

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036047**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.18

(21) Номер заявки
201490053

(22) Дата подачи заявки
2012.07.09

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

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С OX40, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/506,491**

(32) **2011.07.11**

(33) **US**

(43) **2014.08.29**

(86) **PCT/IB2012/053502**

(87) **WO 2013/008171 2013.01.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИКНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Аттингер Антуан, Блейн Станислас,
Бэк Джонатан Альберт, Лиссилаа
Рами, Хоу Самюэль (CH)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-2010096418
WO-A2-2008106116
WO-A2-2007062245

(57) Изобретение относится к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека. Более конкретно изобретение относится к антагонистичному антителу или его фрагменту, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и/или CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6.

B1**036047****036047****B1**

Родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на патент Соединенных Штатов Америки с № 61/506 491, поданной 11 июля 2011 г., всё содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и/или CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6.

Уровень техники

OX40 является членом TNFR-суперсемейства рецепторов и впервые был идентифицирован в 1987 г. в форме гликопротеина с массой 50 кДа, экспрессируемого активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами у крысы (Paterson D.J. et al., (1987) Mol. Immunol. 24:1281-90). Внеклеточный лигандсвязывающий домен OX40 состоит из 3 полных богатых цистеином доменов (CRD) и неполного четвертого С-концевого CRD (Bodmer J.L. et al., (2002) Trends Biochem. Sci. 27:19-26). Лигандом для OX40 служит OX40L (CD252), и три копии OX40 связываются с тримерным лигандом, образуя комплекс OX40-OX40L (Compaan D.M. & Hymowitz S.G. (2006) Structure, 14:1321-1330). OX40 представляет собой мембраносвязанный рецептор; однако также была выявлена растворимая изоформа (Taylor L. & Schwarz H. (2001) J. Immunol. Methods, 255:67-72). В отличие от CD28 OX40 не демонстрирует конститутивную экспрессию в непримированных (naïve) Т-лимфоцитах, а их экспрессия индуцируется после вовлечения рецептора Т-лимфоцитов (TCR). OX40 является вторичной костимулирующей молекулой, экспрессируемой через 24-72 ч после активации; его лиганд - OX40L - также не экспрессируется в покоящихся антиген-презентирующих клетках, а экспрессируется после их активации. OX40 экспрессируется главным образом активированными CD4⁺ Т-лимфоцитами и, в ограниченной степени, активированными CD8⁺ Т-лимфоцитами (Salek-Ardakani S. et al., (2006) Curr. Immunol. Rev. 2: 37-53).

Краткое описание изобретения

Настоящее описание относится в целом к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека, способам их получения и применения, включая способы лечения расстройств, опосредованных OX40. Антагонистичные антитела или их фрагменты согласно настоящему изобретению, которые связываются с OX40 человека, являются антагонистичными антителами и не демонстрируют агонистичных эффектов и/или не активируют OX40 человека при связывании.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и/или CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат вариабельную каркасную область, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) и IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 32, и при этом указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент,

которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность каркасного участка вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, содержащие каркасный участок вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), и при этом указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариательной области легкой цепи соответствующего антитела мыши.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат:

(a) последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 37 и 38; и

(b) последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 47.

Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 59, 79 и 80. Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60, 86, 87 и 89.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат:

(a) вариательную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 58 или 59; и

(b) вариательную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 60.

Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело содержит область Fc IgG4 человека, и при этом указанное антитело не обладает Fc-обусловленной цитотоксичностью. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело содержит область Fc IGHG1 человека, и при этом указанное антитело функционально в отношении механизмов цитотоксичности, таких как антителозависимая клеточно опосредованная цитотоксичность (ADCC). Согласно предпочтительному аспекту указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат нефукозилированную область Fc IGHG1 и проявляют усиленные Fc-обусловленные механизмы цитотоксичности, такие как ADCC.

Согласно ещё одному аспекту в описании настоящего изобретения также раскрыты антагонистичные гуманизированные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека с таким же сродством, как соответствующее химерное антитело, например, сохраняют по меньшей мере 75% сродства связывания с OX40 (K_D) по сравнению со сродством соответствующего химерного антитела или обладают по меньшей мере таким же или более высоким сродством связывания с OX40 (K_D) по сравнению со сродством соответствующего химерного антитела. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с эпителием во втором домене внеклеточной области OX40 человека.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела и их фрагменты, связывающиеся с OX40 человека, векторы и клетки-хозяева, содержащие указанную нуклеиновую кислоту или вектор. Также предложены композиции, содержащие указанное антагонистичное антитело или его фрагмент и фармацевтически приемлемую основу, и иммуноконъюгаты, содержащие указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, в связи с терапевтическим агентом.

В описании настоящего изобретения также предложены способы лечения расстройств, опосредованных OX40. Согласно одному аспекту в модели активации и пролиферации аллореактивных Т-лимфоцитов *in vitro* (реакция смешанной культуры лимфоцитов; MLR) антагонистичное антитело или

его фрагмент эффективно ингибируют MLR у двух разных индивидуумов (субъекты, у которых достигнут лечебный эффект) со значением ЭК₅₀ приблизительно 100 нг/мл. Кроме того, в модели реакции ксенотрансплантата против хозяина, в модели болезни "аллогенный трансплантат против хозяина" (GVHD), наблюдаемой после пересадки костного мозга у пациентов, антагонистичное антитело или его фрагмент оказывали мощное угнетающее действие на реакцию GVHD.

Также в соответствии с настоящим изобретением предложены наборы и готовые изделия, содержащие указанное антитело или его фрагмент, композицию или иммуноконъюгат для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 (А) - ELISA-анализ с прямым связыванием иммобилизованного рекомбинантного ОХ40-his человека. Связывание химерных антител 2F8 и 1D4 с ОХ40 человека измеряли при помощи прямого ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Разные концентрации (в диапазоне от 10 до 0,01 мг/мл) 1D4 (диаграмма с черными столбиками) и 2F8 (диаграмма с белыми столбиками) инкубировали с 2 мг/мл рекомбинантного ОХ40-his, меченного и в белковой оболочке, в течение ночи при 4°C в планшете на 96 лунок. Связывание каждого антитела с ОХ40 определяли при помощи конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела против иммуноглобулина человека; (В) - конкурентный ELISA иммобилизованного рекомбинантного ОХ40-his человека. Ингибиторные эффекты химерных антител 2F8 и 1D4 на взаимодействие ОХ40/ОХ40L оценивали при помощи блокирующего ELISA. Разные концентрации (в диапазоне от 10 до 0,01 мг/мл) 1D4 (диаграмма с черными столбиками) и 2F8 (диаграмма с белыми столбиками) инкубировали с 2 мг/мл рекомбинантного ОХ40-Fc, меченного и в белковой оболочке, в течение ночи при 4°C в планшете на 96 лунок. Через 5 мин в каждую лунку добавляли биотинилированный рекомбинантный ОХ40L человека в фиксированной концентрации (0,04 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Связывание ОХ40L с ОХ40 определяли при помощи стрептавидина-HRP.

Фиг. 2 - односторонняя реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR), измеряемая по включению ³H-тимидина. Столбцы диаграммы отражают среднее включение ³H-тимидина (количество импульсов) по меньшей мере для трех измерений $\pm$ среднеквадратическую ошибку среднего. Показаны контроль изотипа (трастузумаб) и положительный контроль (эфализумаб). Эффектор действителен только для эффекторных клеток. "Эффектор+мишень" соответствует измерению, где антитела не добавляли.

Фиг. 3 - проточная цитометрия в целях анализа химерного антитела 1D4. (А) - окрашивание активированных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) и клеток НРВ-ALL. На графиках показана интенсивность флуоресценции (ось X) и относительное количество клеток (% от максимума событий - ось Y). Указан тип окрашенных клеток. РВМС человека активировали при помощи фитогемагглютинина (РНА) и интерлейкина-2 (IL-2) в течение 48 ч перед измерением; (В) - окрашивание активированных РВМС яванской макаки. Связывание химерного антитела 1D4 с ОХ40 яванского макака оценивали посредством проточной цитометрии. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из цельной крови яванского макака и культивировали 3×10^6 клеток в течение 50 ч в присутствии 10 мг/кг РНА и 100 Е/мл rhIL-2. Активированные РВМС инкубировали с 25 мг/мл контрольного антитела (верхний график (i)) либо биотинилированного овечьего антитела к ОХ40 человека (средний график (ii)), либо биотинилированного химерного антитела 1D4 (нижний график (iii)). Связывание каждого антитела с ОХ яванской макаки определяли при помощи стрептавидина-APC.

Фиг. 4 - поверхностный плазменный резонанс для измерения анти-ОХ40 антител. Данные выражены как количество откликов (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X).

Фиг. 4А - антитела VH1/VL1 по сравнению с химерой 1D4.

Фиг. 4В - гуманизированные антитела на основе VH1, VH2 и VH3 (как указано) по сравнению с химерой 1D4.

Фиг. 4С - примеры антител, которые связываются плохо: VH4/VL4, VH5/VL4, VH5/VL5 и VH5/VL6.

Фиг. 4D - примеры антител, которые связываются слабо (VH5/VL9 и VH4/VL9) и связываются хорошо (VH6/VL9 и VH7/VL9).

Фиг. 4Е - гуманизированные антитела на основе VH7.

Фиг. 4F - VH6/VL9 обладает наилучшими свойствами связывания по сравнению с химерой 1D4 и гуманизированным вариантом VH7/VL9.

Фиг. 5 - выравнивание последовательностей. Выравнивание вариабельных областей тяжелой цепи (фиг. 5А) или легкой цепи (фиг. 5В) антитела 1D4 с избранными каркасными областями антител эмбрионального типа (IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) и IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24)) из иммуногенетической базы данных и мутированными к первоначальному виду вариантами вариабельных областей (VH1 (SEQ ID NO: 29), VH2 (SEQ ID NO: 77), VH3 (SEQ ID NO: 78), VH4 (SEQ ID NO: 79), VH5 (SEQ ID NO: 80), VH6 (SEQ ID NO: 58), VH7 (SEQ ID NO: 59), VL1 (SEQ ID NO: 30), VL2 (SEQ ID NO: 81), VL3 (SEQ ID NO: 82), VL4 (SEQ ID NO: 83), VL5 (SEQ ID NO: 84), VL6 (SEQ ID NO: 85), VL7 (SEQ ID NO: 86), VL8 (SEQ ID NO: 87), VL9 (SEQ ID NO: 60) VL10 (SEQ ID NO: 88), VL11 (SEQ ID NO: 89)).

Фиг. 6 - измерение термостабильности гуманизированного фрагмента FАВ анти-ОХ40 анти-антитела VН6/VL9 при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии. Данные выражены как добавочная мольная теплоемкость (сокращенно C_p [ккал/моль/°C]; ось Y) в зависимости от температуры (ось X).

Фиг. 7 - описание свойств эпитопа. На данной фигуре показан эпитоп гуманизированного анти-ОХ40 анти-антитела VН6/VL9 по результатам ELISA, который описан в примере 7.

Фиг. 8 - реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR), измеряемая по включению ^3H -тимидина. На фиг. 8А и 8В показаны результаты оценки реакции смешанной культуры лимфоцитов от двух неродственных доноров. Пролиферацию измеряли по включению ^3H -тимидина. На графиках показаны абсолютные значения импульсов для каждого состояния $\pm$ СКО. Клетками субъектов, отвечающих на лечение, были необработанные РВМС, стимулирующими клетками были РВМС, обработанные митомицином. Все условия для тестируемых антител применяли в отношении клеток субъектов, отвечающих на лечение, в смеси с гетерологичными стимулирующими РВМС. Положительным контролем служил эфализумаб (анти-LFA-I антитело).

Фиг. 9 - модель реакции ксеногенного трансплантата против хозяина. На данной фигуре показан процент выживания в группах из восьми животных при каждом из упоминаемых условий. Носитель: только ФСБ (фосфатно-солевой буфер). Вертикальная пунктирная линия указывает последний день лечения. В группе из двух подвергнутых облучению животных, которые не получали РВМС, не было отмечено ни смертности, ни каких-либо симптомов (не показано).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с ОХ40 человека.

В настоящей заявке термин "ОХ40 человека" охватывает варианты, изоформы и видовые гомологи ОХ40 человека. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению могут в определенных случаях обладать перекрестной реактивностью с ОХ40 из организма видов, отличных от человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела могут быть полностью специфичными в отношении одного или более белков ОХ40 человека и могут не проявлять видовой или другой перекрестной реактивности по отношению к видам, отличным от человека. Полная аминокислотная последовательность примера ОХ40 человека имеет номер доступа в системе Swiss-Prot P43489 (TNR4_HUMAN; SEQ ID NO: 12). ОХ40 называют CD134, TNFRSF4, ACT35 или TXGP1 L. ОХ40 человека обозначается идентификационным номером гена 7293 в системе Entrez Gene и HGNC 11918 в системе HGNC (Комитет по номенклатуре генов Международной организации по изучению генома человека). ОХ40 может кодироваться геном, обозначаемым TNFRSF4/ОХ40.

Применяемый в настоящей заявке термин "ОХ40 человека" охватывает все известные или еще не открытые аллели и полиморфные формы ОХ40 человека. В настоящей заявке термины "ОХ40 человека", "ОХ40" или "рецептор ОХ40" применяются эквивалентно и обозначают "ОХ40 человека", если другое особо не указано.

В настоящей заявке термин "лиганд ОХ40" или "ОХ40L" применяется эквивалентно и включает лиганд ОХ40, особенно лиганд ОХ40 человека. ОХ40L является членом TNF-супер семейства и также называется gp34 или CD252. Также для ОХ40L было введено обозначение CD252 (кластер дифференцировки 252), и он имеет номер доступа в базе данных P23510 (Swiss-Prot) или Q6FGS4 (Uniprot). ОХ40L экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, дендритных клеток или клеток эндотелия.

В настоящей заявке термин "антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека" включает антитела или их фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека, например с ОХ40 человека в изолированной форме, со сродством (K_D) 500 нМ или менее, предпочтительно 200 нМ или менее, более предпочтительно 150 нМ или менее, более предпочтительно 120 нМ или менее и даже более предпочтительно 110 нМ или менее. Термин "антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека" включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящей заявке термины "антагонистичное антитело" или "антитело-антагонист" применяются эквивалентно и охватывают антитело, которое способно ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность ОХ40, например, путем блокирования связывания или существенного уменьшения связывания ОХ40 с лигандом ОХ40 и за счет этого ингибировать или уменьшать действие сигнального пути, запускаемого ОХ40, и/или ингибировать или уменьшать ОХ40-опосредуемый ответ клетки, такой как пролиферация лимфоцитов, экспрессия цитокинов или выживание лимфоцитов.

В настоящей заявке термин "антитело" включает целые антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты или одиночные цепи. Термин "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), соединенные между собой дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающему фрагменту. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (в настоящей заявке сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (в настоящей заявке сокращенно VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Области VH и VL также можно под-

разделить на области гипервариабельности, именуемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые гипервариабельны по своей последовательности и/или участвуют в распознавании антигена и/или образуют структурно обусловленные петли, между которыми расположены более консервативные области, именуемые каркасными участками (FR или FW). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Последовательности аминокислот FW1, FW2, FW3 и FW4 составляют "отличную от CDR область" или "неполную область CDR", как изложено в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин "каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи" может включать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательности участков каркаса тяжелой цепи (например, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) и/или каркас 4 (FW4)). Предпочтительно каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи включает FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3. В настоящей заявке термин "каркасный участок вариабельной области легкой цепи" может включать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательности участков каркаса легкой цепи (например, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) и/или каркас 4 (FW4)). Предпочтительно каркасный участок вариабельной области легкой цепи включает FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки), и первым компонентом классического пути активации комплемента (C1q).

Антитела группируют по классам, которые также называют изотипами, определяемыми генетически по константной области. Константные области легких цепей человека подразделяют на каппа (Ск) и лямбда (Сλ)-легкие цепи. Тяжелые цепи подразделяют на мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эпсилон (ε), и они определяют изотип антитела - IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Таким образом, термин "изотип" в настоящей заявке относится к любым классам и/или подклассам иммуноглобулина, определяемым по химическим и антигенным характеристикам их константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека включают IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) и IgE (IGHE). Так называемый ген псевдо-γ иммуноглобулина человека IGHGP представляет собой ген дополнительной константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, который был секвенирован, но который не кодирует белок в связи с измененным сайтом переключения (Bensmana M. et al., (1988) *Nucleic Acids Res.* 16(7): 3108). Несмотря на то, что ген псевдо-γ иммуноглобулина человека IGHGP содержит измененный сайт переключения, он обладает открытой рамкой считывания для всех константных доменов тяжелой цепи (CH1-CH3) и шарнирной области. Все открытые рамки считывания для константных доменов его тяжелой цепи кодируют белки-домены, которые обладают хорошим соответствием со всеми константными доменами иммуноглобулинов человека с прогнозируемыми структурными особенностями. Данный дополнительный псевдо-γ изотип в настоящей заявке обозначается IgGP или IGHGP. Были описаны другие гены псевдо-иммуноглобулинов, такие как псевдогены константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина эпсилон человека P1 и P2 (IGHEP1 и IGHEP2). Чаще всего для терапевтических целей применяют класс IgG. У человека данный класс включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей данный класс включает IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c и IgG3.

В настоящей заявке термин "химерное антитело" включает антитела, в которых последовательности вариабельной области из одного вида, а последовательности константной области получены из другого вида, такие как антитела, в которых последовательности вариабельной области получены из антитела мыши, а последовательности константной области получены из антитела человека.

В настоящей заявке термин "гуманизированное антитело" или "гуманизированное антитело против OX40" включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из антител эмбрионального типа другого вида млекопитающих, например мыши, были объединены с каркасными последовательностями антитела человека. Каркасные последовательности и антитела человека, а также в последовательности CDR, полученные из антител эмбрионального типа другого вида млекопитающих, могут содержать дополнительные модификации.

В настоящей заявке термин "Fab" или "область Fab" включает полипептиды, которые содержат домены иммуноглобулинов VH, CH1, VL и CL. Термин "Fab" может относиться к данной области, когда она изолирована, или к данной области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

В настоящей заявке термин "Fc" или "область Fc" включает полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина. Таким образом, термин "Fc" относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, и к гибкому шарнирному участку на N-конце к данным доменам. В случае IgA и IgM Fc может включать J-цепь. В случае IgG Fc включает домены иммуноглобулина С гамма 2 и С гамма 3 (Cγ2 и Cγ3), а также шарнирный участок между С гамма 1 (Cγ1) и С гамма 2 (Cγ2). Хотя границы области Fc могут варьировать, область Fc

тяжелой цепи IgG человека обычно по определению содержит остатки C226 или P230 на своем С-конце, причем нумерация проводится в соответствии с системой нумерации ЕС. В случае IgG1 человека область Fc по определению согласно настоящей заявке содержит остаток P232 на своем С-конце, причем нумерация проводится в соответствии с системой нумерации ЕС (Edelman G.M. et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63(1): 78-85). Термин "Fc" может относиться к данной области, когда она изолирована, или к данной области в контексте полипептида Fc, например антитела.

В настоящей заявке термин "шарнир", или "шарнирная область", или "шарнирная область антитела" включает гибкий полипептид, содержащий аминокислоты, находящиеся между первым и вторым константным доменом антитела. В настоящей заявке термин "шарнирная область" относится к области длиной 6-62 аминокислот, которая присутствует только в IgA, IgD и IgG, которая охватывает остатки цистеина, образующие мостики с двумя тяжелыми цепями. Структурно домен CH1 IgG заканчивается в положении ЕС 220, а домен CH2 IgG начинается на остатке в положении ЕС 237. Таким образом, в случае IgG шарнирная область антитела согласно определению, данному в настоящей заявке, включает положения (D221 в IgG1) - 231 (A231 в IgG1), причем нумерация проводится в соответствии с системой нумерации ЕС (Edelman G.M. et al. выше).

В настоящей заявке термин "исходное антитело" или "исходный иммуноглобулин" включает немодифицированное антитело, которое впоследствии модифицируют с получением его варианта. Указанное исходное антитело может быть природным антителом или вариантом или сконструированной версией существующего в природе антитела. Термин "исходное антитело" может относиться к самому антителу, композициям, которые содержат исходное антитело, последовательности, которая его кодирует. В настоящей заявке под термином "исходное антитело против OX40" понимают антитело или иммуноглобулин, который связывается с OX40, которое модифицировано и из которого получен вариант. В настоящей заявке под термином "соответствующее антитело мыши" понимают антитело или иммуноглобулин мыши, которые связываются с OX40 человека, которое можно модифицировать и из которого можно получить вариант, в частности антитело мыши 1D4, которое раскрыто в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин "альтернативное антитело" или "вариант антитела" включает последовательность антитела, которая отличается от последовательности исходного антитела по меньшей мере в результате одной модификации по сравнению с исходным антителом. В настоящей заявке подразумевается, что последовательность альтернативного антитела желательна обладает по меньшей мере 80%, более желательна по меньшей мере 90%, более желательна по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью исходного антитела по последовательности аминокислот. Термин "вариант антитела" может относиться к самому антителу, композициям, которые содержат вариант антитела, последовательности, которая его кодирует.

В настоящей заявке термин "модификация аминокислот (аминокислотная модификация)" включает замену, вставку и/или делецию аминокислоты в последовательности полипептида. В настоящей заявке под термином "замена аминокислоты" или "замена" понимают замещение аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Например, термин "замена R94K" относится к альтернативному полипептиду, в данном случае варианту каркасного участка варибельной области тяжелой цепи, в котором аргинин в положении 94 заменен на лизин. В предыдущем примере "94K" означает замену в положении 94 на лизин. В целях настоящей заявки множественные замены обычно разделяют косой чертой. Например, "R94K/L78V" относится к двойному варианту, содержащему замены R94K и L78V. В настоящей заявке под "вставкой аминокислоты" или "вставкой" понимают добавление аминокислоты в конкретном положении в последовательность исходного полипептида. Например, "-94" обозначает вставку в положении 94. В настоящей заявке под "делецией аминокислоты" или "делецией" понимают удаление аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида. Например, "R94-" обозначает делецию аргинина в положении 94.

