

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047697**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.28

(21) Номер заявки
202291499

(22) Дата подачи заявки
2020.11.19

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

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К OX40 В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ К PD1 ИЛИ К PDL1

(31) PCT/CN2019/120055

(32) 2019.11.21

(33) CN

(43) 2022.07.25

(86) PCT/CN2020/130075

(87) WO 2021/098774 2021.05.27

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

(72) Изобретатель:
**Цзян Бэйбэй, Лю Е, Сун Сяоминь
(CN)**

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

(56) GUO, Z.Q. et al. "PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer", PLOS ONE, Vol. 9, No. 2, 27 February 2014 (2014-02-27), e89350

GUO, Z.Q. et al. "PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer", PLOS ONE, Vol. 9, No. 2, 27 February 2014 (2014-02-27), e89350

COLOMBO, M.P. "On OX40 and PD-1 Combination: Why Should OX40 Be First in Sequence?", Clin Cancer Res., Vol. 23, No. 20, 13 October 2017 (2017-10-13), pages 5999-6001

COLOMBO, M.P. "On OX40 and PD-1 Combination: Why Should OX40 Be First in Sequence?", Clin Cancer Res., Vol. 23, No. 20, 13 October 2017 (2017-10-13), pages 5999-6001

WO-A1-2019223733

US-B1-8735553

US-A1-2018215825

WO-A1-2016057667

ZHANG, P. et al. "Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity", Cell Reports, Vol. 27, No. 11, 11 June 2019 (2019-06-11), pages 3117-3123

(57) В изобретении предложены способы лечения рака или повышения, усиления или стимуляции иммунного ответа неконкурентоспособными агонистическими антителами к OX40 и их антигенсвязывающими фрагментами, которые связываются с OX40 человека (ACT35, CD134 или TNFRSF4 (член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)), в комбинации с антителами к PD1 (белок 1 запрограммированной смерти клеток) или к PDL1 (лиганд 1 белка запрограммированной смерти клеток).

047697 B1

047697 B1

Область техники

В данном документе раскрыт способ лечения рака с применением комбинации антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40 (член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли) человека, PD1 (белок 1 запрограммированной смерти клеток) человека или PDL1 (лиганд 1 белка запрограммированной смерти клеток) человека.

Уровень техники

OX40 (также известный как ACT35, CD134 или TNFRSF4 (член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа приблизительно 50 кДа и является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). Зрелый OX40 человека состоит из 249 аминокислотных (АК) остатков, с цитоплазматическим хвостом из 37 АК и внеклеточной областью из 185 АК. Внеклеточный домен OX40 содержит три полных и один неполный домен, богатый цистеином (CRD). Внутриклеточный домен OX40 содержит один консервативный сигнальный родственный мотив QEE (глутамин-глутаминовая кислота-глутаминовая кислота), который опосредует связывание с несколькими факторами, ассоциированными с TNFR (рецептор фактора некроза опухоли) (TRAF), включая TRAF2, TRAF3 и TRAF5, что позволяет OX40 связываться с внутриклеточными киназами (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017).

Первоначально OX40 обнаруживали на активированных CD4⁺ Т-клетках крыс, а затем клонировали мышиные и человеческие гомологи из Т-клеток (al-Shamkhani et al., 1996; Calderhead et al., 1993). В дополнение к экспрессии на активированных CD4⁺ Т-клетках, включая Т-хелперы (Th) 1, Th2-клетки, Th17-клетки, а также регуляторные Т-клетки (Treg), экспрессия OX40 также была обнаружена на поверхности активированных CD8⁺ Т-клеток, естественных киллеров (NK) Т-клеток, нейтрофилов и NK-клеток (Croft, 2010). Напротив, низкая экспрессия OX40 обнаружена на наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, а также на большинстве покоящихся Т-клеток памяти (Croft, 2010; Soroosh et al., 2007). Поверхностная экспрессия OX40 на наивных Т-клетках является временной. После активации TCR (Т-клеточный рецептор), экспрессия OX40 на Т-клетках значительно повышается в течение 24 часов и с пиками через 2~3 дня, сохраняясь в течение 5~6 дней (Gramaglia et al., 1998).

Лиганд для OX40 (OX40L, также известный как gp34, CD252 или TNFSF4) является единственным лигандом для OX40. Подобно другим членам суперсемейства TNFSF, OX40L представляет собой гликопротеин II типа, который содержит 183 АА с внутриклеточным доменом из 23 АА и внеклеточным доменом из 133 АА (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). OX40L естественным образом образует гомомерный тримерный комплекс на поверхности клетки. Тример лиганда взаимодействует с тремя копиями OX40 на области контакта раздела лиганда мономер-мономер в основном через области CRD1, CRD2 и частичные CRD3 рецептора, но без участия CRD4 (Compaan and Hymowitz, 2006). OX40L в основном экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках (APC), включая активированные В-клетки (Stuber et al., 1995), зрелые обычные дендритные клетки (ДК) (Ohshima et al., 1997), плазмоцитодные ДК (пДК) (Ito et al., 2004) (Weinberg et al., 1999), макрофаги и клетки Лангерганса (Sato et al., 2002). Кроме того, было обнаружено, что OX40L экспрессируется на других типах клеток, таких как NK-клетки, тучные клетки, подклассы активированных Т-клеток, а также сосудистые эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц (Croft, 2010; Croft et al., 2009).

Тримеризация OX40 путем лигирования с помощью тримерного OX40L или димеризация с помощью агонистических антител способствуют рекрутингу и присоединению адаптерных молекул TRAF2, TRAF3 и/или TRAF5 с его внутриклеточным мотивом QEE (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017). Рекрутинг и присоединение TRAF2 и TRAF3 могут дополнительно приводить к активации как канонических путей NF-κB1, так и неканонических путей NF-κB2, которые играют ключевую роль в регуляции выживаемости, дифференцировки, размножения, продукции цитокинов и эффекторных функций Т-клеток (Croft, 2010; Gramaglia et al., 1998; Huddleston et al., 2006; Rogers et al., 2001; Ruby and Weinberg, 2009; Song et al., 2005a; Song et al., 2005b; Song et al., 2008).

В нормальных тканях экспрессия OX40 низкая и в основном происходит на лимфоцитах в лимфоидных органах (Dirkorp et al., 1995). Однако повышенная регуляция экспрессии OX40 на иммунных клетках часто наблюдалась как у животных моделей, так и у пациентов с патологическими состояниями (Redmond and Weinberg, 2007), такими как аутоиммунные заболевания (Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Szybowska et al., 2014) и рак (Kjaergaard et al., 2000; Vetto et al., 1997; Weinberg et al., 2000). Примечательно, что повышенная экспрессия OX40 связана с более длительной выживаемостью у пациентов с колоректальным раком и меланомой кожи и обратно коррелирует с возникновением отдаленных метастазов и более выраженными признаками опухоли (Ladanyi et al., 2004; Petty et al., 2002; Sarff et al., 2008). Было также показано, что лечение антителом к OX40 может вызывать противоопухолевую эффективность в различных мышиных моделях (Aspeshlagh et al., 2016), что указывает на потенциал OX40 в качестве иммунотерапевтической мишени. В первом клиническом исследовании у пациентов с раком, проведенном Curti и др., наблюдались доказательства противоопухолевой эффективности и активации опухолеспецифических Т-клеток с помощью агонистического моноклонального антитела к OX40, что указывает на то, что антитела к OX40 имеют полезность для усиления противоопухолевых Т-клеточных ответов (Curti et al., 2013).

Механизм действия агонистических антител к OX40 в опосредовании противоопухолевой эффективности изучали в первую очередь в моделях опухолей мышей (Weinberg et al., 2000). До недавнего времени механизм действия агонистических антител к X40 в опухолях объяснялся их способностью запускать костимулирующий сигнальный путь в эффекторных Т-клетках, а также ингибирующим действием на дифференцировку и функции Treg-клеток (регуляторные Т-клетки) (Aspeshlagh et al., 2016; Ito et al., 2006; St Rose et al., 2013; Voo et al., 2013). Недавние исследования показали, что как в моделях опухолей животных, так и у пациентов с раком, проникающие в опухоль Treg экспрессируют более высокие уровни OX40, чем эффекторные Т-клетки (как CD4⁺, так и CD8⁺) и периферические Treg (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016). Следовательно, вторичные эффекты, посредством которых антитела к OX40 запускают противоопухолевые ответы, зависят от их Fc-опосредованных эффекторных функций при истощении внутриопухолевых клеток OX40⁺ Treg посредством антителозависимой цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) (Aspeshlagh 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 Fc-опосредованной эффекторной функцией могут предпочтительно истощать внутриопухолевые Treg и улучшать соотношения CD8⁺ эффекторных Т-клеток к Treg в микроокружении опухоли (TME), что приводит к улучшению противоопухолевых иммунных ответов, усилению регрессии опухоли и улучшению выживаемости (Bulliard et al., 2014; Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Marabelle et al., 2013b). Основываясь на этих результатах, существует неудовлетворенная медицинская потребность в разработке агонистических антител к OX40 с агонистической активностью и Fc-опосредованными эффекторными функциями.

На сегодняшний день агонистические антитела к OX40 в клинике в основном являются лиганд-конкурентными антителами, которые блокируют взаимодействие OX40-OX40L (например, WO2016196228A1). Поскольку взаимодействие OX40-OX40L необходимо для усиления эффективного противоопухолевого иммунитета, блокада OX40-OX40L ограничивает эффективность данных лиганд-конкурентных антител. Следовательно, агонистические антитела OX40, которые специфически связываются с OX40, не препятствуя взаимодействию OX40 с OX40L, могут быть использованы при лечении рака и аутоиммунных расстройств как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими терапевтическими средствами, например, антителом к PD1.

Моноклональные антитела, которые нацелены на PD1 или на PDL1, могут блокировать это взаимодействие и усиливать иммунный ответ против раковых клеток. Было показано, что эти антитела полезны при лечении нескольких типов рака, включая меланому кожи, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак почки, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи и лимфому Ходжкина. Раковые клетки у большинства не отвечающих на моноактивные ингибиторы контрольных точек выходят через врожденные механизмы, которые позволяют раковым клеткам расти и выживать. В результате болезнь прогрессирует со скоростью, согласующейся с естественным анамнезом. Тем не менее, в отличие от внутренней резистентности, поздние рецидивы в настоящее время возникают у пациентов с предшествующей клинической пользой после более длительного последующего наблюдения за клиническими испытаниями, предполагая возникновение приобретенной резистентности (Jenkins и др., 2018).

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD1 или антитело к OX40 в комбинации с антителом к PDL1 вызывает значительное ингибирование роста опухоли при раковых заболеваниях по сравнению с монотерапией каждым из вышеуказанных активных фармацевтических агентов отдельно.

Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам к OX40 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые активируют OX40 и индуцируют передачу сигналов в иммунных клетках, тем самым способствуя противоопухолевому иммунитету, в комбинации с антителом к PD1 или с антителом к PDL1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены агонистические моноклональные антитела, которые связываются с OX40 человека или его антигенсвязывающие фрагменты. В одном аспекте антитело по настоящему изобретению не конкурирует с OX40L и не препятствует связыванию OX40 с его лигандом OX40L.

Настоящее изобретение охватывает следующие варианты осуществления.

Способ лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PD1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Способ, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с OX40 человека и содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи) с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи) 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 и (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 и (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 и (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, в комбинации с антителом к PD1.

Способ, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(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 (VL), содержащую SEQ ID NO: 11.

Способ, где антитело к PD1 включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD1 человека, и содержит:

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 32, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 34; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 35, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

Способ, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD1 человека и содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

Способ, где антитело к PD1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

Способ, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

Способ, где антитело к OX40 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где антитело к PD1 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PDL1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Способ, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с OX40 человека и содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 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 и (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 и (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 и (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, в комбинации с антителом к PDL1.

Способ, где антитело к PDL1 включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PDL1 человека, и содержит:

варибельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 50, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 51 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 52; и варибельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 53, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 54 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 55.

Способ, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PDL1 человека и содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

Способ, где антитело к PDL1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

Способ, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

Способ, где антитело к OX40 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где антитело к PDL1 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной 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 или саркомы.

Способ, где рак представляет собой метастатический рак.

Способ, где лечение приводит к устойчивому противораковому ответу у субъекта после прекращения лечения.

Способ повышения, усиления или стимуляции иммунного ответа или функции, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PD1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Способ, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с OX40 человека и содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 18 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 13 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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, в комбинации с антителом к PD1.

Способ, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

Способ, где антитело к PD1 включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD1 человека, и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 32, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 34; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 35, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

Способ, где антитело к PD1 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает PD1 человека и содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

Способ, где антитело к PD1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

Способ, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

Способ, где антитело к OX40 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где антитело к PD1 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где стимуляция иммунного ответа связана с Т-клетками.

Способ, где стимуляция иммунного ответа характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

Способ, где Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокинов, пролиферацией или цитолитической активностью.

Способ, где Т-клетки представляют собой CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

Способ, где введение приводит к устойчивому клеточному иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

Способ повышения, усиления или стимуляции иммунного ответа или функции, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PDL1 или его антигенсвязывающим фрагментом.

Способ, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с OX40 человека и содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 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 и (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 и (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 и (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, в комбинации с антителом к PDL1.

Способ, где антитело к PDL1 включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PDL1 человека, и содержит:

переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 50, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 51 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 52; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 53, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 54 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 55.

Способ, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PDL1 человека и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

Способ, где антитело к PDL1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

Способ, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

Способ, где антитело к OX40 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где антитело к PDL1 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

Способ, где стимуляция иммунного ответа связана с Т-клетками.

Способ, где стимуляция иммунного ответа характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

Способ, где Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокинов, пролиферацией или цитолитической активностью.

Способ, где Т-клетки представляют собой CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

Способ, где введение приводит к устойчивому клеточному иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

В одном варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), содержащих 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 варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (HCDR), содержащую 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) переменную область легкой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (LCDR), содержащую 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 варианте осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области (HCDR), которые представляют собой HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 24; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ

вающий фрагмент содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две или три аминокислотные замены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28; или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28. В другом варианте осуществления, аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В одном варианте осуществления, антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

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

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

В одном варианте осуществления, антитело по настоящему изобретению относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В более конкретном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен человеческого IgG1 дикого типа (также называемый человеческим IgG1wt или huIgG1) или IgG2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, указанное антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен IgG4 человека с заменами S228P и/или R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

В одном варианте осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания (K_D) от 1×10^{-6} М до 1×10^{-10} М. В другом варианте осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания (K_D) около 1×10^{-6} М, около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М.

В другом варианте осуществления, антитело к OX40 человека по настоящему изобретению демонстрирует межвидовую связывающую активность с OX40 яванского макака.

В одном варианте осуществления, антитело к OX40 по настоящему изобретению связывается с эпитопом OX40 человека вне интерфейса взаимодействия OX40-OX40L. В другом варианте осуществления, антитело к OX40 по настоящему изобретению не конкурирует с OX40 лигандом, связывающимся с OX40. В еще одном варианте осуществления, антитело к OX40 по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие между OX40 и его лигандом OX40L.

Антитела по настоящему изобретению являются агонистическими и значительно усиливают иммунный ответ. В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению может значительно стимулировать первичную Т-клетку к продуцированию IL-2 (IL - интерлейкин) в анализе смешанной реакции лимфоцитов (MLR).

В одном варианте осуществления, антитела по настоящему изобретению обладают сильными Fc-опосредованными эффекторными функциями. Антитела опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против клеток-мишеней OX40^{Hi}, таких как регуляторные Т-клетки (Treg-клетки) НК-клетками. В одном аспекте изобретение относится к способу оценки опосредованного антителом к OX40 истощения *in vitro* специфических подмножеств Т-клеток на основе различных уровней экспрессии OX40.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению не блокируют взаимодействие OX40-OX40L. Кроме того, антитела к OX40 проявляют дозозависимую противоопухолевую активность *in vivo*, как показано на животных моделях. Дозозависимую активность дифференцируют 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 варианте осуществления, 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 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 согласно настоящему изобретению. Альтернативно или дополнительно

но, выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VL 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 согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к OX40 в терапевтически эффективном количестве. В другом варианте осуществления, заболевание, подлежащее лечению антителом или 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 в комбинации с антителом к PD1 или антителом к PDL1 для лечения заболевания, такого как рак или аутоиммунное заболевание.

В другом варианте осуществления, указанное антитело к PD1 ранее было раскрыто в патенте США № 8735553, в котором раскрыты последовательности CDR, найденные в SEQ ID NO: 32-37, и продемонстрирована противораковая активность.

В другом варианте осуществления, указанное антитело к PDL1 было ранее раскрыто в US 2018/0215825, в котором раскрыты последовательности CDR, найденные в SEQ ID NO: 50-55, и продемонстрирована противораковая активность.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму 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 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фиг. 3 показано определение связывания OX40 с помощью проточной цитометрии. OX40-положительные клетки HuT78/OX40 (HuT78 - клетки, полученные от пациента с синдромом Сезари) инкубировали с различными антителами к OX40 (антитела ch445, 445-1, 445-2, 445-3 и 445-3 IgG4) и подвергали анализу путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Результат показан по средней интенсивности флуоресценции (MFI, ось Y).

На фиг. 4 показано связывание антител к OX40 с помощью проточной цитометрии. Клетки HuT78/OX40 и HuT78/cynoOX40 окрашивали антителом 445-3, и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, показанную на оси Y) определяли с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 5 иллюстрирует определение аффинности Fab 445-3 к OX40 дикого типа и точечных мутантов с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

На фиг. 6 показаны подробные взаимодействия между антителом 445-3 и его эпитопами на OX40. Антитела 445-3 и антитела к OX40 изображены бледно-серыми и черными, соответственно. Взаимодействие водородных связей или солевого мостика, π - π стэкинг и Ван-дер-Ваальсово взаимодействие (VDW) обозначено пунктирными, двойными пунктирными и сплошными линиями, соответственно.

Фиг. 7 демонстрирует, что антитело 445-3 не мешает связыванию OX40L. Перед окрашиванием клеток HEK293/OX40L (HEK293 - клетки эмбриональных почек человека), слитый белок OX40-мышинный IgG2a (OX40-mIgG2a) предварительно инкубировали с IgG человека (+HuIgG), антителом 445-3 (+445-3) или антителом 1A7.gr1 (+1A7.gr1, см. US 2015/0307617) в молярном соотношении 1:1. Связывание OX40L с комплексом OX40-mIgG2a/антитело к OX40 определяли путем совместной инкубации клеток HEK293/OX40L и комплекса OX40-mIgG2a/антитело к OX40 с последующей реакцией с вторичным антителом к IgG мыши и проточной цитометрией. Результаты были показаны в среднем \pm SD (стандартное отклонение) для двух повторов. Статистическая значимость: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

На фиг. 8 показано структурное выравнивание Fab OX40/445-3 с указанным комплексом OX40/OX40L (код PDB: 2HEV). OX40L показан белым цветом, 445-3 Fab, показан серым цветом, а OX40 показан черным цветом.

