍生物(諸如包含OX40結合域之衍生物)之方法述於WO 95/21915中，其亦描述包括連接至其他肽(諸如人類免疫球蛋白(「Ig」)Fc區域)之OX40L之可溶性形式之蛋白質，其可經產生以促進OX40配體自培養之細胞純化或以增強分子在活體內投與給哺乳動物後之穩定性(亦參見，美國專利第5,457,035號及PCT公開案第WP 2006/121810號，此兩案係以其全文引用的方式併入本文中)。

所謂「個體(subject)」或「個體(individual)」或「動物」或「患者」或「哺乳動物」意指需要診斷、預後或療法之任何個體，特別是哺乳動物個體。哺乳動物個體包括人類、馴養動物、農場動物、及動物園中之動物、運動動物或寵物(諸如狗、貓、天竺鼠、兔、大鼠、小鼠、馬、豬、牛、熊等等)。

如本文中所使用，詞組諸如「將自療法獲益之個體」及「需要治療之動物」包括將自投與人類化抗OX40抗體獲益之個體，諸如哺乳動物個體。此等抗體可例如用於診斷程序且/或用於治療或預防疾病，例如，癌症。

人類化抗OX40抗體及其抗原結合片段

本發明係關於特異性結合至OX40之抗體，例如，人類化抗體。在某些態樣中，可分離如本文中所提供之抗體或其片段。在某些態樣中，如本文中所提供之抗體或其片段可係實質上純。在某些態樣中，如本文中所提供之抗體或其片段可係非自然生成。

在某些態樣中，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其包含OX40mAb5、OX40mAb8、OX40mAb10、OX40mAb11、OX40mAb12、OX40mAb13、OX40mAb14、OX40mAb15、OX40mAb16、OX40mAb17、OX40mAb18、

OX40mAb19 、 OX40mAb20 、 OX40mAb21 、 OX40mAb22 、
OX40mAb23 、 OX40mAb24 、 OX40mAb25 、 OX40mAb25a 、
OX40mAb26 、 OX40mAb27 、 OX40mAb28 、 OX40mAb29 、
OX40mAb30、OX40mAb31、OX40mAb32或OX40mAb37之VH及VL。
在某些態樣中，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片
段，其包含OX40mAb5、OX40mAb8、OX40mAb10、OX40mAb11、
OX40mAb12 、 OX40mAb13 、 OX40mAb14 、 OX40mAb15 、
OX40mAb16 、 OX40mAb17 、 OX40mAb18 、 OX40mAb19 、
OX40mAb20 、 OX40mAb21 、 OX40mAb22 、 OX40mAb23 、
OX40mAb24 、 OX40mAb25 、 OX40mAb25a 、 OX40mAb26 、
OX40mAb27 、 OX40mAb28 、 OX40mAb29 、 OX40mAb30 、
OX40mAb31或OX40mAb32之重鏈及輕鏈。

在某些態樣中，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結
合片段，其包含抗體VH及抗體VL，其中該VL包含與參照胺基酸序列
SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32至少70%、75%、80%、85%、90%、
95%或100%一致之胺基酸序列。

在某些態樣中，本發明提供一種包含抗體VH及抗體VL之人類化
抗OX40抗體或其抗原結合片段，其中該VL包含SEQ ID NO:29或SEQ
ID NO:32。

本發明進一步提供一種包含抗體VH及抗體VL之人類化抗OX40
抗體或其抗原結合片段，其中該VH包含VH-CDR1、VH-CDR2及VH-
CDR3胺基酸序列，該等胺基酸序列與以下相同或除了一或多個VH-
CDR中之八處、七處、六處、五處、四處、三處、兩處或一處單胺基
酸代換、缺失或插入外與以下相同：VHCDR1胺基酸序列SEQ ID
NO:8、VHCDR2胺基酸序列SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID
NO:16及VHCDR3胺基酸序列SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID

NO:27。

本發明進一步提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其包含抗體VH及抗體VL，其中該VH包含具有下式之胺基酸序列：

HFV1-HCDR1-HFV2-HCDR2-HFV3-HCDR3-HFV4，

其中HFV1為SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7，HCDR1為SEQ ID NO:8，HFV2為SEQ ID NO:9，HCDR2為SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16，HFV3為SEQ ID NO:17，HCDR3為SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27，及HFV4為SEQ ID NO:28。在某些態樣中，HFV2之胺基酸序列為SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13。在某些態樣中，HFV3之胺基酸序列為SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。

除此之外，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其包含抗體VH及抗體VL，其中該VH包含與以下參照胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67。

在一個態樣中，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其包含抗體VH及抗體VL，其中該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:29及該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:59。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段除了VH及VL外可包括重鏈恆定區或其片段。在某些態樣中，重鏈恆定區為人類重鏈恆定區，例如，人類IgG恆定區，例如，人類IgG1恆定區或

人類IgG4恆定區。如本文中其他地方所述，在某些態樣中，重鏈恆定區或其片段(例如，人類IgG恆定區或其片段)相對於野生型IgG恆定區可包含一或多處胺基酸代換，其中該經修飾IgG相對於野生型IgG恆定區具有一或多種所需性質。例如，如本文中其他地方所述，人類IgG恆定區可為IgG4P恆定區或IgG1-TM恆定區。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段除了VH及VL外可包含且視需要包含重鏈恆定區或其片段、輕鏈恆定區或其片段。在某些態樣中，輕鏈恆定區為 κ 或 λ 輕鏈恆定區，例如，人類 κ 恆定區或人類 λ 恆定區。在一特定態樣中，輕鏈恆定區為人類 κ 恆定區。

在某些態樣中，本發明提供一種人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其包含抗體重鏈或其片段及抗體輕鏈或其片段，其中該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO:71，及該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO:30。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可為例如單株、多株、重組、多特異性或其任何組合。人類化抗OX40抗體或抗原結合片段可為例如Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段、sc(Fv)₂片段、Fd片段、經雙硫鍵鏈結之Fv片段、V-NAR域、IgNar、胞內抗體、IgG Δ CH₂抗體、F(ab')₃片段、四鏈抗體(tetrabody)、三鏈抗體(triabody)、雙鏈抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab片段、mAb₂片段、(scFv)₂片段或scFv-Fc片段。

在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可特異性地結合至人類、馬來猴或恆河猴OX40。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可特異性地結合至初代人類、馬來猴、或恆河猴CD4 T細胞或Jurkat細胞之表面。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其

抗原結合片段可特異性地結合至表現於人類、馬來猴、恆河猴之活化CD4⁺或CD8⁺ T細胞上之OX40或其任何組合。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可特異性地結合至表現於人類、馬來猴、恆河猴之初代活化CD4⁺ T細胞上之OX40或其任何組合。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段不結合至鼠類或大鼠OX40。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段不與列於下文實例3之表3-1中之相關TNFRSF蛋白質(例如，TNFRSF蛋白質)交叉反應。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可包含一或多個保守性胺基酸變化，例如，高達十個保守性變化(例如，兩個經取代之胺基酸、三個經取代之胺基酸、四個經取代之胺基酸或五個經取代之胺基酸等)，限制條件為可在該多肽中作出該等變化而不改變該人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之生化功能，例如，特異性地結合至OX40，由此引起信號傳導。例如，可在如本文中所提供之抗體之受體結合域中作出一或多個保守性變化而不阻斷其結合至OX40之能力。

此外，可刪除多肽域之部分而不削弱或消除其所有功能。類似地，可於多肽鏈中製造插入或增加(例如，增加抗原決定基標籤)而不削弱或消除其功能，如下所述。可作出之不實質性削弱多肽之一或多個功能之其他修飾包括(例如)合併特殊胺基酸之活體內或活體外化學及生化修飾。此類修飾包括如一般技術者將容易瞭解之例如乙醯化、羧基化、磷酸化、醯化、標記(例如以放射性核種標記)及各種酵素性修飾。各種用於標記多肽之方法及適用於此類目的之標記係此項技術中所熟知的，且包括放射性同位素(諸如³²P)、螢光團、化學發光劑、酵素及抗配體。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可進一

步包含異源劑，例如，穩定劑、免疫反應調節劑或可偵測劑。在某些態樣中，該異源劑包含一或多個經由肽鍵融合至該多肽次單位之額外多肽序列，諸如信號序列(例如，分泌信號序列)、連接子序列、胺基酸標籤或標記，或促進純化之肽或多肽序列。在某些態樣中，該異源多肽可融合至重鏈或輕鏈抗體次單位或其片段的N端或C端，只要維持該等域之功能性特徵即可。

在某些態樣中，該異源劑可化學結合至如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段。可化學結合至該多肽次單位之例示性異源劑包括(但不限於)連接子、藥物、毒素、顯影劑、放射性化合物、有機及無機聚合物及任何可提供該多肽次單位本身不提供之所需活性之其他組合物。特定試劑包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、細胞毒性劑、放射性核種、顯影劑、生物素。

在某些態樣中，本發明提供某些抗OX40L抗體以用作對照或研究工具。例如，本發明提供一種如本文中所述之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其中該VH及VL係分別融合至鼠類IgG1重鏈及鼠類 κ 輕鏈。此「逆轉嵌合體」適用於恆河猴之活體內表徵。在另一實例中，該在如本文中所提供之人類化抗OX40抗體上之VH區可經連接至各種具有經改變之效應子功能之重鏈恆定區，例如，人類IgG4P或人類IgG1TM，如本文中其他地方所述。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可特異性地結合至表現於人類、馬來猴、恆河猴之初代活化T細胞(例如，初代活化CD4⁺ T細胞、初代活化CD8⁺ T細胞及/或調節性T細胞)上之OX40或其任何組合。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段(例如，OX40mAb24)可以約0.01 pM至約1 nM，例如，約1 pM至約500 pM，例如，約100 pM至約400 pM，例如，約250 pM至約370 pM之結合親和力結合至表現於初代活化人類

CD4⁺ T細胞上之人類OX40，所有結果藉由流式細胞計數法測得。例如，人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以約0.1 pM、約0.5 pM、約1 pM、約10 pM、約50 pM、約100 pM、約150 pM、約200 pM、約250 pM、約275 pM、約300 pM、約325 pM、約350 pM、約370 pM、約400 pM、約425 pM、約450 pM、約475 pM、約500 pM、約550 pM、約600 pM、約650 pM、約700 pM、約750 pM或約1 nM之結合親和力結合至表現於初代活化人類CD4⁺ T細胞上之人類OX40，所有結果藉由流式細胞計數法測得。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以約312 pM之結合親和力結合至表現於初代活化人類CD4⁺ T細胞上之人類OX40。如一般技術者所熟知，可藉由許多不同方法及/或儀器測量結合親和力，及相對結合親和力可根據方法或儀器而改變。

如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可佔有及交聯細胞(例如，初代活化人類CD4⁺ T細胞)表面上之部分或全部OX40分子。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可結合至表現於初代活化人類CD4⁺ T細胞上之人類OX40，且可以如藉由流式細胞計數法測得之約0.01 pM至約1 nM，例如，約0.1 pM至約500 pM，例如，約1 pM至約200 pM，例如，約10 pM至約100 pM，例如，約50 pM至約100 pM，例如，約63 pM至約93 pM，例如，約1 pM、約10 pM、約20 pM、約30 pM、約40 pM、約50 pM、約60 pM、約70 pM、約78 pM、約80 pM、約90 pM、約100 pM或150 pM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成20%受體佔有率(EC₂₀)。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約78 pM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成20%受體佔有率(EC₂₀)。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可結合至表

現於初代活化人類CD4⁺ T細胞上之人類OX40，且全部可以如流式細胞計數法測得之約0.01 pM至約1 nM，例如，約1 pM至約500 pM，例如，約100 pM至約400 pM，例如，約250 pM至約370 pM，例如，約100 pM、約150 pM、約200 pM、約250 pM、約275 pM、約300 pM、約325 pM、約350 pM、約370 pM、約400 pM、約425 pM、約450 pM、約475 pM或約500 pM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成50%受體佔有率(EC₅₀)。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約312 pM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成50%受體佔有率(EC₅₀)。在某些態樣中，人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可結合至表現於初代活化人類CD4⁺ T細胞上之人類OX40，且可以如藉由流式細胞計數法測得之約100 pM至約100 nM，例如，約500 pM至約10 nM，例如，約1 nM至約500 nM，例如，約2 nM至約4 nM，例如，約1 nM、約2 nM、約3 nM、約4 nM或約5 nM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成90%受體佔有率(EC₉₀)。在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約2290 pM至約3330 pM，例如，約2810 pM之濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成90%受體佔有率(EC₉₀)。

在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約250 pM至約600 pM，例如，約424 pM之結合親和力結合至表現於OX40過度表現Jurkat細胞上之人類OX40。

在某些態樣中，人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可結合至表現於OX40過度表現Jurkat細胞上之人類OX40，且可以如藉由流式細胞計數法測得之約60至約150 pM之濃度達成EC₂₀，以約250至約600 pM之濃度達成EC₅₀，及以約2260至約4390 pM之濃度達成EC₉₀。在某

些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可結合至表現於OX40過度表現Jurkat細胞上之人類OX40，且可以如藉由流式細胞計數法測得之約106 pM之濃度達成EC₂₀，以約424 pM之濃度達成EC₅₀，及以約3820 pM之濃度達成EC₉₀。

在另一實例中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約340 pM至約820 pM，例如，約580 pM之結合親和力結合至表現於初代活化馬來猴CD4⁺ T細胞上之馬來猴OX40。在另一實例中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可以如藉由流式細胞計數法測得之約130 pM至約600 pM，例如，約370 pM之結合親和力結合至表現於初代活化恆河猴CD4⁺ T細胞上之恆河猴OX40。

在某些態樣中，於基於板之分析法中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可誘導活化CD4⁺ T細胞之劑量依賴性增殖。例如，在如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段(例如，OX40mAb24)之活體外分析中，可以約14 pM至約28 pM，例如，約21 pM之抗體濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞中達成20%最大增殖反應(EC₂₀)，可以約0.3 pM至約130 pM，例如，約28 pM之抗體濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞中達成50%最大增殖反應(EC₅₀)，及可以約50 pM至約90 pM，例如，約72 pM之抗體濃度於初代活化人類CD4⁺ T細胞中達成90%最大增殖反應(EC₉₀)，所有結果藉由流式細胞計數法測得。

在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可誘導自活化CD4⁺ T細胞，例如，人類初代活化CD4⁺ T細胞之劑量依賴性細胞介素釋放。在某些態樣中，經釋放之細胞介素為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 或其任何組合。在某些態樣中，該細胞介素為IFN γ 、TNF α 、IL-

5、IL-10、IL-13或其任何組合。類似地，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可於初代活化馬來猴CD4⁺ T細胞及於初代活化恆河猴CD4⁺ T細胞中達成CD4⁺ T細胞增殖及細胞介素釋放。

在其他態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可在FcγR表現細胞存在下於OX40表現T細胞中活化NFκB路徑。例如，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可於對NFκB信號傳導路徑之刺激反應而產生螢光素酶之OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶報導細胞中活化NFκB路徑。或者，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可於表現人類OX40、馬來猴OX40或恆河猴OX40之細胞中活化NFκB路徑。

在又另一態樣中，當以有效劑量投與需要癌症治療之個體時，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可促進癌症治療，例如，藉由減慢腫瘤生長，使腫瘤生長停止，或減小現存腫瘤尺寸。在某些態樣中，可在T細胞之存在下達成癌症治療之促進。在某些態樣中，當以有效劑量投與需要治療之個體時，相較於投與同型匹配對照抗體，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可減少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%之腫瘤生長。

又於其他態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可透過結合至OX40誘導活化OX40表現T細胞之增殖，且同時觸發對抗該等OX40表現T細胞(例如，活化CD4⁺ T細胞、活化CD8⁺ T細胞及/或調節性T細胞)之補體依賴性或抗體依賴性細胞毒性。此外在某些態樣中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可透過結合至OX40誘導OX40表現T細胞(例如，活化OX40表現CD4⁺、CD8⁺ T細胞及/或調節性T細胞)之增殖，且同時結合至C1q或引起OX40表現T細胞(例如，活化CD4⁺ T細胞、活化CD8⁺ T

細胞及/或調節性T細胞)之NK細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性。

在某些態樣中，本發明提供一種抗OX40抗體或其片段，其包含連接至鼠類重鏈恆定區之人類化VH及連接至鼠類輕鏈恆定區之人類化VL，其中該重鏈包含SEQ ID NO:81及該輕鏈包含SEQ ID NO:83。在某些態樣中，該重鏈恆定區可為例如鼠類IgG1恆定區。在某些態樣中，該輕鏈恆定區可為例如鼠類 κ 恆定區。

在某些態樣中，本發明提供一種大鼠抗小鼠OX40抗體或其抗原結合片段，其包含大鼠VH及大鼠VL，其中該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:85及該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:88。在某些態樣中，此抗體或其片段進一步包含融合至VL的C端之輕鏈恆定區或其片段。該輕鏈恆定區可為例如鼠類 κ 恆定區。在某些態樣中，此抗體或其片段進一步包含融合至VH的C端之重鏈恆定區或其片段。該重鏈恆定區可為例如鼠類IgG2a恆定區。在某些態樣中，此大鼠抗小鼠OX40抗體包含重鏈胺基酸序列SEQ ID NO:86及輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO:89。在某些態樣中，如本文中所提供之大鼠抗小鼠OX40抗體或其片段可特異性地結合至小鼠OX40。在某些態樣中，對小鼠投與有效劑量之如本文中所提供之大鼠抗小鼠OX40抗體或其片段可抑制小鼠中之小鼠癌細胞系生長。

在某些態樣中，如本文中所提供之大鼠抗小鼠OX40抗體片段可為例如Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段或sc(Fv)₂片段或其任何組合。

編碼人類化ANTI-OX40抗體、片段或次單位之多核苷酸

本發明提供包含編碼人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之核酸序列之多核苷酸。例如，本發明提供一種多核苷酸或兩種或更多種多核苷酸，其包含編碼人類化抗OX40抗體或人類化抗OX40抗體之次單位或編碼此類抗體之抗原結合片段之核酸序列。本發明之多核苷酸

可呈RNA之形式或呈DNA之形式。DNA包括cDNA、基因組DNA(例如，經修飾之基因組DNA)及合成DNA；且可為雙股或單股，若單股可為編碼股或非編碼(反義)股。

在某些態樣中，可分離多核苷酸。在某些態樣中，多核苷酸可係實質上純。在某些態樣中，多核苷酸可係非自然生成。在某些態樣中，多核苷酸可為cDNA或係衍生自cDNA。在某些態樣中，多核苷酸可重組產生。在某些態樣中，多核苷酸針對該成熟多肽可包含在相同讀框中融合至一可幫助例如多肽自宿主細胞表現及分泌之多核苷酸的編碼序列，例如作用為控制自細胞運輸多肽之分泌序列之引導序列。具有引導序列之多肽為前蛋白質且可具有由宿主細胞裂解以形成該多肽之成熟形式之引導序列。

在某些態樣中，本發明提供一種多核苷酸，其包含編碼本文所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段或本文所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之多肽次單位之核酸。

亦提供多核苷酸，其包含一個或小數目之缺失、增加及/或代換之核酸序列。此類變化可係鄰接的或可分佈於核酸之不同位置。實質上相同之核酸序列可例如具有1個或2個或3個或4個或甚至更多個核苷酸缺失、增加及/或代換。在某些態樣中，該等一或多個缺失、增加及/或代換不改變該多核苷酸序列編碼之讀框，使得該核酸表現時產生經修飾(「突變體」)但實質上相同之多肽。

在某些態樣中，本發明提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼抗體VL之核酸，其中該VL包含與參照胺基酸序列SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列。在某些態樣中，該多核苷酸編碼抗體輕鏈且包含與參照核酸序列SEQ ID NO:31至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之核苷酸序列。

在某些態樣中，本發明提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼抗體VL之核酸，其中該VL包含SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32。

本發明進一步提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼抗體VH之核酸，其中該VH包含與以下相同或除了一或多個VH-CDR中之八處、七處、六處、五處、四處、三處、兩處或一處單胺基酸代換、缺失或插入外與以下相同之VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列：VHCDR1胺基酸序列SEQ ID NO:8、VHCDR2胺基酸序列SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16及VHCDR3胺基酸序列SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27。

本發明進一步提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼抗體VH之核酸，其中該VH包含具有下式之胺基酸序列：

HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4，

其中HFW1為SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7，HCDR1為SEQ ID NO:8，HFW2為SEQ ID NO:9，HCDR2為SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16，HFW3為SEQ ID NO:17，HCDR3為SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27，及HFW4為SEQ ID NO:28。在某些態樣中，HFW2之胺基酸序列為SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13。在某些態樣中，HFW3之胺基酸序列為SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。

除此之外，本發明提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼抗體VH之核酸，其中該VH包含與以下參照胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、

SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67。在某些態樣中，多核苷酸包含與以下參照核酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之核苷酸序列：SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:68。

在某些態樣中，本發明提供一種多核苷酸，其包含SEQ ID NO:60之核酸、SEQ ID NO:31之核酸、SEQ ID NO:72之核酸或其任何組合。

進一步提供一種載體，其包含如上所述之多核苷酸。適宜之載體述於本文中其他地方，且為一般技術者已知。

在某些態樣中，本發明提供一種組合物，例如，醫藥組合物，其包含如上所述之多核苷酸或載體，視需要進一步包含一或多種載劑、稀釋劑、賦形劑或其他添加劑。

在某些態樣中，本發明提供一種多核苷酸組合物，其包含：包含編碼VH之核酸之多核苷酸及包含編碼VL之核酸之多核苷酸。根據此態樣，該VL及VH共同可包含參照胺基酸序列SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之VL胺基酸序列、及包含以下之VH：(a)與以下相同或除了一或多個VH-CDR中之八處、七處、六處、五處、四處、三處、兩處或一處單胺基酸代換、缺失或插入外與以下相同之VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列：VHCDR1胺基酸序列SEQ ID NO:8、VHCDR2胺基酸序列SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16及VHCDR3胺基酸序列SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27；(b)具有下

式之胺基酸序列：

HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4，

其中HFW1為SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7，HCDR1為SEQ ID NO:8，HFW2為SEQ ID NO:9，HCDR2為SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16，HFW3為SEQ ID NO:17，HCDR3為SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27，及HFW4為SEQ ID NO:28；或(c)與以下參照胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67。就VH(b)而言，HFW2之胺基酸序列可為SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13；及/或HFW3之胺基酸序列可為SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。

在如上所述之多核苷酸組合物中，包含編碼VH之核酸之多核苷酸及包含編碼VL之核酸之多核苷酸可存在於單一載體中，或可在個別非相同載體上。因此，本發明提供一或多種包含上文所述之多核苷酸組合物之載體。

在一些情況中，如上所述之編碼VH及VL之多核苷酸組合物可編碼可特異性結合至OX40(例如，人類OX40、馬來猴OX40及/或恆河猴OX40)之人類化抗體或其抗原結合片段。

在某些態樣中，本發明提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼包含連接至鼠類重鏈恆定區之人類化VH及連接至鼠類輕鏈恆定區之人類化VL之抗OX40抗體或其片段之核酸，其中該重鏈包含SEQ ID

NO:81及該輕鏈包含SEQ ID NO:83。在某些態樣中，該重鏈恆定區可為例如鼠類IgG1恆定區。在某些態樣中，該輕鏈恆定區可為例如鼠類 κ 恆定區。

在某些態樣中，本發明提供一種分離的多核苷酸，其包含編碼包含大鼠VH及大鼠VL之大鼠抗小鼠OX40抗體或其抗原結合片段之核酸，其中該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:85及該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:88。在某些態樣中，此抗體或其片段進一步包含融合至VL的C端之輕鏈恆定區或其片段。該輕鏈恆定區可為例如鼠類 κ 恆定區。在某些態樣中，此抗體或其片段進一步包含融合至VH的C端之重鏈恆定區或其片段。該重鏈恆定區可為例如鼠類IgG2a恆定區。在某些態樣中，此大鼠抗小鼠OX40抗體包含重鏈胺基酸序列SEQ ID NO:86及輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO:89。在某些態樣中，如本文中所提供之大鼠抗小鼠OX40抗體或其片段可特異性地結合至小鼠OX40。在某些態樣中，對小鼠投與有效劑量之如本文中所提供之大鼠抗小鼠OX40抗體或其片段可抑制小鼠中之小鼠癌細胞系生長。

本發明進一步提供一種宿主細胞，其包含如上文所提供之多核苷酸、多核苷酸組合物或載體，其中該宿主細胞可在一些情況中表現特異性結合至OX40(例如，人類OX40、馬來猴OX40或恆河猴OX40)之抗體或其抗原結合片段。此類宿主細胞可用於製造如本文中所提供之抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括(a)培養宿主細胞及(b)分離自宿主細胞表現之抗體或其抗原結合片段。

亦提供多核苷酸變體。多核苷酸變體可包含編碼區、非編碼區或二者中之變化。在一些態樣中，多核苷酸變體包含產生沉默代換、增加或缺失但不改變經編碼多肽之性質或活性之變化。在一些態樣中，多核苷酸變體係因由於遺傳密碼之簡併性所致之沉默代換產生。可出於多種原因產生出多核苷酸變體(例如)以對特定宿主最佳化密碼

子表現(藉由細菌宿主諸如大腸桿菌(*E. coli*)將人類mRNA中之密碼子變成其等密碼子)。亦提供包含本文中所述之多核苷酸之載體及細胞。

在一些態樣中，可由化學合成法使用寡核苷酸合成儀來建構編碼人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之DNA序列。可基於所需多肽之胺基酸序列基礎上及選擇其等在將產生所述重組多肽之宿主細胞中偏好的密碼子來設計此等寡核苷酸。可應用標準方法以合成分離的編碼分離的所述多肽之多核苷酸序列。例如，完整胺基酸序列可用於建構經回譯之基因。另外，可合成包含編碼特定分離的多肽之核苷酸序列之DNA寡聚物。例如，可合成若干的編碼所需多肽之部分之小寡核苷酸且接著拼接。該等個別寡核苷酸可針對於互補組合體包含5'或3'突出物。

在組合(藉由合成、定點突變或另一方法)後，可立刻將所述之編碼特定的分離的多肽之多核苷酸序列插入至表現載體中且可操作連接至適合在所需宿主中表現蛋白質之表現對照序列。可例如藉由核苷酸定序、限制製圖/或生物活性多肽在適宜宿主中之表現證實適當的組合。為了獲得經轉染基因在宿主中之高表現水平，可將該基因操作連接至在所選表現宿主中具功能性之轉錄及轉譯表現控制序列或與其結合。

在某些態樣中，使用重組表現載體以擴增且表現編碼人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之DNA。重組表現載體為具有編碼人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之多肽鏈之合成或cDNA衍生的DNA片段之可複製DNA建構物，其係操作連接至衍生自哺乳動物、微生物、病毒或昆蟲基因之適宜轉錄或轉譯調節元件。在一個實例中，轉錄單元可包含(1)一或多個在基因表現中具有調節作用之遺傳元件，例如，轉錄啟動子或強化子，(2)轉錄成mRNA且轉譯成蛋白質之結構

或編碼序列，及(3)如下文詳細描述之適宜之轉錄及轉譯起始及終止序列之組合體。此等調節元件可包含操作序列以控制轉錄。可另外併有例如由複製起點及促進識別轉形體之篩選基因所賦予的在宿主中複製之能力。DNA區當在其彼此功能上相關時操作連接。例如，單一肽(分泌引導子)之DNA在其呈參與多肽之分泌之前驅物表現之情況下操作連接至針對多肽之DNA；啟動子在其控制序列之轉錄之情況下操作連接至編碼序列；或核糖體結合位點在其經定位以允許轉譯之情況下操作連接至編碼序列。意欲用於酵母表現系統中之結構元件包含可藉由宿主細胞實現所轉譯蛋白質之胞外分泌之引導序列。或者，在重組蛋白質於無引導或運輸序列下表現之情況下，蛋白質可包含N端甲硫胺酸。可視需要在後來自經表現重組蛋白質裂解此甲硫胺酸以提供最終產物。

表現控制序列及表現載體之選擇將取決於宿主之選擇。可使用各種表現宿主/載體組合。用於真核宿主之有用的表現載體包括(例如)包含來自SV40、牛乳突狀瘤病毒、腺病毒及細胞巨大病毒之表現控制序列之載體。用於細菌宿主之有用的表現載體包括已知細菌質體，諸如來自大腸桿菌之質體，包括pCR 1、pBR322、pMB9及其等衍生物、更廣泛之宿主範圍質體，諸如M13及絲狀單股DNA噬菌體。

用於表現人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之適宜宿主細胞包括在適宜啟動子之控制下之原核生物、酵母、昆蟲或高等真核細胞。原核生物包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物，例如大腸桿菌或桿菌(bacilli)。高等真核細胞包括如下文描述之哺乳動物之已確認的細胞系。亦可使用無細胞轉譯系統。可例如於美國專利公開案第2008/0187954號、美國專利第6,413,746號及第6,660,501號及國際專利公開案第WO 04009823號中發現關於蛋白質產生(包括抗體產生)方法之額外資訊，其等各以其全文引用的方式併入本文中。

亦可使用各種哺乳動物或昆蟲細胞培養系統以表現人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段。可於哺乳動物細胞中進行重組蛋白質之表現，因為此類蛋白質通常經正確折疊、適當修飾及完全功能化。適宜哺乳動物宿主細胞系之實例包括由Gluzman (Cell 23:175, 1981)描述之猴腎細胞之HEK-293及HEK-293T、COS-7系及包括(例如)L細胞、C127、3T3、中國倉鼠卵巢(CHO)、HeLa及BHK細胞系之其他細胞系。哺乳動物表現載體可包括非轉錄元件(諸如複製起點、適宜之啟動子及連接至意欲表現之基因之強化子)、及其他5'或3'側翼非轉錄序列，及5'或3'非轉譯序列(諸如核糖體結合位點、聚腺核苷酸化位點、剪接供體及受體位點、及轉錄終止序列)。Luckow及Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988)已評論用於在昆蟲細胞中產生異源蛋白質之桿狀病毒系統。

可依任何適宜方法純化由轉形宿主產生之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段。此類標準方法包括層析法(例如，離子交換、親和力及尺寸分級管柱層析法)、離心、示差溶解或藉由任何其他用於蛋白純化之標準技術。諸如六組胺酸、麥芽糖結合域、流行性感冒外殼序列及麩胱甘肽-S-轉移酶之親和力標籤可連接至該蛋白質以允許藉由通過適宜親和力管柱上之簡單純化。亦可使用諸如蛋白水解、核磁共振及X射線結晶學技術物理性表徵分離的蛋白質。

例如，可使用購買獲得之蛋白質濃縮過濾器(例如，Amicon或Millipore Pellicon超過濾裝置)首先濃縮來自使重組蛋白質分泌至培養基中之系統之上清液。該濃縮步驟之後，可將該濃縮物施加至適宜之純化基質中。或者，可使用陰離子交換樹脂，例如，具有側鏈二乙基胺乙基(DEAE)基團之基質或基板。該等基質可為丙烯醯胺、瓊脂糖、聚葡萄糖、纖維素或其他的常用於蛋白純化中之類型。或者，可採用陽離子交換步驟。適宜之陽離子交換劑包括包含磺丙基或羧甲基

之各種不溶性基質。最後，可採用一或多個使用疏水性逆相高效液相層析(RP-HPLC)介質(例如，具有側鏈甲基或其他脂族基團之矽膠)之RP-HPLC步驟以進一步純化人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段。亦可以各種組合採用前述純化步驟中之一些或全部以提供均質重組蛋白質。

產生於細菌培養物中之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可例如藉由自細胞沉澱之初始萃取，接著進行一或多個濃縮、鹽析、水性離子交換或尺寸排除層析步驟來分離。高效液相層析(HPLC)可用於最終純化步驟中。可藉由任何簡便方法(包括凍融循環、音波振動處理、機械破壞或使用細胞溶劑)破壞用於表現重組蛋白質之微生物細胞。

相關技術中已知的用於純化抗體及其他蛋白質之方法亦包括(例如)其等述於美國專利公開案第2008/0312425號、第2008/0177048及第2009/0187005號中之方法，該等案各以其全文引用的方式併入本文中。

醫藥組合物及投與方法

製備及投與如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段至有此需要之個體例如以增強癌症患者之免疫反應，例如以抑制或減少腫瘤生長之方法是熟悉此項技術者所熟知的或可輕易地為熟悉此項技術者所判定。人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之投與途徑可(例如)經口、非經腸、經吸入或局部投與。如本文中所使用之術語非經腸投與包括(例如)靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、直腸、或陰道投與。雖然所有此等形式之投與明確地視為適宜之形式，但用於投與之形式之另一實例將係用於注射之溶液，特定言之係用於靜脈內或動脈內注射或滴注之溶液。通常，適宜之醫藥組合物可包括(但不限於)緩衝液(例如，乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液)、

表面活性劑(例如，聚山梨醇酯)、穩定劑(例如，人類白蛋白)等。在其他與本文中之教示相容之方法中，如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可直接遞送至有害細胞群之位點從而增大患病組織暴露於治療劑。

可以包括(例如)膠囊、錠劑、水性懸浮液或溶液之可接受之劑型經口投與本文中所提供之某些醫藥組合物。亦可藉由鼻噴霧劑或吸入劑投與某些醫藥組合物。此類組合物可製備成鹽水溶液，使用苯甲醇或其他適宜之防腐劑、增強生物可利用性之吸收促進劑及/或其他習知助溶劑或分散劑。

可與載劑物質組合以產生單一劑型之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之量將根據所治療個體及特定投與模式而改變。該組合物可以單一劑量、多重劑量或在既定時間段內輸注投與。亦可調整劑量方案以提供最佳所需反應(例如，治療或預防反應)。

所謂「治療有效劑量或量」或「有效量」意指人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段當在投與時對患有意欲治療之疾病或病症之患者之治療帶來正向治療反應的量。

套組

本發明進一步提供包含如本文中所述之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段且可用於進行本文中所述之方法之套組。在某些實施例中，套組包括至少一種在一或多個容器中之經純化之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段。熟悉此項技術者將輕易地明瞭所揭示之人類化抗OX40抗體可輕易地併入相關技術中所熟知既存套組形式中之一種形式中。

免疫分析法

可藉由此項技術中已知的任何方法分析人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段之特異性及/或選擇性結合。可以採用的免疫分析法包

括(但不限於)採用諸如西方墨點、放射免疫分析法、ELISA(酵素結合免疫吸附分析法)、螢光集落分析法(FFA)、「三明治」免疫分析法、免疫沉澱分析法、沈澱素反應、凝膠擴散沈澱素反應、免疫擴散分析法、凝集分析法、補體結合分析法、免疫放射量分析法、螢光免疫分析法等等之技術之競爭性及非競爭性分析系統。此類分析法為例行方法且此項技術中熟知(參見，例如，Ausubel等人編(1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY)第1卷，該案以其全文引用方式併入本文中)。

適於判定如本文中所提供之人類化抗OX40抗體之結合特徵之方法及試劑為此項技術中已知的且/或可購買獲得。設計用於此類動力學分析之設備及軟體可購買獲得(例如，BIAcore®、BIAevaluation®軟體、GE Healthcare；KINEXA®軟體、Sapidyne Instruments)。

免疫增強及治療之方法

可使用各種方法達成在抗原活化期間或之後藉由接合活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)上之OX40增強個體(例如，哺乳動物個體，諸如人類個體)之抗原特異性免疫反應。該方法之選擇主要取決於抗希望增強免疫反應之抗原的類型，及下文將討論各種可利用之方法。無論選擇何種方法，可投與人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段至個體(例如，人類患者)使得其在藉由抗原初免T細胞期間或之後不久呈遞至個體之T細胞。

在某些態樣中，本發明提供一種促進活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)之存活或增殖之方法，其包括使活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)與人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段在人類化抗OX40抗體可特異性結合至T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)表面上的OX40之條件下接觸。在某些態樣中，該接觸在活體外。在某些態

樣中，該接觸在活體內，例如，通過投與有效劑量之人類化抗OX40抗體至需要治療之個體。在某些態樣中，該接觸可與T細胞活化(例如，抗原活化)同時發生，在某些態樣中，該接觸可在T細胞活化之後發生。

在其他態樣中，本發明提供一種誘導自活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)之細胞介素釋放之方法，其包括使活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)與如本文中所提供之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段接觸，其中該人類化抗OX40抗體可特異性地結合至活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)表面上的OX40。在某些態樣中，該接觸在活體外。在某些態樣中，該接觸在活體內，例如，通過投與有效劑量之人類化抗OX40抗體至需要治療之個體。在某些態樣中，該接觸可與T細胞活化(例如，抗原活化)同時發生，在某些態樣中，該接觸可在T細胞活化之後發生。在某些態樣中，該細胞介素可為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 或其任何組合。在某些態樣中，該細胞介素為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13或其任何組合。

在某些態樣中，該等活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)為人類T細胞、馬來猴T細胞、恆河猴T細胞或其組合。

本發明進一步提供一種促進T細胞活化之方法，其包括使T細胞與如本文中所提供之人類化抗OX40抗體接觸，其中該人類化抗OX40抗體可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。在某些態樣中，該接觸在抗原(例如，腫瘤抗原)之存在下發生。在某些態樣中，該方法進一步包括使人類化抗OX40抗體之Fc域與表現Fc γ R之細胞(例如，B細胞、單核細胞、巨噬細胞、骨髓或漿細胞樣樹突細胞、毛囊樹突細

胞、蘭格漢氏細胞、內皮細胞、NK細胞、活化之T細胞、嗜中性細胞、嗜伊紅細胞、血小板、肥大細胞、來自初代人類腫瘤或腫瘤引流或非引流淋巴結之CD45⁺細胞、來自其他二級或三級淋巴結構之CD45⁺細胞或其組合)相互作用。在某些態樣中，可透過NFκB信號轉導路徑之刺激測量T細胞活化。在某些態樣中，該接觸在活體外。在某些態樣中，該接觸在活體內，例如，通過投與有效劑量之人類化抗OX40抗體至需要治療之個體。

本發明進一步提供一種治療個體癌症之方法，其包括對需要治療之個體投與有效量之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段或包含人類化抗OX40抗體之組合物或調配物。在某些態樣中，該癌症為實體腫瘤。根據該方法，投與人類化抗OX40抗體或組合物可抑制腫瘤生長；可促進腫瘤縮小或兩者皆可。在某些態樣中，該腫瘤生長抑制係在T細胞之存在下達成。