Подразумевается, что в настоящей заявке термин "консервативные модификации" или "консервативные модификации последовательности" относятся к модификациям аминокислот, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристик связывания антитела, содержащего указанную последовательность аминокислот. Такие консервативные модификации включают замены, вставки и делеции аминокислот. Модификации можно ввести в антитело согласно настоящему изобретению при помощи стандартных технологий, известных в технике, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез. Консервативными заменами аминокислот являются замены, при которых остаток аминокислоты замещается остатком аминокислоты со сходной боковой цепью. Семейства остатков аминокислот со сходными боковыми цепями были определены в технике. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), с боковыми цепями с β -ветвями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более остатков аминокислот в участках CDR или в каркасных областях антитела согласно настоящему

изобретению могут быть заменены другими остатками аминокислот из того же семейства боковых цепей, и можно провести оценку, сохранило ли функцию измененное антитело (альтернативное антитело).

Для всех константных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов человека нумерация производится в соответствии с "системой нумерации ЕС" (Edelman G.M. et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63(1): 78-85). Для константного домена легких цепей иммуноглобулина каппа человека (IGKC), нумерация производится в соответствии с "системой нумерации ЕС" (Edelman G.M. et al. выше).

Для константных доменов легких цепей иммуноглобулинов лямбда человека (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7) нумерация производится в соответствии с "системой нумерации Кабата" (Kabat E.A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication № 91-3242), которая описана у Dariavach P. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 84(24): 9074-8 и Frangione B. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82(10): 3415-9.

В настоящей заявке термин "вариабельный домен" относится к доменам, которые обуславливают связывание с антигеном и определяют специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. В природных антителах антигенсвязывающий сайт состоит из двух вариабельных доменов (областей), которые определяют специфичность: один расположен в тяжелой цепи (VH), а другой расположен в легкой цепи (VL). В некоторых случаях специфичность может быть присуща только одному из двух доменов, как у однодоменных антител на основе тяжелых цепей, обнаруженных у животных семейства верблюдовых. Длина V областей обычно составляет примерно 110 аминокислот, и они состоят из относительно инвариантных фрагментов последовательности аминокислот, именуемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с крайне высокой вариабельностью, именуемых "гипервариабельными участками", длина которых 9-12 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат FR, которые принимают главным образом конфигурацию "β-слоёв", соединенные тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости друг от друга при помощи FR, и совместно с гипервариабельными участками из другой цепи-, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антитела (см. Kabat E.A. et al. выше). В настоящей заявке термин "гипервариабельный участок" относится к остаткам аминокислот антитела, которые отвечают за связывание с антигеном. Как правило, гипервариабельный участок включает остатки аминокислот из "участка, определяющего комплементарность" или "CDR", причем последний обладает наивысшей вариабельностью последовательностей и/или участвует в распознавании антигена. Для всех вариабельных доменов нумерация производится в соответствии с "системой нумерации Кабата" (Kabat E.A. et al. выше).

Применяется несколько определений CDR, и все они включены в настоящую заявку. Определение по Кабату основано на вариабельности последовательностей и применяется чаще всего (Kabat E.A. et al. выше). Определение по Хотия основано на локализации структурных петель (Chothia C. & Lesk A.M. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Определение программы AbM представляет собой компромисс между определениями Кабата и Хотия и применяется в программах для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (Martin ACR et al., (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86: 9268-72; Martin ACR et al., (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen J.T. et al., (1992) Immunomethods, 1: 126-136; Rees AR et al., (1996) In Steinberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Недавно было введено контактное определение (MacCallum R.M. et al., (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745), которое основано на анализе структур комплексов, имеющихся в базе данных "Protein Databank". Определение CDR в соответствии с IMGT® - иммуногенетической информационной системой® (<http://www.imgt.org>) основано на нумерации IMGT для V-областей всех иммуноглобулинов и рецепторов Т-лимфоцитов всех видов (IMGT®, международная иммуногенетическая информационная система®; Lefranc M.P. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 27(1): 209-12; Ruiz M. et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28(1): 219-21; Lefranc M.P. (2001) Nucleic Acids Res. 29(1): 207-9; Lefranc M.P. (2003) Nucleic Acids Res. 31(1): 307-10; Lefranc M.P. et al., (2005) Dev. Comp. Immunol. 29(3): 185-203; Kaas Q. et al., (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64). Все гипервариабельные участки (CDR), обсуждаемые в настоящем изобретении, предпочтительно отвечают определению согласно IMGT®. Остатки вариабельных доменов для каждого из указанных CDR следующие (нумерация в соответствии с Kabat E.A., et al. выше): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 и HCDR3: 93-102. Термин "отличная от CDR область" области VL в настоящей заявке включает последовательности аминокислот 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3) и 98-приблизительно 107 (FR4). Термин "отличная от CDR область" области VH в настоящей заявке включает последовательности аминокислот 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3) и 103-приблизительно 113 (FR4).

CDR согласно настоящему изобретению могут включать "полные CDR", которые основаны на упоминаемых выше определениях и содержат следующие остатки вариабельных доменов: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Указанные полные CDR нумеруются также в соответствии с Kabat et al. выше. Термин "неполная область CDR" области VL в настоящей заявке включает последовательности аминокислот 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) и 98-приблизительно 107 (FR4). Термин "неполная область CDR" области VH в настоящей заявке включает

последовательности аминокислот 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3) и 103-приблизительно 113 (FR4).

В настоящей заявке термин "полноразмерное антитело" включает структуру, которая образует природную биологическую форму антитела, включая переменные и константные области. Например, у большинства млекопитающих, включая человека и мышь, полноразмерное антитело класса IgG представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулинов, в каждой паре есть одна легкая и одна тяжелая цепь, причем каждая легкая цепь содержит домены иммуноглобулина VL и CL, а каждая тяжелая цепь содержит домены иммуноглобулина VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2) и CH3 (C γ 3). У некоторых млекопитающих, например у верблюдов и лам, антитела класса IgG могут состоять только из двух тяжелых цепей, причем каждая тяжелая цепь содержит переменный домен, присоединенный к области Fc.

Фрагменты антител включают без ограничений (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, включая Fab' и Fab'-SH; (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одиночного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward E.S. et al., (1989) *Nature*, 341: 544-546), который состоит из одного переменного домена; (v) фрагменты F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab; (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет соединяться двум доменам и образовывать антигенсвязывающий сайт (Bird R.E. et al., (1988) *Science* 242: 423-426; Huston J.S. et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83); (vii) биспецифические одноцепочечные димеры Fv (PCT/US 92/09965); (viii) "диатела" или "триотела", поливалентные или мультиспецифические фрагменты, образованные посредством слияния генов (Tomlinson I. & Hollinger P. (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; WO 94/13804; Holliger P. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48) и (ix) scFv, генетически присоединенные к такому же или другому антителу (Coloma M.J. & Morrison S.L. (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

В настоящей заявке термин "эффекторная функция" включает биохимическое событие, которое возникает вследствие взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают Fc γ R-опосредуемые эффекторные функции, такие как ADCC (антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность) и ADPC (антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз), а также комплемент-опосредуемые эффекторные функции, такие как CDC (комплементзависимая цитотоксичность). Эффекторную функцию антитела можно изменять путем изменения, т.е. усиления или снижения, предпочтительно усиления, сродства антитела к молекуле-эффектору, такой как Fc-рецептор или компонент комплемента. Сродство связывания, как правило, можно варьировать за счет модификации связывающего сайта молекулы, и в данном случае целесообразно определять локализацию рассматриваемого сайта и модифицировать по меньшей мере часть указанного сайта подходящим способом. Также представляется, что изменение в сайте связывания антитела для молекулы-эффектора не обязательно значительно изменяет общее сродство связывания, но может изменять геометрию взаимодействия, приводя к неэффективности эффекторного механизма, как при непродуктивном связывании. Кроме того, представляется, что эффекторную функцию можно изменить путем модификации сайта, непосредственно не участвующего в связывании молекулы-эффектора, но участвующего другим образом в реализации эффекторной функции. Путем изменения эффекторной функции возможно контролировать разные аспекты иммунного ответа, например усиливать или угнетать разные реакции иммунной системы, с возможными полезными эффектами при диагностике или терапии.

В настоящей заявке термин "расстройство, опосредованное OX40" включает патологические состояния, такие как аллергия, астма, ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких), ревматоидный артрит, псориаз и заболевания, ассоциированные с аутоиммунитетом и воспалением.

В настоящей заявке термин "субъект" включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин "животное, отличное от человека" включает всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как нечеловекообразные обезьяны, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и др. Предпочтительно субъектом является человек.

Антитела против OX40.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, которые содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и/или, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат полный CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13, протяженный CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14; и/или протяженный CDR3 тяжелой цепи, содержащий по-

последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 15; и/или содержат полный CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 16, и/или полный CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 17, и/или полный CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 18.

Предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6. Более предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6.

В технике хорошо известно, что домен CDR3, независимо от доменов CDR1 и/или CDR2, один может определять специфичность связывания антитела в отношении родственного антигена, и что можно предсказуемо генерировать множество антител, обладающих одинаковой специфичностью связывания на основе общей последовательности CDR3. См., например, Klimka A. et al., (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (описано получение гуманизированного анти-CD30 антитела с применением только вариабельного домена тяжелой цепи CDR3 из мышиного анти-CD30 антитела Ki-4); Beiboer S.H. et al., (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (описаны рекомбинантные антитела к эпителиальному гликопротеину-2 (EGP-2), полученные с применением только последовательности CDR3 тяжелой цепи из исходного мышиного анти-EGP-2 антитела MOC-31); Rader C. et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (описана панель гуманизированных антител к интегринам $\alpha\beta 3$, полученных с применением вариабельного домена CDR3 тяжелой и легкой цепи мышиного антитела к интегринам $\alpha\beta 3$ LM609, причем каждый член панели антител содержит отличную последовательность вне домена CDR3 и способен связываться с тем же эпитопом, что и исходное мышиное антитело со сродством, таким же или выше, чем сродство у исходного мышиного антитела); Barbas C. et al., (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (описано, что домен CDR3 вносит наиболее значимый вклад в связывание антигена).

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены антитела и их фрагменты, которые связываются с OX40 человека и содержат один или более доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи, в частности, содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3; и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6, причем указанное антитело способно связываться с OX40 человека. В рамках некоторых вариантов реализации предложенные в соответствии с настоящим изобретением антитела, содержащие один или более доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела, не происходящего от человека, (a) способны конкурировать за связывание; (b) сохраняют функциональные характеристики; (c) способны связываться с тем же эпитопом; и/или (d) обладают таким же сродством связывания, как и исходное не происходящее от человека, например мышиное антитело.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело и его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 8.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены варианты антагонистичного антитела или его фрагмента, которые связываются с OX40 человека. Так, согласно настоящему изобретению предложены антитела или их фрагменты, которые обладают последовательностью аминокислот областей, отличных от CDR, вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична (обладает идентичностью по последовательности аминокислот по меньшей мере на 80%) последовательности аминокислот областей, отличных от CDR, вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи исходного антагонистичного антитела для любой последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепи, например любой из последовательностей вариабельной области тяжелой или легкой цепи, таких как в SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 соответственно. Также согласно настоящему

изобретению предложены антитела или их фрагменты, которые обладают последовательностью аминокислот неполных областей CDR варибельной области тяжелой и/или легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности аминокислот неполных CDR областей варибельной области тяжелой и/или легкой цепи исходного антагонистичного антитела для тяжелой или легкой цепи. Предпочтительно идентичность последовательностей аминокислот для областей, отличных от CDR, или неполных CDR варибельной области тяжелой и/или легкой цепи составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, в особенности 96%, более конкретно 97% и даже более конкретно 98%, наиболее конкретно 99%, включая, например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100%. В настоящей заявке под идентичностью или гомологией применительно к последовательности аминокислот понимают процент остатков аминокислот в представляющей интерес последовательности, которые идентичны остаткам в антагонистичном антителе или его фрагменте, связывающемся с OX40 человека, после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения пропусков для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Таким образом, идентичность последовательностей можно определять стандартными способами, которые обычно применяют для сравнения сходства в положениях аминокислот в двух полипептидах. При помощи компьютерной программы, такой как BLAST или FASTA, два полипептида выравнивают для оптимального соответствия их соответствующих аминокислот (либо по полной длине одной, либо по обоим последовательностям, либо по заранее определенной части одной или обеих последовательностей). Программы выдают штраф за раскрытие по умолчанию и штраф за пропуск в последовательности по умолчанию, и в сочетании с указанной компьютерной программой можно применять матрицу замен, такую как PAM250 (стандартная матрица замен; см. Dayhoff M.O. et al., (1978) в Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3). Например, процент идентичности можно рассчитать так: общее количество идентичных пар, умноженное на 100, а затем разделенное на сумму длины более длинной последовательности в совпавших промежутках и количествах пропусков, введенных в более длинные последовательности с целью выравнивания двух последовательностей.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержат последовательность каркасной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности каркасной области SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 или 23, последовательность каркасной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 60% идентична последовательности каркасной области SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 и 28. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержат последовательность каркасной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 74% идентична последовательности каркасной области SEQ ID NO: 19, и/или последовательность каркасной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 65% идентична последовательности каркасной области SEQ ID NO: 24.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR тяжелой или легкой цепи, которые описаны выше, а также содержат каркасный участок варибельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) и IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), предпочтительно каркасный участок варибельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19). Указанный каркасный участок варибельной области тяжелой цепи может содержать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательностей каркасных участков варибельной области тяжелой цепи (например, каркасный участок 1 (FW1), каркасный участок 2 (FW2), каркасный участок 3 (FW3) и/или каркасный участок 4 (FW4)), присутствующие в продукте или полученные из указанных генов человека. Предпочтительно указанный каркасный участок варибельной области тяжелой цепи содержит FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3, присутствующие в продукте или полученные из генов человека, выбранного из группы, состоящей из IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) и IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23). В настоящей заявке последовательности каркасных участков варибельных областей включают FW1 (положения с 1 по 25), FW2 (положения с 36 по 49), FW3 (положения с 66 по 94) и FW4 (положения с 103 по 113), причем положение аминокислоты указывается в соответствии с системой нумерации, установленной Кабатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок варибельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGHV2-70*10 (SEQ ID NO: 19), и причем указанный каркасный участок варибельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком варибельной области тяжелой цепи соответствующего мышиного антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его

фрагмент, содержащие последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 32, причем указанный каркасный участок вариательной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариательной области тяжелой цепи соответствующего мышинового антитела.

Предпочтительно модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, более предпочтительно замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 50, 60 и 62, более предпочтительно замену аминокислоты в положении 35b, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Конкретно, указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N и 62A, предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из T23S, S35bG, I48L, R50H, S60N и S62A, и наиболее предпочтительной заменой является S35bG, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат каркасный участок вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), предпочтительно каркасный участок вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24). Указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи может содержать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательностей каркасных участков вариательной области легкой цепи (например, каркасный участок 1 (FW1), каркасный участок 2 (FW2), каркасный участок 3 (FW3) и/или каркасный участок 4 (FW4)), присутствующие в продукте или полученные из указанных генов человека. Предпочтительно указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3, присутствующие в продукте или полученные из генов человека, выбранных из группы, состоящей из V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28). В настоящей заявке последовательности каркасных участков вариательных областей легкой цепи включают FW1 (положения с 1 по 23), FW2 (положения с 35 по 49), FW3 (положения с 57 по 88) и FW4 (положения с 98 по 108), причем положение аминокислоты указывается в соответствии с системой нумерации, установленной Кабатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, содержащие каркасный участок вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24), причем указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариательной области легкой цепи соответствующего мышинового антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, содержащие последовательность аминокислот легкой цепи согласно SEQ ID NO: 32, причем каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариательной области легкой цепи соответствующего мышинового антитела.

Предпочтительно модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 и/или делеции аминокислоты в положении 31, более предпочтительно замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 и/или делеции аминокислоты в положении 31, наиболее предпочтительно замену аминокислоты в положении 46 и/или 47, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Конкретно, указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, и/или а делеции в T31, предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, более предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 33M, 34H, 46P, 47W и 71Y, и наиболее предпочтительной заменой является 46P, 47W, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат каркасный участок вариательной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), V2-70*01 (SEQ ID NO: 20), V2-70*13 (SEQ ID NO: 21), V2-5*09 (SEQ ID NO: 22) и V2-70*11 (SEQ ID NO: 23), и каркасный участок вариательной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из V3-11*01 (SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28), предпочтительно каркасный участок вариательной области тяжелой

цепи, которая является продуктом или получена из гена человека V2-70*10 (SEQ ID NO: 19), и каркасный участок варибельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека V3-11*01 (SEQ ID NO: 24). Также настоящее изобретение включает комбинации каркасных участков варибельной области тяжелой цепи, которые присутствуют в продукте или получены из генов человека, упоминаемых выше, и/или каркасных участков варибельной области легкой цепи, которые присутствуют в продукте или получены из генов человека, упоминаемых выше.

Последовательности ДНК эмбрионального типа для генов тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных последовательностей человека эмбрионального типа "VBase" (доступна в интернете на сайте www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat E.A. et al. выше; Tomlinson I.M. et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798 and Cox JPL. et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24:827-836. В качестве другого примера последовательности ДНК эмбрионального типа для генов варибельных областей тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных Genbank.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, в котором по меньшей мере один из CDR тяжелой цепи и/или один из CDR легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты. Модификации можно ввести при помощи сайт-направленного мутагенеза и ПЦР-опосредуемого мутагенеза, а действие на связывание антитела или другие рассматриваемые функциональные свойства можно оценивать при помощи проб *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Модификация(и) может включать замены, добавления или делеции аминокислот, но предпочтительны замены. Обычно в одном участке CDR проводят не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты.

Согласно определенным вариантам реализации для получения альтернативного антитела при конструировании варибельных областей можно применять последовательности каркасных областей. Альтернативные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела, в которых в остатках каркасной области в VH и/или VK были сделаны модификации, например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие модификации в каркасные области вносят, чтобы уменьшить иммуногенность антитела. Например, один подход состоит в "мутировании к первоначальному виду" одного или более остатков в каркасной области с возвратом к соответствующей последовательности мыши или в "мутировании к первоначальному виду" одного или более остатков в каркасной области с возвратом к соответствующей последовательности эмбрионального типа.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, в которых по меньшей мере одна из последовательностей каркасных участков варибельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела или его фрагмента содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком варибельной области тяжелой цепи соответствующего мышинного антитела. Предпочтительно указанной модификацией аминокислоты является замена аминокислоты. Обычно в каркасной области проводят не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, причем указанная модификация аминокислоты в каркасных участках варибельной области тяжелой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Предпочтительно замена аминокислоты в каркасных участках варибельной области тяжелой цепи охватывают положения аминокислот, выбранные из группы, состоящей из 23, 35b, 50, 60 и 62. Более предпочтительно замены аминокислот в каркасных участках варибельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50N, 60N и 62A, наиболее предпочтительной заменой в каркасных участках варибельной области тяжелой цепи является 35bG.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, причем по меньшей мере одна из последовательностей каркасных участков варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела или его фрагмента содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком варибельной области легкой цепи соответствующего мышинного антитела. Предпочтительно указанной модификацией аминокислоты является замена и/или делеция аминокислоты. Обычно в каркасном участке проводят не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены гуманизированное антитело или его фрагмент, причем указанная модификация аминокислоты в каркасных участках варибельной области легкой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71, и/или де-

лецию аминокислоты в положении 31. Более предпочтительные модификации аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи включают делецию в Y31 и/или замену, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Наиболее предпочтительные модификации аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи включают делецию в Y31 и/или замену, выбранную из группы, состоящей из 33M, 34H, 46P, 47W и 71Y, особенно предпочтительны замены 46P и/или L47W. Согласно некоторым вариантам реализации указанное гуманизованное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению могут содержать модификации аминокислот в каркасных участках вариабельной области легкой цепи, которые указаны выше, и модификации аминокислот в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи, которые указаны выше.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58, 59, 79 и 80, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58 и 59. Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и которые содержат вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, и 89, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60, 86, 87 и 89, более предпочтительно SEQ ID NO: 60. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 и 89. При условии, что каждая из указанных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи могут связываться с OX40 человека, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи можно "объединять и комбинировать" для получения анти-OX40-связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Связывание с OX40 таких "объединённых и комбинированных" анти-тел можно оценивать при помощи анализа связывания, например, описанного в примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58 и 59, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60 и 89. Согласно более предпочтительным вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 60, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 89, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 89, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 60, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 59, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 89. Наиболее предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 58 и 59, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 60.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37 и 38, и более предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и 38.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 46, 47 и 49, более предпочтительно SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38, и последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49. При условии, что каждая из указанных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи может связываться с OX40 человека, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи можно "объединять и

комбинировать" для получения анти-OX40-связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Связывание с OX40 таких "объединенных и комбинированных" антител можно оценивать при помощи анализа связывания, например, описанного в примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и 38, и содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47 и 49. Согласно более предпочтительным вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 37, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 47, последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 37, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 49, последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 47, или последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 49. Наиболее предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37 и 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID NO: 47.

Согласно одному варианту настоящего изобретения указанное антагонистичное антитело или его фрагмент является мышинным антителом, химерным антителом или гуманизированным антителом, предпочтительно гуманизированным антителом, более предпочтительно моноклональным антителом, моноклональным химерным антителом или моноклональным гуманизированным антителом.

Также согласно настоящему изобретению предложены одновалентное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, т.е. антитело, которое содержит один антигенсвязывающий фрагмент. Также согласно настоящему изобретению предложен фрагмент антитела, который связывается с OX40 человека, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, биспецифических одноцепочечных димеров Fv, диател, триател и фрагментов scFv, образованных посредством слияния генов одинаковых или разных антител. Предпочтительными фрагментами являются scFv, биспецифические одноцепочечные димеры Fv и диатела. Также согласно настоящему изобретению предложено полноразмерное антитело, которое связывается с OX40 человека.

Также согласно настоящему изобретению предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые дополнительно содержат константную область тяжелой и/или легкой цепи, в частности константную область тяжелой и/или легкой цепи человека. Константные области тяжелой цепи человека можно выбирать из группы областей иммуноглобулинов человека, включая IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) или IgE (IGHE), предпочтительна константная область IgG, в частности, IgG1 (IGHG1). Константные области легкой цепи человека можно выбирать из группы областей иммуноглобулинов человека, включая константные области каппа или лямбда, предпочтительна константная область каппа. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 (IGHG1) человека и константный домен легкой цепи каппа человека.

