(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090533 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.05.26

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

(54) АНТИТЕЛА К OX40 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/168,377; 62/239,574; 62/264,691; 62/327,140; 62/333,556**
(32) **2015.05.29; 2015.10.09; 2015.12.08; 2016.04.25; 2016.05.09**
(33) **US**
(62) **201792572; 2016.05.26**

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Цай Чжэхун, Чакраборти Индрани, Гарсиа Мари-Мишель Наварро, Кемпе Томас Д., Корман Алан Дж., Кожич Александр Т., Лемар Хадиа, Море Марк, Милберн Кристина Мариа, Куигли Майкл, Родригес Мариа, Шао Сян, Сринивасан Мохан, Стивенс Бренда Л., Тудиум Кент, Вонг Сусань Чиэнь-Цзу, Гокмайер Йохем, Ван Си-Тао, Чан Хань, Хуанг Кристин, Джуре-Кункел Мария, Ян Чжэн, Феng Ян, Гуирналда Патрик, Лонберг Нилс, Барнхарт Брайан С., Ямнюк Аарон П., Хеннинг Карла А., Хан Мишель Миньхуа, Лей Мин (US), Швайцер Лианг (CN), Хэтчер Сандра В., Раджпал Арвинд, Аанур Правиин, Селби Марк Дж. (US)

(74) Представитель:
Глухарёва А.О., Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40. Также предусмотрено применение этих белков в терапевтических применениях, таких как лечение злокачественной опухоли. Дополнительно предусмотрены клетки, которые производят антитела, полинуклеотиды, кодирующие вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антител, и векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антител.

202090533 A2

202090533 A2

АНТИТЕЛА К OX40 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/333556, 62/327140, 62/264691, 62/239574 и 62/168377, поданных 9 мая 2016 г., 25 апреля 2016 г., 8 декабря 2015 г., 9 октября 2015 г. и 29 мая 2015 г., соответственно. Содержание вышеуказанной заявки включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

В настоящей заявке содержится список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 26 мая 2016 г., называется MXI_543PC_Sequence_Listing.txt и характеризуется размером 417528 байт.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

OX40 (TNFRSF4), также известный как ACT35, IMD16, TXGP1L и CD134, представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I размером 50 кД в семействе TNFSFR костимулирующих рецепторов, экспрессирующихся на активированных CD4+ Т-клетках. В контексте злокачественной опухоли экспрессирующие OX40 активированные Т-клетки обнаруживаются в инфильтрующих опухоли лимфоцитах. OX40 и его лиганд OX40-L играют решающую роль в индуцировании и поддержании ответов Т-клеток. Недавние исследования продемонстрировали полезность усиления противоопухолевой Т-клеточной функции для борьбы со злокачественной опухолью с ключевыми компонентами эффективного ответа, включающими в себя активацию CD4+ Т-клеток и продвижение сигналов выживания через Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки. Учитывая постоянную потребность в улучшенных стратегиях лечения таких заболеваний, как злокачественная опухоль, например, путем усиления иммунных ответов, таких как ответы Т-клеток, новые средства, которые модулируют ответы Т-клеток, такие как те, которые нацелены на OX40, а также способы лечения (например, комбинированные способы лечения), которые применяют такие средства, имели бы терапевтическую ценность.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе предусмотрены антитела, такие как человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с OX40 и обладают желательными функциональными свойствами. Эти свойства включают в себя высокую аффинность связывания с OX40 человека и OX40 яванского макака и способность стимулировать антигенспецифические Т-клеточные ответы, например, у субъектов-опухоленосителей. Также в настоящем документе предусмотрены способы обнаружения OX40 в образце.

Согласно одному аспекту в настоящем документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с OX40 и проявляют по меньшей мере одно из следующих свойств:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличение производства IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиление пролиферации Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкуренция за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкуренция за связывание с OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, например, антигенспецифический Т-клеточный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их

антигенсвязывающие части увеличивают производство цитокинов (например, IL-2 и/или IFN-γ) в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или увеличивают пролиферацию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с компонентом C1q комплемента человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела индуцируют опосредованный NK лизис активированных CD4+ Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело способствует опосредованному макрофагами фагоцитозу экспрессирующих OX40 клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело ингибирует регуляторное опосредованное Т-клетками подавление пролиферации CD4+ Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части связываются с Fc-рецепторами, такими как один или несколько активирующих FcγR. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие части индуцируют или усиливают активацию Т-клеток посредством многовалентного перекрестного сшивания.

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые специфически связываются с OX40 и содержат три CDR вариабельной области тяжелой цепи и три CDR вариабельной области легкой цепи, которые находятся в парах вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, выбранных из: SEQ ID NO: 318 и 94; SEQ ID NO: 17 и 18; 28 и 29; 28 и 30; 37 и 38; 48 и 49; 48 и 50; 57 и 58; 65 и 66; 73 и 74; 84 и 85; 84 и 86; 93 и 94.

Также в настоящем документе предусмотрены моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40 и содержат:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 11-13, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 14-16, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 51-53, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62-64, соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67-69, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 70-72, соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 78-80, соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81-83, соответственно, или

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно.

В настоящем документе предусмотрены моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40 и содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 318, 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93.

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40 и содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94.

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40 и содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 85%, например, на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100%, идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 318 и 94; 17 и 18; 28 и 29; 28 и 30; 37 и 38; 48 и 49; 48 и 50; 57 и 58; 65 и 66; 73 и 74; 84 и 85; 84 и 86; 93 и 94.

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40 и содержат последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 124 и 116; 95 и 96; 97 и 98; 99 и 100; 101 и 102; 103 и 104; 105 и 106; 107 и 108; 109 и 110; 111 и 112; 113 и 114; 115 и 116; 117 и 118; 119 и 120; 121 и 122; 123 и 116; 124 и 116; и 125 и 116.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части (a) связываются с одним и тем же эпитопом на OX40, как 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 или 20C1, или связываются с одним и тем же эпитопом на OX40, как 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 или 14A2-2, и (b) ингибируют связывание 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и/или 20C1 с OX40 на активированных Т-клетках по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, как измерено, например, посредством FACS.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части связываются в областях DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179) зрелой внеклеточной части OX40 человека (SEQ ID NO: 2). Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части связываются как с OX40 человека, так и с OX40 яванского

макака. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части не связываются с OX40 мыши и/или крысы.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части представляют собой антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианты. Согласно некоторым вариантам осуществления метиониновые остатки в областях CDR антител к OX40 или их антигенсвязывающих частей заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислению. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 содержат Fc, имеющий улучшенное связывание с активирующим FcγR.

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с OX40, содержащим модифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит шарнир IgG2 и по меньшей мере один из CH1, CH2 и CH3, который не представляет собой изотип IgG2.

Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125, или тяжелая цепь, которая отличается от нее не более чем на 10 аминокислот, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125.

Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122 , или легкая цепь, которая отличается от нее не более чем на 10 аминокислот, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102 , 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части не являются иммуногенными.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части не содержат аминокислотной последовательности, которая подвергается изомеризации. Например, если аминокислотная последовательность Asp-

Gly присутствует в последовательностях CDR тяжелой и/или легкой цепи антитела, последовательность заменена аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации. Согласно одному варианту осуществления антитело содержит последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 76, но причем Asp или Gly в последовательности Asp-Gly (LISY**DG**SRKHYADSVKG; SEQ ID NO: 76) заменен аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации, например, последовательностью Asp-Ser или Ser-Gly. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 88, но причем Asp или Gly в последовательности Asp-Gly (AIDT**DG**GTFYADSVRG; SEQ ID NO: 88) заменен аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации, например, последовательностью Ser-Gly, Asp-Ala или Ser-Thr.

В настоящем документе предусмотрены антитела, которые связываются с OX40, содержащим аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 282-296. Согласно одному варианту осуществления антитела содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 282-296.

В настоящем документе предусмотрены биспецифические молекулы, содержащие антитело к OX40, связанное с молекулой, характеризующейся второй специфичностью связывания.

В настоящем документе предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельные области тяжелых и/или легких цепей антител к OX40 или их антигенсвязывающих частей, векторы экспрессии, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки, трансформированные векторами экспрессии.

Предусмотренные в настоящем документе иммуноконъюгаты, содержащие описанные в настоящем документе антитела к OX40, связаны со средством.

В настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части, и носитель.

В настоящем документе предусмотрены наборы, содержащие антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части, и инструкции по применению. Согласно некоторым вариантам осуществления наборы дополнительно содержат антитело к CTLA4, антитело к PD-1 или к PD-L1.

В настоящем документе предусмотрен способ получения антител к OX40, предусматривающий экспрессию антитела к OX40 в клетке и выделение антитела из клетки.

В настоящем документе предусмотрен способ стимуляции антигенспецифического Т-клеточного ответа, предусматривающий контактирование Т-клетки с антителом к OX40 или его антигенсвязывающей частью, так что стимулируется антигенспецифический ответ Т-клеток.

В настоящем документе предусмотрен способ активирования или костимулирования Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки, предусматривающий контактирование клетки, например, эффекторной Т-клетки, с антителом к OX40 или его антигенсвязывающей частью и CD3, причем эффекторная Т-клетка активируется или костимулируется.

В настоящем документе предусмотрен способ увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ и/или пролиферации Т-клетки, предусматривающий контактирование Т-клетки с эффективным количеством антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части.

В настоящем документе предусмотрен способ увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ в Т-клетках у субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или конъюгата, содержащего антитело к OX40, или композиции, содержащей антитело к OX40, для увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ из Т-клеток.

В настоящем документе предусмотрен способ снижения или уменьшения количества регуляторных Т-клеток в опухоли нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или конъюгата, причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуется эффекторной или усиленной эффекторной функцией, для уменьшения количества регуляторных Т-клеток в опухоли.

В настоящем документе предусмотрен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или конъюгата субъекту, так что у субъекта стимулируется иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием опухоли и у него стимулируется иммунный ответ против опухоли.

В настоящем документе предусмотрен способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или конъюгата, так что у субъекта ингибируется рост опухоли.

В настоящем документе предусмотрен способ лечения злокачественной опухоли, например, путем иммунотерапии, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к OX40 или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или конъюгата, содержащего антитело к OX40, или композиции, содержащей антитело к OX40, для лечения злокачественной опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли матки/шейки матки, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичек, злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли толстой и прямой кишок, злокачественной опухоли толстой кишки, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли легких, злокачественной опухоли желудка, злокачественной опухоли половых клеток, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли кожи, новообразования центральной нервной системы, лимфомы, лейкоза, миеломы, саркомы и связанной с вирусом злокачественной опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, рефрактерную злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы дополнительно предусматривают введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств с антителом к OX40, например, антителом к PD1, антителом к LAG-3, антителом к CTLA-4 и/или PD- L1.

