

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045547**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.05**

(21) Номер заявки  
**202092460**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.05.22**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К ОХ40 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **PCT/CN2018/088101**

(32) **2018.05.23**

(33) **CN**

(43) **2021.03.24**

(86) **PCT/CN2019/088013**

(87) **WO 2019/223733 2019.11.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БЕЙДЖИН, ЛТД. (КУ)**

(72) Изобретатель:  
**Лю Е, Чжан Тун, Ван Цзобай, Ли Кан  
(CN)**

(74) Представитель:  
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.  
(RU)**

(56) **WO-A1-2017063162  
WO-A1-2016139482  
WO-A2-2018031490**

---

(57) В изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека (ACT35, CD134 или TNFRSF4), фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, и применение антитела или композиции для лечения заболевания, такого как рак. В частности, антитело к ОХ40 по изобретению не препятствует связыванию ОХ40-лиганда с его рецептором.

---

**B1**

**045547**

**045547**

**B1**

### Область техники

В данном документе раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим OX40, композиция, содержащая указанное антитело, а также способы применения для лечения рака.

#### Предшествующий уровень техники

OX40 (также известный как ACT35, CD134 или TNFRSF4) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I приблизительно 50 кДа, и член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF - tumor necrosis factor receptor super family) (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). Зрелый человеческий OX40 состоит из 249 аминокислотных (а.к.) остатков, с цитоплазматическим хвостом из 37 а.к. и внеклеточной областью из 185 а.к. Внеклеточный домен OX40 содержит три полных и один неполный цистеин-богатый домен (CRD - cysteine-rich domain). Внутриклеточный домен OX40 содержит один консервативный мотив QEE, связанный с сигнализацией, который опосредует связывание с несколькими TNFR-ассоциированными факторами (TRAF), включая TRAF2, TRAF3 и TRAF5, делая возможным связывание OX40 с внутриклеточными киназами (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017).

OX40 исходно был раскрыт на активированных CD4 T-клетках крысы, и мышинные и человеческие гомологи впоследствии клонировали из T-клеток (al-Shamkhani et al., 1996; Calderhead et al., 1993). Помимо экспрессии на активированных CD4<sup>+</sup> T-клетках, включая клетки T-хэлперы (Th) 1, клетки Th2, клетки Th17, а также регуляторные T (Treg)-клетки, экспрессия OX40 также была обнаружена на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> T-клеток, естественных T-клеток-киллеров (NK - Natural Killer), нейтрофилов и NK-клеток (Croft, 2010). Напротив, низкий уровень экспрессии OX40 обнаружен на наивных CD4 и CD8 T-клетках, а также большинстве покоящихся T-клеток памяти (Croft, 2010; Soroosh et al., 2007). Экспрессия OX40 на поверхности наивных T-клеток является временной. После активации TCR (T cell receptor - T-клеточный рецептор) уровень экспрессии OX40 на T-клетках значительно повышается за 24 часа и с пиками через 2~3 суток, продолжаясь в течение 5-6 суток (Gramaglia et al., 1998).

Лиганд для OX40 (OX40L, также известный как gp34, CD252 или TNFSF4) представляет собой один единственный лиганд для OX40. Аналогично другим членам TNFSF (суперсемейство факторов некроза опухолей), OX40L представляет собой гликопротеин типа II, который содержит 183 а.к. с внутриклеточным доменом из 23 а.к. и внеклеточным доменом из 133 а.к. (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). В природе OX40L образует гомомерный тримерный комплекс на поверхности клетки. Лиганд-тример взаимодействует с тремя копиями OX40 на поверхности контакта мономер-мономер лиганда главным образом посредством CRD1, CRD2 и частично CRD3 областей рецептора, но без участия CRD4 (Compaan and Hymowitz, 2006). OX40L главным образом экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках (APC - antigen presenting cell), включая активированные B-клетки (Stuber et al, 1995), зрелые обычные дендритные клетки (DC - dendritic cell) (Ohshima et al., 1997), плазмациитоидные DC (pDC) (Ito et al., 2004), макрофаги (Weinberg et al., 1999) и клетки Лангерганса (Sato et al., 2002). Кроме того, было обнаружено, что OX40L экспрессируется на других типах клеток, таких как NK, тучные клетки, субпопуляция активированных T-клеток, а так же эндотелиальные клетки сосудов и гладкомышечные клетки (Croft, 2010; Croft et al., 2009).

Тримеризация OX40 в результате лигирования посредством тримерного OX40L или димеризация посредством агонистических антител способствует рекрутированию и "причаливанию" адаптерных молекул TRAF2, TRAF3 и/или TRAF5 к их внутриклеточному мотиву QEE. (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017) Рекрутирование и "причаливание" TRAF2 и TRAF3 могут дополнительно приводить к активации как канонического NF-κB1, так и неканонического NF-κB2 путей, которые играют ключевые роли в регуляции выживаемости, дифференциации, размножении, продукции цитокинов и эффекторных функций T-клеток (Croft, 2010; Gramaglia et al., 1998; Huddlestone et al., 2006; Rogers et al., 2001; Ruby and Weinberg, 2009; Song et al., 2005a; Song et al., 2005b; Song et al., 2008).

В нормальных тканях уровень экспрессии OX40 является низким и главным образом она происходит на лимфоцитах в лимфоидных органах (Durkop et al., 1995). Однако, повышающая регуляция экспрессии OX40 на иммунных клетках часто наблюдалась как в животных моделях, так и у пациентов, являющихся человеком, с патологическими состояниями (Redmond and Weinberg, 2007), такими как аутоиммунные заболевания (Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Szyrowska et al., 2014) и раковые заболевания (Kjaergaard et al., 2000; Vetto et al., 1997; Weinberg et al., 2000). Примечательно, повышенный уровень экспрессии OX40 ассоциирован с более длительной выживаемостью у пациентов с раком толстой и прямой кишки и меланомой кожи, и обратно пропорционально коррелирует с возникновением удаленных метастазов и признаков опухолей более поздних стадий (Ladanyi et al., 2004; Petty et al., 2002; Sarff et al., 2008). Также было показано, что лечение антителами к OX40 могло вызывать противоопухолевую эффективность в разных мышинных моделях (Aspesslagh et al, 2016), указывая на потенциал OX40 в качестве иммунотерапевтической мишени. В первом клиническом испытании у пациентов с раком, проводимом Curti et al., наблюдали подтверждение противоопухолевой эффективности и активации опухолеспецифичных T-клеток с агонистическими моноклональными антителами к OX40, что указывало на то, что антитела к OX40 полезны в стимулировании противоопухолевых T-клеточных ответов (Curti et al., 2013).

Механизм действия агонистических антител к OX40 в посредничестве противоопухолевой эффективности исследован главным образом в мышинных моделях опухолей (Weinberg et al., 2000). До недавнего времени механизм действия агонистических антител к OX40 в опухолях объясняли их способностью запускать костимулирующий сигнальный путь в эффекторных Т-клетках, а также ингибирующим действием на дифференциацию и функции клеток Treg (Aspeslagh et al., 2016; Ito et al., 2006; St Rose et al., 2013; Voo et al., 2013). Недавние исследования показали, что как в животных моделях опухолей, так и у пациентов с раком, Treg, инфильтрирующие опухоль, экспрессируют OX40 на более высоких уровнях, чем эффекторные Т-клетки (как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>) и Treg периферической крови (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016). Вследствие этого, вторичные эффекты, посредством которых антитела к OX40 запускают противоопухолевые ответы, обусловлены их Fc-опосредованными эффекторными функциями в истощении внутриопухолевых OX40 Treg-клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC - antibody-dependent cytotoxicity) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP - antibody-dependent cellular phagocytosis) (Aspeslagh et al., 2016; Bulliard et al., 2014; Marabelle et al., 2013a; Marabelle et al., 2013b; Smyth et al., 2014). Данная работа демонстрирует, что агонистические антитела к OX40 с эффекторной функцией, опосредованной Fc, могли предпочтительно истощать внутриопухолевые Treg и улучшать отношения CD8 эффекторных Т-клеток к Treg в микроокружении опухоли (TME - tumor microenvironment), приводя к улучшенным противоопухолевым иммунным ответам, увеличенной регрессии опухоли и улучшенной выживаемости (Bulliard et al., 2014; Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Marabelle et al., 2013b). Как следует из этих данных, существует неудовлетворенная медицинская потребность в разработке агонистических антител к OX40 как с агонистическими активностями, и так и эффекторными функциями, опосредованными Fc.

На настоящий момент агонистические антитела к OX40 в лечебном учреждении представляют собой главным образом лиганд-конкурентные антитела, которые блокируют взаимодействие OX40-OX40L (например, WO2016196228A1). Поскольку взаимодействие OX40-OX40L является существенным для усиления эффективного противоопухолевого иммунитета, блокада OX40-OX40L ограничивает эффективность данных лиганд-конкурентных антител. Таким образом, антитела-агонисты к OX40, которые специфично связываются с OX40, одновременно не препятствуя взаимодействию OX40 с OX40L, обладают полезностью в лечении рака и аутоиммунных расстройств.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение направлено на агонистические антитела к OX40 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые активируют OX40 и индуцируют сигнализацию в иммунных клетках, стимулируя, таким образом, противоопухолевый иммунитет.

В одном воплощении согласно изобретению предложены моноклональные антитела, которые связываются с человеческим OX40, или их антигенсвязывающие фрагменты. В одном аспекте антитело по настоящему изобретению не конкурирует с OX40L или не мешает связыванию OX40 с его лигандом OX40L.

Настоящее изобретение охватывает следующие воплощения.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с человеческим OX40 и содержит: (i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область тяжелой цепи) 1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область легкой цепи) 1 с SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8; (ii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 18, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8; (iii) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 13, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7, и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8; или (iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 содержит: (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 28; (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 22; (iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 14, и переменную область

легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 16; или (iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 % идентичную SEQ ID NO: 11.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где в SEQ ID NO: 26, 28, 20, 22, 14, 16, 9, и/или 11 имеются инсерции, делеции или замены одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит: (i) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 28; (ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 22; (iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 16; или (iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 11.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизованное антитело, человеческое сконструированное антитело, одноцепочечное антитело (scFv), Fab фрагмент, Fab' фрагмент или F(ab')<sub>2</sub> фрагмент.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое обладает OX40-агонистической активностью.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 на эпитопе, содержащем один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153-D170 человеческого OX40.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 на уровне эпитопа, содержащего один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153, T154, I165, E167 и D170 человеческого OX40.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 на уровне эпитопа, содержащего один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153, I165 и E167 человеческого OX40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 на уровне эпитопа, содержащего один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из H153, I165 и E167 человеческого OX40.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 на или в пределах SEQ ID NO. 30.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим OX40 при равновесной константе диссоциации (K<sub>D</sub>), равной или более высокой, чем 7,28 нМ, 9,47 нМ, 13,5 нМ или 17,1 нМ, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR - surface plasmon resonance).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) или комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC -complement-dependent cytotoxicity).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет пониженный уровень гликозилирования или не имеет гликозилирование или является гипогликозилированным.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное содержание структур, имеющих ветвление в точках GlcNac.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где домен Fc принадлежит к IgG1.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где домен Fc принадлежит к IgG4.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где IgG4 имеет замену S228P (в соответствии с системой нумерации EU).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где IgG4 имеет замены S228P и R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое имеет одно или более из следующих свойств:

- (i) способно вступать в перекрестную реакцию с супоOX40;
- (ii) не препятствует взаимодействию OX40-OX40L;
- (iii) способно стимулировать Т-клетку, в частности, при EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация), равной или превышающей 0,06 нг/мл;
- (iv) способно активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетку, в частности, как измерено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR - mixed lymphocyte reaction);
- (v) способно опосредовать ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность), в частности, как измерено в анализе ADCC на основе высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH - lactate dehydrogenase);

(vi) способно истощать CD4<sup>+</sup> Treg;

(vii) способно увеличивать отношение CD8 Teff (эффекторная Т-клетка)/Treg; или

(viii) способно опосредовать частичную регрессию опухоли в животной модели опухоли.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Способ, где рак включает рак молочной железы, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и т.д., но не ограничивается ими.

Способ, где антитело или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.

Способ, где терапевтическое средство представляет собой паклитаксел или средство на основе паклитаксела, доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубин, леналидомид, 5-азацитидин.

Способ, где терапевтическое средство представляет собой средство на основе паклитаксела, леналидомид или 5-азацитидин.

Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту.

Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение из культуры антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении или снижения вероятности: рака молочной железы, рака головы и шеи, рака желудка, рака почки, рака печени, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака кожи, мезотелиомы, лимфомы, лейкоза, миеломы и саркомы.

Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое мечено.

Диагностический реагент, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего средства и иона металла.

В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или определяющих комплементарность более областей (CDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (HCDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 5; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (LCDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 8.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (HCDR), которые представляют собой HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 24; и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (LCDR), которые представляют собой LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 25; LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 19; и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В другом воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (HCDR), которые представляют собой HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;



(с) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

В одном воплощении антитело по настоящему изобретению принадлежит к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В более конкретном воплощении антитело по настоящему изобретению содержит домен Fc человеческого IgG1 дикого типа (также называемого человеческим IgG1wt или huIgG1) или IgG2. В другом воплощении антитело по настоящему изобретению содержит домен Fc человеческого IgG4 с заменами S228P и/или R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

В одном воплощении антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания ( $K_D$ ) от  $1 \times 10^{-6}$  М до  $1 \times 10^{-10}$  М. В другом воплощении антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания ( $K_D$ ) примерно  $1 \times 10^{-6}$  М, примерно  $1 \times 10^{-7}$  М, примерно  $1 \times 10^{-8}$  М, примерно  $1 \times 10^{-9}$  М или примерно  $1 \times 10^{-10}$  М.

В другом воплощении антитело к человеческому OX40 по настоящему изобретению демонстрирует межвидовую активность связывания с OX40 яванского макака.

В одном воплощении антитело к OX40 по настоящему изобретению связывается с эпитопом человеческого OX40 за пределами зоны взаимодействия OX40-OX40L. В другом воплощении антитело к OX40 по настоящему изобретению не конкурирует с лигандом OX40, связывающимся с OX40. В еще одном воплощении антитело к OX40 по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие OX40 с его лигандом OX40L.

Антитела по настоящему изобретению являются агонистическими и значительно усиливают иммунный ответ. Согласно изобретению предложен способ анализа агонистической способности антител к OX40. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению может значимо стимулировать продукцию первичными Т-клетками IL-2 (интерлейкин-2) в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

В одном воплощении антитела по настоящему изобретению имеют сильные Fc-опосредованные эффекторные функции. Антитела опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) к OX40<sup>hi</sup> клеткам-мишеням, таких как регуляторные Т-клетки (клетки Treg), под действием NK-клеток. В одном аспекте согласно изобретению предложен способ оценки опосредованного антителом к OX40 *in vitro* истощения конкретных Т-клеточных субпопуляций в зависимости от разных уровней экспрессии OX40.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению не блокируют взаимодействие OX40-OX40L. Кроме того, антитела к OX40 демонстрируют дозозависимую противоопухолевую активность *in vivo*, как показано на животных моделях. Дозозависимая активность отличается от профиля активности антител к OX40, которые блокируют взаимодействие OX40-OX40L.

Настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В одном воплощении выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VH SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27, и кодирует область VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. В качестве альтернативы или дополнительно, выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 29, или нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 29, и кодирует область VL антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент и возможно фармацевтически приемлемый эксципиент.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к OX40 в терапевтически эффективном количестве. В другом воплощении заболевание, подлежащее лечению антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

Настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к OX40 для лечения заболевания, такого как рак или аутоиммунные заболевания.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение конструкций OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и

OX40-His. ECD OX40: внеклеточный домен OX40. N: N-конец. C: C-конец.

На фиг. 2 показано определение аффинности очищенных химерных (ch445) и гуманизированных (445-1, 445-2, 445-3 и 445-3 IgG4) антител к OX40 посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фиг. 3 продемонстрировано определение связывания OX40 посредством проточной цитометрии. OX40-позитивные NuT78/OX40 клетки инкубировали с разными антителами к OX40 (антитела ch445, 445-1, 445-2, 445-3 и 445-3 IgG4) и подвергали анализу FACS (fluorescence-activated cell sorting - сортировка клеток с активированной флуоресценцией). Результат показан посредством средней интенсивности флуоресценции (MFI - mean fluorescence intensity, ось Y).

На фиг. 4 показано связывание антител к OX40 посредством проточной цитометрии. NuT78/OX40- и NuT78/супоOX40-клетки окрашивали антителом 445-3, и посредством проточной цитометрии определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, показано по оси Y).

На фиг. 5 изображено определение аффинности Fab 445-3 в отношении OX40 дикого типа и точечные мутации посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фиг. 6 подробно показаны взаимодействия между антителом 445-3 и его эпитопами на OX40. Антитело 445-3 и OX40 изображены светло-серым и черным, соответственно. Водородные связи или солевой мостик,  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг и ван-дер-ваальсово (VDW - Van der Waals) взаимодействие показаны пунктирными, двойными пунктирными и сплошными линиями, соответственно.