術語「癌症」、「腫瘤」、「癌變」及「惡性」係指或描述哺乳動物中之通常以失調之細胞生長為特徵之生理病症。癌症之實例包括(但不限於)癌，包括腺癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、黑色素瘤、肉瘤及白血病。此類癌症之更特定的實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸道癌、霍奇金氏(Hodgkin's)及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、胰腺癌、神經膠質母細胞瘤、神經膠質瘤、子宮頸癌、卵巢癌、諸如肝癌及肝腫瘤之肝臟癌、膀胱癌、乳癌(包括激素介導之乳癌，參見，例如，Innes等人(2006) Br.J. Cancer 94:1057-1065)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤)、唾液腺癌、諸如腎細胞癌及威爾姆氏腫瘤之腎臟癌、基細胞癌、黑色素瘤、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、睪丸癌、食道癌、各種類型之頭頸癌(包括(但不限於)鱗狀細胞癌症)及黏液性起源之癌症(諸如，黏液性卵巢癌、膽管癌(肝臟)及腎乳突癌)。

本發明進一步提供一種預防或治療有此需要之個體中癌症之方法，其包括對該個體投與有效量之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段、包含人類化抗OX40抗體或如本文中所提供之多核苷酸、載體或宿主細胞之組合物或調配物。

用於治療癌症之組合物之有效劑量根據許多不同因素(包括投與方法、靶位點、患者之生理狀態、患者是人類或動物、所投與之其他藥物及治療是預防性還是治療性)而改變。通常，該患者為人類，但亦可治療包括基因轉殖哺乳動物之非人類哺乳動物。可使用熟悉此項技術者已知的慣常方法滴定治療劑量以最佳化安全性及有效性。

可藉由任何適宜方法投與本發明之組合物，例如，非經腸、心室內、經口、經吸入噴霧、經局部、經直腸、經鼻、經頰、經陰道或通過植入型儲存器。如本文中所使用，術語「非經腸」包括皮下、靜脈內、肌肉內、關節內、滑膜內、胸骨內、鞘內、肝內、病灶內及顱內注射或輸注技術。

本發明進一步提供一種增強個體之免疫反應之方法，其包括對有此需要之個體投與治療有效量之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段或包含人類化抗OX40抗體之組合物或調配物。

意欲治療之個體可為需要治療之任何動物，例如哺乳動物，在某些態樣中，個體為人類個體。

呈其最簡形式，意欲對個體投與之製劑為以習知劑型投與之人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段，其可與如本文中其他地方所述之醫藥賦形劑、載劑或稀釋劑組合。

人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段可由如本文中其他地方所述之任何適宜方法，例如，通過IV輸注來投與。在某些態樣中，可將人類化抗OX40抗體或其抗原結合片段引入至腫瘤中或引至腫瘤細胞附近。

藉由此方法可能適用於治療所有類型之腫瘤，包括(但不限於)乳癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、腎臟癌、結腸癌及膀胱癌及黑色素瘤、肉瘤及淋巴瘤。

在藉由抗原初免期間或之後不久，活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)上OX40受體之接合會導致活化之T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)對該抗原之反應增加。在本發明背景內容中，術語「接合」係指結合至OX40受體並刺激藉由OX40受體介導之至少一種活性。例如，相較於單獨對抗原之反應，抗原特異性活化T細胞(例如，活化之CD4⁺ T細胞及/或活化之CD8⁺ T細胞)上OX40受體之接合會導致T細胞增殖增加及細胞介素產生增加。對抗原之高反應可保持一段實質上長於缺少OX40受體接合之時間。因此，通過OX40受體之刺激藉由加強抗原(例如，腫瘤抗原)之T細胞識別來增強抗原特異性免疫反應。

當藉由抗原初免T細胞期間或之後不久對個體投與OX40促效劑時，OX40促效劑可增強該個體(諸如人類個體)之抗原特異性免疫反應。OX40促效劑包括OX40配體(「OX40L」)，諸如可溶性OX40L融合蛋白質及抗OX40抗體或其片段。一特定實例為特異性結合至OX40由此引起信號傳導之人類化抗體。本發明提供人類化抗OX40單株抗體之收集。亦描述核酸，其等包含編碼此類抗體之多核苷酸序列。本發明亦提供使用人類化抗OX40單株抗體以增強個體之抗原特異性免疫反應之方法。

OX40抗原決定基

標靶分子(例如，OX40多肽)之特異性地與抗體之抗原結合域相互作用之部分為「抗原決定基」或「抗原決定子」。標靶分子(例如，多肽)可為單一抗原決定基，但通常包含至少兩個抗原決定基，且可包含任何數目之抗原決定基，取決於標靶分子之大小、構形及類型。

認為標靶多肽上之抗體可結合之抗原決定基之最小尺寸為約四個至五個胺基酸。肽或多肽抗原決定基可包含至少七個、至少九個、至少十個或至少約15個或更多個胺基酸。由於抗體可識別呈其三級形式之多肽抗原，故包含抗原決定基之胺基酸無需連續。OX40(例如，如本文中所提供之人類OX40)之抗原決定基可包含至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少15個、至少20個、至少25個或約10至約30個OX40(例如，人類OX40)之鄰接或非鄰接胺基酸。在某些態樣中，OX40(例如，如本文中所提供之人類OX40)之抗原決定基由100個或更少個胺基酸、75個或更少個胺基酸、50個或更少個胺基酸、40個或更少個胺基酸、35個或更少個胺基酸、30個或更少個胺基酸、25個或更少個胺基酸、20個或更少個胺基酸或15個或更少個胺基酸之肽組成，且可包含OX40(例如，人類OX40)之至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少15個、至少20個、至少25個或約10個至約30個鄰接或非鄰接胺基酸。另一方面，如本文中所提供之OX40(例如，人類OX40)之抗原決定基可包含OX40(例如，人類OX40)之不多於4個、不多於5個、不多於6個、不多於7個、不多於8個、不多於9個、不多於10個、不多於15個、不多於20個、不多於25個鄰接或非鄰接胺基酸，或可由約10個至約30個鄰接或非鄰接胺基酸組成。

在某些態樣中，如本文中所提供之抗OX40抗體或其片段結合至OX40(例如，人類OX40、恆河猴OX40或馬來猴OX40)之落在OX40之第三富半胱胺酸域(CRD3)之抗原決定基，例如，落在人類OX40之胺基酸108至146(SEQ ID NO:91)或與SEQ ID NO:91之胺基酸108至146至少17%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%一致之肽。所謂「落在」OX40之CRD3意指抗原決定基可包含OX40之由CRD3區，例如SEQ ID NO:91之胺基酸108至146組成之區之

4個或更多個、5個或更多個、6個或更多個、7個或更多個、8個或更多個、9個或更多個、10個或更多個、15個或更多個或30個或更多個鄰接或非鄰接胺基酸或與SEQ ID NO:91之胺基酸108至146至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%一致之肽。

在某些態樣中，結合本文中所提供之抗體之OX40 CRD3肽保留在對應於SEQ ID NO: 91之胺基酸116位置之白胺酸及在對應於SEQ ID NO:91之胺基酸126位置之丙胺酸。例如，某些如本文中所提供之抗OX40抗體或其片段結合至人類OX40但不結合至小鼠或大鼠OX40。小鼠OX40之CRD3區從SEQ ID NO:92之約胺基酸104延伸至約胺基酸144。小鼠OX40(SEQ ID NO:92)之胺基酸Q113對應於人類OX40(SEQ ID NO:91)之胺基酸L116，及小鼠OX40(SEQ ID NO:92)之胺基酸V124對應於人類OX40(SEQ ID NO:91)之胺基酸A126。如實例10中所顯示，如本文中所提供之OX40抗體(例如，OX40mAb24)可結合至小鼠OX40之包含SEQ ID NO:92但Q113L突變及V124A之變體。

在某些態樣中，提供分離的肽，該肽包括特異性結合至如本文中所提供之OX40抗體(例如，OX40mAb24)之抗原決定基或由其組成。在某些態樣中，該肽由100個或更少個胺基酸、75個或更少個胺基酸、50個或更少個胺基酸、40個或更少個胺基酸、35個或更少個胺基酸、30個或更少個胺基酸、25個或更少個胺基酸、20個或更少個胺基酸或15個或更少個胺基酸組成，且包含OX40(例如，與SEQ ID NO:91之胺基酸108至146至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%一致之OX40區)之CRD3之至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少15個、至少20個、至少25個或約10個至約30個鄰接或非鄰接胺基酸。在某些態樣中，該肽保留在對應於SEQ ID NO:91之胺基酸116之位置

之白胺酸及在對應於SEQ ID NO:91之胺基酸126之位置之丙胺酸。

此類分離的肽可例如用於篩選特異性結合至OX40或作為免疫原以增加個體動物中之抗OX40抗體之結合分子庫。

除非另作指示，否則本發明使用此項技術中之細胞生物學、細胞培養、分子生物學、基因轉殖生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習知技術。此類技術充分闡釋於文獻中。參見，例如，Sambrook等人編(1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook等人編(1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover編(1985) *DNA Cloning*, 第I卷及第II卷; Gait編(1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis等人，美國專利第4,683,195號; Hames及Higgins編(1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames及Higgins編(1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller及Calos編(1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu等人編，*Methods In Enzymology*, 第154卷及第155卷; Mayer及Walker編(1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir及Blackwell編(1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, 第I-IV卷; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及Ausubel等人(1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley及Sons, Baltimore, Md.)。

抗體工程化之一般原理闡明於 Borrebaeck 編 (1995) *Antibody Engineering* (第2版; Oxford Univ. Press) 中。蛋白質工程化之一般原理闡明於 Rickwood 等人編 (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) 中。抗體及抗體-半抗原結合之一般原理闡明於: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (第2版; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 及 Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.) 中。另外, 此項技術中已知及未特別描述之免疫學標準方法通常遵循於 *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites 等人編 (1994) *Basic and Clinical Immunology* (第8版; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 及 Mishell 及 Shiigi (編) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY) 中。

闡述免疫學之一般原理之標準參考著作包括 *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett 等人編 (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* 編 Burden 等人 (Elsevier, Amsterdam); Goldsby 等人編 (2000) *Kuby Immunology* (第4版; H. Freeman & Co.); Roitt 等人 (2001) *Immunology* (第6版; London: Mosby); Abbas 等人 (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (第5版; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann 及 Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook 及 Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor

Press) ; Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003) ; Harlow及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press) ; Dieffenbach 及 Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

上文所引用之所有參考文獻及本文中所引用之所有參考文獻係以其全文引用方式併入本文中。

藉由闡述之方式及非限制之方式提供下列實例。

實例

術語之縮寫及定義列於表2中。

表2. 術語之縮寫及定義之清單

縮寫或術語	定義
1A7	同型對照小鼠IgG1 κ 抗體
9B12	小鼠抗人類OX40 IgG1 κ 單株抗體
A375	人類黑色素瘤細胞系
Aa	胺基酸
ADCC	抗體依賴性細胞細胞毒性
ADPE	抗體之發展及蛋白質之工程化
ANOVA	方差分析
Asp	天冬胺酸
BSA	牛血清白蛋白
BLASTP	蛋白質序列同源性基本局部比對搜索工具
C	對照組之最終腫瘤體積
CD	分化叢
CDC	補體依賴性細胞毒性
CD4 ⁺ 、OX40 ⁺	CD4陽性、OX40陽性
CDR	互補決定區
CFA	完全佛氏佐劑
CFSE	羧基螢光素琥珀醯亞胺酯
CI	置信區間
Clq	補體成分Clq
CR	完全反應
CRD	富半胱胺酸域
馬來	馬來猴

縮寫或術語	定義
DM-L	密度培養基-淋巴細胞
E:T	效應子對靶(比率)
EC	有效濃度
Ecf	導致f%之最大效應之有效濃度
EC ₂₀	導致20%之最大效應之有效濃度
EC ₅₀	半數最大有效濃度
EC ₉₀	導致90%之最大效應之有效濃度
F	最大分數
FACS	經螢光活化之細胞分選
FBS	胎牛血清
Fc	可結晶片段
Fcer1g-/-	經基因改造之小鼠品系；缺少活化性Fc γ 受體(Fc γ I、III及IV)之表現
Fcgr2b-/-	基因改造之小鼠品系；缺少抑制性Fc γ IIb受體之表現
FCS	流式細胞計數法標準
Fc γ	可結晶 γ 片段
FMO	螢光減一
FP	融合蛋白質
G	重力
H	小時
H ⁺ L	重鏈加輕鏈
HEK293	人類胚腎細胞系
Hr	小時
HSC	造血幹細胞
Hu	人類
ICOS	可誘導之T-細胞共刺激因子
IgG	免疫球蛋白
IgG1	免疫球蛋白G1
IL-2	介白素2
IP	腹膜內
IU	國際單位
K _d	平衡結合解離常數
KI	敲入
KLH	匙孔血藍蛋白(Keyhole limpet hemocyanin)
KO	敲出
K _p	平衡解離常數

縮寫或術語	定義
Leu	白胺酸
M	小鼠
mAb	單株抗體
mL	毫升
OX40mAb24	人類化抗人類OX40 IgG1κ單株抗體
MFI	平均螢光強度
mOX40L FP	小鼠OX40配體小鼠IgG1融合蛋白
mOX40L (Y182A) FP	經工程化以具有OX40結合減低之小鼠OX40配體小鼠IgG1融合蛋白
NFκB	活化之B細胞之核因子κ輕鏈增強子
NIP228	抗4-羥基-3-碘-5-硝基苯乙酸之小鼠IgG1κ單株抗體
NK	自然殺手
NOD/SCID	非肥胖糖尿病/重症聯合免疫缺陷
NSG	具有遺傳背景Nod.Cg-Prkd ^{cscid} 112rg ^{tm/Wy} /SzJ之小鼠
OX40L	OX40配體
OX40L FP IgG4P Y180A	經工程化以具有OX40結合減低之人類OX40配體IgG4P融合蛋白
OX40mAb24	人類化抗人類OX40 IgG1κ單株抗體
OX86	大鼠抗小鼠OX40 IgG1κ單株抗體
PBMC	周邊血液單核細胞
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
PHA-L	植物血球凝集素-白細胞凝集素
PI	碘化丙啶
PK/PD	藥物動力學/藥效動力學
RBC	紅血球細胞
RBCL	紅血球細胞細胞裂解
RBD	受體結合域
Rh	重組人類
RLU	相對光單位
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640培養基
ROA	投藥途徑
SC	皮下
SD	標準偏差
SEM	平均值標準誤差
Ser	絲胺酸

縮寫或術語	定義
T	測試組之最終腫瘤體積
Tcm	中樞記憶T細胞
TCR	T細胞受體
Teff	效應T細胞
Tem	效應子記憶T細胞
TGI	腫瘤生長抑制
TIL	腫瘤浸潤白血球
TM	跨膜域
TNFR	腫瘤壞死因子受體
TNFRSF	腫瘤壞死因子受體超家族
TRAF2	腫瘤壞死因子受體相關因子2
Treg	調節性T細胞
μL	微升
μg	微克
V	體積

實例1：抗人類OX40鼠類MAb 9B12之人類化

小鼠mAb 9B12藉由接枝其CDR至所選人類生殖系架構上而人類化。將小鼠mAb 9B12之重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)之序列與可在公開NCBI資料庫中取得之人類抗體生殖系序列進行比較。基於最高序列同源性來識別人類受體架構(FR)。當在選擇最佳受體架構時，考慮若干標準，諸如可影響結合之匹配殘基(游標帶中之殘基、典型類別殘基及VH/VL介面殘基)及免疫原性之可能性(低生殖系頻率)。最佳混合人類受體FR序列係獨立地藉由針對各個別架構區選擇最為同源之人類免疫球蛋白生殖系片段設計用於VH及VL。將三個不同生殖系受體序列組合以形成人類化VH架構主鏈，而針對VL選擇兩個不同生殖系受體序列。針對VH鏈所選擇之完全人類生殖系受體模板(9B12VH-hu)為IGVH4-34*09(FR 1)、VH4-39(FR 2)、VH6-1(FR 3)及JH4(FR 4)之組合。VL(9B12VL-hu1)為O18(FR 1)、O18(FR 2)、L23(FR 3)及JK1(FR 4)之組合。鼠類序列及人類模板受體序列之間之

架構同源性就VH而言為約72%及就VL而言為77%。

識別可影響或維持親代CDR之功能性構形而不與人類生殖系序列相匹配之鼠類架構殘基且選擇性地再引入至人類受體FR中以最佳保留9B12結合親和力及功能性。在此情況中，VH鏈中之小鼠FR殘基27D、39K、47Y、48M、71R、78Y及91F與VL鏈中之44V及68R經突變回至人類模板。將如依Kabat定義之CDR殘基融合至針對VH及VL二者設計之受體架構中以產生人類化抗體。依GeneART(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)合成兩個人類化VH基因(9B12VH-hu及9B12VH-hu39K71R)及兩個VL基因(9B12VL-hu1及9B12VL-hu2)，接著選殖至內部pOE IgG1表現載體中。

已產生人類化變體之板及在基於T細胞之結合及增殖分析法中進行表徵。包含若干的回至重鏈可變區中之小鼠FR殘基之架構胺基酸之人類化變體以與9B12相當之親和力及類似效力(T細胞增殖)結合至活化之CD4⁺ T細胞上的OX40。與所有人類化VH變體配對之可變輕鏈編碼完全人類化架構。為降低免疫原性之風險，藉由改由對應之人類殘基置換未受影響之小鼠殘基進一步減少VH人類FR中小鼠殘基之數目至3或4。為移除可能之序列缺陷，主動性地獨立或以組合方式移除VH-CDR2中之NG脫醯胺位點、RYD整合素結合位點及VH-CDR3中之DG異構化位點。為避免經人類IgG1 Fc效應子功能介導之ADCC，針對人類化引導mAb製造IgG4P及IgG1TM Fc變體。所得IgG4P及IgG1TM變體顯示與IgG1變體相同之OX40結合活性，但明顯地降低ADCC活性，其最類似於鼠類mAb 9B12。總而言之，人類化變體顯示與親代小鼠mAb 9B12相當之細胞結合親和力及活體外效力。人類化VH變體中均與人類化VL配對之胺基酸差異概述於圖1中。

針對恆河猴中之活體內表徵工程化反向嵌合體。簡言之，接枝人類化mAb24之VH及VL至鼠類9B12之恆定重鏈及恆定輕鏈上。活體

外表徵證實反向嵌合體之Fab部分結合至人類OX40，與mAb24相當。

實例2：OX40mAb24對表現於活化之人類、非人類之靈長類動物、大鼠及小鼠T細胞之表面上之天然OX40的結合親和力及受體佔有率

2.1 材料

此實例中所使用之材料列於表2-1中。

表2-1 材料

條目	來源
AlexaFluor® A488 山羊抗人類 IgG(H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
AlexaFluor® A488 山羊抗小鼠 IgG(H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
AlexaFluor® A488 山羊抗大鼠 IgG(H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗生素/抗黴劑溶液，100X	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗大鼠CD134(OX40純系)抗體	Biolegend, San Jose, CA
抗大鼠CD3抗體	BD Biosciences, San Jose, CA
抗小鼠CD134(OX86純系)抗體	MedImmune, Gaithersburg, MD
抗大鼠IgG1， κ 同型對照 mAb純系 RTK2071	Biolegend, San Jose, CA
Balb/C小鼠	Harlan, Indianapolis, IN
β 巰基乙醇(BME)	Life Technologies, Carlsbad, CA
伴刀豆球蛋白A	Sigma, St. Louis, MO
乙二胺四乙酸(EDTA)	Life Technologies, Carlsbad, CA
經熱不活化之新生胎牛血清(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
倉鼠抗小鼠CD3抗體	BD Biosciences, San Jose, CA
倉鼠抗小鼠CD28抗體	BD Biosciences, San Jose, CA
IL-2，重組人類	Preprotech, Rocky Hill, NJ
淋巴細胞分離培養基(LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
Magclect大鼠CD4 T細胞分離套組	R&D Systems, Minneapolis, MN
Miltenyi MACS緩衝液	Miltenyi San, Diego, CA
小鼠CD4 T細胞分離套組	Miltenyi San, Diego, CA
小鼠IgG1， κ 同型對照 mAb純系 MOPC-21	Biolegend, San Jose, CA

條目	來源
非人類之靈長類動物CD4 T細胞分離套組	Miltenyi San, Diego, CA
未經TC處理之圓底96孔板	VWR, Radnor, PA
Percoll	Sigma, St. Louis, MO
植物血球凝集素 - 白細胞凝集素 (PHA-L)	Roche Applied Science, Indianapolis, IN
磷酸鹽緩衝鹽水, pH 7.2(PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
RosetteSep CD4 T細胞增富套組	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC
RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
Sprague Dawley大鼠	Harlan, Indianapolis, IN
全血, 經肝素鈉抗凝固	醫學免疫公司血液供體計劃, Gaithersburg, MD

在此實例中，進行基於細胞之平衡結合分析以測量OX40mAb24結合至表現於人類、非人類之靈長類動物、大鼠及小鼠T細胞之細胞表面上之OX40的表觀親和力。另外，採用平衡結合分析以確定OX40mAb24之達成活化之人類CD4⁺ T細胞上20%、50%或90%人類OX40受體佔有率之濃度。

亦針對9B12(OX40mAb24自其衍生而來之鼠類抗人類OX40單株抗體)與表現於CD4⁺ T細胞之表面上之人類及非人類之靈長類動物OX40之結合確定達成20%、50%或90%受體佔有率所需要之OX40mAb24濃度以比較OX40mAb24及9B12結合。

2.2 分析法

2.2.1 OX40mAb24與初代人類CD4⁺ T細胞及OX40表現Jurkat T細胞之結合

從OX40mAb24對OX40表現活化初代人類CD4⁺ T細胞或人類OX40過度表現Jurkat T細胞之結合曲線計算OX40mAb24結合至人類OX40之表觀平衡結合常數(K_d)及在平衡時結合細胞表面人類OX40受體之20%、50%或90%所需要之濃度。在相同時間進行相似的實驗以

評估9B12與此等細胞之結合以與OX40mAb24值比較。

首先，使用RosetteSep CD4⁺ T細胞增富套組(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC)及經改良之製造商方案從通過醫學免疫公司血液供體計劃(MedImmune Blood Donor Program)自健康供體獲得之經肝素鈉抗凝固之全血分離初代人類CD4⁺ T細胞。

用2 µg/mL PHA-L及20 IU/mL rhIL-2培養初代人類CD4⁺ T細胞48小時以活化T細胞及上調OX40。接著將活力>95%之活化之T細胞用於OX40mAb24結合實驗中。所有供體代表獨特個體；即，並非用來自相同供體之CD4⁺ T細胞進行重複結合實驗。

在結合實驗之前，將人類OX40過度表現Jurkat NFκB螢光素酶純系64細胞培養於完全RPMI +10% FBS中但無需活化。

將OX40mAb24(10 µg/mL)或9B12(10 µg/mL)稀釋在17點2倍稀釋系列中。添加OX40mAb24至1每孔00,000個細胞(活化之初代CD4⁺ T細胞或人類OX40過度表現Jurkat NFκB螢光素酶純系64細胞)且在4°C培育1小時。為背景結合減去，於單獨二級抗體之存在下培育細胞。對照R347人類IgG1單株抗體及小鼠IgG1同型純系MOPC-21在實驗中與OX40過度表現Jurkat T細胞一起使用以分別證實OX40mAb24或9B12之OX40結合特異性。在培育之後，用200 µL冷(4°C) FACS緩衝液洗滌細胞三次及用包含10 µg/mL經AlexaFluor® 647標記之山羊抗人類IgG二級抗體(用於結合至OX40mAb24)或10 µg/mL經AlexaFluor® 488標記之山羊抗小鼠IgG二級抗體(用於結合至9B12)及5 µg/mL碘化丙啶(PI)之100 µL FACS緩衝液(PBS + 2%經熱不活化之新生胎牛血清)培育。在二級抗體培育之後，洗滌細胞且懸浮於100 µL FACS緩衝液中以用於在BD LSRII流式細胞計數法上之流式細胞分析。

2.2.2 OX40mAb24與小鼠CD4⁺ T細胞之結合

研究OX40mAb24與表現於活化之初代CD4⁺ T細胞上之小鼠OX40

之結合。在相同時間進行相似的實驗以評估9B12與此等細胞之結合以與OX40mAb24比較。根據下列方案自獲得之正常Balb/C小鼠脾臟分離得小鼠CD4⁺ T細胞：

對著70 μM尼龍過濾器搗碎脾臟以釋放脾細胞且用1 mL 完全培養基(RPMI-1640加上10% FBS、1% 抗生素/抗黴劑溶液及55 μM β巰基乙醇[BME])沖洗該過濾器。使脾細胞成沉澱成團粒並棄置上清液。用5 mL IX紅血球細胞(RBC)溶胞緩衝液處理該團粒且培育以溶解RBC。藉由在培育時間結束時添加完全培養基以恢復滲透壓。

使細胞沉澱成團粒，在Miltenyi MACS緩衝液(PBS pH 7.2+0.5% 牛血清白蛋白(BSA)+2 mM乙二胺四乙酸[EDTA])中洗滌並棄置上清液。將該團粒懸浮於冷MACS緩衝液中及用ViCell計數器計數以判定細胞數目及生存力。

用Miltenyi處理套組(San Diego, CA)依製造商說明書進行小鼠CD4⁺ T細胞分離，及將所分離的細胞懸浮於完全培養基中。

將小鼠CD4⁺ T細胞(150,000個/孔含於100 μL完全培養基中)培養於塗覆2 μg/mL倉鼠抗小鼠CD3及倉鼠抗小鼠CD28抗體各者之96孔板中過夜以活化T細胞並誘導OX40表現。從該培育板移除活化之CD4⁺ T細胞及將100,000個細胞轉移至未經組織培養物處理之96孔圓底板之各孔中以用於結合分析且用FACS緩衝液洗滌一次。用各在FACS緩衝液中連續3倍稀釋以獲得10點數據曲線之10 μg/mL OX40mAb24、9B12及大鼠抗小鼠OX40、純系OX86(陽性對照)抗體進行結合。關於陰性對照，6倍稀釋10 μg/mL R347人類IgG1、MOPC-21小鼠IgG1或RTK2071大鼠IgG1以獲得3點數據曲線。以二重複的方式將包含OX40mAb24或抗體之FACS緩衝液(50 μL)添加至CD4⁺ T細胞並培育。在初代培育之後，用200 μL 4°C FACS緩衝液洗滌細胞且用包含10 μg/mL經AlexaFluor® 488標記之山羊抗人類二級抗體、10 μg/mL經

AlexaFluor® 488標記之山羊抗小鼠二級抗體或經AlexaFluor® 488標記之山羊抗大鼠二級抗體及5 µg/mL PI之50 µL FACS緩衝液培養。在二級抗體培育之後，用4°C FACS緩衝液(200 µL/洗滌)洗滌細胞且懸浮於100 µL FACS緩衝液中以用於如部分2.3中所述之在BD LSRII流式細胞計數法上之流式細胞分析。

2.2.3 OX40mAb24與大鼠CD4⁺ T細胞之結合

研究OX40mAb24與表現於活化之初代CD4⁺ T細胞上之大鼠OX40之結合。在相同時間用9B12進行相似的實驗以允許與OX40mAb24比較。依上文針對小鼠脾細胞之分離所述之方案自新鮮獲得之正常Sprague-Dawley大鼠脾臟分離大鼠CD4⁺細胞，但用R&D Systems Magellect套組(Minneapolis, MN)依製造商說明書進行大鼠CD4⁺ T細胞分離。

在T75細胞培養燒瓶中用1 µg/mL伴刀豆球蛋白A(Con A)及500 IU/mL IL-2培養大鼠CD4⁺ T細胞(1×10^6 個/mL完全培養基)過夜以活化T細胞且誘導OX40表現，並培育過夜。從該燒瓶移除活化之CD4⁺ T細胞且將100,000個細胞轉移至未經組織培養物處理之96孔圓底板之各孔中以用於結合分析並用FACS緩衝液洗滌。用在FACS緩衝液中連續3倍稀釋之10 µg/mL OX40mAb24、9B12或小鼠抗大鼠CD134、純系OX40(陽性對照)抗體進行結合以獲得10點數據曲線。關於陰性對照，連續6倍稀釋10 µg/mL R347人類IgG1或小鼠IgG1純系MOPC-21以獲得3點數據曲線。以二重複的方式將100 µL OX40mAb24對照蛋白質、9B12或純系OX40抗體添加至CD4⁺ T細胞並培育。在初代培育之後，每次洗滌用200 µL 4°C FACS緩衝液洗滌細胞且用包含10 µg/mL經AlexaFluor® 488標記之山羊抗人類或經AlexaFluor® 488標記之山羊抗小鼠二級抗體及5 µg/mL PI之100 µL FACS緩衝液培育。在二級抗體培育之後，處理細胞以進行如部分2.3中所述之流式細胞分析。

2.2.4 OX40mAb24與馬來猴CD4⁺ T細胞之結合

研究OX40mAb24與表現於活化之初代CD4⁺ T細胞上之馬來猴(cyno) OX40之結合。在相同時間用9B12進行相似的實驗以與OX40mAb24值比較。根據以下方案從自World Wide Primates (Miami, FL)之健康馬來猴供體(N=2)獲得之經肝素鈉抗凝固之全血分離馬來猴CD4⁺ T細胞：

將全血在50 mL圓錐形離心管中分層於30 mL 60% Percoll上。將血液離心及於介面處收集周邊血液單核細胞(PBMC)且以1200 RPM用冷(4°C) Miltenyi MACS緩衝液洗滌10分鐘。棄置上清液且以5 mL 1×RBC溶胞緩衝液處理團粒並培育。在培育時間結束時將完全培養基(具有10% FBS及1%抗生素/抗黴劑之RPMI)添加至該團粒以停止溶胞過程。

使細胞沉澱成團粒且用20 mL冷(4°C)Miltenyi MACS緩衝液洗滌。棄置上清液且將細胞團粒懸浮於冷(4°C)MACS緩衝液中並用ViCell計數器計數以判定細胞數目及生存力。

用Miltenyi非人類之靈長類動物套組依製造商說明書進行馬來猴CD4⁺ T細胞分離，接著在ViCell計數器上計數CD4⁺ T細胞且如上所述以 1×10^6 /mL懸浮於完全培養基中。

在T75細胞培養燒瓶中用2 μ g/mL PHA-L及20 IU/mL IL-2培育馬來猴CD4⁺ T細胞(1×10^6 /mL含於完全培養基中)48小時以活化T細胞並誘導OX40表現。從該燒瓶移除活化之CD4⁺ T細胞且將100,000個細胞轉移至未經組織培養物處理之96孔圓底板之各孔中以用於結合分析並用200 μ L FACS緩衝液洗滌。用在FACS緩衝液中連續4倍稀釋之10 μ g/mL OX40mAb24或9B12以獲得11點數據曲線，或連續6倍稀釋之R347人類IgG1或小鼠IgG1純系MOPC-21(陰性對照)以獲得3點數據曲線二者進行結合。將OX40mAb24、9B12或對照蛋白質添加至CD4⁺ T

細胞並培育。在初代培育之後，每次洗滌用200 μ L冷(4 $^{\circ}$ C) FACS緩衝液洗滌細胞且用包含10 μ g/mL經AlexaFluor $^{\circledR}$ 488標記之山羊抗人類二級抗體或10 μ g/mL經AlexaFluor $^{\circledR}$ 488標記之山羊抗小鼠二級抗體及5 μ g/mL PI之100 μ L FACS緩衝液培育。在二級抗體培育之後，處理細胞以進行如部分2.3中所述之流式細胞分析。

2.2.5 OX40mAb24與恆河猴CD4 $^{+}$ T細胞之結合

研究OX40mAb24與表現於活化之初代CD4 $^{+}$ T細胞上之恆河猴OX40之結合。在相同時間用9B12進行相似的實驗以與OX40mAb24值比較。根據以下方案從自World Wide Primates (Miami, FL)之健康恆河猴供體(N=2)獲得之經肝素鈉抗凝固之全血分離恆河猴CD4 $^{+}$ T細胞：

用PBS 1:1稀釋肝素化恆河猴血液(20 mL)且在50 ml錐形離心管中分層於15 ml 95% LSM上。將血液離心，於介面處收集PBMC且以400 \times g用冷Miltenyi MACS緩衝液洗滌兩次歷時30分鐘。棄置上清液且用5 mL IX RBC溶胞緩衝液處理團粒並培育。在培育時間結束時，將完全培養基(具有10% FBS及1%抗生素/抗黴劑之RPMI)添加至該團粒以停止溶胞過程。使細胞沉澱成團粒且用20 mL冷Miltenyi MACS緩衝液洗滌。棄置上清液且將該團粒懸浮於冷MACS緩衝液中並以ViCell計數器計數以判定細胞數目及生存力。用Miltenyi非人類靈長類動物套組(San Diego, CA)依製造商說明書進行恆河猴CD4 $^{+}$ T細胞分離。

在T75細胞培養燒瓶中用5 μ g/mL Con-A及1000 IU/mL IL-2培養恆河猴CD4 $^{+}$ T細胞(1×10^6 個/mL含於完全培養基中)48小時以活化T細胞並誘導OX40表現。用在FACS緩衝液中連續3倍稀釋以獲得10點數據曲線(實驗1)或12點數據曲線(實驗2)之10 μ g/mL OX40mAb24及9B12及6倍稀釋以獲得2個數據點(實驗1)或4個數據點(實驗2)之10

$\mu\text{g/mL}$ 人類及小鼠同型對照進行與100,000個活化之恆河猴 CD4^+ T細胞之結合。經AlexaFluor® 488標記之山羊抗人類二級抗體及經AlexaFluor® 488標記之山羊抗小鼠二級抗體結合如上針對馬來猴 CD4^+ T細胞所述及如部分2.3中所述流式細胞分析。

2.3 流式細胞分析

使用LSRII流式細胞計數法(Becton-Dickinson, San Jose, CA)進行部分2.1中所述分析法中之流式細胞分析。使用Flow Jo細胞計數分析軟體(TreeStar, Ashland, OR)以判定OX40mAb24、9B12及對照蛋白質與細胞之結合。關於單一染色補償對照，準備包含OX40表現細胞(未經染色、無PI或二級抗體)、僅結合至經AlexaFluor® 488-或AlexaFluor® 647標記之二級抗體試劑之細胞或以0.1%皂苷通透化並經10 $\mu\text{g/mL}$ PI處理之細胞的孔。在螢光補償之後，圈圍活(PI陰性)細胞且測定二級抗體之平均螢光強度(MFI)。

2.4 計算法

2.4.1 測定表觀平衡解離常數(K_d)

使用Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com之GraphPad Prism第5.01版繪製OX40mAb24結合之MFI對蛋白質濃度(M)之圖以建立結合曲線，從該結合曲線測得表觀 K_d 。為測得OX40mAb24及9B12結合至人類、小鼠、大鼠、馬來猴或恆河猴OX40之表觀 K_d ，採用單位點(特異性)結合之非線性回歸(曲線擬合)公式。

2.4.2 測定20%、50%及90%受體佔有率值

可由以下結合關係估計單株抗體(mAb)結合至其受體之量：



由下式表示各別抗體之結合解離常數(K_d)：

公式2：

$$Kd = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

其中[A]及[B]分別表示游離受體及抗體之濃度。

最終，可由下式計算分率佔有率，即所有結合至抗體之受體分子之分率(F)：

公式3：

$$F = \frac{[AB]}{[A] + [AB]}$$

形成公式2且換入公式3中得到：

公式4：

$$F = \frac{[A][B]/Kd}{[A] + ([A][B]/Kd)}$$

簡化公式4得到：

公式5：

$$F = \frac{[B]}{[B] + Kd}$$

因此，在平衡條件下，若已知游離mAb之濃度及各別抗體之解離常數 K_d ，則可計算所有的結合至抗體之受體分子之分率。

由此用於計算表示為F之分率受體佔有率所需要抗體之濃度之公式推導得到以下公式：

公式6：

$$[B] = F * Kd / (1 - F)$$

其中[B]等於mAb(在此情況中，為OX40mAb24)之濃度。使用此公式(公式6)以計算細胞結合實驗中達成20、50及90%受體佔有率(F=0.20、0.50或0.90)所需要OX40mAb24之濃度，自該等濃度使用針對上述單位點(特異性)結合之非線性回歸(曲線擬合)公式計算得 K_d 值。

2.5 統計方法

在Graphpad Prism軟體中採用95%置信度之雙側非成對學生t值檢定與以不同標準偏差解釋數據集之Welch校正法以確定針對相對OX40表現Jurkat T細胞而言OX40mAb24結合至活化初代人類CD4⁺ T細胞上的OX40測得之表觀K_d值或表觀受體佔有率值之間之統計顯著差異。總結圖及表中呈現敘述性統計(即，平均值及平均值標準誤差)。

2.6 結果

2.6.1 OX40mAb24與初代人類CD4⁺ T細胞之結合

OX40mAb24與活化人類CD4⁺ T細胞以312 pM之平均表觀K_d結合及20%、50%及90%受體佔有率值分別為78.1、312及2810 pM；n=6，利用六個獨立T細胞供體之結合分析(圖2A及2B，及表2-2)。

比較而言，9B12與活化人類CD4⁺ T細胞以669 pM之平均K_d結合，及20%、50%及90%受體佔有率值分別為167、669及6020 pM(圖2C及2D及表2-2)。9B12表觀K_d值與OX40mAb24表觀K_d值之比率因此為2.1:1，及反映人類OX40對鼠類及人類化單株抗體之結合親和力相似

表2-2 OX40mAb24或9B12與OX40表現活化初代人類CD4⁺ T細胞結合之表觀親和力(K_d)及受體佔有率值

結合蛋白質	N 個 供 體	K _d (StdErr)) , pM	EC ₂₀ (StdErr)) , pM	EC ₅₀ (StdErr)) , pM	EC ₉₀ (StdErr)) , pM
OX40mAb24	6	312(57.9)	78.1(14.5)	312(57.9)	2810(521)
9B12	6	669(137)	167(34.3)	669(137)	6020(1230)

EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；K_d=平衡結合解離常數；StdErr=平均值標準誤差。

2.6.2 OX40mAb24結合至工程化以過度表現人類OX40之Jurkat T細胞系

OX40mAb24與OX40表現Jurkat T細胞以424 pM之平均 K_d 結合及20%、50%及90%受體佔有率值分別為106、424及3820 pM。圖3A-C及表2-3。OX40mAb24對由活化初代人類 $CD4^+$ T細胞及OX40過度表現Jurkat T細胞表現之OX40之表觀結合親和力或受體佔有率無統計顯著差異($p=0.59$)。