В настоящем документе предусмотрен способ обнаружения наличия OX40 в образце, предусматривающий контактирование образца с антителом к OX40 или его антигенсвязывающей частью в условиях, которые позволяют образовывать комплекс

между антителом или его антигенсвязывающей частью и OX40, и обнаружение образования комплекса.

В настоящем документе предусмотрено применение описанных в настоящем документе антител к OX40 для лечения злокачественной опухоли, стимуляции иммунного ответа у субъекта, стимуляции антигенспецифического ответа Т-клеток, активации или костимуляции Т-клетки, увеличения производства таких цитокинов, как IL-2 и/или IFN-γ, и/или пролиферации Т-клетки, уменьшения или снижения количества Т-регуляторных клеток в опухоли и/или ингибирования роста опухолевых клеток. Также в настоящем документе предусмотрено применение описанных в настоящем документе антител к OX40 для получения лекарственного средства для стимуляции иммунного ответа у субъекта, стимуляции антигенспецифического ответа Т-клеток, активации или костимуляции Т-клетки, увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ в Т-клетке и/или пролиферации Т-клетки, уменьшения или снижения количества регуляторных Т-клеток в опухоли и/или ингибирования роста опухолевых клеток.

В настоящем документе предусмотрен способ лечения солидной опухоли у человека, предусматривающий введение субъекту эффективного количества антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла вводится одна доза антитела к OX40 в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает дополнительное введение антитела к PD-1, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 302, причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две, три или четыре недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла вводится одна доза антитела к OX40 в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы

тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, а одну дозу антитела к PD-1 вводят в дозе 240, 360 или 480 мг или дозе приблизительно 240, 360 или 480 мг.

Согласно другому варианту осуществления способ предусматривает дополнительное введение антитела к CTLA-4, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, характеризующейся последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310, причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в три недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла одну дозу антитела к OX40 вводят в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, а одну дозу антитела к CTLA-4 вводят в дозе 1 мг/кг или дозе приблизительно 1 мг/кг, причем антитело к OX40 вводят вместе с антителом к CTLA-4 в течение по меньшей мере одного цикла с последующей монотерапией антитела к OX40 по меньшей мере в течение одного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение состоит из 8 циклов. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 вводят вместе с антителом к CTLA-4 в течение первых 4 циклов с последующей монотерапией антитела к OX40 в течение последних 4 циклов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит последовательности тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 124 и 116, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 или антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 составляются для внутривенного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 и к PD-1 или к CTLA-4 составляют вместе. Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40 и к PD-1 или к CTLA-4 составляют отдельно.

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение состоит из 8 циклов. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 или антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят в первый день каждого цикла.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят перед введением антитела к PD-1 или к CTLA-4. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 вводят приблизительно за 30 минут до введения антитела к PD-1 или

антитела к CTLA-4. Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 вводят после введения антитела к PD-1 или к CTLA-4. Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 вводят одновременно с антителом к PD-1 или к CTLA-4.

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение дает по меньшей мере один терапевтический эффект, выбранный из уменьшения размера опухоли, уменьшения количества метастатических поражений с течением времени, полного ответа, частичного ответа и стабильного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль связана со злокачественной опухолью, выбранной из группы, состоящей из злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли толстой кишки и злокачественной опухоли яичников.

Другие особенности и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

Краткое раскрытие графических материалов

На фиг. 1A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 126) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 17) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 3F4 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 12) и CDR3 (SEQ ID NO: 13) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 1B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 127) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 18) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 3F4 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 15) и CDR3 (SEQ ID NO: 16) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 2A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 128) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 28) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 14B6 (14B6-1 и 14B6-2) человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 19), CDR2 (SEQ ID NO: 20) и CDR3 (SEQ ID NO: 21) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 2B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 129) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 29) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 14B6-1 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID

NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 23) и CDR3 (SEQ ID NO: 24) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 2C показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 130) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 30) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 14B6-2 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 27) и CDR3 (SEQ ID NO: 28) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 3A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 131) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 37) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 23H3 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 31), CDR2 (SEQ ID NO: 32) и CDR3 (SEQ ID NO: 33) и показаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 3B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 132) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 38) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 23H3 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 35) и CDR3 (SEQ ID NO: 36) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 4A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 133) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 48) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 6E1 (6E1-1 и 6E1-2) человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 39), CDR2 (SEQ ID NO: 40) и CDR3 (SEQ ID NO: 41) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 4B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 134) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 49) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 6E1-1 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO: 43) и CDR3 (SEQ ID NO: 44) и показаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 4C показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 135) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 50) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 6E1-2 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 46) и CDR3 (SEQ ID NO: 47) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 5A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 136) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 57) вариабельной области тяжелой

цепи моноклонального антитела 18E9 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 51), CDR2 (SEQ ID NO: 52) и CDR3 (SEQ ID NO: 53) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 5B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 137) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 58) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 18E9 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 54), CDR2 (SEQ ID NO: 55) и CDR3 (SEQ ID NO: 56) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 6A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 138) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 65) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 8B11 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 59), CDR2 (SEQ ID NO: 60) и CDR3 (SEQ ID NO: 61) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 6B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 139) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 66) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 8B11 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 62), CDR2 (SEQ ID NO: 63) и CDR3 (SEQ ID NO: 64) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 7A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 140) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 73) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 20B3 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 67), CDR2 (SEQ ID NO: 68) и CDR3 (SEQ ID NO: 69) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 7B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 141) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 74) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 20B3 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 70), CDR2 (SEQ ID NO: 71) и CDR3 (SEQ ID NO: 72) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 8A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 142) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 84) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 75), CDR2 (SEQ ID NO: 76) и CDR3 (SEQ ID NO: 77) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 8B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 143) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 85) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 14A2-1 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 78), CDR2 (SEQ ID NO: 79) и CDR3 (SEQ ID NO: 80) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 8C показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 144) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 86) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 14A2-2 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 81), CDR2 (SEQ ID NO: 82) и CDR3 (SEQ ID NO: 83) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 9A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 145) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 93) вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 20C1 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 87), CDR2 (SEQ ID NO: 88) и CDR3 (SEQ ID NO: 89) и указаны производные V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 9B показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 146) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 94) вариабельной области легкой цепи каппа моноклонального антитела 20C1 человека. Обозначены области CDR1 (SEQ ID NO: 90), CDR2 (SEQ ID NO: 91) и CDR3 (SEQ ID NO: 92) и указаны производные V и J зародышевой линии.

На фиг. 10A показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 176) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 124) тяжелой цепи моноклонального антитела OX40.21 человека. Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 168) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 116) легкой цепи показаны на фиг. 10B.

На фиг. 11A-11D показаны кривые связывания и EC_{50} (в нМ) различных антител к OX40 для активированных Т-клеток человека с hIgG1 и вторичными антителами, служащими в качестве контролей, по данным FACS.

На фиг. 12A-12C показаны кривые связывания и EC_{50} (в нМ) различных антител к OX40 для активированных Т-клеток яванского макака с hIgG1 и вторичными антителами, служащими в качестве контролей, по данным FACS.

На фиг. 13A-13C показаны кривые связывания и K_D антитела к OX40, OX40.21, для активированных Т-клеток человека, клеток HEK293, сверхэкспрессирующих OX40

человека, и клеток CHO, сверхэкспрессирующих OX40 яванского макака, по оценке Скэтчарда.

На фиг. 14A показано иммуногистологическое окрашивание различных фиксированных ацетоном замороженных срезов ткани с помощью антител к OX40, OX40.8, OX40.6 и OX40.16. На изображениях показано характерное окрашивание при концентрации антител 1 мкг/мл для гиперплазийной миндалины и 5 мкг/мл для других тканей, за исключением OX40.16 при 10 мкг/мл в эндокарде и клапанах. В то время как все три антитела положительно окрашивали небольшое количество лимфоцитов в миндалине, OX40.8 также окрашивал подобные миофиламентам структуры в сердце и OX40.6 окрашивал сердечные мышцы, матрикс эндотелия/субэндотелия в небольших артериях в миндалинах и эндокарде и клапаны в сердце. GC, зародышевый центр; MZ, мантийная зона.

На фиг. 14B показано иммуноокрашивание различных фиксированных ацетоном замороженных срезов тканей человека антителом к OX40, OX40.21 (вариант OX40.16). На изображениях показано типичное окрашивание при концентрации антител 5 мкг/мл. Антитело позитивно окрашивало небольшое подмножество лимфоцитов в миндалине и тимусе. Позитивные клетки в миндалине были распределены в зародышевом центре, мантийной зоне и межфолликулярной области, тогда как позитивные клетки тимуса были в основном локализованы в мозговом слое. Никакого специфического окрашивания не наблюдалось в сердце, печени, почках и легких. GC, зародышевый центр; Me, мозговой слой; MZ, мантийная зона.

На фиг. 15A показано распределение инфильтрующих опухоли лимфоцитов OX40+ при гепатоцеллюлярной карциноме (HCC), колоректальной карциноме (CRC), плоскоклеточной карциноме головы и шеи (HNSCC) и меланоме (Mel). Оценивание вручную от 12 до 20 случаев для каждого типа опухоли проводили путем оценки количества положительных клеток под микроскопом при 20-кратном увеличении. Минимум, <1 клетки на поле объектива 20x; умеренное, 1 ~ <10 клеток на поле объектива 20x; среднее, 10 ~ <50 клеток на поле объектива 20x; заметное, 50 ~ < 200 клеток на поле объектива 20x; интенсивное > 200 клеток на поле объектива 20x.

На фиг. 15B и 15C показано иммуногистологическое окрашивание для CD3, FoxP3 и OX40 на соседних FFPE срезах из образцов колоректальной карциномы (CRC) и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC). На фиг. 15B показан вид с малой степенью увеличения, показывающий, что как OX40+, так и FoxP3 + TIL составляют небольшую фракцию CD3+ TIL и в основном распределены по строме опухоли. На фиг.

15C показан вид с более высокой степенью увеличения, показывающий потенциальную частичную совместную локализацию TIL OX40+ и FoxP3+ (Treg) в CRC.