На фиг. 9A, B показано, что антитело к OX40 445-3 индуцирует продукцию IL-2 в сочетании со стимуляцией TCR (рецептор T-клетки). OX40-положительные клетки HuT78/OX40 (фиг. 9A) совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (APC) (HEK293/OS8^{шикс}-Fc γ RI) в присутствии антител к OX40 в течение ночи, и продукцию IL-2 использовали в качестве показаний для стимуляции T-клеток (фиг. 9B). IL-2 в культуральном супернатанте определяли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD для трех повторов.

Фиг. 10 иллюстрирует, что антитела к OX40 усиливают ответы MLR. In vitro дифференцированные дендритные клетки совместно культивировали с аллогенными CD4⁺ T-клетками в присутствии антител к OX40 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 дней. IL-2 в супернатанте определяли с помощью ELISA. Все исследования проводились в четырех повторах, и результаты были показаны как среднее значение \pm SD. Статистическая значимость: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

На фиг. 11 показано, что антитело 445-3 к OX40 индуцирует ADCC. Анализ ADCC проводили с использованием клеток NK92MI/CD16V в качестве эффекторных клеток и клеток HuT78/OX40 в качестве клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или контрольных образцов. Равное количество эффекторных клеток и клеток-мишеней совместно культивировали в течение 5 часов перед обнаружением высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). Процент цитотоксичности (ось Y) рассчитывали на основе протокола производителя, как описано в примере 12. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD для трех повторов.

На фиг. 12A-12C показано, что антитело 445-3 к OX40 в комбинации с NK-клетками повышает соотношение $CD8^+$ эффекторных T-клеток к Treg в активированных PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) *in vitro*. PBMC человека предварительно активировали с помощью PMA-L (фитогемагглютинин) (1 мкг/мл), а затем совместно культивировали с клетками NK92MI/CD16V в присутствии антител к OX40 или контроля. Процентное содержание различных подклассов T-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Дополнительно рассчитывали соотношения $CD8^+$ эффекторных T-клеток к Treg. На фиг. 12A показано соотношение $CD8^+$ /общее количество T-клеток. Фиг. 12B иллюстрирует соотношение Treg/общее количество T-клеток. На фиг. 12C показано соотношение $CD8^+$ /Treg. Данные показаны как среднее \pm SD для повторов. Показаны статистические показатели между 445-3 и 1A7.gr1 при указанных концентрациях. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

На фиг. 13A, 13B показано, что антитело 445-3 к OX40, но не 1A7.gr1, демонстрирует дозозависимую противоопухолевую активность в сингенной модели колоректального рака MC38 у OX40-гуманизированных мышей. Клетки карциномы толстой кишки мыши MC38 (2×10^7) имплантировали подкожно самкам трансгенных мышей, несущих OX40 человека. После рандомизации в соответствии с объемом опухоли, животным вводили внутривенно антитела к OX40 или изотипический контроль один раз в неделю в течение трех раз, как указано. На фиг. 13A сравнивали увеличение доз антитела 445-3 с увеличением доз антитела 1A7.gr1 и снижением роста опухоли. На фиг. 13B представлены данные для всех мышей, получавших эту конкретную дозу. Данные представлены как средний объем опухоли \pm SEM (стандартная ошибка среднего) с 6 мышами на группу. Статистическая значимость: *: $P < 0,05$ в сравнении с изотипическим контролем.

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

На фиг. 15 показана эффективность антител к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в модели опухоли толстой кишки мыши (MC38) у мышей с нокином OX40 человека.

На фиг. 16 продемонстрирована эффективность антитела 445-3 в комбинации с антителом к PD1 в модели карциномы толстой кишки мыши.

Фиг. 17 иллюстрирует эффективность антитела к OX40 в комбинации с антителом к PD1 в модели рака толстой кишки мыши с нокином OX40 и PD1 человека.

На фиг. 18 показано, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD1 является эффективным в модели метастатического рака молочной железы мыши.

Фиг. 19 демонстрирует, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD1 является эффективным в модели рака поджелудочной железы мыши.

На фиг. 20 показано, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PDL1 является эффективным в модели рака поджелудочной железы мыши.

Определения.

Если иное не определено в настоящем документе, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области техники.

В данном контексте, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают их соответствующие формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

Термин "или" используется для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если из контекста явно не следует иное.

Термин "OX40" относится к трансмембранному гликопротеину I типа приблизительно 50 кДа, члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. OX40 также известен как ACT35, CD134 или TNFRSF4. Аминокислотную последовательность OX40 человека (SEQ ID NO: 1) также можно найти под регистрационным номером NP_003318, а нуклеотидная последовательность, кодирующая белок OX40, представляет собой последовательность под регистрационным номером X75962.1. Термин "лиганд OX40" или "OX40L" относится к единственному лиганду OX40 и взаимозаменяем с gp34, CD252 или TNFSF4.

Термины "введение", "вводить", "лечение" и "обработка" в настоящем документе, когда они применяются к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означают контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает в себя приведение реагента в контакт с клеткой, а также приве-

дение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клеткой. Термин "введение" и "обработка" также означает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин "субъект" в настоящем 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 облегчению заболевания или расстройства (т.е. замедлению или остановке или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте, "лечить", "обработка" или "лечение" относится к облегчению или улучшению, по меньшей мере, одного физического параметра, включая те, которые не могут быть различимы самим пациентом. В еще одном аспекте, "лечить", "обработка" или "лечение" относится к модуляции заболевания или расстройства, либо физически (например, стабилизацией заметного симптома), либо физиологически (например, стабилизацией физического параметра), либо и тем и другим. В еще одном аспекте изобретения, "лечить", "обработка" или "лечение" относится к предотвращению или задержке начала 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 имеющего риск возникновения расстройства, описанного в настоящем документе).

В данном контексте термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном. Внутри антигена вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует через нековалентные силы с антигеном на многочисленных участках; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

В данном контексте термин "антитело" относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов, который может нековалентно связывать соответствующий антиген, обратимо и специфически. Например, встречающееся в природе антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначается в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (в настоящем описании используется сокращение VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями, чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксионца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 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 различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антитело" включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела. Антитела могут быть любого изотипа/класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

В некоторых вариантах осуществления, антитела к OX40 содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт или по меньшей мере вариабельную область. В некоторых вариантах осуществления, антитела к OX40 содержат антигенсвязывающий фрагмент из антитела к OX40, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, антитело к OX40 является выделенным или рекомбинантным.

Термин "моноклональное антитело" или "mAb" или "Mab" в настоящем документе означает популяцию по существу однородных антител, то есть молекулы антител, содержащиеся в популяции, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, обычные (поликлональные) препараты антител обычно содержат множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, в частности, их определяющие комплементарность области, которые часто являются специфическими для различных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител и его не следует интерпретировать как требующее продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. См., например, Kohler и др., *Nature* 1975 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel и др., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* 1992; Harlow и др., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan и др., *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* 1993. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть любого класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и любой их подкласс, такой как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Гибридому, продуцирующую моноклональное антитело, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Вы-

сокие титры моноклональных антител могут быть получены при продукции *in vivo*, когда клетки из отдельных гибридом вводят внутрибрюшинно мышам, таким как первично-праймированные мыши Balb/c, с получением асцитной жидкости, содержащей высокие концентрации желаемых антител. Моноклональные антитела изотипа IgM или IgG могут быть очищены от таких асцитных жидкостей или от супернатантов культур с использованием способов колоночной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области техники.

В целом, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область из от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию. Как правило, легкие цепи человека классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как α , δ , ϵ , γ или μ и определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельная и константная области соединены "J" -областью из около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит "D" -область из около более 10 аминокислот.

Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелая цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, в целом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания являются одинаковыми.

Как правило, вариабельные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гипервариабельные области, также называемые "определяющими комплементарность областями", которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR). CDR обычно выравниваются каркасными областями, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. Как правило, от N-конца к C-концу вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепи 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 могут быть определены с использованием различных хорошо известных определений в данной области техники, например, Kabat, Chothia и AbM (см., например, Johnson и др., *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia и др., *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia и др., *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani и др., *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). Определения сайтов связывания антигена также описаны в следующих источниках: Ruiz и др., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); и Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum и др. al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); и Martin и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin и др., *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); и Rees и др., In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996). В комбинированной схеме нумерации по Кабату и Чотии, в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR по Кабату, CDR по Чотии 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.

Термин "гипервариабельная область" означает аминокислотные остатки антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "CDR" (т.е., 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 и др. 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); см. также Chothia и Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре Термин "каркасные" или "FR" остатки означает те остатки, относящиеся к вариабельному домену, которые отличаются от остатков, относящихся к гипервариабельной области, определенных в настоящем документе как остатки, относящиеся к CDR.

Если не указано иное, "антигенсвязывающий фрагмент" означает антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом, например, фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечные Fv (ScFv); нанотела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитело "специфически связывается" с белком-мишенью, что означает, что антитело проявляет преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается "специфичным" для его предполагаемой мишени, если его связывание является определяющим для присутствия целевого белка в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные результаты.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, используемые в настоящем описании, будут связываться с целевым белком 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 нецелевыми белками. В настоящем документе говорится, что антитело в настоящем документе специфически связывается с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например, аминокислотную последовательность молекулы ОХ40 человека, если оно связывается с полипептидами, содержащими такую последовательность, но не связывается с белками, не имеющими этой последовательности.

Термин "антитело человека" в настоящем документе означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать углеводные цепи мыши, если оно продуцируется у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши. Аналогичным образом, "мышинное антитело" или "крысиное антитело" означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина мыши или крысы, соответственно.

Термин "гуманизованное антитело" означает формы антител, которые содержат последовательности антител нечеловеческого происхождения (например, мыши), а также антител человека. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таким участкам иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все из FR областей соответствуют таким участкам последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело также не обязательно будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Приставка "hum", "hu", "Hu" или "h" добавляется к обозначениям клонов антител, когда это необходимо для того, чтобы отличить гуманизованные антитела от исходных антител грызунов. Гуманизованные формы антител грызунов, как правило, содержат одинаковые последовательности CDR исходных антител грызунов, хотя некоторые аминокислотные замены могут быть включены для увеличения аффинности, повышения стабильности гуманизованного антитела, удаления посттрансляционной модификации или по другим причинам.

В данном контексте термин "неконкурентный" означает, что связывание антитела происходит и не препятствует связыванию лиганда с рецептором.

Термин "соответствующая последовательность зародышевой линии человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность переменной области человека, которая имеет самую высокую определенную идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной переменной области по сравнению со всеми другими известными аминокислотными последовательностями переменной области, кодируемыми последовательностями переменной области иммуноглобулина зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности переменной области человека с самой высокой идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной переменной области по сравнению со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями переменной области. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может представлять собой только каркасные области, определяющие только комплементарность области, каркасные и определяющие комплементарность области, переменный сегмент (как определено выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат переменную область. Идентичность последовательностей может быть определена с использованием способов, описанных в данном документе, например, выравнивание двух последовательностей с использованием BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в данной области техники. Соответствующая нуклеиновая кислота или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности с эталонной нуклеиновокислотной или аминокислотной последовательности переменной области.

Термин "равновесная константа диссоциации (K_D , M)" относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹, M⁻¹). Константы равновесной диссоциации могут быть измерены с использованием любого известного способа в данной области техники. Антитела согласно настоящему изобретению, как правило, имеют равновесную константу диссоциации менее чем около 10^{-7} или 10^{-8} M, например, менее чем около 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых аспектах менее чем около 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

Термины "рак" или "опухоль" в настоящем документе имеют самое широкое значение, как понятно в данной области техники, и относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. В контексте настоящего изобретения рак не

ограничивается определенным типом или местоположением.

Термин "комбинированная терапия" относится к введению двух или более терапевтических агентов для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящем описании. Такое введение включает совместное введение данных терапевтических агентов по существу одновременно. Такое введение также включает совместное введение в нескольких или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разведены до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное применение каждого типа терапевтического агента приблизительно в одно и то же время или в разное время. В любом случае, схема лечения обеспечит благоприятные эффекты комбинации лекарственного средства при лечении состояний или расстройств, описанных в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения, когда делается ссылка на аминокислотную последовательность, термин "консервативная замена" означает замену исходной аминокислоты новой аминокислотой, которая по существу не изменяет химические, физические и/или функциональные свойства антитела или фрагмента, например, его аффинность связывания с OX40. В частности, общие консервативные подстанции аминокислот показаны в следующей таблице и хорошо известны в данной области техники.

Примеры консервативных аминокислотных замен.

Исходный аминокислотный остаток	Однобуквенные и трехбуквенные 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

Примерами алгоритма, которые подходят для определения процента идентичности последовательности и схожести последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul и др., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul и др., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для выполнения BLAST-анализа общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар последовательностей с максимальным показателем сходства (HSP) путем определения коротких слов длиной W в

последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому показателю T с положительной оценкой, либо соответствуют слову такой же длины в базы данных последовательностей. T представляет собой порог показателя соседнего слова. Данные исходные совпадения соседних слов выполняют роль заправки для начальных поисков для того, чтобы найти более длинные содержащие их HSP. Совпадения слов распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности по мере увеличения кумулятивного показателя оценки выравнивания. Кумулятивные показатели оценки рассчитываются с помощью нуклеотидных последовательностей, параметры M (наградный показатель для пар совпадающих остатков, всегда больше 0) и N (штрафной показатель для несовпадающих остатков, всегда меньше 0). Для аминокислотных последовательностей матрица показателей используется для расчета кумулятивного показателя оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается когда: кумулятивный показатель выравнивания падает ниже величины X от его полученного максимального значения; кумулятивный показатель достигает нуля или ниже из-за накопления в выравнивании одного или более остатков с отрицательным показателем; либо же достигается конец последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используются длина слова (W) 11, математическое ожидание (E) 10, M составляет 5, N составляет -4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLAST по умолчанию используются длина слова 3 и математическое ожидание (E) 10, и матрица расчета показателей BLOSUM62 (см., Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989) выравнивания (B) 50, математическое ожидание (E) 10, M составляет 5, N составляет -4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ схожести двух последовательностей (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787, 1993). Одно измерение схожести, обеспеченное алгоритмом BLAST заключается в определении наименьшей суммарной вероятности $P(N)$, которая обеспечивает представление о вероятности, посредством которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет происходить случайно. Например, нуклеотидная последовательность считается похожей на эталонную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность в сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше чем около 0,2, более предпочтительно, меньше чем около 0,01 и, наиболее предпочтительно, меньше чем около 0,001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма Е. Мейерса и В. Миллера (Comput. Appl. Biosci. Biosci., 4: 11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. Biol. 48: 444-453, (1970), который был включен в программу GAP в программный пакет GCG, с использованием либо матрицы BLOSUM62, либо матрицы PAM250, и штраф за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и длины гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Термин "нуклеиновая кислота" используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки или связи, которые являются синтетическими, природными и неприродными, имеющие сходные связывающие свойства, как у эталонной нуклеиновой кислоты, и которые метаболизируются способом, подобным эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

Термин "функционально связанный" в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК (дизоксирибонуклеиновая кислота) сегментами. Обычно термин относится к функциональному взаимодействию транскрипционной регуляторной последовательности 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 экспрессирующей системе. Как правило, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е., они являются цисдействующими. Однако некоторые регуляторные последовательности транскрипции, такие как энхансеры, не обязательно должны физически примыкать или находиться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипция которых они усиливают.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к композициям, например, фармацевтически приемлемым композициям, которые включают антигеном OX40, описанное в настоящем документе, составленное вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным эксципиентом. В данном контексте термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому

подобное, которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может быть пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые 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 из подходящих способов введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутривенный, внутримышечный). В некоторых вариантах осуществления, антитело вводили путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводили путем внутримышечной или подкожной инъекции.

Термин "терапевтически эффективное количество" в данном контексте 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 изменяться 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 веса субъекта, подлежащего лечению. Соответствующее количество в любом конкретном случае может быть очевидным для специалистов в данной области техники или может быть определено с помощью рутинных экспериментов. В случае комбинированной терапии "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству объектов комбинации для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

В данном контексте фраза "в комбинации с" означает, что антитело к OX40 вводили субъекту одновременно с, до или после введения антитела к PD1 или антитела к PDL1. В некоторых вариантах осуществления, антитело к PD1 или антитело к PDL1 вводили в виде совместного состава с антителом к OX40.

Подробное описание изобретения

Антитела к PD1.

Настоящее изобретение относится к антителам к PD1, найденным, например, в патенте США № 8735553. Антитела к PD1 также предложены в настоящем документе и содержат, например, переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, как указано в SEQ ID NO: 32, HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 33, и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 34; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую: LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 35, LCDR2, как указано в SEQ ID NO: 36 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 37.

В другом варианте осуществления, антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PD1 человека и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В еще одном варианте осуществления, антитело к PD1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47. В другом аспекте, константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

Антитела к PDL1.

Настоящее изобретение относится к антителам к PDL1, обнаруженным, например, в US 2018/0215825. Антитела к PDL1 также предложены в настоящем документе и содержат, например, переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, как указано в SEQ ID NO: 50, HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 51, и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 52; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую: LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 53, LCDR2, как указано в SEQ ID NO: 54, и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 55.

В другом варианте осуществления, антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает PDL1 человека и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

Антитела к OX40.

Настоящее изобретение относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают OX40 человека. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, которые имеют желательные фармакокинетические характеристики и другие желательные характеристики, и, таким образом, могут быть использованы для снижения вероятности или лечения рака. В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела, и способы получения и применения таких фармацевтических композиций для профилактики и лечения рака и связанных с ним расстройств.

Настоящее изобретение относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают OX40 человека. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, антитела или их антигенсвязывающие фраг-

менты, полученные, как описано ниже.

В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, где указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 20 или 26 (табл. 3). Настоящее изобретение также относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат VH CDR, имеющую аминокислотную последовательность любой из VH CDR, перечисленных в табл. 3. В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с OX40, где указанные антитела содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в табл. 3.

В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, где указанные антитела или фрагменты антител содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 22 или 28 (табл. 3). Настоящее изобретение также относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат VL CDR, содержащую аминокислотную последовательность любой из VL CDR, перечисленных в табл. 3. В частности, изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с OX40, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VL, содержащих аминокислотную последовательность любой из CDR VL, перечисленных в табл. 3.

Другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают аминокислоты, которые были подвержены мутации, но по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичны в областях CDR с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных в табл. 3. В некоторых аспектах он включает мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвержены мутации в областях CDR по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательности, описанной в табл. 3.

Другие антитела по настоящему изобретению включают антитела, где аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, были подвержены мутации; но по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичны последовательностям, описанным в табл. 3. В некоторых аспектах, оно включает мутантные аминокислотные последовательности, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвержены мутации в переменных областях по сравнению с переменными областями, изображенными в последовательности, описанной в табл. 3, при сохранении по существу той же терапевтической активности.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфически связываются с OX40. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

Идентификация эпитопов и антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом.

В настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом OX40 человека. В некоторых аспектах, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с одним и тем же эпитопом OX40.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к OX40, описанные в табл. 3. Таким образом, дополнительные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с OX40 демонстрирует, что тестируемое антитело может конкурировать с данным антителом или его антигенсвязывающими фрагментами за связывание с OX40. Такое антитело может, не будучи связанным какой-либо одной теорией, связываться с тем же или схожим (например, структурно подобным или пространственно проксимальным) эпитопом на OX40, что и антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, с которыми оно конкурирует. В определенном аспекте антитело, которое связывается с тем же эпитопом на OX40, что и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, представляет собой человеческое или гуманизованное моноклональное антитело. Такие человеческие или гуманизованные моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в настоящем документе.

Дальнейшее изменение каркаса Fc-области.

Еще в одном аспекте, Fc-область изменяли путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или более аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком, таким образом, что антитело будет иметь измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет

антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторным лигандом, в отношении которого аффинность изменяли, может быть, например, рецептор Fc или C1-компонентом комплемента. Этот подход описан, например, в патенте США № 5624821 и 5648260, Winter и др.

В другом аспекте один или более аминокислотных остатков могут быть заменены одним или более различными аминокислотными остатками, так что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или отмененную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход описан, например, в патенте США № 6194551, Idusogie и др.

В другом аспекте, одну или более аминокислотных остатков изменяли, чтобы таким образом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан, например, в публикации PCT WO 94/29351 Bodmer и др. В конкретном аспекте одну или более аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменяли одним или более аллотипическими аминокислотными остатками для подкласса IgG1 и изотипа каппа. Аллотипические аминокислотные остатки также включают, но не ограничиваются ими, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа, как описано Jefferis и др., MAbs. 1:332-338 (2009).

В еще одном аспекте область Fc модифицировали для увеличения способности антитела опосредовать зависимую от антитела клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела в отношении рецептора Fcγ путем модификации одной или более аминокислот. Этот подход описан, например, в публикации PCT WO 00/42072 от Presta. Более того, сайты связывания на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см., Shields, R.L. и др., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

В еще одном аспекте, модифицировали гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело не имеет или имеет уменьшенное гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к "антигену". Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть выполнены одна или более аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или более сайтов гликозилирования каркаса варибельной области, чтобы таким образом элиминировать гликозилирование на этом сайте. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Данный подход описан, например, в патенте США № 5714350 и 6350861, Co и др.

Дополнительно или альтернативно может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такой как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества остатков фукозила, или антитело, имеющее увеличенные бисектные структуры GlcNac (N-ацетилглюкозамин). Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают ADCC-способность антител. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным аппаратом гликозилирования. Клетки с измененным аппаратом гликозилирования были описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по изобретению, в результате чего получали антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195, Hang и др., описана клеточная линия с функционально разрушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835, Presta, описан вариант клеточной линии CHO (клетка яичника китайского хомячка), клетки Lecl3, с уменьшенной способностью присоединять фукозу к Asn (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также, Shields, R.L. и др., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342, Umana и др., описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют увеличенное разделение на две половины структур GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC в антителах (см. также Umana и др., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

В другом аспекте, если желательно снижение ADCC, было показано, что человеческое антитело подкласса IgG4 имеет только умеренную ADCC и почти не обладает эффекторной функцией CDC (Moore G L, и др. 2010 MAbs, 2:181-189). С другой стороны, было обнаружено, что природный IgG4 менее стабилен в стрессовых условиях, таких как в кислотном буфере или при повышающейся температуре (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall 'Acqua, W. и др., 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse и др. 2002 Immunol, 105:9-19). Сниженная ADCC может быть достигнута путем функционального связывания антитела с IgG4, сконструированным с комбинациями изменений, чтобы иметь сниженную или нулевую активность связывания FcγR или связывания C1q, тем самым уменьшая или устраняя эффекторные функции ADCC и CDC. Учитывая физико-химические свойства антитела как биологического лекарственного средства, одним из менее желательных, присущих IgG4 свойств является динамическое разделение двух его тяжелых цепей в растворе с образованием полуантитела, которое приводит к полуспеци-

фическим антителам, генерируемым *in vivo* посредством процесса, называемого "обменом плеча Fab" (Van der Neut Kolfshoten M., и др. 2007 Science, 317:1554-157). Мутация серина на пролин в положении 228 (система нумерации EU), по-видимому, ингибирует разделение тяжелой цепи IgG4 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse и др. 2002 Immunol, 105:9-19). Сообщалось, что некоторые из аминокислотных остатков в шарнирной области и области γ Fc оказывают влияние на взаимодействие антитела с рецепторами Fc γ (Chappel S.M., и др. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee, J. и др., 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour, K.L. и др. 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes, R.A. и др., 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 также могут вызывать различные физико-химические свойства (Brusco, A. и др. 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse и др. 2002 Immunol, 105:9-19). Для получения антител к OX40 с низкой ADCC, CDC и низкой нестабильностью можно модифицировать шарнирную область и область Fc IgG4 человека и внести ряд изменений. Данные модифицированные молекулы Fc IgG4 могут быть раскрыты в SEQ ID NO: 83-88, патент США № 8735553.

Получение антител к OX40.

Антитела к OX40 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены любыми способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетрамеров антител, тогда как полноразмерные моноклональные антитела могут быть получены, например, гибридомным или рекомбинантным получением. Рекомбинантная экспрессия может происходить из любых подходящих клеток-хозяев, известных в данной области техники, например, клеток-хозяев млекопитающих, клеток-хозяев бактерий, клеток-хозяев дрожжей, клеток-хозяев насекомых и т.д.

В настоящем изобретении дополнительно предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области или сегменты тяжелой или легкой цепи, содержащие определяющие комплементарность области, как описано в настоящем 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 последовательности нуклеиновой кислоты 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 последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 23 или 29.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать последовательность переменной области антитела к OX40. Они также могут 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 примерных антител к OX40. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, которые, соответственно, по существу идентичны переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из антител мыши.

В настоящем изобретении также предложены экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения антител к OX40. Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которые должен быть экспрессирован вектор. Как правило, экспрессионные векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь антитела к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах, индуцируемый промотор используется для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей, за исключением контроля условий индукции. Индуцируемые промоторы включают, например, аарбинозу, *lacZ* (ген лактозного оперона), промотор металлотионеина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть размножены в неиндуцирующих условиях без смещения популяции для кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, для эффективной экспрессии антитела к OX40 или антигенсвязывающего фрагмента также могут потребоваться или могут быть необходимы другие регуляторные элементы. Данные элементы обычно включают кодон инициации ATG и прилегающий сайт связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf и др., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; и Bittner и др., Meth. 20:125, 1994; and Bittner et al., Meth. Enzymol., 153: 516, 1987). Например, энхансер SV40 (вирус 40 обезьян) или энхансер CMV (цитомегаловирус) можно использовать для усиления экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

Клетки-хозяева для сбора и экспрессии цепей антитела к OX40 могут быть либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E.coli* представляет собой один из прокариотических хозяев, которые могут использоваться для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и

другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В данных прокариотических хозяевах также можно создавать векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество различных известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности и имеют последовательности сайтов связывания с рибосомами и тому подобное для инициирования и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также могут быть использованы для экспрессии полипептидов к ОХ40. Также могут быть использованы клетки насекомых в комбинации с векторами бакуловируса.

В других аспектах клетки-хозяева млекопитающих использованы для экспрессии и получения полипептидов к ОХ40 по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой либо гибридную клеточную линию, экспрессирующую гены эндогенного иммуноглобулина или клеточную линию млекопитающего, несущую экзогенный вектор экспрессии. К ним относятся любые нормальные моральные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животных или человека. Например, было разработано ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии СНО, различные клеточные линии СОS (фибробластоподобные клетки), клетки НЕК293, клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток ткани млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждалось в целом, например, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев млекопитающих могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см. например, Queen, и др., *Immunol. Rev.* 89: 49-68, 1986) и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК (рибонуклеиновая кислота), сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Данные векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для конкретного типа клеток, специфичными для стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Используемые промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотиионеина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор ММТV (вирус опухоли молочной железы мышей), промотор SV40, промотор MRP (процессинг митохондриальной РНК) роIII (полимераза III), конститутивный промотор MPSV (миелолиферативный вирус саркомы мышей), индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как человеческий среднеранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в области техники.

Способы обнаружения и диагностики.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы обнаружения ОХ40. В одном аспекте, антитела или антигенсвязывающие фрагменты пригодны для обнаружения присутствия ОХ40 в биологическом образце. В данном контексте термин "обнаружение" включает количественное или качественное обнаружение. В некоторых аспектах биологический образец включает клетку или ткань. В других аспектах, такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани, которые экспрессируют ОХ40 на более высоких уровнях по сравнению с другими тканями.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу обнаружения присутствия ОХ40 в биологическом образце. В некоторых аспектах, способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом к ОХ40 в условиях, допускающих связывание антитела с антигеном, и обнаружение образования комплекса между антителом и антигеном. Биологический образец может включать, без ограничения, образцы мочи или крови.

Также включен способ диагностики расстройства, связанного с экспрессией ОХ40. В некоторых аспектах, способ включает приведение тестируемой клетки в контакт с антителом к ОХ40; определение уровня экспрессии (количественно или качественно) ОХ40 в тестируемой клетке путем обнаружения связывания антитела к ОХ40 с полипептидом ОХ40; и сравнение уровня экспрессии в тестируемой клетке с уровнем экспрессии ОХ40 в контрольной клетке (например, нормальной клетке того же тканевого происхождения, что и тестируемая клетка или клетка, не экспрессирующая ОХ40), где более высокий уровень экспрессии ОХ40 в тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие нарушения, связанного с экспрессией ОХ40.

Способы лечения.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы лечения расстройства или заболевания, ассоциированного с ОХ40. В одном аспекте, расстройство или заболевание, ассоциированное с ОХ40 представляет собой рак.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения рака. В некоторых аспектах способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к ОХ40

или антигенсвязывающего фрагмента. Рак может включать, без ограничения, 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 согласно настоящему изобретению можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости для местного лечения, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение дозы может быть осуществлено любым пригодным способом, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В настоящем документе рассмотрены различные схемы введения доз, включая одно или множество введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульс-терапию, но не ограничиваясь ими.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению будут составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину заболевания, область доставки лекарственного агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-практикам. Антитело не должно быть, но необязательно, составлено с одним или более агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Как правило их применяют в такой же дозировке и посредством того же способа введения, как описано в настоящем документе, или в дозировке, составляющей от около 1 до 99% количества доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозировке и посредством любого способа введения, эмпирически/клинически считающихся подходящими.

Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, введения антитела в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и осмотра лечащего врача. Антитело соответствующим образом вводили пациенту однократно или в ходе серии сеансов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания от около 1 до 100 мг/кг антитела является рассматриваемой начальной дозой для введения пациенту, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии/ Типичная ежедневная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. При повторном введении в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение обычно следует продолжать до желаемого подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, около шести доз антитела). Можно вводить начальную повышенную нагрузочную дозу, за которой следует одна или более пониженные дозы. Однако, могут быть пригодны другие схемы лечения. Ход такого лечения можно легко контролировать с помощью обычных методик и анализов.

Комбинированная терапия.

В одном аспекте, антитела к OX40 по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с другими терапевтическими агентами, например, антителами к PD1. Другие терапевтические агенты, которые могут быть использованы с антителами к OX40 по настоящему изобретению, включают: но не ограничиваются ими, химиотерапевтический агент (например, паклитаксел или агент паклитаксела; (например, Абрахане®), доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубин, леналидомид, 5-азациитидин, ифосфамид, оксалиплатин, пеметрексед динатрий, циклофосфамид, этопозид, децитабин, флударабин, винкристин, бендамустин, хлорамбуцил, бусульфид, гемцитабин, мелфалан, пентостатин, митоксантрон, пеметрексед динатрий), ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) (например, эрлотиниб), ингибитор мультикиназы (например, MGCD265, RGB-286638), агент, направленный на CD-20 (например, ритуксимаб, офатумумаб, RO5072759, LFB-R603), агент, направленный на CD52 (например, алектумаб), преднизолон, дарбэпозин альфа, леналидомид, ингибитор Vcl-2 (В-клеточная лимфома 2) (например, обимерсен натрия), ингибитор аврора-киназы (например, MLN8237, TAK-901), ингибитор протеасом (например, бортезомиб), агент, направленный на CD-19 (например, MEDI-551, MOR208), ингибитор MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) (например, АВТ-348), ингибитор JAK-2 (янус-киназа 2) (например, INCB018424), ингибитор mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) (например, темсиролиму, эверолиму), ингибитор BCR/ABL (например, иматиниб), антагонист рецептора ET-A (эндотелин) (например, ZD4054), агонист рецептора 2 TRAIL (индуцирующий апоптоз лиганд, связанный с TNF) (TR-2) (например, CS-1008), ингибитор HGF/SF (фактор роста гепатоцитов/рассеивающий фактор) (например, AMG 102), EGEN-001, ингибитор Polo-подобной киназы 1 (например, BI 672).

Антитела к OX40 по настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими терапевтическими средствами, например, антителами к PD1. Антитела к PD1 могут включать, без ограничения, антитела, раскрытые в патенте США №:8735553. Пембролизумаб (ранее MK-3475), как раскрыто Merck, представляет собой гуманизированный иммуноглобулин IgG4-K с молекулярной массой около 149 кДа, который нацелен на рецептор PD1 и ингибирует связывание лигандов рецептора PD1 с PD-L1 и PD-L2. Пембролизумаб был одобрен для показаний к применению при метастатической меланоме и метастатическом немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), и в настоящее время проводится клиническое исследование для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC) и рефрактерной лимфомы Ходжкина (рХЛ). Ниволумаб (описанный Bristol-Meyers Squibb) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4-K. Ниволумаб (клон 5C4) описан в патенте США № 8008449 и WO 2006/121 168. Ниволумаб одобрен для лечения меланомы, рака легкого, рака почек и лимфомы Ходжкина.

Фармацевтические композиции и препараты.

Также предложены композиции, включая фармацевтические препараты, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент к OX40, или полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент к OX40. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 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 техники.

Фармацевтические препараты антитела к OX40 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе, получают путем смешивания такого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е изд., 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, не ограничиваясь перечисленным, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 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; металлсодержащие комплексы (например, комплексы цинк-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, например, полиэтиленгликоль (PEG). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящем документе дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, например, растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины PH-20 гиалуронидазы человека, например, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примерные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентах США № США 7871607 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP комбинируют с одним или более дополнительными гликозаминогликанами, например, хондроитиназами.

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

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрицы находятся в форме формованных изделий, например пленок или микрокапсул.

Препараты для введения *in vivo* обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Примеры

Пример 1. Получение моноклонального антитела к OX40.

Моноклональные антитела к OX40 получали на основе общепринятой технологии слияния гибридом (de St Groth и Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1) с незначительными модификациями. Антитела с высокой связывающей активностью при твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) и анализе путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) отбирали для дальнейшей характеристики.

Рекомбинантные белки OX40 для анализа иммунизации и связывания.

Кодирование кДНК для полноразмерного OX40 человека (SEQ ID NO: 1) синтезировали Sino Biological (Пекин, Китай) на основе последовательности GenBank (регистрационный номер: X75962.1). Кодировую область сигнального пептида и внеклеточного домена (ECD), состоящую из аминокислот (AA) 1-216 OX-40 (SEQ ID NO: 2), амплифицировали с помощью PCR (полимеразная цепная реакция) и клонировали в разработанные собственными силами экспрессионные векторы с С-концом, слитым с Fc-доменом IgG2a мыши, Fc-доменом тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа или His-меткой, что привело к трем плазмидам экспрессии рекомбинантного слитого белка, OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His, соответственно. Схематическое представление слитых белков OX40 показано на фиг. 1. Для получения рекомбинантного слитого белка OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His экспрессионные плазмиды временно трансфицировали в клетки 293G и культивировали в течение 7 дней в CO₂-инкубаторе, оснащенный вращающимся шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и очищали путем центрифугирования. OX40-mIgG2a и OX40-huIgG1 очищали с использованием колонки с белком А (Кат. №: 17-5438-02, GE Life Sciences). OX40-His очищали с использованием колонки с никель-сефарозой (Кат. № 17-5318-02, GE Life Science). Белки OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His диализировали против фосфатно-солевого буфера (PBS) и хранили в морозильной камере при -80°C в небольших аликвотах.

Стабильные экспрессионные клеточные линии.

Для получения стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный OX40 человека (OX40) или OX40 яванского макака (SynoOX40), данные гены клонировали в ретровирусный вектор pFB-Neo (Кат. №: 217561, Agilent, США). Ретровирусную трансдукцию проводили на основании протокола, описанного ранее (Zhang et al., 2005). Клетки HuT78 и HEK293 трансдуцировали ретровирусом, содержащим OX40 человека или SynoOX40, соответственно, с получением клеточных линий HuT78/OX40, HEK293/OX40 и HuT78/SynoOX40.

Иммунизация, слияние гибридом и клонирование.

Восемь-двенадцать недельных мышей Balb/c (от HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Пекин, Китай) иммунизировали внутрибрюшинно 200 мкл смеси антигена, содержащей 10 мкг OX40-mIgG2a и иммуноадьюванта с быстрым антителом (Quick-Antibody Immuno-Adjuvant) (Кат. № KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай). Процедуру повторяли через три недели. Через две недели после 2-й иммунизации, сыворотки мышей оценивали на связывание OX40 с помощью ELISA и FACS. Через десять дней после скрининга, сыворотки мышей с самыми высокими титрами антител к OX40 стимулировали путем внутрибрюшинной инъекции 10 мкг OX40-mIgG2a. Через три дня после бустинга, спленоциты выделяли и сливали с линией клеток миеломы мышей, клетками SP2/0 (ATCC, Manassas VA), используя стандартные методики (Somat Cell Genet, 1977 3:231).

Анализ OX40-связывающей активности антител с помощью ELISA и FACS.

Супернатанты клонов гибридомы первоначально подвергали скринингу с помощью ELISA, как описано в (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52) с некоторыми модификациями. Вкратце, белок OX40-His накрывали в 96-луночных планшетах при 4°C в течение ночи. После промывки PBS/0,05% Tween-20, планшеты блокировали PBS/3% BSA (бычий сывороточный альбумин) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали PBS/0,05% Tween-20 и инкубировали с клеточными супернатантами при комнатной температуре в течение 1 ч. HRP-связанное (HRP - пероксидаза хрена) антитело к IgG мыши (Кат. № 115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ fragment specific) и субстрат (Кат. № 00-4201-56, eBioscience, USA) использовали для получения сигнала цветового поглощения при длине волны 450 нм, который измеряли с помощью планшетного считывателя (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/ PHERAstar, BMG LABTECH). Положительные исходные клоны брали из слияния скрининга с непрямой ELISA. ELISA-положительные клоны дополнительно верифицировали с помощью FACS с использованием клеток HuT78/OX40 и HuT78/synoOX40, описанных выше. OX40-экспрессирующие клетки (10⁵ клеток/лунку) инкубировали с ELISA-положительными супернатантами гибридомы с последующим связыванием с антителами к IgG мыши eFluor® 660 (Кат. № 50-4010-82, eBioscience, США). Клеточную флуоресценцию количественно определяли с использованием проточного цитометра (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, США).