比較而言，9B12與此等細胞以726 pM之平均 K_d 結合及20%、50%及90%受體佔有率值分別為182、726及6540 pM(圖3D-F及表2-3)。9B12之表觀 K_d 值與OX40mAb24之表觀 K_d 值之比率因此為1.7:1，類似於與活化之人類 $CD4^+$ T細胞上的OX40結合所計算得的比率

表2-3 OX40mAb24或9B12與人類OX40過度表現Jurkat NFkB螢光素酶純系64細胞之結合之表觀親和力(K_d)及受體佔有率值

結合蛋白質	N個實驗	K_d (StdErr), pM	EC_{20} (StdErr), pM	EC_{50} (StdErr), pM	EC_{90} (StdErr), pM
OX40mAb24	3	424(173)	106(43.3)	424(173)	3820(1560)
9B12	3	726(308)	182(76.9)	726(308)	6540(2770)

EC_{20} =達成20%最大效應之有效濃度； EC_{50} =半數最大有效濃度； EC_{90} =達成90%最大效應之有效濃度； K_d =平衡結合解離常數；StdErr=平均值標準誤差。

2.6.3 OX40mAb24與小鼠或大鼠 $CD4^+$ T細胞之結合

OX40mAb24或9B12皆不結合至活化之小鼠或大鼠 $CD4^+$ T細胞(數據未顯示)。分別用市售抗小鼠及抗大鼠OX40抗體純系OX86及OX40來觀測活化之小鼠及大鼠 $CD4^+$ T細胞之陽性染色。9B12不與活化之小鼠或大鼠 $CD4^+$ T細胞結合(數據未顯示)。

2.6.4 OX40mAb24與馬來猴及恆河猴 $CD4^+$ T細胞之結合

OX40mAb24與活化之馬來猴細胞以581 pM之平均 K_d 結合。馬來

猴 K_d 比人類 K_d 高1.9倍(表2-4)。

9B12與活化之馬來猴 $CD4^+$ T細胞以1088 pM之平均 K_d 結合(表2-4)，此使得9B12表觀 K_d 值與OX40mAb24表觀 K_d 值之比率為1.9:1。

OX40mAb24與活化之恆河猴 $CD4^+$ T細胞以369 pM之平均 K_d 結合(表2-4)。恆河猴 K_d 比人類 K_d 高1.2倍。

9B12與活化之恆河猴 $CD4^+$ T細胞以713 pM之平均 K_d 結合(表2-4)，此使得9B12表觀 K_d 值與OX40mAb24表觀 K_d 值(未顯示)之比率為2.8:1。

表2-4 OX40mAb24或9B12與馬來猴及恆河猴OX40表現活化初代 $CD4^+$ T細胞之結合之表觀親和力(K_d)

結合蛋白質	馬來猴		恆河猴	
	N 個 實 驗	K_d (StdErr) , pM	N 個 實 驗	K_d (StdErr) , pM
OX40mAb24	2	581(238)	2	369(236)
9B12	2	1088(37)	2	713(559)

K_d =平衡結合解離常數；StdErr=平均值標準誤差。

實例3：OX40mAb24對人類OX40之結合特異性

在此實例中，進行基於流式細胞計數法之細胞結合分析以判定相對其他的具有相關胺基酸序列之人類 TNFRSF 成員而言，OX40mAb24對人類OX40之特異性，該等人類TNFRSF成員包含：NGFR(TNFRSF16)、LT β R(TNFRSF3)、TNFR2(TNFRSF1 β)、GITR(TNFRSF18)、CD137(TNFRSF9)及HVEM(TNFRSF14)。此外，以ELISA的形式測試OX40mAb24對重組人類TNFRSF成員之結合特異性，該等重組人類TNFRSF成員包括上文述及之其等以及DR6(TNFRSF21)、骨保護素(OPG；TNFRSF11B)、RANK(TNFRSF11A)、FAS(TNFRSF6)及CD40(TNFRSF5)。

3.1 材料

此研究中所使用的材料列於表3-1中。

表3-1 材料

項目	來源
AlexaFluor® 647 山羊抗人類 IgG(H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
BioTek®板洗滌機	BioTek®, Wincoski, VT
CD137 (TNFRSF9) pCMV6-XL5表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
GITR (TNFRSF18) pCMV6-XL5表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
山羊抗人類IgGκ輕鏈HRP結合物	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
山羊抗小鼠IgG(Fab特異性)HRP結合物	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
HVEN(TNFRSF14) pCMV6-XL4表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
脂質轉染胺2000	Life Technologies, Carlsbad, CA
AF488抗小鼠IgG1同型物	Biolegend, San Diego, CA
AF488抗人類GITR	Ebioscience, San Diego, CA
AF647抗人類NGFR	BD, San Jose, CA
APC抗人類CD137	BD, San Jose, CA
APC抗小鼠IgG1同型物	Biolegend, San Diego, CA
Clone Manager v9軟體	Sci-Ed Software, Cary, NC
胎牛血清(FBS), 經熱不活化	Life Technologies, Carlsbad, CA
LTβR(TNFRSF3) pCMV6-XI.4表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
MaxiSorp 96孔平底板	VWR, Radnor, PA
新生小牛血清, 經熱不活化	Life Technologies, Carlsbad, CA
NGFR(TNFRSF16) pCMV6-XL5表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
PE抗人類HVEM	Ebioscience, San Diego, CA
PE抗人類LtβR	R&D systems, Minneapolis, MN
PE抗人類TNFRSF 1B	BD, San Jose, CA
PE抗小鼠IgG1同型物	Biolegend, San Diego, CA
PE抗大鼠同型物	Ebioscience, San Diego, CA
PBS, pH 7.2, 不含鈣及鎂	Life Technologies, Carlsbad, CA
重組人類TNFRSF1β(TNFR1)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類TNFRSF3(LTβR)	R&D systems, Minneapolis, MN

項目	來源
重組人類 TNFRSF4(OX40)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF5(CD40)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF6(FAS)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF9(CD137)	內部蛋白質; lot# AMPur19
重組人類 TNFRSF11A(RANK)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF11B(OPG)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF14(HVEM)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF16(NGFR)	R&D systems, Minneapolis, MN
重組人類 TNFRSF18(GITR)	內部蛋白質; lot# LBPur0025
重組人類 TNFRSF21(DR6)	R&D systems, Minneapolis, MN
TNFRSF1 β pCMV6-XL5表現載體	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
吐溫20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

3.2 方法

3.2.1 搜尋具有與人類OX40之密切序列同源性之蛋白質

為識別具有與人類OX40之胺基酸序列同一性之人類蛋白質，使用OX40(CCDS 11/UniProt P43489)之蛋白質序列進行蛋白質序列同源性基本局部比對搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool)(BLASTP)搜索。識別十九個TNFRSF家族成員/同型物。使用CCDS及UniProt數據庫(www.uniprot.org)驗證此等蛋白質之全長序列。Clone Manager第9版軟體用於使用blosum62計分矩陣對人類OX40參照進行組裝比對以確定人類OX40及在BLASTP搜尋中識別之蛋白質間之胺基酸同一性百分率(表3-2)。

3.2.2 相對其他表現於HEK293細胞中之TNFRSF成員而言OX40mAb24對OX40之結合特異性

當在經轉染至哺乳動物細胞中時，可導引個別TNFRSF成員之表現之cDNA建構物係自Origene Technologies, Rockville, MD獲得。擴增此等cDNA建構物且由MedImmune, Gaithersburg, MD之Protein Sciences group來純化以用於暫態轉染中。就各TNFRSF成員之個別表

現而言，使用脂質轉染胺2000(Life Technologies, Carlsbad, CA)組合0.5 μg 之編碼TNFRSF成員之一之表現載體之DNA依製造商針對脂質轉染胺2000所提議的方案轉染HEK293細胞。轉染四十八小時後，藉由胰蛋白酶處理從組織培養板移除細胞。透過添加含血清之完全培養基RPMI-1640加上10% FBS中和胰蛋白酶，接著使細胞沉澱成團粒且在完全培養基中洗滌。接著將細胞懸浮於冷FACS緩衝液(PBS+2% FBS)中且接種至96孔未經組織培養物處理之板以用於對TNFRSF成員特異性mAb(表3-3)及OX40mAb24之結合研究。

關於抗體或OX40mAb24之結合，使HEK細胞沉澱成團粒，移去FACS緩衝液，且將細胞懸浮於包含2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)及製造商所提議的濃度之對經轉染之TNFRSF成員具有特異性之經螢光染料標記之mAb或1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度之OX40mAb24之FACS緩衝液中。關於結合對照，分開地用經螢光染料標記之同型對照抗體培育細胞。用抗體於4 $^{\circ}\text{C}$ 在黑暗中培育細胞1小時。此後，在冷FACS緩衝液中洗滌經過經螢光染料標記之單株抗體培育之細胞且接著收集結合事件並依流式細胞分析使用LSRII流式細胞計數法(BD Biosciences, San Jose, CA)及如部分3.2.3中所述之FlowJo軟體進行分析。在冰冷FACS緩衝液中洗滌經OX40mAb24培育之細胞且接著將25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Alexa Fluor[®] 647山羊抗人類IgG(H+L)二級抗體懸浮且於4 $^{\circ}\text{C}$ 在黑暗中再培育30分鐘。關於二級抗體結合對照，於不存在OX40mAb24但僅存在經螢光染料標記之二級抗體下培育細胞。此後，洗滌細胞且懸浮於冷FACS緩衝液中以用於LSRII流式細胞計數法上之分析。

3.2.3 流式細胞分析

使用FlowJo軟體(Ashland, OR)檢驗流式細胞分析標準物(FCS)數據。為分析mAb結合，首先圈圍細胞以獲得活(PI陰性)細胞，且接著將事件之平均螢光強度(MFI)與事件總數作圖以產生結合直方圖。測

定各樣品之所有活細胞之幾何MFI，可測定超過背景(僅同型對照或二級抗體)之倍數MFI。

3.2.4 OX40mAb24結合特異性ELISA

蛋白質原液在PBS中稀釋至5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 後，製得各重組人類TNFRSF蛋白質之八點兩倍稀釋系列。接著，以二重複的方式將50 μL 各抗原稀釋液轉移至Nunc 96孔MaxiSorp平底板之孔，且在4 $^{\circ}\text{C}$ 培育過夜以使蛋白質吸附至板。隨後，在BioTek[®]板洗滌機中用PBS洗滌板三次以移除未結合之蛋白質。在PBS中將抗OX40 mAb29、9B12及對照抗體稀釋至10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之最終濃度，且將50 μL mAb添加至各孔並在室溫培育一小時以使mAb結合至板結合蛋白質。此後，使用BioTek[®]板洗滌機以PBS/吐溫20 0.1%(體積/體積)洗滌孔。將10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之與HRP結合之山羊抗人類或山羊抗小鼠二級抗體添加至各孔且在室溫培育1小時。在PBS/吐溫20 0.1%中洗滌三次之後，將50 μL TMB基質添加至各孔且在室溫培育5分鐘以顯影比色產物。藉由添加50 μL 0.5莫耳 H_2SO_4 至孔停止反應，且立刻在450 nm下使用Envision C板讀取器讀取板以偵測比色產物。在Windows之GraphPad Prism軟體(第5.01版)中將結果製成圖，及使用針對單位點結合之非線性回歸分析產生結合曲線。

3.3 結果

對人類OX40之蛋白質序列同源性BLASTP搜尋識別19個與全長OX40序列共有15至27%胺基酸序列同一性之人類TNFRSF蛋白質或同型物。該等蛋白質及其序列同一性百分率列於表3-2中。

表3-2 十二個具有與人類OX40最高同源性之TNFRSF成員之胺基酸序列同一性。

TNFRSF成員	替代名稱	與OX40之同一性%	UniProt蛋白質序列ID
TNFRSF11A	RANK、CD265	27	Q9Y6Q6同型2(87、8、9)
TNFRSF6B	DcR3	25	O95407
TNFRSF18	GITR、AITR	25	Q9Y5U5同型2
TNFRSSF10C	DCR1、TRAIL-R3	24	O14798
TNFRSF5	CD40	23	P25942同型2
TNFRSF18	GITR、AITR	23	Q9Y5U5同型3
TNFRSF18	GITR、AITR	23	Q9Y5U5
TNFRSF9	CD137、4-1BB	22	Q07011
TNFRSF5	CD40	21	P25942
TNFRSF14	TR2、HVEM-A	21	Q92956
TNFRSF16	NGF受體	21	P08138
TNFRSF3	LTβR、TNFRIII	20	P36941
TNFRSF6	Fas	20	P25445同型6 Tmdcl(A)
TNFRSF6	Fas	20	P25445
TNFRSF3	LTβR、TNFRIII	19	P36941同型2
TNFRSF6	Fas	19	P25445同型7 FasExo8Del
TNFRSF11B	骨保護素	18	O0030
TNFRSF1B	TNFR1b、TNFR2、 CD120b	18	P20333
TNFRSF11A	RANK、CD265	16	Q9Y6Q6

CCDS=共有編碼序列；ID=標識符；NA=不適用；TNFRSF=腫瘤壞死因子受體超家族；UniProt-通用蛋白質源

藉由如上文部分3.1.3中所述之流式細胞分析評估OX40mAb24與表現人類NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137或HVEM之經暫態轉染HEK293之細胞之結合。使用購買獲得之對各人類TNFRSF蛋白質具有特異性之抗體證實人類NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137及HVEM之細胞表面表現；相較於用於各TNFRSF蛋白質之同型對照抗

體之MFI增加倍數顯示於表3-3中。OX40mAb24與表現人類NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137或HVEM之HEK293細胞之結合實質上不高於單獨二級抗體與彼等相同細胞之結合所觀察者(表3-3，圖4A)。相比之下，OX40mAb24與組成性地過度表現OX40之Jurkat細胞系之結合比單獨經螢光染料標記之二級抗體之結合其平均MFI大48倍(表3-3及圖4B)。

表 3-3：經螢光染料標記之 TNFRSF 特異性單株抗體及 OX40mAb24 與 TNFRSF 過度表現 HEK293 細胞或 OX40mAb24 與 OX40 過度表現 Jurkat 細胞之倍數結合。

經表現之 TNFRSF 成員	經 TNFRSF 成員轉染之細胞系	受體特異性市售 mAb 結合(與同型對照 MFI 之比率)	OX40mAb24 結合(與單獨二級抗體 MFI 之比率)
OX40	Jurkat	ND	48
TNFRSF16(NGFR)	HEK293	17	2.2
TNFRSF3(LTβR)	HEK293	146	1.0
TNFRSF1β	HEK293	5.0	1.0
TNFRSF18(GITR)	HEK293	37	1.1
TNFRSF9(CD137)	HEK293	24	1.2
TNFRSF14(HVEM)	HEK293	69	1.1

mAb=單株抗體；MFI=平均螢光強度；ND=未測定；TNFRSF=腫瘤壞死因子受體超家族

在ELISA形式中，包含OX40mAb24之Fab臂但具有包含三個胺基酸修飾(mAb29)之IgG1 Fc域之抗體之結合對OX40具有特異性(圖5A)，顯示對重組人類NGFR(TNFRSF16)、LTβR(TNFRSF3)、TNFR2(TNFRSF1β)、GITR(TNFRSF18)、CD137(TNFRSF9)、HVEM(TNFRSF14)、DR6(TNFRSF21)、骨保護素(OPG；TNFRSF11B)、RANK(TNFRSF11A)、FAS(TNFRSF6)及CD40(TNFRSF5)無高出背景之特異性結合。9B12(經「人類化」以建立OX40mAb24之小鼠抗人類OX40 IgG1單株抗體)展現同樣缺少與此

等TNFRSF蛋白質之結合(圖5B)。

3.4：結論

OX40mAb24及9B12與人類OX40之結合具有特異性，且不與高度相關TNFRSF蛋白質交叉反應。

實例4：OX40mAb24在活體外透過OX40共刺激初代人類CD4⁺ T細胞之能力

在此實例中，使用基於板之人類CD4⁺ T細胞增殖及細胞介素釋放分析來評估OX40mAb24增強T細胞之活化組合透過CD3/T細胞受體(TCR)複合物之活化之能力。亦檢驗可溶性OX40mAb24活性，作為具有可溶性且板結合之OX40mAb24於不存在CD3/TCR信號傳導之活性。

4.1 材料

此研究中所使用之材料列於表4-1中。

表4-1 材料

條目	來源
AlexaFluor® 647 山羊抗人類IgG(H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗人類CD4 EFluor450®	eBioscience, San Diego, CA
牛血清白蛋白(BSA)	Sigma, Saint Louis, MO
CFSE細胞標記套組	Life Technologies, Carlsbad, CA
完全RPMI培養基：RPMI-1640+10% FBS	Materials from Life Technologies, Carlsbad, CA
深孔板，聚丙烯，2 mL	VWR, Radnor, PA
EasySep CD4 ⁺ T細胞增富套組	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
FlowJo軟體	TreeStar, Ashland, OR
山羊抗人類IgG，具有Fcy特異性	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
山羊抗小鼠IgG，具有Fcy特異性	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
經熱不活化之新生胎牛血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
IL-2，重組人類	Preprotech, Rocky Hill, NJ

條目	來源
Leuko Pak	AllCells, Alameda, CA
LSM	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
LSR II流式細胞計數法	BD Biosciences, San Jose, CA
小鼠抗人類CD3抗體純系OKT3	Biologend, San Diego, CA
新生小牛血清，經熱不活化(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
未經組織培養物處理之圓底96孔板	VWR, Radnor, PA
PHA-L	Roche Applied Science, Indianapolis, IN
磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) pH7.2，無鈣及鎂	Life Technologies, Carlsbad, CA
Prism軟體，第5.01版	Graphpad Software, San Diego, CA
碘化丙啶(1 mg/mL溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
RosetteSep CD4 ⁺ T細胞增富套組	StemCell Technologies, Vancouver, BC Canada
RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
Th1/Th2多細胞介素偵測陣列	Mesoscale Discovery (MSD), Rockville, MD
Vi-Cell計數器	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
全血，經肝素鈉抗凝固	醫學免疫公司血液供體計劃，Gaithersburg, MD

4.2 分析

4.2.1 OX40mAb24之板固定生物活性

在基於板之藥物捕獲分析中測定人類CD4⁺ T細胞增殖及細胞介素產生來判定OX40mAb24之生物活性(圖6)。

依製造商方案使用RosetteSep CD4⁺ T細胞增富套組自健康供體全血分離經增富之人類CD4⁺ T細胞。用自四個獨立供體獲得之細胞進行該等分析。

將CD4⁺ T細胞懸浮於完全RPMI培養基中且調整細胞濃度至 1.0×10^6 /mL。添加最終濃度為2 μ g/mL之植物血球凝集素-白細胞凝集素(PHA-L)及20 IU/mL重組人類IL-2，且在增濕組織培養箱中於37°C及5% CO₂下培養細胞2天以活化T細胞及上調OX40。

用含在PBS中之100 μ L 2 μ g/mL山羊抗小鼠Fc γ 特異性IgG及2 μ g/mL山羊抗人類Fc γ 特異性IgG塗覆未經組織培養物處理之圓底96孔分析板。意欲進行可溶性OX40mAb24活性分析之孔不添加山羊抗人類IgG捕獲抗體。在4 $^{\circ}$ C培育板過夜，用200 μ L PBS洗滌，且在37 $^{\circ}$ C用含在PBS中之1% BSA(1% BSA/PBS)阻斷90分鐘。用PBS洗滌該等板且在37 $^{\circ}$ C將於1% BSA/PBS中復水之2 ng/mL小鼠抗人類CD3純系OKT3添加至該等板維持90分鐘。用PBS洗滌該等板以移除未結合之OKT3，OX40mAb24、R347人類IgG1對照mAb、9B12及小鼠IgG1對照mAb純系MOPC-21各一開始在0.918 μ g/mL(3.0 nM)之1% BSA/PBS中復水且於3倍稀釋系列上連續稀釋且接著添加至分析板並在37 $^{\circ}$ C培育90分鐘。

收集活化之初代人類CD4 $^{+}$ T細胞，在完全RPMI培養基中洗滌，且調整濃度至 1.0×10^6 活細胞/mL。用羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)依製造商說明書標記細胞，除所提議的5 μ M相反使用1.25 μ M CFSE外，在37 $^{\circ}$ C培育10分鐘。在標記之後，將細胞懸浮於完全RPMI培養基中且調整濃度至 0.5×10^6 /mL。用PBS洗滌板且將200 μ L CD4 $^{+}$ T細胞(100,000個/孔)添加至各孔。關於包含可溶性OX40mAb24之孔，在完全RPMI培養基中稀釋OX40mAb24至用於板結合OX40mAb24之最高最終濃度。板中之細胞透過以380 \times g離心而沉澱成團粒且在37 $^{\circ}$ C培育3天。72小時的培育時間後，移除40 μ L細胞培養上清液以用於細胞介素釋放測量。使CD4 $^{+}$ T細胞沉澱成團粒，且用包含2% FBS之PBS(FACS緩衝液)洗滌一次。將細胞懸浮於包含用於識別CD4 $^{+}$ T細胞之經抗人類CD4 eFluor450 $^{\circledR}$ 標記之抗體及用於區別活/非活細胞之碘化丙啶(PI)之結合混合物中，且培育30分鐘。在培育之後，在FACS緩衝液中洗滌細胞，再懸浮於FACS緩衝液中且透過流式細胞分析使用LSRII流式細胞計數法及用於分析流式細胞分析標準物(FCS)格式化數

據之FlowJo軟體分析。

為分析T細胞增殖，使用FlowJo軟體圈圍活(PI陰性)事件及顯示CFSE稀釋之CD4-圈圍細胞之百分率測定作為經歷增殖之細胞百分率之量度。

為分析細胞介素釋放，使用來自MesoScale Discovery (Gaithersburg, MD)之10-plex人類Th1/Th2細胞介素分析套組依製造商方案測量培養72小時後獲得之細胞培養上清液的細胞介素含量。此套組採用電化學偵測方法以定量測量以下人類細胞介素：IFN γ 、IL-2、IL4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12 p70、IL-13及IL-1 β 。

使用Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com之GraphPad Prism第5.01版以將mAb濃度之log值對增殖或細胞介素釋放值作圖。自S形劑量反應生物活性曲線使用ECAnything函數計算得達成OX40mAb24生物活性之20%、50%及90%最大效應(EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀)值之有效濃度。

4.3 結果

四個供體各者之增殖數據及一個供體之細胞介素釋放數據顯示於圖7A-C及圖8A-E中。人類初代CD4⁺ T細胞增殖之EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀效力值顯示於表4-2中；人類初代CD4⁺ T細胞細胞介素釋放分析之效力值顯示於表4-3至表4-7中；OX40mAb24及9B12之平均增殖及細胞介素釋放值分別顯示於表4-8及表4-9中。

OX40mAb24以濃度依賴性方式共刺激初代人類CD4⁺ T細胞(n=4)之增殖，EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值分別為21、28及72 pM。9B12共刺激CD4⁺ T細胞之增殖，EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值為106、218及622 pM。因此，誘導50%最大增殖反應所需要的9B12濃度與OX40mAb24濃度之比率為8:1(表4-2)。

OX40mAb24及9B12共刺激初代人類CD4⁺ T細胞以釋放細胞介素

(n=4)。平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值相較於增殖之值其效力更低，且概述於表4-8及表4-9中。兩種mAb之IL-2、IL-4、IL-8、IL-12 p70及IL-1β分析結果不進行非線性回歸分析，此乃因S形劑量反應曲線形成欠佳或不存在。

表4-2 初代人類CD4⁺ T細胞增殖分析中OX40mAb24及9B12之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在 TCR 刺激下之活性
367	OX40mAb24	32(22, 46)	38(20, 72)	71(17, 29)	未測試	無
661	OX40mAb24	33(28, 39)	51(33, 77)	128(96, 172)	未測試	無
645	OX40mAb24	7.5(2.7, 21)	8.3(2.8, 25)	35(7.1, 173)	無	未測試
651	OX40mAb24	9.6(6.3, 15)	16(9.1, 26)	54(30, 99)	無	未測試
平均值 (平均值 標準誤 差), pM	OX40mAb24	21(6.9)	28(9.8)	72(20)		
367	9B12	99.8(80.0, 125)	156(90.2, 269)	337(214, 530)	未測試	未測試
661	9B12	128(113, 144)	237(164, 342)	535(464, 617)	未測試	未測試

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
645	9B12	77.5(30.2, 199)	169(67.0, 425)	686(152, 3080)	未測試	未測試
651	9B12	118(80.8, 173)	309(201, 475)	929(511, 1690)	未測試	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	9B12	106(11.1)	218(35.2)	622(125)		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；TCR=T細胞受體。

表4-3：初代人類CD4⁺ T細胞生物活性分析中由OX40mAb24或9B12誘導之IFN γ 之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
367	OX40mAb24	38.6(21.3, 70.0)	57.2(31.2, 105)	106(34.6, 328)	未測試	無
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未測試	無
645	OX40mAb24	32.1(20.8, 49.7)	58.2(42.0, 80.8)	150(77.6, 289)	無	未測試
651	OX40mAb24	47.5(24.5, 91.8)	77.4(51.4, 116)	168(86.7, 324)	無	未測試

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
平均值(平均值標準誤差), pM	OX40mAb24	39.4(4.46)	64.3(6.57)	141(18.4)		
367	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
661	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
645	9B12	706(518, 963)	2380(1420, 3970)	16300(5480, 48300)	未測試	未測試
651	9B12	344(274, 430)	758(639, 900)	2660(780, 3990)	未測試	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	9B12	525(148)	1570(662)	9480(5569)		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；TCR=T細胞受體。

表4-4：初代人類CD4⁺ T細胞生物活性分析中由OX40mAb24或9B12誘導之TNF α 之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	未測試	無
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未測試	無
645	OX40mAb24	37.6(22.5, 62.7)	54.1(29.1, 101)	96.2(26.7, 347)	無	未測試
651	OX40mAb24	ND	ND	ND	無	未測試
平均值 (平均值標準誤差), pM	OX40mAb24	ND	ND	ND		
367	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
661	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
645	9B12	306(258, 503)	670(527, 853)	1800(1100, 2920)	未測試	未測試
651	9B12	388(300, 502)	764(640, 919)	2260(1500, 3410)	未測試	未測試
平均值 (平均值標準誤差), pM	9B12	347(33.5)	717(38.4)	2030(188)		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因曲線擬合欠佳(EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀)或缺少足夠的數值來確定平均值及平均值標準誤差而未測定；TCR=T細胞受體。

表4-5：初代人類CD4⁺ T細胞生物活性分析中由OX40mAb24或9B12誘導之IL10之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
367	OX40mAb24	41.6(17.8, 97.0)	59.5(25.4, 139)	105(25.0, 440)	未測試	無
661	OX40mAb24	63.5(29.6, 136)	89.5(64.2, 125)	154(93.3, 255)	未測試	無
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	無	未測試
651	OX40mAb24	53.0(31.0, 90.6)	86.4(65.0, 115)	188(110, 321)	無	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	OX40mAb24	52.7(6.32)	78.5(9.53)	149(24.1)		
367	9B12	130(83.3, 204)	198(139, 284)	385(224, 662)	未測試	未測試
661	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
645	9B12	528(363, 767)	1220(858, 1740)	4630(2050, 10400)	未測試	未測試
651	9B12	405(300, 547)	796(649, 976)	2320(1440, 3730)	未測試	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	9B12	354(118)	738(296)	2445(1227)		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因曲線擬合欠佳(EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀)或缺少足夠的數值來確定平均值及平均值標準誤差而未測定；TCR=T細胞受體。

表 4-6：初代人類 CD4⁺ T 細胞生物活性分析中由 OX40mAb24 或 9B12 誘導之 IL13 之平均 EC₂₀、EC₅₀ 及 EC₉₀ 值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在 TCR 刺激下之活性
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	未測試	無
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未測試	無
645	OX40mAb24	44.7(26.5, 75.5)	73.8(52.2, 104)	163(93.3, 286)	無	未測試
651	OX40mAb24	36.2(24.9, 52.7)	65.0(49.6, 85.3)	164(99.2, 273)	無	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	OX40mAb24	40.5(4.25)	69.4(4.40)	164(0.50)		
367	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
661	9B12	154(841, 283)	238(166, 341)	472(278, 800)	未測試	未測試
645	9B12	1100(413, 2910)	5450(1060, 2800)	6930(4310, 1110000)	未測試	未測試
651	9B12	495(324, 756)	1770(896, 3510)	13400(2980, 60400)	未測試	未測試
平均值(平均值標準誤差), pM	9B12	583(277)	2486(1550)	6930(3730)		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因曲線擬合欠佳(EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀)或缺少足夠的數值來確定平均值及平均值標準誤差而未測定；TCR=T細胞受體。

表 4-7：初代CD4⁺ T細胞生物活性分析中由OX40mAb24或9B12誘導之IL5之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值

供體編號	單株抗體	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶性活性	不存在TCR刺激下之活性
367	OX40mAb24	33.2(21.2, 52.1)	46.7(24.7, 88.0)	79.8(12.3, 519)	未測試	無
661	OX40mAb24	43.4(27.6, 68.4)	69.0(49.7, 95.7)	144(86.8, 238)	未測試	無
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	無	未測試
651	OX40mAb24	56.2(35.5, 88.9)	95.9(76.1, 121)	224(128, 391)	無	未測試
平均值 (平均值標準誤差), pM	OX40mAb24	44.3(6.65)	70.5(14.2)	149(41.7)		
367	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
661	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
645	9B12	ND	ND	ND	未測試	未測試
651	9B12	423(285, 627)	1090(742, 1600)	4870(1900, 12500)	未測試	未測試
平均值 (平均值標準誤差), pM	9B12	ND	ND	ND		

CI=置信區間；EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因曲線擬合欠佳(EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀)或缺少足夠的數值來確定平均值及平均值標準誤差而未測定；TCR=T細胞受體。

表4-8：OX40mAb24之增殖及細胞介素釋放之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值概述

生物活性讀數	EC ₂₀ (StdErr) , pM	EC ₅₀ (StdErr) , pM	EC ₉₀ (StdErr) , pM
CD4 T細胞增殖	21(6.9)	28(98)	72(20)
IFN γ 釋放	39.4(4.46)	64.3(6.57)	141(18.4)
TNF α 釋放	ND	ND	ND
IL10	52.7(6.32)	78.5(9.53)	149(24.1)
IL13	40.5(4.25)	69.4(4.40)	164(0.50)
IL5	44.3(6.65)	70.5(14.2)	149(41.7)

EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因計算平均值及平均值標準誤差之n值不夠而未測定；StdErr=平均值標準誤差。

表4-9：9B12之增殖及細胞介素釋放之平均EC₂₀、EC₅₀及EC₉₀值概述

生物活性讀數	EC ₂₀ (StdErr) , pM	EC ₅₀ (StdErr) , pM	EC ₉₀ (StdErr) , pM
CD4 T細胞增殖	106(11.1)	218(35.2)	622(125)
IFN γ 釋放	525(148)	1570(662)	9480(5569)
TNF α 釋放	347(33.5)	717(38.4)	2030(188)
IL10	354(118)	738(296)	2445(1227)
IL13	583(277)	2486(1547)	6934(3732)
IL5	ND	ND	ND

EC₂₀=達成20%最大效應之有效濃度；EC₅₀=半數最大有效濃度；EC₉₀=達成90%最大效應之有效濃度；ND=因計算平均值及平均值標準誤差之n值不夠而未測定；StdErr=平均值標準誤差。

測定非板結合、可溶性OX40mAb24之活性。可溶性OX40mAb24不誘導超過針對單獨抗CD3抗體或存在R347人類IgG1對照mAb下所觀察到水平之初代人類CD4⁺ T細胞增殖(圖7A-C)或細胞介素釋放(圖8A-E)。單獨板結合抗CD3抗體產生最小至中等水平之增殖及細胞介素釋放。此處由可溶性OX40mAb24證實缺少活性與不存在針對在測量OX40介導之NF κ B信號傳導之2-細胞生物活性分析中無基於細胞之交

聯之可溶性OX40mAb24所觀察到的活性一致(參見下述實例5)。

同樣地，不存在亞有絲分裂抗CD3抗體信號之固定於板表面上或添加作為可溶性未結合蛋白質之OX40mAb24誘導很少的(至不誘導)CD4⁺ T細胞增殖(圖7A-C)或細胞介素釋放(圖8A-E)。此等結果證實此研究中OX40mAb24在初代人類CD4⁺ T細胞中於不存在同時CD3/TCR連接下不具有活性。

4.4 結論

OX40mAb24以類似於其經人類化9B12之抗體之增殖及細胞介素釋放之濃度依賴性方式誘導初代人類CD4⁺ T細胞之增殖及細胞介素釋放(圖8A-E及圖9A-E)。OX40mAb24證實如板結合蛋白質般但非如可溶性蛋白質般之活性。另外，OX40mAb24活性與CD3/TCR信號傳導同時發生。

實例5：使用Jurkat NFκB螢光素酶報導子T細胞之基於2-細胞之生物活性分析中OX40mAb24之活體外活性之測定

在此實例中，使用一組2-細胞報導子生物活性分析來評估OX40mAb24及9B12透過人類OX40傳導信號之能力。藉由使用對NFκB信號傳導路徑之刺激反應產生螢光素酶之OX40過度表現Jurkat NFκB螢光素酶T細胞報導子系達成透過OX40共刺激測量T細胞活化(圖10)。已報導NFκB信號傳導在OX40接合下游發生，且可與T細胞活化之其他測量值諸如增殖及細胞介素釋放相關聯(Croft M等人, *Immunol Rev.* 229:173-91 (2009))。藉由添加螢光素酶基質至細胞溶胞產物中且使用照度計測量由反應產物發射之光來測量螢光素酶之量及從而測量T細胞活化。測量使用經工程化以表現不同Fcγ受體補體之細胞交聯之OX40mAb24及可溶性、非FcγR交聯OX40mAb24之生物活性。

5.1 材料

此研究中所使用之材料列於表5-1中。

表5-1：材料

項目	來源
CD45 ⁺ 微珠	Miltenyi, San Diego, CA
膠原酶III	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
DNA酶I，來自牛胰臟	Sigma, Saint Louis, MO
EDTA，0.5 M pH 8.0	Life Technologies, Carlsbad, CA
Envision發光讀取器	Perkin Elmer, Waltham, MA
經熱不活化之新生胎牛血清 (FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
LS管柱	Miltenyi, San Diego, CA
MACS 緩衝液：PBS+0.5% BSA+2 mM EDTA	材料購自 Life Technologies, Carlsbad, CA
未經TC處理之圓底96孔板	VWR, Radnor, PA
Prism第5.01版軟體	GraphPad, San Diego, CA
Steady-Glo螢光素酶分析溶液	Promega, Madison, WI
ViCell計數器	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

5.2 2-細胞生物活性分析

5.2.1 初代人類CD45⁺細胞之分離

自人類腫瘤分離初代人類CD45⁺細胞。自傳輸培養基中移除腫瘤樣品並置於無菌培養皿中。添加漢克氏緩衝鹽溶液(Hank's Buffered Salt Solution)及切下來自腫瘤樣品之可見的壞死組織或任何正常組織。將組織切成小塊(~1 mm)且置於50 mL圓錐形管中，及添加膠原酶III酶混合物(250 IU/mL膠原酶III、3 mM CaCl₂、315 µg/mL DNA酶1)，混合，然後培育。經消化之樣品透過70微米過濾器過濾且用MACS緩衝液洗滌。使經解離之細胞沉澱成團粒且使用ViCell計數器以判定細胞數目及生存力。將細胞懸浮於具有CD45微珠之MACS緩衝液中且在冰上培育。洗滌細胞且再懸浮於MACS緩衝液中使用LS管柱來陽性篩選CD45⁺細胞。藉由自磁鐵移除管柱且添加MACS緩衝液

至管柱以洗脫經珠結合之CD45⁺細胞。使細胞沉澱成團粒且再懸浮於完全RPMI培養基中並用於如上所述之生物活性分析中。

5.2.2 分析方案

使用2-細胞生物活性分析測試OX40mAb24及9B12之生物活性。使用人類OX40過度表現Jurkat NFκB螢光素酶報導子純系64(OX40 Jurkat報導子)以測量OX40促效作用(NFκB活性)。使用第二個FcγR表現細胞系以介導OX40mAb24交聯，此群聚並活化OX40 Jurkat報導細胞上的OX40(圖10)。用於交聯之FcγR表現細胞系包括Raji人類B細胞淋巴瘤系、CD32A表現HEK293、CD32B表現HEK293或自初代人類腫瘤分離之CD45⁺免疫細胞。

為測定OX40mAb24之可溶性活性，亦使用無FcγR且因此無法交聯OX40mAb24之親代HEK293細胞或在整體上缺少交聯細胞之情況下進行生物活性分析。

使用前，在組織培養箱中於完全RPMI培養基中以0.5至1.5×10⁶個/mL之密度培養OX40 Jurkat報導細胞。在生物分析前一天以10⁶個細胞/mL之最終密度繼代培養細胞。

收集OX40 Jurkat報導細胞、FcγR表現細胞系或HEK親代細胞且使其沉澱成團粒。如下文所描述，為自初代人類腫瘤及正常毗鄰組織分離CD45⁺細胞，解離組織及分離CD45⁺細胞且將其再懸浮於完全RPMI培養基中用於生物活性分析。

在完全RPMI培養基中連續3倍稀釋OX40mAb24、9B12及各種對照抗體。

以100,000各細胞/孔將OX40 Jurkat報導細胞加上FcγR表現細胞或HEK親代細胞添加至96孔板。將OX40mAb24、9B12或對照抗體添加至起始濃度為10 μg/mL之稀釋系列之細胞，且在組織培養箱中於37°C下培育。

16至24小時的培育時間後，將100 μL 經復水之Steady-Glo螢光素酶分析溶液(Promega, Madison, WI)添加至各孔並混合以溶解細胞且接著培育以平衡螢光素酶信號。將Steady-Glo/樣品溶胞產物(150 μL)自各孔轉移至96孔白壁分析板中以使用Perkin Elmer Envision發光讀取器偵測及讀取發光。

使用Windows之GraphPad Prism第5.01版(GraphPad Software, San Diego, CA)作出OX40mAb24、9B12、R347人類IgG1、小鼠IgG1純系MOPC-21之濃度(x軸為蛋白質濃度之 \log_{10})對發光RLU(y軸)之圖。使用S形劑量反應(可變斜率)生物活性曲線之 $f=20$ 、 $f=50$ 及 $f=90$ 之ECAnything(EC $_f$)測定生物活性之EC $_{20}$ 、EC $_{50}$ 及EC $_{90}$ 值。