На фиг. 7 показано, что антитело 445-3 не препятствует связыванию OX40L. Перед окрашиванием HEK293/OX40L-клеток, слитый белок OX40-мышинный IgG2a (OX40-mIgG2a) предварительно инкубировали с человеческим IgG (+HuIgG), антителом 445-3 (+445-3) или антителом 1A7.gr1 (+1A7.gr1, см. США 2015/0307617) в молярном соотношении 1:1. Связывание OX40L с комплексом OX40-mIgG2a/антитело к OX40 определяли посредством совместной инкубации HEK293/OX40L-клеток с комплексом OX40-mIgG2a/антитело к OX40 с последующим взаимодействием с вторичным Ab к мышинному IgG и посредством проточной цитометрии. Результаты показаны в следующем виде: среднее плюс/минус SD (Standard Deviation - стандартное отклонение) двух повторностей. Статистическая значимость: \*: P меньше 0,05; \*\*: P меньше 0,01.

На фиг. 8 показано структурное выравнивание OX40/Fab 445-3 с описанным комплексом OX40/OX40L (код PDB (Protein Data Bank - банк данных трехмерных структур белков и нуклеиновых кислот): 2HEV). OX40L показан белым, Fab 445-3 показано серым и OX40 показан черным.

На фиг. 9А, В показано, что антитело к OX40 445-3 вызывает продукцию IL-2 совместно со стимулирующей TCR. OX40-позитивные NuT78/OX40 клетки (фиг. 9А) совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (APC) (HEK293/OS8<sup>Low</sup>-FcγRI) в присутствии антител к OX40 в течение ночи, и продукцию IL-2 использовали в качестве регистрируемой величины для стимуляции Т-клеток (фиг. 9В). IL-2 в супернатанте культуры выявляли посредством ELISA. Результаты показаны следующим образом: среднее плюс/минус SD трех повторностей.

На фиг. 10 показано, что антитела к OX40 усиливают ответы MLR. In vitro дифференцированные дендритные клетки (DC) совместно культивировали с аллогенными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в присутствии антител к OX40 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 суток. IL-2 в супернатанте выявляли посредством ELISA. Все анализы проводили в четырех повторностях, и результаты показывали в следующем виде: среднее плюс/минус SD. Статистическая значимость: \*: P меньше 0,05; \*\*: P меньше 0,01.

На фиг. 11 показано, что антитело к OX40 445-3 вызывает ADCC. Анализ ADCC проводили с использованием клеток NK92MI/CD16V в качестве эффекторных клеток и NuT78/OX40-клеток в качестве клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или контролей. Равные количества эффекторных клеток и клеток-мишеней совместно культивировали в течение 5 часов перед выявлением высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). Процент цитотоксичности (ось Y) рассчитывали на основе протокола от производителя, как описано в примере 12. Результаты показаны следующим образом: среднее плюс/минус SD трех повторностей.

На фиг. 12А-12С показано, что антитело к OX40 445-3 в комбинации с НК-клетками увеличивает отношения CD8 эффекторных Т-клеток к Treg в активированных PBMC (human peripheral blood mononuclear cell - мононуклеарные клетки периферической крови человека) in vitro. Человеческие PBMC предварительно активировали PMA-L (1 мкг/мл) и затем совместно культивировали с клетками NK92MI/CD16V в присутствии антител к OX40 или контроля. Процентные содержания разных субпопуляций Т-клеток определяли посредством проточной цитометрии. Дополнительно рассчитывали отношения CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток к Treg. На фиг. 12А показано отношение CD8 /общее число Т-клеток. Фиг. 12В представляет собой отношение Treg/Общее число Т-клеток. На фиг. 12С показано отношение CD8 /Treg. Данные показаны в виде среднего плюс/минус SD двух повторностей. Показана статистическая значимость между 445-3 и 1A7.gr1 при указанных концентрациях. \*: P меньше 0,05; \*\*: P меньше 0,01.

На фиг. 13А, 13В показано, что антитело к OX40 445-3, а не 1 A7.gr1, обнаруживает дозозависимую противоопухолевую активность на сингенной модели рака толстой и прямой кишки MC38 у OX40-

гуманизированных мышей. Мышиные клетки карциномы толстой кишки MC38 ( $2 \times 10^7$ ) подкожно имплантировали самкам мышей, трансгенных по человеческому OX40. После рандомизации в соответствии с объемом опухоли животным внутривенно инъецировали либо антитела к OX40, либо изотипический контроль один раз в неделю три раза, как указано. На фиг. 13А проведено сравнение возрастающих доз антитела 445-3 с возрастающими дозами антитела 1A7.gr1 и уменьшения роста опухоли. На фиг. 13В представлены данные по всем мышам, обработанным той конкретной дозой. Данные представлены, как средний объем опухоли плюс/минус стандартная ошибка среднего (SEM - standard error of the mean) с 6 мышами на группу. Статистическая значимость: \*: P меньше 0,05, в сравнении с изотипическим контролем.

Фиг. 14А, 14В представляет собой таблицу изменений аминокислотного состава, которые были сделаны в антителах к OX40.

### Определения

Если особым образом не определено еще где-либо в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятные рядовому специалисту в данной области.

В том виде, в котором они используются в данном документе, включая прилагаемую формулу изобретения, слова в единственном числе включают соответствующие ссылки на них во множественном числе, если контекстом явно не продиктовано иное.

Термин "или" используется для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если контекстом явно не продиктовано иное.

Термин "противораковое средство", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к любому средству, которое можно использовать для лечения нарушения пролиферации клеток, такого как рак, включая цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и радиотерапевтические средства, противораковые средства направленного действия и иммунотерапевтические средства, но, не ограничиваясь ими.

Термин "OX40" относится к трансмембранному гликопротеину типа I приблизительно 50 кДа, члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. OX40 также известен как ACT35, CD134 или TNFRSF4. Аминокислотную последовательность человеческого OX40 (SEQ ID NO: 1) можно также обнаружить с учетным номером NP\_003318, и нуклеотидная последовательность, кодирующая белок OX40, представляет собой учетный номер: X75962.1. Термин "лиганд OX40" или "OX40L" относится к одному единственному лиганду OX40 и является взаимозаменяемым с gp34, CD252 или TNFSF4.

Термины "введение", "осуществление введения", "лечение" и "обработка", в данном документе, при применении к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означают приведение экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического средства или композиции в контакт с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки охватывает приведение реагента в контакт с клеткой, а также приведение реагента в контакт с жидкостью, где данная жидкость находится в контакте с клеткой. Термин "введение" и "обработка" также означает обработки *in vitro* или *ex vivo*, например клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин "субъект" в данном документе включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например, крысу, мышь, собаку, кошку, кролика) и наиболее предпочтительно человека. Лечение любого заболевания или расстройства относится в одном аспекте к улучшению состояния при заболевании или расстройстве (а именно, замедлению или купированию или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте термин "лечить", "лечение" или "обработка" относится к облегчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая параметры, которые могут не быть заметны пациенту. В еще одном аспекте термин "лечить", "лечение" или "обработка" относится к модулированию заболевания или расстройства, или физически (например, стабилизация выраженного симптома) или физиологически (например, стабилизация физического параметра), или и так и так. В еще одном аспекте термин "лечить", "лечение" или "обработка" относится к предотвращению или задержке возникновения или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

Термин "субъект" в контексте настоящего изобретения представляет собой млекопитающее, например, примата, предпочтительно высшего примата, например, человека (например, пациента, имеющего или подвергающегося риску иметь расстройство, описанное в данном документе).

Термин "аффинность", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном. В пределах антигена вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует за счет нековалентных сил с антигеном на множестве участков; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

Термин "антитело", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов, который может связывать соответствующий антиген нековалентно, обратимо и специфичным образом. Например, встречающееся в природе антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две (L) легкие цепи, взаимосвя-

занные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно в данном документе VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно в данном документе VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Термин "антитело" включает моноклональные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела к идиотипическим антителам (anti-Id), но не ограничивается ими. Антитела могут принадлежать к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

В некоторых воплощениях антитела к OX40 содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий участок или по меньшей мере вариабельную область. В некоторых воплощениях антитела к OX40 содержат антигенсвязывающий фрагмент от антитела к OX40, описанного в данном документе. В некоторых воплощениях антитело к OX40 является выделенным или рекомбинантным.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" или "Mab" в данном документе означает популяцию по существу однородных антител, а именно молекулы антитела, содержащиеся в данной популяции, являются идентичными по аминокислотной последовательности за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, традиционные препараты (поликлональных) антител обычно включают множество разных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, особенно в своих определяющих комплементарность областях (CDR), которые часто являются специфичными в отношении разных эпитопов. Определение "моноклональный" указывает на характер антитела, получаемого по существу из однородной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. См., например, Kohler et al, Nature 1975 256:495-497; Пат. США № 4376110; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992; Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993. Антитела, раскрытые в данном документе, могут принадлежать к классу иммуноглобулинов, включающему IgG, IgM, IgD, IgE, IgA, и любому его подклассу, как например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Гибридому, продуцирующую моноклональное антитело, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры моноклональных антител можно получать при продукции *in vivo*, при которой клетки от отдельных гибридом инъецируют внутрибрюшинно мышам, таким как в первоначальном виде премированные мыши Balb/c, с получением свободной жидкости брюшной полости, содержащей высокие концентрации желательных антител. Моноклональные антитела изотипа IgM или IgG могут быть очищены из таких свободных жидкостей брюшной полости или супернатантов культуры, используя методы колоночной хроматографии, хорошо известные специалистам в данной области.

В общем, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую цепь" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую цепь" (примерно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область примерно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. C-концевая часть тяжелой цепи может определять константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Обычно, человеческие легкие цепи относятся к легким цепям каппа и лямбда. Кроме того, человеческие тяжелые цепи обычно относятся к  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  или  $\mu$ , и определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей вариабельные и константные области соединены "J" областью из примерно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает "D" область из еще примерно 10 аминокислот.

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи (VL/VH) образуют связывающий сайт антитела. Таким образом, в общем, интактное антитело имеет два связывающих сайта. За исключением бифункциональных или биспецифичных антител, данные два связывающих сайта обычно являются одинаковыми.

Обычно, вариабельные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гипервариабельные области, также называемые "определяющими комплементарность областями (CDR)", которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR). CDR обычно выравнены по каркасным областям, что обеспечивает связывание с конкретным эпитопом. В общем, от N-конца к C-

концу вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепей содержат FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (или FR3), CDR-3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Положения CDR и каркасных областей можно определять, используя разные хорошо известные определения в данной области, например, Kabat, Chothia и AbM (см., например, Johnson et al, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). Определения антигенсвязывающих сайтов также описаны в следующих источниках: Ruiz et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); и Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); и Rees et al., In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996). В комбинированной схеме нумерации Кабата и Чотиа в некоторых воплощениях CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR Кабат, CDR Чотиа или и того и другого. Например, CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HC CDR1), 50-65 (HC CDR2) и 95-102 (HC CDR3) в VH, например, VH млекопитающего, например, VH человека; и аминокислотным остаткам 24-34 (LC CDR1), 50-56 (LC CDR2) и 89-97 (LC CDR3) в VL, например, VL млекопитающего, например, VL человека.

Под термином "гипервариабельная область" подразумеваются аминокислотные остатки антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки от "CDR" (а именно, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 в вариабельном домене легкой цепи и VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 в вариабельном домене тяжелой цепи). См., Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); см. также Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре). Термин "FR" остатки или остатки "каркасной области" означают остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, определенных в данном документе, как остатки CDR.

Если особым образом не указано иное, термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает антигенсвязывающие фрагменты антител, а именно фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном, который связывается полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются фрагментами Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диателами; линейными антителами; молекулами одноцепочечных антител, например, одноцепочечным Fv (ScFv); нанотелами и мультиспецифичными антителами, образованными из фрагментов антител.

Антитело "специфично связывается" с белком-мишенью, означая, что антитело демонстрирует предпочтительное связывание с той мишенью, в отличие от других белков, но данная специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается "специфичным" в отношении его предполагаемой мишени, если ее связывание определяет наличие белка-мишени в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложно-положительные. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полезные в настоящем изобретении, будут связываться с белком-мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз больше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз больше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз больше, чем аффинность с белками, не являющимися мишенью. Говорят, что антитело в данном документе специфично связывается с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например, аминокислотную последовательность молекулы человеческого OX40, если оно связывается с полипептидами, содержащими ту последовательность, но не связывается с белками, не содержащими той последовательности.

Термин "человеческое антитело" в данном документе означает антитело, которое содержит только человеческие последовательности белка - иммуноглобулина. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи при продуцировании в мыши, в клетке мыши или в гибридоме, происходящей из мышинной клетки. Аналогично, термины "мышинное антитело" или "крысиное антитело" обозначают антитело, которое содержит только последовательности белка - иммуноглобулина мыши или крысы, соответственно.

Термин "гуманизованное антитело" означает формы антител, которые содержат последовательности от антител, не являющихся человеческими (например, мышинных), а также человеческие антитела. Такие антитела содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. В общем, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одной и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все из FR областей представляют собой FR области человеческой последовательности иммуноглобулина. Гуманизованное антитело возможно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константной области иммуноглобулина человека. Префикс "hum", "hu", "Hu" или "h" добавляют к обозначениям клонов антитела, когда необходимо провести различие между гуманизованными антителами и исходными антите-

лами грызунов. Гуманизированные формы антител грызунов обычно будут содержать те же последовательности CDR исходных антител грызунов, хотя определенные аминокислотные замены могут быть включены для повышения аффинности, повышения стабильности гуманизированного антитела, удаления посттрансляционной модификации или по другим причинам.

Термин "соответствующая последовательность зародышевой линии человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей человеческую аминокислотную последовательность варибельной области, или подпоследовательности, которая разделяет наивысшую определенную идентичностью аминокислотных последовательностей с референсной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью варибельной области, в сравнении со всеми другими известными аминокислотными последовательностями варибельной области, кодируемыми последовательностями варибельной области иммуноглобулина зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может также относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности варибельной области человека с наиболее высокой идентичностью аминокислотных последовательностей с референсной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью варибельных областей, в сравнении со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями варибельных областей. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может представлять собой только каркасные области, только определяющие комплементарность области, каркасные области и определяющие комплементарность области, варибельный сегмент (как определено выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат варибельную область. Идентичность последовательностей можно определять, используя способы, описанные в данном документе, например, выравнивая две последовательности с использованием BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в данной области. Соответствующая нуклеотидная или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может по меньшей мере примерно на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательностям с референсной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью варибельной области.

Термин "равновесная константа диссоциации ( $K_D$ , M)" относится к константе скорости диссоциации ( $k_d$ , время<sup>-1</sup>), деленной на константу скорости ассоциации ( $k_a$ , время<sup>-1</sup>, M<sup>-1</sup>). Равновесные константы диссоциации могут быть измерены, используя любой известный способ в данной области. Антитела по настоящему изобретению обычно будут иметь равновесную константу диссоциации меньше чем примерно  $10^{-7}$  или  $10^{-8}$  M, например, меньше чем примерно  $10^{-9}$  M или  $10^{-10}$  M, в некоторых аспектах меньше чем примерно  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M или  $10^{-13}$  M.

Термины "рак" или "опухоль" в данном документе имеют самое широкое значение, которое подразумевается в данной области, и относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. В контексте настоящего изобретения рак не ограничивается определенным типом или локализацией.

Термин "комбинированная терапия" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящем изобретении. Такое введение охватывает совместное введение данных терапевтических средств по существу одновременно. Такое введение также охватывает совместное введение в многосоставных или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разведены до желательной дозы перед введением. Кроме того, такое введение также охватывает применение каждого типа терапевтического средства последовательно, или приблизительно в одно и то же время, или в разные моменты времени. В любом случае схема лечения будет обеспечивать полезное действие комбинации лекарственных средств при лечении состояний или расстройств, описанных в данном документе.

В контексте настоящего изобретения, когда ссылаются на аминокислотную последовательность, термин "консервативная замена" означает замену исходной аминокислоты новой аминокислотой, которая по существу не меняет химических, физических и/или функциональных свойств антитела или фрагмента, например, его аффинности связывания с OX40. Конкретно, часто встречающиеся консервативные замены аминокислот показаны в следующей таблице и хорошо известны в данной области.

Иллюстративные консервативные аминокислотные замены.