На фиг. 16 показана способность различных антител к OX40 ингибировать связывание лиганда OX40 (OX40-L) с трансфицированными OX40 клетками 293 («клетки hOX40-293») с hIgG1 в качестве контроля.

На фиг. 17 суммируются блокирующие связи OX40-L между различными антителами к OX40.

На фиг. 18 показана способность различных антител к OX40 ингибировать связывание клона L106 антитела к OX40 с клетками hOX40-293, как оценивается с помощью FACS, только с меченными PE L106, меченными PE mIgG1 и неокрашенными клетками в качестве контроля.

На фиг. 19A-19C показана способность различных антител к OX40 ингибировать связывание конъюгированного с аллофикоцианином (APC) антитела OX40.1 с клетками hOX40-293 (фиг. 19A и 19B) или hOX40-HT1080 (фиг. 19C), как было оценено посредством FACS. hIgG1 и/или hIgG4 использовали в качестве контролей.

На фиг. 19D-19G показана способность различных антител к OX40 ингибировать связывание конъюгированного с биотином антитела OX40.4 или OX40.5 с клетками hOX40-293. hIgG1 и стрептавидин-APC использовали в качестве контролей.

На фиг. 19H суммируются эпитопные группы по отношению к OX40.1 на основе результатов, показанных на фиг. 19A-19C.

На фиг. 19I суммируются эпитопные группы по отношению к OX40.5 или OX40.4 на основе результатов, показанных на фиг. 19D-19G.

На фиг. 20A показано, что OX40.21 связывается только с нередуцированным OX40 человека, независимо от присутствия N-связанных сахаров.

На фиг. 20B и 20C показаны два N-гликопептида, которые идентифицировали путем пептидного картирования после дегликозилирования: заполняемость 60% как для AspN118 (фиг. 20B), так и для AspN12 (фиг. 20C).

На фиг. 20D показаны области в OX40, связанные OX40.16, OX40.21 и OX40.8.

На фиг. 20E показана идентификация пептидов, распознаваемых OX40.16, OX40.21 и OX40.8 с помощью ЖХ-МС.

На фиг. 21A-21D показано влияние различных антител к OX40 на пролиферацию первичных CD4+ Т-клеток человека при совместном культивировании с клетками CHO-CD3-CD32A. Только клетки CHO, только Т-клетки, клетки CHO, культивируемые только с Т-клетками, и hIgG1 использовали в качестве контролей.

На фиг. 22A-22D показано влияние различных антител к OX40 на секрецию интерферона гамма (IFN-γ) из первичных CD4+ Т-клеток человека, совместно культивируемых с клетками CHO-CD3-CD32A. Только клетки CHO, только Т-клетки, клетки CHO, культивируемые только с Т-клетками, и hIgG1 использовали в качестве контролей.

На фиг. 23A-23F показано влияние различных антител к OX40 на стимуляцию секреции IL-2 из первичных Т-клеток в культурах активируемых энтеротоксином B стафилококка (SEB) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, которые были выделены из разных доноров.

На фиг. 24 показано влияние различных антител к OX40 на индуцированный клеткой NK92 лизис активированных CD4+ клеток.

На фиг. 25A и 25B показано влияние различных антител к OX40 на опосредованный первичными NK-клетками лизис активированных CD4+ Т-клеток, выделенных из двух доноров посредством соотношений NK: целевые клетки.

На фиг. 26 показано влияние различных антител к OX40 на фагоцитоз клеток hOX40-293 первичными макрофагами человека.

На фиг. 27 показан уровень связывания компонента комплемента C1q человека с OX40.21. IgG1 и IgG1.1 (не имеющие эффекторных функций) использовали в качестве контролей.

На фиг. 28A-28C показано, что OX40 экспрессируется в инфильтрующих опухоли лимфоцитах, причем профиль, как правило, ограничен CD4+ клетками с минимальной экспрессией на CD8+ клетках.

На фиг. 28D показано, что OX40 экспрессируется CD4+ Т-клетками и регуляторными Т-клетками в опухолях Sa1N мышей.

На фиг. 28E показано, что OX40 экспрессируется CD4+ Т-клетками, CD8+ Т-клетками и регуляторными Т-клетками в опухолях MC38 мышей.

На фиг. 29 показана способность различных антител к OX40 к обратному опосредованному регуляторными Т-клетками (Treg) подавлению CD4+ Т-клеток человека. Как в присутствии, так и в отсутствии клеток Treg антитела к OX40 увеличивали пролиферацию иммунореактивных Т-клеток (Tresp) по сравнению с изотипическим контролем IgG1.

На фиг. 30A и 30B показано выведение внутривенно вводимого антитела OX40.6 от обезьян. Две из обезьян показали ускоренное выведение, которое коррелировало с образованием антител к лекарственным средствам.

Фиг. 31 представляет собой график, показывающий результаты пролиферации Т-клеток для процентной антигенности для различных антител к OX40, а также образцы контроля качества QC-1, QC-2 и QC-3.

На фиг. 32A-32C показано влияние различных изотипов химерного антитела OX86 (антитело, содержащее вариабельные области крысы OX86 и константную область мыши, которая не блокирует взаимодействие между OX40 и OX40-L, т.е. неблокирующее антитело) на противоопухолевую активность, измеренную изменениями объемов опухолей у отдельных мышей, подвергнутых воздействию этими изотипами (изотипы mIgG1 и mIgG2) в модели аденокарциномы толстой кишки MC38: (фиг. 32A) контрольное антитело IgG1 мыши («контроль»), (фиг. 32B) антитело mIgG1 OX86 («OX-40 mIgG1»), (фиг. 32C) антитело mIgG2 OX86 («OX-40 mIgG2a).

На фиг. 33A-33C показано влияние различных изотипов (mIgG1 и mIgG2a) антитела OX86 на количество CD4+ регуляторных Т-клеток в опухолях и периферии и на количество клеток в селезенке.

На фиг. 34A-34C показано влияние химерных антител OX86 с IgG1 человека на противоопухолевую активность, измеренную посредством изменений объемов опухолей у отдельных мышей, подвергнутых воздействию указанными антителами в модели аденокарциномы MC38 толстой кишки: (фиг. 34A) изотипический контроль человека IgG1 («изотип»), (фиг. 34B) химерное антитело OX86-hIgG1 («OX86-hG1»), (фиг. 34C) антитело OX86-hIgG1-S267E («OX86-hG1-S267E»). Замена S267E в hIgG1 увеличивает его эффекторную функцию за счет увеличения связывания с FcR (CD32A и CD32B). OX86-hIgG1 проявлял сильную противоопухолевую активность.

На фиг. 35A-35D показано влияние химерного антитела hIgG1 OX86 на истощение регуляторных Т-клеток.

На фиг. 36A-36E показано влияние блокирования (т.е. блокирования взаимодействия между OX40 и лигандом OX40) антитела хомячка к мышиному OX40 (8E5) в разных дозах на противоопухолевую активность путем изменения объемов опухолей у отдельных мышей, подвергнутых воздействию указанными антителами в подкожной опухолевой модели CT-26 мыши. (Фиг. 36A) контроль Ig хомяка, (фиг. 36B) 8E5 при 10 мг/кг, (фиг. 36C) 8E5 при 3 мг/кг, (фиг. 36D) 8E5 при 1 мг/кг, (фиг. 36E) 8E5 при 0,3 мг/кг.

На фиг. 37A-37D показано влияние комбинированной терапии с антителом OX86-rG1 и антителом к PD1 на противоопухолевую активность, измеренную посредством изменений объемов опухолей у отдельных мышей, подвергнутых воздействию

указанными антителами и комбинацией в модели аденокарциномы толстой кишки MC38: (фиг. 37A) изотипический контроль, (фиг. 37B) антитело к PD1, (фиг. 37C) OX86-rG1 («анти-OX40»), (фиг. 36D) OX86-rG1 + антитело к PD1 («анти-OX40 + анти-PD1»).

На фиг. 38A и 38B показан вторичный иммунный ответ *ex vivo* на KLH, CD69+, экспрессирующие CD4+CD8-Т-клетки, через 22 и 41 день, соответственно. Животных иммунизировали KLH в 1-й день исследования. Данные указывают на результаты отдельных животных (самцов и самок) в виде процентов CD4+CD8- Т-клеток. Горизонтальные полосы представляют собой групповые средние.

На фиг. 39 показано связывание антитела с Fab к his, захваченным белками FcγR-his. Ответы на связывание изображаются в виде процента от теоретического Rmax, предполагающего стехиометрию связывания mAb:FcγR как 1:1. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, указанном цветными легендами в нижней части слайда.

На фиг. 40 показано связывание антитела с Fab к his, захваченным белками FcgR-his. Ответы на связывание изображаются как процент от теоретического Rmax, предполагающего стехиометрию связывания mAb:FcγR как 1:1. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, указанном цветными легендами в нижней части слайда.

На фиг. 41A-41D показано влияние комбинированной терапии с агонистическим антителом к OX40 (OX86-rG1) и антителом к CTLA-4 (9D9-mG2b) на противоопухолевую активность, измеренную посредством изменений объемов опухолей у отдельных мышей, подвергнутых воздействию указанными антителами и комбинацией в модели аденокарциномы толстой кишки CT26: (фиг. 41A) изотипический контроль, (фиг. 41B) антитело к CTLA-4, (фиг. 41C) OX86-rG1, (фиг. 41D) OX86-rG1 + антитело к CTLA-4.

Фиг. 42 представляет собой схему протокола фазы 1/2a клинического испытания.

Фиг. 43 представляет собой схему графика визитов исследования для фазы 1/2a клинического испытания.

Подробное описание настоящего изобретения

В настоящем документе описаны выделенные антитела, в частности моноклональные антитела, например, человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с OX40 и, таким образом, активируют нисходящий сигнальный путь OX40 («агонистические антитела к OX40»). Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела характеризуются определенными функциональными особенностями и/или содержат определенные

структурные особенности, такие как области CDR, содержащие специфические аминокислотные последовательности. В настоящем документе предусмотрены выделенные антитела, способы получения таких антител к OX40, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы, содержащие такие антитела, и фармацевтические композиции, составленные для содержания антител. Также в настоящем документе предусмотрены способы применения антител для усиления иммунного ответа, отдельно или в комбинации с другими иммуностимулирующими средствами (например, антителами), и/или для терапии злокачественной опухоли. Соответственно, описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть использованы при лечении в широком спектре терапевтических применений, включая в себя, например, ингибирование роста опухоли и лечение вирусных инфекций.