5.3 2-細胞生物活性分析之結果

OX40mAb24及對照抗體之生物活性結果顯示於圖11A-D、圖12A-D及表5-2中。

在Fc γ R表現細胞系(例如，CD32A表現HEK293、CD32B表現HEK293、Raji B細胞或自初代人類腫瘤分離之CD45⁺細胞)之存在下，OX40mAb24證實OX40過度表現Jurkat NF κ B報導細胞之有效刺激，如藉由NF κ B路徑活化測量。在缺少第二種細胞類型或在存在缺少外源性表現之Fc γ R之HEK293細胞之情況下，OX40mAb24展現最小報導子活性(圖11A-D)。

2-細胞生物分析之效力值(EC $_{20}$ 、EC $_{50}$ 及EC $_{90}$)概述於表5-2中。所有分析之平均EC $_{20}$ 、EC $_{50}$ 及EC $_{90}$ 值分別為228、751及5630 pM。

9B12及對照抗體之生物活性結果顯示於圖12A-D及效力值概述於表5-3中。所有分析之平均EC $_{20}$ 、EC $_{50}$ 及EC $_{90}$ 分別為519、2530及41100 pM。因此，9B12之2-細胞生物活性(EC $_{50}$)對OX40mAb24之2-細胞生物活性(EC $_{50}$)之比率經計算為3.4:1。

表5-2：OX40mAb24之2-細胞生物活性

實驗編號	FcγR表現細胞*	EC ₂₀ (95% CI) pM	EC ₅₀ (95% CI) pM	EC ₉₀ (95% CI) pM
1	Raji	298(236, 378)	1140(982, 1340)	9850(6500, 14300)
2	CD32A表現HEK	104(78.8, 138)	437(370, 517)	4250(2900, 6240)
3	CD32A表現HEK	100(79.5, 126)	322(281, 370)	2060(1530, 2780)
4	Raji	350(259, 467)	1040(855, 1270)	5930(3740, 9400)
5	CD32B表現HEK	90.6(75.4, 109)	270(242, 301)	1520(1200, 1920)
6	Raji	180(109, 296)	796(577, 1100)	8410(3820, 18500)
7	CD32B表現HEK	280(198, 394)	899(710, 1140)	5730(3290, 9970)
8	CD32B表現HEK	237(196, 286)	671(592, 762)	3510(2630, 4670)
9	Raji	676(443, 1030)	1320(970, 1800)	3820(2000, 7320)
10	Raji	297(127, 694)	1260(666, 2390)	12500(2570, 60500)
11	CD32B表現HEK	144(113, 184)	700(598, 818)	8540(5770, 12600)
12	CD45 ⁺ 細胞，NSCLC	33.6(24.7, 45.8)	81.6(68.5, 97.3)	334(236, 471)
13	CD45 ⁺ 細胞，RCC	92.2(75.4, 113)	337(296, 383)	2630(1940, 3550)
14	CD45 ⁺ 細胞，NSCLC	247(207, 295)	772(688, 867)	4700(3600, 6140)
15	CD45 ⁺ 細胞，RCC	351(155, 798)	1410(782, 2530)	12700(2960, 54500)
16	CD32A表現HEK	166(145, 191)	553(507, 603)	3720(3060, 4530)
	平均值(平均值標準誤差)	228(38.9)	751(101)	5630(937)

NSCLC=非小細胞肺癌；RCC=腎細胞癌

*如所示，分析使用Raji、CD32A表現HEK293、CD32B表現HEK293細胞或自初代人類腫瘤樣品分離之CD45⁺細胞與具有OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶純系64報導細胞。

表5-3：9B12之2-細胞生物活性

實驗編號	FcyR表現細胞*	EC ₂₀ pM	EC ₅₀ pM	EC ₉₀ pM
1	Raji	1110(791, 1570)	9280(4460, 19300)	267000(57900, 1230000)
2	CD32A 表現 HEK	74.1(53.0, 104)	338(279, 410)	3760(2440, 5790)
3	CD32A 表現 HEK	66.7(43.3, 103)	225(175, 289)	1550(914, 2630)
4	Raji	1040(834, 1300)	5040(3880, 6550)	61200(32200, 116000)
5	CD32B 表現 HEK	249(206, 303)	726(641, 823)	3950(2980, 5240)
6	Raji	548(408, 736)	2700(2070, 3620)	33700(17000, 66700)
7	CD32B 表現 HEK	585(520, 658)	1770(1620, 1930)	10200(8280, 12500)
8	CD32B 表現 HEK	518(449, 598)	1340(1210, 1480)	6050(4800, 7630)
9	Raji	872(504, 1510)	3070(1910, 4950)	22600(7000, 73100)
10	Raji	571(212, 1540)	3330(1080, 10200)	54400(3400, 872000)
11	CD32B 表現 HEK	650(458, 923)	2360(1790, 3100)	18200(9200, 36000)
12	CD45 ⁺ 細胞， NSCLC	104(76.3, 143)	223(185, 269)	741(501, 1100)
13	CD45 ⁺ 細胞， RCC	ND	ND	ND
14	CD45 ⁺ 細胞， NSCLC	ND	ND	ND
15	CD45 ⁺ 細胞， RCC	356(132, 964)	2420(938, 6250)	50500(4140, 616000)
	平均值(平均值 標準誤差)	519(96.2)	2530(687)	41100(19700)

ND=未測定；NSCLC=非小細胞肺癌；RCC=腎細胞癌

*如所示，分析使用Raji、CD32A表現HEK293、CD32B表現HEK293細胞或自初代人類腫瘤樣品分離之CD45⁺細胞與具有OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶純系64報導細胞。

5-4: : 結論

OX40mAb24及9B12介導人類T細胞之活化，如藉由OX40過度表現Jurkat NFκB螢光素酶報導細胞系中NFκB路徑之刺激測得。在缺少表現可經由OX40mAb24之Fc域交聯之FcγR之細胞之情況下，測得最小報導細胞系活性。然而，在包含可交聯mAb之表現FcγR之細胞及用於讀取T細胞活化之Jurkat過度表現NFκB螢光素酶報導子系之2-細胞系統中，OX40mAb24及9B12介導有效OX40活化，平均EC₅₀值分別為751 pM及2530 pM。因此，2-細胞分析系統中OX40mAb24之生物活性類似於9B12之生物活性。

實例6：OX40mAb24引起效應子功能之能力

在此實例中，針對OX40mAb24評估其引起Fc效應子功能之能力，即，OX40mAb24引起人類自然殺手(NK)細胞介導之抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)抗表現高水平OX40之初代人類CD4⁺ T細胞或結合C1q之能力，為傳統的補體路徑之補體依賴性細胞細胞毒性(CDC)之先決條件。使用包含人類IgG4P Fc域(mAb28)或減弱Fcγ RIIIa結合(mAb29)之IgG1 Fc域之三重突變之OX40mAb24變體以評估OX40mAb24 IgG1 Fc域介導ADCC活性之貢獻。此外，將OX40mAb24之效應子功能與9B12(人類化以產生OX40mAb24之小鼠抗人類OX40 IgG1單株抗體)之效應子功能進行比較。抗CD20抗體利妥昔單抗結合至表現CD20之B細胞且用作ADCC實驗之陽性對照。因為初代活化人類CD4⁺ T細胞不表現CD20，故進行使用不表現CD20之Toledo B細胞系之獨立分析以驗證用於ADCC分析系統中之NK細胞之活性。

6.1 材料

此研究中所使用之材料列於表7-1中。

表6-1：材料

項目	來源
補體蛋白C1q	Quidel, San Diego, CA
完全RPMI培養基：RPMI-1640+10% FBS	材料購自Life Technologies, Carlsbad, CA
DM-L培養基	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
GLC生物感測器晶片	Bio-Rad, Hercules, CA
FlowJo軟體	FlowJo, Ashland, OR
IL-2，重組人類	Preprotech, Rocky Hill, NJ
LSR II流式細胞計數法	BD Biosciences, San Jose, CA
Prism軟體，第5.01版	Graphpad Software, San Diego, CA
碘化丙啶(1 mg/mL溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
ProteOn Manager 2.1軟體	Bio-Rad, Hercules, CA
ProteOn XPR36儀器	Bio-Rad, Hercules, CA
RosetteSep CD4 T細胞增富套組	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
RosetteSep人類NK細胞增富	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
ViCell計數器	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
Vybrant DiO細胞標記溶液	Life Technologies, Carlsbad, CA
全血，經肝素鈉抗凝固	醫學免疫公司血液供體計劃，MedImmune，Gaithersburg, MD

6.2 分析

6.2.1 抗體依賴性細胞細胞毒性

使用經增富之初代人類NK細胞作為效應子及OX40表現初代人類CD4⁺ T細胞作為標靶測試OX40mAb24相對於9B12及包含OX40mAb24之具有IgG4P Fc域或三重突變(TM)人類IgG1 Fc域之Fab臂之單株抗體之ADCC活性之ADCC活性。關於陽性對照，使用利妥昔單抗導向殺死Toledo B細胞系測試各NK細胞製劑之活性。

關於分離初代人類CD4⁺ T細胞，依以下方案處理自健康供體透過醫學免疫公司血液供體計劃獲得之經肝素抗凝固之全血：對每20 mL全血添加Stem Cell Technologies RosetteSep CD4 T細胞分離套組抗

體混合物(1 mL, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada), 混合, 且在室溫(RT)培育20分鐘(mm)。用無菌室溫FACS緩衝液(PBS, pH 7.2加上2%經熱不活化之新生胎牛血清)1:1稀釋血液且分層至DM-L培養基上接著離心20分鐘。在離心之後, 移除含有人類CD4⁺ T細胞之膚色血球層及用RT FACS緩衝液洗滌該等細胞一次且用RT完全RPMI培養基洗滌一次。於ViCell計數器上計數細胞以測定細胞數目與生存力並以 1.0×10^6 個/mL之濃度將CD4⁺ T細胞懸浮於完全RPMI培養基中。

在增濕之組織培養箱中於37°C及5% CO₂下用2 µg/mL PHA-L及20 IU/mL rhIL-2培育初代人類CD4⁺ T細胞(1.0×10^6 個/mL含於完全RPMI培養基中)48小時以活化T細胞並上調OX40及隨後用於OX40mAb24 ADCC分析中。下文提及的圖中之所有供體表示獨特個體; 即, 用於重複ADCC實驗之CD4⁺ T細胞並非從相同供體分離。

為區分標靶T細胞或來自細胞毒性分析中之經純化人類NK細胞之經培養之Toledo B細胞, 使用Vybrant DiO細胞標記溶液(依製造商針對懸浮細胞標記之方案)將螢光染料DiO併入標靶細胞之細胞膜。活化及DiO標記初代人類CD4⁺ T細胞及Toledo B細胞後, 除改用1 mL RosetteSep NK細胞分離套組抗體混合物替代1 mL RosetteSep CD4⁺ T細胞分離套組抗體混合物以外, 使用如上用於人類CD4⁺ T細胞之相同方案自醫學免疫公司血液供體計劃之經肝素鈉抗凝固之血液分離效應子NK細胞。用溫的完全RPMI培養基(RPMI-1640加上10% FBS)洗滌所分離之初代人類NK細胞兩次, 且接著以 2.67×10^6 個/mL之濃度將其懸浮於完全RPMI中。同樣地, 亦在溫的完全RPMI中洗滌活化之初代人類CD4⁺ T細胞兩次且以 2.67×10^5 個/mL之濃度懸浮。此後, 將75 µL初代人類NK細胞(200,000)及75 µL活化初代人類CD4⁺ T細胞(20,000)添加至無菌未經組織培養物處理之圓底96孔板之孔中以達成10:1之效應

子-對-靶比率。在一些實驗中，添加包含OX40mAb24或對照mAb之完全RPMI培養基(50 μ L)以得到10 μ g/mL之最終濃度。在其他實驗中，將包含達成67 nM之最終濃度之OX40mAb24或對照mAb之3倍稀釋系列之完全RPMI(50 μ L)或始於67 nM之9B12或R347人類IgG1之27倍稀釋系列添加至盤細胞。在包含經DiO標記之CD20表現Toledo B細胞替代OX40表現活化初代人類CD4⁺ T細胞之孔中使用利妥昔單抗(10 μ g/mL，對照抗體)作為陽性對照，因為活化CD4⁺ T細胞不表現CD20。藉由在RT下離心輕輕地使ADCC分析中之細胞沉澱成團粒及隨後培養24小時。

在培育期間結束時，藉由離心使細胞沉澱成團粒且接著懸浮於包含10 μ g/mL碘化丙啶(PT)之FACS緩衝液中以用於BD LSR II流式細胞計數法上之流式細胞分析。使用FlowJo軟體於螢光補償後區分DiO陽性標靶CD4⁺ T細胞或Toledo B細胞中之非活(PT陽性)細胞。

使用Windows之GraphPad Prism第5.01版產生包含平均值及平均值標準誤差之測定之用於NK細胞ADCC分析之資料的圖解表現。

6.2.2 OX40mAb24與C1q之結合

使用ProteOn XPR36儀器以藉由表面電漿共振測定OX40mAb24或9B12與自OX40mAb24或9B12之組併人類血清純化之人類補體蛋白C1q之結合。使用標準胺耦合以將OX40mAb24或9B12固定至GLC生物感測器晶片之表面。將人類C1q以26 nM至1.6 nM範圍內變化之五個濃度懸浮於pH7.4的PBS/0.005%吐溫20中。以30 μ L/min注射樣品200秒，且隨後解離相600秒。使用ProteOn Manager 2.1軟體(Bio-Rad)使用1:1擬合處理感應圖資料。

6.3 結果

使用NK細胞及OX40表現標靶細胞之同種異體及自體混合物二者(圖13A及圖14A)，在飽和濃度(10 μ g/mL [67 nM])下針對於OX40結合

測試OX40mAb24、9B12及OX40mAb24之人類IgG4P (mAb28)及IgG1-TM(mAb29)變體介導ADCC之能力(參見實例2)。OX40mAb24顯示對活化人類CD4⁺ T細胞具有可測量之ADCC活性。相比之下，9B12、mAb28及mAb29顯示無超過陰性對照之ADCC活性之ADCC活性。抗人類CD20之陽性對照抗體(利妥昔單抗)證實使用相同NK細胞之ADCC活性，表明NK細胞均可穩定ADCC活性(圖13B及圖14B)。

在劑量反應實驗中，OX40mAb24證實抗活化人類CD4⁺ T細胞之濃度依賴性ADCC活性(圖15A至D、圖16A至D、圖17A至B及表6-2)。相比之下，9B12不顯示任何可偵測ADCC活性。此外，R347人類IgG1對照mAb不顯示任何可偵測ADCC活性，此證實由OX40mAb24介導之ADCC活性取決於標靶細胞上之OX40結合。抗人類CD20之陽性對照抗體亦證實抗CD20表現B細胞淋巴瘤細胞系之ADCC(圖13B及圖14B)；此支持該分析之有效性。此等實驗之結果全體地證實OX40mAb24可具抗已在先前顯示刺激細胞表面OX40之表現之條件下培養之標靶細胞之ADCC。

表6-2 OX40mAb24介導之NK細胞ADCC效力之概述

實驗編號	供體編號	EC20(pM)	EC50(pM)	EC90(pM)
3	363	134	2380	225000
3	504	309	1370	14600
4	464	37.0	3050	3330000
4	532	111	1310	66100
5	601	54.4	501	16900
5	602	61.4	527	16000
平均值(平均值標準誤差)，pM		118(41.1)	1520(415)	611000 (545000)

使用表面電漿共振分析評估OX40mAb24結合至人類補體成分C1q之潛力。在此分析中，使用與C1q之結合作為補體依賴性細胞毒性分析中活性之替代(Dall'Acqua等人, J. Immunol 177:1129-1138 (2006))。

使用9B12作為陰性對照抗體。OX40mAb24證實結合至經純化人類C1q蛋白質之濃度依賴性能力(圖18A)。相比之下，9B12不證實任何與C1q蛋白質之可偵測之結合(圖18B)。

6.4 結論

OX40mAb24結合至C1q且觸發對抗活化CD4⁺ T細胞之NK介導之ADCC。

實例7：OX40mAb24與馬來猴及恆河猴T細胞之活體外比較性研究

在此實例中，使用表現馬來猴(cyno)/恆河猴OX40之Jurkat NFκB螢光素酶T細胞報導子系之2-細胞報導子生物活性分析判定OX40mAb24增強T細胞活化之能力。Fcγ受體介導之藥物交聯係藉由恆河猴B細胞系或藉由紅血球細胞裂解後全血樣品中之恆河猴Fcγ受體表現細胞介導。OX40之活化係測定為螢光素酶活性對初代人類T細胞活化下游NFκB信號傳導路徑之刺激反應之增加。NFκB信號傳導為OX40信號傳導中之充分研究的下游事件，且可與T細胞活化之其他測定諸如增殖及細胞介素釋放相關聯(Croft M等人, *Immunol Rev.* 229:173-91 (2009))。此外，使用評估CD4⁺ T細胞增殖之板生物活性分析測試OX40mAb24增強恆河猴T細胞之T細胞受體介導之活化(共刺激)之能力。使用同型對照(NIP228 IgG1)以證實特異性OX40接合。

類似地，測定9B12(OX40mAb24所衍生之鼠類抗-OX40單株抗體)之生物活性以提供用於與非人類之靈長類動物OX40上之OX40mAb24及9B12活性比較。

7.1 材料

此研究中所使用之材料列於表7.1中。

表7-1 材料

項目	來源
氯化銨	StemCell Technologies, Vancouver, BC
抗人類CD3抗體，純系SP34-2	BD Biosciences, San Jose, CA
抗人類CD4-V450抗體，純系L200	BD Biosciences, San Jose, CA
抗人類CD28抗體，純系CD28.2	BD Biosciences, San Jose, CA
CFSE細胞標記套組	Life Technologies, Carlsbad, CA
伴刀豆球蛋白A	Sigma, Saint Louis, MO
Envision多標記板讀取器	Perkin Elmer, Waltham, MA
山羊抗人類Fcy抗體	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA
山羊抗小鼠Fcy抗體	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA
經熱不活化之胎牛血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
介白素-2，重組人類	Preprotech, Rocky Hill, NJ
LSR II流式細胞計數法	BD Biosciences, San Jose, CA
淋巴細胞分離培養基(LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
MACS緩衝液	Miltenyi, San Diego, CA
非人類之靈長類動物CD4 T細胞分離套組	Miltenyi, San Diego, CA
碘化丙啶(1 mg/mL溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
恆河猴(印度起源)全血，經肝素鈉抗凝固	Worldwide Primates, Miami, FL
RPMI-1640培養基	Life Technologies, Carlsbad, CA
SteadyGlo螢光素酶分析溶液	Promega, Madison, WI
ViCell計數器	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

7.2 分析

7.2.1 馬來猴/恆河猴2-細胞生物活性分析

使用2-細胞報導子分析測試OX40mAb24之生物活性。因馬來猴及恆河猴共有相同OX40胺基酸序列，故使用馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat NFκB螢光素酶報導細胞系(純系B2)以用於讀出OX40促效作用(NFκB活性)。為介導OX40mAb24交聯及因此介導Jurkat報導細胞上之OX40聚集，使用Fcy受體表現恆河猴B細胞系、LCL8664或來自正常

恆河猴全血之包含 FcγR 表現細胞之白血球。在兩種不添加 OX40mAb24 及亦缺少 FcγR 表現細胞之情況下評估背景生物活性。為證實 OX40 接合於報導細胞上之作用，改用同型對照替代 OX40mAb24。

依以下方案以 LCL8664 進行 OX40mAb24 2-細胞生物活性分析：

在使用前一天，將馬來猴/恆河猴 OX40 表現 Jurkat NFκB 螢光素酶報導子純系 B2 及 LCL8664 培養於完全 RPMI 培養基(具有 10% 胎牛血清 [FBS] 及 1% 抗生素/抗黴劑之 RPMI) 中以分別達成約 5×10^6 個細胞/mL 及 4×10^5 個細胞/mL 之細胞密度。次日，使 OX40 Jurkat 報導細胞及 LCL8664 沉澱成團粒，懸浮於完全培養基中且在調整兩細胞系之細胞濃度至 2.5×10^6 個含於完全培養基中之前使用 ViCell 計數器計數。

將純系 B2 及 LCL8664 細胞各者以 100,000 個細胞/孔添加至非經組織培養物處理之 96 孔圓底板。將 OX40mAb24 添加至含於完全 RPMI 培養基中之細胞，達到以 30 μg/mL 開始及以 3 倍增量稀釋之最終濃度。類似地，以 10 μg/mL 且以 6 倍增量稀釋之最終濃度使用 R347 IgG1 (同型對照)。以相同方法稀釋 9B12 及 MOPC-21 (同型對照)。將板轉移至具有增濕 5% CO₂ 氛圍之 37°C 培養箱。

16 小時的培育時間後，將 100 μL 復水 Steady-Glo 螢光素酶分析溶液添加至各孔並混合以溶解細胞且接著培育以平衡螢光素酶信號。將 Steady-Glo/樣品溶胞產物 (150 μL) 自各孔轉移至 96 孔白壁分析板中以用於偵測及使用 Perkin Elmer Envision 發光讀取器讀取發光。

使用以下方案以自從健康印度起源之恆河猴獲得的經肝素鈉抗凝固之全血中獲得 RBC 溶胞恆河猴細胞：

將新鮮全血 (5 mL) 添加至 50-mL 圓錐形管中並添加 45 mL 氯化銨溶液。在冰上培育細胞混合物 10 分鐘，接著使其沉澱成團粒，且用完全 RPMI 培養基洗滌，此後，細胞準備用於 2-細胞生物活性分析中。

除使用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NIP228 IgG1 作為陰性對照抗體外，如針對 LCL8664 恆河猴 B 細胞系所述進行恆河猴 RBC 溶胞全血細胞之 2-細胞生物活性分析。

7.2.2 恆河猴 CD4⁺ T 細胞增殖分析

在 CD4⁺ T 細胞增殖分析中使用活化之初代恆河猴 CD4⁺ T 細胞及經板捕獲之藥物依以下方案測定 OX40mAb24 生物活性。使用自來自 World Wide Primates 之健康恆河猴 (N=2) 獲得之經肝素鈉抗凝固之全血分離之恆河猴 CD4⁺ T 細胞作為反應細胞之來源。

室溫 (RT) 下，用 PBS 1:1 稀釋新鮮肝素化恆河猴血液。接著，將 20 mL 經稀釋之全血塗層於 50-mL 圓錐形離心管中之 15 mL 95% 淋巴細胞分離培養基 (LSM) 上。室溫下，以 400 \times g 不停離心血液 30 分鐘。在介面處收集周邊血液單核細胞且用 Miltenyi MACS 緩衝液洗滌兩次並使其沉澱成團粒。用紅細胞溶胞緩衝液處理細胞團粒 5 分鐘，及在添加完全 RPMI 培養基下使溶胞緩衝液失去作用。洗滌細胞且懸浮於 MACS 緩衝液中及以 ViCell 計數器計數以判定細胞數目及生存力。

用 Miltenyi 非人類之靈長類動物套組依製造商說明書分離恆河猴 CD4⁺ T 細胞。接著，在 ViCell 計數器上計數 CD4⁺ T 細胞，以 1 \times 10⁶ 個細胞/mL 懸浮於具有 51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 伴刀豆球蛋白 A 及 1000 IU/mL IL-2 之完全 RPMI 培養基中且 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO₂ 下於增濕培養箱中培養 2 天以活化 T 細胞並誘導 OX40 表現。以含在 PBS 中之 100 μL 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗小鼠 Fc γ 特異性 IgG 及 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊抗人類 Fc γ 特異性 IgG 塗覆非經組織培養物處理之圓底 96 孔分析板。意欲用於可溶性 OX40mAb24 活性分析之孔不添加山羊抗人類 IgG 捕獲抗體。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 培育板過夜，用 200 μL PBS 洗滌，且在 37 $^{\circ}\text{C}$ 用 1% 含在 PBS 中之 BSA (1% BSA/PBS) 阻斷 90 分鐘。用 PBS 洗滌板及於 37 $^{\circ}\text{C}$ 將在 1% BSA/PBS 中復水之 2 ng/mL 抗-CD3 (純系 SP34-2) 添加至該等板 90 分鐘。用 PBS 洗滌該等板以移除未結合之

OX40mAb24，R347人類IgG1對照mAb、9B12及小鼠IgG1對照mAb(純系MOPC-21)各在以1.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6.67 nM；實驗1)或1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10.0 nM；實驗2)開始及超過3倍稀釋系列連續稀釋之1% BSA/PBS中復水且接著添加至分析板中並在37°C培育90分鐘。

收集活化之初代恆河猴CD4⁺ T細胞，在完全RPMI培養基中洗滌，且調整濃度至 1.0×10^6 個活細胞/mL。用羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)依製造商說明書標記細胞，除改用1.25 μM CFSE替代所建議之5 μM 外，在37°C培育10分鐘。標記後，將細胞懸浮於完全RPMI中及調整濃度至 1.0×10^6 個/mL。用PBS洗滌板且將200 μL CD4⁺ T細胞(200,000個/孔)添加至各孔。接著，在37°C培育該板3天。

72小時的培育時間後，使CD4⁺ T細胞沉澱成團粒，且用包含2% FBS之PBS(FACS緩衝液)洗滌一次。將細胞懸浮於包含用於識別CD4⁺ T細胞之經抗-CD4 V450[®]標記之抗體及用於活/非活細胞區分之碘化丙啶(PI)之結合混合物中，且培育30分鐘。培育後，在FACS緩衝液中洗滌細胞，再懸浮於FACS緩衝液中且藉由使用LSRII流式細胞計數法之流式細胞分析及用於分析流式細胞測量標準物(FCS)格式化數據之FlowJo軟體分析。

使用初代恆河猴CD4⁺ T細胞在兩個獨立實驗中重複該分析。

為評估細胞增殖，使用FlowJo軟體圈圍活(碘化丙啶陰性)事件及測定顯示CFSE稀釋之CD4⁺-圈圍細胞之百分率。由顯示CSFE對抗-CD3抗體加上OX40mAb24反應之稀釋之CD4⁺-圈圍細胞之百分率減去顯示CFSE對單獨抗-CD3反應之稀釋之CD4⁺-圈圍細胞之百分率計算得OX40mAb24之特異性活性。

於GraphPad Prism第5.01版(San Diego, CA)中使用非線性回歸分析(對數劑量反應，4參數擬合曲線)判定在Jurkat NF κ B報導子分析及初代恆河猴CD4⁺ T細胞分析中達成半數最大(EC₅₀)反應之OX40mAb24

濃度。

7.3 結果

7.3.1 馬來猴/恆河猴2-細胞生物活性分析

馬來猴/恆河猴2-細胞生物活性分析之結果顯示於表7-2、圖19A-B、圖20A-B及圖21A-B中。OX40mAb24在恆河猴B-細胞系(LCL8664)之存在下活化馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat T細胞中之如藉由NFκB信號傳導測得之OX40信號傳導路徑，平均EC₅₀為1450 pM(N=2個實驗)。如表7-2中所顯示，馬來猴/恆河猴2-細胞分析中之OX40mAb24活性之EC₅₀值比在Raji B-細胞系之人類2-細胞分析中高1.3倍，而在馬來猴/恆河猴2-細胞分析中9B12具有限制的活性及無法測定EC₅₀值。

此外，如表7-2中所顯示，OX40mAb24在期望包含Fcγ受體表現細胞之恆河猴RBC溶胞全血之存在下活化Jurkat T細胞中之OX40信號傳導路徑，EC₅₀為550 pM(N=1個實驗)。如表7-2中亦顯示，相同分析中9B12之EC₅₀值為6052 pM，及在Raji B-細胞系之人類2-細胞分析中為4680 pM。

表7-2 2細胞生物活性分析中OX40mAb24及9B12之平均半數最大有效濃度

測試或對照物	2-細胞分析形式		
	恆河猴LCL8664 B細胞+馬來猴/恆河猴OX40 表現 Jurkat NFκB螢光素酶純系B2生物活性 [平均EC ₅₀ (Std Err) ; n]	恆河猴RBC溶胞全血+馬來猴/恆河猴OX40 表現 Jurkat NFκB螢光素酶純系B2生物活性 [平均 EC ₅₀ (Std Err) ; n]	人類Raji B細胞+人類 OX40 Jurkat NFκB螢光素酶純系64生物活性 ^a [平均 EC ₅₀ (Std Err) ; n]
OX40mAb24	1450(204) ; n=2	550 ; n=1	1110(92.5) ; n=5
R347人類IgG1	無活性 ; n=2	NT	無活性
NIP228人類IgG1	NT	無活性 ; n=1	NT
9B12	ND	6052 ; n=1	4680(1220) ; n=5

Std Err=平均值標準誤差。n=實驗次數。NT=未測試。ND=未測定。

^a實例5之數據。

7.3.2 恆河猴初代C細胞增殖分析

恆河猴初代T細胞增殖分析之結果顯示於表7-3、表7-4及圖22A至D中。OX40mAb24以436 pM之平均EC₅₀誘導初代恆河猴CD4⁺ T細胞之增殖(表7-3；N=2次實驗)。如表7-5中所顯示，9B12之EC₅₀值為110 pM(表7-4；N=2次實驗)。在OX40mAb24中以28 pM之平均EC₅₀依相似之分析形式誘導活化初代人類CD4⁺ T細胞之增殖(表7-5；實例4之數據)。

表7-3 初代恆河猴CD4 T細胞增殖分析中OX40mAb24之平均半數最大有效濃度

測試或對照抗體	實驗編號	平均EC ₅₀ (Std Err)
OX40mAb24	2	436(309)
NIP228 IgG1	2	無活性

Std Err=平均值標準誤差。

表7-4 初代恆河猴CD4 T細胞增殖分析中9B12之平均半數最大有效濃度

測試或對照抗體	實驗編號	平均EC ₅₀ (Std Err)
9B12	2	110(13)
MOPC-21小鼠IgG1	2	無活性

Std Err=平均值標準誤差。

表7-5 恆河猴及人類CD4 T細胞增殖分析中OX40mAb24及9B12之平均半數最大有效濃度

測試或對照抗體	恆河猴平均 (Std Err)	人類平均 (Std Err)
OX40mAb24	436(309)	28(98)
9B12	110(13)	218(35)

Std Err=平均值標準誤差。

7.4 結論

OX40mAb24在包含於RBC溶胞恆河猴全血中之恆河猴B細胞或Fc γ 受體表現細胞之存在下活化馬來猴/恆河猴OX40表現Jurkat T細胞NF κ B報導細胞系中之OX40信號傳導路徑。此外，OX40mAb24誘導初代恆河猴CD4⁺ T細胞之增殖。

實例8：人類癌症之小鼠模型中OX40mAb24之活性

設計此實例以判定OX40mAb24是否可作為單一試劑療法有效治療癌症。在混合免疫功能受損之非肥胖糖尿病/重症聯合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠之同種異體反應性人類T細胞之人類癌症之異種移植模型中進行此研究。

8.1 材料

此研究中所使用之材料及其來源列於表8-1中。

表8-1 材料

項目	來源
DMEM培養基	Invitrogen, Carlsbad, CA
FBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
淋巴細胞分離培養基	VWR, West Chester, PA
PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, CA
RosetteSep CD4 ⁺ T細胞增富套組	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
RosetteSep CD8 ⁺ T細胞增富套組	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
RosetteSep DML培養基	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
絲裂黴素C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

8.2 實驗方案

8.2.1 測試動物

5至9週大的雌性NOD/SCID小鼠係自Harlan Laboratories, Inc獲得。人道處理該等動物且依機構動物照護及使用委員會批准之協定圈

養在MedImmune之實驗室動物資源設施(經實驗動物照護動物認證學會及美國農業部許可之設施)中。將動物飼養在無菌微型隔離單元中，提供無菌襯料及食物，且隨意地取用酸化飲用水。標準化環境條件(室溫：20°C +/-1°C；相對濕度：50%±10%；12小時明暗循環)。每日監測動物之不利的臨床訊息且每週監測體重。

8.2.2 異種移植之建立

源自於人類黑色素瘤細胞系之人類癌變A375細胞係自ATCC獲得。該等細胞在增濕培養箱中於37°C在5% CO₂下生長於具有10% FCS之DMEM中。接著將其收穫，用PBS洗滌一次，接著再懸浮於PBS中。

自細胞培養物收穫人類癌變A375細胞。將其再懸浮於PBS中。隨後在植入動物前將A375細胞與對A375腫瘤細胞系具有同種異體反應性之CD4⁺及CD8⁺ T細胞系混合。

為產生CD4⁺及CD8⁺ T細胞系，藉由對每20 mL全血添加1 mL RosetteSep T細胞增富產物以使來自健康供體之人類周邊血液單核細胞(PBMCs)增富CD4⁺或CD8⁺ T細胞。此後接著培育20分鐘及隨後使用RosetteSep DM-L密度介質藉由密度梯度離心分離。離心後，該等細胞用補充2%胎牛血清(FBS)之PBS洗三次且再懸浮於補充10% FBS之RPMI1640培養基中。增富之CD4⁺及CD8⁺ T細胞分別在補充重組人類介白素2(rhIL-2)之培養基中培養7至10天且各與絲裂黴素C處理之A375細胞組合。收集T細胞且再分別於補充rhIL-2之培養基中培養7至10天且與絲裂黴素C處理之A375細胞組合。收集CD4⁺及CD8⁺ T細胞且以2:1比率組合。

植入前才以6個A375細胞對1個T細胞之比率將A375細胞及增富CD4⁺及CD8⁺ T細胞之PMBCs混合。

藉由皮下(SC)注射3.5×10⁶個細胞(以1:6之效應子對靶(E:T)比率將

人類T細胞與A375細胞混合且懸浮於200 μL PBS中)至動物之右脇中來建立異種移植。

8.2.3 隨機分組、組名及劑量

在SC注射細胞前，將六隻動物隨機分配至各實驗組中。無動物替換。各實驗之組名及劑量列於表8-2、表8-3及表8-4中。在PBS中稀釋測試及對照抗體至適宜濃度且經腹膜內(IP)投與200 μL 總體積。於植入癌細胞/效應T細胞後第3天或第4天投與第一劑量之測試及對照抗體。如圖式所示及對應之圖式說明中所述，動物接受多達3個額外劑量之測試及對照抗體。觀察各動物之腫瘤形成一週1或2次。此研究中之主要終點為2000 mm^3 之腫瘤體積或肉眼可見之腫瘤壞死。

8.2.4 腫瘤測量

各實驗藉由測徑器以圖式及表中所示之時間間隔測量腫瘤且使用以下公式計算腫瘤體積(V)：

$$V(\text{mm}^3) = (\text{長度}[\text{mm}] \times \text{寬度}[\text{mm}] \times \text{寬度}[\text{mm}]) / 2。$$

對於各組，以算術平均值記錄結果。抗腫瘤效應表現為如下計算得之腫瘤生長抑制百分率(%TGI)：

$$\%TGI = (1 - [\text{治療組之平均腫瘤}V] \div [\text{對照組之平均腫瘤}V]) \times 100$$

8.3 統計方法

在經OX40mAb24治療或經9B12治療之動物與經同型對照治療之動物之間進行比較，及藉由曼-惠特尼秩和檢定(Mann-Whitney rank sum test)分析組間差異之統計顯著性。

自曼-惠特尼秩和檢定獲得之顯著p值呈現於總表及毗鄰於算術平均值及平均值標準誤差之圖式中。

8.4 結果

此研究中研究OX40mAb24於人類癌症之小鼠模型中對腫瘤生長之活性。將經同種異體反應性人類CD4⁺及CD8⁺ T細胞系混合之人類

癌細胞系植入免疫缺陷之NOD/SCID雌性動物中。CD4⁺及CD8⁺ T細胞係衍生自健康人類供體分離的PBMC。動物在植入異種移植物三或四天後接受第一劑量之該等測試及對照抗體，及如所示投與額外劑量之該等測試及對照抗體。

在三個獨立實驗中，相較於同型對照組，OX40mAb24加上同種異體反應性人類T細胞以高達85%顯著抑制A375細胞之生長(表8-2、表8-3及表8-4；圖23A、圖24A及圖25)。相較於同型對照組，對照9B12加上同種異體反應性人類T細胞亦以高達77%顯著抑制A375細胞之生長(表8-2至8-4、圖23B及圖24B)。

表8-2 A375異種移植模型中在第18天之治療組及TGI百分比
(實驗2)

組 ^a	測試抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c
1	無；無T細胞	NA	NA
2	無	NA	NA
3	同型對照	5	NA
4	OX40mAb24	5	79
5	OX40mAb24	2.5	75
6	OX40mAb24	1.0	85
7	9B12	5	53

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V=體積

^a每組的動物數量：6。

^b所有動物在第4天、第7天、第9天及第12天IP接受200 μl測試抗體。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(同型對照組之平均腫瘤V)]×100

表8-3 A375異種移植模型中在第25天之治療組及TGI百分比
(實驗1)

組 ^a	測試抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c
1	無；無T細胞	NA	NA
2	無	NA	NA
3	同型對照	5	NA
4	OX40mAb24	5	68
5	OX40mAb24	2.5	83

組 ^a	測試抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c
6	OX40mAb24	1.0	84
7	9B12	5	80

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V=體積

^a每組的動物數量：6。

^b所有動物在第4天、第7天、第9天及第12天IP接受200 μl測試抗體。

^cTGI%=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(同型對照組之平均腫瘤V)]×100

表8-4 A375異種移植模型中在第28天之治療組及TGI百分比
(實驗3)

組 ^a	測試抗體	劑量 ^b (mg/kg)	TGI% ^c
1	無；無T細胞	NA	NA
2	無	NA	NA
3	同型對照	3.0	NA
4	OX40mAb24	3.0	75
5	OX40mAb24	1.0	73
6	OX40mAb24	0.3	68
7	OX40mAb24	0.1	84
8	OX40mAb24	0.03	73

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V=體積

^an=6。

^b所有動物在第3天、第6天、第8天及第10天IP接受200 μl測試抗體。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(同型對照組之平均腫瘤V)]×100

8.5 結論

OX40mAb24證實在混合同種異體反應性人類T細胞之人類癌症之小鼠模型中之有效抗腫瘤活性。OX40mAb24之抗腫瘤活性類似於9B12之抗腫瘤活性。此等結果提供OX40mAb24可作為單一試劑療法有效治療罹患T細胞浸潤癌症之患者的證據。