Исходный аминокислотный остаток	Однобуквенный и трехбуквенный коды	Консервативная замена
Аланин	A или Ala	Gly; Ser

Аргинин	R или Arg	Lys; His
Аспарагин	N или Asn	Gln; His
Аспарагиновая кислота	D или Asp	Gln; Asn
Цистеин	C или Cys	Ser; Ala
Глутамин	Q или Gln	Asn
Глутаминовая кислота	E или Glu	Asp; Gln
Глицин	G или Gly	Ala
Гистидин	H или His	Asn; Gln
Изолейцин	I или Ile	Leu; Val
Лейцин	L или Leu	Ile; val
Лизин	K или Lys	Arg; His
Метионин	M или Met	Leu; Ile; Tyr
Фенилаланин	F или Phe	Tyr; Met; Leu
Пролин	P или Pro	Ala
Серин	S или Ser	Thr
Треонин	T или Thr	Ser
Триптофан	W или Trp	Tyr; Phe
Тирозин	Y или Tyr	Trp; Phe
Валин	V или Val	Ile; Leu

Примеры алгоритмов, которые подходят для определения выраженных в процентах идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST, которые описаны в Altschul et al, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST находится в открытом доступе через Национальный центр биотехнологической информации. Данный алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP - high scoring sequence pair) посредством идентификации коротких слов длиной  $W$  в искомой последовательности, которые подходят под пару или соответствуют некому пороговому показателю сходства с положительным значением  $T$  при выравнивании со словом той же длины в последовательности базы данных.  $T$  называют порогом показателя совпадения соседних слов. Данные исходные совпадения соседних слов действуют в качестве значений для начала поиска для нахождения более длинных содержащих их HSP. Совпадения слов продолжают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания может быть увеличен. Совокупные показатели рассчитывают, используя, в случае нуклеотидных последовательностей, параметры  $M$  (поощрительный балл для пары совпадающих остатков; всегда больше 0) и  $N$  (штрафной балл для несовпадающих остатков; всегда меньше 0). В случае аминокислотных последовательностей для расчета совокупного показателя используют весовую матрицу. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращают, когда: совокупный показатель выравнивания снижается на количественную величину  $X$  со своего максимально достигаемого значения; совокупный показатель приближается к нулю или ниже вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательным показателем; или достигается конец одной из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10,  $M$  равен 5,  $N$  равен минус 4 и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей программа BLAST использует по умолчанию длину слова 3 и ожидание ( $E$ ) 10, и весовую матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915), число выравниваний ( $B$ ) 50, ожидание ( $E$ ) 10,  $M$  равен 5,  $N$  равен -4, и сравнение обеих нитей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Одним критерием сходства, предложенным алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), которая обеспечивает показатель вероятности, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокис-

лотных последовательностей случайно произойдет. Например, нуклеиновая кислота считается похожей на референсную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении анализируемой нуклеиновой кислоты с референсной нуклеиновой кислотой, меньше чем примерно 0,2, более предпочтительно меньше чем примерно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше чем примерно 0,001.

Выраженная в процентах идентичность двух аминокислотных последовательностей может быть определена с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17, (1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафом за удлинение гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме того, выраженная в процентах идентичность двух аминокислотных последовательностей может быть определена с использованием Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, (1970), алгоритма, который включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG с использованием или матрицы BLOSUM62, или матрицы PAM250 и штрафа за гэп 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за удлинение 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Термин "нуклеиновая кислота" используется в данном документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам или в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, включая известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки остова или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют похожие свойства связывания, как у референсной нуклеиновой кислоты, и которые метаболизируются путем, аналогичным референсным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфотиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA - peptide-nucleic acid).

Термин "функционально связанный" в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной связи между двумя или более сегментами полинуклеотидов (например, ДНК). Обычно, он относится к функциональной связи последовательности регуляции транскрипции с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе. Обычно, промоторные последовательности, регулирующие транскрипцию, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически прилегают к транскрибируемой последовательности, а именно, они являются цис-действующими. Однако, некоторые регуляторные последовательности, регулирующие транскрипцию, такие как энхансеры, не обязательно должны физически прилегать или располагаться в непосредственной близости к кодирующим последовательностям, чью транскрипцию они усиливают.

В некоторых аспектах согласно настоящему изобретению предложены композиции, например, фармацевтически приемлемые композиции, которые включают антитело к OX40, описанное в данном документе, составленные вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любой или все растворители, дисперсионные среды, изотонические агенты и агенты, замедляющие поглощение, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии).

Композиции, раскрытые в данном документе, могут находиться в самых разных формах. Данные формы включают, например, жидкие, полужидкие и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Подходящая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные подходящие композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. Одним подходящим способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный). В некоторых воплощениях антитело вводят посредством внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых воплощениях антитело вводят посредством внутримышечной или подкожной инъекции.

Термин "терапевтически эффективное количество", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к количеству антитела, которое, при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства, является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, расстройства или симптома. "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от антитела, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста субъекта, подлежащего лечению, и/или массы субъекта, подлежащего лечению. Соответствующее количество в любом приведенном примере может быть очевидным специалистам в данной области и может быть определено общепринятыми экспериментами. В случае комбинированной терапии "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству объектов комбинации для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

### Подробное описание

Согласно настоящему изобретению предложены антитела, антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают человеческий OX40. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые имеют желательные фармакокинетические характеристики и другие желательные признаки, и, таким образом, могут быть использованы для снижения вероятности или лечения рака. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела и способы получения и использования таких фармацевтических композиций для предупреждения и лечения рака и ассоциированных расстройств.

Антитела к OX40.

Согласно настоящему изобретению предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, образованными, как описано ниже.

Согласно настоящему изобретению предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40, где указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат VH домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, 20 или 26 (табл. 3). Согласно настоящему изобретению также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связывают OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR VH, содержащую аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в табл. 3. В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40, где указанные антитела содержат (или в качестве альтернативы состоят из) одну, две, три или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в табл. 3.

Согласно настоящему изобретению предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат домен VL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 22 или 28 (табл. 3). Согласно настоящему изобретению также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR VL, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VL, перечисленных в табл. 3. В частности, согласно изобретению предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с OX40, причем указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат (или в качестве альтернативы состоят из) одну, две, три или более CDR VL, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VL, перечисленных в табл. 3.

Другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают аминокислоты, которые были мутированы, еще обладают выраженной в процентах идентичностью по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99% в областях CDR с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных в табл. 3. В некоторых аспектах включены мутантные аминокислотные последовательности, где не больше чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR, по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательности, описанной в табл. 3.

Другие антитела по настоящему изобретению включают антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, мутированы; еще обладают выраженной в процентах идентичностью по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или 99 % с последовательностями, описанными в табл. 3. В некоторых аспектах включены мутантные аминокислотные последовательности, где не больше чем 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот мутированы в переменных областях при сравнении с переменными областями, изображенными в последовательности, описанными в табл. 3, сохраняя по существу ту же терапевтическую активность.

Согласно настоящему изобретению также предложены последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфично связываются с OX40. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

Идентификация эпитопов и антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом

Согласно настоящему изобретению предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом человеческого OX40. В некоторых аспектах антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с одним и тем же эпитопом OX40.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, как и антитела к OX40, описанные в табл. 3. Дополнительные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут, таким образом, быть идентифицированы в зависимости от их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания. Способность анализируемого антитела ингибировать связывание антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с OX40 демонстрирует то, что анализируемое антитело может конкурировать с тем антителом или его антигенсвязывающим фрагментом за связывание с OX40. Такое антитело может,

не будучи связанными какой-либо одной теорией, связываться с тем же или родственным (например, структурно похожим или пространственно близким) эпитопом на ОХ40, как и антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, с которыми оно конкурирует. В конкретном аспекте антитело, которое связывается с тем же эпитопом на ОХ40, как и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело. Такие человеческие или гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в данном документе.

Дополнительное изменение каркаса области Fc

В еще одних аспектах область Fc изменена посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка отличным аминокислотным остатком с изменением эффекторных функций антитела. Например, одну или более аминокислот можно заменить отличным аминокислотным остатком, таким образом, чтобы антитело обладало измененным сродством в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, в отношении которого изменена аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Данный подход описан, например, в пат. США №№ 5624821 и 5648260, оба принадлежат Winter et al.

В другом аспекте один или более аминокислотных остатков можно заменить одним или более отличными аминокислотными остатками, таким образом, чтобы антитело имело измененное C1q связывание и/или уменьшенную или аннулированную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Данный подход описан, например, в пат. США № 6194551 Idusogie et al.

В еще одном аспекте один или более аминокислотных остатков изменены с изменением, вследствие этого, способности антитела фиксировать комплемент. Данный подход описан, например, в РСТ публикации WO 94/29351 Bodmer et al. В конкретном аспекте одна или более аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменены одним или более аллотипическими аминокислотными остатками, в случае подкласса IgG1 и изотипа каппа. Аллотипические аминокислотные остатки также включают константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа, как описано Jefferis et al., MAbs. 1:332-338 (2009), но не ограничиваются ими.

В другом аспекте область Fc модифицирована для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышать аффинность антитела к Fcγ-рецептору посредством модификации одной или более аминокислот. Данный подход описан, например, в РСТ Публикации WO 00/42072 Presta. Кроме того, сайты связывания на человеческом IgG1 для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы, и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

В еще одном аспекте модифицировано гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (а именно, антитело не имеет или обладает пониженным уровнем гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, с повышением аффинности антитела в отношении "антигена". Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, посредством изменения одного или более сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, может быть сделана одна или более аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или более сайтов гликозилирования каркаса варибельной области с устранением, таким образом, гликозилирования в данном сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход описан, например, в пат. США № 5714350 и № 6350861 Co et al.

Кроме того или в качестве альтернативы может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное содержание структур, имеющих ветвление в точках GlcNac. Такие измененные профили гликозилирования продемонстрированы для увеличения ADCC-способности антител. Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, посредством экспрессирования антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела с продукцией, вследствие этого, антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 Hang et al. описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование. В РСТ публикации WO 03/035835 Presta описан вариант линии клеток CHO (Chinese Hamster Ovary - яичник китайского хомяка), клетки Lec13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в той клетке-хозяине (см. также Shields et al, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В РСТ публикации WO 99/54342 Umana et al. описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, чтобы антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях,

демонстрировали повышенное содержание структур, имеющих ветвление в точках GlcNac, что приводит к повышенной ADCC активности антител (см. также Umana et al., *Nat. Biotech.* 17:176-180, 1999).

В другом аспекте, если желательное уменьшение ADCC, подкласс человеческого антитела IgG4, как было показано во многих предыдущих отчетах, обладает лишь умеренной ADCC и у него почти отсутствует CDC-эффекторная функция (Moore G L, et al. 2010 *MAbs*, 2:181-189). С другой стороны, природный IgG4, как было обнаружено, менее стабилен в стрессовых условиях, как например, в кислотном буфере или при возрастании температуры (Angal, S. 1993 *Mol Immunol*, 30:105-108; Dall'Acqua, W. et al, 1998 *Biochemistry*, 37:9266-9273; Aalberse et al. 2002 *Immunol*, 105:9-19). Пониженная ADCC может быть достигнута посредством функционального связывания антитела с IgG4, сконструированного с комбинациями изменений для снижения или исключения активностей связывания FcγR или Clq, таким образом, снижая или устраняя эффекторные функции ADCC и CDC. Рассматривая физико-химические свойства антитела в качестве биологического лекарственного средства, одним из менее желательных внутренних свойств IgG4 является динамическое разделение его двух тяжелых цепей в растворе с образованием полуантитела, что приводит к получению биспецифичных антител, образованных *in vivo* посредством процесса, называемого "обменом Fab-фрагментами" (Van der Neut Kolfshoten M, et al. 2007 *Science*, 317:1554-157). Мутация серина до пролина в положении 228 (система нумерации EU) оказалась ингибиторной для разделения тяжелых цепей IgG4 (Angal, S. 1993 *Mol Immunol*, 30:105-108; Aalberse et al. 2002 *Immunol*, 105:9-19). Сообщалось, что некоторые из аминокислотных остатков в шарнирной области и области γFc влияют на взаимодействие антитела с Fcγ-рецепторами (Chappel S M, et al. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9036-9040; Mukherjee, J. et al., 1995 *FASEB J*, 9:115-119; Armour, K. L. et al. 1999 *Eur J Immunol*, 29:2613-2624; Clynes, R. A. et al, 2000 *Nature Medicine*, 6:443-446; Arnold J. N., 2007 *Annu Rev Immunol*, 25:21-50). Кроме того, некоторые редко встречающиеся изоформы IgG4 в человеческой популяции могут также вызывать разные физико-химические свойства (Brusco, A. et al. 1998 *Eur J Immunogenet*, 25:349-55; Aalberse et al. 2002 *Immunol*, 105:9-19). Для получения антител к OX40 с низкой ADCC, CDC и нестабильностью возможно модифицировать шарнирную область и область Fc человеческого IgG4 и вводить целый ряд изменений. Данные модифицированные молекулы Fc IgG4 могут быть обнаружены в SEQ ID NO: 83-88, Патент США № 8735553 Li et al.

Получение антител к OX40.

Антитела к OX40 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены любыми средствами, известными в данной области, включая, но, не ограничиваясь рекомбинантной экспрессией, химическим синтезом и ферментативным расщеплением тетрамеров антител, тогда как полноразмерные моноклональные антитела могут быть получены посредством, например, гибридомы или рекомбинантной продукции. Рекомбинантная экспрессия может происходить из любых соответствующих клеток-хозяев, известных в данной области, например, клеток-хозяев млекопитающего, бактериальных клеток-хозяев, дрожжевых клеток-хозяев, клеток-хозяев насекомого и т. д.

Согласно изобретению дополнительно предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела, описанные в данном документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области тяжелой или легкой цепей или сегменты, содержащие определяющие комплементарности области, как описано в данном документе. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи по меньшей мере на 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 идентичен нуклеотидным последовательностям с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 21 или 27. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи по меньшей мере на 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен нуклеотидным последовательностям с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 23 или 29.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать последовательность переменной области антитела к OX40. Они могут также кодировать как переменную область, так и константную область антитела. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит переменные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из иллюстративных антител к OX40. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два сегмента полипептида, которые соответственно по существу идентичны переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из мышиных антител.

Также в настоящем изобретении предложены экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения антител к OX40. Выбор экспрессионного вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен экспрессироваться вектор. Обычно, экспрессионные векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь антитела к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах индуцируемый промотор используется для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей за исключением тех, которые находятся под контролем индуцирующих условий. Индуцируемые промоторы включают, например, промотор арабинозы, *lacZ*, металлотиюнеина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть размножены в неиндуцирующих условиях, не оказывая влияния на популяцию в отношении кодирующих последовательностей, чьи про-

дукты экспрессии лучше переносятся клетками-хозяевами. Помимо промоторов, другие регуляторные элементы также могут требоваться или быть желательными для эффективной экспрессии антитела к ОХ40 или антигенсвязывающего фрагмента. Данные элементы обычно включают старт-кодон АТГ и соседний сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть усилена включением энхансеров, свойственных используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al, *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV может использоваться для повышения уровня экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающего.

Клетки-хозяева для переноса и экспрессии цепей антитела к ОХ40 могут являться или прокариотическими, или эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, полезным для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие хозяева-микробы, подходящие для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и разные виды *Pseudomonas*. В данных прокариотических хозяевах можно также создавать экспрессионные векторы, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое число из множества хорошо известных промоторов, таких как система лактозного промотора, система триптофанового промотора (*trp*), система бета-лактамазного промотора или система промоторов от фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно посредством последовательности - оператора, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микробы, такие как дрожжи, могут также использоваться для экспрессии полипептидов к ОХ40. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с векторами на основе бакуловирусов.

В других аспектах клетки-хозяева млекопитающего используются для экспрессии и продукции полипептидов к ОХ40 по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой или линию клеток гибридомы, экспрессирующую гены эндогенного иммуноглобулина, или линию клеток млекопитающего, несущую экзогенный экспрессионный вектор. Данные клетки включают любую нормальную мортализованную или нормальную или ненормальную иммортализованную клетку животного или человека. Например, был разработан целый ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток CHO, разные линии клеток COS (клетки почки обезьяны, трансформированные вирусом SV-40), клетки НЕК 293, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение культуры клеток ткани млекопитающего для экспрессии полипептидов обычно обсуждается, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987. Экспрессионные векторы для клеток-хозяев млекопитающего могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al, *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), и необходимые сайты процессинга информационной РНК, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Данные экспрессионные векторы обычно содержат промоторы, происходящие из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными в отношении типа клетки, специфичными в отношении стадии развития и/или модулируемыми или регулируемыми. Полезные промоторы включают, но не ограничиваются промотором металлотронеина, конститутивным аденовирусным главным поздним промотором, дексаметазон-индуцибельным промотором MMTV (mouse mammary tumor virus - вирус опухоли молочной железы мыши), промотором SV40, промотором MRP polIII, конститутивным промотором MPSV (myeloproliferative sarcoma virus - миелолифферативный вирус саркомы), тетрациклин-индуцибельным промотором CMV (cytomegalovirus цитомегаловирус) (таким как человеческий промотор гена немедленного - раннего ответа CMV), конститутивным промотором CMV и комбинациями промотора-энхансера, известными в данной области.