Определения

Для того чтобы настоящее описание было более понятным, сначала определяются определенные термины. Дополнительные определения излагаются во всем подробном описании.

Используемый в настоящем документе термин «OX40» относится к рецептору, который является представителем суперсемейства рецепторов TNF, которые связываются с лигандом OX40 (OX40-L). OX40 также упоминается как надсемейство рецепторов фактора некроза опухолей, представитель 4 (TNFRSF4), ACT35, IMD16, TXGP1L и CD134. Термин «OX40» включает в себя любые варианты или изоформы OX40, которые естественным образом экспрессируются клетками. Соответственно, описанные в настоящем документе антитела могут перекрестно реагировать с OX40 от видов, отличных от человека (например, OX40 яванского макака). Альтернативно, антитела могут быть специфическими для OX40 человека и могут не проявлять перекрестной реактивности с другими видами. OX40 или любые его варианты и изоформы могут быть выделены из клеток или тканей, которые естественным образом экспрессируют их или рекомбинантно получают с использованием хорошо известных способов в настоящей области техники и/или описанных в настоящем документе.

Аминокислотная последовательность предшественника OX40 человека (учетный номер NP_003318.1) представлена в SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность внеклеточного домена зрелого OX40 человека представлена в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность OX40 яванского макака представлена в SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность OX40-L человека представлена в SEQ ID NO: 4.

Используемые в настоящем документе термины «Programmed Death 1», «Programmed Cell Death 1», «белок PD-1», «PD-1», «PD1», «PDCD1», «hPD-1» и «hPD-I» используются взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, видовые гомологи PD-1 человека и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Полную последовательность PD-1 можно найти под учетным номером GenBank U64863.

Термины «связанный с цитотоксическим Т-лимфоцитом антиген-4», «CTLA-4», «CTLA4», «антиген CTLA-4» и «CD152» (смотрите, например, Murata (1999) Am. J. Pathol. 155: 453-460) используются взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, видовые гомологи CTLA-4 человека и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA-4 (смотрите, например, Balzano (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 28-32). Полная последовательность CTLA-4 человека представлена в GenBank под учетным номером Ll 5006.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» может включать в себя целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. «антигенсвязывающие части») или их отдельные цепи. Согласно одному варианту осуществления «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. В некоторых встречающихся в природе антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. В некоторых встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или

факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфически связываются со своим родственным антигеном с высокой аффинностью, что отражается константой диссоциации (K_D) от 10^{-7} до 10^{-11} М или менее. Как правило, считается, что K_D более чем приблизительно 10^{-6} М указывает на неспецифическое связывание. Как используется в настоящем документе, антитело, которое «специфически связывается» с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и по существу идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает K_D 10^{-7} М или менее, предпочтительно 10^{-8} М или менее, еще более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее и наиболее предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-10} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является «по существу идентичным» данному антигену, если он проявляет высокую степень идентичности последовательности по отношению к данному антигену, например, если он характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97% или даже более предпочтительно по меньшей мере 99%, по отношению к последовательности данного антигена. В качестве примера антитело, которое специфически связывается с OX40 человека, может перекрестно реагировать с OX40 от некоторых видов нечеловекообразных приматов (например, яванского макака), но не может перекрестно реагировать с OX40 от других видов (например, OX40 мыши) или с антигеном, отличным от OX40.

Иммуноглобулин может быть любого из широко известных изотипов, включая в себя, без ограничения, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG подразделяется на подклассы у некоторых видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 относятся к подтипу IgG1 или IgG2. Иммуноглобулины, например, IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. «Антитело» может включать в себя, например, как природные, так и неприродные антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая часть» антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, OX40 человека). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть выполнена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела, например, описанного в настоящем документе антитела к OX40, включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, CL и CH1; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена V_H, и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, их можно объединить, используя рекомбинантные способы, синтетическим линкером, который позволяет им представлять собой одну белковую цепь, в которой пары областей V_L и V_H образуют одновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv), смотрите, например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин «антигенсвязывающая часть» антитела. Эти и другие потенциальные конструкции описаны в Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Эти фрагменты антител получают обычными способами, известными специалистам в настоящей области техники, и фрагменты подвергают скринингу на предмет полезности таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены способами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

«Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две разные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включающими в себя слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. Смотрите, например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность и аффинность связывания к конкретному эпитопу или композиции антител, в которых все антитела проявляют единственную специфичность и аффинность связывания к конкретному эпитопу. Как правило, такие моноклональные антитела будут получены из единственной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и будут увеличиваться в количестве без преднамеренного введения любых изменений последовательности. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к моноклональному антителу, которое содержит вариабельные и необязательные константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту осуществления человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной от трансгенных или трансхромосомных отличных от человека животных (например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и легкую цепь), с иммортализованной клеткой.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает в себя все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными средствами, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов человеческого иммуноглобулина или полученной из него гибридомы, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированные для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, вырабатываемые или выделенные любыми другими способами, которые включают в себя сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельные и константные области, которые используют определенные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируются генами зародышевой линии, но включают в себя последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в настоящей области техники (смотрите, например, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), вариабельная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируют с образованием антитела, специфического к чужеродному антигену. В дополнение к реаранжировке

вариабельная область может быть дополнительно модифицирована несколькими одиночными изменениями аминокислот (называемыми соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константная область будет изменяться в дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, реаранжированные и соматически мутированные последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичны исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого будут по существу идентичными или похожими (т.е. характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%).

«Человеческое» антитело (HuMAb) относится к антителу, содержащему вариабельные области, в которых как каркасная, так и CDR-области происходят от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит от последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Описанные в настоящем документе антитела могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайтоспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на последовательности каркаса человека. Термины «человеческие» антитела и «полностью человеческие» антитела и используются синонимично.

«Гуманизированное» антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR отличного от человеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, полученными из человеческих иммуноглобулинов. Согласно одному варианту осуществления гуманизированная форма антитела представляет собой антитело, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR являются неизмененными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, если они не отменяют способность антитела связываться с определенным антигеном.

«Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой исходного антитела.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором вариабельные области получены от одного вида, а константные области получены от другого вида, такого как антитело, в котором вариабельные области получены от мышиного антитела, а константные области происходят от человеческого антитела.

Используемый в настоящем документе термин «изотип» относится к классу антител (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

«Аллотип» относится к встречающимся в природе вариантам в определенной группе изотипов, варианты которых отличаются несколькими аминокислотами (смотрите, например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). Описанные в настоящем документе антитела могут быть любого аллотипа. Как используется в настоящем документе, антитела, обозначенные как изотип «IgG1f» или «IgG1.1f», представляют собой IgG1 и лишенные эффекторной функции антитела IgG1.1, соответственно, аллотипа «f», т.е. характеризующиеся 214R, 356E и 358M в соответствии с индексом EC как в Kabat, как показано, например, в SEQ ID NO: 5 (смотрите подчеркнутые остатки в SEQ ID NO: 5 в табл. 23).

Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное для антигена» в настоящем документе взаимозаменяемы с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, характеризующихся разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с OX40, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от OX40). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом OX40, может, однако, иметь перекрестную реактивность по отношению к другим белкам OX40 от разных видов.

Используемое в настоящем документе антитело, которое «ингибирует связывание OX40-L с OX40» предназначено для обозначения антитела, которое ингибирует связывание OX40-L с OX40, например, в анализах связывания с использованием клеток hOX40-293 с EC50 приблизительно 1 мкг/мл или менее, приблизительно 0,9 мкг/мл или менее, приблизительно 0,85 мкг/мл или менее, приблизительно 0,8 мкг/мл или менее,

приблизительно 0,75 мкг/мл или менее, приблизительно 0,7 мкг/мл или менее, приблизительно 0,65 мкг/мл или менее, приблизительно 0,6 мкг/мл или менее, приблизительно 0,55 мкг/мл или менее, приблизительно 0,5 мкг/мл или менее, приблизительно 0,45 мкг/мл или менее, приблизительно 0,4 мкг/мл или менее, приблизительно 0,35 мкг/мл или менее, приблизительно 0,3 мкг/мл или менее, приблизительно 0,25 мкг/мл или менее, приблизительно 0,2 мкг/мл или менее, приблизительно 0,15 мкг/мл или менее или приблизительно 0,1 мкг/мл или менее, в признанных в настоящей области техники способах, например, анализах связывания на основе FACS, описанных в настоящем документе.

«Эффекторная функция» относится к взаимодействию области Fc антитела с Fc-рецептором или лигандом или биохимическому событию, которое возникает из-за этого. Иллюстративные «эффекторные функции» включают в себя связывание с Clq, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, опосредованные FcγR эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP), и подавление рецептора клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR). Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы область Fc объединялась со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела).

«Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая в себя аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей, FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства FcγR человека представлены в таблице 1. Большинство типов врожденных эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как клетки натуральных киллеров (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и считается эквивалентным мышиному IgG2a по отношению к типам активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

Таблица 1. Свойства FcγR человека

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность к IgG человека	Предпочтение изотипа	Клеточное распределение
FcγRI	Ничего не описано	Высокая (K_D ~ 10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
FcγRIIA	H131	От низкой до средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

«Область Fc» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина) или «домен Fc» или «Fc» относится к С-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или на первом компоненте (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, область Fc содержит константную область антитела, исключающую первую константную область иммуноглобулина (например, CH1 или CL). В изотипах IgG, IgA и IgD антитела область Fc содержит константные домены C_{H2} и C_{H3} в каждой из двух тяжелых цепей антитела; области Fc IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены 2-4 в C_H) в каждой полипептидной цепи. Для IgG область Fc содержит домены иммуноглобулина Cγ2 и Cγ3 и шарнир между Cγ1 и Cγ2. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, область Fc тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбоксильного конца тяжелой цепи, причем нумерация соответствует индексу EC, как в Kabat. Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* National Institutes of Health, Bethesda, MD; смотрите также фиг. 3C-3F в публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0248028. Домен C_{H2} области Fc IgG человека простирается от приблизительно

аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как домен C_{H3} расположен на С-концевой стороне домена C_{H2} в области Fc, т.е. он простирается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 IgG. Как используется в настоящем документе, область Fc может представлять собой нативную последовательность Fc, включающую в себя любой аллотипический вариант, или вариант Fc (например, не встречающийся в природе Fc). Fc также может относиться к этой области выделенно или в контексте содержащего Fc белкового полипептида, такого как «связывающий белок, содержащий Fc-область», также называемый «Fc-слитым белком» (например, антитело или иммуноадгезин).