實例9：大鼠/小鼠抗小鼠OX40 IgG2a嵌合抗體純系OX86抑制同基因模型中小鼠癌細胞系之生長

OX40mAb24不與小鼠(m)OX40交叉反應(參見實例2)；因此，不

可能在具有免疫活性的小鼠模型中測試其活性。OX86為特異性結合至mOX40並引起mOX40之信號傳導之大鼠抗mOX40 IgG1抗體(al-Shamkhani等人, *Eur.J. Immunol.*26:1695-1699 (1996))，及在具有免疫活性的小鼠癌症模型中具有抗腫瘤活性(Weinberg AD等人, *J. Immunol.*164:2160-2169 (2000))。為使用具有類似於OX40mAb24之功能特性之小鼠替代抗體更充分地研究OX40促效作用之效應，自OX86產生大鼠/小鼠抗mOX40 IgG2a嵌合抗體(OX86 mIgG2a；具有小鼠IgG2a恆定區之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區)。此實例評估三個小鼠癌症模型中OX86 mIgG2a之單一試劑抗腫瘤活性。

9.1 材料

此研究中所使用之材料及其來源列於表9-1中。

表9-1 材料

項目	來源
磷酸鹽緩衝鹽水，pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
胎牛血清，經熱不活化	Life Technologies, Carlsbad, CA
Roswell Park Memorial Institute 1640培養基	Life Technologies, Carlsbad, CA
0.25%胰蛋白酶-EDTA(1×)	Life Technologies, Carlsbad, CA

EDTA=乙二胺四乙酸。

9.2 實驗方案

9.2.1 測試動物

在MedImmune之Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN)接收得6至8週大的BALB/c及C57BL/6小鼠且容許在開始研究之前適應環境3天。此後，小鼠在腫瘤移植位點剃毛及植入微晶片應答器以用於識別。

該等動物依機構動物照護及使用委員會批准之協定圈養在

MedImmune之實驗室動物資源設施(經實驗動物照護動物認證學會及美國農業部許可之設施)中。將動物飼養於無菌微型隔離單元中，提供無菌襯料及食物，且隨意地取用酸化飲用水。標準化環境條件(室溫： $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；相對濕度： $50\%\pm 10\%$ ；12小時明暗循環)。每日監測動物之不利的臨床訊息且每兩週監測體重。若注意到後肢癱瘓、呼吸窘迫，20%體重損失，或大於 2000 mm^3 之腫瘤體積，則立即藉由用 CO_2 窒息將動物人道犧牲。

9.2.2 同基因腫瘤之建立及植入

CT26及4T1係自ATCC, Manassas, VA獲得。MCA205細胞係自Providence Cancer Center, Portland, OR獲得。將所有細胞培養於補充10% FBS之RPMI 1640細胞培養基中且在增濕組織培養室中於 37°C 在5% CO_2 下生長，接著將其收穫，在FBS中洗滌一次且接著再懸浮於PBS中。

藉由將懸浮於0.1 mL PBS中之 5.0×10^5 個CT26細胞或 1.0×10^5 個4T1細胞皮下(SC)注射至7至9週大的BALB/c小鼠之右脇中來建立同種異體移植，同時將懸浮於0.1 mL磷酸鹽緩衝鹽水中之 2.5×10^5 個MCA205細胞注射至7至9週大的C57BL/6小鼠之右脇中。

9.2.3 隨機分組、組名及劑量水平

此研究中使用BALB/c(總共216隻)及C57BL/6(總共70隻)雌性小鼠。在植入9天後腫瘤生長至每群 120 mm^3 或植入13天後腫瘤生長至每群 200 mm^3 之平均體積之後，隨機分配植入CT26腫瘤細胞之BALB/c小鼠。植入13天後，腫瘤生長至每群 120 mm^3 之平均體積後隨機分配植入4T1腫瘤細胞之BALB/c小鼠。植入11天後，腫瘤生長至每群 95 mm^3 之平均體積後隨機分配C57BL/6小鼠。組名、動物數量、劑量水平及劑量時間表呈現於表9-2、表9-3、表9-4及表9-5中。腹膜內(IP)注射投與所有測試抗體及對照抗體。無動物替換。

當腫瘤體積達到約2000 mm³時或當腫瘤潰瘍或壞死時犧牲各組之動物。

表9-2 研究設計：CT26同基因模型

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	10(F)	無	NA	NA	IP
2	10(F)	陰性對照 (OX86 mIgG1 D265A)	第9天、 第12天	2.5	IP
3	10(F)	OX86 mIgG2a	第9天、 第12天	2.5	IP
4	10(F)	OX86 mIgG2a	第9天、 第12天	1.0	IP
5	10(F)	OX86 mIgG2a	第9天、 第12天	0.25	IP
6	10(F)	OX86 mIgG2a	第9天、 第12天	0.1	IP

F=雌性；IgG1=免疫球蛋白G1；IP=腹膜內；mAb=單株抗體；OX86 mIgG2a=純系OX86之具有小鼠IgG2a恆定區之大鼠抗OX40輕鏈及直鏈可變區；OX86 mIgG1 D265A=在減小其與Fc γ 受體結合之能力之Fc域中具有點突變之小鼠抗小鼠OX40 mIgG1；NA=因為動物未經治療而不適用；ROA=投藥途徑。^a劑量體積：0.2 mL。

表9-3 研究設計：CT26同基因模型

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	12(F)	無	NA	NA	IP
2	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天	10	IP
3	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天	3	IP
4	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天	1	IP
5	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天	0.3	IP

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
6	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天	0.1	IP

F=雌性；IP=腹膜內；OX86 mIgG2a=純系OX86之具有小鼠IgG2a恆定區之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區；NA=因動物未經治療而不適用；ROA=投藥途徑。^a劑量體積：0.2 mL。

表9-4 研究設計：MCA205同基因模型

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	14(F)	無	NA	NA	IP
2	14(F)	同型對照 (混合物) ^b	第11天、 第14天	20	IP
3	14(F)	OX86 mIgG2a	第11天、 第14天	10	IP
4	14(F)	OX86 mIgG2a	第11天、 第14天	10	IP
5	14(F)	OX86 mIgG2a	第11天、 第14天	5	IP

F=雌性；IP=腹膜內；OX86 mIgG2a=純系OX86之具有小鼠IgG2a恆定區之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區；NA=因動物未經治療而不適用；ROA=投藥途徑。^a劑量體積：0.2 mL。^b混合物包含具有mIgG2a(10 mg/kg)及mIgG2b(10 mg/kg)之Fc域之同型對照抗體。

表9-5 研究設計：4T1同基因模型

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	12(F)	無	NA	NA	IP
2	12(F)	同型對照 (混合物) ^b	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	70	IP

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表 (研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
3	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	10	IP
4	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	5	IP
5	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	2.5	IP
6	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	1.0	IP
7	12(F)	OX86 mIgG2a	第13天、 第16天、 第20天、 第23天	0.25	IP

F=雌性；IP=腹膜內；OX86 mIgG2a=純系OX86之具有小鼠IgG2a恆定區之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區；NA=因動物未經治療而不適用；ROA=投藥途徑。^a劑量體積：0.2 mL。^b混合物包含具有mIgG2a(10 mg/kg)、mIgG2b(20 mg/kg)、大鼠IgG2a(20 mg/kg)及大鼠IgG2b(20 mg/kg)之Fc域之同型對照抗體。

9.2.4 腫瘤測量

每週藉由測徑器測量腫瘤兩次並使用以下公式計算腫瘤體積：

$$\text{腫瘤體積}(V)=[\text{長度}(\text{mm})\times\text{寬度}(\text{mm})^2]/2$$

其中長度定義為較大側而寬度為垂直於長度之較小側。

各組之抗腫瘤效應表示為如下計算得之腫瘤生長抑制(TGI)：

$$\%TGI=(1-[\text{治療組之平均}V]\div[\text{對照組之平均}V])\times 100$$

若無可測量之腫瘤，則將腫瘤生長反應歸類為完全反應(CR)。

9.3 統計方法

使用單向ANOVA以判定平均腫瘤體積差異。在顯著F檢定事件中，利用Dunnett或Sidak多重比較檢定(在適當的情況下)。在適用的情況下，將對數10轉換應用於腫瘤體積以說明異方差性。p值<0.05視為顯著。

9.4 結果

用OX86 mIgG2a治療小鼠導致CT26及MCA205腫瘤細胞之生長相較於未經治療或陰性或經同型對照抗體治療之小鼠對照顯著降低(表9-6、表9-7及表9-8；圖26A、圖27A及圖28A)。用OX86 mIgG2a治療小鼠導致4T1腫瘤細胞之生長相較於未經治療或同型對照抗體延遲並降低(表9-9及圖29A)。

混合反應通常顯示於同基因模型中；然而，用OX86 mIgG2a治療之顯著反應自個別動物腫瘤生長圖表(圖26B、圖27B、圖28B及圖29B)中更為清晰。基於TGI(表9-6、表9-7、表9-8及表9-9；圖26A、圖27A、圖28A及圖29A)或就展現完全反應之動物的數量增加(表9-6、表9-7、表9-8及表9-9)而言，在經OX86 mIgG2a治療之小鼠中未觀察到劑量反應。

表9-6 CT26同基因模型中之治療組、在第22天之腫瘤生長抑制百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試 / 對照 抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c	12隻小鼠中 完全反應者 之數量 ^d
1	無	NA	NA	0
2	OX86 mIgG2a	10	67	8
3	OX86 mIgG2a	3	67	6

組 ^a	測試 / 對照 抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c	12隻小鼠中 完全反應者 之數量 ^d
4	OX86 mIgG2a	10	75	8
5	OX86 mIgG2a	0.3	65	8
6	OX86 mIgG2a	0.1	70	8

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V體積。

^an=12。

^b所有動物在第13天及第16天IP接受200 μL測試抗體。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(對照組之平均腫瘤V)]×100。

^d在研究結束時一組中具有腫瘤體積測量之動物數量記為零。

表9-7 CT26同基因模型中之治療組、在第26天之腫瘤生長抑制百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試/對照抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c	10隻小鼠中 完全反應者 之數量 ^d
1	無	NA	NA	1
2	陰性對照 (OX86 mIgG1 D265A)	2.5	NA	1
3	OX86 mIgG2a	2.5	94	7
4	OX86 mIgG2a	1.0	97	8
5	OX86 mIgG2a	0.25	95	6
6	OX86 mIgG2a	0.1	92	7

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V體積。

^an=10。

^b所有動物在第9天及第12天IP接受200 μL測試抗體。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(對照組之平均腫瘤V)]×100。

^d在研究結束時一組中具有腫瘤體積測量之動物數量記為零。

表9-8 MCA205同基因模型中之治療組、在第22天之腫瘤生長抑制百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試 / 對照 抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c	14隻小鼠中 完全反應者 之數量 ^d
1	無	NA	NA	0
2	同型對照 (混合物)	20	NA	0
3	OX86 mIgG2a	20	65	0
4	OX86 mIgG2a	10	76	4
5	OX86 mIgG2a	5	70	2

表9-9 4T1同基因模型中之治療組、在第25天之腫瘤生長抑制百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試 / 對照 抗體	劑量 ^b (mg/kg)	%TGI ^c	12隻小鼠中 完全反應者 之數量 ^d
1	無	NA	NA	0
2	同型對照 (混合物)	70	NA	0
3	OX86 mIgG2a	10	5	0
4	OX86 mIgG2a	5	34	2
5	OX86 mIgG2a	2.5	37	0
6	OX86 mIgG2a	1.0	22	0
7	OX86 mIgG2a	0.25	ND	0

IP=腹膜內；NA=不適用；TGI=腫瘤生長抑制；V體積；ND=未測定。

^an=12。

^b所有動物在第13天、第16天、第20天及第23天IP接受200 μL測試抗體。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(對照組之平均腫瘤V)]×100。

^d在研究結束時一組中具有腫瘤體積測量之動物數量記為零。

9-5 結論

用OX86 mIgG2a單一試劑治療具有腫瘤之小鼠導致抗腫瘤活性，該抗腫瘤活性相較於未經治療、陰性對照及/或同型對照治療組顯著降低多個腫瘤之生長。

實例10：OX40mAb24之抗原決定基之表徵

此實例使用一系列人類/小鼠OX40嵌合變體檢驗OX40mAb24之抗原決定基。

10.1 此研究中所使用之材料及其來源列於表10-1中。

表10-1 材料

項目	來源
抗人類IgG-Alexa480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
抗羊IgG-Alexa-480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
抗山羊IgG-Alexa480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
FreeStyle 293F細胞(HEK293F細胞)	Invitrogen (Carlsbad, CA)
山羊抗小鼠OX40多株抗體	R&D Systems (Minneapolis, MN)
LSRII流式細胞計數法	BD Biosciences (San Jose, CA)
磷酸鹽緩衝鹽水	Invitrogen (Carlsbad, CA)
羊抗人類OX40多株抗體	R&D Systems (Minneapolis, MN)
293fectin轉染試劑	Invitrogen (Carlsbad, CA)

10.2 人類/小鼠嵌合變體之產生

OX40mAb24特異性地結合至人類OX40(SEQ ID NO:91)但不識別小鼠OX40(SEQ ID NO:92)，然而共有其胺基酸(aa)序列60%之同一性(圖30)。人類/小鼠嵌合OX40變體藉由交換人類OX40與小鼠OX40之間的胞外域部分而工程化。人類OX40及小鼠OX40之cDNA建構物作為模板用於重疊延伸PCR以建構具有用於重組蛋白質之細胞表面表現之跨膜域之嵌合變體中。OX40為具有三個完整富半胱胺酸域(CRD)及

一個截短富半胱氨酸域之約45 kDa的蛋白質。此結構具有TNFR超家族之特徵。

人類OX40之胞外域之以下殘基經對應小鼠OX40 aa或丙胺酸置換以建構十三個嵌合敲出(KO/損失功能)變體(圖31)：

- •CRD1(人類OX40 aa 29至65經小鼠對應物置換)；
- •CRD2(人類OX40 aa 66至107經小鼠對應物置換)；
- •CRD3(人類OX40 aa 108至146經小鼠對應物置換)；
- •CRD4+連接子(人類OX40 aa 147至214經小鼠對應物置換)；
- •CRD3+4(人類OX40 aa 108至167經其小鼠對應物置換)；
- •A¹¹¹(人類OX40 aa丙胺酸111經其小鼠對應物脯胺酸置換)；
- •L¹¹⁶(人類OX40 aa白胺酸116經其小鼠對應物麩醯胺酸置換)；
- •P¹²¹(人類OX40 aa脯胺酸121經其小鼠對應物白胺酸置換)；
- •A¹²⁶(人類OX40 aa丙胺酸126經其小鼠對應物纈胺酸置換)；
- •D¹³⁷(人類OX40 aa天冬胺酸137經其小鼠對應物天冬醯胺酸置換)；
- •A¹¹¹P¹²¹D¹³⁷(人類OX40 aa Ala111、Pro121及Asp137經小鼠對應物置換)；
- •L¹¹⁶A¹²⁶(人類OX40 aa Leu116及Ala126經小鼠對應物置換)；及
- •D¹¹⁷S¹¹⁸(人類OX40 aa Asp117及Ser118經Ala突變置換)。

此外，藉由使用如上針對KO建構務所述之相同方法接枝人類OX40之以下殘基至小鼠OX40中來建構五個敲入(KI/獲得功能)變體(圖31)：

- CRD3(人類OX40 aa 108至146經接枝至對應之小鼠區中)；
- A¹¹¹(人類OX40 aa丙胺酸111經接枝至對應之小鼠位置中)；
- L¹¹⁶(人類OX40 aa白胺酸116經接枝至對應之小鼠位置中)；

- A¹²⁶(人類OX40 aa丙胺酸126經接枝至對應之小鼠位置中)；
- L¹¹⁶A¹²⁶(人類OX40 aa白胺酸116及丙胺酸126經接枝至對應之小鼠位置中)。

將所得嵌合DNA閉入哺乳動物表現載體pEBNA中以用於暫態哺乳動物表現。在轉染前一天將293F細胞以 0.7×10^6 個細胞/mL之密度接種。使用5 μ L 293fectin轉染試劑依製造商說明書將3.5微克的各表現載體轉染至5 mL HEK293 F細胞中。

10.3 OX40mAb24與嵌合OX40變體之結合之表徵

轉染後四十八小時，用1 μ g/mL OX40mAb24於含在PBS中之冰上培育HEK293F細胞1小時。為藉由流式細胞計數法偵測經結合之OX40mAb24，用冷PBS洗滌細胞3次，用1 μ g/mL與Alexa480偶聯之抗人類IgG抗體於冰上培育1小時，且接著使用LSRII流式細胞計數法分析。

亦藉由流式細胞計數法監測所有嵌合OX40變體之表現水平；用羊抗人類OX40及山羊抗小鼠OX40多株抗體之混合物以1 μ g/mL含於PBS中於冰上培育細胞1小時。用冷PBS洗滌細胞3次，且接著用與Alexa480偶聯之抗山羊及抗羊IgG多株抗體之混合物培育。用冷PBS洗滌3次後，用LSRII流式細胞計數法分析細胞。

10.4 結果

使用嵌合人類/小鼠變體表徵OX40mAb24之抗原決定基。人類OX40及小鼠OX40在aa序列上共有60%之同一性(圖30)；然而，OX40mAb24特異性地結合至人類OX40但不識別小鼠OX40。利用此特異性以識別OX40mAb24之抗原決定基。藉由換出小鼠OX40胞外域之各種域至人類OX40中(KO/損失功能之變體)或換入人類OX40胞外域之各種域至小鼠OX40中(KI/獲得功能之變體)來建構十八個嵌合變體(圖31)。所有變體編碼跨膜域以用於嵌合蛋白質之細胞表面表現。藉

由流式細胞計數法分析OX40mAb24與此等變體結合之特徵。

藉由在人類及小鼠OX40之間交換個別域將OX40mAb24之抗原決定基安置至人類OX40之CRD3域中。當在人類CRD3域經小鼠對應物置換(KO_CRD3及KO_CRD3-4)時，OX40mAb24與人類OX40之結合消除(圖32A-C)。其他人類CRD域經小鼠區置換不影響OX40mAb24(KO_CRD1、KO_CRD2及KO_CRD4+連接子)之結合。另外，接枝人類CRD3域至小鼠OX40中導致OX40mAb24之結合(KI_CRD3)。所有變體如藉由抗-人類及小鼠OX40多株抗體所監測表現(圖32A-C)。亦在結合研究中表徵OX40mAb24之親代mAb(9B12)。9B12顯示此等變體與OX40mAb24之相同結合性質，表明兩IgG識別CRD3域之相同抗原決定基。

另外，藉由突變人類及小鼠OX40間不同之胺基酸來識別CRD3域中之關鍵抗原決定基殘基Leu¹¹⁶及Ala¹²⁶。人類CRD3域中之五個胺基酸(包括Ala¹¹¹、Leu¹¹⁶、Pro¹²¹、Ala¹²⁶及Asp¹³⁷)(圖30)經突變為呈個別胺基酸或不同組合之對應之小鼠殘基或Ala(圖31)。當人類殘基Leu¹¹⁶及Ala¹²⁶經小鼠對應物(KO_L¹¹⁶+A¹²⁶)置換時，OX40mAb24之結合消除。另外，KI/獲得功能之變體證實此兩關鍵殘基之重要性。接枝Leu¹¹⁶、Ala¹²⁶或其組合至小鼠OX40中導致OX40mAb24之結合。

10.5 結論

使用具有關鍵殘基Leu¹¹⁶及Ala¹²⁶之人類/小鼠嵌合變體將OX40mAb24之抗原決定基安置至人類OX40之CRD3域中。OX40mAb24及其親代9B12之間之所有變體之結合性質相同，指示其識別人類OX40上之相同抗原決定基。

實例11：未經治療之小鼠及具有同基因腫瘤之小鼠中大鼠/小鼠抗小鼠OX40 IgG2a嵌合抗體純系OX86之藥效動力學活性

OX86為特異性結合並引起MOX40之信號傳導之大鼠抗mOX40

IgG1 抗體(al-Shamkhani等人, 1996), 且在具有免疫活性之小鼠癌症模型中具有抗腫瘤活性(Weinberg等人, 2000)。為使用具有類似於 OX40mAb24之功能性之小鼠替代抗體更充分地研究OX40促效作用之效應, 此實例使用實例9中所述之大鼠/小鼠抗mOX40 IgG2a嵌合抗體 OX86。然而, 物種間可取得一些類似性, 例如, mIgG2a及人類IgG1 通常視為在功能上等效, 因為兩種同型物可結合多個Fc γ 受體, 可具有高親和力Fc γ 受體結合且可引起ADCC並結合至人類C1q, 為傳統的補體路徑之補體依賴性細胞毒性(CDC)之先決條件(Stewart等人 2014; Dall'Acqua等人, 2006)。OX86 mIgG2a結合至人類OX40(參見實例9)且用作OX40mAb24之替代小鼠OX40促效抗體。

在此實例中, OX86 mIgG2a具有誘導未經治療及具有腫瘤之小鼠中之T細胞且進入細胞週期及增殖之能力。另外, 研究評估K167及ICOS作OX40促效劑活性之潛在生物標誌。測定兩個同基因小鼠癌症模型中之T細胞增殖及抗腫瘤活性。除此之外, 最終, 判定活化性(Fc γ 受體I、III及IV)及/或抑制性(Cf γ 受體IIb) Fc γ 受體對OX86 mIgG2a之活體內活性所起的作用。

11.1 材料及方法

11.1.1 動物之接收及識別

在MedImmune之Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN或Charles River Laboratories (UK))接收6至8週大的野生型Fcgr2b^{-/-}或Fcer1g^{-/-} BALB /c及Fcgr2b^{-/-}或Fcer1g^{-/-} C57BL/6小鼠且容許在開始研究之前適應環境 \leq 15天。此後, 小鼠植入微晶片應答器以識別個別小鼠。

11.1.2 圈養

人道處理該等動物且依機構動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)(USA)及內政部(Home Office)(UK)批

准之協定圈養在 MedImmune 之實驗室動物資源設施 (Laboratory Animal Resources facility)(USA)及生物科學單位(Biological Sciences Unit)(UK)(經實驗動物照護動物認證學會 (Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care)及美國農業部(United States Department of Agriculture)許可之設施)中。將動物飼養在無菌微型隔離單元中，提供無菌襯料及食物，且隨意地取用經酸化之飲用水 (USA)或自來水(UK)。標準化環境條件(室溫：20°C±1°C (USA)或21°C±1°C (UK)；相對濕度：50%±10%(USA)或55±10%(UK)；12小時明暗循環)。每日監測動物之不利的臨床訊息並每兩週監測體重。若注意到後肢癱瘓、呼吸窘迫，20%體重損失，或大於2000 mm³之腫瘤體積，則立即藉由頸椎脫臼法或用CO₂窒息將動物人道犧牲。

11.1.3 同基因腫瘤之建立

CT26細胞系(小鼠結腸癌)係從ATCC, Manassas, VA獲得，及細胞系MCA 205(化學誘發性小鼠軟組織肉瘤)係從Providence Cancer Center, Portland, OR獲得。將兩種細胞系維持在37°C、5% CO₂下之RPMI 1640培養基+10% FBS中。

藉由將再懸浮於0.1 mL PBS中之5.0×10⁵個CT26細胞皮下(SC)注射於7至9週大野生型Fcgr2b^{-/-}或Fcer1g^{-/-} BALB/c小鼠之右脇中來建立同種異體移植。亦藉由將再懸浮於0.1 mL PBS中之2.5×10⁵個MCA205細胞SC注射於7至9週大野生型Fcgr2b^{-/-}或Fcer1g^{-/-} C57BL/6小鼠之右脇中來建立同種異體移植。

11.1.4 隨機分組、組名及劑量水平

此研究中使用野生型(n=70)、Fcgr2b^{-/-}(n=36)或Fcer1g^{-/-}(n=36) BALB/c及Fcgr2b^{-/-}(n=36)或Fcer1g^{-/-} C57BL/6雌性小鼠(n=36)。將所有小鼠隨機分配至治療組中。組名、動物數量、劑量水平及劑量時間表呈現於表11-1、表11-2及表11-3中。經腹膜內投與(IP)所有測試物及對

照物。無動物替換。

當腫瘤體積達到約2000 mm³時或當腫瘤潰瘍或壞死時將各組之動物犧牲。

表11-1 未經治療之Balb/c小鼠之組名及劑量水平

組	動物數量 (M/F)	治療	劑量時間 表(研究天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1、9	7(F)、7(F)	鹽水	1	NA	IP
3、11	7(F)、7(F)	同型對照 (NIP228 IgG2a)	1	20	IP
4、12	7(F)	OX86 mIgG2a	1	20	IP
5、13	7(F)、7(F)	OX86 mIgG2a	1	2	IP
6、14	7(F)、7(F)	OX86 mIgG2a	1	0.2	IP

F=雌性；M=雄性；NA=不適用；IP=腹膜內；ROA=投藥途徑；
OX86 mIgG2a=OX86之小鼠抗小鼠OX40 IgG2a單株抗體變體

^a劑量體積：鹽水或調整至體重之體積為0.2 mL；所有其他組為10 mL/kg。

表11-2 CT26同基因模型中之組名及劑量水平

組	動物數量 (M/F)	小鼠品 系	治療	劑量時間 表(研究 天)	劑量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	8(F)	Balb/c Fcgr2b ^{-/-}	無	NA	NA	IP
2	8(F)		對照(OX86 mIgG1 D265A)	第4天、 第7天	2.5	IP
3	8(F)		OX86 mIgG2a	第4天、 第7天	2.5	IP
4	8(F)	Balb/c Fcer1g ^{-/-}	無	NA	NA	IP
5	8(F)		對照(OX86 mIgG1 D265A)	第4天、 第7天	2.5	IP
6	8(F)		OX86 mIgG2a	第4天、 第7天	2.5	IP

F=雌性；M=雄性；NA=因動物未經治療而不適用；IP=腹膜內；ROA=投藥途徑；OX86 mIgG2a=具有小鼠IgG2a恆定區之純系OX86之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區。

^a劑量體積：0.2 mL。

表11-3 MCA205同基因模型之組名及劑量水平

組	動物數量(M/F)	小鼠品系	治療	劑量時間表(研究天)	劑量水平(mg/kg) ^a	ROA
1	8(F)	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	無	NA	NA	IP
2	8(F)		對照 (OX86 mIgG1 D265A)	第4天、 第7天	7.5	IP
3	8(F)		OX86 mIgG2a	第4天、 第7天	7.5	IP
4	8(F)	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	無	NA	NA	IP
5	8(F)		對照 (OX86 mIgG1 D265A)	第4天、 第7天	7.5	IP
6	8(F)		OX86 mIgG2a	第4天、 第7天	7.5	IP

F=雌性；M=雄性；NA=因動物未經治療而不適用；IP=腹膜內；ROA=投藥途徑；OX86 mIgG2a=具有小鼠IgG2a恆定區之純系OX86之大鼠抗OX40輕鏈及重鏈可變區。

^a劑量體積：0.2 mL。

11.1.5 腫瘤測量

每週兩次藉由測徑器測量腫瘤並使用以下公式計算腫瘤體積：

$$\text{腫瘤體積} = [\text{長度(mm)} \times \text{寬度(mm)}^2] / 2$$

其中長度定義為較大側及寬度為垂直於長度之較小側。

各組之抗腫瘤效應表示為如下計算之腫瘤生長抑制(TGI)：

$$\%TGI = (1 - [\text{治療組之平均腫瘤V}] \div [\text{對照組之平均腫瘤V}]) \times 100$$

11.1.6 組織收集及單細胞分離

11.1.6.1 準備小鼠血液細胞以用於流式細胞分析

將紅血球細胞溶胞(RBCL)緩衝液(2 mL)添加至血液(50 μ L)且培育5分鐘。自一生出血獲得之體積在20 μ L至50 μ L範圍。末梢出血為50 μ L。將RPMI+10%胎牛血清(FBS)(8 mL)添加至各樣品。使各樣品中之細胞沉澱成團粒(300 \times g, 5分鐘)且接著再懸浮於0.3 mL Flow Buffer中。將細胞懸浮液(200 μ L)添加至96孔圓底板之各孔以用螢光抗體染色。使用組併在一起之組樣品以用於未染色、單一抗體染色、同型染色及螢光減一(fluorescence-minus-one)(FMO)抗體染色對照。

11.1.6.2 小鼠引流淋巴結及脾臟之分離及用於流式細胞分析之單細胞懸浮液之產生

將脾臟置於10 mL RPMI+1X Pen/Strep溶液中且通過40 μ m細胞過濾器。使樣品沉澱成團粒(300 \times g, 5分鐘)且接著再懸浮於1 mL RBCL緩衝液中3分鐘。將RPMI+FBS 10%(9 mL)添加至各樣品。使細胞懸浮液沉澱成團粒(300 \times g, 5分鐘)且再懸浮於1 mL Flow Buffer中。將細胞懸浮液(100 μ L)添加至96孔圓底板之各孔以用螢光抗體染色。使用組併在一起之組樣品以用於未染色、單一抗體染色、同型染色及FMO抗體染色對照。

11.1.6.3 製備小鼠腫瘤之單細胞懸浮液以用於流式細胞分析

從實施安樂死的小鼠無菌切除腫瘤，當心避免收集到結締組織或皮膚，且置於6孔培養皿之經漢克氏平衡鹽溶液稀釋之膠原酶中。為提高酶促消化過程之效率，用一解剖刀或一把小的尖銳剪刀將各腫瘤分成小塊。經分成小塊之腫瘤轉移至15 mL圓錐形管中且置於搖動平臺上以在37 $^{\circ}$ C培育20至30分鐘。將5 mL RPMI+10% FBS添加至各樣品以使膠原酶失去活性並維持免疫細胞之存活力。使樣品通過70 μ M細胞過濾器且將其置於50 mL圓錐形管中。移除等分試樣之各樣品以進行計數。在離心機中以330 \times g使剩餘量之樣品沉澱成團粒且以 1×10^7 個細胞/mL之濃度再懸浮於FACS緩衝液(PBS+2% FBS)中。

11.1.7 流式細胞分析

11.1.7.1 對來自不具有腫瘤之小鼠之組織的分析

使(300× g, 5分鐘)血液或脾臟細胞之單細胞懸浮液沉澱成團粒，再懸浮於50 μL Fc Block溶液(1:50)中，在eBiosciences Flow Buffer中稀釋且在冰上培育10分鐘。將50微升螢光標記之抗體(2×原液)添加至各樣品(最終體積100 μL)。以1 μL/孔添加單一抗體染色溶液(胞外)且在冰上培育該等細胞/抗體混合物30分鐘。使(300× g, 5分鐘)細胞沉澱成團粒，洗滌兩次(200 μL Flow Buffer/孔, 300× g, 5分鐘)，再懸浮於50 μL Fix/Penn緩衝液(一份濃縮液對三份稀釋劑)中且接著在4°C於黑暗中培育過夜。

在1×通透化緩衝液(已稀釋於水中)中洗滌經處理之細胞兩次。將胞內標記抗體稀釋至通透化緩衝液(100 μL/孔)中且添加至該等細胞，接著在室溫於黑暗中培育30分鐘。以1 μL/孔至100 μL通透化緩衝液中將用於單一標誌物染色(胞內)之抗體添加至細胞且在冰上於黑暗中培育30分鐘。在通透化緩衝液中洗滌該等細胞一次且在Canto II流式細胞計數法(BD Biosciences, San Jose, CA)上分析前將其再懸浮於3.7%甲醛溶液(100 μL)中。

11.1.7.2 對來自具有腫瘤之小鼠之組織的分析

11.1.7.2.1 細胞表面染色

將沉澱成團粒之細胞之各樣品再懸浮於FACS緩衝液中。將含在FACS緩衝液中之螢光抗體混合物添加至適宜之孔且在4°C於黑暗中培育20至30分鐘。用FACS緩衝液洗滌細胞兩次，再懸浮於FACS緩衝液中且在LSRII流式細胞計數法(BD Biosciences, San Jose, CA)上分析。

11.1.7.2.2 胞內染色(經固定且通透化之細胞)

將沉澱成團粒之細胞之各樣品再懸浮液於50 μL用於活/非活細胞區分之可螢光固定之藍色染料之1:500稀釋液中，且在4°C於黑暗中培

育15分鐘。用FACS緩衝液洗滌細胞一次，再懸浮於30 μ L包含Fc Block之PBS+4%正常小鼠血清中，且在室溫培育15分鐘。將含在FACS緩衝液中之螢光抗體混合物添加至適宜之孔中，且在4°C於黑暗中培育20至30分鐘。用FACS緩衝液洗滌細胞兩次，再懸浮於150 μ L新鮮製備之FoxP3 Fix/Penn工作溶液中且在室溫於黑暗中培育30分鐘。用1 \times 通透化緩衝液洗滌細胞兩次，再懸浮於100 μ L包含抗體之1 \times 通透化緩衝液中以染色胞內抗原，且在室溫於黑暗中培育30分鐘。用1 \times 通透化緩衝液洗滌細胞一次，再懸浮於FACS緩衝液中且在LSRII流式細胞計數法上分析。

11.1.8 統計方法

使用單向ANOVA以判定平均腫瘤體積差異及Ki67+或ICOS+細胞之平均百分率。在顯著F檢定事件中，利用Dunnnett或Sidak多重比較檢定(在適當的情況下)。在適用的情況下，將對數10轉換應用於平均值以說明異方差性。p值<0.05視為顯著。使用GraphPad Prism 6.0以用於線性回歸分析，此產生最佳自X、線之統計顯著水平及所確定最佳擬合線之擬合優度(r^2)預測Y之最佳擬合線。

11.1.9 材料

此研究中所使用之材料及其來源列於表11-4及表11-5中。

表11-4 材料

項目	來源
0.25%胰蛋白酶-EDTA(1 \times)	Life Technologies, Carlsbad, CA
10 \times 通透化緩衝液	eBioscience, UK
3.7%甲醛溶液	Sigma-Aldrich, UK
40及70 μ m細胞過濾器	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA
3型膠原酶	Worthington Biochem Corp., Lakewood, NJ
Fc Block	eBioscience, UK
胎牛血清，經熱不活化	Life Technologies, Carlsbad, CA

項目	來源
固定/通透化濃縮液	eBioscience, UK
固定/通透化稀釋劑	eBioscience, UK
Flow Buffer	eBioscience, UK
FoxP3 Fix/Perm套組	eBioscience, UK
漢克氏緩衝鹽溶液	Life Technologies USA
用於RBCL緩衝液中和之熱不活化經 γ 輻射之FBS	SASC Biosciences, KS, USA
LSRII及Canto II流式細胞計數法	BD Biosciences, San Jose, CA
正常小鼠血清	Jackson Labs, Bar harbor, MA
Pen/Strep溶液	Life Technologies UK
通透化緩衝液	eBiosciences, USA
磷酸鹽緩衝鹽水, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
紅血球細胞溶胞緩衝液	Sigma, UK
Roswell Park Memorial Institute 1640培養基	Life Technologies, Carlsbad, CA

表11-5 用於流式細胞測量研究之螢光抗體

項目	來源
與APC偶聯之大鼠IgG2a抗CD4	eBiosciences, UK
與FITC偶聯之mIgG2a抗MHC2	eBiosciences USA
與APC-H7偶聯之大鼠IgG2a抗CD8	BD Biosciences, UK
與EFluor 480偶聯之大鼠IgG2a抗Ki67	eBioscience, UK
與APC偶聯之同型對照大鼠IgG2a	eBioscience, UK
與APC-H7偶聯之同型對照大鼠IgGa	BD Biosciences, UK
與eFluor偶聯之同型對照大鼠IgG2a	eBioscience, UK
與PE偶聯之同型對照大鼠IgG2b	eBioscience, UK
與PECy7偶聯之rlgG2a Ki67	eBioscience, USA
與BV605偶聯之rlgG2a抗CD4	Biolegend USA
與BV711偶聯之rlgG2a抗CD8	Biolegend USA
可固定藍	Life Technologies, USA
與PeCy7偶聯之同型對照rlgG2a	Biolegend USA

11.2 結果

用抗OX40抗體OX86小鼠IgG2a(OX86 mIgG2a)腹膜內治療未經治療的小鼠導致相較於經對照物治療之小鼠而言血液中Ki67+CD4+及ICOS+CD4+ T細胞之百分率隨時間而顯著、劑量依賴性且暫態性地增

加(圖33A及C)。在第10天偵測到Ki67+CD4+及ICOS+CD4+ T細胞之最大百分率。相較於經對照物治療之小鼠，在第10天於小鼠之脾臟中於投與OX86 mIgG2a後測得Ki67+CD4+及ICOS+CD4+ T細胞之百分率顯著增加(圖33B及D)。判定第10天之血液及脾臟中Ki67+CD4+ T細胞及ICOS+CD4+ T細胞之百分率間之統計顯著性及強力相關性(圖34A及34B)。

未接受OX86 mIgG2a治療之小鼠之治療亦導致相較於經對照物治療之小鼠而言血液中Ki67+CD8+ T細胞之百分率隨時間顯著暫態性地增加(圖35A)。在OX86 mIgG2a之治療後偵測到血液中ICOS+CD8+ T細胞之百分率隨時間而增加(圖35C)，及第10天脾臟中Ki67+CD8+ T細胞之百分率增加(圖35B)，但相較於對照物之治療無統計顯著性。未接受OX86 mIgG2a治療之小鼠之治療不誘導相較於經對照物治療之小鼠而言第10天脾臟中ICOS+CD8+ T細胞之百分率顯著、劑量依賴性地增加(圖35D)。判定血液及脾臟中Ki67+CD8+ T細胞及ICOS+CD8+ T細胞之百分率之間之中等但顯著之關聯性(圖36A及36B)。

用OX86 mIgG2a單一試劑治療具有腫瘤之野生型小鼠導致抗腫瘤活性，如相較於未經治療及經同型對照治療組，其降低兩種具有組織學差異之腫瘤之生長(參見實例9)。相較於在經基因改造以缺少抑制性Fc γ 受體IIB之表現之C57BL/6小鼠(Fcgr2b^{-/-}小鼠)中用對照物治療，用OX86 mIgG2a治療導致顯著地降低第20天之MCA205腫瘤之生長(圖38A、表11-7)。具有CT26腫瘤之小鼠之相同治療導致降低腫瘤生長，相較於在Fcgr2b^{-/-}BALB/c小鼠中用對照物治療，其在第18天不達到統計顯著性(圖37A、表11-6)。在經基因改造以缺少活化性Fc γ 受體之表現之具有腫瘤之Balb/c及C57BL/6小鼠(Fcer1g^{-/-}小鼠；圖37C；圖38C)中未觀測到藉由任何藥劑抑制生長。通常在同基因模型中觀測到混合反應。然而，Fc γ 受體敲出小鼠之兩個不同品系中用OX86 mIgG2a治