Способы выявления и диагностики.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению полезны во множестве применений, включая способы выявления ОХ40, но, не ограничиваясь ими. В одном аспекте антитела или антигенсвязывающие фрагменты полезны для выявления наличия ОХ40 в биологическом образце. Термин "выявление", в том виде, в котором он используется в данном документе, включает количественное или качественное выявление. В некоторых аспектах биологический образец содержит клетку или ткань. В других аспектах такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани, которые экспрессируют ОХ40 на более высоких уровнях, относительно других тканей.

В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ выявления наличия ОХ40 в биологическом образце. В некоторых аспектах способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом к ОХ40 в условиях, являющихся перmissive в отношении связывания антитела с антигеном, и выявление того, образуется ли комплекс между антителом и антигеном. Биологический образец может включать, без ограничения, образцы мочи или крови.

Также включен способ диагностирования расстройства, ассоциированного с экспрессией ОХ40. В некоторых аспектах способ включает приведение анализируемой клетки в контакт с антителом к ОХ40;

определение уровня экспрессии (или количественно или качественно) ОХ40 в анализируемой клетке посредством выявления связывания антитела к ОХ40 с полипептидом ОХ40; и сравнение уровня экспрессии в анализируемой клетке с уровнем экспрессии ОХ40 в контрольной клетке (например, нормальной клетке того же тканевого происхождения, как и в случае анализируемой клетки или клетки, не экспрессирующей ОХ40), где более высокий уровень экспрессии ОХ40 в анализируемой клетке, по сравнению с контрольной клеткой, указывает на наличие расстройства, ассоциированного с экспрессией ОХ40.

Способы лечения.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению полезны в большом количестве применений, включая, но, не ограничиваясь способами лечения ОХ40-ассоциированного расстройства или заболевания. В одном аспекте ОХ40-ассоциированное расстройство или заболевание представляет собой рак.

В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения рака. В некоторых аспектах способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела к ОХ40 или антигенсвязывающего фрагмента. Рак может включать, без ограничений, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому и саркому.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно вводить любым подходящим средством, включая парентеральное, внутривенное и интраназальное, и, при необходимости для местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, посредством инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично, в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В данном документе рассматриваются разные схемы дозирования, включающие, но не ограничивающиеся одиночным или многократным введениями на протяжении разных моментов времени, болюсным введением и импульсной инфузией.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могли бы быть приготовлены, дозированы и введены путем, согласующимся с хорошей медицинской практикой. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное заболевание, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело не обязательно должно быть, но возможно приготовлено посредством одного или более агентов, используемых в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество других таких агентов зависит от количества антитела, находящегося в препарате, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Данные агенты обычно используются в таких же дозировках и посредством путей введения, как описано в данном документе, или примерно от 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и посредством любого пути, который эмпирически/клинически определен как целесообразный.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая дозировка антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в целях предупреждения или с терапевтической целью, предыдущей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и усмотрения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту один раз или на протяжении целого ряда курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно от 1 до 100 мг/кг антитела может являться исходной возможной дозировкой для введения пациенту, будь то, например, посредством одного или более отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. Одна типичная ежедневная дозировка могла бы находиться в интервале от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг и больше, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Для повторных введений на протяжении нескольких суток или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно будет продолжаться до наступления желательного подавления симптомов заболевания. Такие дозы могут быть введены с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз антитела). Можно вводить исходную более высокую нагрузочную дозу с последующей одной или более низкими дозами. Однако, могут быть полезны другие схемы дозировки. Результативность данной терапии с легкостью отслеживали посредством традиционных методик и анализов.

Комбинированная терапия.

В одном аспекте антитела к ОХ40 по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с другими терапевтическими средствами. Другие терапевтические средства, которые можно использовать с антителами к ОХ40 по настоящему изобретению, включают: химиотерапевтическое средство (например, паклитаксел или средство на основе паклитаксела; (например, Абраксан®), доцетаксел; карбоплатин; топотекан; цисплатин; иринотекан, доксорубин, леналидомид, 5-азациитидин, ифосфамид, оксалиплатин, пеметрексед натрия, циклофосфамид, этопосид, децитабин, флударабин, винкристин, бендамустин, хлорамбуцил, бусульфан, гемцитабин, мелфалан, пентостатин, митоксантрон, пеметрексед ди-

натрия), ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (epidermal growth factor receptor - рецептор эпидермального фактора роста) (например, эрлотиниб), ингибитор мультикиназ (например, MGCD265, RGB-286638), средство, нацеленное на CD-20 (например, ритуксимаб, офатумумаб, RO5072759, LFB-R603), средство, нацеленное на CD52 (например, алемтузумаб), преднизолон, дарбепоэтин альфа, леналидомид, ингибитор Vc1-2 (например, облимерсен натрия), ингибитор аврора-киназы (например, MLN8237, TAK-901), ингибитор протеасом (например, бортезомиб), средство, нацеленное на CD-19 (например, MEDI-551, MOR208), ингибитор MEK (например, АВТ-348), ингибитор JAK-2 (например, INCB018424), ингибитор mTOR (например, темсиролимус, эверолимус), ингибитор BCR/ABL (например, иматиниб), антагонист рецептора ET-A (например, ZD4054), агонист рецептора TRAIL 2 (TR-2) (например, CS-1008), ингибитор HGF/SF (например, AMG 102), EGEN-001, ингибитор Polo-подобной киназы 1 (например, BI 672), но не ограничиваются ими.

Фармацевтические композиции и препараты.

Также предложены композиции, включая фармацевтические препараты, содержащие антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых воплощениях композиции содержат одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40, или один или более полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40. Данные композиции могут дополнительно содержать подходящие носители, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области.

Фармацевтические препараты антитела к OX40 или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в данном документе, получают посредством смешивания такого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, обладающего желательной степенью чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но не ограничиваются следующими носителями: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; пирокатехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (меньше чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в данном документе дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в интерстициальном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины - гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины - гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы применения, включающие rHuPH20, описаны в Патенте США № 7871607 и № 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяют с одной или более дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Иллюстративные лиофилизированные препараты антитела описаны в Патенте США № 6267958. Водные препараты антитела включают препараты, описанные в патенте США № 6171586 и WO2006/044908, причем последние препараты включают гистидин-ацетатный буфер.

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, матрицы которых находятся в форме частиц, имеющих определенную форму, например, пленок или микрокапсул.

Препараты, подлежащие применению для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко реализована, например, посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

### Примеры

Пример 1. Получение моноклонального антитела к OX40.

Моноклональные антитела к OX40 получали на основе общепринятой гибридомной технологии на основе слияния (de StGroth and Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1) с незначительными модификациями. Антитела с высокой активностью связывания в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) и анализе сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS - fluorescence-activated cell sorting) отбирали для осуществления дальнейшей характери-

зации.

Рекомбинантные белки OX40 для анализов иммунизации и связывания кДНК, кодирующую полно-размерный человеческий OX40 (SEQ ID NO: 1), синтезировали посредством Sino Biological (Пекин, Китай) на основе последовательности GenBank (учетный номер: X75962.1). Кодировующую область сигнального пептида и внеклеточный домен (ECD - extracellular domain), состоящий из аминокислот (а.к.) 1-216 OX-40 (SEQ ID NO: 2), амплифицировали посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция) и клонировали в самостоятельно разработанные экспрессионные векторы с С-концом, слитым с доменом Fc мышиного IgG2a, доменом Fc тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа или His-меткой, что приводило к получению трех экспрессионных плазмид рекомбинантных слитых белков, OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His, соответственно. Схематичное изображение слитых белков OX40 показано на фиг. 1. Для получения рекомбинантных слитых белков OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His осуществляли временную трансфекцию клеток 293G экспрессионными плазмидами и культивировали в течение 7 суток в инкубаторе CO<sub>2</sub>, оснащенный вращающимся шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и осветляли посредством центрифугирования. OX40-mIgG2a и OX40-huIgG1 очищали, используя колонку с белком А (кат.№: 17-5438-02, GE Life Sciences). OX40-His очищали, используя колонку с Ni-сефарозой (кат.№: 17-5318-02, GE Life Science). Осуществляли диализ белков OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His против фосфатно-солевого буферного раствора (PBS - phosphate buffered saline) и хранили в морозилке при минус 80°C в маленьких аликвотах.

Клеточные линии со стабильной экспрессией.

Для получения стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный человеческий OX40 (OX40) или OX40 яванского макака (супоOX40), данные гены клонировали в ретровирусный вектор pFB-Neo (кат. №: 217561, Agilent, США). Ретровирусную трансдукцию проводили на основе ранее описанного протокола (Zhang et al, 2005). Осуществляли ретровирусную трансдукцию клеток HuT78 и HEK293 вирусом, содержащим человеческий OX40 или супоOX40, соответственно, с получением клеточных линий HuT78/OX40, HEK293/OX40 и HuT78/супоOX40.

Иммунизация, слияние с получением гибридомы и клонирование Мышей Balb/c в возрасте от восьми до двенадцати недель (от FIFK BIOSCIENCE CO., LTD, Пекин, Китай) иммунизировали внутрибрюшинно 200 мкл антигена в смеси, содержащей 10 мкг OX40-mIgG2a и Quick-Antibody Immuno-Adjuvant (кат. №: KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай). Процедуру повторяли через три недели. Спустя две недели после 2-ой иммунизации, мышинные сыворотки оценивали на связывание OX40 посредством ELISA и FACS. Через десять суток после осуществления скрининга сыворотки мышей с самыми высокими титрами антител к OX40 в сыворотке повторно иммунизировали посредством в.б. (внутрибрюшинной) инъекции 10 мкг OX40-mIgG2a. Трое суток после повторной иммунизации спленоциты выделяли и сливали с линией клеток миеломы мыши, клетками SP2/0 (ATCC, Manassas VA), используя стандартные методики (Somat Cell Genet, 1977 3:231).

Оценка активности связывания OX40 антителами посредством ELISA и FACS.

Осуществляли первоначальный скрининг супернатантов клонов гибридомы посредством ELISA, как описано в (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52) с некоторыми модификациями. Кратко, осуществляли покрытие 96-луночных планшетов белком OX40-His при 4°C в течение ночи. После промывки PBS/0,05 % Твин-20 планшеты блокировали PBS/3 % БСА (бычьим сывороточным альбумином) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем, планшеты промывали PBS/0,05 % Твин-20 и инкубировали с клеточными супернатантами при комнатной температуре в течение 1 часа. HRP (horse-radish peroxidase - пероксидаза хрена)-связанное антитело к мышинному IgG (кат. №: 115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, антитела козы, меченные пероксидазой, к мышинному IgG AffiniPure, специфичный Fc-фрагмент) и субстрат (кат. №: 00-4201-56, eBioscience, США) использовали для проявления сигнала поглощения при длине волны 450 нм, который измеряли посредством использования планшет-ридера (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/PHERAstar, BMG LABTECH). Позитивные исходные клоны отбирали из слияния, осуществляя скрининг посредством непрямого ELISA. ELISA-позитивные клоны дополнительно проверяли посредством FACS, используя клетки HuT78/OX40 и HuT78/супоOX40, описанные выше. OX40-экспрессирующие клетки (10 клеток/луночка) инкубировали с ELISA-позитивными супернатантами гибридных клеток с последующим связыванием с антителами к мышинному IgG eFluor® 660 (кат. №: 50-4010-82, eBioscience, США). Флуоресценцию клеток количественно оценивали, используя проточный цитометр (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, США).

Кондиционированные среды из гибридом, которые демонстрировали положительные сигналы как при ELISA-, так и FACS-скрининге, подвергали функциональным анализам для идентификации антител с хорошей функциональной активностью в анализах на основе человеческих иммунных клеток (см. следующие разделы). Антитела с желательными функциональными активностями дополнительно субклонировали и характеризовали.

Субклонирование и адаптация гибридом к среде, не содержащей сыворотку, или с низким содержанием сыворотки.

После первичного скрининга посредством ELISA, FACS и функциональных анализов, как описано

выше, позитивные клоны гибридомы субклонировали посредством предельного разведения с обеспечением клональности. Лучшие субклоны антител проверяли посредством функциональных анализов и адаптировали для роста в среде CDM4MAb (кат. №: SH30801.02, Hyclone, США) с 3 % FBS (Fetal Bovine Serum - фетальная телячья сыворотка).

Экспрессия и очистка моноклональных антител.

Клетки гибридомы, экспрессирующие лучшие клоны антител, культивировали в среде CDM4MAb (кат. №: SH30801.02, Hyclone) и инкубировали в инкубаторе CO<sub>2</sub> в течение 5-7 суток при 37°C. Кондиционированную среду собирали посредством центрифугирования и фильтровали посредством пропускания через 0,22 мкм мембрану перед очисткой. Мышиные антитела в супернатантах наносили на и осуществляли связывание с колонкой с Белком А (кат. №: 17-5438-02, GE Life Sciences) в соответствии с руководством от производителя. В результате данной процедуры обычно получали антитела с чистотой выше 90%. Антитела, очищенные посредством колонки для аффинной хроматографии с белком А, или подвергались диализу против PBS, или, при необходимости, дополнительно очищались с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex 200 (кат. №: 28-9893-35, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белка определяли посредством измерения поглощения при 280 нм. Конечные препараты антител хранили в аликвотах в морозилке при минус 80°C.

Пример 2. Клонирование и анализ последовательностей антител к OX40.

Мышиные клоны гибридомы собирали для получения тотальной клеточной РНК, используя набор Ultrapure RNA (кат. №: 74104, QIAGEN, Германия) на основе протокола производителя. Одноцепочечные кДНК синтезировали, используя набор для синтеза кДНК от Invitrogen (кат. №: 18080-051), и ПЦР-амплификацию VH и VL антител гибридомы проводили, используя набор для ПНР (кат. №: CW0686, CWBio, Пекин, Китай). Олигопраймеры, используемые для клонирования кДНК антитела вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), синтезировали в Invitrogen (Пекин, Китай) на основе последовательностей, приведенных ранее (Brocks et al. 2001 Mol Med 7:461). ПЦР-продукты использовали непосредственно для секвенирования или субклонировали в клонирующий вектор pEASY-Blunt (кат. №: CB101 TransGen, Китай), затем секвенировали с помощью Genewiz (Пекин, Китай). Аминокислотные последовательности областей VH и VL устанавливали на основе результатов секвенирования ДНК.

Определяющие комплементарность области, (CDR) мышиных антител определяли на основе системы Kabat (Wu and Kabat 1970 J. Exp. Med. 132:211-250) посредством аннотации последовательностей и посредством компьютерной программы для анализа последовательностей. Аминокислотные последовательности репрезентативного самого главного клона Mu445 (VH и VL) перечислены в табл. 1 (SEQ ID NO. 9 и 11). Последовательности CDR Mu445 перечислены в табл. 2 (SEQ ID NO. 3-8).

Таблица 1

Аминокислотные последовательности областей VH и VL Mu445

VH Mu445	SEQ ID NO: 9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFT SYIHHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDS AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTSVTVSS
VL Mu445	SEQ ID NO: 11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNY LNWYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKL PYTFGGGTKLEKK

Таблица 2

Последовательности CDR (аминокислоты) областей VH и VL мышиноного моноклонального антитела Mu445

Антитело	SEQ ID NO	CDR	Последовательность
Mu445	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIHH
	SEQ ID NO: 4	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

Пример 3. Гуманизация мышиноного антитела к человеческому OX40 445.

Гуманизация и конструирование антитела.

Для гуманизации Mu445 гены IgG зародышевой линии человека исследовали в отношении последо-

вательностей, которые разделяют высокие степени гомологии с последовательностями кДНК переменных областей Mu445, посредством сравнения последовательностей с базой данных генов иммуноглобулина человека в IMGT. Человеческие гены IGHV и IGKV, которые находятся в репертуаре антител человека с высокими частотами (Glanville et al, 2009 PNAS 106:20216-20221) и являются высоко гомологичными Mu445, отбирали в качестве матриц для гуманизации.