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

Субклонирование и адаптация гибридом к бессывороточной или низкосывороточной среде.

После первичного скрининга с помощью ELISA, FACS и функциональных анализов, как описано выше, положительные клоны гибридомы субклонировали ограничивающим разведением для обеспечения клональности. Лучшие субклоны антител проверяли с помощью функциональных анализов и адаптировали для роста в среде CDM4MAb (Кат № SH30801.02, Hyclone, США) с 3% FBS.

Экспрессия и очистка моноклональных антител.

Клетки гибридомы, экспрессирующие лучшие клоны антител, культивировали в среде CDM4MAb (Кат. № SH30801.02, Hyclone) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 5-7 дней при 37°C. Кондиционированную среду собирали путем центрифугирования и фильтровали, пропуская мембрану 0,22 мкм перед очисткой. Антитела мыши в супернатантах наносили и связывали на колонку с белком А (Кат. № 17-5438-02, GE Life Sciences) в соответствии с руководством производителя. Процедура обычно давала антитела с чистотой выше 90%. Аффинно очищенные антитела к белку А либо диализировали против PBS, либо, при необходимости, дополнительно очищали с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex 200 (Кат. № 28-9893-35, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белка определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм. Итоговые препараты антител хранили аликвотами в морозильной камере с температурой -80°C.

Пример 2. Клонирование и анализ последовательностей антител к OX40.

Клоны мышинной гибридомы собирали для получения общих клеточных РНК с использованием набора Ultrapur RNA (Кат. № 74104, QIAGEN, Германия) на основе протокола производителя. 1-ю цепь кДНК (комплементарная ДНК) синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК от Invitrogen (Кат. № 18080-051), а амплификацию PCR VH и VL гибридомных антител проводили с использованием набора для PCR (Кат. № CW0686, CWBio, Пекин, Китай). Олигопраймеры, используемые для клонирования кДНК антител вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), синтезировали с помощью Invitrogen (Пекин, Китай) на основе последовательностей, описанных ранее (Brocks et al. 2001 Mol Med 7:461). Продукты PCR использовали непосредственно для секвенирования или субклонировали в вектор клонирования pEASY-Blunt (Кат. № CB101 TransGen, Китай), затем секвенировали с помощью Genewiz (Пекин, Китай). Аминокислотные последовательности областей VH и VL были выведены из результатов секвенирования ДНК.

Определяющие комплементарность области (CDR) антител мыши были определены по Кабату (Wu и Kabat 1970 J. Exp. Med. 132:211-250) посредством аннотации последовательности и анализа последовательности с помощью компьютерной программы. Аминокислотные последовательности репрезентативного лучшего 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 Mu445 VH и VL

Mu445 VH	SEQ ID NO:9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFT SYIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDS AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
Mu445 VL	SEQ ID NO:11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNY LNWYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKL PYTFGGGTKLEKK

Таблица 2

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

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

Пример 3. Гуманизация мышинового антитела 445 к OX40 человека.

Гуманизация и конструирование антител.

Для гуманизации Mu445, гены IgG зародышевой линии человека, искали последовательности, которые имеют высокую степень гомологии с последовательностями кДНК переменных областей Mu445 путем сравнения последовательностей с базой данных генов иммуноглобулина человека в IMGT. В качестве матриц для гуманизации были выбраны гены IGHV (переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина) и IGKV (переменный кластер каппа иммуноглобулина) человека, которые присутствуют в спектре антител человека с высокой частотой (Glanville и др., 2009 PNAS 106:20216-20221) и в высокой степени гомологичны Mu445.

Гуманизацию проводили с помощью CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods and Protocols, Том 248: Humana Press), а гуманизированные антитела конструировали в формате IgG1 человека дикого типа с использованием разработанного собственными силами экспрессионного вектора. На начальном этапе гуманизации мутации из остатков аминокислот мыши к человеку в каркасных областях определяли с помощью имитированного 3D-структурного анализа, а остатки, относящиеся к каркасной области мыши со структурной значимостью для поддержания канонических структур CDR сохраняли в первом варианте гуманизированного антитела 445 (см. 445-1, табл. 3). Шесть CDR из 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). Переменная область тяжелой цепи 445-1 имеет аминокислотную последовательность (VH) SEQ ID NO: 14, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 15, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность (VL) SEQ ID NO: 16, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17. В частности, LCDR Mu445 (SEQ ID NO: 6-8) прививали в каркас переменной области гена зародышевой линии человека IGVK1-39 с сохранением двух остатков, относящихся к каркасной области мыши (I₄₄ и Y₇₁) (SEQ ID NO: 16). HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 13) и HCDR3 (SEQ ID NO: 5) прививали в каркас переменной области гена зародышевой линии человека IGHV1-69 с сохранением двух остатков, относящихся к каркасной области мыши (L₇₀ и S₇₂) (SEQ ID NO: 14). В варианте гуманизации 445 (445-1), прививали только N-концевую половину HCDR2 по Кабату, поскольку только N-концевая половина, согласно предположениям, была важна для связывания антигена в соответствии с смоделированной 3D-структурой.

445-1 конструировали в виде гуманизированного полноразмерного антитела с использованием разработанных собственными силами экспрессионных векторов, которые содержат константные области цепи IgG1 человека дикого типа (IgG1wt) и каппа, соответственно, с легко адаптирующимися сайтами субклонирования. Антитело 445-1 экспрессировали путем совместной трансфекции двух вышеуказанных конструкций в клетки 293G и очищали с использованием колонки 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 -80°C.

Используя антитело 445-1, было внесено несколько одиночных аминокислотных изменений, преобразующих удерживаемые остатки, относящиеся к каркасной области VH и VL мыши в соответствующие остатки зародышевой линии человека, такие как I44P и Y71F в VL и L70I и S72A в VH. Кроме того, в CDR было внесено несколько одиночных аминокислотных изменений для снижения потенциального риска изомеризации и повышения уровня гуманизации. Например, изменения T51A и D50E были сделаны в LCDR2, а изменения D56E, G57A и N61A были сделаны в HCDR2. Все изменения гуманизации осуществляли с использованием праймеров, содержащих мутации в определенных положениях, и набора для сайт-специфического мутагенеза (Кат. № AP231-11, TransGen, Пекин, Китай). Требуемые изменения проверяли с помощью секвенирования.

Аминокислотные изменения в антителе 445-1 оценивали на их связывание с OX40 и термическую стабильность. 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), было сконструировано из комбинации конкретных изменений, 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, несколько дополнительных аминокислотных изменений в каркасной области VL были внесены для дальнейшего улучшения аффинности/кинетики связывания, например, изменения аминокислот G41D и K42G. Кроме того, несколько одиночных аминокислотных изменений в CDR как VH, так и VL были внесены с целью снижения риска иммуногенности и повышения термической стабильности, например, S24R в LCDR1 и A61N в HCDR2. Полученные изменения показали либо улучшенную связывающую активность, либо термическую стабильность по сравнению с 445-2.

Гуманизированные антитела 445 были дополнительно сконструированы путем внесения специфических аминокислотных изменений в CDR и каркасные области для улучшения молекулярных и биофизических свойств для терапевтического применения у людей. Данные аспекты включали удаление вредных посттрансляционных модификаций, улучшенную термостабильность (T_m), поверхностную гидрофобность и изоэлектронные точки (pI) при сохранении связывающей активности.

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), сконструировали из процесса созревания, описанного выше, и подробно описано. Антитело 445-3 также получали в версию IgG2 (445-3 IgG2), содержащую домен Fc тяжелой цепи IgG2 человека дикого типа, и версию IgG4, содержащую домен Fc IgG4 человека с мутациями S228P и R409K (445-3 IgG4). Результаты показали, что 445-3 и 445-2 продемонстрировали сопоставимую аффинность связывания (см. табл. 4 и 5).

Таблица 3

Последовательности антител 445			
Антитело	SEQ ID NO		Последовательность
445-1	SEQ ID NO:3	HCDR1 (по Кабату)	SYIHH
	SEQ ID NO:13	HCDR2 (по Кабату)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO:5	HCDR3 (по Кабату)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабату)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO:7	LCDR2 (по Кабату)	DTSTLYS
	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабату)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO:14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYKFTSYIHHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRYNQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	SEQ ID NO:16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKVEIK
445-2	SEQ ID NO:3	HCDR1 (по Кабату)	SYIHH
	SEQ ID NO:18	HCDR2 (по Кабату)	YINPYNEGTRYA QKFQG
	SEQ ID NO:5	HCDR3 (по Кабату)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабату)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO:19	LCDR2 (по Кабату)	DASTLYS
	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабату)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO:20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYKFTSYIHHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRYNQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS

			TSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTR RYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISN YLNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYS KLPYTFGGGTKVEIK
445-3	SEQ ID NO:3	HCDR1 (по Кабату)	SYIIH
	SEQ ID NO:24	HCDR2 (по Кабату)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO:5	HCDR3 (по Кабату)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO:25	LCDR1 (по Кабату)	RASQGISNYLN
	SEQ ID NO:19	LCDR2 (по Кабату)	DASTLYS
	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабату)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO:26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYKF TSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTR RYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISN YLNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYS KLPYTFGGGTKVEIK

Пример 4. Кинетика связывания и определение аффинности антител к OX40 с помощью SPR.

Антитела к OX40 характеризовали по их кинетике связывания и аффинности с помощью SPR анализов с использованием BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Вкратце, антитело к IgG человека иммобилизовали на активированном чипе биосенсора CM5 (Кат. № BR100530, GE Life Sciences). Антитело с Fc-областью IgG человека пропускали по поверхности чипа и захватывали антителом к IgG человека. Затем по поверхности чипа пропускали рекомбинантный белок OX40 серийного разведения с His-меткой (Кат. № 10481-H08H, Sino Biological) и анализировали изменения сигналов поверхностного плазмонного резонанса для расчета скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) с использованием модели связывания "один-к-одному" Langmuir (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_d/k_a . Результаты SPR-детерминированных профилей связывания антител к OX40 кратко приведены на фиг. 2 и табл. 4. Профиль связывания со средним значением K_D антитела 445-3 (9,47 нМ) был немного лучше, чем у антитела 445-2 (13,5 нМ) и 445-1 (17,1 нМ), и аналогичен таковому у ch445. Профиль связывания 445-3 IgG4 был аналогичен профилю связывания 445-3 (с Fc IgG1), что указывает на то, что изменение Fc между IgG4 и IgG1 не изменяло специфическое связывание антитела 445-3.

Таблица 4

Аффинность связывания антител к OX40 с помощью SPR

Параметры исследования	ch445*	445-1	445-2	445-3	445-3 IgG4	
Исследование 1	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1,74 \times 10^5$	$1,56 \times 10^5$	$2,76 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$
	k_d (s^{-1})	$1,43 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-3}$	$3,90 \times 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-3}$
	K_D (нМ)	8,26	17,8	14,2	9,16	10,0
	K_A (M^{-1})	$1,22 \times 10^8$	$0,56 \times 10^8$	$0,71 \times 10^8$	$1,09 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$
Исследование 2	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$2,65 \times 10^5$	$2,37 \times 10^5$	$2,06 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	–
	k_d (s^{-1})	$1,67 \times 10^{-3}$	$3,89 \times 10^{-3}$	$2,64 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-3}$	–
	K_D (нМ)	6,3	16,4	12,8	9,77	–
	K_A (M^{-1})	$1,59 \times 10^8$	$0,61 \times 10^8$	$0,78 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$	–
Среднее	K_D (нМ)	7,28	17,1	13,5	9,47	10,0
	K_A (M^{-1})	$1,41 \times 10^8$	$1,59 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$

*ch445 состоит из переменных доменов Mu445, слитых с константными областями IgG1 wt/каппа человека.

Пример 5. Определение аффинности связывания антител к OX40 с OX40, экспрессируемых на клетках HuT78.

Для оценки связывающей активности антител к OX40 по связыванию с OX40, экспрессируемого на поверхности живых клеток, клетки HuT78 трансфицировали OX40 человека, как описано в примере 1, для получения линии, экспрессирующей OX40.

Живые клетки HuT78/OX40 высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с серийным разведением различных антител к OX40. Антитела козы к IgG-FITC (FITC -флуоресцеинизотиоцианат) человека (Кат. № A0556, Beyotime) использовали в качестве вторичного антитела для обнаружения связывания антитела с поверхностью клетки. Значения EC_{50} (средняя эффективная концентрация) для дозозависимого связывания с OX40 человека определяли путем сопоставления данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с помощью GraphPad Prism. Как показано на фиг. 3 и в табл. 5, антитела к OX40 имели высокую аффинность к OX40. Было также обнаружено, что антитела к OX40 по настоящему изобретению имели относительно более высокий верхний уровень интенсивности флуоресценции, измеренный с помощью проточной цитометрии (см. последний столбец табл. 5), что указывает на более медленную диссоциацию антитела из 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 интенсивности (MFI)
	Исследование 1	Исследование 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
445-3 IgG4	0,263	НД	0,263	892

Пример 6. Определение перекрестной реактивности антител к OX40.

Для оценки перекрестной реактивности антитела 445-3 к OX40 человека и яванского макака (суно) клетки, экспрессирующие OX40 человека (HuT78/OX40) и OX40 яванского макака (HuT78/СуноOX40), высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с антителами к OX40 серийного разведения. Антитела козы к IgG-FITC (флуоресцеинизотиоцианат) человека (Кат. № A0556, Beyotime) использовали в каче-

стве вторичного антитела для обнаружения. Значения EC_{50} для дозозависимого связывания с нативным ОХ40 человека и яванского макака определяли путем сопоставления данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с помощью GraphPad Prism. Результат показан на фиг. 4 и в табл. 6 ниже. Антитело 445-3 вступает в перекрестную реакцию как с ОХ40 человека, так и с ОХ40 яванского макака с аналогичными значениями EC_{50} , как показано ниже.

Таблица 6

EC_{50} антитела 445-3, связывающегося с ОХ40 человека и яванского макака

Линия клеток	EC_{50} (мкг/мл) 445-3	Верхний уровень интенсивности (MFI)
HuT78/ОХ40	0,174	575
HuT78/СуноОХ40	0,171	594

Пример 7. Сокристаллизация и структурное определение ОХ40 с 445-3 Fab.

Для понимания механизма связывания ОХ40 с антителами по настоящему изобретению была расшифрована сокристаллическая структура ОХ40 и Fab 445-3. Мутации в остатках, относящихся к T148 и N160 были введены для блокирования гликозилирования ОХ40 и улучшения гомогенности белка. ДНК, кодирующую мутантный ОХ40 человека (остатки, относящиеся к M1-D170 с двумя мутированными сайтами, T148A и N160A), клонировали в экспрессионный вектор с включением гекса-His-метки, и эту конструкцию временно трансфицировали в клетки 293G для экспрессии белка при 37°C в течение 7 дней. Клетки собирали, собирали супернатант и инкубировали с аффинной смолой с His меткой при 4°C в течение 1 ч. Смолу трижды промывали буфером, содержащим 20 mM Трис, pH 8,0, 300 mM NaCl и 30 mM имидазола. Затем белок ОХ40 элюировали буфером, содержащим 20 mM Трис, pH 8,0, 300 mM NaCl и 250 mM имидазола, с последующей дополнительной очисткой Superdex 200 (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM Трис, pH 8,0, 100 mM NaCl.

Кодирующие последовательности тяжелой цепи и легкой цепи 445-3 Fab клонировали в экспрессионный вектор с включением гекса-His-метки на С-конце тяжелой цепи, и они были временно совместно трансфицированы в клетки 293G для экспрессии белка при 37°C в течение 7 дней. Стадии очистки 445-3 Fab были такими же, как и в случае мутантного белка ОХ40 выше.

Очищенные ОХ40 и 445-3 Fab 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 Трис, pH 8,0, 100 mM NaCl. Пик комплекса собирали и концентрировали приблизительно до 30 мг/мл.

Скрининг сокристаллов проводили путем смешивания белкового комплекса с раствором резервуара в объемном соотношении 1:1. Сокристаллы получали из висячих капель, культивируемых при 20°C с помощью паровой диффузии с раствором резервуара, содержащим 0,1 M HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), pH 7,0, 1% PEG 2000 MME (монометилловый эфир) и 0,95 M сукцината натрия.

Нейлоновые петли использовали для сбора сокристаллов, а кристаллы погружали в резервуарный раствор с добавлением 20% глицерина в течение 10 с. Данные дифракции были собраны в BL17U1, Шанхайский центр синхротронного излучения, и были обработаны с помощью программы XDS. Фазу решали с помощью программы PHASER с использованием структуры IgG Fab (цепи C и D PDB: 5CZX) и структуры ОХ40 (цепь R PDB: 2HEV) в качестве моделей поиска молекулярного замещения. Графический интерфейс Phenix.refine использовался для выполнения жесткого тела, TLS (Translation-Libration-Screw, смещение-колебание-вращение) и ограниченного уточнения в отношении данных рентгеновского анализа с последующей корректировкой с помощью программы COOT и дальнейшим уточнением в программе Phenix.refine. Статистика сбора и уточнения данных рентгеновского анализа обобщена в табл. 7.

Статистика сбора и уточнения данных

Сбор данных	
Источник излучения	BL17U1, SSRF
Пространственная группа	P 3 1 2 1
Размеры ячейки (Å)	a составляет 183,96 b составляет 183,96 c составляет 79,09
Углы (°)	α составляет 90,00 β составляет 90,00 γ составляет 120,00
Разрешение (Å)	159,3-2,55 (2,63-2,55)
Общее количество отражений	988771 (81305)
Количество уникальных отражений	50306 (4625)
Завершенность (%)	99,9 (99,9)
Средняя избыточность	19,7 (17,6)
Rmerge ^a	0,059 (0,962)
I/сигма (I)	29,4 (3,5)
Коэффициент В Вильсона (Å)	73,9
Уточнение	
Разрешение (Å)	60,22-2,55
Количество отражений	50008
среднеквадратичное отклонение длины связи (Å)	0,010
среднеквадратичное отклонение углов связи (°)	0,856
R _{раб} ^b (R _{work}) (%)	19,27
R _{своб} ^c (R _{free}) (%)	21,60
Средние B-факторы белка	97,10
Карта Рамачандрана (%)	
Подходящее	96,34
Допустимое	3,48
Выпадающие показатели	0,17

Значения в скобках относятся к оболочке с наибольшим разрешением.

a Rmerge представляет собой $\frac{\sum \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum_i |I(h)_i|}$, где $\langle I(h) \rangle$ представляет собой среднюю интенсивность эквивалента.

b R_{work} представляет собой $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, где F_o и F_c являются наблюдаемыми и рассчитанными амплитудами факторов структуры, соответственно.

c R_{free} представляет собой $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, рассчитанное с использованием набора тестовых данных, 5% от общего объема данных, случайным образом выбранных из наблюдаемых отражений.

Пример 8. Идентификация эпитопа антитела 445-3 с помощью SPR.