療後之抗腫瘤反應亦可自個別動物腫瘤生長圖表(圖37B及D；圖38B及D)看出；用OX86 mIgG2a治療導致CT26及MCA205腫瘤生長之抑制及在一些情況中誘導Fcgr2b^{-/-}小鼠中之完全反應(圖37B；圖38B)。

表11-6 CT26同基因小鼠模型中之治療組及TGI百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試/對照物	劑量 ^b (mg/kg)	小鼠品系	%TGI ^c	8隻小鼠中完全反應者之數量 ^d
1	無	NA	Balb/c Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	同型對照	2.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		15	0
4	無	NA	Balb/c Fcer1g ^{-/-}	NA	0
5	同型對照	2.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		<0	0

TGI=腫瘤生長抑制；NA=不適用；IP=腹膜內；V=體積

^a每組的動物數量：8。

^b所有動物在第4天及第7天IP接受200 μL測試物。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(對照組之平均腫瘤V)]×100；
Fcgr2b^{-/-}小鼠在第18天及Fcer1g^{-/-}小鼠在第16天計算得。

^d在研究結束時一組中具有腫瘤體積測量之動物數量記為零。

表11-7 MCA205同基因模型中之治療組及第20天之TGI百分比及完全反應者之數量

組 ^a	測試/對照物	劑量 ^b (mg/kg)	小鼠品系	%TGI ^c	8隻小鼠中完全反應者之數量 ^d
1	無	NA	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	同型對照	7.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		95	8
4	無	NA	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	NA	0
5	同型對照	7.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		35	1

TGI=腫瘤生長抑制；NA=不適用；IP=腹膜內；V=體積

^a每組的動物數量：8。

^b所有動物在第4天及第7天IP接受200 μ L測試物。

^c%TGI=[1-(治療組之平均腫瘤V)÷(對照組之平均腫瘤V)] \times 100

^d在研究結束時一組中具有腫瘤體積測量之動物數量記為零。

在類似的藥效動力學研究中，相較於對照物，用OX86 mIgG2a治療引起具有CT26腫瘤之Fcgr2b^{-/-} Balb/c小鼠之脾臟中Ki67+CD4+ T細胞之百分率(圖39A)及周邊血液及脾臟但非腫瘤(圖40A)中Ki67+CD8+ T細胞之百分率顯著增加。如相較於對照物(圖39B；圖40B)，具有CT26腫瘤之Fcer1g^{-/-}Balb/c小鼠之血液、脾臟或腫瘤中在用OX86 mIgG2a治療後未觀測到Ki67+CD4+或CD8+ T細胞之增加。

● 另外，在類似的研究中，相較於對照物，用OX86 mIgG2a治療導致具有MCA205腫瘤之Fcgr2b^{-/-} C57BL/6小鼠之引流淋巴結、脾臟及腫瘤中Ki67+CD4+ T細胞之百分率(圖41A)及引流淋巴結及脾臟中Ki67+CD8+ T細胞之百分率(圖42A)顯著增加。具有MCA205腫瘤之Fcgr2b^{-/-} C57BL/6小鼠之腫瘤中Ki67+CD8+ T細胞之百分率之增加無統計顯著性(圖42A)。相較於對照物，用OX86 mIgG2a治療亦誘導具有MCA205腫瘤之Fcer1g^{-/-} C57BL/6小鼠之引流淋巴結及脾臟中Ki67+CD4+ T細胞之百分率顯著增加(圖41B)。亦觀測到此等小鼠之脾臟中Ki67+CD8+ T細胞之百分率之顯著增加(圖42B)。未觀測到具有MCA205腫瘤之Fcgr2b^{-/-} C57BL/6小鼠之腫瘤中Ki67+CD4+ T細胞之百分率(圖42B)或引流淋巴結或腫瘤中Ki67+CD8+ T細胞之百分率(圖42B)顯著增加。

11.3 結論

未經治療的小鼠中單一劑量之OX86 mIgG2a誘導T細胞活化及增殖之暫態性增加，如分別藉由ICOS及Ki67之表現之增加測量。發現CD4+及CD8+ T細胞上ICOS及Ki67之百分率之顯著線性關聯性。OX86 mIgG2a之抗腫瘤活性經測定為CT26及MCA205腫瘤之生長之抑

制，取決於活化性Fc γ 受體I、III及IV但非抑制性Fc γ 受體IIB之表現而定。在類似的藥效動力學實驗中於表現活化性Fc γ 受體之具有腫瘤之小鼠中觀測到周邊血液、引流淋巴結及/或脾臟T細胞增殖(Ki67)之增加；在僅表現抑制性Fc γ 受體之小鼠中觀測到部分T細胞增殖。結合未經治療的小鼠之藥效動力學結果但不希望受理論限制地，OX86 mIgG2a抗腫瘤活性之潛在機制為增加之周邊及腫瘤內T細胞增殖(Ki67)。除此之外，OX86 mIgG2a活體內抗腫瘤活性在活化性Fc γ 受體之表現後產生。

實例 12：接枝人類造血幹細胞之免疫功能受損之小鼠中對 OX40mAb24療法反應之T細胞藥效動力學變化

此實例研究OX40mAb24是否可活化且擴增人類CD4⁺及CD8⁺記憶T細胞或減少具有重組人類免疫系統之免疫功能受損之小鼠中之人類Treg。在經重組具有人類免疫細胞之活體內小鼠模型系統中測試OX40mAb24以判定藥物是否對人類T細胞具有免疫調節效應。

12.1 材料及方法

12.1.1 測試動物

Nod.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1^{Wy}}/SzJ(NSG)小鼠(n=14隻，23至26週大)係從Jackson Laboratory獲得。人道處理該等動物且依機構動物照護及使用委員會批准之協定圈養在MedImmune之實驗室動物資源設施(經實驗動物照護動物認證學會及美國農業部許可之設施)中。將動物飼養於無菌微型隔離單元中，提供無菌襯料及食物，且隨意地取用酸化飲用水。標準化環境條件(室溫：20°C \pm 1°C；相對濕度：50% \pm 10%；12小時明暗循環)。研究過程中每日監測動物之不利的臨床訊息。

12.1.2 HSC接枝(人類化)小鼠中OX40mAb24之藥效動力學

12.1.2.1 人類HSC接枝小鼠之建立

人類CD34⁺ HSC接枝小鼠係自Jackson Laboratory購買得到。如

下產生小鼠：分離多個臍帶血供體之組併在一起之人類CD34+細胞且經靜脈內注射至Nod.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Wj}/SzJ(NSG)小鼠之尾靜脈。接枝1後2週，採集小鼠周邊血液樣品及用Pharm Lyse紅血球細胞溶胞緩衝液裂解且接著藉由流式細胞計數法分析人類CD45、CD19及CD3陽性細胞以判定小鼠中人類免疫細胞接枝之程度。隨後，將成功接枝總活血液細胞之25%或更多CD45+人類免疫細胞之小鼠運送至MedImmune。

12.1.2.2 人類HSC接枝小鼠之抗原攻毒及OX40mAb24治療

在注射人類CD34細胞22週後藉由流式細胞分析證實持續接枝人類免疫細胞至NSG小鼠中，及在23週將小鼠安置在未經治療或接受治療之3個組中(表12-1)。開始實驗前22週最終治療組之間之人類CD45+細胞接枝之平均百分率無統計顯著差異。組1由4隻小鼠組成且不接受皮下(SC)匙孔血藍蛋白(KLH)免疫接種或抗體投與。組2由5隻小鼠組成且在兩個獨立注射SC位點接受300 µg/50 µL KLH及50 µL完全佛氏佐劑(CFA)。該組小鼠亦在KLH免疫接種後一天接受2 mg/kg hIgG1同型對照抗體，腹膜內(IP)投與。組3由5隻小鼠組成且接受如上所述之KLH/CFA SC免疫接種。此外，小鼠亦在一天後投與單一IP劑量之2 mg/kg OX40mAb24。在KLH/CFA SC免疫接種當天，於免疫接種之前(治療前)及數天後(治療後)，透過眼窩採血獲得全血及免疫表型細胞且藉由流式細胞計數法計數。

表12-1 實驗組、人類CD45+細胞移植及治療

組	小鼠數量	人類CD45+細胞 佔總活人類加上 小鼠CD45細胞之 百分率 ^a -HSC移植 後22週	治療 ^b -HSC移植後 23週
1	1-1 4575	39.5	無
1	1-2 4576	68.3	無
1	1-3 4577	20.9	無
1	1-4 4578	23.8	無
2	2-1 4579	29.6	KLH免疫接種 +NIP228 huIgG1
2	2-2 4580	21.7	KLH免疫接種 +NIP228 huIgG1
2	2-3 4581	27.8	KLH免疫接種 +NIP228 huIgG1
2	2-4 4582	50.3	KLH免疫接種 +NIP228 huIgG1
2	2-5 4583	32.5	KLH免疫接種 +NIP228 huIgG1
3	3-1 4584	15.4	KLH免疫接種 +OX40mAb24
3	3-2 4585	44.3	KLH免疫接種 +OX40mAb24
3	3-3 4586	20.3	KLH免疫接種 +OX40mAb24
3	3-4 4587	16.3	KLH免疫接種 +OX40mAb24
3	3-5 4588	25.6	KLH免疫接種 +OX40mAb24

Hu=人類；KLH=匙孔血藍蛋白；HSC=造血幹細胞。

^a藉由流式細胞計數法判定之人類CD45+細胞；^bKLH免疫接種，匙孔血藍蛋白加上完全佛氏佐劑。

12.1.2.3 流式細胞計數法之免疫細胞分析

藉由流式細胞計數法使用全血抗體結合方案免疫表型細胞。簡言之，將恆定體積之EDTA抗凝固之全血添加至深孔板之孔及將T細胞染色預混液(master mix)添加至細胞以與細胞表面抗原結合。FACS緩

衝液(PBS, pH 7.2加上2%經熱不活化之新生胎牛血清)中洗滌之後，使用1× RBC溶胞緩衝液裂解紅血球細胞(RBC)，且使用EBiosciences固定及通透化套組依製造商方案固定細胞並通透化。隨後，使抗FoxP3及抗Ki67 mAb結合至細胞。使用1×固定及通透化緩衝液洗滌細胞，再懸浮於FACS緩衝液中且使用LSRII流式細胞計數法分析事件。使用FlowJo軟體分析原始流式細胞分析標準物(FCS)數據，及在區分活/死細胞後識別細胞群體並移除雙聯體(doublers)及細胞碎片。在CD4+及CD8+ T細胞群體之圈圍後，藉由CD45RA及CCR7表現性質判定記憶T細胞，天然T細胞定義為CD45RA+/CCR7+，效應T細胞(Teff)定義為CD45RA+/CCR7-，效應子記憶T細胞(Tem)定義為CD45RA-/CCR7-，及中樞記憶T細胞(Tcm)定義為CD45RA-/CCR7+。Treg定義為CD4+/FoxP3+細胞。

12.1.2.4 統計方法

使用Windows之GraphPad Prism軟體(第6.03版)以用於數據之圖表製作及統計分析。

使用單向ANOVA多重比較檢定及Turkey事後檢定分析以比較實驗組方法之間之差異。在顯著F檢定事件中，利用Sidak多重比較檢定。p值小於0.05視為顯著。

12.1.3 材料

此研究中所使用之材料及其來源列於表12-2中。

表12-2 材料

項目	來源
抗人類CCR7 APC純系150503	R&D Systems, Minneapolis, MN
抗人類CD14 APC純系M5E2	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD16 PE純系1243	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD25 FITC純系M-A251	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD3 FITC純系UCHT1	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD4 BV605純系RPA-T4	Becton Dickinson, San Jose, CA

項目	來源
抗人類CD56 FITC純系HCD56	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD8 PE-CF594純系RPA-T8	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗人類CD19 APC純系HIB19	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD19 PE-CF594純系HIB19	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗人類CD45 PE純系HI30	Biolegend, San Diego, CA
抗人類CD45 PE純系HI30	Biolegend, San Diego, CA
抗人類FoxP3 PE純系PHC101	eBioscience, San Diego, CA
抗人類HLA-DR BV421純系3G8	Biolegend, San Diego, CA
抗人類Ki67 FITC純系B56	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗小鼠CD16/32 PE-Cy7	Biolegend, San Diego, CA
抗小鼠CD45 PE-Cy7純系30F11	Biolegend, San Diego, CA
完全佛氏佐劑(CFA) Difco™	Becton Dickinson, San Jose, CA
EBiosciences固定及Perm套組	EBioscience, San Diego, CA
FlowJo軟體	FlowJo, Ashland, OR
FoxP3/轉錄因子固定/通透濃縮液及稀釋劑	eBioscience, San Diego, CA
Graphpad Prism軟體，第6.03版	Graphpad Software, San Diego, CA
經熱不活之新生胎牛血清	Life Technologies, Frederick, MD
匙孔血藍蛋白	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
活/死®可固定藍色染料	Life Technologies, Frederick, MD
LSR II流式細胞計數法	BD Biosciences, San Jose, CA
小鼠IgG2a APC同型對照	eBioscience, San Diego, CA
小鼠IgG2b BV421同型對照	Biolegend, San Diego, CA
小鼠IgG1 FITC同型對照	Biolegend, San Diego, CA
磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，pH 7.2	Life Technologies, Frederick, MD
大鼠IgG1 PE-CF594同型對照	Becton Dickinson, San Jose, CA
大鼠IgG2a PE同型對照	eBioscience, San Diego, CA
大鼠IgG2a PE-Cy7同型對照	Biolegend, San Diego, CA

12.2 結果

在用KLH免疫接種後一天，投與OX40mAb24或huIgG1對照抗體。OX40mAb24導致六天後周邊血液中Treg之百分率相對投與

【序列表】

<110> 美商麥迪紐有限責任公司

<120> 人類化抗-OX40 抗體及其用途

<130> OX40H-100TW1

<140>

<141>

<150> 62/062,431

<151> 2014-10-10

<160> 98

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asp Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 8
Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln 或 Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Trp 或 Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Ile 或 Met

<400> 9
 Trp Ile Arg Xaa His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Xaa Xaa Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 10
 Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 11
 Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12
 Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 13

Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 14

Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 15

Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Pro 或 Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Phe 或 Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Tyr 或 Phe

<400> 17

Arg Ile Thr Ile Asn Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 18

Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 19

Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 20

Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 21
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 21
 Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 22
 Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 23
 Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 24

Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 25

Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 26

Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Ala Gly His Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 27

Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 28

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 29

<211> 107

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 29
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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His 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 Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 30
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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His 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 Gly Ser Ala Leu Pro Trp

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 31

gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcaagc tgcacagcgg cgtgccccagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacacctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctccgccc tggcctggac ctttgccag 300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 32
 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 Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Arg 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 Gly Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 33
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 33
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 34
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggcagcac 120
cccggcaagg gcttggaatg gatcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cccgacacca gcaagaacca gttctccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccaacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 35
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 363
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 36
cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tglacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaatg gatcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gttctccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcacctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 37
<211> 121
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 37
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 363
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 38
 caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcga cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catgggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca giactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgcccg glacagatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 39
 <211> 121
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 363

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 40

cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaaac ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgtacggcga cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggttac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgigacccc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 41

<211> 121

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 42

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg	60
acctgtgccg tgtacggcga cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac	120
cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac	180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gttctccctg	240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgccg gtacagatac	300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc	360
tct	363

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 363
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 44
cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgtacggcga cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactcctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 45
<211> 121
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 45
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46
 <211> 363
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 46
 caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcga cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gttctccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 47
 <211> 121
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 47
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 48

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cccgacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 49

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 49

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 50

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaaac ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat cacatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 51

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 51

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 52
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggicaagc ccagccagac cctgagcctg 60
accgtgtccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 53
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 54
 caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cccgacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
 gactacgacg gcgccacgc catggactac tggggccagg gcacctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 55
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 55
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Ala Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 56

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgtgccg tgiacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120

cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240

cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg glacaaatac 300

gactacgacg cgggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360

tct 363

<210> 57

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 58
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 58
 cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacagatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 59
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 59
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 60
caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgtgccg tgiacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccgat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 61
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 61
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 62
 cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggicaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gccctggaata catcggctac atcagctaca gcggcatacac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgigtact actgcgcccc gtacagatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 63
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 63
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 64
cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctgggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
accigtgccg tgtaaggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggcaagg gcctggaata catcggttac atcagctaca gcggcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca glactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 65
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 66
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 66
 gaggtagcagc tgcaggaaag cggccccagc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcagcg tgaccggcga cagcttcacc agcggctact ggaactggat ccggaagttc 120
 cccggcaacc ggctcgagta catgggctac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat cagcatcacc cgggacacca gcaagaacca ctactacctg 240
 cagctgaaca gegtgaccac cgaggacacc gccacctact ttgcgcccg gtacagatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tct 363

<210> 67
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 67
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 68
caggatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaacg ccagccagac cctgagcctg 60
accigtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
cccggaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac 300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
tct 363

<210> 69
<211> 330
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 69
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

<210> 70

<211> 990

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 70
 gcgtcgacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcc 120
 tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tctcttccc ccaaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gctacaccc tgccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960
 cagaagagct taagcctgtc tccgggtaaa 990

<210> 71
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 71
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 72
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 72
 caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 accctgtgccg tgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggtac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcciga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tctgcgtcga ccaagggccc atccgtctc cccctggcac cctcctcaa gacacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcctggaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggcca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagltcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc cggagaacca caggtctaca ccctgcccc atcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atgcccggg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcttaagcct gtctccgggt aaa 1353

<210> 73

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 73

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 74

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 74

```

caggTgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg      60
acctgtgccg tgtacggcgg cagcctcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac      120
cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac      180
cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg      240
cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac      300
gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc      360
ctcgcgtcga ccaagggcc cagcgtgttc cccctggccc ctgcagcag aagcaccagc      420
gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg      480
tcctggaaca gggcgctct gaccagcggc gtgcatacct tccccgccgt gctccagagc      540
agcggactgt actccctgag cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagcct gggcaccaag      600
acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag      660
agcaagtacg gccctccctg ccccccttgc cctgcccccg agttcctggg cggacctagc      720
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg      780
acctgcgtgg tgggtggacgt gtcccaggag gaccccgagg tccagtftaa ttggtacgtg      840
gacggcgtgg aagtgcataa cgccaagacc aagcccagag aggagcagtt caacagcacc      900
tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgtcg caccaggact ggctgaacgg caaggaatac      960
aagtgcgaag tctccaacaa gggcctgcct agcagcatcg agaagacat cagcaaggcc     1020
aagggccagc cacgggagcc ccaggctc ac cctgccac ctagccaaga ggagatgacc     1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct atcccagcga tctgccctg     1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc tgtgctggac     1200
agcgacggca gcctcttccct gtactccaga ctgaccgtgg acaagtccag atggcaggag     1260
ggcaacgtct tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag     1320
tcctgagcc tgagcctggg caag                                             1344

```

<210> 75

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 75

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245

250

255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 76

<211> 1353

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 76

cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg

60

accigtgccg tgiacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcgcttac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg giacaaatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tcigcgtcga ccaagggccc atccgtcttc cccctggcac cctcctccaa gacacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg 480
 tcctggaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 cccaaatctt gtagcaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga attcgagggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccaagaag acctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcttc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaagg tccaacaaa gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggcttaca cctgcccc atcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtctggact ccgacggctc ctctctctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgctt ctcatgctcc gtgatgatg aggtctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 77
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 77
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 78
 <211> 1344
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 78
 cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tgtacggcgg cagctcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggctac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccgat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tcigcgtcga ccaagggccc cagcgtgttc ccctggccc ctgacagcag aagcaccagc 420
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggcgtctt gaccagcggc gtgcatacct tccccgccgt gctccagagc 540
 agcggactgt actccctgag cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagcct gggaccaag 600
 acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtggag 660
 agcaagtagc gccctccctg ccccccttgc cctgcccccg agttcctggg cggacctagc 720

gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg
 acctgcgtgg tggiggacgt gtcccaggag gaccccagg tccagtttaa ttggtacgtg
 gacggcgtgg aagtgcataa cgccaagacc aagcccagag aggagcagtt caacagcacc
 tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggaatac
 aagtcaagg tctccaaca gggcctgcct agcagcatcg agaagacat cagcaaggcc
 aagggccagc cacgggagcc ccaggtctac accctgccac ctagccaaga ggagatgacc
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct atcccagcga tatcgcctg
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc tgtgctggac
 agcgacggca gcttcttct gtactccaga ctgaccgtgg acaagtccag atggcaggag
 ggcaacgtct tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag
 tcctgagcc tgagcctggg caag

<210> 79

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

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

405

410

415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 80
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 80
 cagggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg lgtacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcgctac atcagctaca acgcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccgat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tctgcgtcga ccaagggccc atccgtcttc cccctggcac cctcctcaa gacacacct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgctgtgic aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcttggaaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggaaa gagagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga attcgagggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggica catgcgtggt ggiggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgigga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cctccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggcttaca ccttgcctcc atcccgggag. 1080
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc ctcttctctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtett ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccacta
 acgcagaaga gccctcctcct gtctccgggt aaa

<210> 81
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 81
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
 340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 82

<211> 1335

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 82
 caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgtgccg tftacggcgg cagcttcagc agcggctact ggaactggat ccggaagcac 120
 cccggcaagg gcctggaata catcggttac atcagctaca acggcatcac ctaccacaac 180
 cccagcctga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtactccctg 240
 cagctgaaca gcgtgacccc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtacaaatac 300
 gactacgacg gcggccacgc catggactac tggggccagg gcaccctggt caccgtgtcc 360
 tctgcgaaga cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact 420
 aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg 480
 acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct 540
 gacctctaca ctctgagcag ctacgtgact gtcccctcca gcacctggcc cagcgagacc 600
 gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc 660
 agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt accgtcccag aagtatcatc tgtcttcac 720
 ttcccccaa agccaagga tgtgctcacc attactciga ctctaaggt cagctgtgtt 780
 gtggtagaca tcagcaagga tgatcccagc gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg 840
 gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca 900
 gtcagtgaac ttcccatcat gcaccaggac tggctcaatg gcaaggagt ccaatgcagg 960
 gtcaacagtg cagctttccc tgccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga 1020
 ccgaaggctc cacaggtgta taccatcca cctccaagg agcagatggc caaggataaa 1080
 gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag 1140
 tggaatgggc agccagcggg gaactacaag aacactcagc ccatcatgga cacagatggc 1200
 tcttacttcg tctacagaa gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact 1260
 ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc atactgagaa gacccctccc 1320
 cactctcctg gtaaa 1335

<210> 83
 <211> 214
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 83
 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 Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His 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 Gly Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

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

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

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 84

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 84

gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcaagc tgcacagcgg cgtgcccagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacacctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggctccgccc tgcctggac ctttggccag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa gcgggctgat gcggcgccaa ctgtatccat cttcccacca 360
tccagtgagc agttaacatc tggagggtgcc tcagtcgtgt gcttctttaa caacttctac 420
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 480
aacagttaga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag 540
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 600
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 642

<210> 85
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 85
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> 86
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 86

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 Ala Ser Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
 180 185 190
 Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
 210 215 220
 Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
 260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 87

<211> 1323

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 87

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtt ctactaacc gttacaatt tacactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gtcctggagtg gatgggaaga atgaggtatg atggagacac atattataat 180

tcagttctca aatcccgact gagcatcagc agggacacct ccaagaacca agttttcttg 240

aaaatgaaca gtcctgcaaac ggatgacaca gccatttact attgtaccag agacgggcgt 300

ggtgactcct ttgattactg gggccaagga gtcattgtca cagtctcctc cgcgtcgagc 360

acacccccat ctgtctatcc actggcccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg 420
 accctgggat gcctgggtaa gggctatttc cctgagccag tgacagtgac ctggaactct 480
 ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagictga cctctacact 540
 ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt caccigcaac 600
 gtgcccacc cggccagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgtgccag ggattgtggt 660
 tgaagcctt gcatatgtac cgtcccagaa giatcatctg tcttcatctt cccccaaag 720
 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggta cgtgtgttgt ggtagacatc 780
 agcaaggatg atcccagggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca 840
 gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 900
 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtta aatgcagggt caacagtgca 960
 gctttccctg cccccatga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 1020
 caggtgiata ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 1080
 tgcataataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 1140
 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgic 1200
 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 1260
 gtgtfacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt 1320
 aaa 1323

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 88

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
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Arg Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
 85 90 95

Arg Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 89
 <211> 219
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>人工序列之描述：合成多肽

<400> 89
 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
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Arg Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
 85 90 95

Arg Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 90
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 90
 gatattgtga tgaccaggagg tgactccccc aatcctgtcc ctctcggaga gtcagcttcc 60
 atcacctgca ggtctagtea gagtctggta tacaagacg gccagacata ctgaattgg 120
 tttctgcaga ggccaggaca gctcctcag ctctcagcct attggatgic taccctgca 180
 tcaggagtct cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa catattcac actgaaaatc 240
 agtagagtga gggctgagga tgcgggtgtg tattactgtc agcaagttcg agagtalct 300
 ttcactttcg gctcaggagc gaagttggaa ataaaacggg ctgatgcggc gccaaactga 360
 tccatcttcc caccatccag tgagcagttt acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtga agattgatgg cagtgaacga 480
 caaaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540
 agcagcacc ctcagttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgt 657

<210> 91
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 91
 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> 92
<211> 272
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 92
Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
100 105 110

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

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

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

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 93

Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly

1

5

<210> 94
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 94
 Lys Tyr Asp Tyr Asp Ala
 1 5

<210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 95
 Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly
 1 5

<210> 96
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 96
 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

<210> 97

<211> 175

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 97

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
 35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
 50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
 65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
 85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
 100 105 110

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

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

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

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp
 165 170 175

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成 6xHis 標籤

<400> 98
His His His His His His
1 5

發明摘要

※ 申請案號：104132442

※ 申請日：104.10.1

※IPC 分類：C07K ¹⁶/₃₈ (2006.01)

A61K ³⁹/₉₅ (2006.01)

A61P ³⁵/₀₀ (2006.01)

【發明名稱】

人類化抗-OX40抗體及其用途

HUMANIZED ANTI-OX40 ANTIBODIES AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供人類化抗-OX40抗體。亦提供製造此等抗體之方法及使用(例如治療癌症)之方法。

【英文】

The disclosure provides humanized anti-OX40 antibodies. Also provided are methods of making such antibodies, and methods of use, e.g., treatment of cancer.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（13A）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種包含人類化重鏈可變區(VH)及人類化輕鏈可變區(VL)之抗體或其抗原結合片段；

其中該VH包含具有下式之胺基酸序列：

HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4，

其中HFW1為SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7，HCDR1為SEQ ID NO:8，HFW2為SEQ ID NO:9，HCDR2為SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16，HFW3為SEQ ID NO:17，HCDR3為SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27，及HFW4為SEQ ID NO:28；

其中該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:32；及

其中該抗體或其片段可特異性地結合至人類OX40。

2. 如請求項1之抗體或其片段，其中該HFW2之胺基酸序列為SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13。
3. 如請求項1或2之抗體或其片段，其中該HFW3之胺基酸序列為SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體或其片段，其中該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67。
5. 如請求項1至4中任一項之抗體或其片段，其中該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO:29且該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO:59。

6. 如請求項1至5中任一項之抗體或其片段，其進一步包含融合至VL的C端之輕鏈恆定區或其片段。
7. 如請求項6之抗體或其片段，其中該輕鏈恆定區為人類 κ 恆定區。
8. 如請求項1至7中任一項之抗體或其片段，其進一步包含融合至VH的C端之重鏈恆定區或其片段。
9. 如請求項8之抗體或其片段，其中該重鏈恆定區為人類IgG1恆定區、人類IgG4P恆定區、人類IgG1TM恆定區或鼠類IgG1恆定區。
10. 如請求項9之抗體或其片段，其中該重鏈恆定區為人類IgG1恆定區。
11. 如請求項1至10中任一項之抗體或其片段，其包含重鏈胺基酸序列SEQ ID NO:71及輕鏈胺基酸序列SEQ ID NO:30。
12. 如請求項1至11中任一項之抗體或片段，其中該抗原結合片段為Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段或sc(Fv)₂片段或其任何組合。
13. 如請求項1至12中任一項之抗體或其片段，其可特異性地結合至馬來猴(*cynomolgus monkey*)或恆河猴OX40。
14. 如請求項13之抗體或其片段，其可特異性地結合至表現於下列細胞上之OX40：Jurkat細胞、來自於人類、馬來猴、恆河猴之初代活化CD4⁺或CD8⁺ T細胞，或其任何組合。
15. 如請求項1至14中任一項之抗體或其片段，其不結合至鼠類或大鼠OX40。
16. 如請求項1至15中任一項之抗體或其片段，其不與相關腫瘤壞死因子受體超家族(TNFRSF)蛋白質交叉反應。
17. 如請求項14之抗體或其片段，其中對於初代活化人類CD4⁺ T細

胞上表現之人類OX40之結合親和力為約250 pM至約370 pM，如藉由流式細胞計數法測得。

18. 如請求項17之抗體或其片段，其中該結合親和力為約312 pM。
19. 如請求項17或18之抗體或其片段，其可以約63至約93 pM在初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成20%受體佔有率(EC₂₀)，以約250至約370 pM在初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成50%受體佔有率(EC₅₀)及以約2290至約3330 pM在初代活化人類CD4⁺ T細胞上達成90%受體佔有率(EC₉₀)，如藉由流式細胞計數法測得。
20. 如請求項19之抗體或其片段，其中EC₂₀為約78 pM，EC₅₀為約312 pM，及EC₉₀為約2810 pM。
21. 如請求項14之抗體或其片段，其中對於OX40過度表現之Jurkat細胞上表現之人類OX40之結合親和力為約250 pM至約600 pM，如藉由流式細胞計數法測得。
22. 如請求項21之抗體或其片段，其中該結合親和力為約424 pM。
23. 如請求項21或22之抗體或其片段，其可以約60至約150 pM在過度表現OX40之Jurkat細胞上達成EC₂₀，以約250至約600 pM在過度表現OX40之Jurkat細胞上達成EC₅₀，及以約2260至約4380 pM在過度表現OX40之Jurkat細胞上達成EC₉₀，如藉由流式細胞計數法測得。
24. 如請求項23之抗體或其片段，其中EC₂₀為約106 pM，EC₅₀為約424 pM，及EC₉₀為約3820 pM。
25. 如請求項14之抗體或其片段，其中對於初代活化馬來猴CD4⁺ T細胞上表現之馬來猴OX40之結合親和力為約340 pM至約820 pM，如藉由流式細胞計數法測得。
26. 如請求項25之抗體或其片段，其中該結合親和力為約580 pM。
27. 如請求項14之抗體或其片段，其中對於初代活化恆河猴CD4⁺ T

細胞上表現之恆河猴 OX40 之結合親和力為約 130 pM 至約 600 pM，如藉由流式細胞計數法測得。

28. 如請求項 27 之抗體或其片段，其中該結合親和力為約 370 pM。
29. 如請求項 1 至 28 中任一項之抗體或其片段，其在基於板之分析法中可誘導活化之 CD4⁺ T 細胞之劑量依賴性增殖及初代活化人類 CD4⁺ T 細胞中之劑量依賴性細胞介素釋放。
30. 如請求項 29 之抗體或其片段，其中可以約 14 pM 至約 28 pM 之抗體濃度在初代活化人類 CD4⁺ T 細胞中達成 20% 最大增殖反應 (EC₂₀)，可以約 0.3 pM 至約 130 pM 之抗體濃度在初代活化人類 CD4⁺ T 細胞中達成 50% 最大增殖反應 (EC₅₀)，及可以約 50 pM 至 90 pM 之抗體濃度在初代活化人類 CD4⁺ T 細胞中達成 90% 最大增殖反應 (EC₉₀)，皆藉由流式細胞計數法測得。
31. 如請求項 30 之抗體或其片段，其中 EC₂₀ 為約 21 pM，EC₅₀ 為約 28 pM，及 EC₉₀ 為約 72 pM。
32. 如請求項 29 至 31 中任一項之抗體或其片段，其中該細胞介素為 IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 或其任何組合。
33. 如請求項 32 之抗體或其片段，其中該細胞介素為 IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13 或其任何組合。
34. 如請求項 1 至 28 中任一項之抗體或其片段，其可達成初代活化馬來猴 CD4⁺ T 細胞及初代活化恆河猴 CD4⁺ T 細胞中之 CD4⁺ T 細胞增殖及細胞介素釋放。
35. 如請求項 1 至 34 中任一項之抗體或其片段，其可在表現 Fc γ R 之細胞存在下活化表現 OX40 之 T 細胞中之 NF κ B 路徑。
36. 如請求項 35 之抗體或其片段，其中該等表現 OX40 之 T 細胞為表現 OX40 之 Jurkat NF κ B-螢光素酶報導細胞，該報導細胞對於 NF κ B

信號傳導路徑之刺激反應產生螢光素酶。

37. 如請求項1至36中任一項之抗體或其片段，其可觸發對抗表現OX40之細胞之補體依賴性或抗體依賴性細胞細胞毒性。
38. 如請求項37之抗體或其片段，其可結合至C1q且觸發對抗表現OX40之細胞之NK介導的抗體依賴性細胞細胞毒性。
39. 如請求項1至38中任一項之抗體或其片段，其中對需要癌症治療的個體投與有效劑量可抑制個體中之腫瘤生長。
40. 如請求項39之抗體或其片段，其中該腫瘤生長抑制係在T細胞存在下達成。
41. 如請求項39或40之抗體或其片段，其中與投與同型匹配之對照抗體或其片段相比，腫瘤生長抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%。
42. 一種組合物，其包含如請求項1至41中任一項之抗體或其片段及載劑。
43. 一種多核苷酸，其包含編碼如請求項1至41中任一項之抗體或其片段或如請求項1至41中任一項之抗體或其片段之多肽次單位之核酸。
44. 如請求項43之多核苷酸，其包含SEQ ID NO:60之核酸、SEQ ID NO:31之核酸、SEQ ID NO:72之核酸，或其任何組合。
45. 一種載體，其包含如請求項43或44之多核苷酸。
46. 一種宿主細胞，其包含如請求項43或44之多核苷酸或如請求項45之載體。
47. 一種產生抗體或其片段之方法，其包含將如請求項46之宿主細胞在該多核苷酸編碼的抗體或其片段表現的條件下培養，及回收該抗體或其片段。
48. 一種促進活化T細胞存活或增殖之方法，其包括使活化之T細胞

與如請求項1至41中任一項之抗體或其片段接觸，其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。

49. 一種誘發細胞介素從活化之T細胞釋放之方法，其包括使活化之T細胞與如請求項1至41中任一項之抗體或其片段接觸，其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。
50. 如請求項49之方法，其中該細胞介素為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β ，或其任何組合。
51. 如請求項50之方法，其中該細胞介素為IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13，或其任何組合。
52. 如請求項48至51中任一項之方法，其中該活化之T細胞為活化之CD4⁺ T細胞、活化之CD8⁺ T細胞，或其組合。
53. 如請求項52之方法，其中該活化之CD4⁺ T細胞為人類CD4⁺ T細胞、馬來猴CD4⁺ T細胞、恆河猴CD4⁺ T細胞，或其組合。
54. 一種促進T細胞活化之方法，其包括使T細胞與如請求項1至41中任一項之抗體或其片段接觸，其中該抗體或其片段可特異性地結合至T細胞表面上的OX40。
55. 如請求項54之方法，其中T細胞活化可經由NF κ B信號轉導路徑之刺激測得。
56. 如請求項54或55之方法，其中該等T細胞為活化之CD4⁺ T細胞、活化之CD8⁺ T細胞，或其組合。
57. 如請求項56之方法，其中該等活化之CD4⁺ T細胞為人類CD4⁺ T細胞、馬來猴CD4⁺ T細胞、恆河猴CD4⁺ T細胞，或其組合。
58. 如請求項54至57中任一項之方法，其中該接觸包括對個體投與有效量之該抗體或其片段。
59. 一種治療個體癌症之方法，其包括對需要治療的個體投與有效

量之如請求項1至41中任一項之抗體或其片段或如請求項42之組合物。

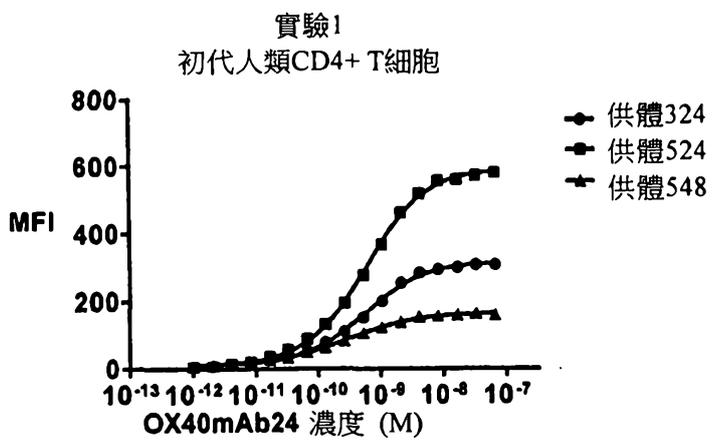
60. 如請求項59之方法，其中該癌症為實體腫瘤。
61. 如請求項59或60之方法，其中投與該抗體或其片段或組合物可抑制腫瘤生長、可促進腫瘤縮小，或兩者。
62. 如請求項61之方法，其中腫瘤生長抑制係在T細胞存在下達成。
63. 一種提高個體免疫反應之方法，其包括對有此需要的個體投與治療有效量之如請求項1至41中任一項之抗體或其片段或如請求項42之組合物。
64. 如請求項59至63中任一項之方法，其中該個體為人類個體。
65. 如請求項1至41中任一項之抗體或其片段，其係結合至人類OX40之抗原決定基，該抗原決定基係落在SEQ ID NO:91之胺基酸108至146之內。
66. 如請求項65之抗體或其片段，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO:91之至少胺基酸白胺酸116及丙胺酸126。
67. 如請求項1至41中任一項之抗體，其係結合至包含SEQ ID NO:92但Q113L突變及V124A突變之小鼠OX40變體。
68. 一種由100個或更少胺基酸組成之分離肽，其中該肽可特異性結合如請求項1至41中任一項之抗體或其片段。
69. 如請求項68之肽，其包含SEQ ID NO:91之胺基酸116至126。
70. 如請求項68或69之肽，其包含SEQ ID NO:91之胺基酸108至146，但一個、兩個、三個、四個、五個或六個單胺基酸代換、缺失或插入在除L116及A126外之任何位置。