Гуманизацию проводили посредством CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods and Protocols, Vol 248: Humana Press), и конструировали гуманизированные антитела в формате человеческого IgG1 дикого типа посредством использования самостоятельно разработанного экспрессионного вектора. В исходном раунде гуманизации мутациями аминокислотных остатков в каркасных областях с превращением из мышинных в человеческие управляли посредством анализа смоделированной 3D структуры, и остатки мышинной каркасной области с важностью структуры для сохранения канонических структур CDR сохранялись в первой версии гуманизированного антитела 445 (см. 445-1, табл. 3). Шесть CDR 445-1 имеют аминокислотные последовательности HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO:13), HCDR3 (SEQ ID NO:5) и LCDR1 (SEQ ID NO: 6), LCDR2 (SEQ ID NO:7) и LCDR3 (SEQ ID NO:8). Варибельная область тяжелой цепи 445-1 имеет аминокислотную последовательность (VH) SEQ ID NO: 14, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 15, и варибельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность (VL) SEQ ID NO: 16, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17. Конкретно, LCDR Mu445 (SEQ ID NO: 6-8) прививали на каркас гена варибельной области зародышевой линии человека IGVK1-39 с сохранением двух остатков мышинной каркасной области (I<sub>44</sub> и Y<sub>71</sub>) (SEQ ID NO: 16). HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 13) и HCDR3 (SEQ ID NO: 5) прививали на каркас гена варибельной области зародышевой линии человека IGHV1-69 с сохранением двух остатков мышинной каркасной области (L<sub>70</sub> и S<sub>72</sub>) (SEQ ID NO: 14). В вариантах гуманизации 445 (445-1) прививали только N-концевую половину HCDR2 Kabat, поскольку прогнозировали, что только N-концевая половина была важной для связывания антигена в соответствии со смоделированной 3D структурой.

445-1 конструировали в виде гуманизированного полноразмерного антитела с использованием самостоятельно разработанных экспрессионных векторов, которые содержат константные области человеческого IgG1 дикого типа (IgG1wt) и цепь каппа, соответственно, с легкой адаптацией сайтов субклонирования. Антитело 445-1 экспрессировали посредством совместной трансфекции клеток 293G двумя приведенными выше конструкциями и очищали, используя колонку с белком А (кат. №: 17-5438-02, GE Life Sciences). Очищенное антитело концентрировали до 0,5-10 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при минус 80°C.

Используя антитело 445-1, делали несколько одиночных аминокислотных замен, превращая оставшиеся мышинные остатки в каркасной области VH и VL в соответствующие остатки зародышевой линии человека, такие как I44P и Y71F в VL и L70I и S72A в VH. Кроме того, несколько одиночных аминокислотных замен были сделаны в CDR для уменьшения риска возможной изомеризации и для повышения уровня гуманизации. Например, в LCDR2 были сделаны изменения T51A и D50E и в HCDR2 были сделаны изменения D56E, G57A и N61A. Все изменения при гуманизации были сделаны с использованием праймеров, содержащих мутации в конкретных положениях, и набора для сайтнонаправленного мутагенеза (кат. №: AP231-11, TransGen, Пекин, Китай). Желательные замены проверяли посредством секвенирования.

Аминокислотные замены в антителе 445-1 оценивали в отношении их связывания с OX40 и термостабильности. Антитело 445-2, содержащее HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 18, HCDR3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 6, LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8 (см. табл. 3), конструировали на основе комбинации конкретных замен, описанных выше. При сравнении двух антител результаты показали, что оба антитела 445-2 и 445-1 демонстрировали сопоставимую аффинность связывания (см. ниже в табл. 4 и 5).

Начиная с антитела 445-2, делали несколько дополнительных аминокислотных замен в каркасной области VL для дополнительного улучшения аффинности/кинетики связывания, например, замену аминокислот G41D и K42G. Кроме того, делали несколько одиночных аминокислотных замен в CDR как VH, так и VL, для снижения риска иммуногенности и повышения термостабильности, например, S24R в LCDR1 и A61N в HCDR2. Полученные замены демонстрировали или улучшенные активности связывания, или улучшенную термостабильность, в сравнении с 445-2.

Гуманизированные антитела 445 дополнительно конструировали посредством введения конкретных аминокислотных замен в CDR и каркасные области для улучшения молекулярных и биофизических свойств для терапевтического применения у людей. Критерии включали удаление вредных посттрансляционных модификаций, улучшенную термостабильность (T<sub>m</sub>), поверхностную гидрофобность и изоэлектрические точки (pI) при одновременном сохранении активностей связывания.

Гуманизированное моноклональное антитело, 445-3, содержащее HCDR1 с SEQ ID NO: 3, HCDR2 с SEQ ID NO: 24, HCDR 3 с SEQ ID NO: 5, LCDR1 с SEQ ID NO: 25, LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и LCDR3 с SEQ ID NO: 8 (см. табл. 3), конструировали на основе способа созревания, описанного выше, и подробно характеризовали. Антитело 445-3 также превращали в версию IgG2 (IgG2 445-3), содержащую домен Fc

тяжелой цепи дикого типа человеческого IgG2, и версию IgG4, содержащую домен Fc человеческого IgG4 с мутациями S228P и R409K (IgG4 445-3). Результаты показали, что 445-3 и 445-2 демонстрировали сопоставимую аффинность связывания (см. табл. 4 и 5).

Таблица 3

## Последовательности антител 445

Антитело	SEQ ID NO	ID	Последовательность
445-1	SEQ NO: 3	ID HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	SEQ NO: 13	ID HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	SEQ NO: 5	ID HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ NO: 6	ID LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	SEQ NO: 7	ID LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	SEQ NO: 8	ID LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	SEQ NO: 14	ID VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGY KFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGTRYNQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYW GQGTTVTVSS
SEQ NO: 16	ID VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGIS NYLNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGV PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC QQYSKLPYTFGGGTKVEIK	
445-2	SEQ NO: 3	ID HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	SEQ NO: 18	ID HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	SEQ NO: 5	ID HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ NO: 6	ID LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	SEQ NO: 19	ID LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	SEQ ID	ID LCDR3	QQYSKLPYT

	NO: 8	(Kabat)	
	SEQ ID NO: 20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGY KFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN EGTRYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYW GQGTTVTVSS
	SEQ ID NO: 22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGIS NYLNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSKLPYTFGGGTKVEIK
445-3	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (Kabat)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 24	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 25	LCDR1 (Kabat)	RASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGY KFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN EGTRYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYW GQGTTVTVSS
	SEQ ID NO: 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS NYLNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSKLPYTFGGGTKVEIK

Пример 4. Определение кинетики и аффинности связывания антител к OX40 посредством SPR.

Антитела к OX40 характеризовали в отношении их кинетики и аффинности связывания посредством анализов SPR с использованием BIACore™ T-200 (GE Life Sciences). Кратко, осуществляли иммобилизацию антитела к человеческому IgG на активированном биосенсорном чипе CM5 (кат. №: BR100530, GE Life Sciences). Антитело с областью Fc человеческого IgG пропускали через поверхность чипа и проводили захват антителом к человеческому IgG. Затем, серийное разведение рекомбинантного белка OX40 с His-меткой (кат. №: 10481-H08H, Sino Biological) пропускали через поверхность чипа, и изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса анализировали с расчетом скоростей ассоциации ( $k_a$ ) и скоростей диссоциации ( $k_d$ ) посредством использования 1:1 модели связывания Ленгмюра (ознакомительное программное обеспечение BIA, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали в виде отношения  $k_d/k_a$ . Результаты SPR-определенных профилей связывания антител к OX40 кратко обобщены на фиг. 2 и в табл. 4. Профиль связывания со средней  $K_D$  антитела 445-3 (9,47 нМ) немного лучше, чем у антитела 445-2 (13,5 нМ) и 445-1 (17,1 нМ), и похож на профиль связывания ch445. Профиль связывания IgG4 445-3 был похож на 445-3 (с Fc IgG1), указывая на то, что изменение в Fc между IgG4 и IgG1 не изменяло специфичное связывание антитела 445-3.

Таблица 4

## Аффинности связывания антител к OX40 согласно SPR

Анализируемые параметры		ch445*	445-1	445-2	445-3	IgG4 445-3
Тест 1	ka ( $M^{-1}c^{-1}$ )	$1,74 \times 10^5$	$1,56 \times 10^5$	$2,76 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$
	kd ( $c^{-1}$ )	$1,43 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-3}$	$3,90 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-3}$
	KD (нМ)	8,26	17,8	14,2	9,16	10,0
	KA ( $M^{-1}$ )	$1,22 \times 10^8$	$0,56 \times 10^8$	$0,71 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$
Тест 2	ka ( $M^{-1}c^{-1}$ )	$2,65 \times 10^5$	$2,37 \times 10^5$	$2,06 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	–
	kd ( $c^{-1}$ )	$1,67 \times 10^{-3}$	$3,89 \times 10^{-3}$	$2,64 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-3}$	–
	KD(нМ)	6,3	16,4	12,8	9,77	–
	KA ( $M^{-1}$ )	$1,59 \times 10^8$	$0,61 \times 10^8$	$0,78 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$	–
Среднее	KD(нМ)	7,28	17,1	13,5	9,47	10,0
	KA ( $M^{-1}$ )	$1,41 \times 10^8$	$0,59 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$

\*ch445 состоит из переменных доменов Mu445, слитых с константными областями IgG1wt/каппа человека

Пример 5. Определение аффинности связывания антител к OX40 с OX40, экспрессируемым на клетках NuT78.

Для оценки активности связывания антител к OX40 с OX40, экспрессируемым на поверхности живых клеток, клетки NuT78 трансфицировали человеческим OX40, как описано в примере 1, с созданием OX40-экспрессирующей линии. Живые клетки NuT78/OX40 высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с серийным разведением разных антител к OX40. Антитело козы к человеческому IgG-FITC (Cat: A0556, Veoytime) использовали в качестве вторичного антитела для выявления антитела, связывающегося с клеточной поверхностью. Значения  $EC_{50}$  для дозозависимого связывания с человеческим OX40 определяли посредством подгонки данных по зависимости доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели посредством GraphPad Prism. Как показано на фиг. 3 и табл. 5, антитела к OX40 обладали высокой аффинностью в отношении OX40. Также обнаружили, что антитела к OX40 по настоящему изобретению имели относительно более высокий верхний уровень интенсивности флуоресценции, измеряемой посредством проточной цитометрии (см. последний столбец табл. 5), что указывает на более медленную диссоциацию антитела от OX40, что является более желательным профилем связывания.

Таблица 5

 $EC_{50}$  дозозависимого связывания гуманизированных вариантов 445 с OX40

Антитело	$EC_{50}$ (мкг/мл)			Верхний уровень (MFI)
	Тест 1	Тест 2	Среднее	Среднее
ch445	0,321	0,277	0,299	725
445-1	0,293	0,278	0,285	525
445-2	0,323	0,363	0,343	620
445-3	0,337	0,319	0,328	910
IgG4 445-3	0,263	н./д.	0,263	892

Пример 6. Определение перекрестной реактивности антител к OX40.

Для оценки перекрестной реактивности антитела 445-3 в отношении человеческого OX40 и OX40 яванского макака (супо) OX40, клетки, экспрессирующие человеческий OX40 (NuT78/OX40) и супо OX40 (NuT78/супоOX40), высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с серией разведений антител к OX40. Антитело козы к человеческому IgG-FITC (кат. №: A0556, Veoytime) использовали в качестве вторичного антитела для выявления. Значения  $EC_{50}$  для дозозависимого связывания с нативными OX40 человека и яванского макака определяли посредством подгонки данных по зависимости доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели посредством GraphPad Prism. Результат показан на фиг. 4 и в следующей ниже табл. 6. Антитело 445-3 дает перекрестную реакцию как с человеческим OX40, так и с OX40 яванского макака, с похожими значениями  $EC_{50}$ , как показано ниже.

Таблица 6

EC <sub>50</sub> связывания антитела 445-3 с OX40 человека и яванского макака		
Клеточная линия	EC <sub>50</sub> (мкг/мл) 445-3	Верхний уровень (MFI)
HuT78/OX40	0,174	575
HuT78/суноOX40	0,171	594

Пример 7. Определение совместной кристаллизации и структуры OX40 с Fab 445-3.

Для понимания механизма связывания OX40 с антителами по настоящему изобретению расширяли сокристаллическую структуру OX40 и Fab 445-3. Мутации в положениях T148 и N160 вводили для блокирования гликозилирования OX40 и для улучшения однородности белка. ДНК, кодирующую мутантный человеческий OX40 (остатки M1-D170 с двумя мутантными сайтами, T148A и N160A) клонировали в экспрессионный вектор с включением метки гекса-His, и данной конструкцией временно трансфицировали клетки 293G для экспрессии белка при 37°C в течение 7 суток. Клетки собирали, и супернатант собирали и инкубировали со смолой, аффинной в отношении His-метки, при 4°C в течение 1 часа. Смолу три раза промывали буфером, содержащим 20 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl и 30 mM имидазол. Затем белок OX40 элюировали буфером, содержащим 20 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl и 250 mM имидазол с последующей дополнительной очисткой посредством Superdex 200 (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl.

Кодирующие последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Fab 445-3 клонировали в экспрессионный вектор с включением гекса-His-метки на C-конце тяжелой цепи, и осуществляли временную совместную трансфекцию клеток 293G данным вектором для экспрессии белка при 37°C в течение 7 суток. Стадии очистки Fab 445-3 были такими же, как использовались выше в случае мутантного белка OX40.

Очищенные OX40 и Fab 445-3 смешивали в молярном соотношении 1:1 и инкубировали в течение 30 минут на льду с последующей дополнительной очисткой с помощью Superdex 200 (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl. Пик комплекса собирали и концентрировали до приблизительно 30 мг/мл.

Скрининг сокристалла проводили посредством смешивания белкового комплекса с резервуарным раствором в объемном соотношении 1:1. Сокристаллы получали из "висячей капли", культивируемой при 20°C посредством диффузии пара с помощью резервуарного раствора, содержащего 0,1 M HEPES, pH 7,0, 1 % ПЭГ 2000 MME и 0,95 M сукцинат натрия.

Нейлоновые петли использовали для сбора сокристаллов, и данные кристаллы погружали в резервуарный раствор с добавлением 20% глицерина на 10 секунд. Данные по дифракции собирали на BL17U1, устройство с синхротронным излучением, Шанхай, и обрабатывали посредством программы XDS. Фазу расшифровывали посредством программы PHASER, используя структуру Fab IgG (цепи C и D PDB: 5CZX) и структуру OX40 (цепь R PDB: 2HEV) в качестве моделей исследования молекулярного замещения. Графический интерфейс Phenix.refine использовали для выполнения твердого тела, TLS, и ограниченного уточнения на основании данных рентгенографического исследования с последующей корректировкой с помощью программы COOT и дополнительным уточнением в программе Phenix.refine. Совокупность данных рентгенографического исследования и статистика уточнения кратко обобщены в табл. 7.

Таблица 7

## Совокупность данных и статистика уточнения

Совокупность данных	
Канал пучка	BL17U1, SSRF
Пространственная группа	P 31 2 1
Размер ячейки (Å)	a=183,96 b=183,96 c=79,09
Углы (°)	$\alpha$ =90,00 $\beta$ =90,00 $\gamma$ =120,00
Разрешение (Å)	159,3-2,55 (2,63-2,55)
Общее число отражений	988771 (81305)
Число характерных отражений	50306 (4625)
Завершенность (%)	99,9 (99,9)
Средняя избыточность	19,7 (17,6)
Rслияние <sup>a</sup>	0,059 (0,962)
I/сигма (I)	29,4 (3,5)
Фактор Уилсона B (Å)	73,9
Уточнение	
Разрешение (Å)	60,22-2,55
Число отражений	50008
rmsd (среднеквадратическое отклонение) длин связи (Å)	0,010
rmsd углов связи (°)	0,856
R <sub>рабоч</sub> <sup>b</sup> (%)	19,27
R <sub>свободн</sub> <sup>c</sup> (%)	21,60
Средние B-факторы белка	97,10
Карты Рамачандрана (%)	
предпочтительные	96,34
допустимые	3,48
Выбросы	0,17

Значения в скобках относятся к оболочке самого высокого разрешения.

<sup>a</sup>Rслияние =  $\frac{\sum |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum |I(h)_i|}$ , где  $\langle I(h) \rangle$  представляет собой среднюю интенсивность эквивалента.

$$^b R_{\text{рабоч}} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|},$$

где  $F_o$  и  $F_c$  представляют собой наблюдаемые и рассчитанные амплитуды структурного фактора, соответственно.

$$^c R_{\text{свободн}} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|},$$

рассчитывали с использованием набора данных анализа, 5 % суммарных данных, случайным образом выбранных из наблюдаемых отражений.

Пример 8. Идентификация эпитопа антитела 445-3 посредством SPR.

Исходя из сокристаллической структуры OX40 и антитела Fab 445-3, авторы изобретения выбирали и получали целый ряд одиночных мутаций в человеческом белке OX40 для дополнительной идентификации ключевых эпитопов антител к OX40 по настоящему изобретению. Одиночные точечные мутации создавали в слитой конструкции человеческого OX40/IgG1 посредством набора для сайт-направленного

мутагенеза (кат. №: AP231-11, TransGen). Желательные мутации проверяли посредством секвенирования. Экспрессии и получения мутантов OX40 достигали посредством трансфекции клеток 293G и очищали, используя колонку с белком А (кат. №: 17-5438-02, GE Life Sciences).