В дополнение к или в качестве альтернативы модификациям, вносимым в каркасные области или участки CDR, можно сконструировать антитела согласно настоящему изобретению, которые будут включать модификации в области Fc, обычно, с целью изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полураспада в сыворотке, связывание комплемента, связывание с рецептором Fc и/или антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению можно модифицировать химическим путем (например, к антителу можно присоединить одну или более химических групп) или модифицировать так, чтобы изменилось его гликозилирование. Каждый из указанных вариантов реализации описан более подробно ниже. Модификации в области Fc, которые описаны ниже, соответствуют нумерации остатков ЕС в области Fc. Согласно одному варианту реализации шарнирную область CH1 модифицируют так, чтобы изменилось количество остатков цистеина в шарнирной области, например, чтобы оно уменьшилось или увеличилось. Данный подход описан дополнительно в патенте США № 5677425, выданном Bodmer et al. Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, чтобы облегчить сборку легких и тяжелых цепей или чтобы повысить или понизить стабильность антитела. Согласно другому варианту реализации шарнирную область Fc антитела подвергают мутации, чтобы снизить биологический период полураспада указанного антитела. Более конкретно вводят одну или более мутаций аминокислот в поверхностную область домена CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнира, чтобы антитело обладало сниженным связыванием белка А стафилококка (SpA) по сравнению со связыванием с SpA нативного домена Fc-шарнира.

Данный подход описан более подробно в патенте США № 6165745, выданном Ward et al. Согласно другому варианту реализации антитело модифицируют так, чтобы увеличить биологический период полураспада. Возможны разные подходы. Например, можно ввести одну или более из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, выданном Ward et al. В качестве альтернативы для увеличения биологического периода полураспада антитело можно изменить в пределах области CH1 или CL, чтобы они содержали эпитоп для связывания с рецептором "реутилизации", взятым из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022, выданных Presta et al. Согласно дополнительному варианту реализации область Fc изменяют путем замены по меньшей мере одного остатка аминокислоты другим остатком аминокислоты, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 можно заменить остатками других аминокислот так, чтобы антитело приобрело измененное сродство в отношении лиганда-эффектора, но сохранило способность к связыванию антигена, характерную для исходного антитела. Лиганд-эффектор, в отношении которого изменяется сродство, может быть, например, рецептором Fc или C1-компонентом комплемента. Данный подход описан более подробно в патентах США № 5624821 и 5648260, оба из которых выданы Winter et al. Согласно другому примеру одну или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот в положениях 329, 331 и 322, можно заменить остатком другой аминокислоты так, чтобы антитело обладало измененным связыванием C1q и/или сниженной или упраздненной комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC). Данный подход описан более подробно в патенте США № 6194551, выданном Idusogie et al. Согласно другому примеру одну или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот в положениях 231-238 на N-конце домена CH2, изменяют, тем самым изменяя способность указанного антитела к фиксации комплемента. Данный подход описан более подробно в публикации PCT WO 94/29351 авторов Bodmer et al. Согласно еще одному примеру область Fc модифицируют, повышая способность антитела к опосредованию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или повышая сродство антитела к рецептору Fcγ путем модификации одной или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Данный подход описан более подробно в публикации PCT WO 00/42072 автора Presta.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи человека, причем указанная константная область тяжелой цепи человека содержит изотипический вариант, содержащий область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3 из IgG4 (IGHG4) человека, и при этом указанная шарнирная область содержит замену серина в положении 228 на пролин. Предпочтительно указанное гуманизованное антитело, содержащее изотипический вариант, является полноразмерным антителом. Особо предпочтительные гуманизованное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, включают изотипический вариант, содержащий CH1 из IgG4 (IGHG4) человека, шарнирную область IgG4 (IGHG4) человека, содержащее замену S228P, а также CH2 и CH3 из IgG4 (IGHG4) человека, содержат последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 57, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 47. Было показано, что указанный изотипический вариант не проявляет механизмов Fc-опосредованной цитотоксичности, таких как ADCC, по сравнению с антагонистичным антителом или его фрагментом, которое связывается с OX40 человека и которое содержит константную область тяжелой цепи из IgG1 (IGHG1) человека (которое обычно является нативным IgG1 человека), т.е. по сравнению с антагонистичным антителом или его фрагментом, которое связывается с OX40 человека, и которое отличается от изотипического варианта только модифицированной константной областью тяжелой цепи.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат Fc область IgG человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG человека не содержит фукозы (альтернативно обозначается в настоящей заявке "не фукозилированная"). Предпочтительно указанное антитело содержит Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы. Более предпочтительно полноразмерное антитело, содержащее Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы. Из заявки WO 03/035835 известно, что отсутствие фукозы в зрелой углеводной структуре, присоединенной к Fc области IgG человека, может приводить к повышению ADCC. Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению содержат Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы, тогда как антитело, лишенное фукозы, проявляет повышенную ADCC по сравнению с исходным гуманизованным антителом или его фрагментом, которые не лишены фукозы. Способы получения антител, лишенных фукозы, включают, например, (а) применение сконструирован-

ных мутантных клеток-хозяев, которые дефицитны по метаболизму фукозы, такие, которые обладают сниженной способностью (или отсутствием способности) к фукозилрованию белков, экспрессируемых ими; (b) культивирование клеток в условиях, которые препятствуют фукозилрованию или уменьшают его; (c) посттрансляционное удаление фукозы (например, при помощи фермента фукозидазы); (d) посттрансляционное добавление желаемого углевода, например, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопротеина; или (e) очищение гликопротеина таким образом, чтобы отобрать продукт, который не гликозилирован. Предпочтительно применяют способы, описанные в примере 14 WO 10/095031 например способы, описанные у Longmore et al., (1982) Carbohydr. Res. 365-92 или у Imai-Nishiya et al., (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8. Также согласно настоящему изобретению предложена специфическая область или эпитоп OX40 человека, в частности внеклеточный домен рецептора OX40 человека, который связывается антителом, предложенным в настоящем изобретении, в частности антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8. Указанная специфическая область или эпитоп полипептида OX40 человека можно идентифицировать при помощи любого подходящего способа картирования эпитопов, известного в технике, в сочетании с любым одним из антител, предложенных согласно настоящему изобретению. Примеры таких способов включают скрининг пептидов разной длины, полученных из OX40, на связывание с антителом согласно настоящему изобретению, причем наименьший фрагмент, который может специфически связываться с антителом, содержит последовательность эпитопа, распознаваемого указанным антителом. Пептиды OX40 можно получать путем синтеза или протеолитического расщепления полипептида OX40. Пептиды, которые связываются с указанным антителом, можно идентифицировать, например, посредством масс-спектрометрического анализа. Согласно другому примеру для идентификации эпитопа, связываемого антителом согласно настоящему изобретению, можно применять ЯМР-спектроскопию или рентгеновскую кристаллографию. После идентификации фрагмент-эпитоп, который связывается с антителом согласно настоящему изобретению, можно применять, например, в качестве иммуногена для получения дополнительных антагонистичных антител, которые связываются с тем же эпитопом.

Свойства анти-OX40 антител.

В технике известны стандартные пробы для оценки связывающей способности, например, в отношении OX40 человека, включая ELISA, BIAcore®, Вестерн-блот, РИА (радиоиммунный анализ) и проточную цитометрию. Подходящие пробы описаны более подробно в разделе "Примеры". Кинетику связывания (например, сродство связывания, например K_D) антител также можно оценить при помощи стандартных проб, известных в технике, таких как системы анализа Scatchard или BIAcore®. Относительно сродство связывания K_i можно оценить при помощи стандартного конкурентного анализа, известного в технике.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или его фрагменты, которые связываются с OX40 человека и которые блокируют реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR) в зависимости от дозы, в большей степени, чем рекомбинантное гуманизированное антитело эфализумаб. Рекомбинантное гуманизированное антитело эфализумаб связывается с субъединицей CD11a антигена 1, ассоциированного с функцией лимфоцитов. MLR можно проводить и измерять в соответствии с примером 3.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или его фрагменты, которые связываются с OX40 человека и которые также способны распознавать OX40 яванского макака. Связывание антагонистичного анти-OX40 антитела с моноклеарными клетками периферической крови (РВМС) и человека, и яванского макака можно проводить и измерять в соответствии с примером 4 и как показано на фиг. 3. Было показано, что указанное антитело распознает OX40, экспрессируемый на поверхности активированных лимфоцитов человека и яванского макака, что указывает на то, что указанное антитело обладает свойством перекрестной реактивности.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека, в частности с OX40 человека в изолированной форме, со сродством (K_D) 500 нМ или менее, предпочтительно 200 нМ или менее, более предпочтительно 150 нМ или менее, более предпочтительно 120 нМ или менее и даже более предпочтительно 110 нМ или менее, измеренным, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIAcore® ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария), за счет захвата антитела белком-А, соединенным с сенсорным чипом исследовательского класса CM5 ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария; BR-1000-14) с внеклеточным доменом рекомбинантного одновалентного рецептора OX40 человека (SEQ ID NO: 11), применяемым в качестве определяемого вещества, как

подробно описано в примерах 5 и 6 и проиллюстрировано на фиг. 4. В настоящей заявке термин "моновалентный" применительно к измерению сродства с применением рецептора OX40 относится к домену рецептора OX40 человека, такому как внеклеточный домен, не димеризованному или мультимеризованному искусственно, как это могло бы быть, например, если указанный домен на N-конце был соединен с Fc-участком иммуноглобулина. Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое сохраняет по меньшей мере 75% от сродства связывания (K_D) с OX40, присущего соответствующему химерному антителу. Предпочтительно, указанное гуманизированное антитело или его фрагмент связывается с OX40 человека со сродством, равным сродству соответствующего химерного антитела. Под "равным сродством" понимают значение сродства, которое попадает в диапазон $\pm 10\%$ от сродства связывания с OX40 соответствующего химерного антитела. Более предпочтительно согласно настоящему изобретению предложены гуманизированное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека с более высоким сродством, чем соответствующее химерное антитело. Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека и обладают сродством связывания (K_D) 110 нМ или менее, предпочтительно 100 нМ или менее, более предпочтительно 90 нМ или менее, более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более предпочтительно 70 нМ или менее, измеренным, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIAcore® ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария), за счет захвата антитела белком-A, соединенным с сенсорным чипом исследовательского класса CM5 ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария; BR-1000-14) с внеклеточным доменом рекомбинантного одновалентного рецептора OX40 человека (SEQ ID NO: 11), применяемым в качестве определяемого вещества, как подробно описано в примерах 5 и 6 и проиллюстрировано на фиг. 4.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека и которые обладают высокой термостабильностью. Согласно предпочтительному варианту реализации антагонистичное гуманизированное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, обладают термостабильностью фрагмента FAB выше 70°C, предпочтительно выше чем 75°C, более предпочтительно выше чем 80°C и даже более предпочтительно выше чем 85°C. Для анализа термостабильности фрагмента FAB применяют дифференциальную сканирующую калориметрию, поскольку определяют среднюю температуру плавления фрагмента FAB в контексте полноразмерного IgG. Данный вид калориметрических измерений известен специалистам в данной области техники и может проводиться, например, в соответствии с Garber & Demarest (2007), BBRC, 355: 751-7, как более подробно описано в примере 6 и показано на фиг. 6.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения описаны антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с эпитопом внеклеточной области OX40 человека. Как описано в примере 7, был осуществлен обмен одного или более доменов внеклеточной области OX40 между последовательностями человека и крысы и были сгенерированы гибридные белки Fc. Затем проводили ELISA по оценке связывания с целью определения активности антагонистичного гуманизированного антитела в отношении внеклеточной области OX40 человека, внеклеточной области OX40 крысы и четырех химерных белков из последовательностей человека и крысы. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые согласно данным картирования соответствуют второму домену внеклеточной области OX40 человека. Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые можно применять для подавления иммунных реакций. Действие антагонистичных гуманизированных анти-OX40 антител оценивали в MLR (см. пример 8), применяемой в качестве модели аллореактивной активации и пролиферации Т-лимфоцитов *in vitro* (O'Flaherty E. et al., (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B. & Hansen J.A. (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). PBMC от двух неродственных доноров смешивали, что приводило к активации и пролиферации Т-лимфоцитов. Кроме того, в данной пробе оценивали три разных формы антагонистичных гуманизированных анти-OX40 антител: форма IgG1 (IGHG1), не фукозилированная форма IgG1 (IGHG1) и форма IgG4 (IGHG4), чтобы дополнительно определить вклад механизмов цитотоксичности, таких как ADCC, в MLR. Указанные антагонистичные гуманизированные анти-OX40 антитела эффективно подавляли MLR у двух разных индивидуумов (субъектов, отвечающих на лечение) с ЭК₅₀ приблизительно 100 нг/мл. Однако результаты показали различие, зависящее от формы применяемого антитела. У первого индивидуума (субъект 1, отвечающий на лечение) реактивность Т-лимфоцитов эффективно подавлялась антителами в форме IgG1 (IGHG1) и IgG4 (IGHG4), что указывает на то, что механизмы цитотоксичности не важны для данного индивидуума. У второго индивидуума (субъект 2, отвечающий на лечение) форма IgG1 (IGHG1) продемонстрировала более 60% подавления, а форма IgG4 (IGHG4) лишь слабо блокировала MLR. У обоих индивидуумов не фукозилированная форма IgG1 (IGHG1) обладала высокой эффективностью в подавлении MLR. Данные результаты показывают, что активация блокирования OX40 может быть достаточной у некоторых индивидуумов для того, чтобы подавлять MLR, но данное действие можно существенно усилить посредством дополнительных механизмов цитотоксичности. Следовательно, для лечения пациентов, страдающих расстройствами, обуслов-

ленными ОХ40, когда указанное расстройство, по-видимому, не зависит от ко-стимулирующего статуса ОХ40 пациента, например у пациентов с низким уровнем экспрессии ОХ40, введение антагонистичного антитела или его фрагмента, которое связывается с ОХ40 человека и которое усиливает механизмы цитотоксичности, может быть особенно эффективным. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с ОХ40 человека, для лечения пациента, страдающего расстройством, обусловленным ОХ40. Кроме того, у пациента может быть низкий уровень экспрессии ОХ40. Предпочтительно указанное антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с ОХ40 человека, содержит область IgG1 (IGHG1). Более предпочтительно указанное антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с ОХ40 человека, содержит не фукозилированную область IgG1.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения действие антагонистичного антитела или его фрагмента было продемонстрировано в реакции "аллогенный трансплантат против хозяина", при которой создавали мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) при помощи PBMC человека. Данная реакция представляет собой модель реакции "аллогенный трансплантат против хозяина" (GVHD), наблюдаемой после пересадки костного мозга у людей. В данной модели PBMC человека, и Т-лимфоциты в частности, запускают сильную реакцию против клеток-хозяев мыши, что приводит к тяжелым симптомам воспаления. Как описано в примере 9 и показано на фиг. 9 и в табл. 10, антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с ОХ40 человека, сильно подавляет реакцию GVHD в дозе 1 мг/кг. Неожиданно, что данное антитело продемонстрировало более высокую эффективность, чем Энбрел®, признанное средство от GVHD (Xhaard A. et al., (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D. (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7):1109-17). Следовательно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека и которое эффективно при лечении GVHD. Предпочтительно, введение указанного антитела субъекту приводит к четырехкратному повышению средней выживаемости (в днях) по сравнению с введением основы. Более предпочтительно, введение указанного антитела субъекту приводит к двукратному повышению средней выживаемости (в днях) по сравнению с введением Энбрел®. Следовательно, согласно настоящему изобретению предложено антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека, которое более эффективно, чем Энбрел®, при лечении пациента с GVHD и/или при подавлении GVHD. Кроме того, сообщалось, что агонистичные анти-ОХ40-связывающие антитела усугубляют GVHD в моделях аллогенной GVHD у мышей (Valzasina B. et al., (2005) Blood, 105(7):2845-51; Blazar B.R. et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), следовательно, из примера 9 можно заключить, что антагонистичные антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению не демонстрируют агонистичных эффектов в отношении связывания ОХ40 человека, поскольку в данной модели не наблюдалось усугубления GVHD. Следовательно, согласно настоящему изобретению предложено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека и которое не демонстрирует агонистичной активности в отношении связывания.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Также согласно настоящему изобретению предложены изолированные/выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела и их фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека, векторы и клетки-хозяева, содержащие указанную нуклеиновую кислоту или вектор. Указанные нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в лизате клеток, в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является "изолированной/выделенной" или "рассатривается по существу чистой", когда она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других нуклеиновых кислот или белков клетки, при помощи стандартных технологий, включая обработку щелочью/SDS (додецилсульфат натрия), бэндинг CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез на агарозном геле и другие хорошо известные в технике способы, например, см. F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновыми кислотами согласно настоящему изобретению могут быть, например, ДНК или РНК, и они могут содержать или не содержать интронных последовательностей. Согласно предпочтительному варианту реализации нуклеиновой кислотой является молекула кДНК.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно получать при помощи стандартных молекулярно-биологических технологий, например, кДНК, кодирующую легкие и тяжелые цепи указанного антитела или кодирующую сегменты VH и VL, можно получить посредством стандартной ПНР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с применением технологий фагового отображения), одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, можно извлечь из указанной библиотеки. Способы введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева хорошо известны в технике и могут варьировать в зависимости от применяемой клетки-хозяина. Технологии включают без ограничений опосредуемую декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, обработку хлоридом кальция, опосредуемую полиэтиленмином трансфекцию, опосредуемую полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инфицирование вирусом или фагом, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъек-

цию ДНК в ядра клеток. В случае клеток млекопитающих трансфекция может быть временной или стабильной.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению - это молекулы, кодирующие последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38, и/или последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49. Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению - это молекулы, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, и/или вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 и 89.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению - это молекулы, кодирующие вариабельную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 8, и/или вариабельную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 7, например ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 9, и/или ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 10. Более предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению являются молекулы, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 58 или 59, и/или вариабельную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 60, например ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 61 или 62, и/или ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 63, которые являются наиболее предпочтительными.

После того как получены фрагменты ДНК, кодирующие сегменты VH и VL, с указанными фрагментами ДНК можно проводить дальнейшие манипуляции при помощи стандартных технологий рекомбинантных ДНК, например превращать гены вариабельных областей в гены цепей полноразмерного антитела или в гены фрагментов, соответствующих фрагментам, описанным выше, таким как гены фрагментов Fab или ген scFv. В ходе указанных манипуляций фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Подразумевается, что в данном контексте термин "функционально связанный" должен означать, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что последовательности аминокислот, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки. Изолированную ДНК, кодирующую область VH, можно превратить в ген полноразмерной тяжелой цепи, функционально связав ДНК, кодирующую VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константных областей тяжелых цепей человека известны в технике (например, см. Kabat E.A. et al. выше), и фрагменты ДНК, охватывающие данные области, можно получить при помощи стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может быть константной областью IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) или IgE (IGHE), но наиболее предпочтительная константная область IgG1 (IGHG1). Для гена фрагмента Fab тяжелой цепи ДНК, кодирующую VH, можно функционально связать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи CH1. Изолированную ДНК, кодирующую область VL, можно превратить в ген полноразмерной легкой цепи (а также в ген Fab легкой цепи), функционально связав ДНК, кодирующую VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области легкой цепи - CL. Последовательности генов константных областей легких цепей человека известны в технике (например, см. Kabat E.A. et al., выше), и фрагменты ДНК, охватывающие данные области, можно получить при помощи стандартной ПЦР-амплификации. Согласно предпочтительным вариантам реализации константной областью легкой цепи может быть константная область каппа или лямбда, предпочтительно константная область каппа. Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующий последовательность аминокислот (Gly4-Ser)₃, так, чтобы последовательности VH и VL можно было экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями VH и VL, соединенными указанным гибким линкером (например, см., Bird R.E. et al., (1988) *Science*, 242: 423-426; Huston J.S. et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-83; McCafferty J. et al., (1990) *Nature*, 348: 552-554). Для получения фрагментов антител были разработаны разные технологии. Традиционно данные фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (например, см., Morimoto K. et al., (1992) *J. Biochem. & Biophysical Methods*, 24: 107-117 and Brennan M. et al., (1985) *Science*, 229: 81-3). Однако указанные фрагменты теперь можно получать напрямую в клетках-хозяевах. Например, указанные фрагменты антител можно выделить из библиотек антител фагов, обсуждаемых выше. В качестве альтернативы фрагменты Fab'-SH можно напрямую восстановить из *E.coli* и химическим путем соединить так, чтобы образовались фрагменты F(ab')₂ (Carter P. et al., (1992) *Bio/Technology*, 10:163-167). Согласно другому подходу фрагменты F(ab')₂ можно выделить напрямую из культуры клеток-хозяев. Специалистам в данной области техники будут очевидны другие технологии для получения фрагментов антител. Согласно другим вариантам реализации антителом выбора является одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), например, см., WO 1993/16185; патенты США №№ 5571894 и 5587458. Указанным фрагментом антитела может быть также "линейное

антитело", например, как описано в патенте США № 5641870.

Нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитела согласно настоящему изобретению, можно включать в вектор, предпочтительно вектор экспрессии, чтобы экспрессировать указанный белок. Для экспрессии белков можно применять разные вектора экспрессии. Вектора экспрессии могут включать самореплицирующиеся внехромосомные векторы или векторы, которые интегрируются в геном хозяина. Вектора экспрессии конструируют так, чтобы они были совместимы с типом клетки-хозяина. Таким образом, векторы, предпочтительно векторы экспрессии, которые находят применение при реализации настоящего изобретения, включают без ограничений векторы, которые способны к экспрессии белков в клетках млекопитающих, бактерий, клетках насекомых, дрожжей и в системах *in vitro*. Как известно в технике, доступны разные векторы экспрессии, в продаже или получаемые другим путем, которые могут находить применение при реализации настоящего изобретения для экспрессии антител. Обычно векторы экспрессии содержат белок, функционально связанный с контролируемыми или регуляторными последовательностями, селективируемыми маркерами, любыми партнерами слияния и/или дополнительными элементами. В настоящей заявке термин "функционально связанный" означает, что нуклеиновая кислота находится в функциональной взаимосвязи с последовательностью другой нуклеиновой кислоты. Подразумевается, что термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигнал полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Как правило, указанные векторы экспрессии включают нуклеиновую кислоту для регуляции транскрипции или трансляции, функционально связанную с нуклеиновой кислотой, кодирующей указанное антитело, и они обычно соответствуют клетке-хозяину, применяемой для экспрессии белка. Как правило, последовательности для регуляции транскрипции или трансляции могут включать последовательности промоторов, сайты связывания рибосом, последовательности инициации и остановки транскрипции, последовательности инициации и остановки трансляции, а также последовательности энхансеров и активаторов. Как также известно в технике, векторы экспрессии обычно содержат ген селекции или маркер, который позволяет проводить отбор трансформированных клеток-хозяев, содержащих указанный вектор экспрессии. Гены селекции хорошо известны в технике и могут варьировать в зависимости от применяемых клеток-хозяев. Например, обычно ген селективируемого маркера придает устойчивость к лекарственным препаратам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клеткам-хозяевам, в которые он был введен. Предпочтительные гены селективируемых маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген нео (для селекции в присутствии G418).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в настоящей заявке, являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Подходящие прокариоты для данной цели включают зубактерии, включая грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы, например Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например E.coli, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa и Streptomyces. Подходящие хозяева для клонирования на основе E.coli включают E.coli 294 (ATCC 31,446), E.coli B, E.coli X1776 (ATCC 31,537) и E.coli W3110 (ATCC 27,325). Помимо прокариот подходящими микроорганизмами-хозяевами для клонирования или экспрессии являются эукариотические микроорганизмы, такие как гифомицеты или дрожжи. Наиболее часто среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев применяются Saccharomyces cerevisiae, или простые пекарские дрожжи. Однако доступен и широко применяется целый ряд других родов, видов и штаммов, такие как хозяева Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces, включая K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. Walth (ATCC 56,500), K. drosopmarum (ATCC 36,906), K. thermotolerans или K. marxianusyarrowia (EP402226); Pichia pastoris (EP183070); Candida; Trichoderma reesia (EP244234); Neurospora crassa; Schwanniomycetes, такие как Schwanniomycetes occidentalis и гифомицеты, включая Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, или хозяева Aspergillus, такие как A. nidulans или A. niger.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител согласно настоящему изобретению получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки *plaril* и насекомых. Был идентифицирован целый ряд штаммов и вариантов бакуловируса и соответствующих допускающих их введение клеток-хозяев насекомых из таких хозяев, как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (фруктовая мушка) и Bombyx mori. Общедоступны разные штаммы вирусов для трансфекции, например L-1 вариант NPV Autographa californica и штамм Bm-5 NPV Bombyx mori, и такие вирусы можно применять, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda. В качестве хозяев можно применять культуры клеток растений хлопка, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, томата и табака.

Клетками-хозяевами для экспрессии рекомбинантных антител согласно настоящему изобретению предпочтительно являются клетки-хозяева млекопитающих, которые включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая dhfr- клетки CHO, описанные у Urlaub G. & Chasin L.A. (1980)

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:4216-4220, применяемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано у Kaufman R.J. & Sharp P.A. (1982) J. Mol. Biol., 159: 601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности для применения с клетками миеломы NSO предпочтительна другая система экспрессии - система экспрессии генов GS, раскрываемая в патентах WO 87/04462 (выданном Wilson), WO 89/01036 (выданном Bebbington) и EP 338841 (выданном Bebbington). Когда в клетки-хозяева млекопитающих вводят гены рекомбинантных антител, указанные антитела вырабатываются культивируемыми клетками-хозяевами в течение периода времени, достаточного для экспрессии указанного антитела в указанной клетке-хозяине, или более предпочтительно, для секреции указанного антитела в питательную среду, в которой растут клетки-хозяева. Клетки-хозяева, применимые при получении антител, которые связываются OX40 человека, можно культивировать в разных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят имеющиеся в продаже среды, такие как Ham's F10 ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария), минимальная питательная среда (MEM; "Sigma-Aldrich Chemie GmbH"), RPMI-1640 ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Базель, Швейцария) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM; "Sigma-Aldrich Chemie GmbH"). Антитела можно выделять из питательной среды при помощи стандартных способов очистки белков.

Антитела можно функционально связывать с партнерами по слиянию, чтобы было возможно направленное движение экспрессируемого белка, его очистка, скрининг, отображение и т.п. Партнеров по слиянию можно присоединять к последовательности антитела линкерными последовательностями. Линкерные последовательности, как правило, содержат небольшое число аминокислот, обычно менее десяти, хотя можно также применять и более длинные линкеры. Обычно линкерные последовательности выбирают так, чтобы они были гибкими и устойчивыми к разрушению. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, в качестве линкеров можно применять любую из широкого спектра последовательностей. Например, обычная линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот GGGGS. Партнер по слиянию может быть направляющей или сигнальной последовательностью, которая направляет антитело и любые ассоциированные партнеры по слиянию в желательную локализацию клетки или во внеклеточную среду. Как известно в технике, определенные сигнальные последовательности могут направлять белок, чтобы он либо секретировался в питательную среду, либо в периплазматическое пространство, расположенное между внутренним и наружным слоем мембраны клетки. Также партнером по слиянию может быть последовательность, которая кодирует пептид или белок, которые создают возможность для очистки или скрининга. Такие партнеры по слиянию включают без ограничений полигистидиновую метку (His-метки) (например, Р6 или Р10, или другие метки для применения в системах аффинной хроматографии с иммобилизованными металлами (IMAC) (например, колонки для аффинной хроматографии с Ni^{+2}), слияния GST, слияния MBP, шаговая метка, направляющая последовательность для биотинилирования BSP бактериального фермента BirA, и метки эпитопов, на которые направлены антитела (например, метки с-тус, метки-флажки и подобные). Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, такие метки могут быть полезны при очистке, скрининге или и при том, и при другом.

Конструирование и получение антител.

Антитела, направленные против полипептида OX40, можно получать путем иммунизации животного, т.е. путем введения указанных полипептидов животному, желательно не человеку, с применением хорошо известных и стандартных протоколов, см., например, Handbook of Experimental Immunology (Weir D.M. (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Можно иммунизировать многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако, как правило, наиболее подходящим объектом являются мыши, кролики, свиньи и крысы, особенно мыши. Антитела можно получать также при помощи технологий рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области техники. Кроме того, антитела можно получать путем ферментативного или химического расщепления существующих в природе антител. Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать путем переноса одного или более CDR или их частей из областей VH и/или VL животного, отличного от человека (например, мыши), в одну или более каркасные области VH и/или VL человека. Необязательно, остатки каркасных областей антитела человека, таким образом присутствующих в областях VH и/или VL, можно заменять соответствующими остатками из нечеловеческого антитела, когда требуется или желательно снизить иммуногенность антитела и/или сохранить сродство связывания. Необязательно, остатки аминокислот из нечеловеческого антитела, присутствующие в CDR, можно заменить остатками аминокислот из антитела человека. Химерные или гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно получить на основе последовательности нечеловеческого моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получить из нечеловеческой гибридомы и сконструировать так, чтобы она содержала последовательности не мышинных (например, человеческих) иммуноглобулинов, при помощи стандартных способов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области антитела мыши можно соединить с константными областями антитела человека с применением способов, известных в технике (например, см. патент США № 4816567, выданный Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела области CDR антитела мы-

ши можно встроить в каркас антитела человека с применением способов, известных в технике (например, см. патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать, причем молекулу-акцептор человека для введения варибельной области тяжелой цепи выбирают на основании рассмотрения гомологии между варибельными областями потенциальной молекулы-акцептора и варибельной областью тяжелой цепи антитела мыши. Предпочтительны кандидаты из числа молекул-акцепторов человека эмбрионального типа, чтобы снизить потенциальную иммуногенность. Создают базы данных последовательностей антител эмбрионального типа, которые просматриваются до конца области FW3 тяжелой цепи и частично в последовательности CDR3. Для выбора области FW4 в базах данных последовательностей зрелых антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа, можно проводить поиск последовательностей антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа из молекул-доноров человека. Молекулы-доноры человека предпочтительно выбирают из тяжелых цепей того же класса, что молекула-донор мыши, и из того же канонического структурного класса, что и молекула-донор мыши. Дополнительные соображения для выбора молекулы-донора человека для получения варибельной области тяжелой цепи включают гомологию по всей длине CDR между молекулой-донором мыши и молекулой-акцептором человека. Молекулы-акцепторы человека предпочтительно выбирают посредством поиска гомологии в базе данных V-BASE, хотя также можно применять другие базы данных, такие как Кабат и общедоступная база NCBI.

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать, причем молекулу-акцептор человека для получения варибельной области легкой цепи выбирают на основании соображений гомологии между варибельными областями потенциальной молекулы-акцептора и варибельной областью легкой цепи антитела мыши. Предпочтительны кандидаты из числа молекул-акцепторов человека эмбрионального типа, чтобы снизить потенциальную иммуногенность. Создают базы данных последовательностей антител эмбрионального типа, которые просматриваются до конца области FW3 тяжелой цепи и частично в последовательности CDR3. Для выбора области FW4 в базах данных последовательностей зрелых антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа, можно проводить поиск последовательностей антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа из молекул-доноров человека. Молекулы-доноры человека предпочтительно выбирают из легких цепей того же класса, что молекула-донор мыши, и из того же канонического структурного класса, что и молекула-донор мыши. Дополнительные соображения для выбора молекулы-донора человека для получения варибельной области легкой цепи включают гомологию по всей длине CDR между молекулой-донором мыши и молекулой-акцептором человека. Молекулы-акцепторы человека предпочтительно выбирают посредством поиска гомологии в базе данных V-BASE, хотя также можно применять другие базы данных, такие как Кабат и общедоступная база NCBI. Способы гуманизации нечеловеческих антител описаны в настоящей заявке, включая пример 6 ниже.

Согласно настоящему изобретению предложен способ получения антагонистического антитела или его фрагмента, которое связывается с OX40 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антагонистическое антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, или вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антагонистическое антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, так что нуклеиновая кислота экспрессируется, и образуется указанное антитело. Предпочтительно указанное антитело является изолированным. В том, что касается клеток-хозяев, нуклеиновых кислот и векторов, можно применять те клетки, нуклеиновые кислоты и векторы, которые были описаны выше. Экспрессии указанных нуклеиновых кислот можно добиться, например, путем сочетания технологий рекомбинантных ДНК и способов трансфекции генов, которые хорошо известны в технике (например, Morrison S. (1985) Science 229: 1202) и также охарактеризованы выше. Например, для экспрессии антител или фрагментов антител можно получить ДНК, кодирующую часть или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, при помощи стандартных молекулярно-биологических технологий (например, ПЦР-амплификация или клонирование кДНК при помощи гибридомы, которая экспрессирует рассматриваемое антитело), и указанную ДНК можно встроить в векторы, такие как векторы экспрессии. Векторы экспрессии и последовательности для контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, применяемой при экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в отдельный вектор, или, что бывает чаще, оба гена встраивают в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в вектор экспрессии при помощи стандартных способов (например, лигирование комплементарных сайтов рестрикции во фрагмент гена антитела и вектор, или лигирование тупых концов, если отсутствуют сайты рестрикции). Варибельные области легких и тяжелых цепей антител, описанных в настоящей заявке, можно применять для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа путем встраивания их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжелых цепей и константные области легких цепей желаемого изотипа, такие как сегмент VH, функционально связанный с сегментом(ами) CH1 в указанном векторе, и сегмент VK, функционально связанный с сегментом CK в указанном векторе.

Описание свойств и очистка анти-ОХ40 человека.

Скрининг антител можно проводить при помощи проб, основанных на измерении связывания с ОХ40 человека, и/или проб, основанных на измерении способности к блокированию связывания ОХ40 с его лигандом, ОХ40L. Примером анализа связывания является ELISA, в частности, с применением гибридного белка ОХ40 человека и Fc человека, который иммобилизован на планшетах, и с применением конъюгированного вторичного антитела для определения анти-ОХ40 антитела, связанного с указанным гибридным белком. Примером анализа блокирования является проточная цитометрия, основанная на пробе, в которой измеряют блокирование связывания гибридного белка-лиганда ОХ40 с ОХ40 на поверхности клеток CD4. Для определения количества связанного с клетками гибридного белка-лиганда ОХ40 применяют вторичное антитело с флуоресцентной меткой. В данной пробе ожидается снижение сигнала, если указанное антитело в надосадочной жидкости блокирует связывание гибридного белка-лиганда с ОХ40. Еще одним примером анализа блокирования является проба, в которой блокирование совместного стимулирования интактных Т-лимфоцитов человека гибридным белком-лигандом ОХ40, нанесенным на планшет, измеряют путем оценки включения тимидина. В качестве пробы для оценки функциональной активности анти-ОХ40 антител, можно применять, например, снижение активации Т-лимфоцитами реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), как описано в примерах 3 и 8. Антитела согласно настоящему изобретению можно изолировать или очищать разными путями, известными специалистам в данной области техники. Стандартные способы очистки включают хроматографические способы, включая обменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, аффинную хроматографию, разделение по размеру или гель-фильтрацию, а также хроматографию с обращенной фазой, проводимые при атмосферном давлении или при высоком давлении с применением таких систем, как жидкостная хроматография быстрого разрешения (ЖХБР) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Способы очистки также включают электрофорез, иммунологические способы, осаждение, диализ и способы хроматофокусирования. Также применимы способы ультрафильтрации и диалитической ультрафильтрации. Для очистки антител к ОХ40 выбранные клетки-хозяева можно выращивать, например, в роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Надосадочную жидкость можно фильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с применением сефарозы-белка А ("Pharmacia", г. Пискатауэй Нью-Джерси). Десорбированные антитела можно проверять посредством гель-фильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы обеспечить чистоту. Таким образом, предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению является изолированным и/или очищенным антителом, которое связывается с ОХ40 человека.

Иммуноконъюгаты.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антагонистичное антитело к ОХ40 или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека, соединенное с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Такие конъюгаты в настоящей заявке называют "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают в себя один или более цитотоксинов, называют "иммунотоксинами". Термин "цитотоксин" или "цитотоксический агент" включает любой агент, который вреден для клеток (например, убивает их). Примеры цитотоксинов включают таксол, цитохалазин В, грамтитидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацен дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропанолол и пурамицин, а также их аналоги и гомологи. Терапевтические агенты также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарабин), алкилирующие агенты (например, мехлорэатмин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфат, дибромманнитол, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины(II) ((DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее - дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее - актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимицотические агенты (например, винкристин и винбластин). Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно соединять с антителом согласно настоящему изобретению, включают дуокармицины, калихемицины, майтансины и ауристатины и их производные. Примером конъюгата калихемицина и антитела является имеющийся в продаже препарат Милотарг(R) ("American Home Products"). Цитотоксины можно соединять с антителами согласно настоящему изобретению при помощи технологии линкеров, применимой в технике. Примеры типов линкеров, которые применялись для конъюгирования цитотоксина с антителом включают без ограничений гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Линкер можно выбрать таким образом, чтобы, например, он поддавался расщеплению под действием низкого pH в лизосомальном компартменте или поддавался расщеплению протеазами, такими как протеазы, преимущественно экспрессируемые в ткани опухоли, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D). Более подробное обсуждение типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических агентов с антителами можно также найти в Saito G. et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail P.A. et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne G. (2003) Cancer Cell, 3:207-212; Allen T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer, 2:750-763; Pastan I. & Kreitman R.J. (2002) Curr. Opin. Inves-

tig. Drugs, 3: 1089-1091; Senter P.D. & Springer C.J., (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264. Антитела согласно настоящему изобретению также можно соединять с радиоактивным изотопом с целью генерирования цитотоксичных радиофармацевтических препаратов, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностике или терапии, включают без ограничения иод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. Способы получения иммуноконъюгатов установлены в технике. Примеры радиоиммуноконъюгатов есть в продаже, включая Зевалин® ("EDEC Pharmaceuticals") и Бексар® ("Corixa Pharmaceuticals"), и аналогичные способы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов с применением антител согласно настоящему изобретению. Иммуноконъюгаты с антителами согласно настоящему изобретению можно применять для модифицирования конкретной биологической реакции, и функциональную группу препарата не обязательно конструировать, ограничиваясь классическими химическими лекарственными препаратами. Например, функциональной группой лекарственного препарата может быть белок или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин с ферментативной активностью или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон-γ; или модификаторы биологической реакции, например, такие как лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы.

Технологии соединения таких терапевтических агентов с антителами хорошо известны, см, например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe PE & Ross WC (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антагонистичное антитело к OX40 или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, вводимое вместе с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксин.

Фармацевтические композиции.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая антагонистичное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемую основу. Такие композиции могут включать одно или сочетание (например, два или более разных) антител, и/или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению, и/или терапевтический агент, такой как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксины, описанные выше. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать сочетание антител (или иммуноконъюгатов), которые связываются с разными эпитопами на целевом антигене, или которые обладают взаимодополняющим действием. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антагонистичное антитело к OX40 согласно настоящему изобретению в сочетании по меньшей мере с одним другим противовоспалительным агентом или иммуносупрессором.

В настоящей заявке термин "фармацевтически приемлемая основа/носитель" включает любые и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, противомикробные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание объекты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, указанная основа подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального введения, введения в спинной мозг или внутрикожного введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активного соединения, т.е. антитело или иммуноконъюгат, можно покрывать определенным материалом, чтобы защитить указанное соединение от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать указанное соединение. Фармацевтически приемлемые основы включают стерильные водные растворы или дисперсионные среды, а также стерильные порошки для приготовления растворов для инъекций или дисперсий непосредственно перед применением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в технике. За исключением тех случаев, когда традиционная среда или агент несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению включено в заявку. Также можно включать в указанные композиции дополнительные активные соединения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая иммуноконъюгат, содержащий антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, присоединенное к терапевтическому агенту, и фармацевтически приемлемую основу. Иммуно-

конъюгаты и терапевтические агенты, которые можно применять, описаны выше.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая антагонистичное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению, которая также содержит другой фармацевтически активный агент. Предпочтительно, таким другим фармацевтически активным агентом является один или более из а) другого антагониста ОХ40 человека, б) анальгезирующего агента и с) иммуносупрессора, например глюкокортикоида, такого как преднизон.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может также включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и подобные; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и подобные; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиамин-тетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и т.п. Примеры подходящих водных и неводных основ, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытий, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Также указанные композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Для обеспечения отсутствия микроорганизмов можно применять как процедуры стерилизации, как указано выше, так и включать разные противомикробные и противогрибковые агенты, например парабен, хлорбутанол, фенолсорбиновую кислоту и т.п. Также может быть желательно включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п., в композиции. Кроме того, можно создать лекарственную форму для инъекций с замедленным всасыванием путем включения агентов, которые замедляют всасывание, такие как моностеарат алюминия и желатин.

Применение в терапии и другие способы применения.

Антагонистичные антитела согласно настоящему применению можно применять в целом ряде областей для диагностики и терапии *in vitro* и *in vivo*, включая диагностику и лечение ОХ40-опосредованных расстройств. Например, указанные молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или людям, например, *in vivo*, для лечения, профилактики и диагностики разных ОХ40-опосредованных расстройств. Предпочтительно субъектами являются люди, и они включают пациентов, страдающих расстройствами, опосредованными активностью ОХ40 (ОХ4-опосредованные расстройства). Антагонистичные антитела согласно настоящему изобретению могут быть эффективны при лечении пациентов, независимо от их костимулирующего статуса в отношении ОХ40. Более предпочтительными субъектами являются люди, и они включают пациентов, экспрессирующих низкий уровень ОХ40.

Термин "пациент" в целях настоящего изобретения включает как людей, так и животных, предпочтительно млекопитающих, наиболее предпочтительно людей. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению имеют применение как при лечении людей, так и в ветеринарии. Подразумевается, что термин "лечение" в контексте настоящего изобретения должен включать терапевтическое воздействие, а также профилактические или сдерживающие меры в отношении заболевания или расстройства. Таким образом, например, успешное введение антитела до начала заболевания приводит к лечению указанного заболевания. Согласно другому примеру успешное введение антитела после начала клинических проявлений заболевания с целью борьбы с симптомами указанного заболевания включает лечение заболевания. Также термин "лечение" включает введение антитела после проявления заболевания с целью устранения заболевания. Успешное введение антитела после начала заболевания и после того, как развились симптомы, с возможным смягчением клинических симптомов, и вероятно, ослаблением заболевания, включает лечение заболевания. Субъекты "нуждающиеся в лечении" включают млекопитающих, у которых уже есть заболевание или расстройство, а также субъектов, склонных к развитию указанного заболевания или расстройства, включая тех субъектов, у которых указанное заболевание или расстройство требуется предотвратить.

Согласно конкретным вариантам реализации антагонистичные антитела применяют *in vivo* для лечения, профилактики или диагностики разных ОХ40-опосредованных расстройств. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения ОХ40-опосредованного расстройства у субъекта, способ, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества указанного антагонистичного антитела или его фрагмента. Примеры ОХ40-опосредованных расстройств включают инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютенную болезнь, заболевание желчного пузыря.

ря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанка (такая как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Меньера, пузырчатку, первичный билиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, панкреатит, травму (операцию), реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелиит зрительного нерва.

Другие примеры ОХ40-опосредованных расстройств включают инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, бронхит, грипп, респираторно-синциальный вирус, пневмонию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), идиопатический фиброз легких (ИФЛ), криптогенный фиброзирующий альвеолит (КФА), идиопатическую фиброзирующую интерстициальную пневмонию, эмфизему, воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром Меньера, пузырчатку, первичный билиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, панкреатит, травму (операцию), реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелиит зрительного нерва.

Предпочтительные ОХ40-опосредованные расстройства, которые требуется лечить при помощи антитела согласно настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из множественного склероза, ревматоидного артрита, колита, псориаза, астмы, ХОБЛ, ИФЛ, реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), атеросклероза и диабета. Особенно предпочтительными ОХ40-опосредованными расстройствами, которые требуется лечить при помощи антитела согласно настоящему изобретению, являются реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD).