Руководствуясь сокристаллической структурой OX40 и антитела 445-3 Fab, авторы изобретения выбрали и внесли серию одиночных мутаций в белке OX40 человека для дальнейшей идентификации ключевых эпитопов антител к OX40 по настоящему изобретению. Одиночные мутации были внесены в слитой конструкции OX40/IgG1 человека с помощью набора для сайт-специфического мутагенеза (Кат. № AP231-11, TransGen). Желаемые мутации проверяли с помощью секвенирования. Экспрессию и полу-

чение мутантов OX40 достигали путем трансфекции в клетки 293G и очищали с использованием колонки с белком А (Кат. № 17-5438-02, GE Life Sciences).

Аффинность связывания точечных мутантов OX40 с Fab 445-3 характеризовали с помощью SPR-анализов с использованием BIAcore 8K (GE Life Sciences). Вкратце, мутанты OX40 и OX40 дикого типа иммобилизовали на чипе биосенсора CM5 (Кат. № BR100530, GE Life Sciences) с использованием EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) и NHS (N-гидроксисукцинимид). Затем серийное разведение 445-3 Fab в буфере HBS-EP+ (забуференный HEPES физиологический раствор с ЭДТА и поверхностно-активным веществом) (Кат.: BR-1008-26, GE Life Sciences) пропускали по поверхности чипа с использованием времени контакта 180 с и времени диссоциации 600 с при 30 мкл/мин. Изменения сигналов поверхностного плазмонного резонанса анализировали для расчета скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) с использованием модели связывания "один к одному" Langmuir (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_d/k_a . Кратность сдвига K_D для мутанта рассчитывали как соотношение K_D мутанта/ K_D ДТ (дикого типа). Профили идентификации эпитопа, определенные с помощью SPR, кратко изложены на фиг. 5 и табл. 8. Результаты показали, что мутация остатков, относящихся к H153, I165 и E167 на аланин в OX40 значительно снижает связывание антитела 445-3 с OX40, и мутация остатков, относящихся к T154 и D170 на аланин имеет умеренное снижение связывания антитела 445-3 с OX40.

Подробные взаимодействия между антителом 445-3 и остатками, относящиеся к H153, T154, I165, E167 и D170 OX40 показаны на фиг. 6. Боковая цепь H153 на OX40 была окружена небольшим карманом 445-3 на области взаимодействия, образуя водородные связи с тяж S31 и тяж G102 и π - π стэкинг с тяж Y101. Боковая цепь E167 образует водородные связи с тяж Y50 и тяж N52, в то время как D170 образует водородную связь и солевой мостик с тяж S31 и тяж K28, соответственно, которые могут дополнительно стабилизировать комплекс. Взаимодействие Ван-дер-Ваальса (VDW) между T154 и тяж Y105, I165 и тяж R59 способствовало высокой аффинности антитела 445-3 к OX40.

В заключение, остатки, относящиеся к H153, I165 и E167 OX40 были идентифицированы как важные остатки для взаимодействия с антителом 445-3. Кроме того, аминокислоты T154 и D170 OX40 также являются важными контактными остатками для антитела 445-3. Эти данные указывают на то, что эпитопы антитела 445-3 представляют собой остатки, относящиеся к H153, T154, I165, E167 и D170 OX40. Эти эпитопы находятся в последовательности

HTLQPASNSSDAICEDRD

(SEQ NO: 30) с важными контактными остатками, выделенными жирным шрифтом и подчеркнутыми.

Таблица 8

Идентификация эпитопа антитела
445-3, определенного с помощью SPR

Мутанты	Мутант K_D /WT K_D
H153A	Связывание не обнаружили
T154A	8
Q156A	1,9
S161A	1,1
S162A	0,6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

Значительное влияние: Связывание не обнаружили, или значение K_D мутантного K_D /WT K_D было больше 10. Умеренное влияние: мутантный K_D /WT K_D оценивали от 5 до 10. Незначительное влияние: значение K_D мутанта/ K_D WT было меньше 5.

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

Чтобы определить, препятствует ли антитело 445-3 взаимодействию OX40-OX40L, провели анализ проточной цитометрии на основе клеток. В этом анализе антитело 445-3, эталонное антитело 1A7.gr1, контрольное huIgG или только среда предварительно инкубировали с человеческим слитым белком OX40 с Fc мышинового IgG2a (OX40-mIgG2a). Затем комплекс антитела и слитого белка добавляли к клеткам НЕК293, экспрессирующим OX40L. Если антитело к OX40 не мешает взаимодействию OX40-OX40L, то комплекс антитело OX40-mIgG2a OX40 все еще будет связываться с поверхностью OX40L, и это взаимодействие обнаруживали с использованием вторичного антитела к Fc мыши.

Как показано на фиг. 7, антитело 445-3, даже в высокой концентрации, не уменьшает связывание OX40 с OX40L, что указывает на то, что 445-3 не мешает взаимодействию OX40-OX40L. Это указывает на то, что 445-3 не связывается в месте связывания OX40L или связывается достаточно близко, чтобы стерически препятствовать связыванию OX40L. Напротив, положительное контрольное антитело 1A7.gr1 полностью блокирует связывание OX40 с OX40L, как показано на фиг. 7.

Кроме того, сокристаллическая структура OX40 в комплексе с 445-3 Fab была решена и выровнена с комплексом OX40/OX40L (код PDB (база данных белков): 2HEV), как показано на фиг. 8. Триммер лиганда OX40 взаимодействует с OX40 главным образом через CRD1, CRD2 и частичные области CRD3 OX40 (Compaan and Humowitz, 2006), в то время как антитело 445-3 взаимодействует с OX40 только через область CRD4. Таким образом, антитело 445-3 и тример OX40L связываются с различными соответствующими областями OX40, и антитело 445-3 не мешает взаимодействию OX40/OX40L. Данный результат коррелирует с данными картирования эпитопов, описанными в примерах выше. CRD4 OX40 находится в положении аминокислот 127-167, и эпитоп антитела 445-3 частично перекрывается с этой областью. Последовательность OX40 CRD4 (аминокислоты 127-167) показана ниже, а частичное перекрытие эпитопа 445-3 выделено жирным шрифтом и подчеркнуто:

PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE

(SEQ ID NO: 31).

Пример 10: Агонистическая активность антитела 445-3 к OX40 Для исследования агонистических функций антитела 445-3, OX40-положительную линию Т-клеток, HuT78/OX40 совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (APC) (HEK293/OS8^{HLA}-FcγRI) (OS8 - моноклональное антитело против CD3 человека, FcγRI - Fc-гамма-рецептор 1) в присутствии или в отсутствие 445-3 или 1A7.gr1 в течение ночи, и продукцию IL-2 использовали в качестве показателя для стимуляции Т-клеток. В клетках HEK293/OS8^{HLA}-FcγRI гены, кодирующие связанное с мембраной антитело OKT3 (OS8) к CD3 (как описано в патенте США № 8735553) и FcγRI человека (CD64), стабильно совместно трансдуцировали в клетки HEK293. Поскольку индуцированная антителом к OX40 иммунная активация зависит от сшивания антитела (Voo и др., 2013), FcγRI на HEK293/OS8^{HLA}-FcγRI обеспечивает основу для опосредованного антителом к OX40 сшивания OX40 при двойном взаимодействии антитела к OX40 как с OX40, так и с FcγRI. Как показано на фиг. 9, антитело 445 к 3OX40 обладало высокой эффективностью в усилении передачи сигналов TCR дозозависимым образом с EC₅₀ при 0,06 нг/мл. Также наблюдались несколько более слабые активности эталонного антитела 1A7.gr1. Напротив, контрольный IgG человека (10 мкг/мл) или холостой образец не оказывали влияния на продукцию IL-2.

Пример 11. Стимуляция иммунных ответов антителом 445-3 к OX40 в анализе смешанной реакции лимфоцитов (MLR).

Чтобы определить, может ли антитело 445-3 стимулировать активацию Т-клеток, проводили анализ смешанной реакции лимфоцитов (MLR), как описано ранее (Tourkova et al., 2001). Вкратце, зрелые ДК индуцировали из миелоидных клеток CD14⁺, полученных из PBMC человека, путем культивирования с GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и IL-4 с последующей стимуляцией LPS (липолисахарид). Затем ДК, обработанные митомином С, совместно культивировали с аллогенными CD4⁺ Т-клетками в присутствии антитела 445-3 к OX40 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 дней. Продукция IL-2 в совместной культуре была обнаружена с помощью ELISA как считывание ответа MLR.

Как показано на фиг. 10, антитело 445-3 значительно стимулировало продукцию IL-2, что указывает на способность 445-3 активировать CD4⁺ Т-клетки. Напротив, эталонное антитело 1A7.gr1 продемонстрировало значительно (P<0,05) более слабую активность в анализе MLR.

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

Для исследования того, может ли антитело 445-3 уничтожить клетки-мишени, экспрессирующие OX40^{Hi}, был произведен анализ ADCC на основе высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). Клеточную линию NK92MI/CD16V получали в качестве эффекторных клеток путем совместной трансдукции генов CD16v158 (аллель V158) и Fcγ в клеточную линию NK, NK92MI (ATCC, Manassas VA). В качестве клеток-мишеней использовали линию Т-клеток, экспрессирующую OX40, HuT78/OX40. Равное количество (3×10⁴) клеток-мишеней и эффекторных клеток совместно культивировали в течение 5 часов в присутствии антитела к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или контрольных антител. Цитотоксичность оценивали путем высвобождения LDH с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, Мэдисон, Висконсин). Специфический лизис рассчитывали по формуле, показанной ниже.

$$\% \text{ Специфического лизиса} = \frac{\text{Экспериментальный лизис} - \text{Спонтанный лизис эффектора}}{\text{Максимальный лизис мишени} - \text{Спонтанный лизис мишени}} \times 100$$

Как показано на фиг. 11, антитело 445-3 продемонстрировало высокую эффективность в уничтоже-

нии мишеней OX40^{Hi} путем ADCC дозозависимым образом (EC₅₀: 0,027 мкг/мл). Эффект ADCC антитела 445-3 был аналогичен таковому у контрольного антитела 1A7.gr1. Напротив, 445-3 с форматом Fc IgG4 с мутациями S228P и R409K (445-3-IgG4) не продемонстрировали каких-либо значимых эффектов ADCC по сравнению с контрольным IgG человека или холостым образцом. Результаты согласуются с предыдущими выводами о том, что Fc IgG4 имеет слабую или подавленную ADCC (An Z, и др. mAb 2009).

Пример 13. Антитело 445-3 к OX40 предпочтительно истощает CD4⁺ Treg и увеличивает соотношение CD8⁺ Teff/Treg (Teff - эффекторная Т-клетка) *in vitro*.

На нескольких моделях опухолей животных было показано, что антитела к OX40 могут истощать проникающие в опухоль OX40^{Hi} Treg и увеличивать соотношение CD8⁺ Т-клеток к Treg (Bulliard et al., 2014; Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Marabelle et al., 2013b). Следовательно, иммунный ответ был усилен, что привело к регрессии опухоли и улучшению выживаемости.

Учитывая тот факт, что *in vitro* активированные или внутриопухолевые CD4⁺Foxp3⁺ Treg преимущественно экспрессируют OX40, чем другие субпопуляции Т-клеток (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016), был создан анализ на основе РВМС человека для исследования способности антитела 445-3 уничтожать клетки OX40^{Hi}, в частности Treg. Вкратце, РВМС предварительно активировали в течение 1 дня с помощью 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, 5×10⁴) совместно культивировали с равным количеством клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,001-10 мкг/мл) или плацебо в течение ночи. Процентное содержание каждого подкласса Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 12А и 12В, лечение антителом 445-3 индуцировало увеличение процента CD8⁺ Т-клеток и снижение процента CD4⁺Foxp3⁺ Treg дозозависимым образом. В результате было значительно улучшено соотношение CD8⁺ Т-клеток к Treg (фиг. 12С). Более слабые результаты были получены при лечении 1A7.gr1. Данный результат демонстрирует терапевтическое применение 445-3 в индуцировании противоопухолевого иммунитета путем усиления функций CD8⁺ Т-клеток, но ограничивая опосредованную Treg иммунную толерантность.

Пример 14. Антитело к OX40 445-3 проявляет дозозависимую противоопухолевую активность в модели опухоли мыши.

Эффективность антитела к OX40 445-3 была продемонстрирована на мышинной модели опухоли. Клетки опухоли толстой кишки мыши MC38 подкожно имплантировали мышам C57, трансгенным для OX40 человека (Biocytogen, Пекин, Китай). После имплантации клеток опухоли, объемы опухоли измеряли два раза в неделю и рассчитывали в мм³ по формуле: $V = 0,5(a \times b^2)$, где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Когда опухоли достигали среднего объема приблизительно 190 мм³, мышей случайным образом распределяли на 7 групп и вводили внутривенно антитело 445-3 или 1A7.gr1 один раз в неделю в течение трех недель. IgG человека вводили в качестве изотипического контроля. Частичная регрессия (PR) определялась как объем опухоли менее 50% от начального объема опухоли в первый день введения дозы в трех последовательных измерениях. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования роста} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{обработанная } t) - (\text{обработанная } t_0)}{(\text{плацебо } t) - (\text{плацебо } t_0)} \right) \right)$$

где обработанная t представляет собой объем обработанной опухоли в момент времени t;

обработанная t₀ представляет собой объем обработанной опухоли в момент времени 0;

плацебо t представляет собой объем опухоли плацебо в момент времени t;

плацебо t₀ представляет собой объем опухоли плацебо в момент времени 0.

Результаты показали, что 445-3 обладает дозозависимой противоопухолевой эффективностью в виде внутривенной инъекции с дозами 0,4, 2 и 10 мг/кг. Введение 445-3 приводило к ингибированию роста опухоли на 53% (0,4 мг/кг), 69% (2 мг/кг) и 94% (10 мг/кг) и приводило к частичной регрессии на 0% (0,4 мг/кг), 17% (2 мг/кг) и 33% (10 мг/кг) относительно исходного уровня. Напротив, частичной регрессии при обработке антителом 1A7.gr1 не наблюдалось. Данные *in vivo* показывают, что лиганд-неблокирующее антитело 445-3 лучше подходит для противоопухолевой терапии, чем OX40-OX40L блокирующее антитело 1A7.gr1 (фиг. 13А и 13В, табл. 9).

Таблица 9

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

Обработка	Доза	1	Кол-во	Степень	Средний	объем	TGI	на
	р/нед		животных	частичной	опухоли на день 21		21-й	
	(мг/кг)			регрессии	(мм ³)		день (%)	
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 15. Аминокислотные изменения антител к OX40.

Несколько аминокислот были выбраны для внесения изменения для улучшения антител к OX40. Аминокислотные изменения были внесены для улучшения аффинности или для увеличения гуманизации. Наборы праймеров для PCR были разработаны для соответствующих изменений аминокислот, синтезированы и использованы для модификации антител к OX40. Например, изменение K28T в тяжелой цепи и S24R в легкой цепи приводило к увеличению EC₅₀, определенному с помощью FACS, в 1,7 раза по сравнению с исходным антителом 445-2. Изменение Y27G в тяжелой цепи и S24R в легкой цепи привело к увеличению K_D, определенному с помощью Biacore, в 1,7 раза по сравнению с исходным антителом 445-2. Эти изменения кратко изложены на фиг. 14A-14B.

Пример 16. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в модели опухоли толстой кишки мыши (MC38), гуманизированной нокином OX40.

Самкам гуманизированных мышей с нокином OX40 (B-hOX40 или hOX40) подкожно имплантировали 1×10^6 клеток карциномы толстой кишки мыши (MC38) в 100 мкл PBS в правый бок мыши. После инокуляции, животных рандомизировали в 4 группы по 9 животных в каждой группе. Мышей обрабатывали носителем (плацебо-буфер), антителом к OX40 (445-3) в качестве монотерапии, мышином антителом к PD1 (muPD1), полученным собственными силами в качестве монотерапии, и 445-3 в комбинации с muPD1. Антитела 445-3 и muPD-1 вводили в дозе 3 мг/кг один раз в неделю (1 р/нед) путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции. Объем опухоли определяли два раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля и выражали в мм³ по формуле: $V = 0,5(a \times b^2)$, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Данные представлены как средний объем опухоли \pm SEM. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования роста} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{обработанная } t) - (\text{обработанная } t_0)}{(\text{плацебо } t) - (\text{плацебо } t_0)} \right) \right)$$

где обработанная t представляет собой объем обработанной опухоли в момент времени t;

обработанная t₀ представляет собой объем обработанной опухоли в момент времени 0;

плацебо t представляет собой объем опухоли плацебо в момент времени t;

плацебо t₀ представляет собой объем опухоли плацебо в момент времени 0.

Противоопухолевая активность антитела 445-3 и muPD1 в сингенной модели MC38 в модели hOX40 мыши показана на фиг. 15 и в табл. 10. На 12-й день после инокуляции, обработка muPD-1 ингибировало рост опухоли на 23%, в то время как обработка 445-3 приводило к 35% ингибированию роста опухоли. Значительно улучшенное ингибирование роста опухоли на 78% было результатом комбинации 445-3 с muPD1 (p<0,001, комбинация по сравнению с носителем; p<0,05, комбинация по сравнению с монотерапией 445-3; и p<0,001, комбинация по сравнению с монотерапией muPD1). Это демонстрирует, что антитела к OX40, например, 445-3, вводимые в комбинации с антителами к PD1, являются эффективными в модели опухоли толстой кишки мыши и превосходят каждый агент, вводимый в виде монотерапии. В течение всего исследования не наблюдалось значимого влияния на массу тела животных ни в одной группе лечения.

Таблица 10

Эффективность антитела 445-3 в комбинации с антителом к PD1 в модели опухоли толстой кишки мыши (MC38), гуманизированной нокином OX40

Тестируемый образец	Доза ^a (мг/кг)	Кол-во животных	TGI (день 12) (%)	Объем опухоли (мм ³ ; средний ±SEM)	p (в сравнении с группой комбинации)
Носитель	Плацебо	9	НД (нет данных)	2346,4±238,8	0,0000
445-3	3	9	35	1580,7±293,7	0,0133
muPD1	3	9	23	1852,9±204,8	0,0003
muPD1 + 445-3	3+3	9	78	635,0±128,6	НД ^b

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

^b Нет данных.

Пример 17. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в сингенной модели опухоли толстой кишки мыши (MC38).

Самкам мышей C57BL/6 подкожно имплантировали 1×10^6 клеток карциномы толстой кишки (MC38) в 100 мкл PBS в правый бок мыши. После инокуляции, животных рандомизировали в 4 группы по 20 животных в каждой группе. Мышей лечили носителем (PBS), антителом (OX86) в качестве монотерапии или мышинном антителом к PD1 (muPD1) в качестве монотерапии. OX86 представляет собой антитело крысы к OX40 мыши, ранее раскрытое в WO2016/057667, которое дополнительно сконструировали константными областями IgG2a мыши для снижения его иммуногенности, а также сохранения его Fc-опосредованных функций в исследованиях на мышах. Области VH и VL OX86 приведены ниже. Как сообщалось ранее в научной литературе, OX86 имеет механизм действия, аналогичный антителу 445-3, в том смысле, что он не блокирует взаимодействие между OX40 и лигандом OX40 (al-Shamkhani Al, и др., Euro J. Immunol (1996) 26(8); 1695-9, Zhang, P. и др. Cell Reports 27, 3117-3123).