圖式

與人類化VL配對之9B12VH突變變體										
純系ID	VH突變(暱稱)	VH突變位置							移除序列缺陷	
		27D	39K	47Y	48M	71R	78Y	91F	NG (CDR2H)	RYDYDG (CDR3H)
OX40mAb1	9B12嵌合體	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb2	9B12小鼠VH	D	K	Y	M	R	Y	F	NG	RYDYDG
OX40mAb5	hu	G	Q	W	I	P	F	Y		
OX40mAb8	huKR	G	K	W	I	R	F	Y		
OX40mAb10	m1	D	Q	W	I	P	F	Y		
OX40mAb11	m2	G	K	Y	M	P	F	Y		
OX40mAb12	m3	G	Q	W	I	R	Y	F		
OX40mAb13	KR-DYMYF	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb14	KR-DYVYF	D	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb15	KR-DYVFF	D	K	Y	I	R	F	F		
OX40mAb16	KR-DYVYV	D	K	Y	I	R	Y	Y		
OX40mAb17	KR-DYVYF	D	K	Y	I	R	F	Y		
OX40mAb18	KVYF	G	K	Y	I	P	Y	F		
OX40mAb19	KVRYF	G	K	Y	I	R	Y	F		
Ox40mab20	KVRY	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	RYDYDG
OX40mAb21	KVY	G	K	Y	I	P	Y	Y		
OX40mAb22	55A_96K-A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDA
OX40mAb23	55A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	RYDYDG
OX40mAb24	96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb25	54S	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	RYDYDG
OX40mAb25a	54S_96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	KYDYDG
OX40mAb26	小鼠VH-55A	D	K	Y	M	R	Y	F	NA	RYDYDG
OX40mAb27	55A_96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb28	huIgG4P	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb29	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb30	mIgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb31	huIgG4P	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb32	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb37	mIgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG

圖 1

A



B

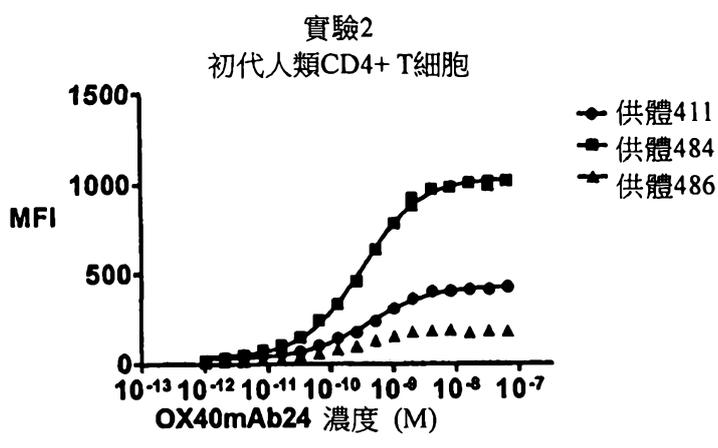
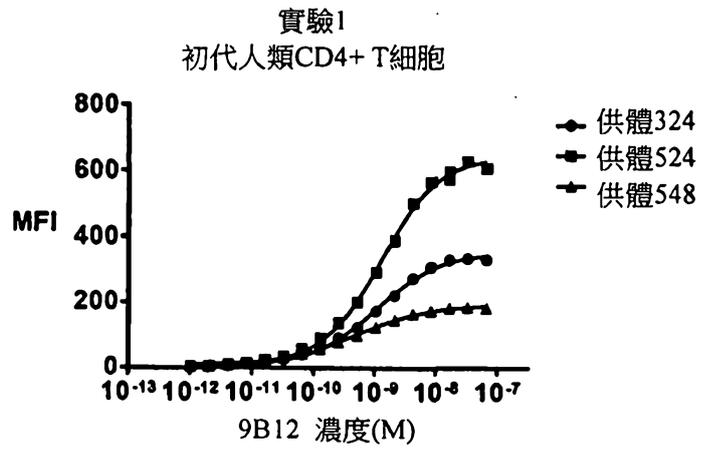
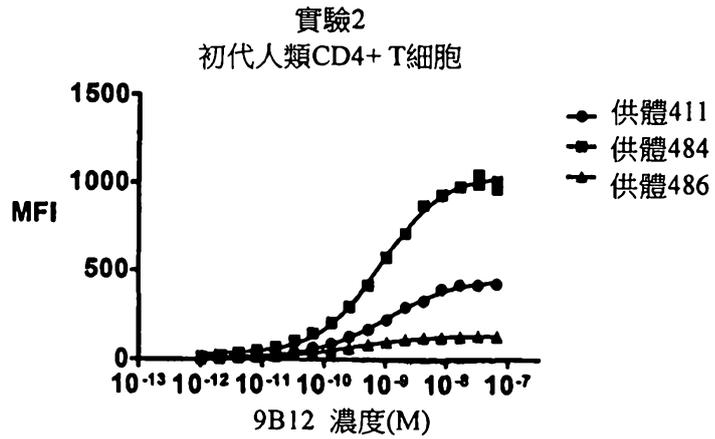


圖 2A-D

C



D



(圖 2A-D, 續上)

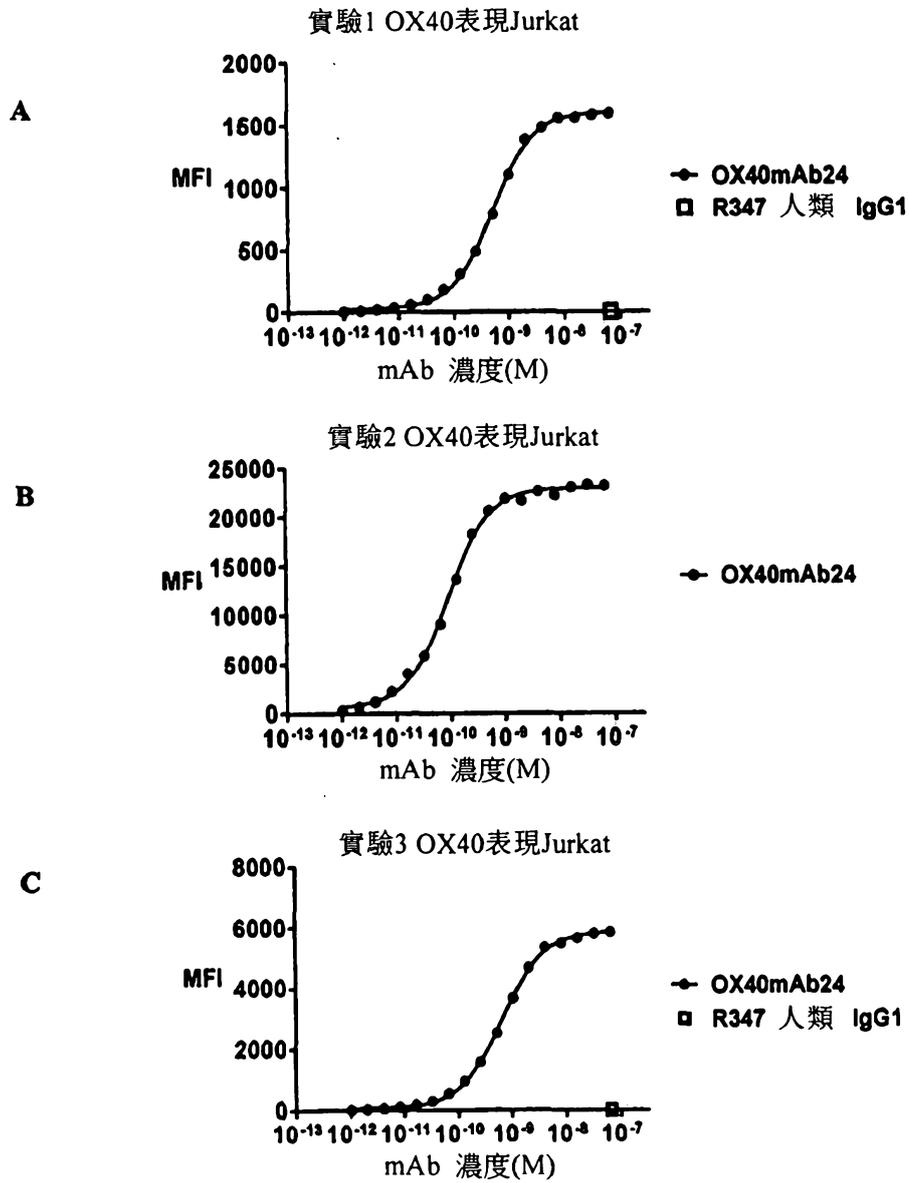
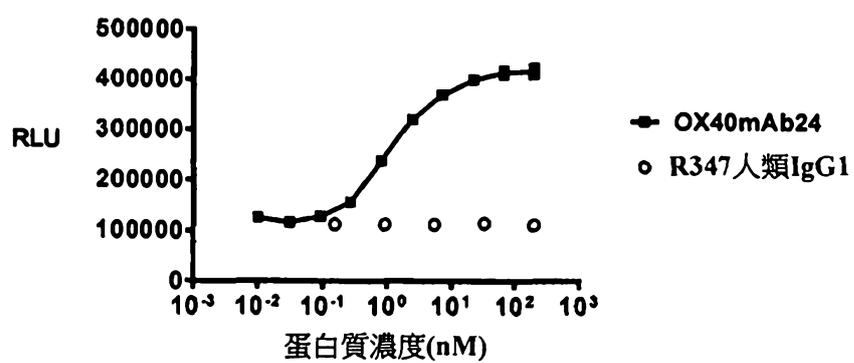


圖 3A-F

A



B

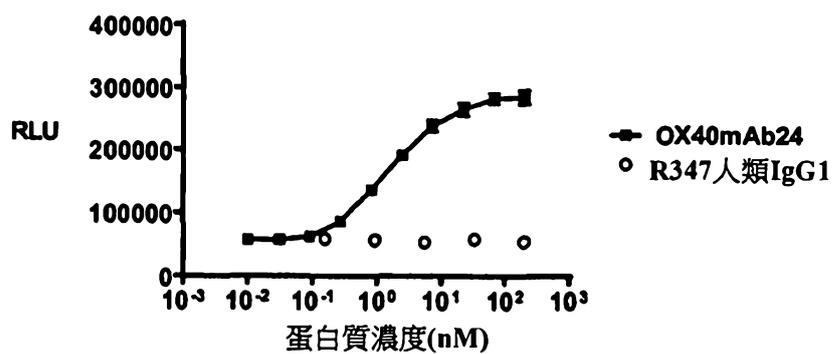
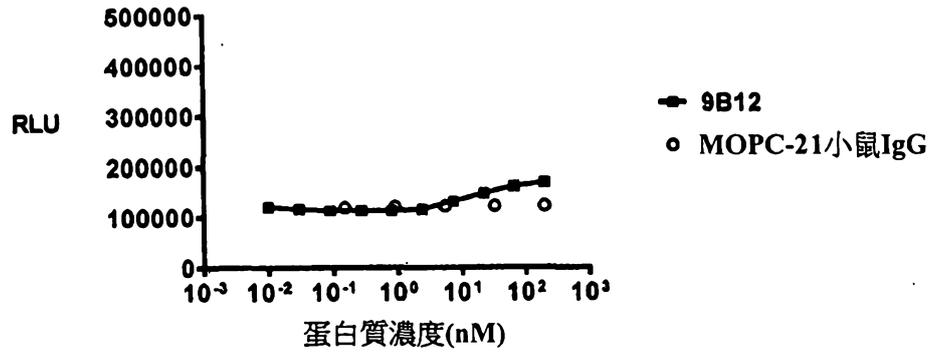


圖 19A-B

A



B

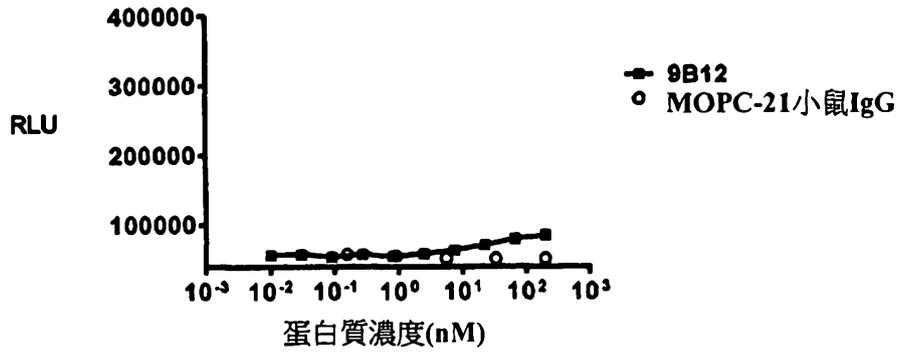
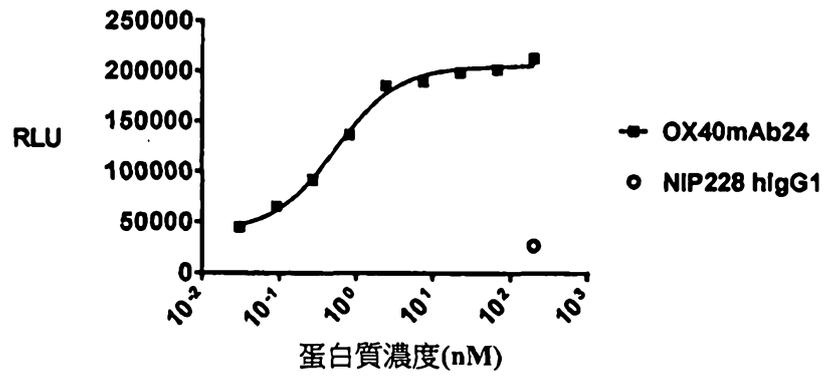


圖 20A-B

A



B

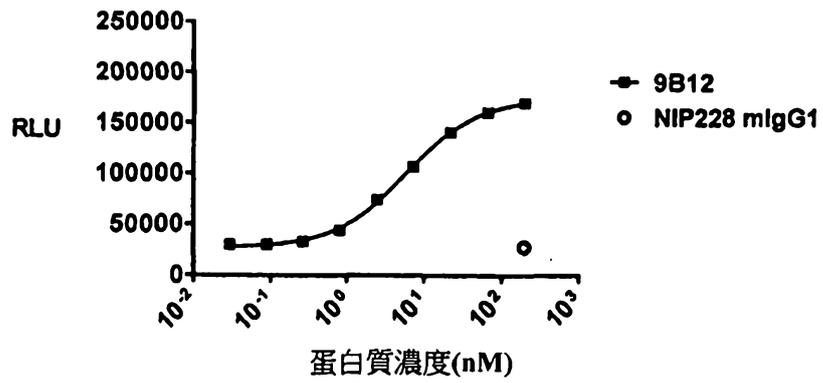
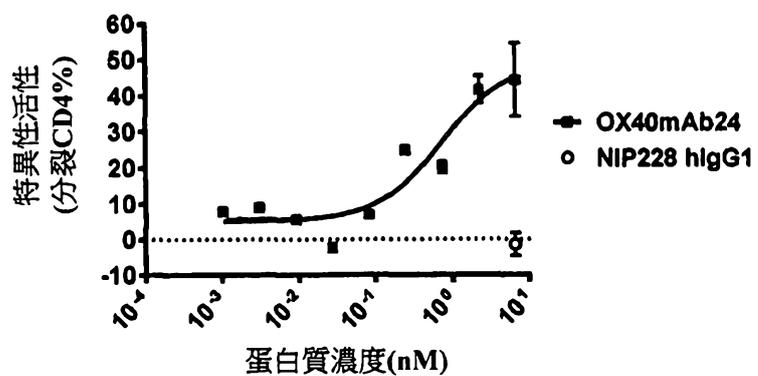


圖 21A-B

A



B

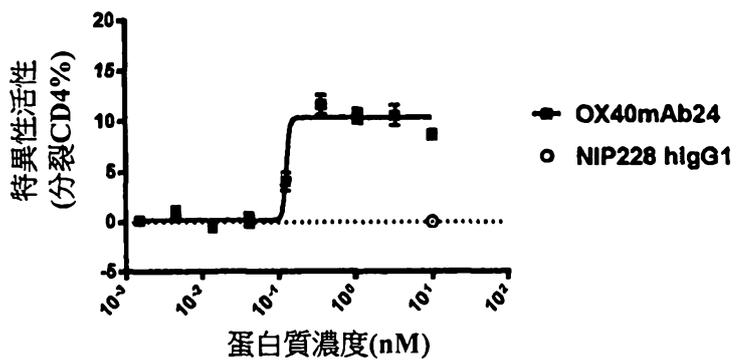
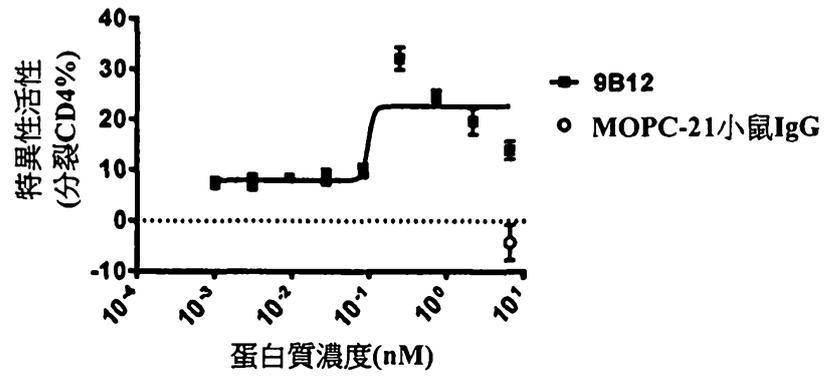
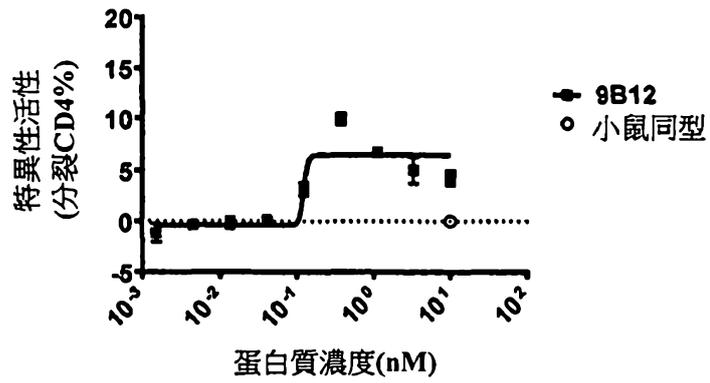


圖 22A-D

C



D



(圖 22A-D, 續上)

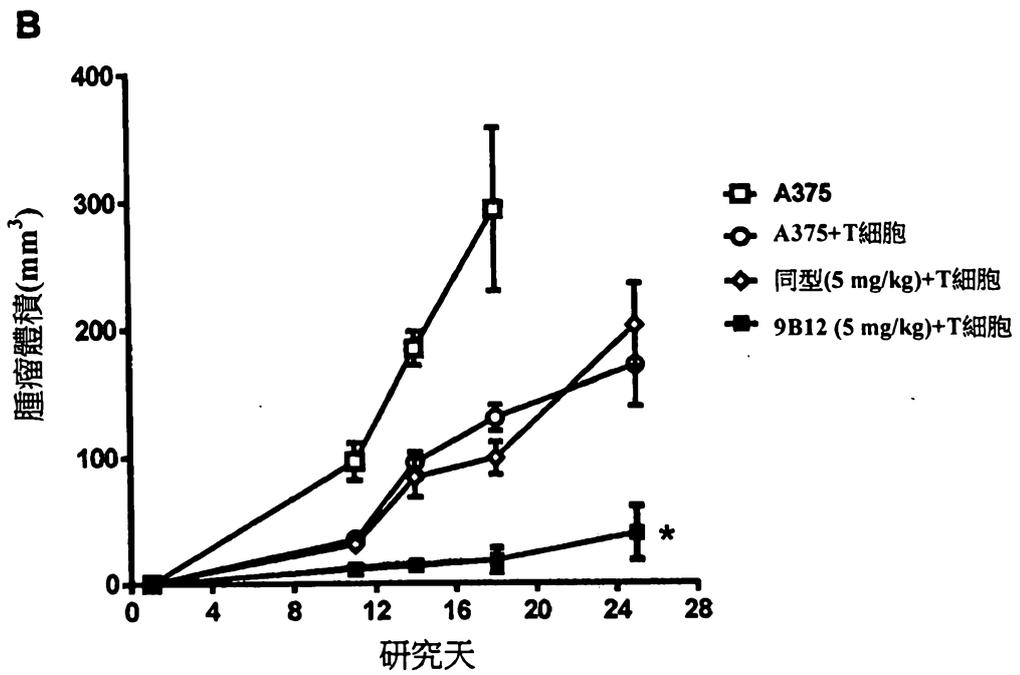
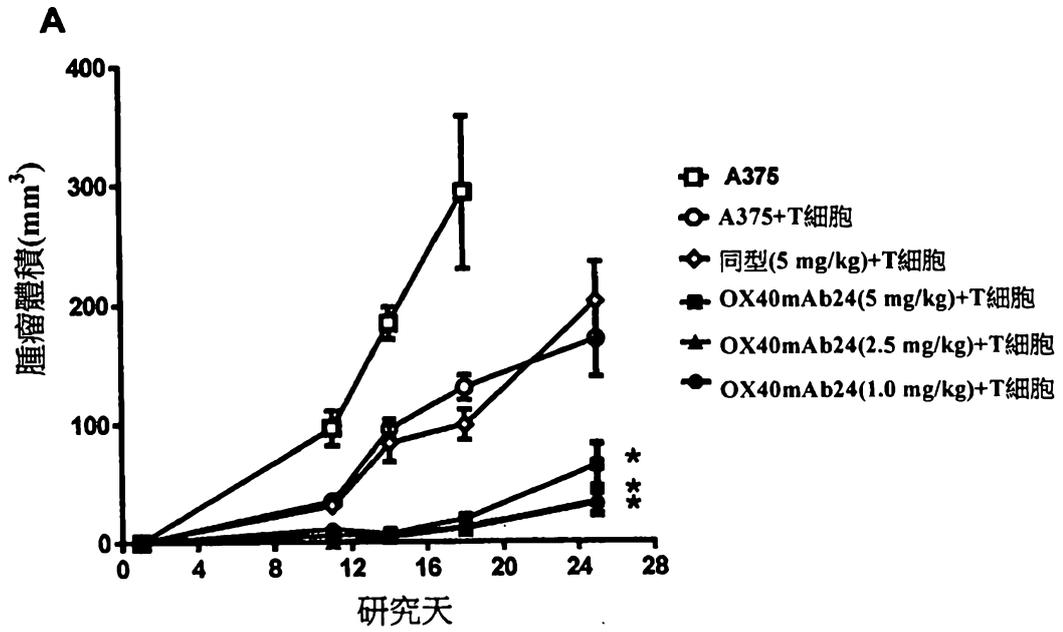


圖 23A-B

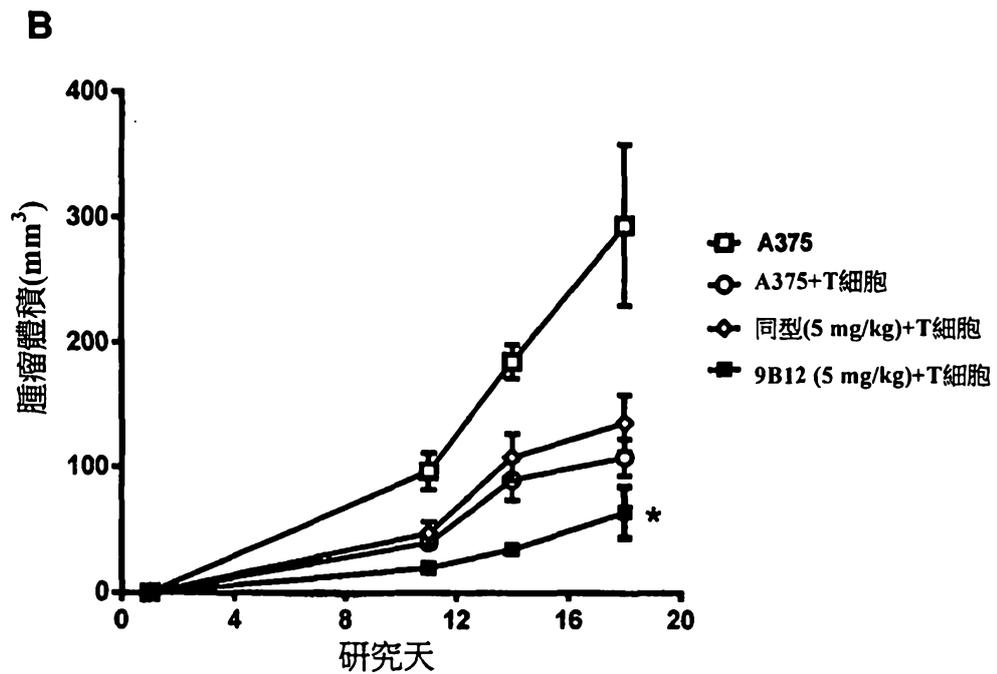
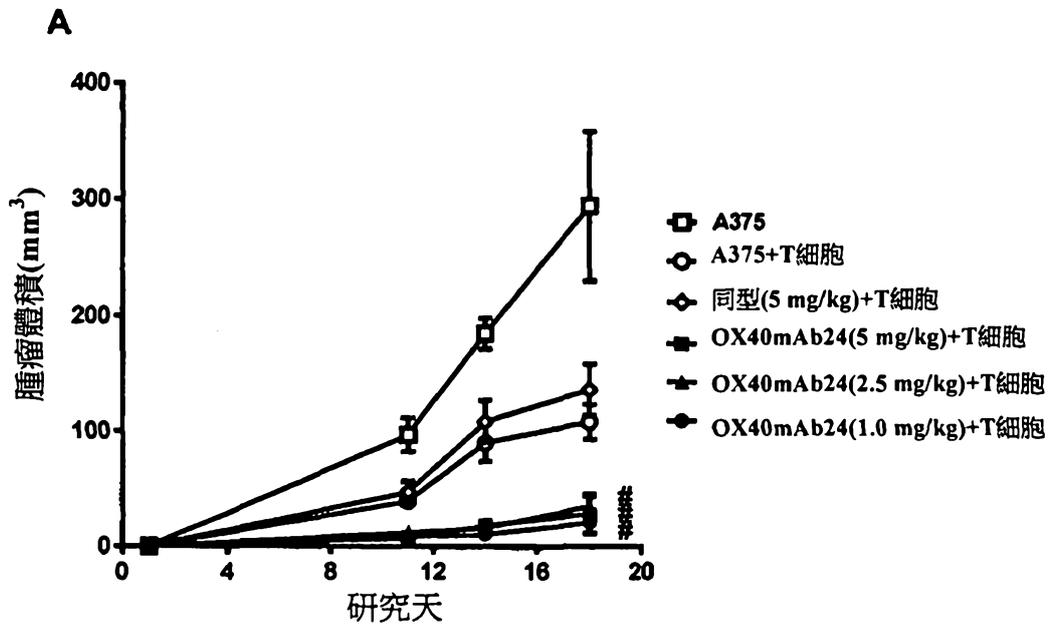


圖 24A-B

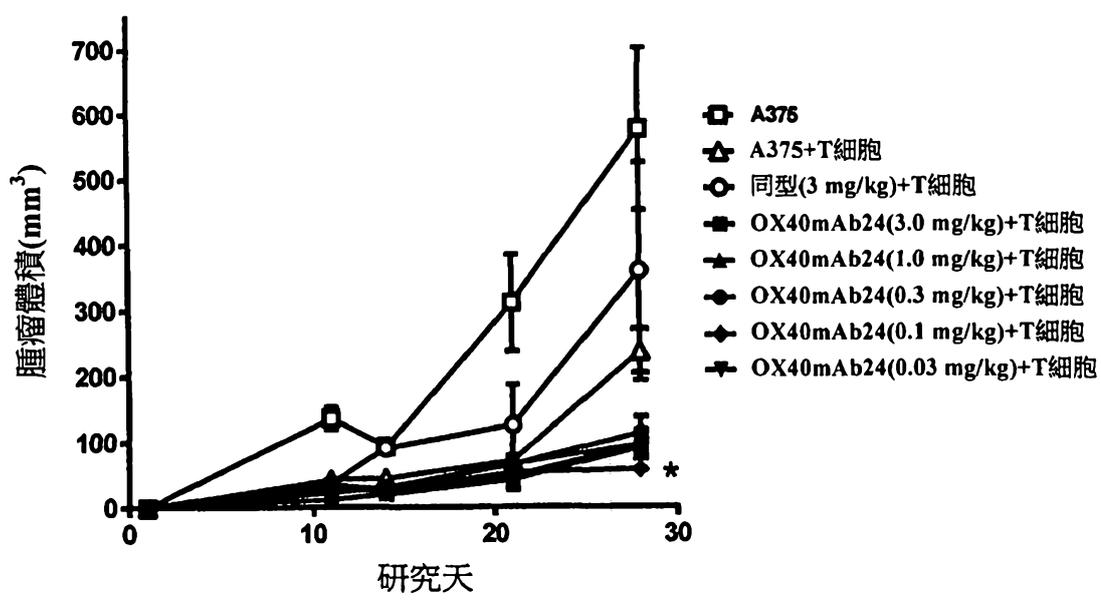


圖 25

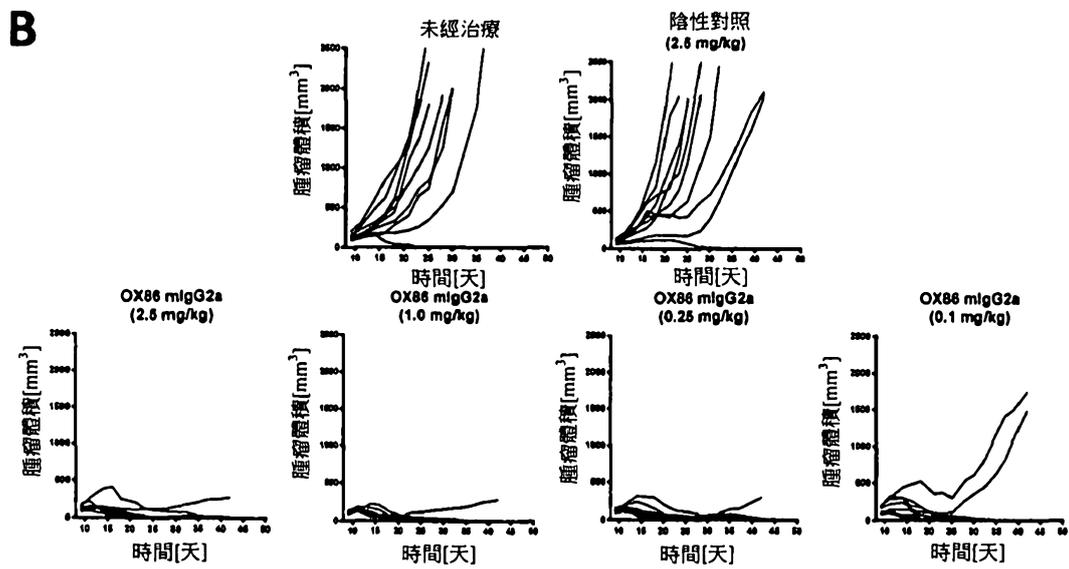
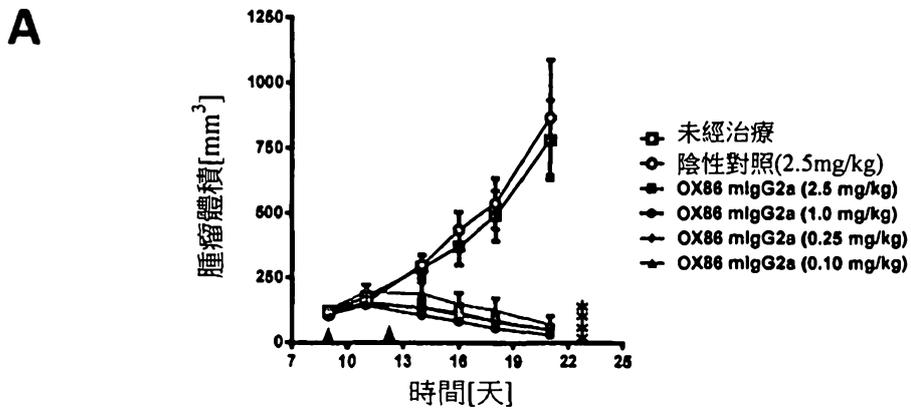


圖 26A-B

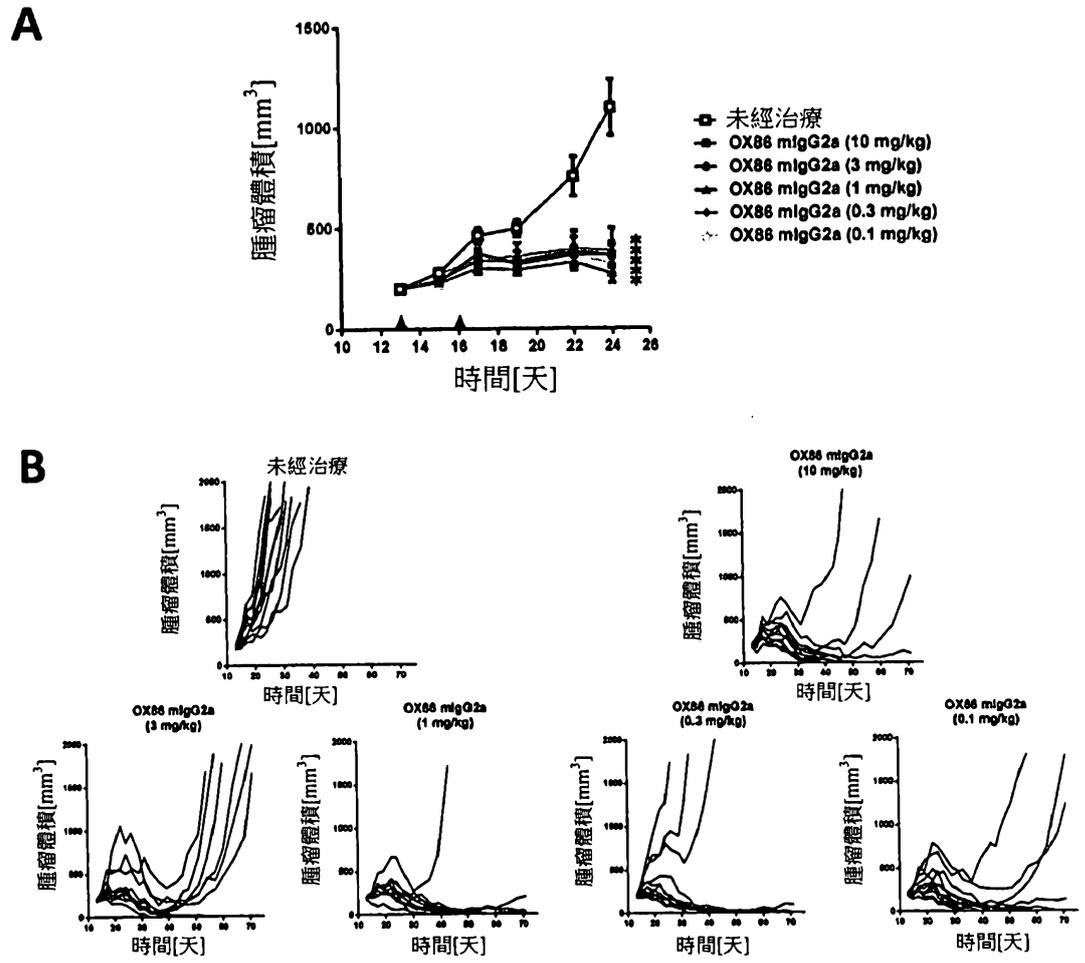


圖 27A-B

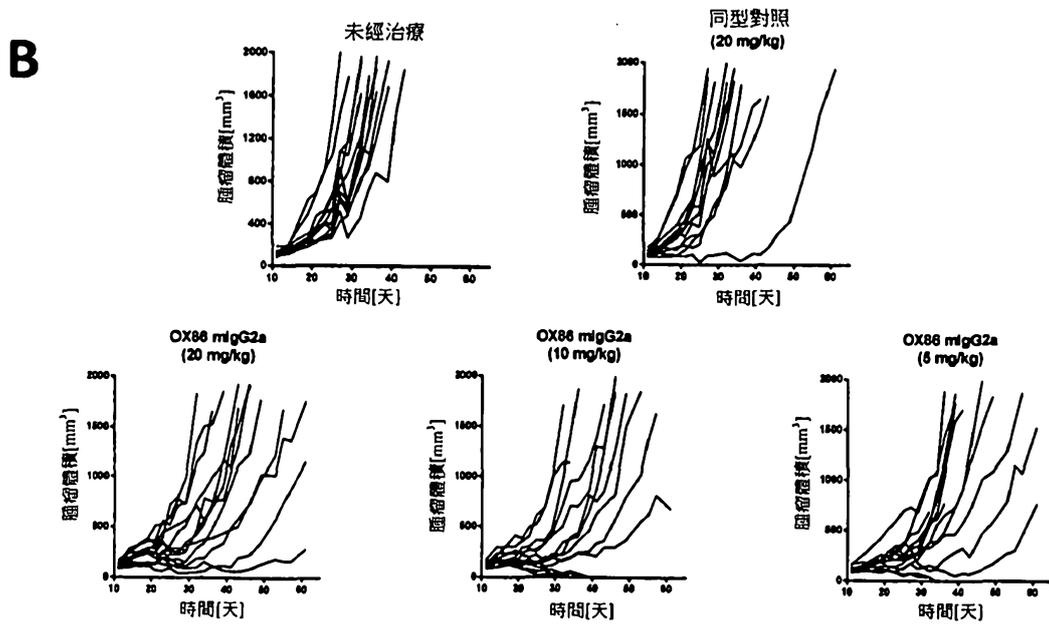
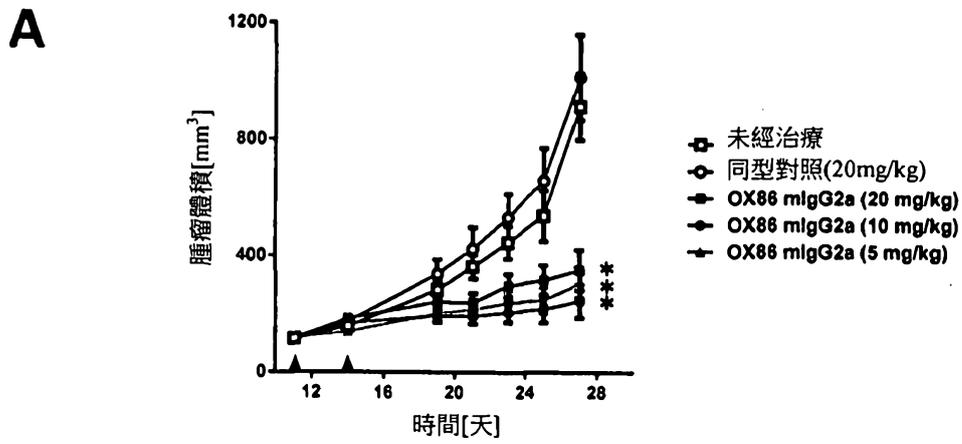
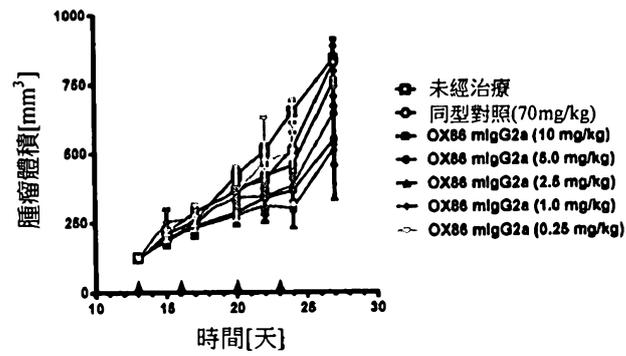