«Шарнир», «шарнирный домен» или «область шарнира» или «область шарнира антитела» относится к домену константной области тяжелой цепи, который соединяет домен CH1 с доменом CH2 и включает в себя верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al., J. Immunol., 1998, 161: 4083). Шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между связывающей и эффекторной областями антитела, а также обеспечивает сайты для межмолекулярного дисульфидного связывания между двумя константными областями тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, шарнир начинается с Glu216 и заканчивается на Gly237 для всех изотипов IgG (Roux et al., 1998 J Immunol 161: 4083). Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа показаны в таблицах 2 и 23.

Таблица 2. Аминокислоты области шарнира

Тип Ig	С-концевой C_H1*	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 188)	CPPCP (SEQ ID NO: 192)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG2	VDKTV (SEQ ID NO: 187)	ERK	CCVECPPCP (SEQ ID NO: 193)	APPVAG (SEQ ID NO: 201)

IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 189)	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$ (SEQ ID NO: 194)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 189)	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_2$ (SEQ ID NO: 195)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG3 (17-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 189)	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_1$ (SEQ ID NO: 196)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	EPKS (SEQ ID NO: 190)	CDTPPPCPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_2$ (SEQ ID NO: 197)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG3 (15)	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	EPKS (SEQ ID NO: 190)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO: 198)	APELLGG (SEQ ID NO: 200)
IgG4	VDKRV (SEQ ID NO: 186)	ESKYGPP (SEQ ID NO: 191)	CPSCP (SEQ ID NO: 199)	APEFLGG (SEQ ID NO: 200)

* С-концевые аминокислотные последовательности доменов CH1.

Термин «шарнир» включает в себя шарниры дикого типа (такие как те, что указаны в таблице 23), а также их варианты (например, не встречающиеся в природе шарниры или модифицированные шарниры). Например, термин «шарнир IgG2» включает в себя шарнир IgG2 дикого типа, как показано в таблице 23, и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, например, замены, делеции или добавления. Иллюстративные варианты шарнира IgG2 включают в себя шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) заменяются на другую аминокислоту. Согласно конкретному варианту осуществления IgG2 содержит замену C219S. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир представляет собой гибридный шарнир, который содержит последовательности по меньшей мере из двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир из одного изотипа и остальную часть шарнира из одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может представлять собой шарнир IgG2/IgG1 и может содержать, например, верхний и средний шарниры IgG2 и нижний

шарнир IgG1. Шарнир может характеризоваться эффекторной функцией или быть лишенным эффекторной функции. Например, нижний шарнир IgG1 дикого типа обеспечивает эффекторную функцию.

Термин «домен CH1» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей вариабельный домен с шарниром в константной области тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH1 начинается с A118 и заканчивается на V215. Термин «домен CH1» включает в себя домены CH1 дикого типа (такие как SEQ ID NO: 202 для IgG1 и SEQ ID NO: 203 для IgG2, таблица 23), а также их варианты (например, не встречающиеся в природе домены CH1 или модифицированные домены CH1). Например, термин «домен CH1» включает в себя домены CH1 дикого типа и варианты, характеризующиеся наличием 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, например, замены, делеции или дополнения. Иллюстративные домены CH1 включают в себя домены CH1 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни. Модификации домена CH1, которые влияют на биологическую активность антитела, приведены в настоящем документе.

Термин «домен CH2» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей шарнир с доменом CH3 в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH2 начинается с P238 и заканчивается на K340. Термин «домен CH2» включает в себя домены CH2 дикого типа (такие как SEQ ID NO: 204 для IgG1 и SEQ ID NO: 205 для IgG2, таблица 23), а также их варианты (например, не встречающиеся в природе домены CH2 или модифицированные CH2). Например, термин «домен CH2» включает в себя домены CH2 дикого типа и варианты, характеризующиеся наличием 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, например, замены, делеции или дополнения. Иллюстративные домены CH2 включают в себя домены CH2 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. Согласно некоторым вариантам осуществления домен CH2 содержит замены A330S/P331S, которые уменьшают эффекторную функцию. Другие модификации домена CH2, которые влияют на биологическую активность антитела, приведены в настоящем документе.

Термин «домен CH3» относится к константной области тяжелой цепи, которая находится к C-концу по отношению к домену CH2 в константной области тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH3 начинается с G341 и заканчивается

на K447. Термин «домен CH3» включает в себя домены дикого типа CH3 (такие как SEQ ID NO: 206 для IgG1 и SEQ ID NO: 207 для IgG2, таблица 23), а также их варианты (например, не встречающиеся в природе домены CH3 или модифицированные CH3). Например, термин «домен CH3» включает в себя домены CH3 дикого типа и варианты, характеризующиеся наличием 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, например, замены, делеции или дополнения. Иллюстративные домены CH3 включают в себя домены CH3 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни. Модификации домена CH3, которые влияют на биологическую активность антитела, приведены в настоящем документе.

«Нативная последовательность области Fc» или «нативная последовательность Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в природе. Нативные последовательности областей Fc человека включают в себя нативную последовательность области Fc IgG1 человека; нативную последовательность области Fc IgG2 человека; нативную последовательность области Fc IgG3 человека и нативную последовательность области Fc IgG4 человека, а также их встречающиеся в природе варианты. Нативная последовательность Fc включает в себя различные аллотипы Fc (смотрите, например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене (например, OX40), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в белковых антигенах могут образовываться как из смежных аминокислот (как правило, линейный эпитоп), так и из несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой белка (как правило, конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связываются данным антителом (например, картирование эпитопов), хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, анализы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, причем перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из OX40) испытывают на реактивность с данным антителом (например, антителом к OX40). Способы определения

пространственной конформации эпитопов включают в себя способы в настоящей области техники и описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию, двумерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (смотрите, например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,* Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин «картирование эпитопов» относится к процессу идентификации молекулярных детерминант антигена, участвующего в распознавании антитело-антиген.

Термин «связывается с одним и тем же эпитопом» применительно к двум или более антителам означает, что антитела связываются с одной и той же группой аминокислотных остатков, как определено данным способом. Техники определения того, связываются ли антитела с «одним и тем же эпитопом на OX40» с описанными в настоящем документе антителами, включают в себя известные в настоящей области техники способы картирования эпитопов, такие как рентгеновский анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, обеспечивающий атомное разрешение эпитопа и масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена (например, протеолитическими фрагментами) или с мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем эпитопного компонента (например, аланин-сканирующий мутагенез - Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081). Кроме того, можно также использовать вычислительные комбинаторные способы для картирования эпитопов. Эти способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Ожидается, что антитела, содержащие одинаковые или близкие VH и VL или одинаковые последовательности CDR1, 2 и 3, будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые «конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью», относятся к антителам, которые (частично или полностью) ингибируют связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом для связывания с мишенью, т.е., будет ли и в какой степени одно антитело ингибировать связывание другого антитела с мишенью, может быть определено с использованием известных конкурентных экспериментов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело представляет собой «блокирующее антитело» (т.е. холодное антитело, которое сначала инкубируется с мишенью). Конкурентные анализы могут проводиться, как описано, например, в Ed Harlow и David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 “Using Antibodies” by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседним эпитопом (например, о чем свидетельствует стерическое затруднение).

Другие известные в настоящей области техники конкурентные анализы связывания включают в себя: твердофазный прямой или косвенный радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или косвенный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (смотрите Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидин EIA (смотрите Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой меченый анализ, твердофазный прямой меченый сэндвич-анализ (смотрите Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой меченый RIA с использованием метки I-125 (смотрите Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидин EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)) и прямой меченый RIA (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Используемые в настоящем документе термины «специфическое связывание», «селективное связывание», «селективно связывается» и «специфически связывается» относятся к связыванию антитела с эпитопом на заранее определенном антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно менее чем 10^{-7} М, например, приблизительно менее чем 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, что определено, например, посредством технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе поверхностного плазмонного резонанса BIACORE 2000 (SPR) с использованием заранее определенного антигена, например, рекомбинантного OX40 человека, в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, и (ii) связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности к связыванию с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предопределенного антигена или близкородственного антигена. Соответственно, антитело, которое «специфически связывается с OX40 человека», относится к антителу, которое связывается с

растворимым или связанным с клеткой OX40 человека с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже. Антитело, которое «перекрестно реагирует с OX40 яванского макака», относится к антителу, которое связывается с OX40 яванского макака с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела, которые перекрестно не реагируют с OX40 от отличных от человеческих видов (например, OX40 мыши), демонстрируют практически необнаружимое связывание с этими белками в стандартных анализах связывания.

Используемый в настоящем документе термин «k_{assoc}» или «k_a» предназначен для обозначения константы скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как используемый в настоящем документе термин «k_{dis}» или «k_d» предназначен для обозначения константы скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Используемый в настоящем документе термин «K_D» предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации, которая получается из отношения k_d к k_a (т.е. k_d/k_a) и выражается в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в настоящей области техники. Предпочтительным способом определения K_D антитела является использование поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore® SPR или проточная цитометрия и анализ Scatchard.

Используемый в настоящем документе термин «высокая аффинность» для антитела IgG относится к антителу, характеризующемуся K_D 10^{-8} М или менее, более предпочтительно 10^{-9} М или менее и даже более предпочтительно 10^{-10} М или менее для целевого антигена. Однако связывание с высокой аффинностью может изменяться для других изотипов антител. Например, связывание с высокой аффинностью для изотипа IgM относится к антителу, имеющему K_D 10^{-7} М или менее, более предпочтительно 10^{-8} М или менее.

Термин «EC50» в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ, который составляет 50% от максимального ответа, т.е. находится посередине между максимальным ответом и исходным уровнем.

Термин «связывается с иммобилизованным OX40» относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с OX40, например, экспрессируемым на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

Используемый в настоящем документе термин «перекрестная реакция» относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с OX40 от другого вида. Например, описанное в настоящем документе антитело, которое связывается с OX40 человека, также может связываться с OX40 от другого вида (например, OX40 яванского макака). Как используется в настоящем документе перекрестная реакция может быть измерена путем обнаружения специфической реакционной способности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания с клетками, физиологически экспрессирующими OX40, или иным образом функционального взаимодействия с ними. Способы определения перекрестной реактивности включают в себя стандартные анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, с помощью анализа BIACORE® с поверхностным плазмонным резонансом (SPR) с использованием прибора SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) или проточной цитометрической техники.