OX86VH	SEQ ID NO:48	QVQLKESGPGLVQPSQTLTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGL EWMGRMRYDGDYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTTD TAIYYCTRDGRGDSFDFYWGQGVMTVSS
OX86VL	SEQ ID NO:49	DIVMTQGALPNPVPSPGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLNWFLQRPG QSPQLLTYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISRVAEDAGVY YCQQVREYPFTFGSGTKLEIK

Антитело OX86 в комбинации с антителом muPD1 вводили в качестве комбинированной терапии. OX86 вводили в дозе 0,4 мг/кг 1 р/нед путем внутрибрюшинной инъекции (в/б), а антитело muPD1 вводили в дозе 3 мг/кг 1 р/нед также путем внутрибрюшинной инъекции. Дозировка антител была такой же, как и у монотерапии при введении в комбинации.

Противоопухолевая активность антитела OX86 в комбинации с антителом muPD1 показана на фиг. 16 и в табл. 11. На 15 день монотерапии OX86 и muPD1 один раз в неделю внутрибрюшинно ингибировали рост опухоли с TGI 55% и 47%, соответственно. Однако, улучшение ингибирования роста опухоли на 95% было результатом комбинации антитела OX86 с muPD1, демонстрируя, что комбинация этих агентов является более эффективной, чем комбинация монотерапией. Кроме того, в группе комбинированного лечения токсичности не наблюдалось.

Таблица 11

Комбинированная эффективность OX86 и muPD1 в сингенной модели MC38

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	Кол-во живых животных	TGI (%) в день 15	Средний объем опухоли на день (мм ³ ; средний ±SEM)	p (в сравнении с группой комбинации)
Носитель	0	12	-	2921,9±145,1	0,0000
OX86	0,4	20	55	1368,7±128,8	0,0000
muPD1	3	20	47	1600,4±138,0	0,0000
OX86 ⁺ muPD1	0,4 + 3	20	95	272,1±61,8	НД ^b

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

^b Нет данных.

Пример 18. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в модели опухоли толстой кишки мыши (CT26WT), гуманизированной двойным нокином OX40 и PD1.

Самкам мышей, гуманизированным двойным нокином OX40 и PD1 (названных мышами hPD1 и hOX40, GemPharmatech Co. Ltd, Нанкин, Китай) подкожно имплантировали 1×10^5 клеток опухоли толстой кишки (CT26WT) в 150 мкл PBS в правый бок. После инокуляции, животных рандомизировали в 4 группы по 9 животных в каждой группе. В группе 1 мышей обрабатывали носителем (PBS) в качестве контроля. В группе 2, антитело к OX40 445-3 вводили в качестве монотерапии. В группе 3, мышей лечили антителом к PD1 (антитело 4B6, как описано в патенте США № 8735553, раскрытом в данном документе как SEQ ID NO: 32-37) в качестве монотерапии. В группе 4, мышам вводили антитело 445-3 в комбинации с антителом 4B6. Как при лечении монотерапией, так и в комбинации, антитело 445-3 вводили в дозе 2 мг/кг один раз в неделю (1 р/нед) путем внутрибрюшинной инъекции (в/б), а антитело 4B6 вводили в дозе 3 мг/кг также 1 р/нед путем в/б инъекции.

Противоопухолевая активность антитела 445-3 в комбинации с антителом 4B6 в сингенной модели мыши CT26WT с нокином hPD1/hOX40 показана на фиг. 17 и в табл. 12. В день 18 антитела 445-3 и 4B6 в виде монотерапии, вводимые один раз в неделю внутрибрюшинно, ингибировали рост опухоли с TGI 93% и 25%, соответственно. Улучшенная противоопухолевая активность наблюдалась в 445-3 в комбинации с группой лечения антителами 4B6, что привело к TGI 103%. Это демонстрирует, что 445-3 в комбинации с антителом к PD1 является эффективным, и ни у одного животного не наблюдалось потери массы тела в течение всего исследования.

Таблица 12

Комбинированная эффективность антител 445-3 и 4B6 в сингенной модели мыши CT26WT с нокином hPD1/hOX40							
Тестовый образец	Доза (мг/кг)	Количество животных	Животные без опухоли (%) на день 18	TGI (%) в день 18	Средний объем опухоли на 18-й день (мм ³ ; средний \pm SEM)	p (по сравнению с комбинированной группой) в день 18	Средний объем опухоли на 28-й день (мм ³ ; средний \pm SEM)
Носитель	0	9	0	-	1846,6 \pm 500,3	0,0078	-
445-3	2	9	44,4	93	255,3 \pm 124,6	0,223	817,5 \pm 397,2
4B6	3	9	0	25	1424,6 \pm 353,5	0,0067	-
445-3 + 4B6	2 + 3	9	55,6	103	85,0 \pm 39,4	НД ^b	201,0 \pm 153,7

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

^b Нет данных.

Пример 19. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в сингенной модели мыши MMTV-PyMT.

MMTV-PyMT представляет собой мышиную модель метастазирования рака молочной железы, где MMTV-LTR используется для сверхэкспрессии среднего Т-антигена полиомавируса в молочной железе. У мышей развиваются высокометастатические опухоли, и эта модель обычно используется для изучения прогрессирования рака молочной железы.

Самкам мышей FVB/N интрацестерально имплантировали 3 мм \times 3 мм фрагменты опухоли MMTV-PyMT, выделенные из трансгенных мышей MMTV-PyMT во втором правом сосочке. После инокуляции, животных рандомизировали в 4 группы по 12 животных в каждой группе. Мышей обрабатывали носителем (PBS) в качестве контроля. Антитело OX86 вводили в виде монотерапии в дозе 0,4 мг/кг один раз в неделю (1 р/нед) путем внутрибрюшинной (в/б) инъекции.

Специфическое мышиное антитело к PD1 (muPD1) вводили в виде монотерапии. Антитело OX86 вводили в комбинации с muPD1 в качестве комбинированной терапии. Независимо от того, вводили ли OX86 в виде монотерапии или в комбинации, вводили внутрибрюшинно в дозе 0,4 мг/кг один раз в неде-

лю (1 р/нед), а антитело muPD1 вводили в дозе 3 мг/кг 1 р/нед путем внутривентриальной инъекции.

Ответ сингенной модели MMTV-РyMT на лечение OX86 и muPD1 показан на фиг. 18 и в табл. 13. На 17 день OX86 ингибировало рост опухоли с показателем роста опухоли (TGI) 61%. Лечение muPD1 приводило к TGI (-5%), имеющему небольшое ингибирование роста опухоли и кривую роста, очень похожую на контроль, обработанный носителем. Значительно улучшенная противоопухолевая активность наблюдалась в группе комбинированного лечения, с TGI 94%, увеличением на 33% по сравнению с OX86, вводимым в качестве монотерапии и приводящим к значительному небольшому среднему объему опухоли ($p < 0,001$, комбинация по сравнению с носителем; $p < 0,01$, комбинация по сравнению с монотерапией OX86; и $p < 0,001$, комбинация по сравнению с монотерапией muPD1). Эти данные указывают на то, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD1 является более эффективным в модели метастазирования опухоли рака молочной железы, чем любая монотерапия, вводимая отдельно. Введение комбинации не продемонстрировало существенного влияния на массу тела животных ни в одной группе лечения на протяжении всего исследования.

Таблица 13

Комбинированная эффективность OX86 и muPD1 в сингенной модели мыши MMTV-РyMT

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	Кол-во живых животных	TGI (%) в день 17	Средний объем опухоли на 17-й день (мм ³ ; средний±SEM)	р (по сравнению с комбинированной группой) в день 17
Носитель	0	12	-	1647,7±214,0	0,0000
OX86	0,4	11	61	720,6±137,1	0,0059
muPD1	3	12	-5	1720,8±267,8	0,0002
OX86 ⁺ muPD1	0,4 + 3	12	94	230,4±64,4	НД ^b

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

^b Нет данных.

Пример 20. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PD1 в модели ортотопического рака поджелудочной железы мыши (Pan02).

Самкам мышей C57BL/6 имплантировали ортотопические клетки 1×10^6 рака поджелудочной железы (Pan02), суспендированные в 30 мкл Matrigel/PBS (3:2). После инокуляции в течение 8 дней, животных рандомизировали в 5 групп по 12 животных в каждой группе в соответствии с массой тела. Затем, мышам лечили носителем (PBS) в качестве контроля. Антитело к OX40 (OX86, описанное выше) вводили в качестве монотерапии. В отдельной группе специфическое мышинное антитело к PD1 (muPD1) вводили в виде монотерапии. Наконец, антитело OX86 вводили в комбинации с muPD1. Антитело OX86 вводили в виде монотерапии или в комбинации в дозе 0,4 мг/кг один раз в неделю (1 р/нед) путем внутривентриальной инъекции (в/в), а muPD1 вводили в дозе 3 мг/кг 1 р/нед путем внутривентриальной инъекции. Всех мышам исследовали, и любые клинические наблюдения фиксировали по меньшей мере один раз в сутки. Животных взвешивали два раза в неделю, а тех мышам, чья потеря массы тела превышала 20% по сравнению с первоначальной массой тела, умерщвляли.

Ответ модели поджелудочной железы на лечение антителом OX86 в комбинации с muPD1 показан на фиг. 19 и в табл. 14. Медиана выживаемости в контрольной группе составила 35,5 дней. В этой модели группы монотерапии были примерно равны, при этом OX86 обеспечивал медиану выживаемости 51,5 дня, а muPD1 при введении в качестве монотерапии приводил к медиане выживаемости 52,5 дня. Напротив, OX86 в комбинации с muPD1 приводил к медиане выживаемости 176,5 дней. Комбинация также обеспечивала выживаемость 50% до конца исследования (188 дней), в то время как в группах лечения монотерапией ни одно животное не выжило до этой временной точки. Эти данные продемонстрировали, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD1 является очень эффективным при лечении рака поджелудочной железы в этой модели и без признаков токсичности у мышам.

Таблица 14

Эффективность комбинации OX86 и muPD1 в ортотопической модели поджелудочной железы мышей

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	Кол-во животных	Средняя продолжительность жизни	Коэффициент выживаемости (%) на день 188
Носитель	0	12	35,5	0
OX86	0,4	12	51,5	0
muPD1	3	12	52,5	0
OX86 ⁺ muPD1	0,4 + 3	12	176,5	50

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

Пример 21. Антитела к OX40 в комбинации с антителами к PDL1 в модели ортотопического рака почки мыши (Rensa).

Самкам мышей BALB/c подкожно имплантировали 2×10^5 клеток рака почки (Rensa), суспендированных в 100 мкл PBS в правый бок. После инокуляции в течение 8 дней, животных рандомизировали в 4 группы по 15 животных в каждой группе. В качестве контроля мышам вводили носитель (PBS). Антитело к OX40 (OX86, описанное выше) вводили в виде монотерапии в дозе 0,4 мг/кг один раз в неделю путем внутрибрюшинной инъекции. Мышиное антитело к PD-L1 (muPD-L1) вводили в виде монотерапии в дозе 10 мг/кг один раз в неделю путем внутрибрюшинной инъекции. OX86 вводили в комбинации с антителом muPD-L1 в тех же дозах, как описано ранее для лечения в одной группе. Объем опухоли измеряли два раза в неделю.

Ответ сингенной модели Rensa на лечение OX86 и muPD-L1 показан на фиг. 20 и табл. 15. Результаты показывают, что на 17 день монотерапии OX86 и muPD-L1 ингибировали рост опухоли с TGI 61% и 15%, соответственно. Однако OX86 в комбинации с muPD-L1 значительно улучшал противоопухолевую активность с TGI 87%. OX86 в комбинации с muPD-L1 также приводил к снижению среднего объема опухоли (160,4 мм³) в отличие от лечения антителом OX86 в качестве монотерапии со средним объемом опухоли 495,4 мм³). Это демонстрирует, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к PD-L1 приводило к большей эффективности в отношении опухоли, чем лечение любым из антител в качестве монотерапии. Токсичность у мышей в ходе лечения не наблюдалась.

Таблица 6

Комбинированная эффективность OX86 и muPD-L1 в сингенной модели Rensa

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	Кол-во живых животных	TGI (%) в день 17	Средний объем опухоли на 17-й день (мм ³ ; средний±SEM)	p (по сравнению с комбинированной группой) в день 17
Носитель	0	15	-	1255,6±159,1	0,0000
OX86	0,4	15	61	495,4±153,5	0,0500
muPD-L1	10	15	15	1064,0±222,2	0,0046
OX86 + muPD-L1	0,4-10	15	87	160,4±35,8	НД ^b

^a Все дозы, вводимые один раз в неделю.

^b Нет данных.

Список литературы.

1. al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, M., Brown, M.H., James, W., and Barclay, A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European journal of immunology* 26, 1695-1699.
2. An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. (2009). IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. *MAbs*. 1,572-579.
3. Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB 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.
4. Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J.C., Zitvogel, L., and Marabelle, A. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 52, 50-66.
5. Bulliard, Y., Jolicoeur, R., Zhang, J., Dranoff, G., Wilson, N.S., and Brogdon, J.L. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγR, leading to antitumor efficacy. *Immunology and cell biology* 92, 475-480.
6. Calderhead, D.M., Buhlmann, J.E., van den Eertwegh, A.J., Claassen, E., Noelle, R.J., and Fell, H.P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. *J Immunol* 151, 5261-5271.
7. Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., and Pena-Rossi, C. (2003). CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 145, 1-11.
8. Compaan, D.M., and Hymowitz, S.G. (2006). The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* 14, 1321-1330.
9. Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annual review of immunology* 28, 57-78.
10. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews* 229, 173-191.

11. Curti, B.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwsen, T., Fox, B.A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer research* 73, 7189-7198.
12. Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P., and Stein, H. (1995). Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. *British journal of haematology* 91, 927-931.
13. Gough, M.J., and Weinberg, A.D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Advances in experimental medicine and biology* 647, 94-107.
14. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161, 6510-6517.
15. Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *Journal of translational medicine* 11, 215.
16. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
17. Huddleston, C.A., Weinberg, A.D., and Parker, D.C. (2006). OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. *European journal of immunology* 36, 1093-1103.
18. Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172, 4253-4259.
19. Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X., and Liu, Y.J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13138-13143.
20. 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.
21. Jenkins RW, Barbie DA, and Flaherty KT (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 118, 9-16.
22. 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.

23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M.S. (2017). OX40: Structure and function - What questions remain? *Molecular immunology* 83, 13-22.
51. 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.
52. Zhang, T., Lemoi, B.A., and Sentman, C.L. (2005). Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood* 106, 1544-1551.
53. Zhang, P., Tu H. G., Wei, J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., Yeung Y. A. (2019) Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. *Cell Reports* 27, 3117-3123.
54. al-Shamkhani A1, Birkeland ML, Puklavec M, Brown MH, James W, Barclay AN. (1996) OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European Journal of Immunology* 26(8):1695-9.

Перечень последовательностей

- <110> БейДжин, ЛТД.
ЦЗЯН Бэйбэй
ЛЮ Е
СУН Сяоминь
- <120> СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К ОХ40 В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ К PD1 ИЛИ К PDL1
- <130> BGB22303-00PCT
- <160> 57

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> ПРТ

<213> Человек разумный

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

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

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

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

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

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 2
 <211> 216
 <212> ПРТ
 <213> Человек разумный

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala
 210 215

<210> 3
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 3

Ser Tyr Ile Ile His
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 4

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

Gly

<210> 5
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 7

Asp Thr Ser Thr Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 120
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 9

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Ile Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 10
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg
 60

tcctgcaagg cttctggata taaattcact agctatatta tacactgggt gaagcagaag
 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaggtac
 180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac
 240

atggagtaca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggggtac
 300

tacggtagta gctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca
 360

<210> 11
 <211> 107
 <212> ПРТ
 <213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 11

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

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

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

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

047697

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Phe Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Lys Lys
100 105

<210> 12

<211> 321

<212> ДНК

<213> МЫШЬ ДОМОВАЯ

<400> 12

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
60

atcagttgca gtgcaagtca gggcattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca
120

gatggaacta ttaaactcct gatctatgac acatcaacct tatactcagg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattttctca ccatcagcaa cctggaacct
240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccgtacac gttcggaggg
300

gggaccaagc tggaaaaaa a
321

<210> 13

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 445-1 HCDR2

<400> 13

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

Gly

<210> 14

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 445-1 VH бел

<400> 14

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

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

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 445-1 VH ДНК

<400> 15

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaagggtg
60

tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca
120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgacgg cacacggtac
180

aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acaagcgata agtctaccag cacagcctat
240

047697

atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac
300

tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc
360

<210> 16
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-1 VK бел

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-1 VK ДНК

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc
60

atcacatgca gcgcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca
120

047697

ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac acctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc
180

agattctctg gcagcggctc cggaaccgac tacaccctga caatctctag cctgcagccc
240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc
300

ggcacaaagg tggagatcaa g
321

<210> 18
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-2 HCDR2

<400> 18

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

Gly

<210> 19
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-2 LCDR2

<400> 19

Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser
1 5

<210> 20
<211> 120
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-2 VH бел

<400> 20

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

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

047697

20 25 30

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-2 VH ДНК

<400> 21
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaagggtg
60

tcctgcaagg cctctggcta caagttcacc tcctatatca tccactgggt gcggcaggca
120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac
180

gcccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat
240

atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actattgtgc cagaggctac
300

tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccagggca ccacagtgac agtgagctcc
360

<210> 22
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 445-2 VK бел

<400> 22

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 23

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 445-2 VK ДНК

<400> 23

gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc
 60

atcacatgca gcgcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca
 120

ggcaaggcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgcctcc
 180

agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttcaccctga caatctctag cctgcagccc
 240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc
 300

ggcacaaagg tggagatcaa g
 321

<210> 24
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 445-3 HCDR2

<400> 24

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

Gly

<210> 25
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 445-3 LCDR1

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 26
 <211> 120
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 445-3 VH бел

<400> 26

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

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

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

047697

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-3 VH ДНК

<400> 27
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc caggcagctc cgtgaaggctg
60

tcttgcaagg cctctggcta caagttcacc tctatatatca tccactgggt gcggcaggca
120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctac atcaaccctt ataatgaggg cacacggtac
180

aaccagaagt ttcagggcag agtgaccctg acagccgata agtctaccag cacagcctat
240

atggagctgt ctagcctgag gtccgaggac accgcccgtgt actattgtgc cagaggctac
300

tatggctcct cttacgccat ggattattgg ggccaggcca ccacagtgac agtgagctcc
360

<210> 28
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 445-3 VK бел

<400> 28

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

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

047697

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 29
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 445-3 VK ДНК