Также согласно настоящему изобретению предложены антитела для применения при лечении боли, в особенности боли, ассоциированной с воспалением.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению можно применять для определения уровня ОХ40 или уровня клеток, которые содержат ОХ40 на своей мембране, причем указанный уровень можно затем связать с определенными симптомами заболевания. В качестве альтернативы, указанные антитела можно применять для подавления или блокирования функции ОХ40, которое, в свою очередь, можно связать профилактикой или облегчением определенных симптомов заболевания, привлекая ОХ40 в качестве медиатора указанного заболевания. Этого можно достичь путем контакта пробы и контрольной пробы с антителами к ОХ40 при условиях, при которых возможно образование комплекса между антителом и ОХ40. Любые комплексы, образовавшиеся между указанным антителом и ОХ40, определяют и сравнивают в пробе и контроле. В свете специфического связывания антител согласно настоящему изобретению с ОХ40 антитела согласно настоящему изобретению можно применять для специфического определения экспрессии ОХ40 на поверхности клеток, например можно применять для определения пациента с низким уровнем экспрессии ОХ40. Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для очистки ОХ40 посредством иммуноаффинной очистки.

Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложен способ скрининга *in vitro* для определения пациента с низким уровнем экспрессии ОХ40, включающий этапы:

- (a) очистка мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) от других компонентов пробы крови пациента;
- (b) подвергание РВМС проточной цитометрии и
- (c) определение количества ОХ40-позитивных клеток среди CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-лимфоцитов и сравнение указанного количества с контрольными уровнями.

Согласно предпочтительному варианту реализации на низкий уровень экспрессии ОХ40 указывает увеличение уровня экспрессии в ОХ40-позитивных клетках по сравнению с контрольным уровнем до 10%, более предпочтительно до 20% и еще более предпочтительно до 30%. Способ определения экспрессии ОХ40 также описан подробно у Kotani A. et al., (2001) Blood, 98:3162-4 and Xiaoyan Z. et al., (2005) Clin. Exp. Immunol. 143: 110-6.

Согласно другому варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению можно сначала оценивать в отношении их активности связывания, ассоциированной с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции согласно настоящему изобретению можно оценивать при помощи проточной цитометрии.

Также согласно настоящему изобретению предложено применение антагонистического антитела или его фрагмента в качестве лекарственного препарата и применение антагонистического антитела или его фрагмента при получении лекарственного препарата для лечения ОХ40-опосредованного расстройства. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антагонистическое антитело или его фрагмент для применения в качестве лекарственного препарата. Также согласно настоящему изобретению предложено антагонистическое антитело или его фрагмент для применения при реализации способа лечения ОХ40-опосредованного расстройства. ОХ40-опосредованные расстройства - это расстройства, описанные выше. Антагонистическое антитело согласно настоящему изобретению может быть особенно полезно при лечении ОХ40-опосредованных расстройств, независимых от стимулирующего статуса ОХ40 пациента. Согласно предпочтительному варианту реализации антагонистического антитела или его фрагмент можно применять при лечении ОХ40-опосредованного расстройства, причем пациент экспрессирует низкий уровень ОХ40.

Как описывалось ранее, антагонистические антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению можно вводить совместно с одним или более терапевтическими агентами, например цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносуппрессором. Указанные антитела можно соединять с указанным агентом (в форме иммуноконъюгата, как описано выше) или можно вводить отдельно с указанным агентом. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить перед введением, после введения или одновременно с введением агента, или можно вводить совместно с проведением других типов лечения, например противоопухолевого лечения, например, облучения.

При введении указанного антитела доза варьирует в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 10 мг/кг массы тела хозяина. Пример режима лечения подразумевает введение антитела один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три месяца или раз в три или шесть месяцев. Обычно указанное антитело вводят несколько раз. Интервалы между введением однократных доз могут, например, составлять неделю, месяц, три месяца или год. Также интервалы могут быть нерегулярными в зависимости от показаний измерения уровня антитела на целевой антиген в крови у пациента. Согласно некоторым способам дозу корректируют так, чтобы достичь концентрации антител в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а согласно некоторым способам приблизительно 25-300 мкг/мл. В качестве альтернативы указанное антитело можно вводить в составе лекарственной формы с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется более редкое введение. Дозировка и частота введения варьируют в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли воздействие профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводят относительно низкую дозу с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают подвергаться лечению до конца жизни. При терапевтическом применении иногда требуется вводить относительно высокие дозы с относительно малыми интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не снизится или не прекратится.

Реальная доза активного ингредиента, т.е. указанного антитела в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может варьировать таким образом, чтобы получать количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого ответа на лечение у конкретного пациента, при применении конкретной композиции и режима введения, без токсичности для пациента. Избранный уровень дозы будет зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций согласно настоящему изобретению, путь введения, время введения и скорость выведения конкретного антитела, которое применяется, длительность лечения, другие применяемые препараты, соединения и/или вещества в конкретных применяемых композициях, а также возраст, пол, массу, общее состояние здоровья и предшествующий анамнез пациента, которого лечат, и подобных факторов, хорошо известных в медицине.

"Терапевтически эффективное количество" антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и длительности периодов без симптомов, и/или предотвращению нарушения или нетрудоспособности в связи с заболеванием. Способность соединения оказывать лечебное воздействие на ОХ40-опосредованное расстройство можно оценивать в модельной системе на животных, которая позволяет предсказать эффективность у человека. В качестве альтернативы данное свойство композиции можно оценивать путем определения способности соединения к подавлению роста клеток, причем такое подавление можно измерить *in vitro* посредством проб, известных специалистам в данной области техники. Специалист в данной области техники способен определить такие количества на основании таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта, а также конкретная композиция или выбранный путь введения.

Антитело или композицию согласно настоящему изобретению можно вводить посредством одного или более путей введения с применением одного или более разных способов, известных в технике. Как

должно быть понятно опытным специалистам, путь и/или способ введения варьирует в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный путь введения, введение в спинной мозг или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Более предпочтительными путями введения является внутривенный или подкожный. Фраза "парентеральное введение" в настоящей заявке обозначает путь введения, отличный от энтерального или местного, обычно путем инъекции и включает без ограничений внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, подболобочное, внутрисуставное, внутриглазное, внутрибрюшинное, внутрисердечное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, введение в полость капсулы, субарахноидальное, внутриспинальное, эпидуральное и внутригрудное введение посредством инъекций и инфузий. В качестве альтернативы антителу согласно настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, кожный путь введения или введение через слизистые оболочки, например внутриназальным, оральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным или местным путем.

Готовые изделия и наборы.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено готовое изделие, содержащее антагонистичное антитело или его фрагмент, композицию или иммуноконъюгат согласно настоящему изобретению, для лечения ОХ40-опосредованного расстройства. Готовое изделие может включать контейнер и этикетку или листок-вкладыш, прилагаемый к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы или шприцы. Контейнеры могут быть выполнены из разных материалов, таких как стекло или пластик. В контейнере содержится композиция, которая может быть эффективна при лечении указанного патологического состояния, и в нем может быть стерильный порт доступа (например, указанным контейнером может быть пакет для растворов для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в указанной композиции может быть антагонистичным антителом, раскрываемым в настоящей заявке. На этикетке или в листке-вкладыше может быть указано, что композицию можно применять для лечения выбранного патологического состояния, такого как рак. Согласно одному варианту реализации на этикетке или листке-вкладыше может быть указано, что композицию, содержащую антагонистичное антитело, можно применять для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

Кроме того, готовое изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит антагонистичное антитело, раскрываемое в настоящей заявке, и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит терапевтический агент, отличный от антагонистичного антитела. Готовое изделие согласно данному варианту реализации настоящего изобретения может также содержать листок-вкладыш, в котором указано, что первую и вторую композицию можно применять в сочетании для лечения ОХ40-опосредованного заболевания или расстройства. Таким терапевтическим агентом может быть любое дополнительное средство из описанных в предыдущем разделе (например, тромболитическое средство, антитромбоцитарное средство, химиотерапевтическое средство, антигормональное соединение, кардиопротектор и/или регулятор иммунной функции у млекопитающих, включая цитокин). В качестве альтернативы или дополнительно готовое изделие может также содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Также оно может содержать другие вещества, желаемые с коммерческой позиции или с позиции пользователя, включая другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Также в область настоящего изобретения входят наборы, включающие антитело, композиции или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению и инструкцию по применению. Указанный набор также включает другие дополнительные реагенты, такие как иммуносупрессор, цитотоксический агент, радиотоксический агент, или одно или более дополнительных антагонистичных антител согласно настоящему изобретению (например, антагонистичное антитело, обладающее дополняющей активностью, которое связывается с эпитопом антигена ОХ40, отличным от эпитопа для первого антагонистичного антитела).

Без дополнительного описания предполагается, что специалист в данной области техники может при помощи предыдущего описания и следующих иллюстрирующих примеров создать и применить агенты согласно настоящему изобретению и реализовать заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры приведены для облегчения реализации на практике настоящего изобретения, и не предназначены для того, чтобы каким бы то ни было образом ограничить остальную часть изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение и скрининг антитела мыши к ОХ40 человека.

Для получения рекомбинантного белка Fc-ОХ40 человека кДНК для TNFRSF4 человека приобрели у компании "imaGenes" (номер клона: RZPDB737H0329D; Берлин, Германия). Указанную кДНК применяли в качестве матрицы для ПЦР-амплификации ДНК кодирующей внеклеточной домен области TNFRSF4 человека (SEQ ID NO: 11). В отдельной реакции ПЦР амплифицировали область Fc IgG1 человека (положения согласно нумерации ЕС 223-451), добавляя линкер 5' GSGGG и линкер 3' SA-6xHis и

сайты рестрикции для клонирования. Затем два полученных продукта соединяли при помощи перекрывающейся расширенной ПЦР с фланкирующими праймерами, добавляя сайты рестрикции для последующего клонирования в модифицированный вектор экспрессии млекопитающих на основе плазмиды pcDNA3.1(-) от компании "Invitrogen" ("Invitrogen AG", Базель, Швейцария, Кат. № V795-20), содержащей промотор CMV человека с донорно-акцепторным фрагментом Ig (первый интрон), описанным в патенте США 5924939, последовательность OriP (Koons M.D. et al., (2001) J. Virol. 75(22): 10582-92), энхансер SV40 и сигнал полиаденилирования SV40, соединенные с терминатором гена гастрина, описанным у Kim D., et al., (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. Указанная рекомбинантная плазмида обеспечивала возможность экспрессии гибридного белка внеклеточный домен TNFRSF4 человека-Fc в клетках млекопитающих с секрецией в питательную среду для выращивания клеток, запускаемой нативным сигнальным пептидом белка TNFRSF4 человека. Для выработки рекомбинантного белка упомянутый выше рекомбинантный вектор трансфецировали в адаптированные к суспензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI™ ("Polyplus-transfection S.A.", Страсбург, Франция; дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с белком А (колонка с сефарозой-белком А HiTrap; "GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария).

Для получения рекомбинантного белка OX40 человека-his внеклеточный домен TNFRSF4 (SEQ ID NO: 11) человека амплифицировали посредством ПЦР, добавляя линкер 3' GSG-6xHis и сайты рестрикции для клонирования. Далее продукт ПЦР клонировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1(-), описанную выше. Указанная рекомбинантная плазмида обеспечивала возможность экспрессии белка OX40 человека-his в клетках млекопитающих с секрецией в питательную среду для выращивания клеток, запускаемой нативным сигнальным пептидом TNFRSF4 человека. Для выработки белка рекомбинантный вектор трансфецировали в адаптированные к суспензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI™ ("Polyplus-transfection S.A.", Страсбург, Франция; дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с Ni²⁺-NTA (колонка с сефарозой- Ni²⁺-NTA HiTrap; "GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария). Было показано, что рекомбинантный белок OX40 человека-Fc и OX40-his были чистыми на 95%, о чем судили методом SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле), и дальше проводили замену буфера на фосфатно-солевой буфер (ФСБ) перед применением.

Рекомбинантный белок OX40 человека-Fc, растворенный в ФСБ, смешивали с эквивалентным объемом адьюванта Stimune ("Prionics", Швейцария, идентификационный номер: 7925000) и готовили эмульсию. Эмульсию переносили в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл ("BD Pharmingen", Аллсвилль, Швейцария) и вводили животным BALB/c ("Harlan", Нидерланды) подкожно в подушечку стопы задней конечности, в основание хвоста и шею в дозе 50 мкг эмульгированного белка. Иммунизацию повторяли через две недели с тем же количеством антигена и с тем же путем введения.

Присутствие циркулирующих антител к OX40 человека у иммунизированных мышей в сыворотке оценивали посредством прямого ELISA с применением планшетов, покрытых рекомбинантным белком OX40 человека-his. Сыворотку мыши в разных разведениях (от 1:10⁰ до 1:10⁹) добавляли в планшеты и связавшиеся антитела определяли при помощи овечьего антимышиного H+L цельного антитела-HRP ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария). Конечные усиливающие дозы 50 мкг антигена без адьюванта вводили подкожно животным, проявляющим самый высокий титр IgG к OX40 человека в сыворотке перед умерщвлением.

Животных подвергали эвтаназии и паховые, подмышечные, плечевые, подколенные и седалищные лимфатические узлы извлекали и готовили суспензию отдельных клеток путем распределения архитектуры лимфатических узлов двумя иглами 25G в растворе ДНКазы ("Roche Diagnostics (Schweiz) AG", Роткройц, Швейцария) и коллагеназы ("Roche Diagnostics (Schweiz) AG", Роткройц, Швейцария). Суспензии отдельных клеток объединяли с линией клеток миеломы X63AG8.653 (линия клеток миеломы мыши BALB/c; номер доступа ATCC: CRL 1580; Kearney J.F. et al., (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) в соотношении 7:1 (партнеры по слиянию - собираемые клетки лимфатических узлов) с полиэтиленгликолем 1500 ("Roche Diagnostics (Schweiz) AG", Роткройц, Швейцария). Слившиеся клетки помещали в планшеты на 96 лунок с плоским дном, покрытые макрофагами мыши в среде DMEM-10 ("Invitrogen AG, Базель", Швейцария) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ, "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 2 mM L-глутамата, 100 Е/мл пенициллина ("Biochrom AG", Германия), 100 мкг/мл стрептомицина ("Biochrom AG", Германия), 10 mM HEPES ("Invitrogen AG", Базель, Швейцария), 50 мкМ гипоксантина/аминоптирина/тимидина ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) и 1% фактора роста ("Hybridokine, Interchim/Uptima", Монтлюкон, Франция).

В результате слияния приблизительно 800 лунок подвергали скринингу посредством ELISA на на-

личие IgG мыши, который распознает ОХ40 человека и блокирует связывание ОХ40 человека на его рецепторах. Содержимое лунок с положительной реакцией распространяли и подвергали двум циклам субклонирования. Клетки собирали и тяжелые и легкие цепи клонировали и секвенировали.

Пример 2. Клонирование и секвенирование VH и VL цепей антитела против ОХ40 из клеток гибридомы.

Для каждой гибридомы, отобранной с положительным результатом, готовили общую РНК, проводили обратную транскрипцию с образованием кДНК, и гены VH и VL, соответственно, амплифицировали посредством ПНР. Продукты ПНР вшивали в "спасающий" вектор (вектор pDrive; "QIAGEN AG", Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 231124), который делает возможным секвенирование ДНК индивидуальных продуктов ПНР и определение моно- или поликлональности избранных гибридом. При применении данного вектора можно было проводить селекцию по синему/белому цвету в планшетах с LB-агаром, содержащим IPTG (изопропилтиогалактозид) и X-gal (колонии без вставки имели синее окрашивание из-за расщепления X-gal пептидом LacZ α). Рекombинантные плазмиды из положительных (белых) бактериальных клонов готовили и секвенировали с применением стандартных ДНК-праймеров для секвенирования, специфических в отношении остова вектора (M13rev, M13fwd, T7 или SP6). В конце последовательности ДНК субклонировали в вектор экспрессии для рекombинантной экспрессии рассматриваемого антитела в клетках млекопитающих.

Выделение РНК.

Общую РНК выделяли из $2 \cdot 10^6$ клеток с применением набора RNeasy Mini от компании "QIAGEN" ("QIAGEN AG", Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 74106) в соответствии с протоколом производителя; количественную оценку в пробах проводили на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 ("WITEC AG", Литгау, Швейцария).

Одноэтапная ПЦР с ОФ.

Препараты общей РНК, полученные, как было описано выше, подвергали обратной транскрипции с получением кДНК, и фрагменты VH и VL амплифицировали с применением двух разных смесей вырожденных праймеров, каждый из которых позволял восстановить вариабельные фрагменты тяжелых цепей и соединительные области вариабельных областей тяжелых цепей всех подсемейств иммуноглобулинов мыши или восстановить вариабельные фрагменты легких цепей каппа и соединительные области вариабельных областей легких цепей всех подсемейств иммуноглобулинов мыши. Праймеры, применяемые для обратной транскрипции и амплификации, были синтезированы компанией "Microsynth" (Балгах, Швейцария) и подвергались очистке посредством ВЭЖХ (табл. 1-4). И обратную транскрипцию, и ПНР-амплификацию проводили одновременно с применением набора для одноэтапной ПЦР с ОФ компании "QIAGEN" ("QIAGEN AG", Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 210212). Поскольку указанная технология основана на применении специфических праймеров, каждую пробу мРНК затем подвергали обработке в двух экземплярах, что позволяло проводить индивидуальную обратную транскрипцию и амплификацию либо VH, либо VL фрагментов. 2 мкг общей РНК, растворенной в воде, не содержащей РНКазу, до конечного объема 30 мкл, смешивали с 10 мкл 5× матричного раствора буфера для одноэтапной ПЦР с ОФ компании "QIAGEN", 2 мкл смеси дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфатов) в концентрации 10 мМ, 3 мкл смеси праймеров в концентрации 10 мМ и 2 мкл смеси ферментов для одноэтапной ПЦР с ОФ компании "QIAGEN". Затем итоговую смесь помещали в пробирку для ПЦР и подвергали циклам в ПЦР-термоциклере (iCycler "BioRad", версия 4.006, "Bio-Rad Laboratories AG", Рейнах, Швейцария) со следующими установками:

30 мин при 50 °C

15 мин при 95 °C

40 циклов: 30 сек при 94 °C

30 сек при 55 °C

1 мин при 72 °C

10 мин при 72 °C

Выдерживать при 4 °C

Клонирование в вектор pDrive.

Продукты ПЦР загружали на 2% агарозные гели. После электрофореза ДНК рассматриваемые фрагменты (~450пб) вырезали из агарозных гелей и подвергали дальнейшей экстракции при помощи набора NuclioSpin Extract II компании "Macherey-Nagel" 250 ("Macherey-Nagel", Энзинген, Швейцария; Кат. № 740609.250). Для секвенирования ДНК экстрагированные продукты ПЦР клонировали в "спасающий" вектор (вектор pDrive; "QIAGEN AG", Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 231124) и трансформировали в E.coli штамм TOP10 ("Invitrogen AG", Базель, Швейцария; Кат. № C404006).

Экстракция по протоколу "Miniprep".

Колонии, продемонстрировавшие положительный результат, культивировали в течение ночи при 37°C (взбалтывание при 250 об/мин) в 1,5 мл среды Луриа-Бертани (LB) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, засеянной в блокирующих планшетах с квадратными лунками "Macherey-Nagel" ("Macherey-Nagel", Энзинген, Швейцария; Кат. № 740488.24). На следующий день экстракцию ДНК по протоколу "miniprep" проводили с применением набора плазмид NucleoSpin Multi-8 ("Macherey-Nagel", Энзинген, Швейцария; Кат. № 740620.5).

Секвенирование и анализ последовательностей.

Пробы отправляли для секвенирования ДНК в компанию "Fastens", оказывающую услуги по секвенированию (План-ле-Отс, Швейцария). Применяли стандартные праймеры: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (табл. 5). Для анализа последовательностей применяли профессиональную версию Clone Manager 9 ("Scientific & Educational Software", Северная Каролина, США) и программу BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, TA (1999) Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98).

Клонирование вектора экспрессии для экспрессии рекомбинантного химерного антитела.

Для рекомбинантной экспрессии в клетках млекопитающих изолированные фрагменты VH и VL мыши переводили в форму химерных иммуноглобулинов при помощи способов ПЦР, основанных на сборке. Указанные химерные антитела состоят из тяжелой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи мыши соединена с константными доменами тяжелой цепи IgG1 человека (области $\gamma 1$, шарнир, $\gamma 2$ и $\gamma 3$), и легкой цепи, где вариабельный домен мышинной легкой цепи соединен с константным доменом человека каппа (Ск). Собранные посредством ПЦР мышинные вариабельные и человеческие константные части впоследствии клонировали в модифицированный вектор экспрессии для клеток млекопитающих, основанный на модифицированном векторе pcDNA3.1(-) от компании "Invitrogen", упоминаемом в примере 1, с тем отличием, что для запуска секреции белка применялся лидерный пептид легкой цепи каппа иммуноглобулина. Для выработки белка иммуноглобулинов-кандидатов эквивалентные количества ДНК-вектора для тяжелой и легкой цепи совместно трансфецировали в адаптированные к суспензии клетки НЕК-293 (номер ATCC: CRL-1573). Через пять дней надосадочную жидкость культуры отбирали и очищали с применением колонки для аффинной хроматографии с белком А (колонка с сепарозой-белком А HiTrap), которой управляла система ÄKTA FPLC ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария).

Таблица 1

Смесь праймеров VH-обратные

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

Таблица 2

Смесь праймеров VH-прямые

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

Таблица 3

Смесь праймеров VL-обратные

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC
 GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

Таблица 4

Смесь праймеров VL-прямые

ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

Таблица 5

Праймеры для секвенирования

M13-Fwd GTAAAACGACGGCCAGT

M13-Rev AACAGCTATGACCATG

T7 TAATACGACTCACTATAGG

SP6 GATTTAGGTGACACTATAG

Пример 3. Описание биологических свойств антитела к OX40 человека.

Определение OX40-специфичных антител посредством ELISA.