Термин «встречающийся в природе», используемый в настоящем документе для применения к объекту, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая в себя вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, представляет собой встречающуюся в природе.

«Полипептид» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, без ограничения, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. «Белок» может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в настоящем документе термин «молекула нуклеиновой кислоты» предназначен для включения молекул ДНК и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также предусмотрены «консервативные модификации последовательностей», представленных в настоящем документе, например, в таблице 23, то есть модификации

нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, которые не отменяют связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащей аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные нуклеотидные и аминокислотные замены, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в последовательность в таблице 23 стандартными способами, известными в настоящей области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, содержащим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, были определены в настоящей области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, предсказанный несущественный аминокислотный остаток в антителе к OX40 предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют связывания с антигеном, хорошо известны в настоящей области техники (смотрите, например, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al. Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) и Burks *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)). Альтернативно, согласно другому варианту осуществления мутации могут быть введены случайным образом по всей или части кодирующей последовательности антитела к OX40, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела к OX40 можно подвергать скринингу для улучшения активности связывания.

Для нуклеиновых кислот термин «существенная гомология» указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, как правило, по

меньшей мере от 90 до 95% и более предпочтительно по меньшей мере от 98% до 99,5% нуклеотидов. Альтернативно, существенная гомология существует, когда сегменты будут гибридизоваться в условиях выборочной гибридизации с комплементарной цепью.

Для полипептидов термин «существенная гомология» указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими аминокислотными вставками или делециями по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, как правило, по меньшей мере приблизительно от 90 до 95% и более предпочтительно по меньшей мере от 98 до 99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, когда последовательности оптимально выровнены (т.е. % гомологии = количество одинаковых положений/общее количество положений x 100), с оптимальным выравниванием, определяемым с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием программы GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу http://www.gcg.com) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафом за открытие пропуска 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафом за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма Е. Мейерса и В. Миллера (CABIOS, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весовых замен остатков PAM120, штрафа за продление пропуска в размере 12 и штрафа за пропуск в последовательности 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по адресу http: // www.gcg.com), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, и штраф за открытие пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4,5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка могут также использоваться в качестве «запрашиваемой последовательности» для выполнения поиска по открытым базам данных, например, для идентификации связанных последовательностей. Такие поиски могут выполняться с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST может выполняться с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиски BLAST белка могут выполняться с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных описанным в настоящем документе белковым молекулам. Для получения содержащих пропуски выравниваний для целей сравнения может быть использована программа Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут применяться параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Смотрите www.ncbi.nlm.nih.gov.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота «выделяется» или «превращается в практически чистую» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков стандартными техниками, включающими в себя воздействие щелочами/SDS, бэндинг CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. Смотрите F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например кДНК, могут быть мутированы в соответствии со стандартными способами для обеспечения последовательностей генов. Для кодирующих последовательностей эти мутации могут при желании влиять на аминокислотную последовательность. В частности, предполагаются ДНК-последовательности, по существу гомологичные или происходящие из нативных V, D, J, констант, переключателей и других подобных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую

нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации и эписомального векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как «рекомбинантные экспрессионные векторы» (или просто «экспрессионные векторы»). В общем, экспрессионные векторы в способах рекомбинантной ДНК часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании «плазмида» и «вектор» могут быть взаимозаменяемы, поскольку плазмида представляет собой наиболее часто используемую форму вектора. Однако также включены другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (например, дефектные ретровирусы репликации, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, и, возможно, клетки, в которую встроен рекомбинантный экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут произойти в последующих поколениях из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным исходной клетке, но все еще включено в объем используемого в настоящем документе термина «клетка-хозяин».

Используемый в настоящем документе термин «антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой OX40 или его фрагмент. Антиген также может представлять собой опухолевый антиген, против которого требуются защитные или терапевтические иммунные ответы, например, антигены, экспрессируемые

опухолевой клеткой (например, для применения в качестве опухолевой вакцины, которую следует вводить в комбинации с антителом к OX40). Антигены включают в себя связанные с опухолью антигены для профилактики или лечения злокачественных опухолей. Примеры связанных с опухолью антигенов включают в себя, без ограничения, последовательности, содержащие все или часть последовательностей βhCG, gp100 или Pmel17, HER2/neu, WT1, мезотелина, CEA, gp100, MART1, TRP-2, Melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотипа, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, тирозиназы, теломеразы, SSX2 и MUC-1 и полученных из зародышевой линии опухолевых антигенов. Связанные с опухолью антигены также включают в себя антигены группы крови, например, антигены Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. Альтернативно, в конструкцию может быть включено более одного антигена. Например, антиген MAGE может быть объединен с другими антигенами, такими как меланин A, тирозиназа и gp100, наряду с адъювантами, такими как GM-CSF или IL-12, и связан с антителом к APC.

Последовательности вышеуказанных антигенов хорошо известны в настоящей области техники. Например, пример последовательности кДНК MAGE-3 представлен в патенте США № 6235525 (Институт исследований злокачественной опухоли Людвига); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка NY-ESO-1 представлены в патенте США № 5804381 и патенте США № 6069233 (Институт исследований злокачественной опухоли Людвига); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка Melan-A представлены в патентах США № 5620886 и № 5854203 (Институт исследований злокачественной опухоли Людвига); примеры последовательностей нуклеиновой кислоты и белка NY-BR-1 приведены в патентах США № 6774226 и № 5911529 (Институт исследований злокачественной опухоли Людвига), и примеры нуклеиновой кислоты и белковых последовательностей NY-CO-58 приведены в публикации международной заявки WO 02/90986 (Институт Людвига для исследования злокачественной опухоли); пример аминокислотной последовательности белка HER-2/neu доступен в GENBANK® с учетным номером AAA58637; и нуклеотидная последовательность (мРНК) для человеческого карциноэмбрионального антиген-подобного белка 1 (CEA-1) доступна в GENBANK® с учетным номером NM020219.

«Иммунный ответ» относится к биологическому ответу внутри позвоночного против чужеродных агентов, который защищает организм от этих агентов и вызванных ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием клетки иммунной системы

(например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки натурального киллера, макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, продуцируемыми любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или элиминации из организма позвоночных вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунная реакция включает в себя, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4+ или CD8+ Т-клетки, или ингибирование клетки Treg.

«Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к средству, например, компоненту сигнального пути, которое может быть включено в модуляцию, регуляцию или модификацию иммунного ответа. «Модуляция», «регуляция» или «модификация» иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или к активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которая может проявляться в увеличении или уменьшении числа различных типов клеток, увеличении или уменьшении активности этих клеток или любых других изменениях, которые могут возникать в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут характеризоваться улучшенной функцией в опухолевом микроокружении. Согласно предпочтительным вариантам осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. «Иммуномодулирующая мишень» или «иммунорегуляторная мишень» представляет собой иммуномодулятор, который нацелен на связывание и активность которого изменяется связыванием вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки («иммуномодулирующие рецепторы») и рецепторные лиганды («иммуномодулирующие лиганды»).

«Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего от заражения или подверженного риску заражения или страдающего от рецидива заболевания, посредством способа, предусматривающего индуцирование, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа.

«Иммуностимулирующая терапия» относится к терапии, которая приводит к увеличению (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, при лечении злокачественной опухоли.

«Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или мощности существующего иммунного ответа у субъекта. Это повышение эффективности и мощности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимулирования механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Клетки «Т-эффекторы» («T_{eff}») относятся к Т-клеткам (например, CD4+ и CD8+ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также к клеткам Т-хелперам (Th), которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают в себя регуляторные Т-клетки (клетки Treg). Описанные в настоящем документе антитела к OX40 активируют клетки T_{eff}, например, клетки CD4+ и CD8+ T_{eff}.

Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может быть результатом повышенной агонистической активности Т-клеточных костимулирующих рецепторов и/или повышенной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может быть отражена в увеличении в несколько раз EC_{50} или максимального уровня активности в анализе, который измеряет иммунный ответ, например, анализе, который измеряет изменения в высвобождении цитокинов или хемокинов, цитолитической активности (определяется непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно посредством обнаружения CD107a или гранзимов) и пролиферации. Способность стимулировать иммунный ответ или активность иммунной системы может быть повышена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз и более.

Используемый в настоящем документе термин «связанный» относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. рекомбинантно слитой). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра признанных в настоящей области техники способов, таких как химическая конъюгация и производство рекомбинантного белка.

Используемый в настоящем документе термин «введение» относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с

использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включают в себя, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интралимфатическую, внутричерепную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутрисуставную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может выполняться, например, однократно, многократно и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемый в настоящем документе термин «опосредуемый Т-клеткой ответ» относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая в себя эффекторные Т-клетки (например, клетки CD8+) и хелперные Т-клетки (например, клетки CD4+). Опосредованные Т-клетками ответы включают в себя, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

Используемый в настоящем документе термин «ответ цитотоксического Т-лимфоцита (CTL)» относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. CTL-ответы опосредуются в основном CD8+ Т-клетками.

Используемые в настоящем документе термины «ингибирует» или «блокирует» (например, ссылаясь на ингибирование/блокирование связывания OX40-L с OX40 на клетках) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 ингибирует связывание OX40-L с OX40 по меньшей мере приблизительно на 50%, например, приблизительно на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, что определено, например, как описано выше. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 ингибирует связывание OX40-L с OX40 не более чем

на 50%, например, приблизительно на 40, 30, 20, 10, 5 или 1%, что определено, например, как дополнительно описано выше.

Используемый в настоящем документе термин «ингибирует рост» опухоли включает в себя любое измеримое уменьшение роста опухоли, например, ингибирование роста опухоли по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 99% или 100%.

Используемый в настоящем документе термин «злокачественная опухоль» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые вторгаются в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» и «воздействие» относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому на субъекте или введению активного средства субъекту с целью обращения, облегчения, остановки, ингибирования или замедления или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, у которого нет заболевания, для предотвращения возникновения заболевания или минимизации его последствия, если это произойдет.