<400> 29
 gacatccaga tgaccagtc tcccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtgacc
 60

atcacatgcc gggcctccca gggcatctcc aactacctga attggtatca gcagaagcca
 120

gacggcgcca tcaagctgct gatctacgac gcctctacac tgtatagcgg cgtgccctcc
 180

agattctctg gcagcggctc cggaaccgac ttcaccctga caatctctag cctgcagccc
 240

gaggatttcg ccacatacta ttgtcagcag tacagcaagc tgccttatac ctttggcggc
 300

ggcacaaaagg tggagatcaa g
 321

<210> 30
 <211> 18
 <212> ПРТ
 <213> Человек разумный

<400> 30

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp
 1 5 10 15

Arg Asp

<210> 31
 <211> 41
 <212> ПРТ
 <213> Человек разумный

<400> 31

Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala
 20 25 30

Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu
 35 40

<210> 32
 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 33
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<400> 33

Val Ile Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 34

Ala Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 35
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<400> 35

Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 36
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 36

Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 37

His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 38
 <211> 354
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4В6 ДНК-VH

<400> 38

caggtgcagc tgcaggagtc gggaccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60

acctgcaactg tctctggggtt ttcattaacc agctatggtg tacactggat ccggcagccc
 120

ccaggggaagg gactggagtg gatcggggtc atatacgccg atggaagcac aaattataat
 180

ccctccctca agagtcgagt gaccatatca aaagacacct ccaagaacca ggtttccctg
 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agcctatggt
 300

aactactggt acatcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 39
<211> 118
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B6 VH

<400> 39

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

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

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

Gly Val Ile Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B6 VL

<400> 40

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcga gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca gcagaaacca
120

ggacagcctc ctaagctgct cattaactat gcatttcacg gcttcactgg ggtccctgac
180

cgattcagtg gcagcgggta tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct
240

gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gtttgccag
300

gggaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 41
<211> 107
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B6 VL

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

Asn Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 42
<211> 327
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> huIgG4mt1 бел

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 43
 <211> 327
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> huIgG4mt2 бел

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

047697

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 44
 <211> 327
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> huIgG4mt6 бел

<400> 44

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Ala Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 45
 <211> 327
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> huIgG4mt8 бел

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

047697

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Thr Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

047697

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 46
 <211> 327
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> huIgG4mt9 бел

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Ala Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 47

<211> 327

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> huIgG4mt10 бел

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

047697

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Ala Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

047697

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 48

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: Синтетический полипептид

<400> 48

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

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

Asn Leu His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Met Arg Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Val Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Arg Asp Gly Arg Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<400> 49

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

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Lys
 20 25 30

Asp Gly Gln Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Thr Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

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

Ser Arg Val Arg Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
 85 90 95

Arg Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 50

<211> 10

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<400> 50

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 51

<211> 16

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<400> 51

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<400> 52

Ala Lys Pro Tyr Gly Thr Ser Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 53

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Val Val Ala
 1 5 10

<210> 54
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 54

Trp Ala Ser Ile Arg His Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<400> 55

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Tyr Thr
 1 5 10

<210> 56
 <211> 117
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4B2 vh

<400> 56

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

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

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Pro Tyr Gly Thr Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4B2 vL

<400> 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Val
 20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Ile Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 (член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли) или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PD1 (белок 1 запрограммированной смерти клеток) или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи) с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи) с SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 18 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 13 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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. Способ по п.1, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

3. Способ по п.1, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 32, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 34; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 35, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

4. Способ по п.3, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

5. Способ по п.3 или 4, где антитело к PD1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

6. Способ по п.5, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

7. Способ по п.1, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

8. Способ по п. 1, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

9. Способ лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PDL1 (лиганд 1 белка запрограммированной смерти клеток) или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 18 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и вариабельную 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 и (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 и (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.

10. Способ по п.9, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

11. Способ по п.9, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 50, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 51 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 52; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 53, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 54 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 55.

12. Способ по п.11, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

13. Способ по п.11 или 12, где антитело к PDL1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

14. Способ по п.13, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

15. Способ по п.9, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

16. Способ по п.9, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

17. Способ по п.1 или 9, где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной 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 или саркомы.

18. Способ по п.17, где рак представляет собой метастатический рак.

19. Способ по любому из пп.1-18, где лечение приводит к устойчивому противораковому ответу у субъекта после прекращения лечения.

20. Способ повышения, усиления или стимуляции иммунного ответа или функции, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PD1 или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 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 и (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 и (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 и (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.

21. Способ по п.20, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

22. Способ по п.20, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 32, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 34; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 35, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

23. Способ по п.22, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

24. Способ по п.22 или 23, где антитело к PD1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

25. Способ по п.24, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

26. Способ по п.20, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

27. Способ по п.20, где антитело к PD1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

28. Способ по п.20, где стимуляция иммунного ответа связана с Т-клетками.

29. Способ по п.20, где стимуляция иммунного ответа характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

30. Способ по п.28, где Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокинов, пролиферацией или цитолитической активностью.

31. Способ по п.28 или 30, где Т-клетки представляют собой CD4+ и CD8+ Т-клетки.

32. Способ по любому из пп.20-31, где введение приводит к устойчивому клеточному иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

33. Способ повышения, усиления или стимуляции иммунного ответа или функции, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к PDL1 или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 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 и (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 и (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 и (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.

34. Способ по п.33, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

35. Способ по п.33, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит: (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 50, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 51 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 52; и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 53, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 54 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 55.

36. Способ по п.35, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

37. Способ по п.35 или 36, где антитело к PDL1 содержит константный домен IgG4, содержащий любую из SEQ ID NO: 42-47.

38. Способ по п.37, где константный домен IgG4 содержит SEQ ID NO: 46 или 47.

39. Способ по п.33, где антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

40. Способ по п.33, где антитело к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

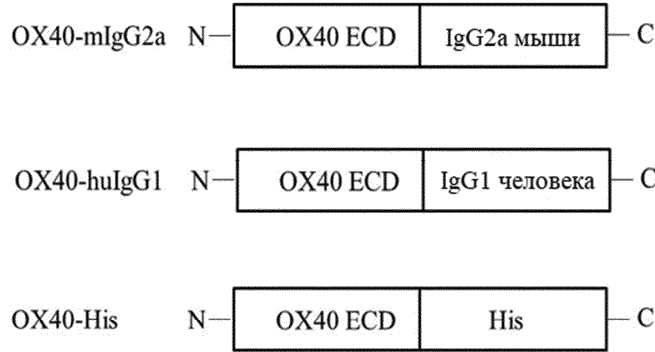
41. Способ по п.33, где стимуляция иммунного ответа связана с Т-клетками.

42. Способ по п.33, где стимуляция иммунного ответа характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

43. Способ по п.41, где Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокинов, пролиферацией или цитолитической активностью.

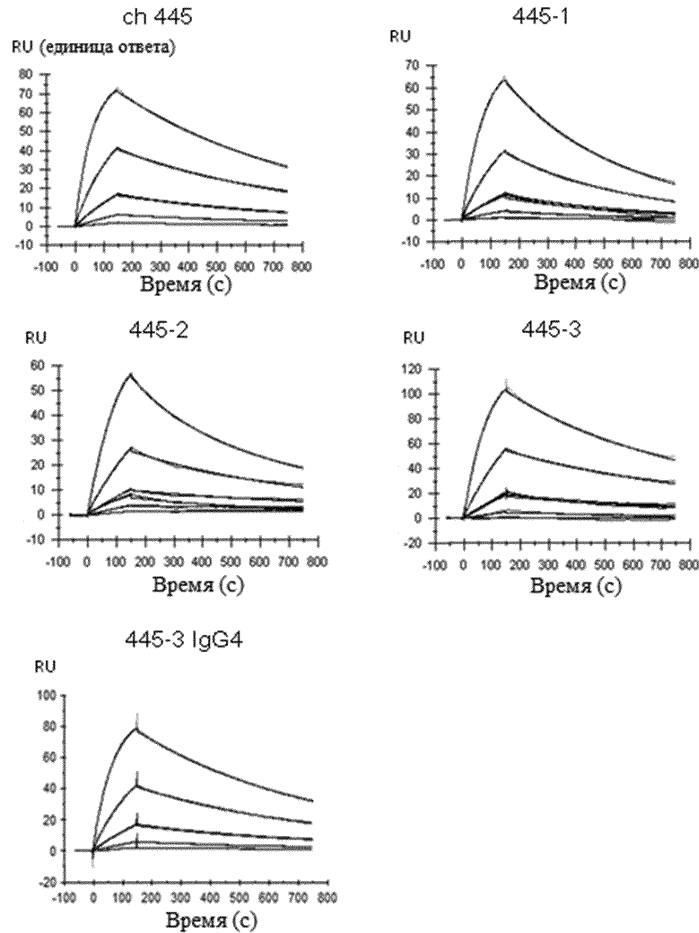
44. Способ по п.41 или 43, где Т-клетки представляют собой CD4+ и CD8+ Т-клетки.

45. Способ по любому из пп.33-44, где введение приводит к устойчивому клеточному иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

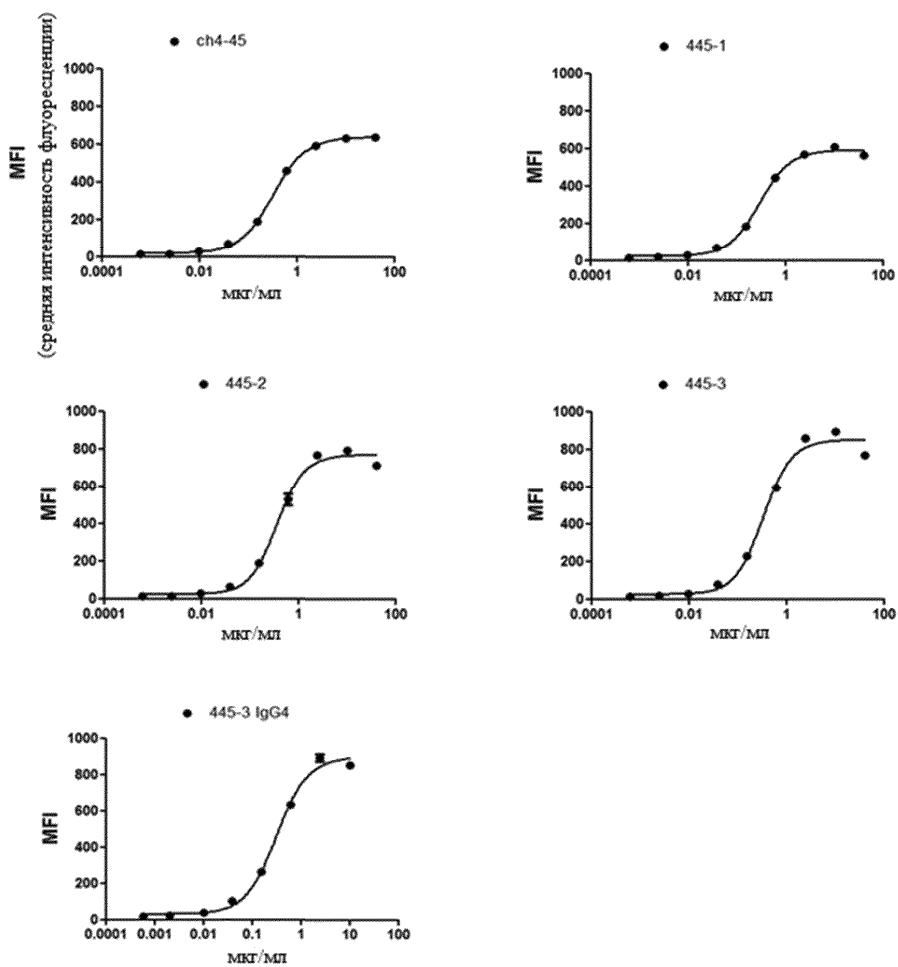


(OX40 - член 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли
 ECD - внеклеточный домен
 His - гистидин)