Титры, специфичность и выработку антител гибридами, а также кандидаты в рекомбинантные антитела определяли посредством ELISA. Если кратко, в микропланшеты на 96 лунок ("Costar", США, дистрибьютор: "VWR AG", Ньон, Швейцария) наносили 100 мкл рекомбинантного OX40 человека-his в концентрации 2 мкг/мл в ФСБ (информацию о генерировании белка OX40-his см. в примере 1). Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем блокировали 2% БСА в ФСБ (бычий сывороточный альбумин, "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия) при комнатной температуре (КТ) в течение 1 ч. Блокирующий раствор удаляли, добавляли надосадочную жидкость от гибридом или очищенные антитела. Планшеты инкубировали при КТ в течение 30 мин, затем проводили отмывку десять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) и добавляли меченные пероксидазой хрена (HRP) овечьи антимышьи антитела для детекции H+L ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) в разведении 1:1000. Для определения рекомбинантных химерных антител (см. пример 2), которые содержат фрагмент Fc человека, в качестве антитела для определения применяли HRP-меченые кроличьи античеловеческие антитела-IgG ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) в разведении 1:1000. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ), проводили отмывку девять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли в планшеты ТМБ (тетраметилбензидиновый) субстрат ("Bio-rad Laboratories AG", Рейнах, Швейцария), через 6 мин реакцию останавливали путем добавления H₂SO₄. Затем измеряли поглощение на длине волны 450 нм на микропланшетном ридере ("Biotek", США; дистрибьютор: "WITTEC AG", Литтау, Швейцария). На фиг. 1А показано, что химерное антитело 1D4 и химерное антитело 2F8 распознают белок OX40-his, нанесенный на планшет.

OX40L-блокирующий ELISA.

Рекомбинантный белок-лиганд OX40 человека (OX40L) генерировали следующим образом: кДНК для TNFSF4 человека (номер клона: ION46203) приобретали у компании "imaGenes" (Берлин, Германия) и внеклеточную часть (аминокислоты 51-183) лиганда TNFSF4 человека (нумерация в соответствии с последовательностью Q6FGS4 Uniprot) амплифицировали с фланкирующими сайтами рестрикции. Полученный продукт ПЦР, окружающий линкер ASA и последовательность метки 8-His на своем 5'-конце, впоследствии клонировали в модифицированную версию вектора pREP4 от компании "Invitrogen" ("Invitrogen AG", Базель, Швейцария), несущую промотор CMV, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста и лидерный пептид VJ2C мыши для запуска секреции указанного рекомбинантного белка. Для выработки рекомбинантного белка указанный рекомбинантный вектор трансфицировали в адаптированные к суспензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI™ ("Polyplus-transfection S.A.", Страсбург, Франция; дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с белком А (колонка с сепарозой-белком А HiTrap; "GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбрунг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбрунг, Швейцария).

Чтобы определить, могут ли сгенерированные антитела против OX40 блокировать связывание OX40L с рецептором OX40L1, применяли блокирующий ELISA. В микропланшеты на 96 лунок ("Costar", США, дистрибьютор: "VWR AG", Ньон, Швейцария) наносили 100 мкл рекомбинантного OX40 человека-Fc (см. пример 1) в концентрации 2 мкг/мл в ФСБ. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем блокировали 2% БСА в ФСБ при КТ в течение 1 ч. Блокирующий раствор удаляли и добавляли надосадочную жидкость от гибридом или очищенные антитела. Через 5 мин в каждую лунку добавляли 50 мкг биотинилированного рекомбинантного OX40L человека в концентрации 0,04 мкг/мл. Планшеты инкубировали при КТ в течение 60 мин, затем проводили отмывку девять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли HRP-стрептавидин ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) в разведении 1:2000. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при КТ, проводили отмывку 9 раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли в планшеты ТМБ субстрат ("Bio-rad Laboratories AG", Рейнах, Швейцария), через 6 мин реакцию останавливали путем добавления H₂SO₄. Затем измеряли поглощение на длине волны 450 нм на микропланшетном ридере ("Biotek", США; дистрибьютор: "WITTEC AG", Литтау, Швейцария). На фиг. 1В показано, что химерное антитело 1D4 способно блокировать взаимодействие между OX40 и OX40L с зависимостью от дозы, а химерное антитело 2F8 не способно блокировать взаимодействие между OX40 и OX40L.

Реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

Кровь у двух разных доноров отбиралась в три закрытые системы взятия венозной крови объемом на 10 мл с цитратом в качестве антикоагулянта ("Sarstedt", Нюмбрехт, Германия). Клетки от донора № 1 применяли в качестве клеток-эффекторов, а клетки от донора № 2 применяли в качестве клеток-мишеней. РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) от 2 указанных доноров очищали с применением 50 мл пробирок Blood-Sep-Filter (дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмывке 2 раза в среде Мемориального института Розуэлл-Парк (RPMI, "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия) без ФБС. Клетки-мишени инкубировали с 50 мкг/мл митомицина С ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) в течение 30 мин

при 37°C. Затем клетки отмывали 3 раза средой RPMI без ФБС и повторно суспендировали с плотностью 1×10^6 клеток/мл в RPMI, 10% ФБС ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 2 мМ L-глутамин ("Lonza", Лёвен, Бельгия), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина ("Biochrom AG", Берлин, Германия). В микропланшетах на 96 лунок с U-образным дном ("TPP", Тразединген, Швейцария) распределяли 50000 клеток-мишеней и 80000 клеток-эффекторов в конечном объеме 100 мкл для каждой лунки. В лунки добавляли 1000 мкл разведений антител. Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Через 7 дней после начала MLR в клетках генерировали импульсы при помощи 0,5 мКири ³H-тимидина ("Perkin Elmer"). Через 8 ч после генерирования импульсов клетки собирали и количественно определяли включенную радиоактивную метку при помощи β-счетчика Wallac. На фиг. 2 показано, что химерное антитело 1D4 способно блокировать MLR с зависимостью от дозы в большей степени, чем положительный контроль.

Пример 4. Связывание антител к ОХ40 человека с активированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека и других видов животных, определяемое посредством проточной цитометрии.

Клетки человека.

Фильтры, содержащие лейкоциты человека, были взяты из Центра сбора крови в г. Ла-Шо-де-Фон, Швейцария (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клетки снимали с фильтров посредством обратной промывки 60 мл ФБС, содержащего 10 Е/мл ликвемина ("Drossapharm AG", Люцерн, Швейцария). Затем PBMC очищали при помощи пробирок Blood-Sep-Filter на 50 мл (дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмывке 3 раза в среде Мемориального института Розуэлл-Парк (RPMI, "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия) с ФБС ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия). Клетки повторно суспендировали с плотностью 3×10^6 клеток/мл в RPMI, 10% ФБС ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 2 мМ ультраглутамин ("Lonza", Лёвен, Бельгия), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина ("Biochrom AG", Берлин, Германия), 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА; "Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) + 100 Е/мл рекомбинантного IL-2 человека (пролейкин, "Novartis", Базель, Швейцария) в планшете на 24 лунки ("TPP", Тразединген, Швейцария). Через 48 ч клетки отбирали и анализировали посредством проточной цитометрии, как описано ниже.

Клетки HPB-ALL (линия клеток острого Т-клеточного лейкоза от компании "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Брауншвейг, Германия) культивировали в RPMI, 10% ФБС. 2×10^5 клеток распределяли в планшете на 96 лунок с V-образным дном ("TPP", Тразединген, Швейцария) и центрифугировали в течение 3 мин при 1300 об/мин; надосадочную жидкость сливали, клетки отбирали и анализировали посредством проточной цитометрии, как описано ниже.

PBMC и клетки HPB-ALL, подготовленные, как описано выше, повторно суспендировали в 50 мкл буфера FACS (ФСБ, 2% ФБС, 10% версена ("Invitrogen", США) с 5 мкг/мл химерного антитела 1D4 или 5 мкг/мл соответствующего по изотипу контроля или 20 мл РЕ-меченного коммерческого антитела к ОХ40 человека (клон L106, "BD Biosciences", Аддисвилль, Швейцария). Клетки инкубировали в течение 30 мин на льду, подвергали отмывке два раза и повторно суспендировали в 50 мкл буфера FACS. Для определения химерного антитела 1D4 и контрольного антитела по изотипу применяли античеловеческий IgG-фикоэритрин-РЕ ("BD Biosciences", Аддисвилль, Швейцария), разведенный в отношении 1/200. Клетки инкубировали в течение 15 мин на льду, подвергали отмывке один раз, повторно суспендировали в 400 мкл буфера FACS и анализировали на инструменте FACS ("Cyan, Beckman Coulter International S.A.", Ньон, Швейцария).

Первичные клетки яванских макак.

Цельную кровь яванских макак (полученных от профессора Эрика Роуллера, Лаборатория нейрофизиологии, Университета Фрибурга, г. Фрибург, Швейцария) отбирали в пробирки с цитратом ("BD Biosciences", Аддисвилль, Швейцария). 2 мл ФБС смешивали с 3 мл крови и указанную смесь наслаивали сверху на 10 мл смеси фриколла: ФБС 85:15 ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбрунг, Швейцария). Пробу центрифугировали в течение 20 мин при комнатной температуре без перерыва. Слой PBMC отбирали и промывали трижды в ФБС. Клетки повторно суспендировали с плотностью 3×10^6 клеток/мл в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 10% ФБС ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), с заменимыми аминокислотами ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 1 мМ пирувата натрия ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 2 мМ ультраглутамин ("Lonza", Бельгия), 100 Е/мл пенициллина ("Biochrom AG", Германия), 100 мкг/мл стрептомицина ("Biochrom AG", Германия). 1 мл суспензии клеток распределяли в планшете на 24 лунки ("TPP", Тразединген, Швейцария) и добавляли 10 мкг/мл ФГА (РНА/М, "Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария), 100 Е/мл рекомбинантного IL-2 человека (пролейкин, "Novartis", Базель, Швейцария). Клетки инкубировали в течение 57 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Активированные PBMC отбирали и повторно суспендировали в ФБС/2,5% ФБС (буфер FACS). 50000 клеток в 50 мкл буфера FACS распределяли в планшете на 96 лунок с V-образным дном и к лункам добавляли 25 мкг/мл биотинилированного химерного антитела 1D4 к ОХ40 человека или биотинилированного контрольного антитела по изотипу, или биоти-

нированного коммерческого антитела к OX40 человека, выработанного в организме овцы ("BD Biosciences", Аддисвилл, Швейцария). Пробы инкубировали в течение 20 мин на льду, а затем клетки подвергали отмывке два раза холодным буфером FACS, а затем инкубировали со стрептавидином-PE ("BD Biosciences", Аддисвилл, Швейцария) в разведении 1:20 в течение 15 мин на льду. Клетки подвергали однократной отмывке буфером FACS, а затем повторно суспендировали в 300 мкл буфера FACS. К каждой пробе добавляли иодид пропиция в объеме 2 мкл (PI; "Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария), чтобы исключить мертвые клетки. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии (Суан, "Beckman Coulter International S.A.", Ньон, Швейцария).

На фиг. 3А и 3В показано, что химерное антитело 1D4 способно распознавать OX40, экспрессируемый на поверхности активированных лимфоцитов человека и яванской макаки, соответственно, таким образом, обеспечивая свойства перекрестной реактивности, которые так желательны при разработке лекарственных препаратов.

Пример 5. Кинетические константы аффинного связывания химерного антитела 1D4 с внеклеточным доменом рецептора OX40 человека, измеренные посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Кинетические константы аффинного связывания (KD) измеряли по захваченному белком А антителу с применением внеклеточного домена рекомбинантного рецептора OX40 человека с гистидиновой меткой, который описан в примере 1, в качестве анализируемого вещества. Измерения проводили на приборе BIAcore 2000 ("GE Healthcare - BIAcore", Упсала, Швеция) при комнатной температуре, результаты анализировали при помощи компьютерной программы (BIAcore; v4.1).

Сенсорный чип исследовательского класса CM5 ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбрунг, Швейцария; BR-1000-14) активировали путем введения 35 мкл раствора N-гидроксисульфосукцинимид (NHS)/1-этил-3-[3-диметиламинпропил]карбодиимида гидрохлорида (EDC) в соотношении 1:1 (по объему, скорость потока 5 мкл/мин; 1 и 2 пути движения потоков). Белок А (идентификационный номер P7837; "Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) разводили до конечной концентрации 50 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 4,5 (GE, BR-1003-50; на одну единицу pH ниже, чем pI) и впоследствии иммобилизовывали на предварительно активированном сенсорном чипе путем введения 35 мкл по обоим путям движения потоков - 1 и 2 (5 мкл/мин); это соответствовало приблизительно 1500 единицам ответов (ЕО). Затем сенсорный чип белок-А-СМ5 инактивировали путем введения 35 мкл раствора этаноламина (5 мкл/мин). В итоге проводили два введения раствора глицина по 10 мкл ("GE", идентификационный номер BR-1003-54; 10 mM; pH 1.5) для высвобождения молекул белка А, не вступивших в перекрестные сшивки.

Перед измерением сродства проводили пробу на ограничение массопереноса путем введения фиксированной концентрации анализируемого вещества в фиксированное количество антитела, захваченного белком, при разных скоростях потока (5, 15, 30, 50, 75 мкл/мин в течение 2 мин). Анализ наклона скорости прямой реакции при разных скоростях потока указывает на наличие массопереноса.

Для измерений сродства химерное антитело 1D4, которое хранили в 1×ФСБ-буфере, разводили до конечной концентрации 15 нМ в буфере HBS-EP ("GE", идентификационный номер BR-1001-88; 0,01M HEPes, 0,15M NaCl, EDTA 3 mM, 0.005% поверхностного активного вещества P20, pH 7,4). 10 мкл такого разведенного матричного раствора впоследствии вводили во 2-й путь движения потока чипа белок-А-СМ5 (30 мкл/мин) так, чтобы достичь 200-250 ЕО. После данного этапа захвата внеклеточный домен рекомбинантного рецептора OX40 человека с гистидиновой меткой вводили в разных концентрациях (от 50 нМ до 0,4 мМ) в 1-й и 2-й пути движения потока (1-й путь движения потока применяли в качестве эталонного) со скоростью потока 30 мкл/мин. После каждого события связывания поверхность подвергали регенерации при помощи глицинового буфера с pH 1,5, вводимого в течение 1 мин (10 мкл/мин).

Измерения (сенсограмма: fc2-fc1) наилучшим образом удавалось аппроксимировать двухвалентной моделью анализируемого вещества 2:1 с массопереносом. Чтобы учесть экспериментальный разброс в отношении антитела, захваченного белком А, в начале каждого измерения, выставляли местное значение Rmax при всех подгонках. Время диссоциации составило по меньшей мере 300-600 секунд. Измерения проводили в двух экземплярах и для сравнения включали пробы с нулевой концентрацией. Значение Хи-квадрат соответствует сумме квадратов разностей между экспериментальными данными и эталонными данными в каждой точке; хотя графики остатков показывают разность между экспериментальными и эталонными данными для каждой точки в подгонке. И Хи-квадрат, и значения остатков применяли для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и индивидуальными моделями связывания.

Измерения проводили в двух повторениях с захваченными химерными антителами 1D4 к OX40 человека, иммобилизованными на сенсорном чипе с белком А и внеклеточным доменом рекомбинантного рецептора OX40 человека с гистидиновой меткой в качестве анализируемого вещества. Значение KD варьировало в диапазоне от 91 до 116 пМ, а значения Хи-квадрат были <1,25.

Пример 6. Гуманизация моноклонального антитела 1D4 мыши.

В настоящей заявке описана гуманизация антитела 1D4 мыши к OX40 человека, включая выбор акцепторных каркасных областей человека, обратные мутации и мутации, которые в значительной степени

позволяют сохранить и/или улучшить свойства связывания акцепторных каркасных областей человека с привитыми CDR.

Дизайн видоизмененных переменных областей.

Для выбора акцепторных каркасных областей человека для прививки CDR антитела 1D4 применяли гомологичное соответствие. Для идентификации подсемейств антител человека, к которым принадлежит V-области тяжелых и легких цепей антитела мыши, и для определения максимально соответствующей каркасной области антител человека эмбрионального типа для применения в качестве акцепторной молекулы, можно применять базы данных, например базу данных генов переменных областей эмбрионального типа из локусов человека и мыши (база данных IMGT (International ImMunoGeneTics information system®; Lefranc M.P. et al., (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M. et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc M.P. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc M.P. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc M.P. et al., (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q. et al., (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64) или VBASE2 (Retter I. et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, выпуск базы данных D671-D674), или база данных Кабата (Johnson G. et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218)), или публикации (например, Kabat E.A. et al. выше). Выбор последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) в указанных подсемействах, которые следует применять в качестве акцептора, может основываться на гомологии последовательностей и/или соответствии структуры областей CDR1 и CDR2, что позволит сохранить соответствующее родственное представление шести CDR после прививки.

Например, применение базы данных IMGT позволяет выявить хорошую гомологию между переменной каркасной областью тяжелой цепи 1D4 и членами подсемейства 2 переменных доменов тяжелых цепей человека. Максимальная гомология и идентичность последовательностей и CDR и каркасных областей были выявлены в последовательностях эмбрионального типа IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (SEQ ID NO: 22) и IGHV2-70*11 (SEQ ID NO: 23), каждая из которых обладает идентичностью последовательности выше 73% для целой последовательности вплоть до CDR3. IGHV 2-70*10, IGHV2-70*01 и IGHV2-70*13 обладают идентичностью последовательности 74%; а IGHV2-5*09 и IGHV2-70*11 обладает идентичностью последовательности 73,5 и 73% соответственно.

При применении того же подхода последовательность переменного домена легкой цепи 1D4 демонстрировала хорошую гомологию с членами подсемейства 3 переменного домена каппа легкой цепи человека. Максимальная гомология и идентичность последовательностей и CDR, и каркасных областей были выявлены в последовательностях эмбрионального типа IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24) (идентичность 65,3%), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 25) (64,9% идентичность), IGKV1D-39*01 (SEQ ID NO: 26) (идентичность 64,9%), IGKV3-11*02 (SEQ ID NO: 27) (идентичность 64,2%) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 28) (идентичность 62,5%).

В качестве начального этапа процесса гуманизации в качестве акцептора для CDR антитела 1D4 были выбраны переменные домены антитела человека IGHV 2-70*10 (SEQ ID NO: 19) и IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 24). IGHV 2-70*10 был выбран в отличие от других переменных доменов тяжелых цепей человека на основании его более высокой гомологии с 1D4 в его каркасной области номер один.

Было получено первое гуманизированное антитело изотипа γ -один человека (см. ниже). Указанное антитело заключало в себе гибридный переменный домен тяжелой цепи человека-мыши и гибридный переменный домен легкой цепи человека-мыши. Гибридный переменный домен тяжелой цепи был основан на переменном домене тяжелой цепи человека IGHV 2-70*10, в котором CDR 1 и 2 эмбрионального типа были заменены на CDR 1 и 2 тяжелой цепи из 1D4. Наилучшее соответствие последовательности сегмента JH с акцепторной каркасной областью антитела человека было идентифицировано при поиске в базе данных IMGT, упоминаемой выше. В настоящей заявке полученная в результате последовательность гибридной переменной области тяжелой цепи человека-мыши, содержащая каркасные области IGHV 2-70*10, CDR из антитела мыши 1D4, и обладающая наилучшим соответствием JH с акцепторной областью из антитела человека, обозначается как переменный домен тяжелой цепи VH1 с последовательностью SEQ ID NO: 29. Аналогично, гибридный переменный домен легкой цепи человека-мыши, применяемый для данного первого гуманизированного антитела-кандидата, содержал каркасные области антитела человека IGKV3-11*01, CDR 1D4 мыши и обладал наилучшим соответствием JH с акцепторной областью из антитела человека, и в настоящей заявке обозначается как переменный домен легкой цепи VL1 с последовательностью ID NO: 30. Первое гуманизированное антитело, заключающее в себе VH1 и VL1, сокращенно обозначается в настоящей заявке как антитело VH1/VL1.

Получение прототипа первого гуманизированного антитела.

Кодирующие последовательности ДНК (кДНК) для VH1 и VL1 были синтезированы в форме scFv компанией "GENEART AG" (Регенсбург, Германия), благодаря чему стало возможно, чтобы одна последовательность ДНК заключала в себе оба переменных домена (SEQ ID NO: 31). кДНК индивидуальных переменных доменов извлекали из данного конструкта scFv посредством ПНР и затем собирали расположенную выше последовательность(и) кДНК их соответствующих константных доменов при помощи

технологии ПЦР-сборки. В итоге полную тяжелую и легкую цепь кДНК вшивали в независимые векторы, которые были созданы на основе модифицированного вектора pcDNA3.1 ("Invitrogen", Калифорния, США), несущего промотор CMV и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста. Специфический вектор для легкой цепи позволял проводить экспрессию легких цепей человека к-изотипа благодаря лигированию кДНК рассматриваемого переменного домена легкой цепи перед кДНК константного домена легкой цепи к с применением сайтов рестрикции BamHI и BsiWI; а специфический вектор для тяжелой цепи был сконструирован так, чтобы было возможно вшить кДНК рассматриваемого переменного домена тяжелой цепи перед последовательностью кДНК кодирующей константные области CH1 IGHG1 человека, шарнирную область IGHG1, CH2 IGHG1 и IGHG1 CH3, с применением сайтов рестрикции BamHI и SalI. В векторе экспрессии как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи секрета запускалась лидерным пептидом VJ2C мыши, содержащим сайт BamHI. Сайт рестрикции BsiWI расположен в константном домене к; а сайт рестрикции SalI обнаруживается в домене CH1 IGHG1.

Антитело VH1/VL1 временно вырабатывалось в результате совместной трансфекции эквивалентным количеством векторов тяжелой и легкой цепи в адаптированные к суспензии клетки HEK 293-EBNA1 (каталожный номер ATCC® CRL-10852) с применением полиэтиленамина (PEI, "Sigma", Букс, Швейцария). Обычно 100 мл клеток в суспензии с плотностью 0,8-1,2 млн клеток на 1 мл трансфицируют смесью ДНК-PEI, содержащей 50 мг вектора экспрессии, кодирующего тяжелую цепь, и 50 мг вектора экспрессии, кодирующего легкую цепь. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, встраиваются в клетки-хозяева, антитела вырабатываются при последующем культивировании клеток в течение периода 4-5 дней, чтобы была возможна секреция в питательную среду (EX-CELL 293, среды для HEK 293 без сыворотки; "Sigma", Букс, Швейцария) с добавлением 0,1% плурониловой кислоты, 4 mM глутамина и 0,25 мкг/мл генетицина).

Антитело VH1/VL1 очищали от надосадочной жидкости без клеток при помощи плавно протекающей среды с рекомбинантным белком А ("GE Healthcare Europe GmbH", Глаттбругг, Швейцария), и проводили обмен буфера в фосфатно-солевом буфере перед проведением проб. Связывание антитела с OX40 человека измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса, как описано в примере 5.