«Гематологическая злокачественность» включает в себя лимфому, лейкоз, миелому или лимфоидную злокачественность, а также злокачественную опухоль селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные лимфомы включают в себя как В-клеточные лимфомы (В-клеточную гематологическую злокачественную опухоль), так и Т-клеточные лимфомы. В-клеточные лимфомы включают в себя как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают в себя диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому лимфатической ткани слизистых оболочек, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекрывается с хроническим лимфоцитарным лейкозом), мантийноклеточную лимфому (MCL), лимфому Беркитта,

медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, интраваскулярную В-крупноклеточную лимфому, первичную эффузионную лимфому, лимфоматоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя внеузловую Т-клеточную лимфому, кожные Т-клеточные лимфомы, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластическую Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные новообразования также включают в себя лейкоз, такой как, без ограничения, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные новообразования дополнительно включают в себя миеломы, такие как, без ограничения, множественная миелома и тлеющая множественная миелома. Другие гематологические и/или связанные с В-клетками или Т-клетками виды злокачественных опухолей охватываются термином гематологическая злокачественность.

Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение ухудшения или инвалидности из-за заболевания.

В отношении солидных опухолей эффективное количество содержит количество, достаточное для того, чтобы вызвать сжатие опухоли и/или уменьшение скорости роста опухоли (например, для подавления роста опухоли) или для предотвращения или задержки другой нежелательной клеточной пролиферации. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для замедления развития опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива опухоли. Эффективное количество можно вводить в одном или нескольких введениях. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшать количество злокачественных клеток; (ii)

уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, сдерживать, замедлять до некоторой степени и может останавливать проникновение злокачественных клеток в периферические органы; (iv) ингибировать, т.е. замедлять до некоторой степени и останавливать метастазы опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать появление и/или рецидив опухоли и/или (vii) облегчать в какой-то мере один или несколько симптомов, связанных со злокачественной опухолью. В одном примере «эффективное количество» представляет собой количество антитела к OX40 и количество антитела к PD-1 (например, ниволумаба) или антитела к CTLA-4 (например, ипилимумаба), в комбинации, которое, как доказано клинически, влияет на значительное снижение злокачественной опухоли или замедление прогрессирования злокачественной опухоли, такой как распространенная солидная опухоль. Используемые в настоящем документе термины «фиксированная доза», «постоянная доза» и «постоянная фиксированная доза» используются взаимозаменяемо и относятся к дозе, которая вводится пациенту без учета массы или площади поверхности тела (BSA) пациента. Поэтому фиксированная или постоянная доза не предусмотрена в виде дозы мг/кг, а скорее как абсолютное количество средства.

Используемый в настоящем документе термин «основанная на площади поверхности тела (BSA) доза» относится к дозе, которая корректируется по отношению к площади поверхности тела (BSA) отдельного пациента. Основанная на BSA доза может быть предусмотрена в виде мг/кг массы тела. Были опубликованы различные расчеты для получения BSA без непосредственного измерения, наиболее широко используемым из которых является формула Дюбуа (смотрите Du Bois D, Du Bois EF (Jun 1916) *Archives of Internal Medicine* 17 (6): 863-71 и Verbraecken, J. et al. (Apr 2006). *Metabolism — Clinical and Experimental* 55 (4): 515–24). Другие иллюстративные формулы BSA включают в себя формулу Мостеллера (Mosteller RD. *N Engl J Med*., 1987; 317:1098), формулу Хайкока (Haycock GB, et al., *J Pediatr* 1978, 93:62-66), формулу Гехана и Джорджа (Gehan EA, George SL, *Cancer Chemother Rep* 1970, 54:225-235), формулу Бойда (Current, JD (1998), *The Internet Journal of Anesthesiology* **2** (2) и Boyd, Edith (1935), University of Minnesota. The Institute of Child Welfare, Monograph Series, No. x. London: Oxford University Press), формулу Фуджимото (Fujimoto S, *et al*., Nippon Eiseigaku Zasshi 1968;5:443-50), формулу Такахиры (Fujimoto S, *et al*., Nippon Eiseigaku Zasshi 1968;5:443-50) и формулу Шлиха (Schlich E, *et al*., Ernährungs Umschau 2010;57:178-183).

«Профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная дозировка» лекарственного средства представляет собой количество

лекарственного средства, которое при введении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или страдающему от рецидива заболевания, препятствует развитию или рецидиву заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства стимулировать регрессию заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с использованием различных способов, известных практикующему специалисту, например, у людей во время клинических испытаний, в системах моделей животных, предсказывающих эффективности у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера противоопухолевое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование злокачественной опухоли или способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до степени устранения злокачественной опухоли. «Способствование регрессии злокачественной опухоли» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в сочетании с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, предотвращению ухудшения или инвалидности из-за заболевания или ухудшения симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемо низкому уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном, органном и/или организменному уровне (побочные эффекты), возникающим в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60 % и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно не подвергнутых лечению субъектов. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, то есть предпочтительно

ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить, используя описанные ниже анализы. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить, исследуя способность соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных квалифицированному практику. Согласно другим описанным в настоящем документе предпочтительным вариантам осуществления регрессия опухоли может наблюдаться и может продолжаться в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 дней или даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 дней.

Термины «пациент» и «субъект» относятся к любому человеку или отличному от человека животному, получающему либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, описанные в настоящем документе способы и композиции могут применяться для лечения субъекта или пациента со злокачественной опухолью, такой как распространенная солидная опухоль. Термин «отличное от человека животное» включает в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как нечеловекообразные приматы, овцы, собаки, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. д.

Различные описанные в настоящем документе аспекты более подробно описаны в следующих подразделах.

I. Антитела к OX40

В настоящем документе описаны антитела, например, полностью человеческие антитела, которые характеризуются конкретными функциональными особенностями или свойствами. Например, антитела специфически связываются с OX40 человека. Кроме того, антитела могут перекрестно реагировать с OX40 от одного или нескольких нечеловекообразных приматов, таких как OX40 яванского макака. Такие антитела применимы при лечении злокачественной опухоли при использовании в качестве монотерапии или при использовании в комбинации с иммуно-онкологическим средством, таким как антитело к PD-1 (например, ниволумаб) или антитело к CTLA-4 (например, ипилимумаб).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 демонстрируют одно или несколько или все из следующих функциональных свойств:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено с помощью анализа BIACORE® SPR;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличение производства IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40Т-клетках и/или (ii) усиление пролиферации Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкурирование за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкурирование за связывание с OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Предпочтительно, антитела связываются с OX40 с высокой аффинностью, например, с K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М или от 10^{-9} М до 10^{-7} М Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 связывается с растворимым OX40 человека, например, как определено с помощью анализа BIACORE® SPR, с K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М, от 10^{-9} М до 10^{-7} М или от 10^{-8} М до 10^{-7} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 связывается со связанным (например, связанным с клеточной мембраной) OX40 человека, например, на активированных Т-клетках человека, например, как определено посредством проточной цитометрии, с KD 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-8} М, от 10^{-10} М до 10^{-8} М, от 10^{-9} М до 10^{-8} М, от 10^{-11} М до 10^{-9} М или от 10^{-10} М до 10^{-9} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40

связываются со связанным (например, связанным с клеточной мембраной) OX40 человека, таким как активированные Т-клетки человека, например, как определено посредством FACS, с EC_{50} 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-8} М, от 10^{-10} М до 10^{-8} М, от 10^{-9} М до 10^{-8} М, от 10^{-11} М до 10^{-9} М или от 10^{-10} М до 10^{-9} М. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 связывается с растворимым OX40 человека с K_D 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М, от 10^{-9} М до 10^{-7} М или от 10^{-8} М до 10^{-7} М, и со связанным с клеточной мембраной OX40 человека с K_D или EC_{50} 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-8} М, от 10^{-10} М до 10^{-8} М, 10^{-9} М до 10^{-8} М, от 10^{-11} М до 10^{-9} М или от 10^{-10} М до 10^{-9} М.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут связываться с OX40 яванского макака, например, связываться с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, от 100 нМ до 0,01 нМ, от 100 нМ до 0,1 нМ, 100 нМ до 1 нМ или от 10 нМ до 1 нМ, например, как измерено посредством FACS (например, как описано в примерах).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут стимулировать или усиливать иммунный ответ, например, путем активации клеток T_{eff}, ограничивая подавление клеток Т-эффекторов клетками Treg, истощая и/или ингибируя опухолевые клетки Treg и/или активируя NK-клетки, например, в опухоли. Например, антитела к OX40 могут активировать или костимулировать клетки T_{eff}, о чем свидетельствуют, например, усиленная секреция цитокинов (например, IL-2 и IFN-γ) и/или усиленная пролиферация. Согласно некоторым вариантам осуществления также обеспечивается стимуляция CD3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело OX40 увеличивает секрецию IL-2 на 50%, 100% (то есть в 2 раза), в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз и более, необязательно с максимумом до 10 раз, 30 раз, 100 раз, как измерено, например, на первичных человеческих Т-клетках или Т-клетках, экспрессирующих OX40 человека (например, как описано далее в примерах). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело OX40 увеличивает секрецию IFN-γ на 50%, 100% (то есть в 2 раза), в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз и более, необязательно с максимумом до 10 раз, 30 раз, 100 раз, как измерено, например, на первичных человеческих Т-клетках или Т-клетках, экспрессирующих OX40 человека (например, как описано дополнительно в примерах).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут ингибировать связывание OX40L человека с OX40 человека на клетках, например, клетках 293, экспрессирующих OX40 человека (т.е. клетках hOX40-293), например, с EC_{50} 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ или от 0,1 нМ до 1 нМ (смотрите пример 6).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются с эпитопом на OX40, как определено, например, путем связывания с фрагментами OX40 человека. Например, согласно некоторым вариантам осуществления антитело связывается со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) OX40 человека (SEQ ID NO: 2), как определено, например, посредством HDX или путем связывания антител с фрагментами OX40 человека с последующим ферментативным расщеплением (смотрите пример 11). Согласно другим вариантам осуществления антитело связывается со всей или частью последовательности DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 182).

Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности PCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 183).

Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), дополнительно связываются со всей или частью последовательности QLCTATQDTVCR (SEQ ID NO: 184).