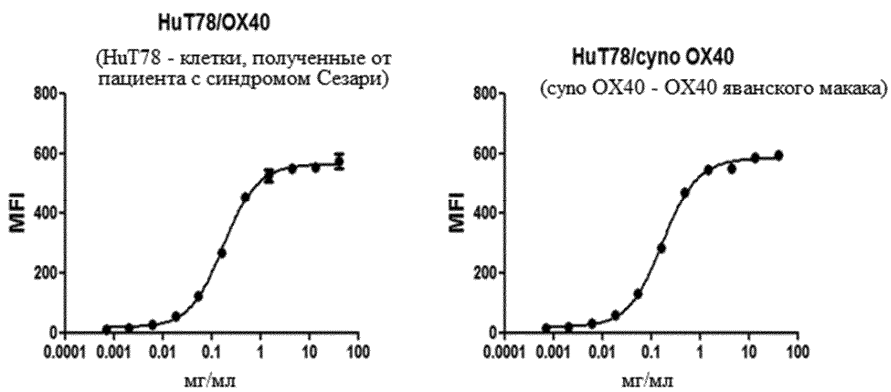
Фиг. 1



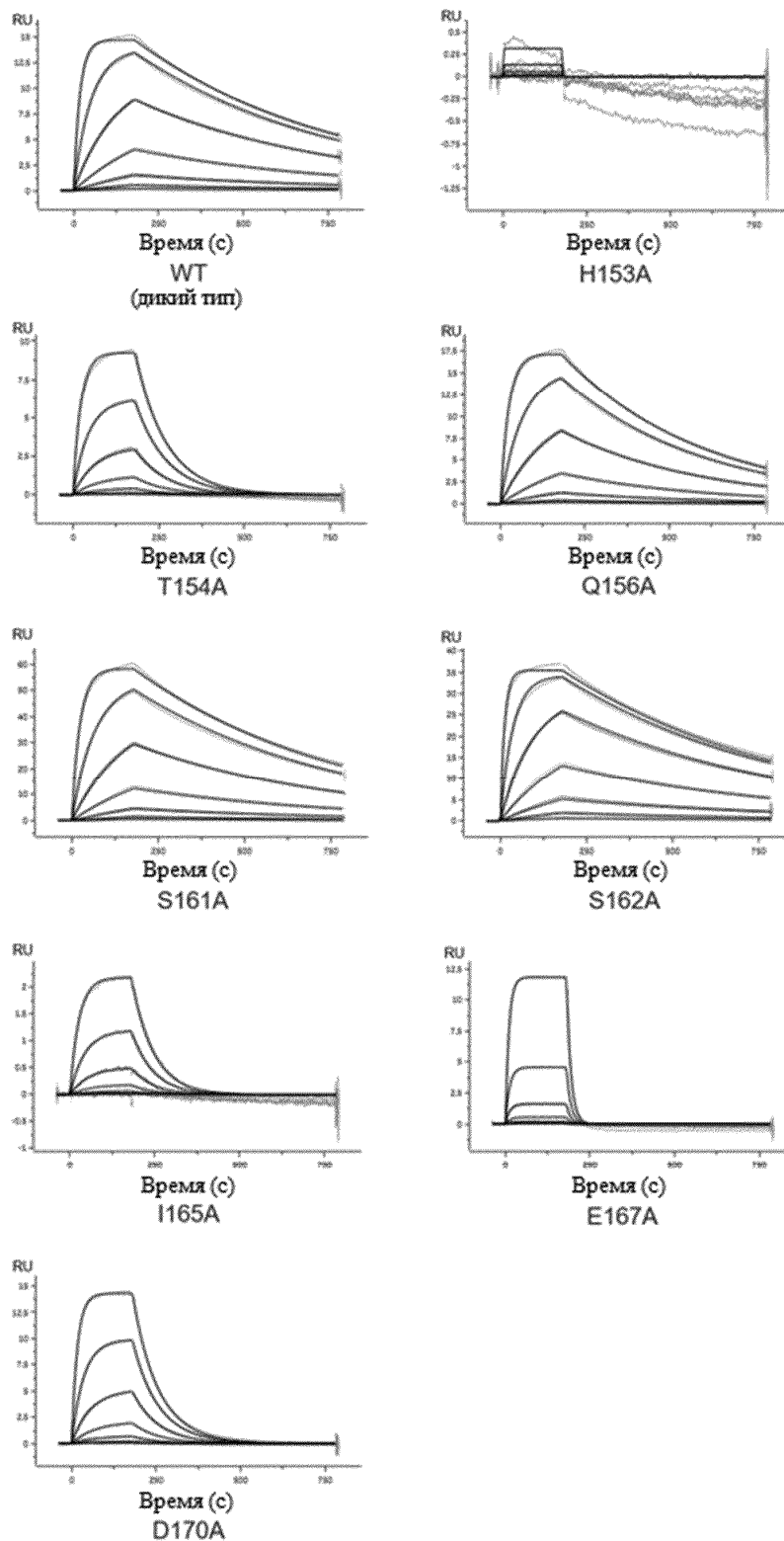
Фиг. 2



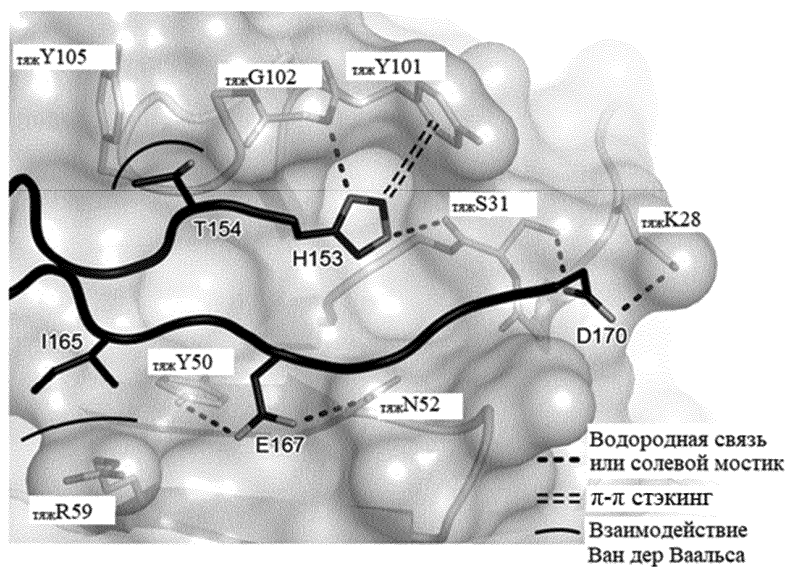
Фиг. 3



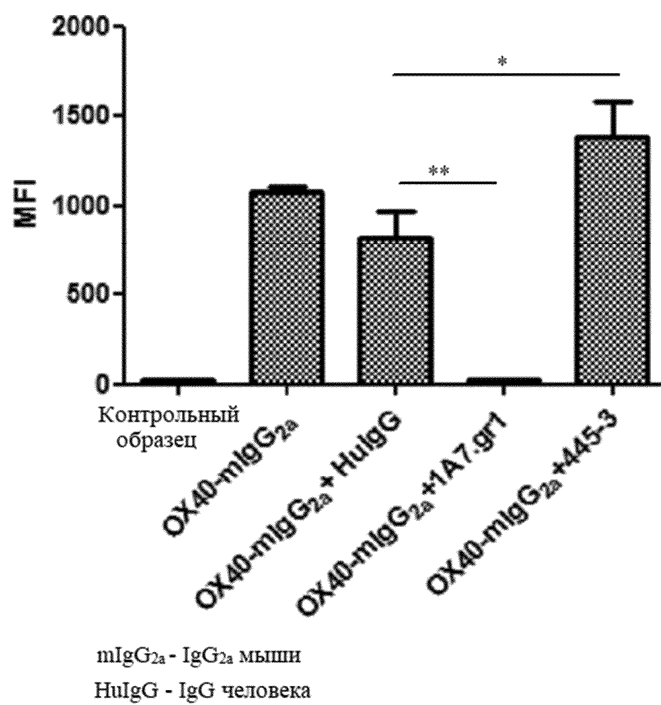
Фиг. 4



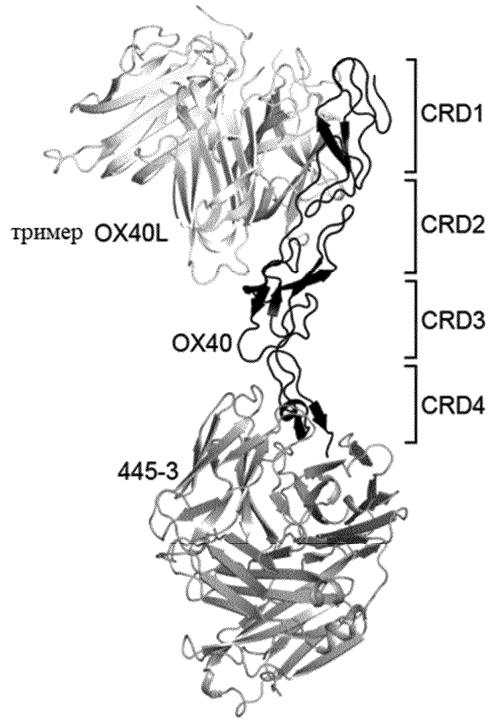
Фиг. 5



Фиг. 6



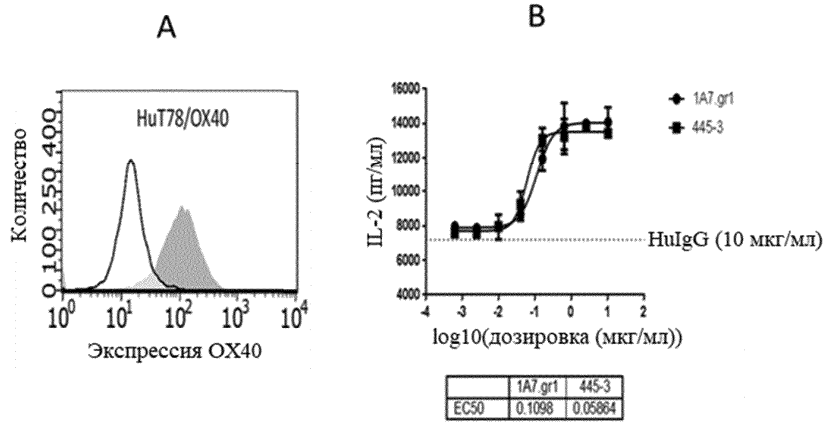
Фиг. 7



CRD - домен, богатый цистеином

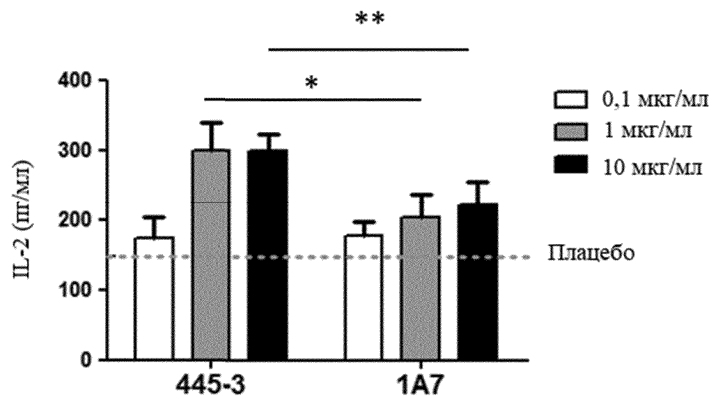
OX40L - лиганд для OX40

Фиг. 8

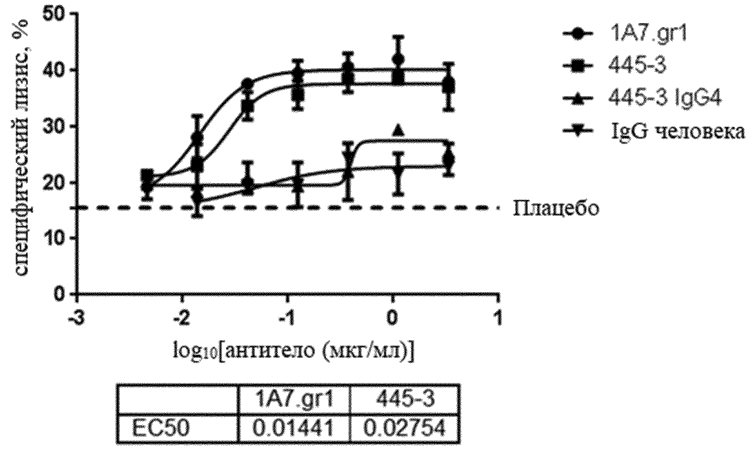


EC50 - (средняя эффективная концентрация)

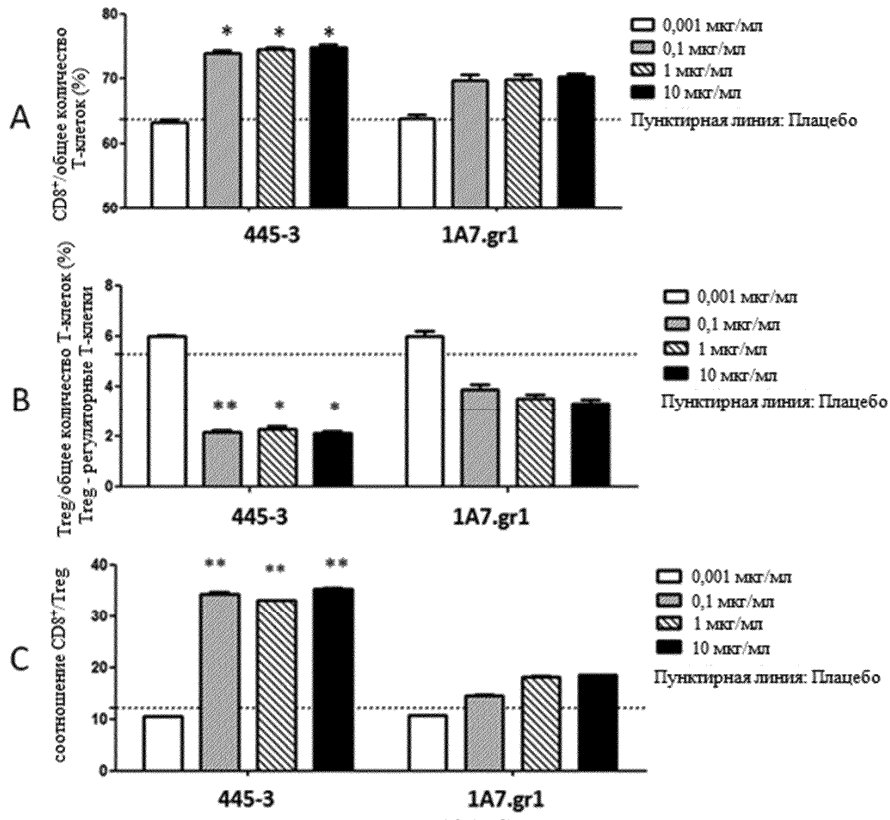
Фиг. 9А, В



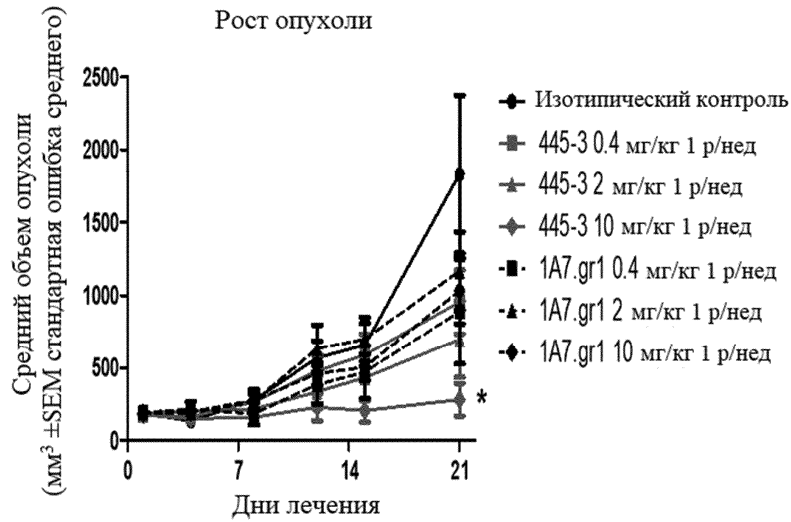
Фиг. 10



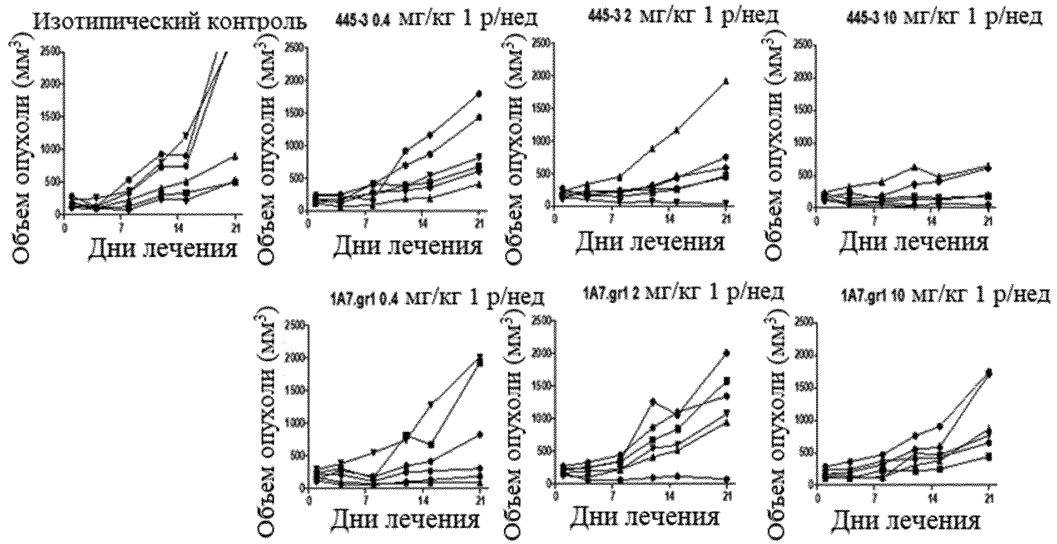
Фиг. 11



Фиг. 12А-С



Фиг. 13А



В

Фиг. 13В

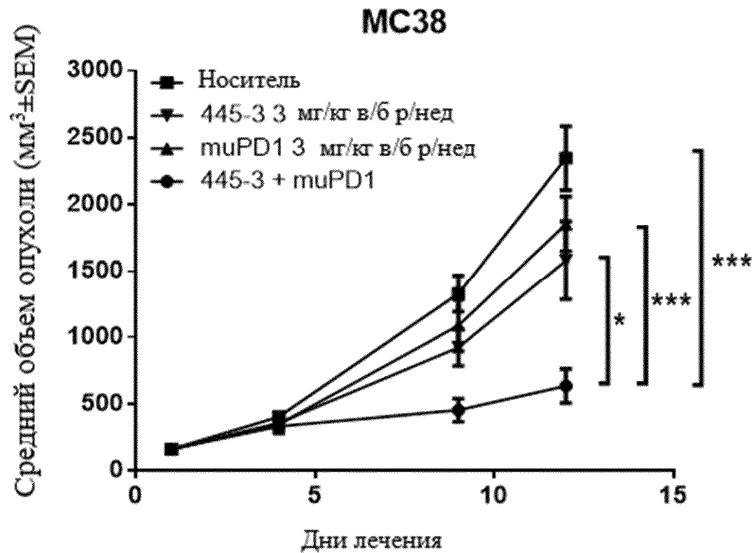
Тяжелая цепь		Легкая цепь		Совместная трансфекция тяжелой и легкой цепи	FACS*		Biacore		
ID (идентификатор)	CDR/FR	ID	CDR/FR	ID Ab (ID антитела)	EC ₅₀ (нг/мл)	Верх.ур. (MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	Kd (M)
445-1VH**	.	445-1VL***	.	445-1	336	500	2,37E+05	3,89E-03	1,64E-08
445-1VH-M48I	FR2	445-1VL	.	445-2 (M48I)-1 (445-1 с мутацией M48I в VH)	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)	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

* сортировка флуоресцентно-активированных клеток
 ** переменная область тяжелой цепи
 *** переменная область легкой цепи

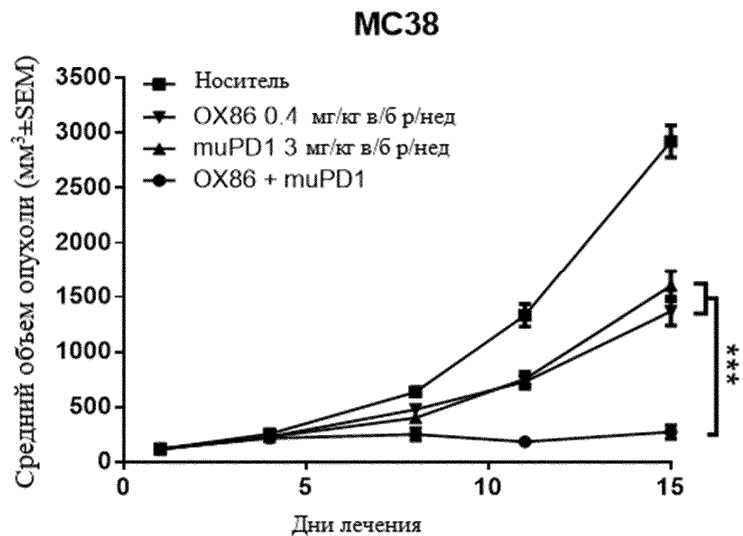
Фиг. 14А

Тяжелая цепь		Легкая цепь		Совместная трансфекция тяжелой и легкой цепи	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC ₅₀ (нг/мл)	Верх.ур. (MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)
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 мутацией 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 с мутацией Q62E в VH и мутацией 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 мутацией K28T в VH и мутацией 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 мутацией Y27G на VH и мутацией 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 мутацией T30S в VH и мутацией 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 (445-2VH с мутациями A61N и K28R и 445-3VL)	369	1080	1,57E+05	1,15E-03	7,35E-09
445-2VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N-K63R)-3 (445-2VH с мутациями A61N и K63R и 445-3VL)	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) (445-3VH и 445-2VL с мутациями G41D, K42G S24R и K93R)	337	1050	2,12E+05	1,68E-03	7,90E-09

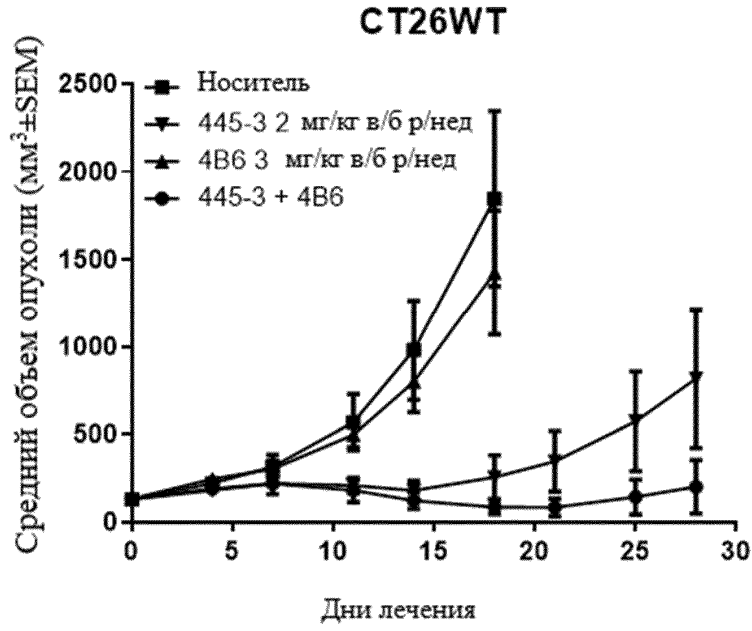
Фиг. 14В



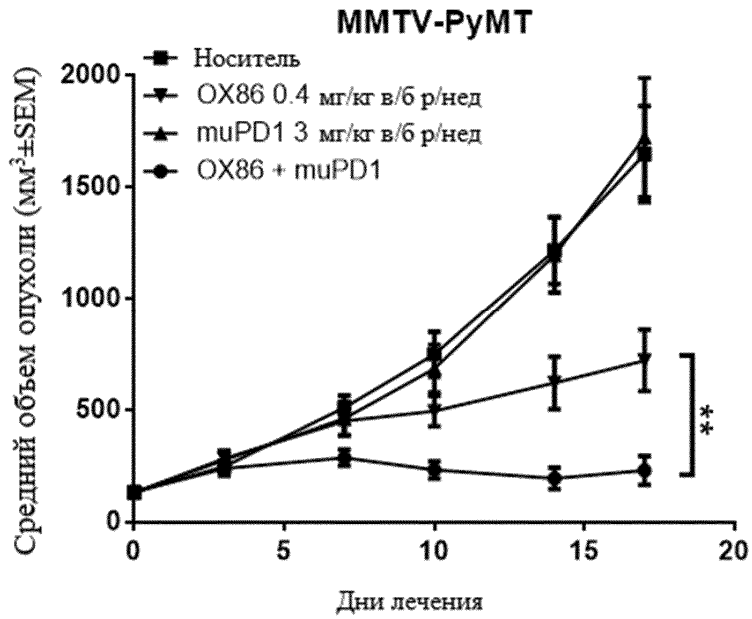
Фиг. 15



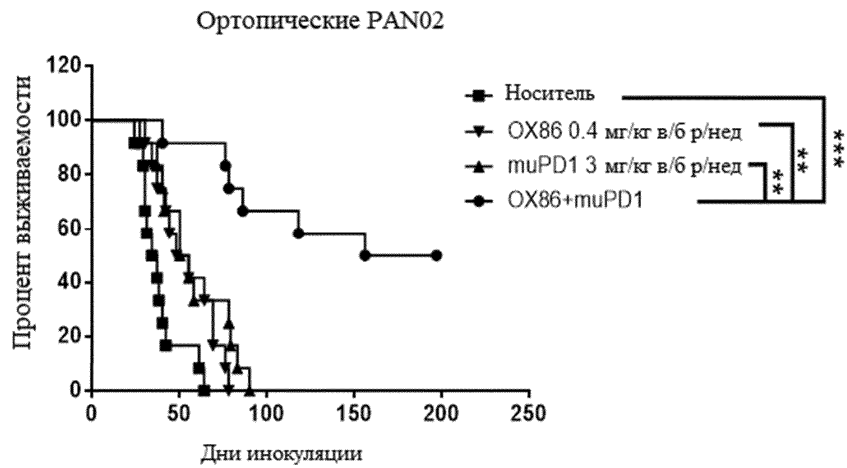
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