Аффинность связывания точечных мутаций OX40 в отношении Fab 445-3 характеризовали посредством анализов SPR, используя BIAcore 8K (GE Life Sciences). Кратко, осуществляли иммобилизацию мутантов OX40 и OX40 дикого типа на биосенсорном чипе CM5 (кат. №: BR100530, GE Life Sciences), используя EDC и NHS. Затем серийное разведение Fab 445-3 в HBS-EP+буфере (кат. №: BR-1008-26, GE Life Sciences) пропускали через поверхность чипа, используя время контакта 180 с и время диссоциации 600 с при 30 мкл/мин. Изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса анализировали для расчета скоростей ассоциации ( $k_a$ ) и скоростей диссоциации ( $K_D$ ) посредством использования 1:1 модели связывания Ленгмюра (пробный выпуск программы BIA, GE Life Sciences). Равновесную константа диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали как отношение  $k_d/k_a$ . Кратность сдвига  $K_D$  мутанта рассчитывали как отношение  $K_D$  мутанта/ $K_D$ WT. Профили идентификации эпитопа, определенные посредством SPR, кратко обобщены на фиг. 5 и в табл. 8. Результаты показали, что мутация остатков H153, I165 и E167 до аланина в OX40 значительно уменьшала связывание антитела 445-3 с OX40, и мутация остатков T154 и D170 до аланина приводила к умеренному уменьшению связывания антитела 445-3 с OX40.

Подробные взаимосвязи антитела 445-3 и остатков H153, T154, I165, E167 и D170 OX40 показаны на фиг. 6. Боковая цепь H153 на OX40 была окружена маленьким карманом 445-3 на поверхности взаимодействия, образуя водородные связи с  $^{тяж}S31$  и  $^{тяж}G102$  и  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг с  $^{тяж}Y101$ . Боковая цепь E167 образовывала водородные связи с  $^{тяж}Y50$  и  $^{тяж}N52$ , в то время как D170 образовывал водородную связь и солевой мостик с  $^{тяж}S31$  и  $^{тяж}K28$ , соответственно, которые могут дополнительно стабилизировать комплекс. Ван-дер-ваальсовы (VDW) взаимодействия T154 с  $^{тяж}Y105$ , I165 и  $^{тяж}R59$  способствовали высокой аффинности антитела 445-3 в отношении OX40.

В заключение, остатки H153, I165 и E167 OX40 идентифицировали как важные остатки для взаимодействия с антителом 445-3. Кроме того, аминокислоты T154 и D170 OX40 также являются важными для контакта остатками в отношении антитела 445-3. Эти данные показали, что эпитопы антитела 445-3 представляют собой остатки H153, T154, I165, E167 и D170 OX40. Данные эпитопы расположены в последовательности HTLQPASNSSDAICEDRD (SEQ ID NO: 30), причем важные для контакта остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 8  
Идентификация эпитопа антитела 445-3,  
определяемого посредством SPR

Мутанты	$K_D$ мутанта/ $K_D$ WT
H153A	Не выявляли связывания
T154A	8
Q156A	1,9
S161A	1,1
S162A	0,6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

Значимое влияние: связывания не выявляли, или значение  $K_D$  мутанта/ $K_D$  WT было больше, чем 10. Умеренное влияние: значение  $K_D$  мутанта/ $K_D$  WT составляло от 5 до 10. Незначимое влияние: значение  $K_D$  мутанта/ $K_D$  WT составляло меньше 5.

Пример 9. Антитело к OX40 445-3 не блокирует взаимодействие OX40-OX40L.

Для определения того, препятствует ли антитело 445-3 взаимодействию OX40-OX40L, проводили анализ проточной цитометрии на клетках. В данном анализе антитело 445-3, референсное антитело 1A7.gr1, контрольное huIgG или отдельно среду предварительно инкубировали со слитым белком человеческого OX40 с мышинным Fc IgG2a (OX40-mIgG2a). Антитело и комплекс слитого белка затем добавляли к OX40L-экспрессирующим клеткам НЕК293. Если антитело к OX40 не препятствует взаимодействию OX40-OX40L, тогда комплекс антитело к OX40-OX40 mIgG2a будет еще связываться с поверхностью OX40L, и данное взаимодействие выявляется с использованием вторичного антитела к мышинному Fc.

Как показано на фиг. 7, антитело 445-3, даже при высокой концентрации, не уменьшало связывания OX40 с OX40L, указывая на то, что 445-3 не мешает взаимодействию OX40-OX40L. Это указывает на то, что 445-3 не связывается в сайте связывания OX40L или не связывается достаточно тесно, чтобы пространственно затруднять связывание OX40L. Напротив, антитело положительного контроля, 1A7.gr1, полностью блокирует связывание OX40 с OX40L, как показано на фиг. 7.

Кроме того, сокристаллическую структуру OX40 в комплексе с Fab 445-3 расшифровывали и сравнивали с комплексом OX40/OX40L (код PDB: 2HEV), как показано на фиг. 8. Тример лиганда OX40 взаимодействует с OX40 главным образом через CRD1 (цистеин-богатый домен), CRD2 и частичные области CRD3 OX40 (Compaan and Humowitz, 2006), в то время как антитело 445-3 взаимодействует с OX40 только через область CRD4. В итоге, антитело 445-3 и тример OX40L связываются на уровне разных соответствующих областей OX40, и антитело 445-3 не препятствует взаимодействию OX40/OX40L. Данный результат коррелирует с данными картирования эпитопов, описанными в вышеприведенных Примерах. CRD4 OX40 находится на уровне аминокислот 127-167, и эпитоп антитела 445-3 частично перекрывается с данной областью. Последовательность CRD4 OX40 (аминокислоты 127-167) показана ниже, и частичное перекрывание эпитопа 445-3 выделено жирным шрифтом и подчеркнуто: PCPPGHF-SPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE (SEQ ID NO: 31).

Пример 10. Агонистическая активность антитела к OX40 445-3.

Для исследования агонистических функций антитела 445-3 линию OX40-позитивных Т-клеток, NuT78/OX40, совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (APC) (HEK293/OS8<sup>low</sup>-FcγRI) в присутствии или отсутствии 445-3 или IA7.gr1 в течение ночи, и продукцию IL-2 использовали в качестве регистрируемой величины для стимуляции Т-клеток. В клетках HEK293/OS8<sup>low</sup>-FcγRI гены, кодирующие мембраносвязанное антитело к CD3 OKT3 (OS8) (как раскрыто в патенте США № 8735553), и человеческого FcγRI (CD64), стабильно совместно трансдуцировали в клетки HEK293. Поскольку активация иммунной системы, индуцируемая антителом к OX40, зависит от перекрестного связывания антитела (Voo et al, 2013), FcγRI на HEK293/OS8<sup>low</sup>-FcγRI обеспечивает основу для опосредованного антителом к OX40 перекрестного связывания OX40 при двойственном взаимодействии антитела к OX40 с OX40 и FcγRI. Как показано на фиг. 9, антитело к OX40 445-3 оказалось высокоактивным в усилении TCR-сигнализации дозозависимым образом с EC<sub>50</sub> на уровне 0,06 нг/мл. Также наблюдали несколько более слабые активности референсного Ab IA7.gr1. Напротив, контрольный человеческий IgG (10 мкг/мл) или холостая проба не демонстрировали воздействия на продукцию IL-2.

Пример 11. Антитело к OX40 445-3 стимулировало иммунные ответы в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Для определения того, может ли антитело 445-3 стимулировать Т-клеточную активацию, анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) проводили, как описано ранее (Tourkova et al., 2001). Кратко, зрелые DC были индуцированы из человеческих PBMC-происходящих CD14 -миелоидных клеток посредством культивирования с GM-CSF и IL-4 с последующей стимуляцией LPS (lipopolysaccharide -липолисахарид). Далее, DC, обработанные митомицином С, совместно культивировали с аллогенными CD4 Т-клетками в присутствии антитела к OX40 445-3 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 суток. Продукцию IL-2 в сокультуре выявляли посредством ELISA в качестве регистрируемого показателя MLR ответа.

Как показано на фиг. 10, антитело 445-3 значительно стимулировало продукцию IL-2, указывая на способность 445-3 активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Напротив, референсное антитело IA7.gr1 демонстрировало значительно (Р меньше 0,05) более слабые активности в анализе MLR.

Пример 12. Антитело к OX40 445-3 демонстрировало ADCC-активность.

Анализ ADCC на основе высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH - lactate dehydrogenase) проводили для исследования того, могло ли антитело 445-3 уничтожать OX40<sup>Hi</sup> - экспрессирующие клетки-мишени. Линию клеток NK92MI/CD16V генерировали в качестве эффекторных клеток посредством совместной трансдукции генов CD16v158 (аллель V158) и Fcγ в линию NK-клеток, NK92MI (ATCC, Manassas VA). Линию OX40-экспрессирующих Т-клеток, NuT78/OX40, использовали в качестве клеток-мишеней. Равные количества (3×10<sup>4</sup>) клеток-мишеней и эффекторных клеток совместно культивировали в течение 5 ч в присутствии антитела к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или контрольных Ab. Цитотоксичность оценивали по высвобождению LDH, используя набор для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, Madison, WI). Специфичный лизис рассчитывали по формуле, показанной ниже.

Экспериментал. – Эффектор, спонтанн. – Мишень, спонтанн.

$$\% \text{, Специфичный лизис} = \frac{\text{Мишень, максимум} - \text{Мишень, спонтанн.}}{\text{Мишень, максимум} - \text{Мишень, спонтанн.}} \times 100$$

Как показано на фиг. 11, антитело 445-3 демонстрировало высокую активность в уничтожении OX40<sup>Hi</sup> мишеней посредством ADCC дозозависимым образом (EC<sub>50</sub>: 0,027 мкг/мл). ADCC-эффект антитела 445-3 был похож на эффект контрольного антитела 1 A7.gr1. Напротив, 445-3 с форматом Fc IgG4 с мутациями S228P и R409K (445-3-IgG4) не демонстрировало каких-либо значимых ADCC-эффектов, по сравнению с контрольным человеческим IgG или холостой пробой. Результаты согласуются с предыдущими результатами, которые свидетельствуют о том, что Fc IgG4 является слабым или "молчит" в отношении ADCC (An Z, et al. mAbs 2009).

Пример 13. Антитело к OX40 445-3 предпочитительно истощает CD4<sup>+</sup> Treg и увеличивает отношения CD8<sup>+</sup> Teff/Treg in vitro.

В нескольких животных моделях опухоли показано, что антитела к OX40 могли истощать OX40<sup>Hi</sup> Treg, инфильтрирующие опухоль, и увеличивать отношения CD8<sup>+</sup> Т-клеток к Treg (Bulliard et al., 2014; Carboni et al, 2003; Jacquemin et al, 2015; Marabelle et al., 2013b). Следовательно, иммунный ответ усили-

вался, приводя к регрессии опухоли и улучшенной выживаемости.

Учитывая тот факт, что *in vitro* активированные или внутриопухолевые CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg экспрессируют OX40 предпочтительнее других субпопуляций Т-клеток (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016), анализ на основе человеческих РВМС проводили для исследования способности антитела 445-3 уничтожать OX40<sup>Hi</sup>-клетки, в частности Treg. Кратко, РВМС предварительно активировали в течение 1 суток РНА-L (1 мкг/мл) для индукции экспрессии OX40 и использовали в качестве клеток-мишеней. Затем эффекторные клетки NK92MI/CD16V (как описано в примере 12,  $5 \times 10^4$ ) совместно культивировали с равным количеством клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,001-10 мкг/мл) или плацебо в течение ночи. Процент каждой субпопуляции Т-клеток определяли посредством проточной цитометрии. Как показано на фиг. 12А и 12В, обработка антителом 445-3 вызывала увеличение процента CD8 Т-клеток и уменьшение процента CD4 Foxp3 Treg дозозависимым образом. В результате, отношения CD8 Т-клеток к Treg значительно улучшались (фиг. 12С). Результаты более слабого улучшения получали в случае обработки 1A7.gr1. Данный результат демонстрирует терапевтические применения 445-3 в индукции противоопухолевого иммунитета посредством стимулирования CD8<sup>+</sup> Т-клеточных функций, но в то же время ограничения Treg-опосредованной иммунологической толерантности.

Пример 14. Антитело к OX40 445-3 обнаруживает дозозависимую противоопухолевую активность в мышинной опухолевой модели.

Эффективность антитела к OX40 445-3 демонстрировали в мышинной опухолевой модели. Мышинные клетки опухоли толстой кишки MC38 подкожно имплантировали мышам C57, трансгенным по человеческому OX40 (Biocytogen, Пекин, Китай). После имплантации опухолевых клеток объемы опухоли измеряли два раза в неделю и рассчитывали в мм<sup>3</sup>, используя формулу:  $V=0,5(a \times b^2)$ , где а и b представляли собой размеры опухоли по длинной и короткой осям, соответственно. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 190 мм<sup>3</sup> в размере, мышей случайным образом распределяли по 7 группам и внутрибрюшинно инъецировали или антитело 445-3 или антитело 1A7.gr1 один раз в неделю на протяжении трех недель. Человеческий IgG вводили в качестве изотипического контроля. Частичную регрессию (PR - Partial regression) определяли, как объем опухоли, составляющий меньше чем 50 % исходного объема опухоли в первые сутки дозирования в трех последовательных измерениях. Ингибирование роста опухоли (TGI - tumor growth inhibition) рассчитывали, используя следующую формулу:

$$\text{Ингибирование роста, \%} = 100 \times \left( 1 - \frac{(\text{обработ. t}) - (\text{обработ. t}_0)}{(\text{плацебо t}) - (\text{плацебо t}_0)} \right)$$

обработ. t означает объем обработанной опухоли в момент времени t; обработ. t<sub>0</sub> означает объем обработанной опухоли в момент времени 0; плацебо t означает объем опухоли в присутствии плацебо в момент времени t; плацебо t<sub>0</sub> означает объем опухоли в присутствии плацебо в момент времени 0. Результаты продемонстрировали, что 445-3 обладало дозозависимой противоопухолевой эффективностью в виде внутрибрюшинной инъекции с дозами 0,4, 2 и 10 мг/кг. Введение 445-3 приводило к 53%-ому (0,4 мг/кг), 69%-ому (2 мг/кг) и 94%-ому (10 мг/кг) ингибированию роста опухоли и приводило к 0%-ной (0,4 мг/кг), 17%-ной (2 мг/кг) и 33%-ной (10 мг/кг) частичной регрессии по сравнению с исходным уровнем. Напротив, частичной регрессии под действием антитела 1A7.gr1 не наблюдали. Данные *in vivo* показывают, что лиганд-неблокирующее антитело 445-3 лучше подходит для противоопухолевой терапии, чем антитело, блокирующее OX40-OX40L, 1A7.gr1 (фиг. 13А и 13В, табл. 9).

Таблица 9

Эффективность 445-3 и 1A7.gr1 в мышинной модели опухоли толстой кишки MC38 мыши

Обработка	QW (еженедельная) Доза (мг/кг)	N	Степень частичной регрессии	Средний объем опухоли в сутки 21 (мм <sup>3</sup> )	TGI в сутки 21 (%)
445-3	0,4	6	0 %	953	53
	2	6	17 %	696	69
	10	6	33 %	280	94
1A7.gr1	0,4	6	0 %	886	57
	2	6	0 %	1163	41
	10	6	0 %	1030	49

Пример 1. Изменения аминокислотного состава антител к OX40.

Несколько аминокислот выбирали для изменения с целью улучшения антител к OX40. Аминокислотные замены осуществляли для улучшения аффинности или для повышения уровня гуманизации. Наборы ПЦР-праймеров конструировали для соответствующих изменений аминокислотного состава, синтезировали и использовали для модификации антител к OX40. Например, замена K28T в тяжелой цепи и

замена S24R в легкой цепи приводили к 1,7-кратному увеличению  $EC_{50}$ , определяемой посредством FACS, по сравнению с исходным антителом 445-2. Замена Y27G в тяжелой цепи и замена S24R в легкой цепи приводили к 1,7-кратному увеличению  $K_D$ , определяемой посредством Biacore, по сравнению с исходным антителом 445-2. Данные изменения кратко обобщены на фиг. 14A, 14B.

Ссылки.

al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, M., Brown, M.H., James, W., and Barclay, A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European journal of immunology* 26, 1695-1699.

An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. (2009). IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. *MAbs*. 1,572-579.

Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and cellular biology* 18, 558-565.

Aspeshlagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J.C., Zitvogel, L., and Marabelle, A. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 52, 50-66.

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

Calderhead, D.M., Buhlmann, J.E., van den Eertwegh, A.J., Claassen, E., Noelle, R.J., and Fell, H.P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. *J Immunol* 151, 5261-5271.

Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., and Pena-Rossi, C. (2003). CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 145, 1-11.

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

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

Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews* 229, 173-191.

Curti, B.D., Kovacovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwse, T., Fox, B.A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer research* 73, 7189-7198.

Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P., and Stein, H. (1995). Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. *British journal of haematology* 91, 927-931.

Gough, M.J., and Weinberg, A.D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Advances in experimental medicine and biology* 647, 94-107.

Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161, 6510-6517.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *Journal of translational medicine* 11, 215.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Huddleston, C.A., Weinberg, A.D., and Parker, D.C. (2006). OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. *European journal of immunology* 36, 1093-1103.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172, 4253-4259.

Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X., and Liu, Y.J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13138-13143.

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159-1170.

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

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

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

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

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

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

Morris, N.P., Peters, C., Montler, R., Hu, H.M., Curti, B.D., Urba, W.J., and Weinberg, A.D. (2007). Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., and Croft, M. (2005b). Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* 22, 621-631.

Song, J., So, T., and Croft, M. (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol* 180, 7240-7248.

Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *J Immunol* 179, 5014-5023.

St Rose, M.C., Taylor, R.A., Bandyopadhyay, S., Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Vella, A.T., and Adler, A.J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-gamma maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and cell biology* 91, 173-183.

Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., and Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507-521.

Szypowska, A., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Luczynski, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4(+)CD25(high) cells in children with type 1 diabetes. *Advances in medical sciences* 59, 39-43.

Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., Caronna, R., Del Bene, G., Longo, F., Ciardi, A., et al. (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive

and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 5, e1175800.

Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunology letters* 78, 75-82.

Vetto, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M., and Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *American journal of surgery* 174, 258-265.

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

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

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

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

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

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с человеческим OX40 и содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR (определяющая комплементарность область тяжелой цепи) 1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR (определяющая комплементарность область легкой цепи) 1 с SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(ii) варибельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 18, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(iii) варибельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 13, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8; или

(iv) варибельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4, (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 26, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 28;

(ii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 20, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 22;

(iii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 14, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 16; или

(iv) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 11.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где

(i) в SEQ ID NO: 26 и/или 28 имеются инсерции, делеции или замены одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот;

(ii) в SEQ ID NO: 20 и/или 22 имеются инсерции, делеции или замены одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот;

(iii) в SEQ ID NO: 14 и/или 16 имеются инсерции, делеции или замены одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот; или

(iv) в SEQ ID NO: 9 и/или 11 имеются инсерции, делеции или замены одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти аминокислот.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 26, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 28;

(ii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 20, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 22;

(iii) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 14, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 16; или

(iv) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 9, и варибельную область легкой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 11.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, представляющее собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое сконструированное антитело, одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент Fab, фрагмент Fab' или фрагмент F(ab')<sub>2</sub>.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, обладающее агонистической активностью в отношении OX40.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связывающееся с человеческим OX40 на эпитопе, содержащем один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153-D170 человеческого OX40.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связывающееся с человеческим OX40 на эпитопе, содержащем один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153, T154, I165, E167 и D170 человеческого OX40.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связывающееся с человеческим OX40 на эпитопе, содержащем один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из H153, I165 и E167 человеческого OX40.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, связывающееся с человеческим OX40 на или в пределах SEQ ID NO. 30.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC).

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет пониженный уровень гликозилирования, или не имеет гликозилирования, или является гипогликозилированным.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет повышенное содержание структур, имеющих ветвление в точках GlcNac.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где домен Fc принадлежит к IgG1.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где домен Fc принадлежит к IgG4.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.15, где IgG4 имеет замену S228P (в соответствии с системой нумерации EU).

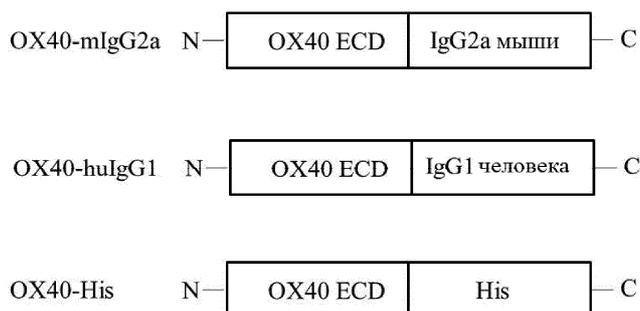
17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.16, где IgG4 имеет замены S228P и R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, которое имеет одно или более из следующих свойств:

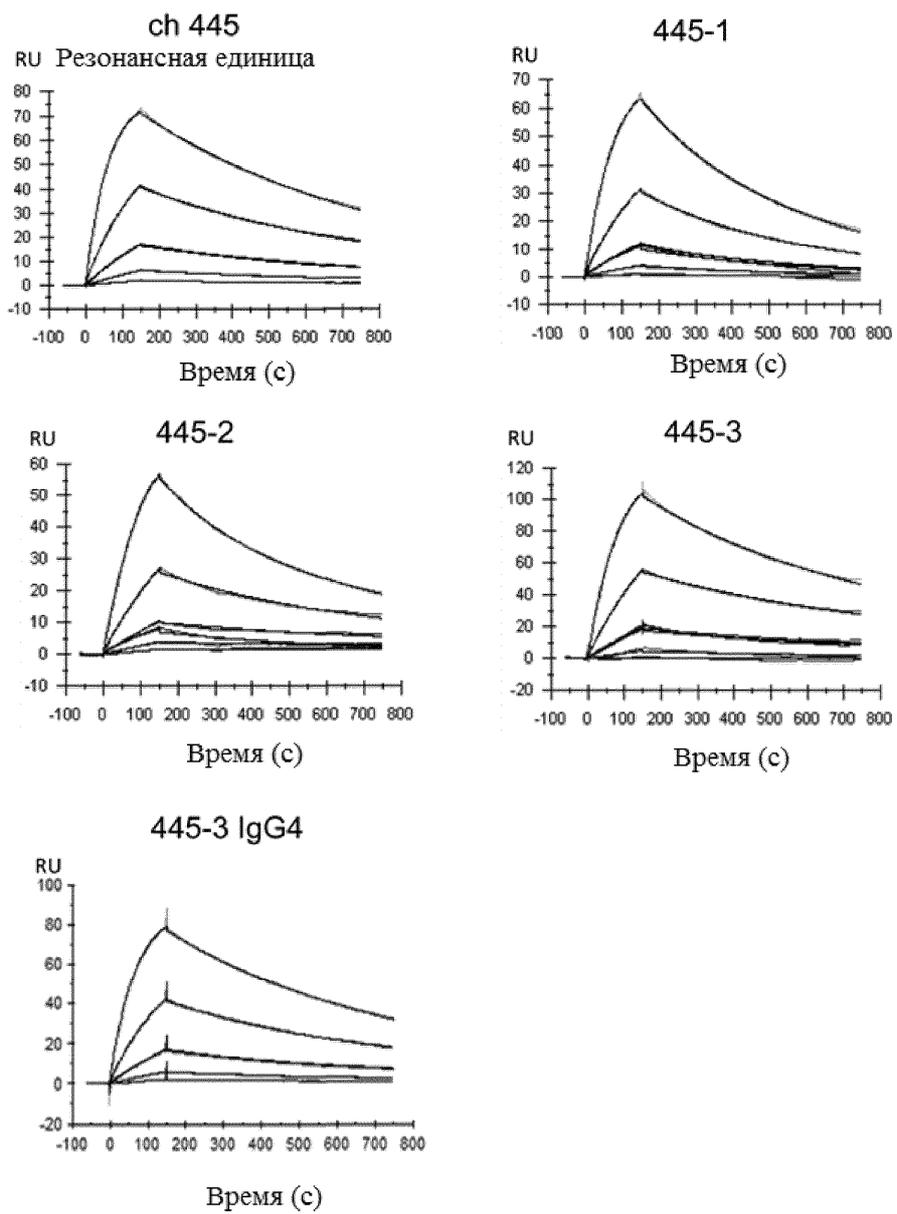
(i) способно вступать в перекрестную реакцию с супоOX40;

(ii) не препятствует взаимодействию OX40-OX40L;

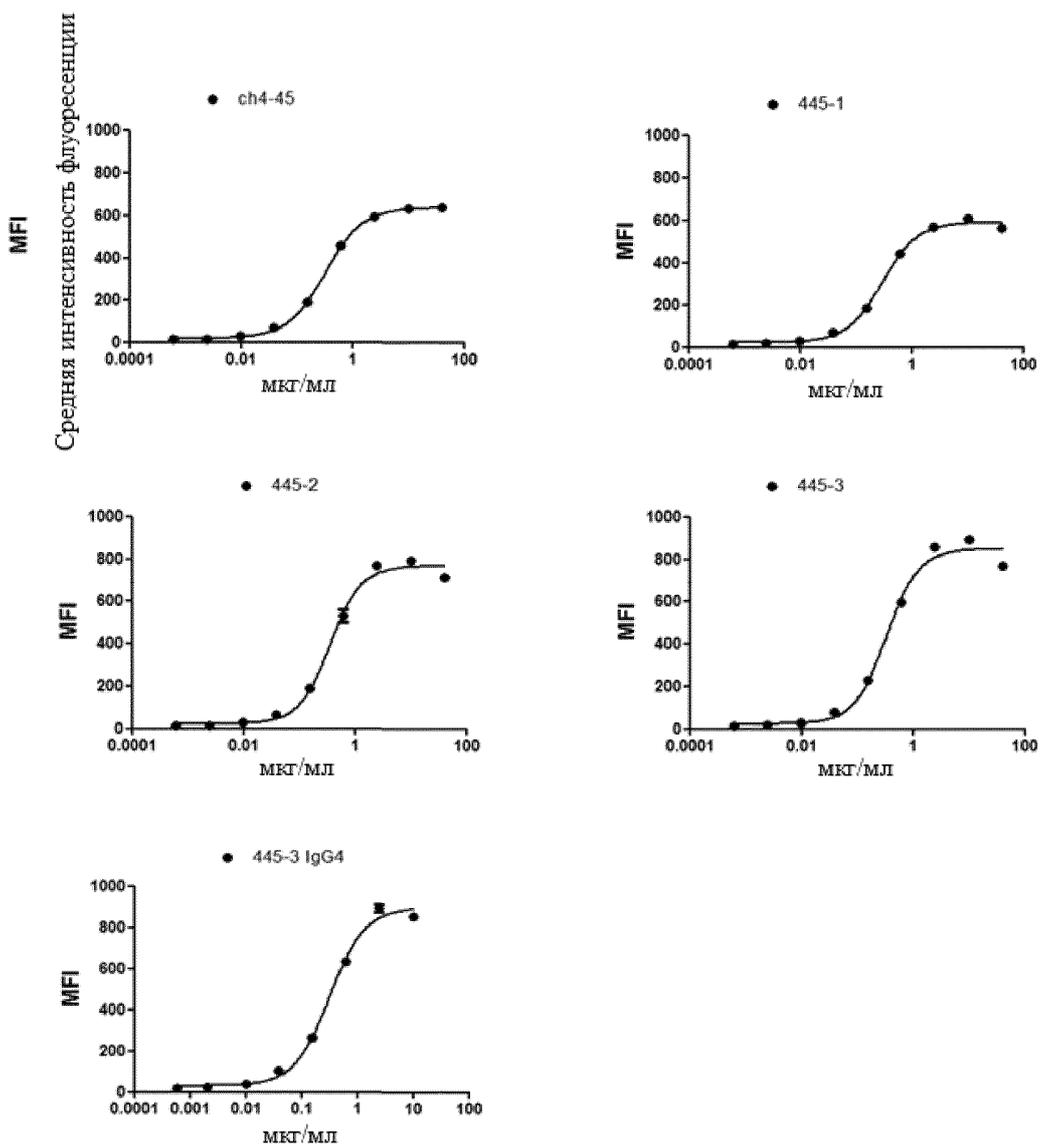
- (iii) способно совместно стимулировать Т-клетки с продукцией IL-2;
- (iv) способно совместно активировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки, в частности, как измерено в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR);
- (v) способно опосредовать ADCC, в частности, как измерено в анализе ADCC на основе высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH);
- (vi) способно истощать CD4<sup>+</sup> Treg (регуляторная Т-клетка);
- (vii) способно увеличивать отношение CD8<sup>+</sup> Teff (эффекторная Т-клетка)/Treg; или
- (viii) способно опосредовать частичную регрессию опухолей в животной модели опухоли.
19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.
20. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-18.
21. Способ по п.20, где рак представляет собой рак молочной железы, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому и саркому.
22. Способ по п.21, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с другим терапевтическим средством.
23. Способ по п.22, где терапевтическое средство представляет собой паклитаксел или средство на основе паклитаксела, доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубин, леналидомид или 5-азацитидин.
24. Способ по п.23, где терапевтическое средство представляет собой средство на основе паклитаксела, леналидомид или 5-азацитидин.
25. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18.
26. Вектор для кодирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-18, содержащий нуклеиновую кислоту по п.25.
27. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.25 или вектор по п.26.
28. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.27 и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из культуры.
29. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-18 для лечения или снижения вероятности рака молочной железы, рака головы и шеи, рака желудка, рака почки, рака печени, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака кожи, мезотелиомы, лимфомы, лейкоза, миеломы и саркомы.
30. Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является меченым.
31. Диагностический реагент по п.30, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего средства и иона металла.