圖 28A-B

A



B

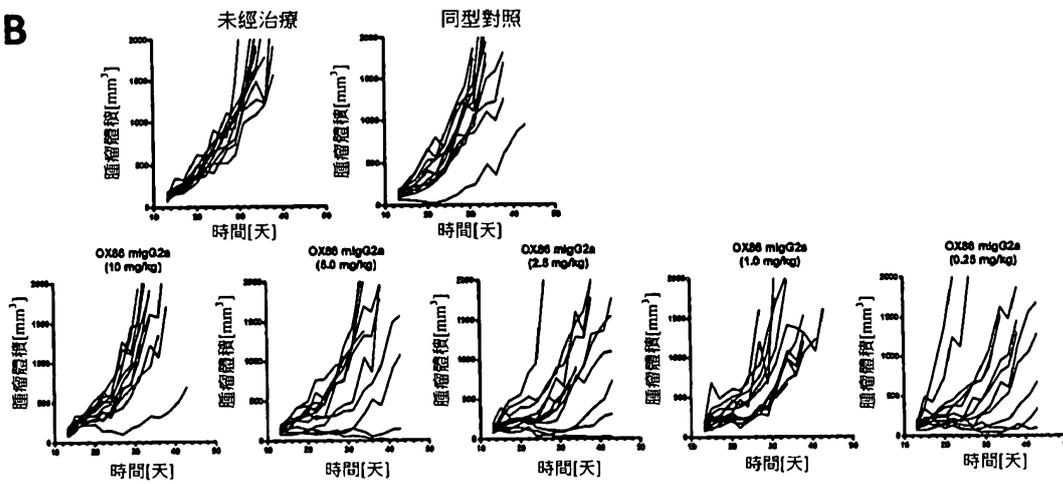


圖 29A-B

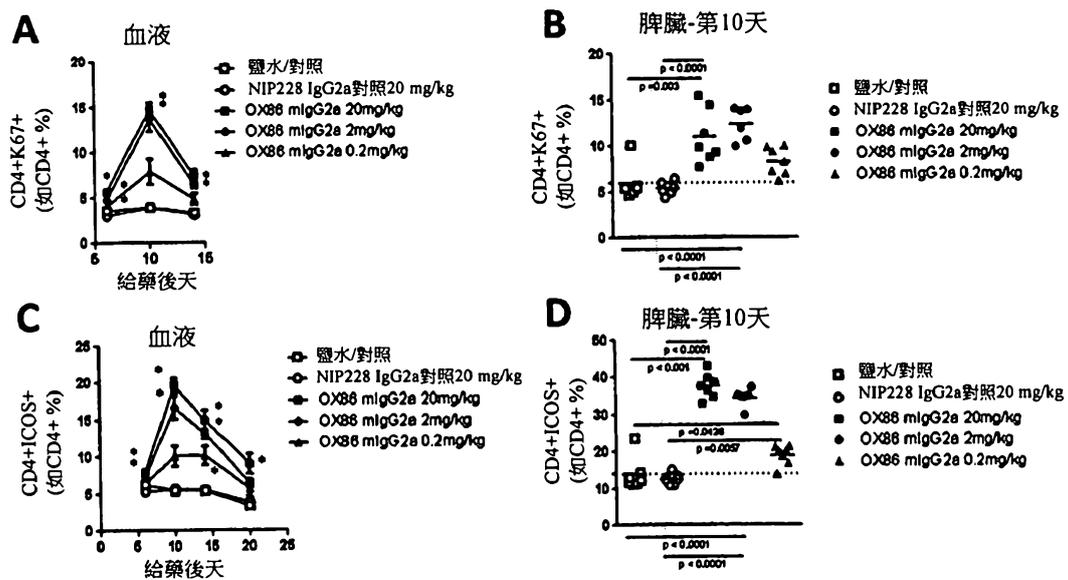


圖 33

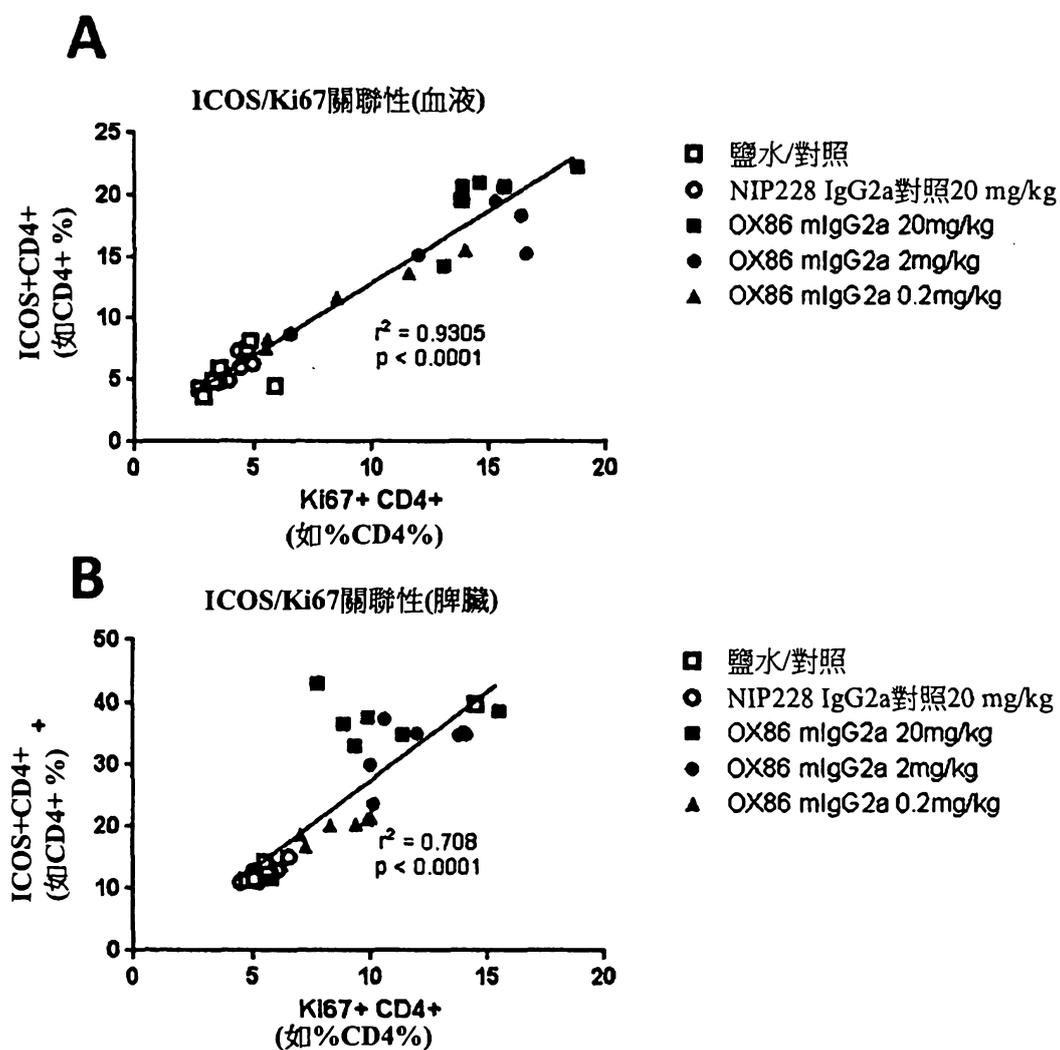


圖 34

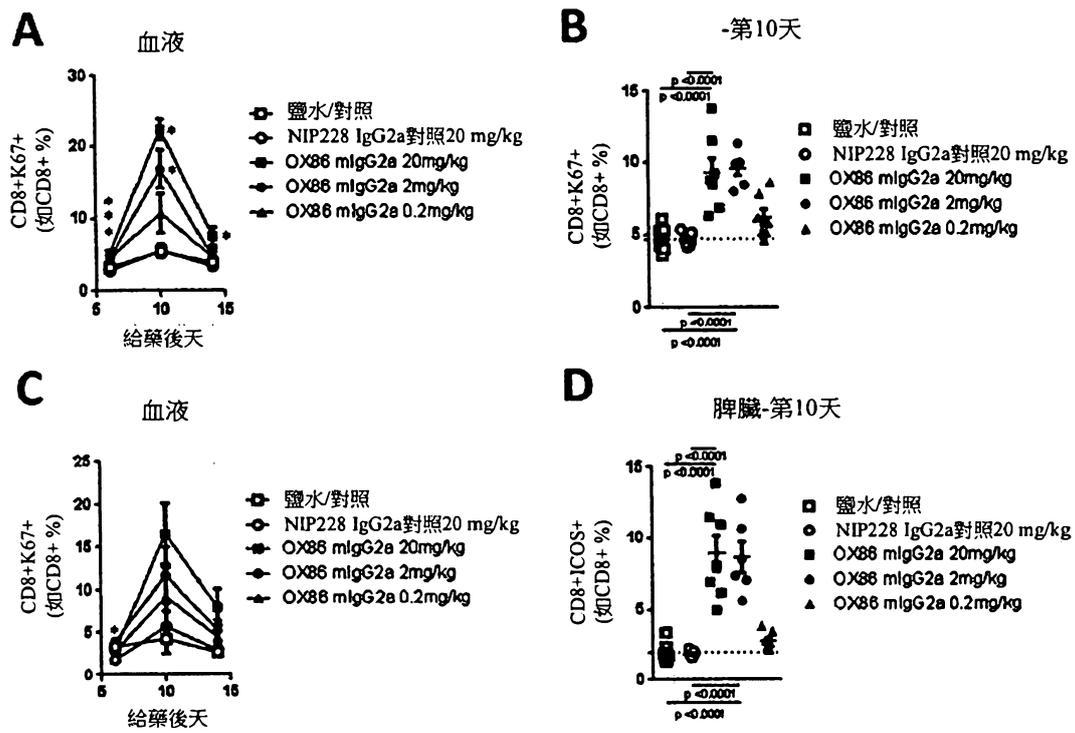


圖 35

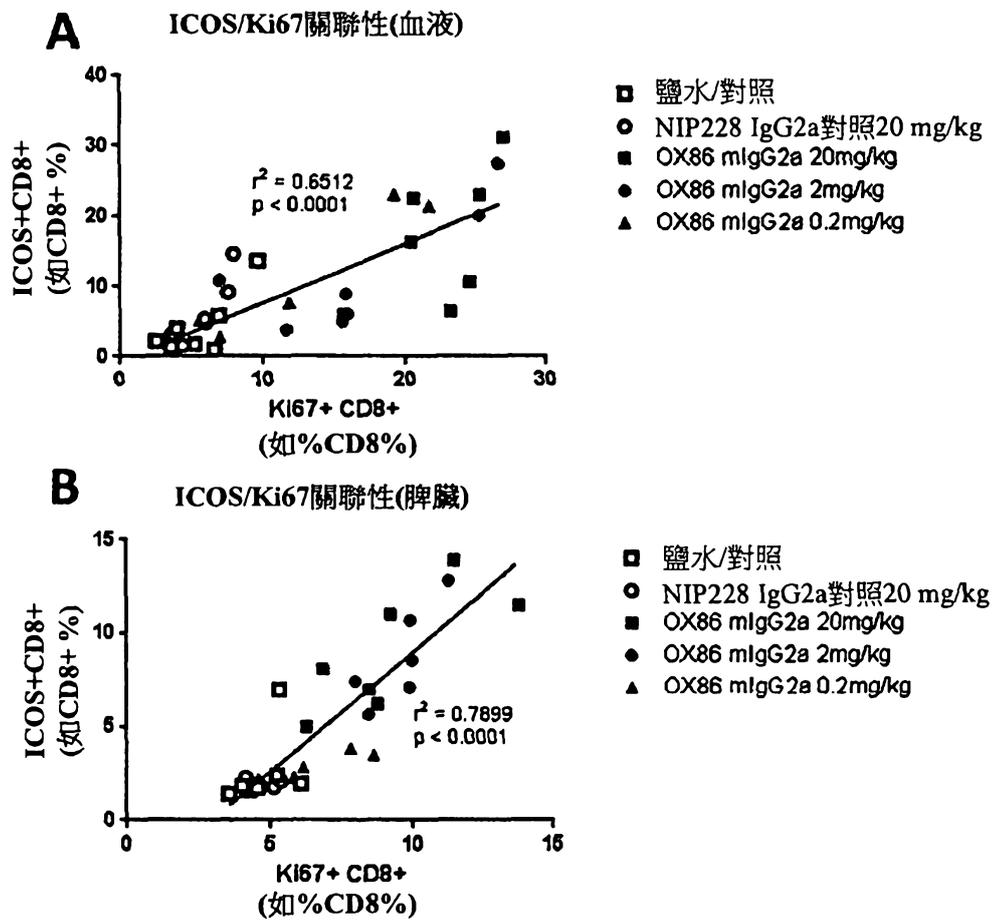


圖 36

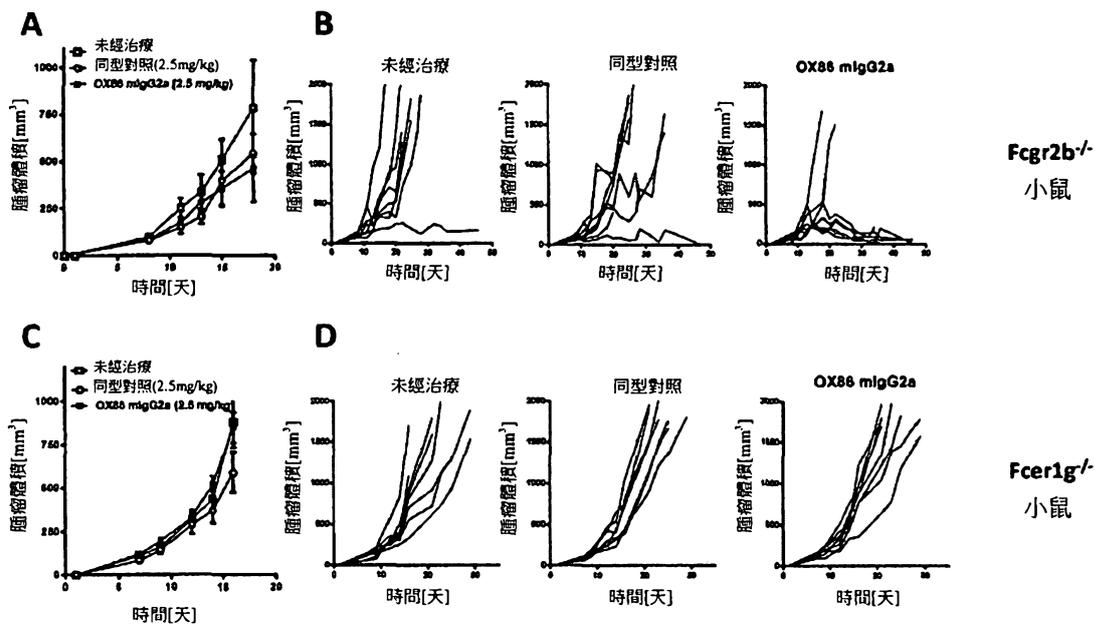


圖 37

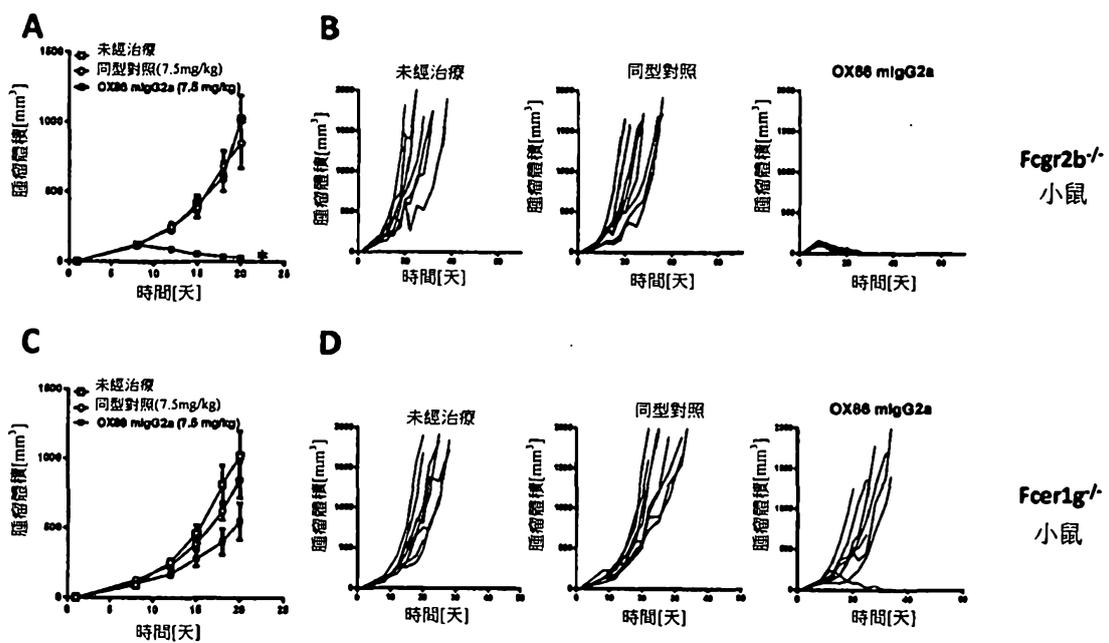


圖 38

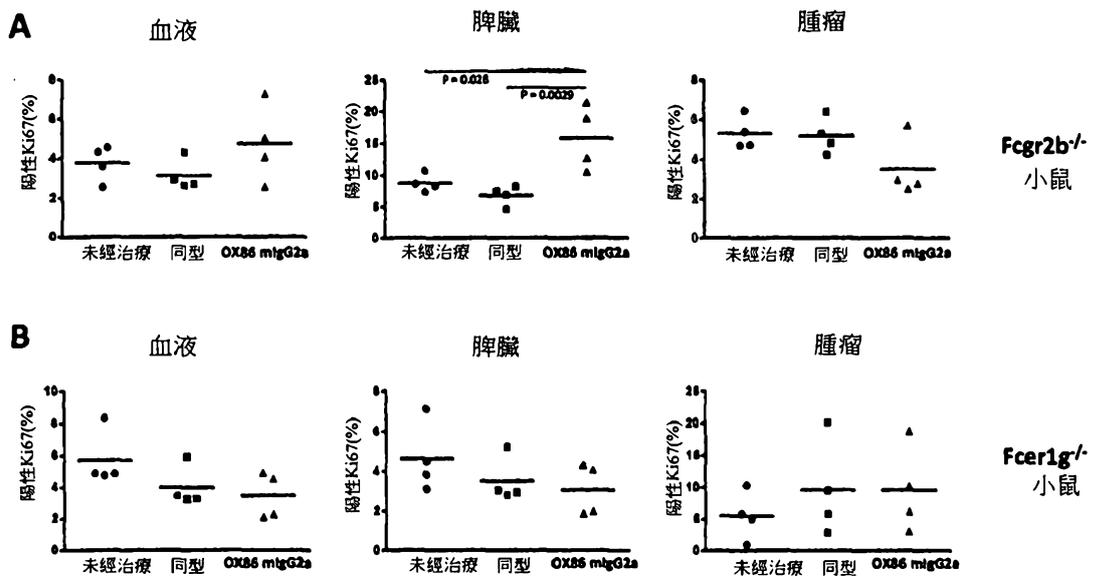


圖 39

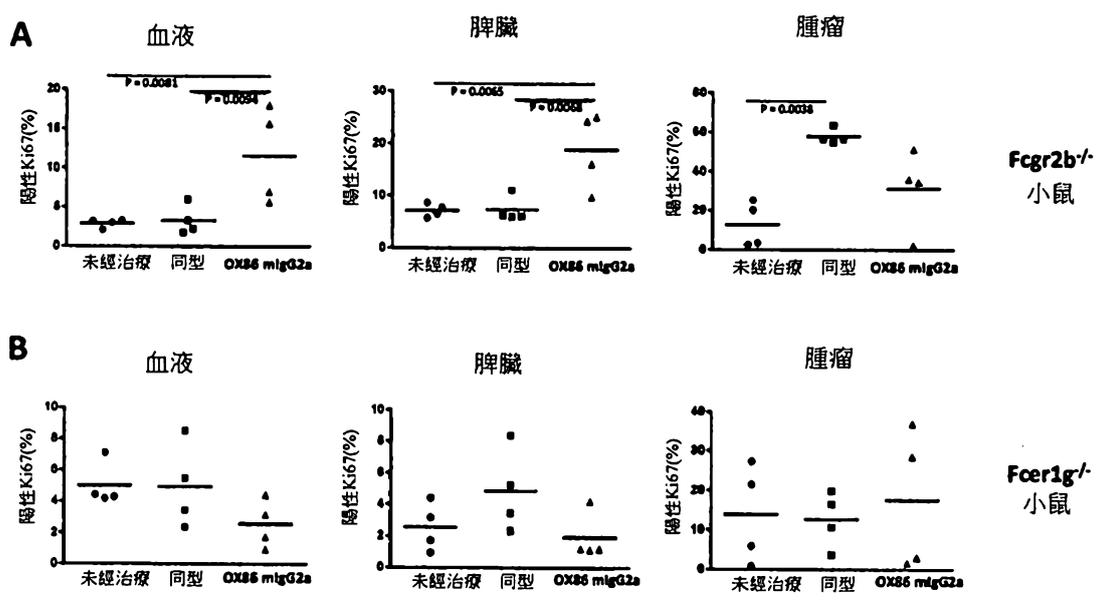


圖 40

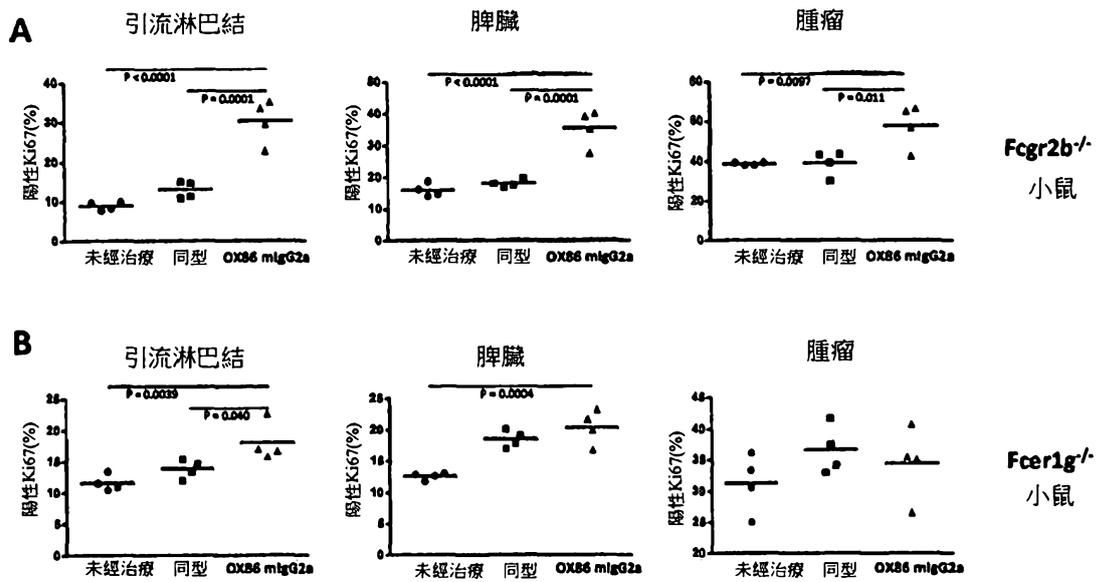


圖 41

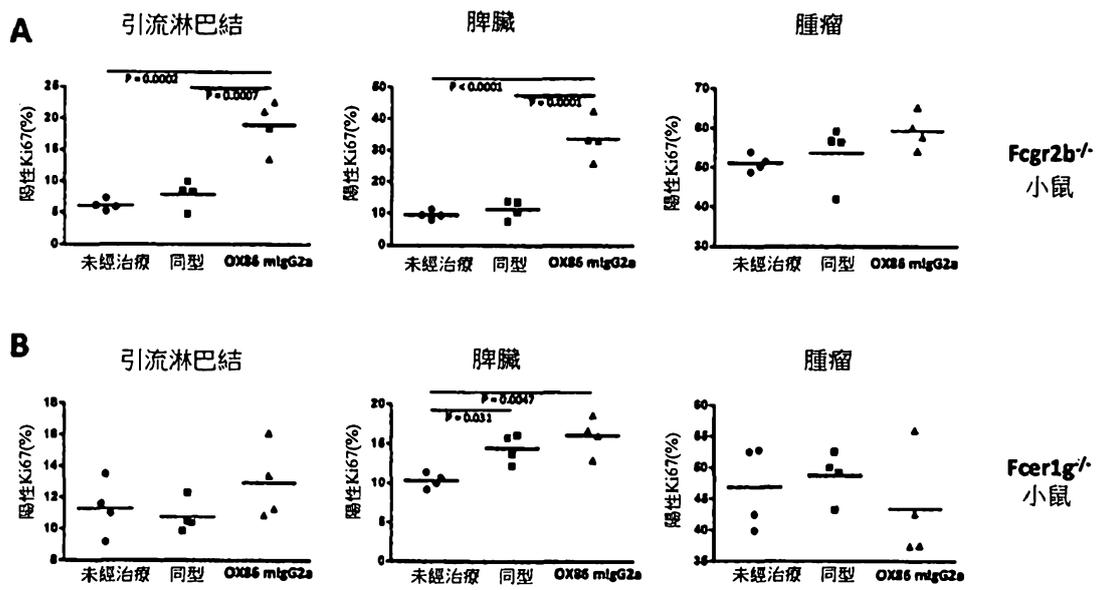


圖 42

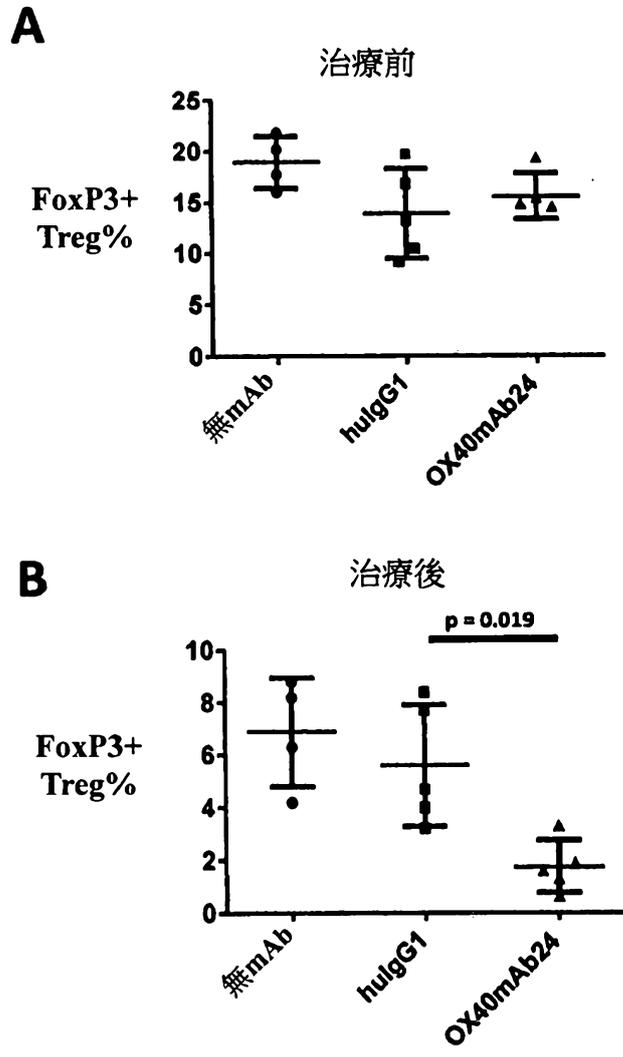


圖 43

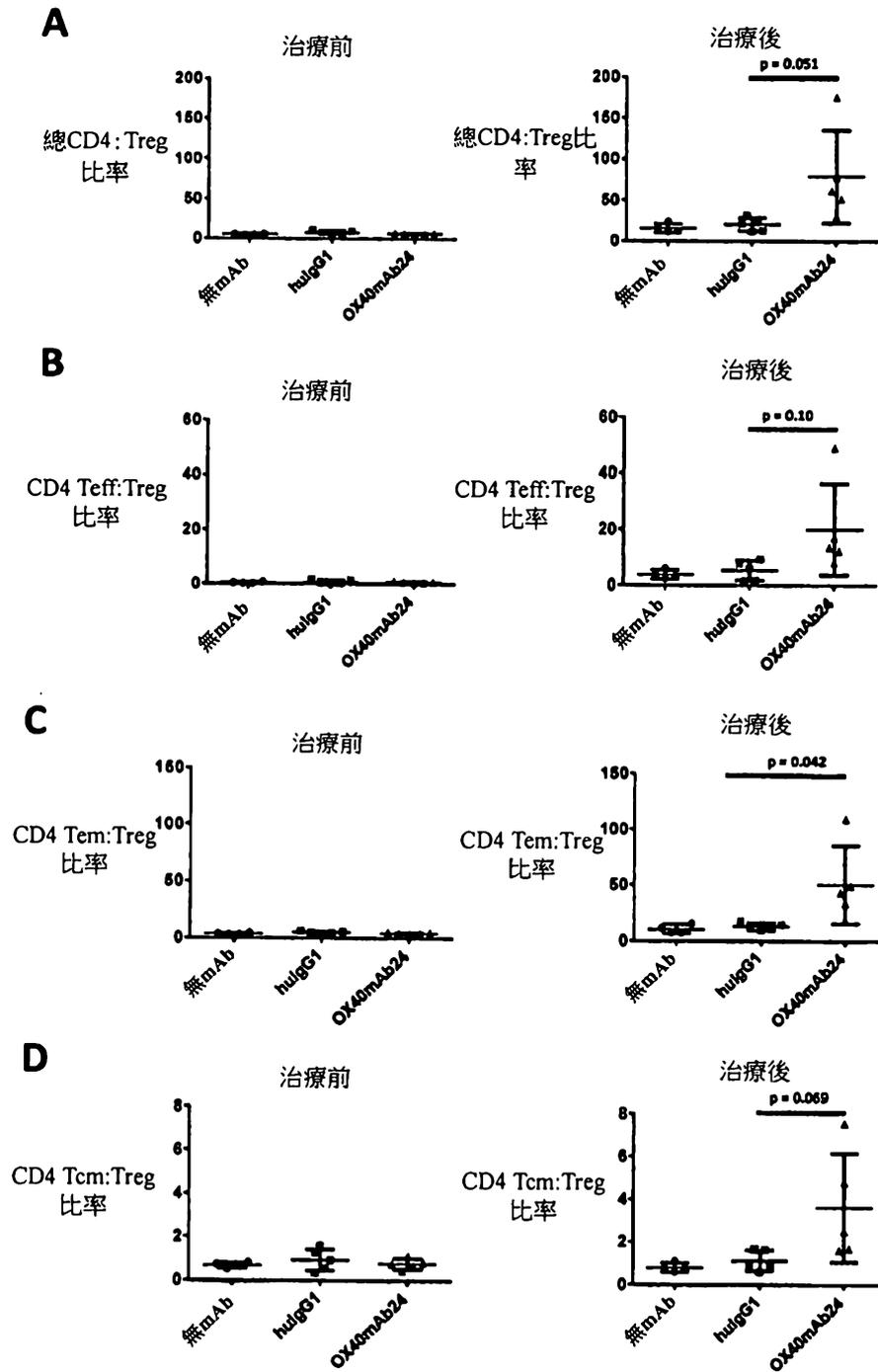


圖 44A-D

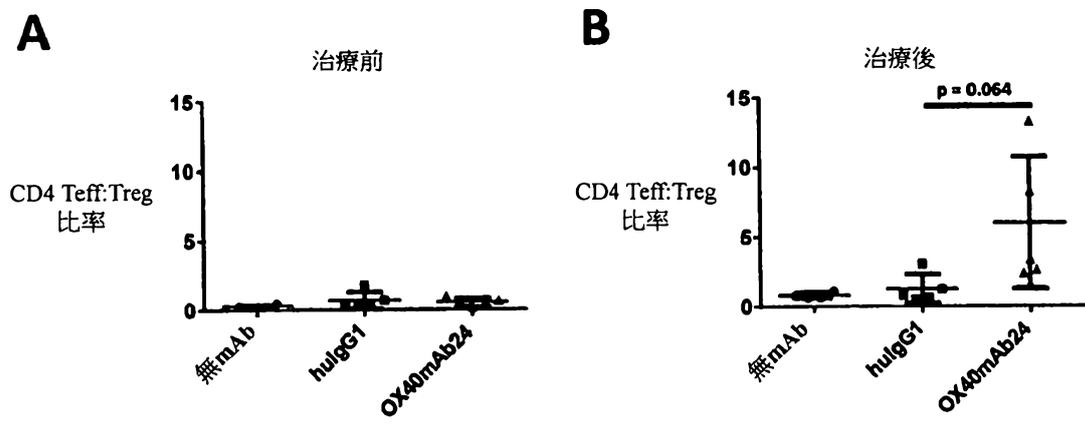


圖 45

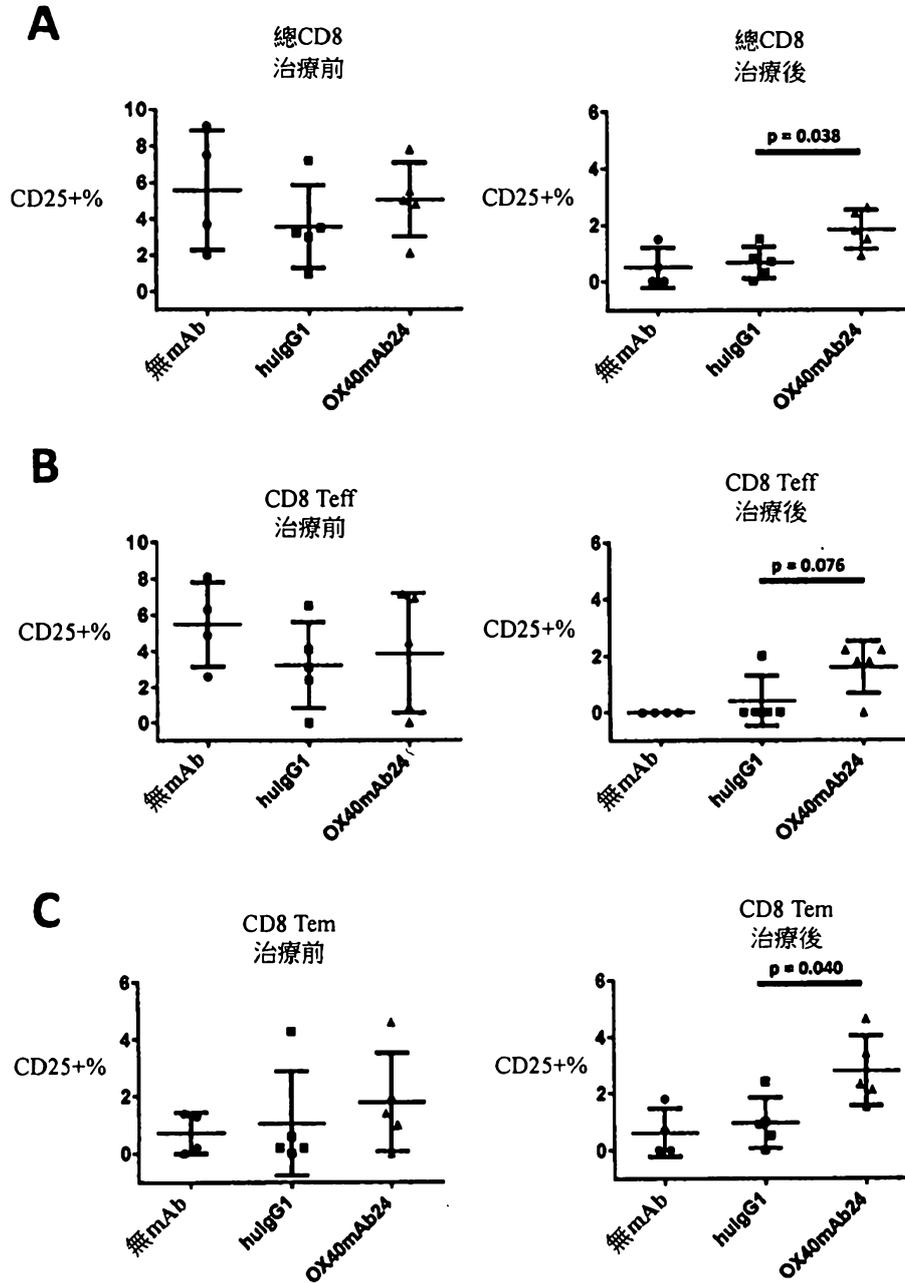


圖 46