Обратные мутации привитых каркасных областей из антитела человека.

Поскольку прямая прививка CDR из антитела 1D4 мыши приводит к тому, что кандидат не способен связываться с OX40 человека (табл. 6 и фиг. 4), инициировали мутагенез, в ходе которого остатки аминокислот в антителе человека были заменены на остатки аминокислот из антитела мыши. Данный способ называется обратной мутацией и является наиболее непредсказуемой процедурой при гуманизации моноклональных антител. При реализации данного способа возникает необходимость в идентификации и отборе критических остатков в каркасной области антитела мыши, которые необходимо сохранить, чтобы сохранилось сродство, и в то же время, чтобы минимизировать потенциальную иммуногенность в гуманизированном антителе. В табл. 7, 8 и на фиг. 5 показаны остатки (нумерация по Кабату), которые различаются в каркасных областях антитела человека и мыши. Остатки, которые могут влиять на конформации CDR или упаковку внутри переменных областей, представляют особый интерес, поскольку они могут оказывать наибольшее влияние на сродство антитела.

Чтобы идентифицировать остатки, которые могут влиять на конформацию большинства CDR и/или упаковку внутри переменных областей, рассчитывали 3-мерную модель для пары VH1-VL1 переменных доменов при помощи сервера для моделирования структурной гомологии SWISS-MODEL (Arnold K. et al., (2006) *Bioinformatics*, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>), установленного в автоматический режим. Анализ модели позволил выбрать подгруппу положений на основании их предположительного влияния на области CDR и/или упаковку переменных доменов легкой-тяжелой цепи. Указанная подгруппа положений включала положения в переменном домене тяжелой цепи: 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, а также положения в переменном домене легкой цепи: 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 (нумерация по Кабату). Помимо указанных обратных мутаций у некоторых кандидатов была проведена делеция в положении Y31 в легкой цепи антитела VH1/VL1.

В контексте последовательности антитела VH1/VL1 с применением стандартного мутагенеза и способов, описанных выше, были получены дополнительные гуманизированные кандидаты на основе разных комбинаций замен в тяжелых и легких цепях. Кандидаты в гуманизированные антитела оценивали по их сродству связывания методом поверхностного плазмонного резонанса, который описан в примере 5.

Количественный выход и свойства связывания некоторых гуманизированных антител, полученных на основе указанной одной или сочетания замен, приведены в табл. 6. Из 28 показанных антител девять кандидатов не продемонстрировали какого-либо связывания с OX40 человека, а другая группа из девяти антител обладала слабым или плохим связыванием. Гуманизированные антитела на основе VL9 демонстрировали при SPR наиболее согласованное слабое связывание с OX40 человека. Только два антитела VH6/VL9 и VH7/VL9 демонстрировали хорошее связывание с OX40 человека. Оба гуманизированных антитела подверглись обратной мутации в переменной области тяжелой цепи в положениях: 23, 35b, 50, 60 и 62 и в переменной области легкой цепи в положениях: 33, 34, 46, 47 и 71 (нумерация по Кабату). Помимо указанных обратных мутаций оба антитела - VH6/VL9 и VH7/VL9 - получили благоприят-

ный результат от удаления остатка в положении 31 легкой цепи. Неожиданно, что антитело VH7/VL9 приобрело повышенное сродство к OX40 человека по сравнению с антителом 1D4 и вариантом VH6/VL9. Сродство связывания указанных гуманизированных антител указано в обобщенном виде в табл. 9.

Термостабильность избранных гуманизированных анти-OX40 антител, определенная посредством дифференциальной сканирующей калориметрии.

Термостабильность гуманизированных антител измеряли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Профиль температур плавления моноклональных антител является свойством, характерным для их изотипа (Garber E. & Demarest S.J. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751-7), однако среднюю температуру плавления фрагмента FAB можно легко идентифицировать даже в контексте полноразмерного IgG. Такую среднюю температуру плавления части FAB применяли для отслеживания моноклональной стабильности гуманизированных кандидатов.

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем калориметре VP-DSC ("MicroCal", Нортхемптон, Соединенное Королевство). Объем кюветы составлял 0,128 мл, скорость нагрева составляла 200°C/ч, и избыточное давление поддерживали на уровне 65 фунтов на кв.дюйм. Все антитела применяли в концентрации 1 мг/мл в ФСБ (pH 7,4). Молярную теплоемкость антитела оценивали путем сравнения с пробами в двух экземплярах, содержащими идентичный буфер, в котором не было антител. Парциальную молярную теплоемкость и кривые плавления анализировали посредством стандартных процедур. Термограммы корректировали на нулевую линию, а концентрацию нормировали перед дальнейшим анализом с применением модели "Non-Two State" в программе Origin v7.0.

Фрагмент FAB гуманизированного варианта VH6/VL9 проявлял один переход при температуре 76,3°C, по форме и амплитуде согласующийся с кооперативным раскручиванием, которое, как правило, наблюдается для компактно свернутых фрагментов FAB, что указывает на то, что процесс конструирования оказался успешным в отношении сохранения стабильности FAB. В целом гуманизированный вариант демонстрировал хорошую термостабильность.

Таблица 6

Гуманизированные антитела к OX40 человека

Варианты гуманизированных антител (IGHG1)	SEQ ID №	Мутации VH/VL	Временная экспрессия (мг/мл)	Связывание с OX40 человека
VH1/VL1	32, 39	H.П./H.П.	40	Нет
VH1/VL2	32, 40	H.П./L33M	21	Нет
VH1/VL3	32, 41	H.П./F71Y	17	Нет
VH2/VL1	33, 39	T23S/H.П.	13	Нет
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	Нет
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	Нет
VH3/VL1	34, 39	R50H/H.П.	23	Нет
VH3/VL2	34, 40	R50H/L33M	22	Нет
VH3/VL3	34, 41	R50H/F71Y	18	Нет
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	Плохое
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Weak
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	Плохое
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Плохое
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Плохое
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	Слабое
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	0	Н.О.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0.5	Н.О.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/Y31deletion-L33M-F71Y	14	Н.О.

VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-F71Y	7	Н.О.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3.5	Хорошее
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-R54L-T56S-F71Y	0.5	Н.О.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5.5	Н.О.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	1	Н.О.
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	Н.О.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-F71Y	1.5	Слабое
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-F71Y	10	Слабое
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Хорошее
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11.5	Слабое/ Хорошее

Таблица 7

Сравнение каркасной области 1D4 и акцепторных каркасной области тяжелой цепи человека
IGHV 2-70*10

Положение в соответствии с нумерацией Кабата	1D4	IGHV 2-70*10 привитыми CDR
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

Таблица 8

Сравнение каркасной области 1D4 и акцепторных каркасной области легкой цепи человека
IGKV 3-11*01

Положение в соответствии с нумерацией Кабата	1D4	IGHV 3-11*01 с привитыми CDR
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

Таблица 9

Характеристики связывания избранных гуманизированных и химерных анти-OX40 антител

Гуманизированные варианты	SEQ ID №	K _{on} (1/мс)	K _{off} (1/с)	K _D (нМ)
Химера 1D4	50, 51	3.4x10 ⁴	3.08x10 ⁻³	91
VH6/VL9	37, 47	3.54x10 ⁴	3.56x10 ⁻³	101
VH7/VL9	38, 47	4.45x10 ⁴	3.12x10 ⁻³	70

Пример 7. Описание свойств эпитопа гуманизированных анти-OX40 антител.

С целью описания эпитопа гуманизированных анти-OX40 антител антитело VH6/VL9 картировали, чтобы определить домен внеклеточной области OX40 человека с применением разных химерных белков OX40 человека-крысы.

Получение химерных белков OX40 человека-крысы и ELISA.

Белкам OX40 крысы и человека-крысы придавали форму Fc-гибридных белков в соответствии со способом, описанным в примере 1. Для проведения ELISA белок OX40 наносили в планшеты на 96 лунок с высокой степенью связывания ("Coastar") в концентрации 2 мкг/мл. в ФСБ и выдерживали в течение ночи при 4°C. Реакцию в планшетах блокировали при помощи 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ перед инкубацией с антителом VH6/VL9 или контрольным антителом по изотипу. Затем планшеты подвергали отмывке и инкубировали с фрагментом F(ab')₂ овечьего-античеловеческого Ig, специфичным к HRP ("Jackson ImmunoResearch Europe Ltd", Ньюмаркет, Соединенное Королевство). После отмывки планшеты инкубировали с ТМБ субстратом ("Bio-Rad Laboratories AG", Рейнах, Швейца-

рия) для выявления связывания антител. Реакцию останавливали путем добавления 2М H₂SO₄ и считывали показатели оптической плотности на длине волны 450 нМ (OD 450 нМ) на спектрофотометре Synergy HT2 ("Biotek", США; дистрибьютор: "WITTEC AG", Литтау, Швейцария).

Результаты.

Независимо от происхождения внеклеточная область OX40 была разделена на четыре структурных модуля, обозначаемые как домен 1, 2, 3 и 4 (Compaan D.M. & Hymowitz S.G. (2006) *Structure*, 14(8): 1321-30). Химерные белки OX40, соответствующие внеклеточной области OX40 человека (аминокислоты 29-214 TNFRSF4 человека, пронумерованные в соответствии с последовательностью Uniport P43489), были сконструированы путем обмена одного из четырех доменов между последовательностями человека и крысы. Например, химерный белок OX40 RHRR соответствует внеклеточной области OX40 крысы, в котором второй домен был заменен последовательностью соответствующего домена человека.

Для оценки реакционной способности антитела VH6/VL9 в отношении внеклеточной области OX40 человека (сокращенно HHHH с последовательностью SEQ ID NO: 11), внеклеточной области OX40 крысы (сокращенно RRRR с последовательностью SEQ ID NO: 52) и четырех химерных белков человека-крысы RHRR (SEQ ID NO: 53), HRRR (SEQ ID NO: 54), HHRR (SEQ ID NO: 55) и RRHH (SEQ ID NO: 56)) проводили связывающий ELISA. Результат такого ELISA показан на фиг. 7. Предпосылкой к проведению данного эксперимента по картированию эпитопов послужило то, что было показано, что антитело VH6/VL9 связывается с белком OX40 человека, но не с белком OX40 крысы, что указывает на то, что перекрестной реактивности с OX40 крысы нет. Было показано, что антитело VH6/VL9 связывалось с RHRR и HHRR, но не с HRRR или RHH, что указывает на то, что эпитоп VH6/VL9 картируется во втором домене внеклеточной области OX40 человека.

Пример 8. Антитело VH6/VL9 блокирует реакцию смешанной культуры лимфоцитов посредством механизма их уничтожения и блокирования.

Активность антитела VH6/VL9 в отношении подавления иммунных реакций *in vitro* оценивали в односторонней реакции смешанной аллогенной культуры лимфоцитов (MLR). MLR представляет собой модель *in vitro* аллореактивной активации и пролиферации Т-лимфоцитов (O'Flaherty E. et al., (2000) *Immunology*, 100(3): 289-99; DuPont B. & Hansen J.A. (1976) *Adv. Immunol.* 23: 107-202). Когда смешивают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух неродственных доноров, Т-лимфоциты активируются посредством распознавания молекул аллогенного главного комплекса гистосовместимости (МНС). Такая активация приводит к пролиферации Т-лимфоцитов. Реакция MLR широко применялась для демонстрации эффекта иммуносупрессорных препаратов, направленных на Т-лимфоциты (Bromelow K.V. et al., (2001) *J. Immunol. Methods*, 247(1-2): 1-8). Иммуносупрессоры, такие как циклоспорин, действуют главным образом посредством подавления активации Т-лимфоцитов. Помимо оценки блокирующего действия антитела VH6/VL9 также проводили изучение вклада цитотоксических механизмов, таких как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), на подавление MLR. В данной пробе оценивали три разных формы антител VH6/VL9: форма IGHG1 (в настоящей заявке обозначается VH6/VL9), форма не фукозилированного IGHG1 (IgG1) (в настоящей заявке обозначается не фукозилированная VH6/VL9) и форма IGHG4 (IgG4) (в настоящей заявке обозначается VH6/VL9 IGHG4 S228P). Известно, что IGHG1 (IgG1) компетентны в отношении механизмов цитотоксичности, таких как ADCC. Известно, что не фукозилированные антитела IGHG1 подавляют повышенную активность ADCC вследствие более высокой активности к FcγRIIIa, экспрессируемому на поверхности цитотоксических клеток, таких как естественные киллеры (клетки NK) (Mizushima T. et al., (2011) *Genes Cells*, 16(11): 1071-80). Напротив, известно, что антитела IGHG4 (IgG4) не обладают такими механизмами Fc-опосредуемой цитотоксичности, как ADCC.

Придание определенной формы антителу VH6/VL9.

Придания формы иммуноглобулину IGHG4, содержащему замену S228P, достигали путем замещения последовательности кДНК, кодирующей константные домены IGHG1 CH1, шарнирную область IGHG1, IGHG1 CH2 и IGHG1 CH3, в специфическом векторе для тяжелой цепи, описанном в примере 6. Замену S228P вводили в матрицу кДНК тяжелой цепи IGHG4 посредством стандартной технологии ПЦР-мутагенеза. Полученная в результате тяжелая цепь имела последовательность SEQ ID NO: 57. Получение не фукозилированного антитела IGHG1 VH6/VL9 проводили в соответствии с протоколом в примере 14 в публикации WO 2010/095031.

Реакция смешанной культуры лимфоцитов.

Кровь у двух разных доноров отбирали в три закрытые системы взятия венозной крови объемом на 10 мл с цитратом в качестве антикоагулянта ("Sarstedt", Нюмбрехт, Германия). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух указанных доноров очищали с применением 50 мл пробирок Blood-Sep-Filter (дистрибьютор: "Brunschwig", Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмывке 2 раза в среде Мемориального института Розуэлл-Парк (RPMI, "PAA Laboratories", Пассинг, Австрия) без ФБС. Стимулирующие клетки от двух доноров готовили путем инкубации с 50 мкг/мл митомицина С ("Sigma-Aldrich Chemie GmbH", Букс, Швейцария) в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки отмывали 3 раза средой RPMI без ФБС и повторно суспендировали с

плотностью 1×10^6 клеток/мл в RPMI, 10% ФБС ("PAA Laboratories", Пассинг, Австрия), 2 mM L-глутамин ("Lonza", Лёвен, Бельгия), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина ("Biochrom AG", Берлин, Германия). В микропланшетах на 96 лунок с U-образным дном ("TPP", Тразадинген, Швейцария) распределяли 50000 реактивных клеток и 80000 стимулирующих клеток в конечном объеме 100 мкл для каждой лунки. В лунки добавляли 100 мкл разведений антител (или только среду). Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. В течение последних 18 ч в клетках генерировали импульсы при помощи 0,5 мКири ³H-тимидина ("Perkin Elmer", Базель, Швейцария). Клетки собирали на плоский фильтр ("Perkin Elmer") и проводили количественное определение включенной радиоактивной метки на β-счетчике Wallac ("Perkin Elmer").

Результаты.

Результаты, показанные на фиг. 8, демонстрируют, что антитело VH6/VL9 способно эффективно подавлять MLR у двух разных индивидуумов (пациентов, отвечающих на лечение) со значением ЭК₅₀ приблизительно 100 нг/мл. Также результаты показывают разную реакцию в зависимости от применяемой формы антитела, а также наблюдается различие во вкладе блокирующего и цитотоксического механизма при MLR от разных индивидуумов.

Реактивность Т-лимфоцитов от пациента, отвечающего на лечение, № 1 (фиг. 8А), эффективно подавлялась формами IGHG1 и IGHG4, что указывает на то, что цитотоксические механизмы не критичны для пациента, отвечающего на лечение, № 1. Напротив, форма IGHG4 была лишь в малой степени способна блокировать MLR от пациента, отвечающего на лечение, № 2 (фиг. 8В), при высокой концентрации, и очень быстро утрачивала свое действие при более низких концентрациях, а форма IGHG1 позволяла достичь более чем 60% подавления, и это означает, что для пациента, отвечающего на лечение, № 2, механизмы уничтожения обуславливают большую часть подавляющего действия.

Указанное различие в механизме действия, вероятно, возникает вследствие того факта, что активация, пролиферация и выживание Т-лимфоцитов при MLR реакции в переменной степени зависит от ко-стимулирующих сигналов ОХ40 между индивидуумами в зависимости от степени аллогенной реактивности и, возможно, других ко-стимулирующих сигналов. У индивидуумов, у которых малая зависимость от ОХ40-порождаемых сигналов, устранение активированных Т-лимфоцитов по механизму ADCC является основным механизмом действия VH6/VL9.

Неожиданно, что не фукозилированная форма IGHG1 проявляла очень высокую способность к подавлению MLR у обоих пациентов, отвечающих на лечение. Данный результат вскрыл тот факт, что даже если блокирующего механизма может быть достаточно для достижения подавления MLR, добавление или усиление уничтожающего механизма улучшает подавляющее действие анти-ОХ40 антител. Такое усиление особенно полезно, когда проводят лечение ОХ40-опосредованных расстройств независимо от ко-стимулирующего статуса ОХ40 пациента, например у пациентов с низким уровнем экспрессии ОХ40.

Пример 9. Антитело VH6/VL9 блокирует реакцию ксеногенного трансплантата против хозяина.

Реакции ксеногенного трансплантата против хозяина (GVH) является моделью болезни "аллогенный трансплантат против хозяина" (GVHD), наблюдаемой после пересадки костного мозга у людей. Реакция GVH представляет собой острый иммунный ответ, опосредуемый пересаженными иммунными клетками, которые атакуют окружение организма-хозяина, как следствие распознавания аллогенного или ксеногенного главного комплекса гистосовместимости (Murphy W.J. et al., (1996) Semin. Immunol. 8(4): 233-41). В реакции GVH главными клетками-эффекторами являются Т-лимфоциты. Активность антитела VH6/VL9 как иммуносупрессора оценивали в модели ксеногенного GVHD на основании воссоздания мышей с SCID с клетками PBMC человека. В данной модели PBMC человека и, главным образом, Т-лимфоциты запускают сильную реакцию против клеток организма мыши-хозяина. Данная реакция приводит к тяжелому воспалению кожи и кишечника, сопровождающемуся потерей веса. Наиболее значимым показателем данной модели является выживание животных.

Метод.

Животных (мыши с SCID) подвергали сублетальному облучению перед введением им 30 млн PBMC человека внутрибрюшинно. Также у указанных животных истощали запас мышиных NK путем введения антитела ТМ-β1 два раза в неделю. Лечение антителом VH6/VL9, Энбрелом или основой проводили посредством в/в инъекций раз в неделю (пять доз подряд), и начинали указанное лечение за два дня до инъекции PBMC. Животным вводили либо основу (ФСБ), либо антитело VH6/VL9 в дозе 10 мг/кг или 1 мг/кг, либо Энбрел® (гибридный белок из растворимого рецептора TNF человека 2, соединенного с компонентом Fc IgG1 человека, "Amgen-Pfizer") в дозе 8 мг/кг. Животных проверяли и оценивали их состояние три раза в неделю с целью выявления следующих симптомов: потеря веса, диарея, состояние меха и общее поведение. Животных умерщвляли в соответствии с этическими нормами, если симптомы рассматривались, как очень тяжелые.

Результаты.

На фиг. 9 показано, что антитело VH6/VL9 очень сильно подавляло реакцию GVHD даже при более низкой дозе - 1 мг/кг. Неожиданно, что антитело VH6/VL9 демонстрировало более высокую эффективность, чем Энбрел®, который является признанным средством от GVHD у человека (Xhaard A. et al.,

(2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D. (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Среднее время выживания животных, получавших антитело VH6/VL9 в дозе 1 или 10 мг/кг, было в четыре раза больше, чем в группе, получавшей основу (табл. 10), и в два раза больше по сравнению с Энбрелом®. Кроме того, данный результат вскрыл тот факт, что антитело VH6/VL9 ut обладает агонистичной активностью, поскольку сообщалось, что агонистичное антитело против OX40 усугубляет GVHD в моделях аллогенных мышей (Valzasina B. et al., (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar B.R. et al., (2003) Blood, 101(9): 3741-8), ситуация, которая не наблюдалась в настоящем исследовании.

Таблица 10

Медиана времени выживания (в днях) в указанных лечебных группах

Лечение	Основа	Энбрел®	1D4 (1 мг/кг)	1D4 (10 мг/кг)
Медиана выживания (дни)	11,5	20,5	42	47,5

Основа: только ФСБ. 1D4: антитело GBR 830-1D4; Энбрел® был клиническим препаратом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонистичное антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, и CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3; и содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4, и CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6.

2. Антитело по п.1, которое представляет собой антитело мыши, химерное антитело или гуманизированное антитело или его фрагмент.

3. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 и 80.

4. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, 58, 59, 79 или 80.

5. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37 и 38.

6. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37 или 38.

7. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которой является продуктом или получена на основе гена человека, выбранного из группы, состоящей из IGHV2-70*10 (кодирует SEQ ID NO: 19), IGHV2-70*01 (кодирует SEQ ID NO: 20), IGHV2-70*13 (кодирует SEQ ID NO: 21), IGHV2-5*09 (кодирует SEQ ID NO: 22) и IGHV2-70*11 (кодирует SEQ ID NO: 23).

8. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которой является продуктом или получена на основе гена человека IGHV2-70*10 (кодирует SEQ ID NO: 19), и при этом указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышинного антитела, причем указанная аминокислотная модификация включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50N, 60N и 62A, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

9. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 32, и при этом каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышинного антитела, причем указанная ами-

нокислотная модификация включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N и 62A, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

10. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 60, 86, 87 и 89.

11. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 46, 47 и 49.

12. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок варибельной области легкой цепи, аминокислотная последовательность которой является продуктом или получена на основе гена человека, выбранного из группы, состоящей из IGKV3-11*01 (кодирует SEQ ID NO: 24), IGKV1-39*01 (кодирует SEQ ID NO: 25), IGKV1D-39*01 (кодирует SEQ ID NO: 26), IGKV3-11*02 (кодирует SEQ ID NO: 27) и IGKV3-20*01 (кодирует SEQ ID NO: 28).

13. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок варибельной области легкой цепи, аминокислотная последовательность которой является продуктом или получена на основе гена человека IGKV3-11*01 (кодирует SEQ ID NO: 24), и при этом каркасный участок варибельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с соответствующим каркасным участком варибельной области легкой цепи соответствующего мышинового антитела, и причем указанная аминокислотная модификация включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

14. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 39, и при этом каркасный участок варибельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с соответствующим каркасным участком варибельной области легкой цепи соответствующего мышинового антитела, и причем указанная аминокислотная модификация включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

15. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.13 или 14, отличающиеся тем, что указанная аминокислотная модификация дополнительно включает делецию аминокислоты в положении 31, при этом положение аминокислоты указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

16. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-15, содержащие константные области тяжелой и/или легкой цепи, причем указанная константная область тяжелой цепи человека выбрана из группы, включающей константные области иммуноглобулинов человека IGHG1, не фукозилированный IGHG1 и IGHG4.

17. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-16, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент выбраны из группы, включающей моновалентное антитело, полноразмерное антитело, Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, биспецифические одноцепочечные димеры Fv, диатела, триатела.

18. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-17, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит вариант области Fc, который содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с областью Fc исходного антитела, при этом указанное антитело, содержащее вариант области Fc, проявляет измененную эффекторную функцию по сравнению с исходным антителом.

19. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-18.

20. Экспрессионный вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.19.

21. Клетка-хозяин для получения антитела или фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-17, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п.19 или вектор по п.20.

22. Способ получения антитела или фрагмента указанного антитела, которые связываются с OX40 человека, по любому из пп.1-18, включающий культивирование клетки-хозяина по п.21 в условиях, обеспечивающих экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его фрагмент, и образование антитела или его фрагмента.

23. Композиция для лечения OX40-опосредованного расстройства, содержащая антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Иммуноконъюгат для лечения OX40-опосредованного расстройства, содержащий антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-18, соединенные с терапевтическим агентом.

25. Композиция для лечения OX40-опосредованного расстройства, содержащая иммуноконъюгат по

п.23 и фармацевтически приемлемый носитель.

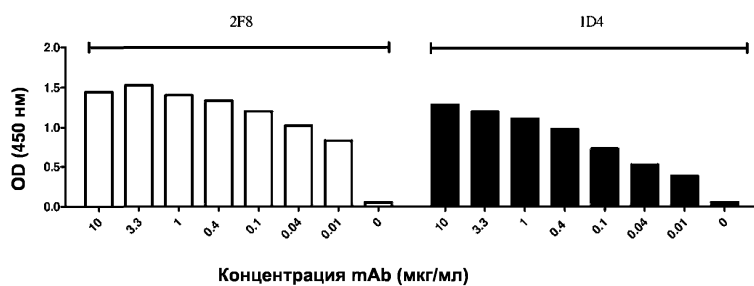
26. Применение антитела или фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-18 в качестве лекарственного средства для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

27. Применение антитела или фрагмента указанного антитела по любому из пп.1-18 для лечения реакции "трансплантат против хозяина".

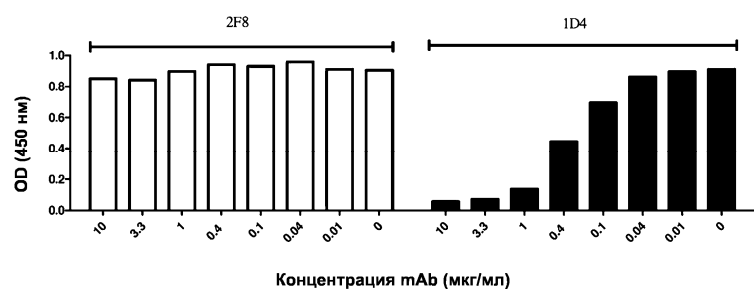
28. Набор, включающий антитело или фрагмент указанного антитела по любому из пп.1-18, композицию по п.23 или 25 или иммуноконъюгат по п.24 для лечения ОХ40-опосредованного расстройства и инструкцию по их применению.

29. Способ скрининга *in vitro* для определения пациента с низким уровнем экспрессии ОХ40, включающий этапы:

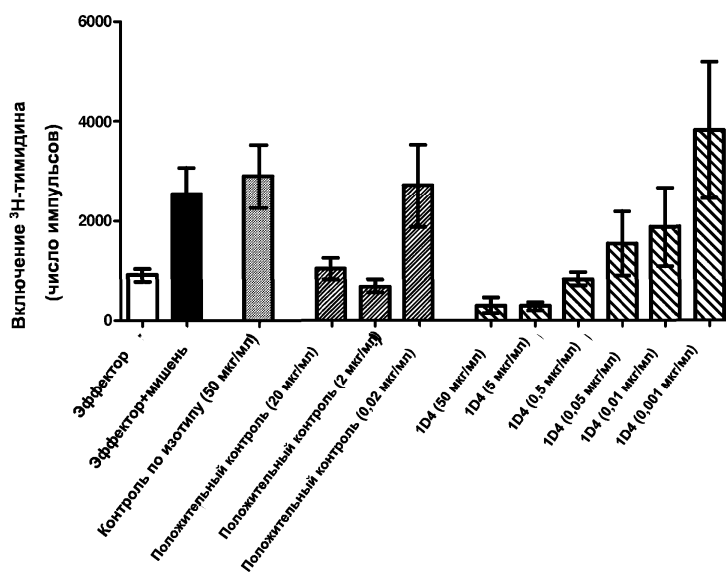
- (а) выделение мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) из образца крови пациента;
- (б) приведение в контакт указанных выделенных РВМС согласно (а) с антителом или фрагментом антитела по п.1 в условиях, при которых возможно образование комплекса между указанными антителом или фрагментом и ОХ40; и далее
- (с) осуществление последующего анализа РВМС способом проточной цитометрии и
- (д) определение количества ОХ40-положительных клеток среди CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-лимфоцитов и сравнение указанного количества с контрольными уровнями.



Фиг. 1А



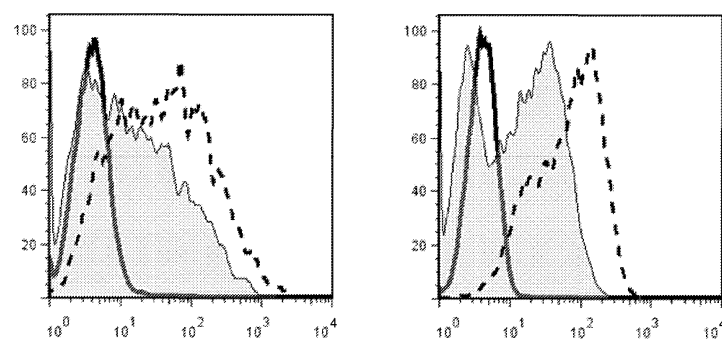
Фиг. 1В



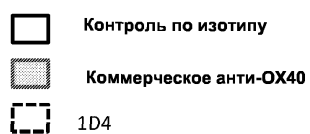
Фиг. 2

Активированные РВМС человека

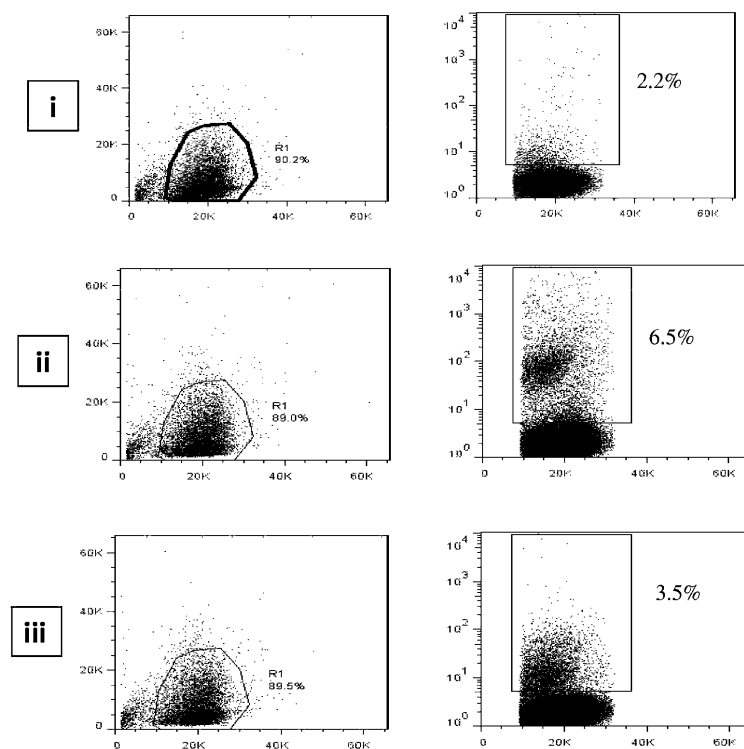
HPB-ALL



Флуоресценция окрашенного антитела

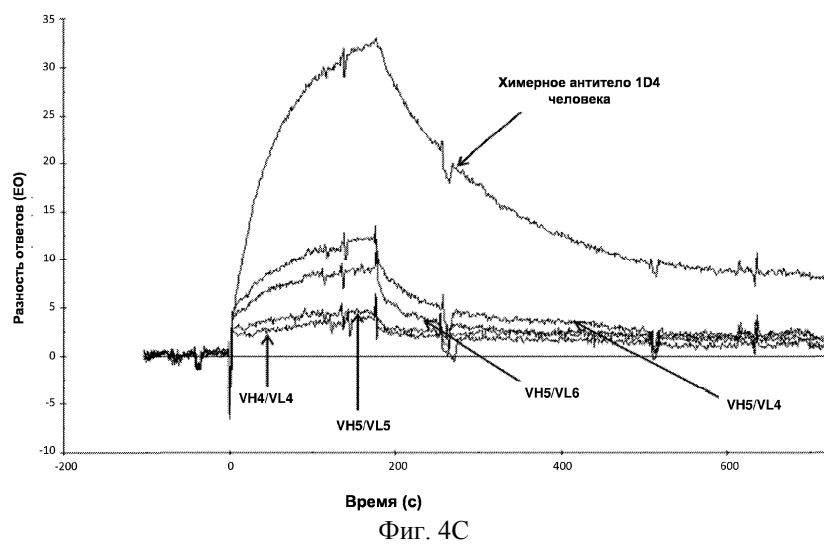
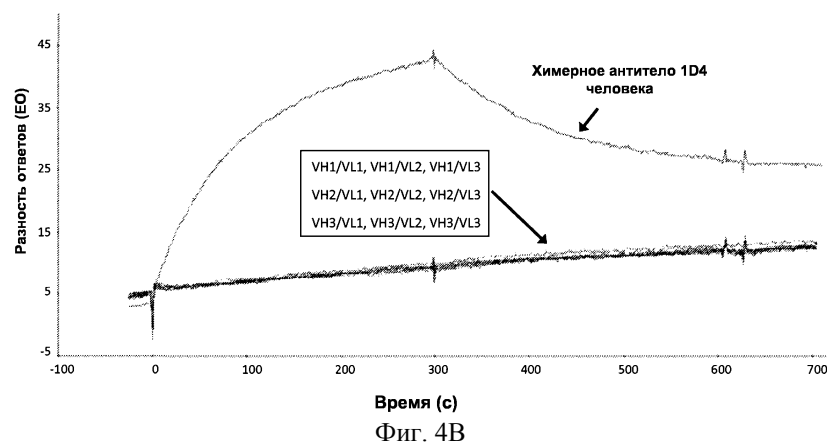
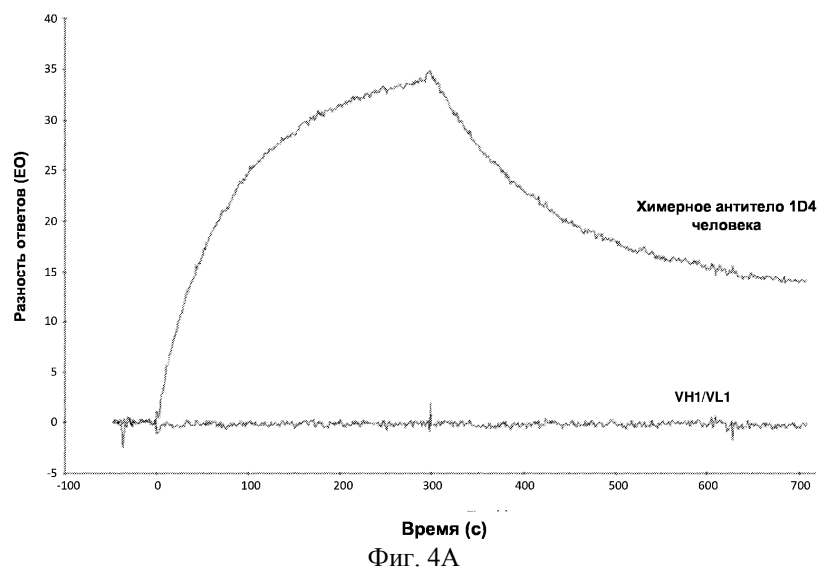


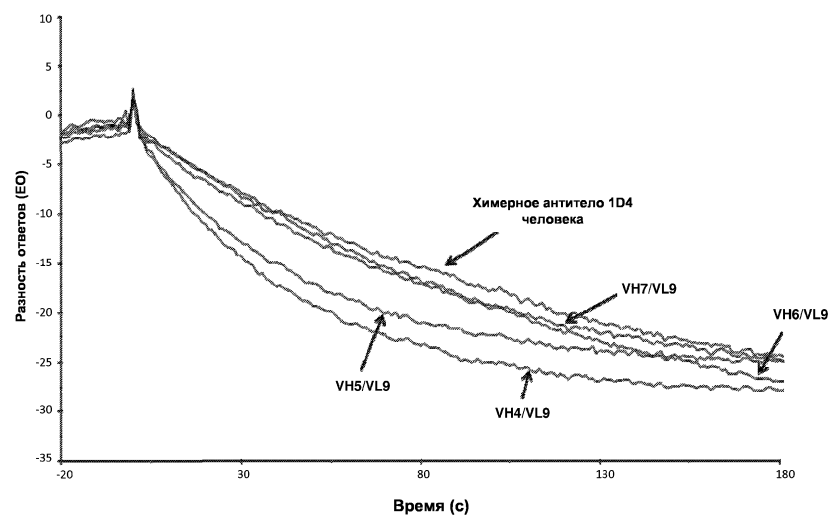
Фиг. 3А



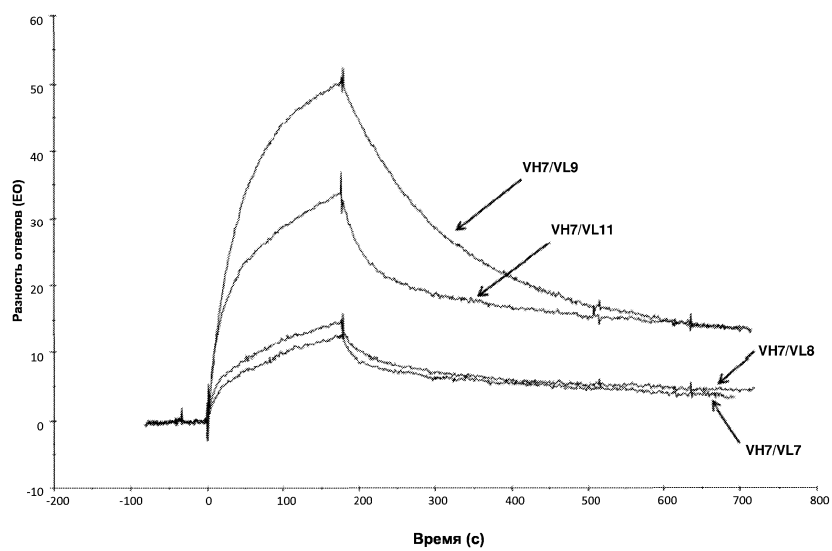
Фиг. 3В

036047

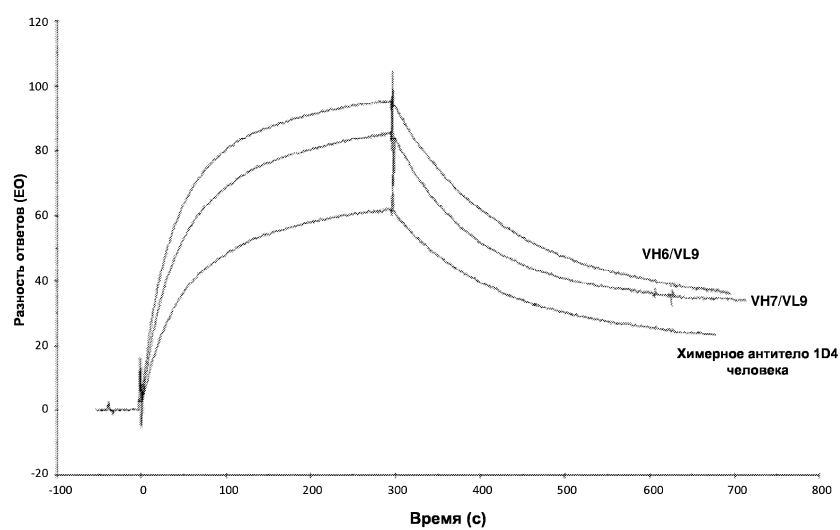




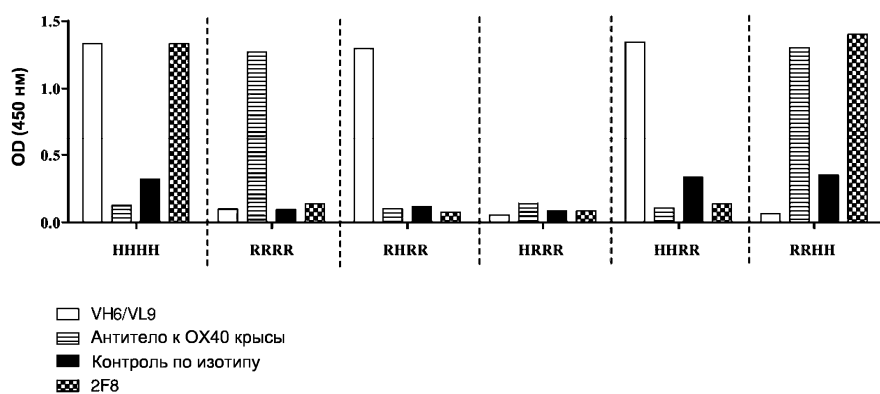
Фиг. 4D



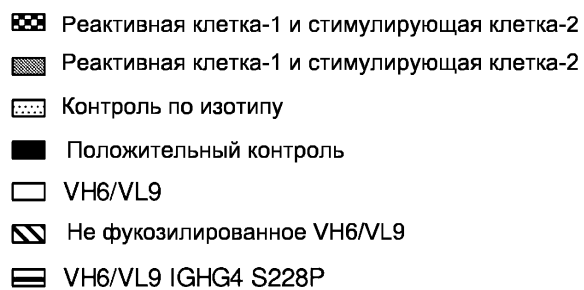
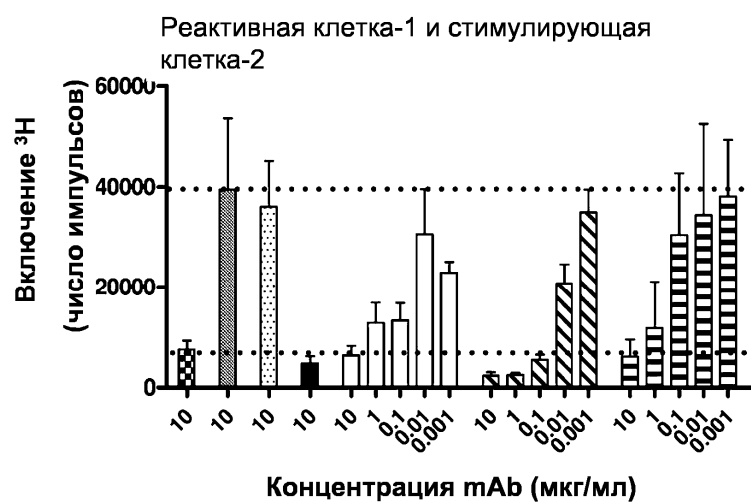
Фиг. 4E



Фиг. 4F

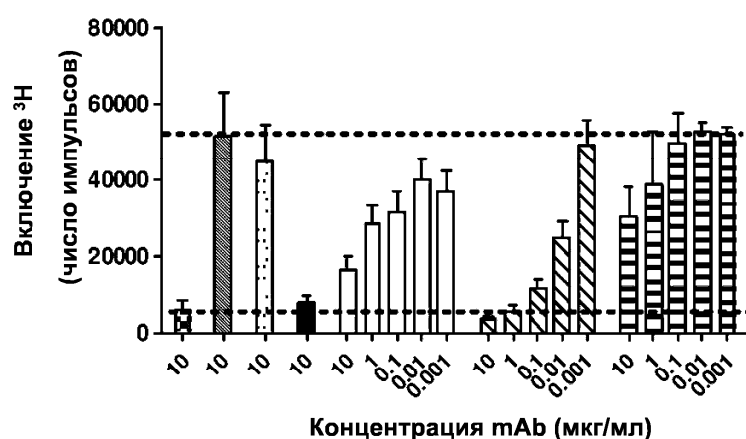


Фиг. 7



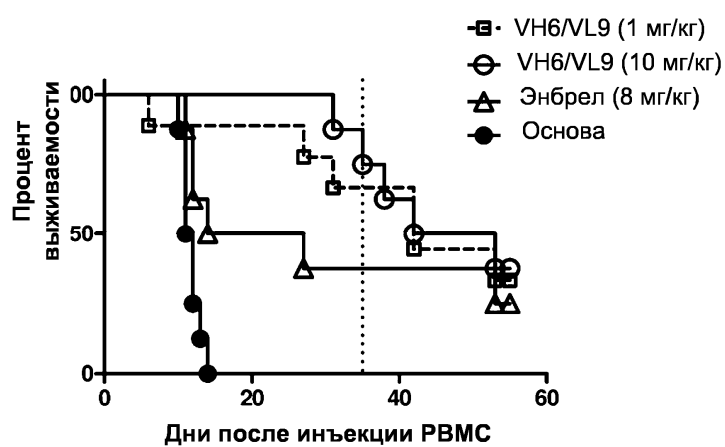
Фиг. 8А

Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1



- Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1
- Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1
- Контроль по изотипу
- Положительный контроль
- VH6/VL9
- ▨ Не фукозилированное VH6/VL9
- ▧ VH6/VL9 IGHG4 S228P

Фиг. 8B



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2