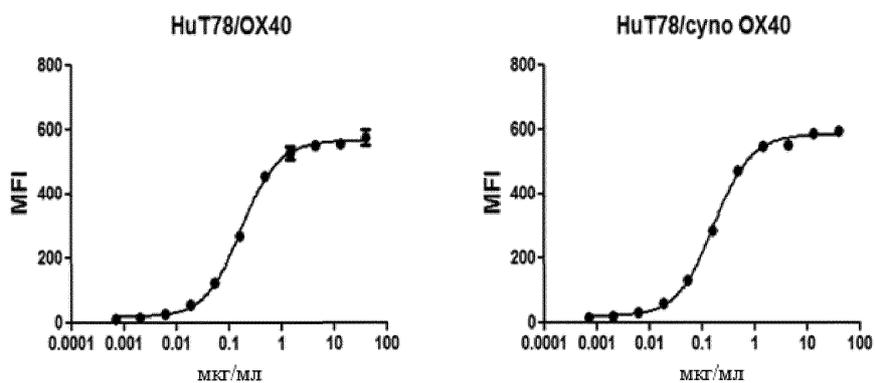
Фиг. 1



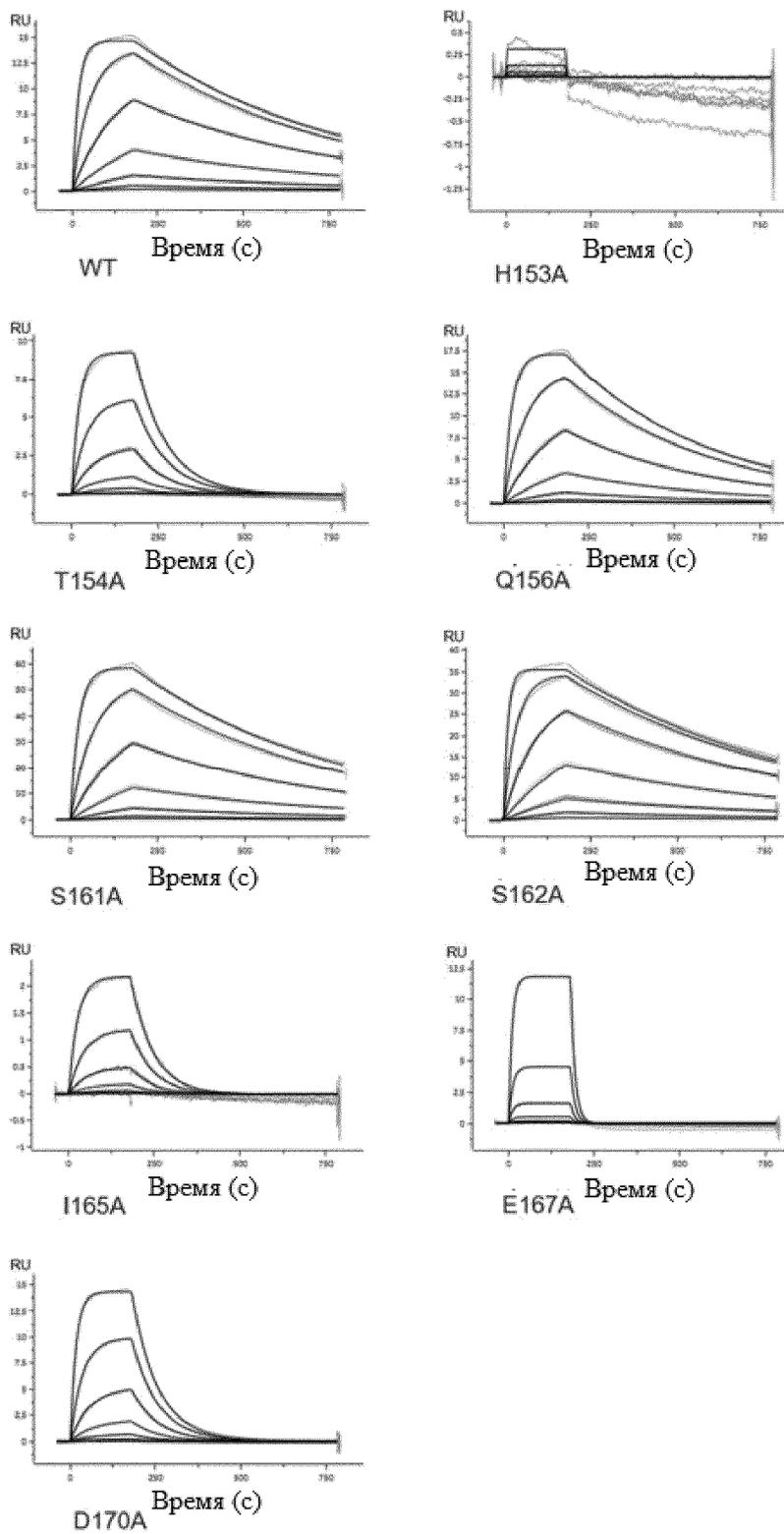
Фиг. 2



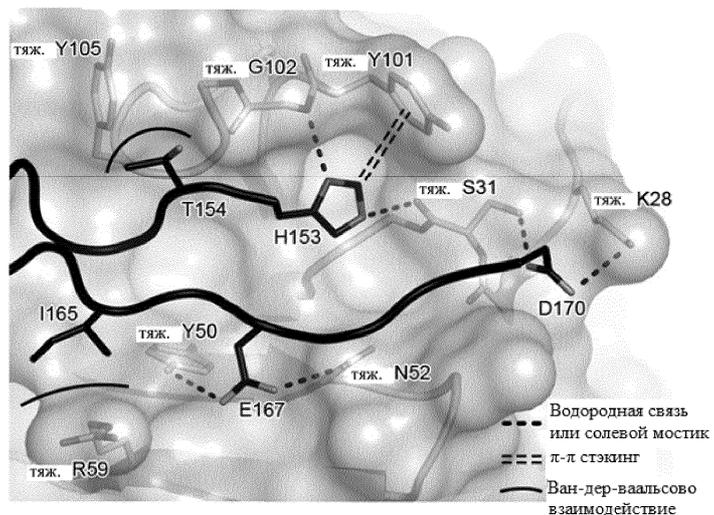
Фиг. 3



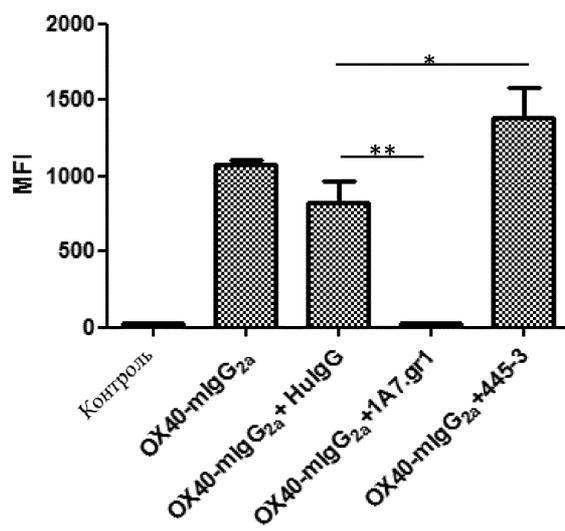
Фиг. 4



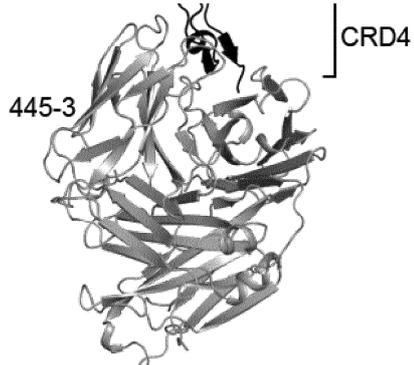
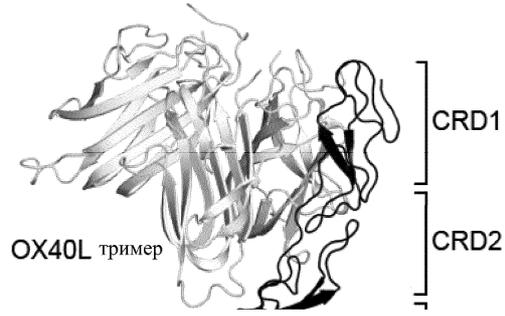
Фиг. 5



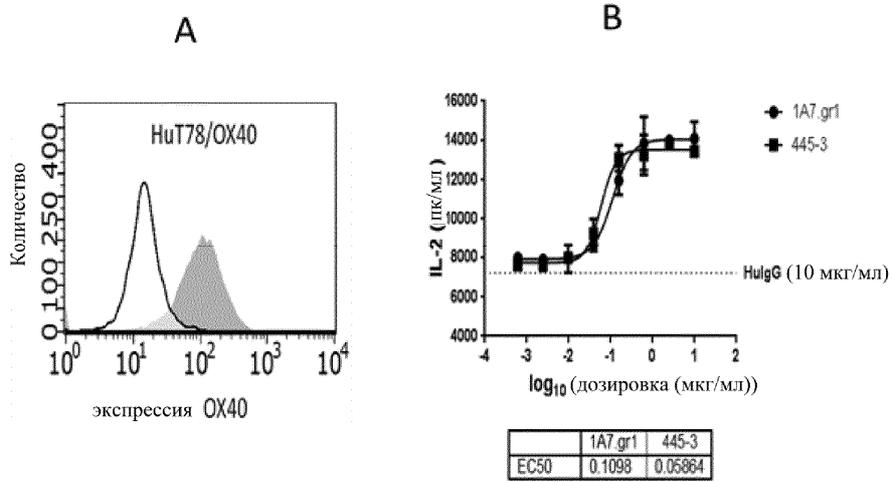
Фиг. 6



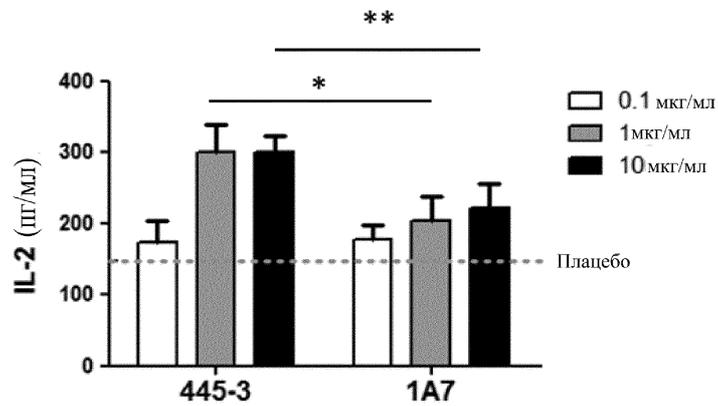
Фиг. 7



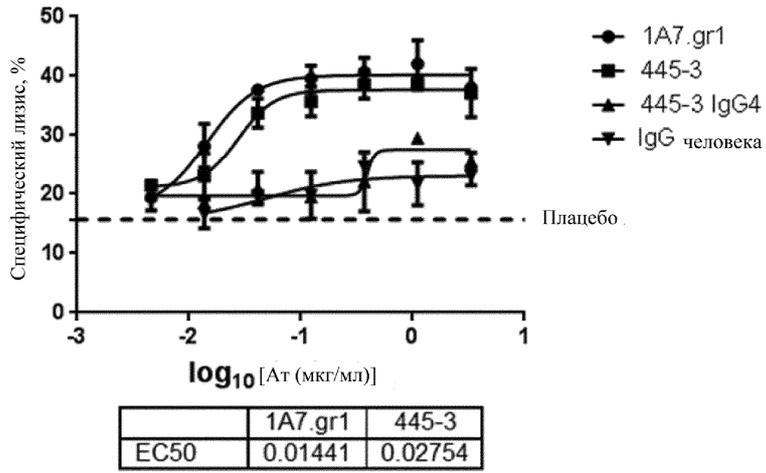
Фиг. 8



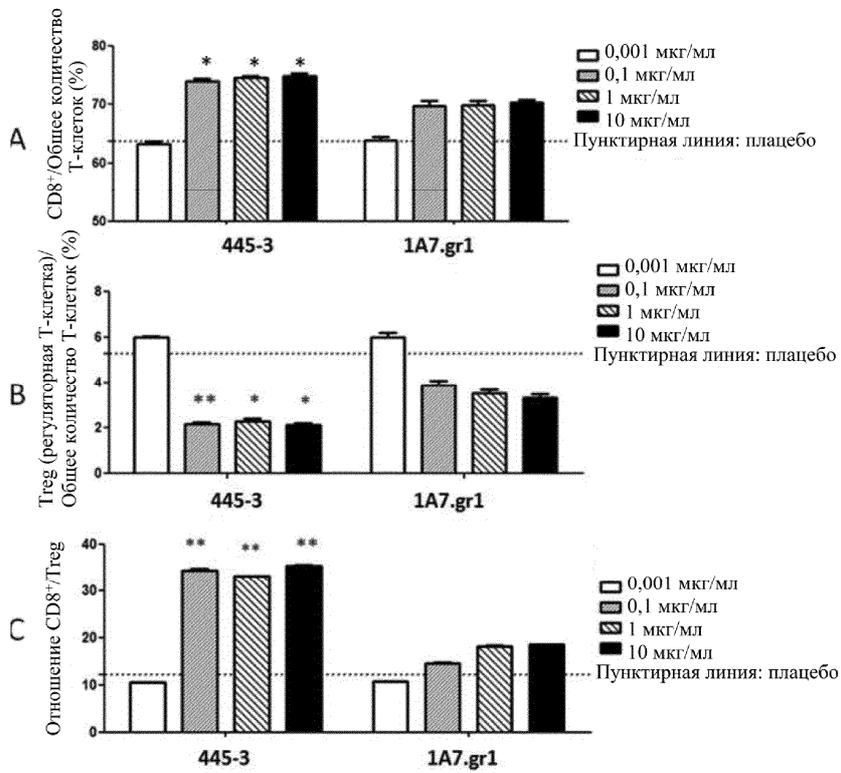
Фиг. 9



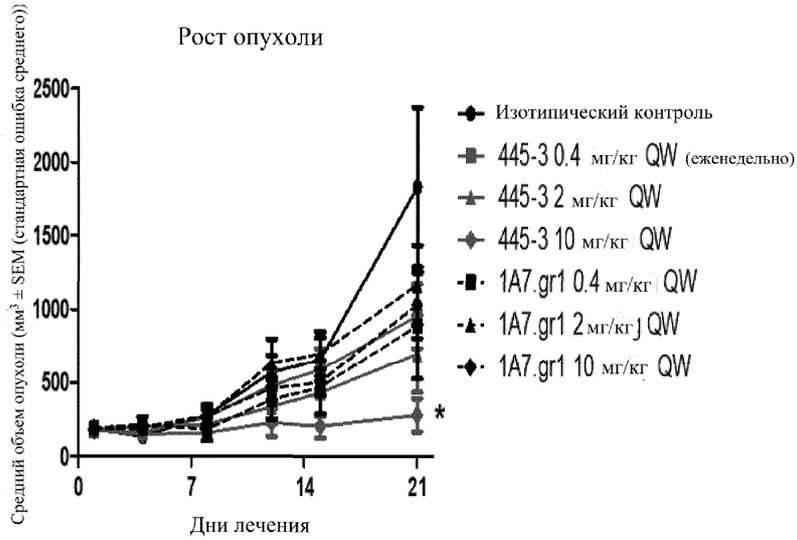
Фиг. 10



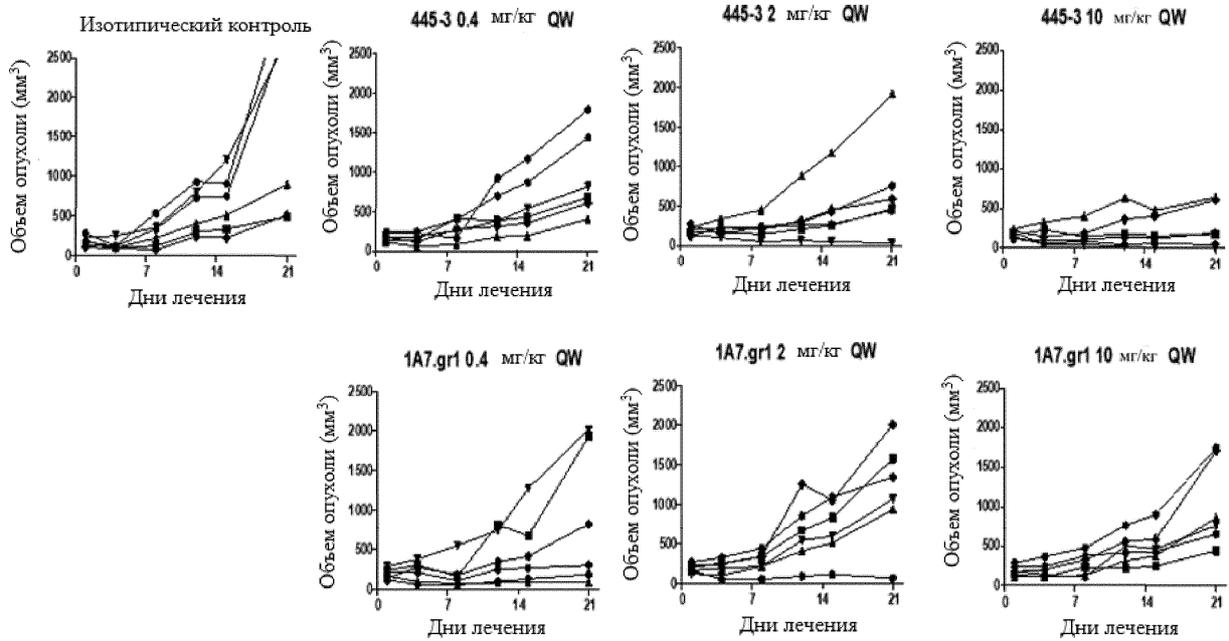
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13А



Фиг. 13В

Тяжелая цепь		Легкая цепь		Котрансфекция тяжелой и легкой цепями	FACS*		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ат ID	ЕС <sub>50</sub> (нг/мл)	Верхний уровень MF1	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)
445-1VH	-	445-1VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.89E-03	1.64E-08
445-1VH-M481	FR2	445-1VL	-	445-2(M481)-1 (445-1 с мутацией M481 в VH (вариабельная область тяжелой цепи))	353	480	2.30E+05	3.56E-03	1.55E-08
445-1VH	-	445-1VL-S24G	CDR1	445-1-2(S24G) (445-1 с мутацией S24G в VL (вариабельная область легкой цепи))	307	470	2.22E+05	3.60E-03	1.62E-08
445-1VH	-	445-1VL-S10T/E81D/D70E	FR1/FR3	445-1-2(S10T/E81D/D70E) (445-1 с мутациями S10T, E81D и D70E в VL)	280	510	2.28E+05	3.40E-03	1.49E-08

\* (анализ сортировки клеток с активированной флуоресценцией)

Фиг. 14А

Тяжелая цепь		Легкая цепь		Контранфлексия тяжелой и легкой цепями	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR		Ab ID	EC <sub>50</sub> (ng/ml)	Тор(MFI)	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )
445-2VH	-	445-2VL	-	445-2	397	760	2.06E+05	2.64E-03	1.28E-08
445-2VH-Q62E-Q65K	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E/Q65K)-3(S24R) (445-2 с мутациями Q62E и Q65K в VH и S24R в VL)	318	790	1.87E+05	2.32E-03	1.24E-08
445-2VH-Q62E	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E)-3(S24R) (445-2 with с мутациями Q62E в VH и S24R в VL)	363	760	1.94E+05	2.27E-03	1.17E-08
445-2VH-K28T	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(K28T)-3(S24R) (445-2 с мутациями K28T в VH и S24R в VL)	660	750	4.44E+05	5.74E-03	1.29E-08
445-2VH-Y27G	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Y27G)-3(S24R) (445-2 с мутациями Y27G в VH и S24R в VL)	755	630	6.25E+04	1.35E-03	2.15E-08
445-2VH-T30S	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(T30S)-3(S24R) (445-2 с мутациями T30S в VH и S24R в VL)	405	800	2.91E+05	3.81E-03	1.31E-08
445-3VH	-	445-3VL	-	445-3	462	990	1.74E+05	1.48E-03	8.51E-09
445-2VH-A61N-K28R	CDR2/FR1	445-3VL	-	445-3(A61N-K28R)-3 (445-2 VH с мутациями A61N и K28R и 445-3 VL)	369	1080	1.57E+05	1.15E-03	7.35E-09
445-2VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N-K63R)-3 (445-2 VH с мутациями A61N и K63R и 445-3 VL)	483	1100	1.61E+05	1.55E-03	9.65E-09
445-3VH	-	445-2VL-G41D-K42G-S24R-K93R	FR2/CDR1/CDR3	445-3-3(G41D-K42G-S24R-K93R) (445-3 VH и 445-2 VL с мутациями G41D, K42G, S24R и K93R)	337	1050	2.12E+05	1.68E-03	7.90E-09

Фиг. 14В