Согласно дополнительным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYN (SEQ ID NO: 185).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут конкурировать за связывание с OX40 (или ингибировать связывание) с антителами к OX40, содержащими CDR или вариабельные области, описанные в настоящем документе, например, 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1 -2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и/или 20C1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 ингибируют связывание 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2

и/или 20C1 с OX40 человека по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или на 100%. Согласно некоторым вариантам осуществления 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 ингибируют связывание антител к OX40 с OX40 человека по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или на 100%.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела индуцируют или усиливают активацию Т-клеток с многовалентным сшиванием посредством, например, связывания FcR. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются многовалентными, например, двухвалентными. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела не являются одновалентными.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела характеризуются 1, 2, 3, 4, 5 или 6 следующими признаками:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено с помощью анализа BIACORE® SPR;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличение производства IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиление пролиферации Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкурирование за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкурирование за связывание с OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Соответственно, будет понятно, что антитело, которое проявляет одно или несколько из этих функциональных свойств (например, биохимическую,

иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другую биологическую активность или тому подобное), как определено в соответствии с известными в настоящей области техники методиками и описано в настоящем документе, имеет отношение к статистически значимой разнице в конкретной активности по сравнению с отсутствием антитела (например, или когда присутствует контрольное антитело к нерелевантной специфичности). Предпочтительно, антитело к OX40 увеличивает измеренный параметр (например, пролиферацию Т-клеток, производство цитокинов) по меньшей мере на 10% от измеренного параметра, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (т.е. в 2 раза), в 3 раза, в 5 раз или в 10 раз. И наоборот, антитело может уменьшать измеренный параметр (например, объем опухоли, связывание OX40-L с OX40, количество регуляторных Т-клеток в опухолях) по меньшей мере на 10% от измеренного параметра, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, 95% или 99%.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител к OX40 различных видов известны в настоящей области техники, включая в себя, например, ELISA, Вестерн-блоты и RIA. Соответствующие анализы подробно описаны в примерах. Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценить стандартными анализами, известными в настоящей области техники, такими как анализ BIACORE® SPR. Анализы для оценки влияния антител на функциональные свойства OX40 (например, связывание лиганда, пролиферацию Т-клеток, производство цитокинов) описаны более подробно ниже и в примерах.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 не представляют собой нативные антитела или не представляют собой природные антитела, например, антитела к OX40 с посттрансляционными модификациями, которые отличаются от антител, которые встречаются в природе, например, меньше или другой тип посттрансляционной модификации.

II. Иллюстративные антитела к OX40

Конкретные описанные в настоящем документе антитела представляют собой антитела, например, моноклональные антитела, содержащие последовательности CDR и/или вариабельной области антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 -1, 14A2-2 и 20C1, выделенные и структурно охарактеризованные, как описано в примере 1, а также антитела, характеризующиеся идентичностью по меньшей

мере на 80% (например, идентичностью по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) по отношению к последовательностям вариабельной области или CDR антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1. Аминокислотные последовательности V_H 3F4, 14B6 (14B6-1 и 14B6-2), 23H3, 6E1 (6E1-1 и 6E1-2), 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93, соответственно. Аминокислотные последовательности V_L 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 приведены в SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94, соответственно.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащая вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93.

Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94.

В настоящем документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащая последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 17 и 18; 28 и 29; 28 и 30; 37 и 38; 48 и 49; 48 и 50; 57 и 58; 65 и 66; 73 и 74; 84 и 85; 84 и 86; 93 и 94.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут содержать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 или их комбинации. Аминокислотные последовательности CDR1 V_H в 3F4, 14B6 (14B6-1 и 14B6-2), 23H3, 6E1 (6E1-1 и 6E1-2), 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_H в 3F4, 14B6 (14B6-1 и 14B6-2), 23H3, 6E1 (6E1-1 и 6E1-2), 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76 и 88, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_H в 3F4, 14B6 (14B6-1 и 14B6-2), 23H3, 6E1 (6E1-1 и 6E1-2), 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89. Аминокислотные последовательности CDR1 V_L в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11,

20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_L в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82 и 91, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_L в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 представлены в SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92, соответственно. Области CDR очерчиваются с использованием системы Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Учитывая, что каждое из этих антител связывается с OX40 и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном областями CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L могут быть «смешанными и сопоставленными» (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и сопоставлять, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, 2 и 3 V_H и CDR1, 2 и 3 V_L) для создания других связывающих антител к OX40. Связывание OX40 таких «смешанных и сопоставленных» антител может быть исследовано с использованием анализов связывания, описанных выше и в примерах (например, ELISA). Предпочтительно, когда последовательности CDR VH смешивают и сопоставляют, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H заменяется структурно подобной последовательностью(ями) CDR. Аналогично, когда последовательности CDR V_L смешивают и сопоставляют, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L предпочтительно заменяется структурно подобной последовательностью(ями) CDR. Специалисту в настоящей области техники будет очевидно, что новые последовательности V_H и V_L могут быть созданы путем замены одной или нескольких последовательностей областей CDR V_H и/или V_L структурно подобными последовательностями из последовательностей CDR, раскрытых в настоящем документе для моноклональных антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1. «Смешанные и сопоставленные» антитела, обладающие связывающей аффинностью, биологической активностью и/или другими свойствами, эквивалентными или превосходящими специфические раскрытые в настоящем документе антитела, могут быть выбраны для применения в способах по настоящему изобретению.

В настоящем документе предусмотрены выделенные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие:

(a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87;

(b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76 и 88;

(c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89;

(d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90;

(e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82 и 91; а также

(f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92;

причем антитело специфически связывается с OX40 человека.

Согласно одному варианту осуществления антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем области CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержат: SEQ ID NO: 11-13; 19-21; 31-33; 39-41; 51-53; 59-61; 67-69; 74-77; 87-89 и 87, 317 и 89, соответственно;

причем антитело специфически связывается с OX40 человека.

Согласно другому варианту осуществления антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем области CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи содержат: SEQ ID NO: 14-16; 22-24; 25-27; 34-36; 42-44; 45-47; 54-56; 62-64; 70-72; 78-80; 81-83 и 90-92, соответственно;

причем антитело специфически связывается с OX40 человека.

Согласно конкретному варианту осуществления антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем антитело содержит:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 11-13, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 14-16, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 51-53, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62-64, соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67-69, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 70-72, соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 78-80, соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81-83, соответственно; или

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

причем антитело специфически связывается с OX40 человека.

Согласно другому варианту осуществления антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, причем антитело содержит:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 11-13, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 14-16, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 51-53, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 62-64, соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 67-69, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 70-72, соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 78-80, соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 81-83, соответственно; или

(м) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 87-89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 90-92, соответственно.

Домен VH или одна или несколько описанных в настоящем документе его CDR могут быть связаны с константным доменом для образования тяжелой цепи, например, полноразмерной тяжелой цепи. Аналогично, домен VL или одна или несколько описанных в настоящем документе CDR могут быть связаны с константным доменом для образования легкой цепи, например, полноразмерной легкой цепи. Полноразмерная тяжелая цепь (за исключением С-концевого лизина (K) или за исключением С-концевого глицина и лизина (GK), которые могут отсутствовать) и полноразмерная легкая цепь объединяются, чтобы образовать полноразмерное антитело. N-концевые остатки глутамина и глутамата также могут быть превращены в остатки пироглутамата как в легкой, так и в тяжелой цепях.

Описанный в настоящем документе домен VH может быть слит с константным доменом IgG человека, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые представляют собой либо встречающиеся в природе, либо модифицированные, например, как описано далее. Например, тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность любого описанного в настоящем документе домена VH, слитого с аминокислотной последовательностью IgG1 человека, представленной в SEQ ID NO: 5.

Константный домен IgG1 человека также может представлять собой аллотипический вариант. Например, аллотипический вариант IgG1 содержит R107K, E189D и M191L (подчеркнуто выше, с нумерацией согласно таковой в последовательности SEQ ID NO: 6). В полноразмерной области тяжелой цепи эти аминокислотные замены характеризуются номерами R214K, E356D и M358L.

Описанный в настоящем документе домен VL может быть слит с константным доменом легкой цепи каппа или лямбда человека. Например, легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность любого описанного в настоящем документе домена VL, слитого с аминокислотной последовательностью легкой цепи каппа IgG1 человека, представленной в SEQ ID NO: 7.

Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи содержит лизин или другую аминокислоту на С-конце, например, она содержит следующие последние аминокислоты: LSPGK (SEQ ID NO: 8) для тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область тяжелой цепи не содержит одну или несколько аминокислот на С-конце и характеризуется наличием, например, С-концевой последовательности LSPG (SEQ ID NO: 9) или LSP.

Аминокислотные последовательности иллюстративных тяжелых и легких цепей приведены в таблице 23 и соответствуют SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125 для тяжелых цепей и SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122 для легких цепей.

Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 70% идентична любой из тяжелых или легких цепей, представленных в таблице 23 (или их вариабельным областям), например, SEQ ID NO: 95 и 96; 97 и 98; 99 и 100; 101 и 102; 103 и 104; 105 и 106; 107 и 108; 109 и 110; 111 и 112; 113 и 114; 115 и 116; 117 и 118; 119 и 120; 121 и 122; 123 и 116; 124 и 116; и 125 и 116, могут быть использованы для образования антител к OX40 человека, имеющих требуемые характеристики, например, такие, как дополнительно описаны в настоящем документе. Иллюстративные варианты представляют собой варианты, содержащие аллотипическую вариацию, например, в константной области, и/или мутацию в вариабельной или константной областях, такую как описанные в настоящем документе мутации. Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем на 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислоту (путем замены, добавления или делеции) от любой из тяжелых или легких цепей, представленных в таблице 23 (или их вариабельных областей), могут быть использованы для образования антител к OX40 человека, имеющих желаемые характеристики, например, тех, которые описаны далее в настоящем документе.

Согласно различным вариантам осуществления описанные выше антитела проявляют одно или несколько, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или все следующие функциональные свойства:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено с помощью Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличение производства IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиление пролиферации Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкурирование за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкурирование за связывание с OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Такие антитела включают в себя, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются с аминокислотными остатками в следующей области зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2):

DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178),

соответствующей аминокислотным остаткам 46-62 зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются с аминокислотными остатками в следующей области зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2):

DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179),

соответствующей аминокислотным остаткам 89-124 зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 182).

Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), связываются со всей или частью последовательности PCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 183).

Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), дополнительно связываются со всей или частью последовательности QLCTATQDTVCR (SEQ ID NO: 184).

Согласно дополнительным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), дополнительно связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYN (SEQ ID NO: 185).

Модифицированные константные домены тяжелой цепи

Константная область тяжелой цепи описанных в настоящем документе антител к OX40 может быть любого изотипа, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или их комбинаций и/или их модификаций. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 содержат модифицированную константную область тяжелой цепи, которая изменяет свойства антитела.

Как обсуждалось дополнительно в настоящем документе и в примерах, сшивание антител к OX40 с немодифицированными константными областями hIgG1 (антителами изотипа hIgG1) индуцирует передачу сигналов OX40 и способствует активации Т-клеток и, в частности, способствует пролиферации Т-клеток, секреции IFN-γ и секреции IL-2. Сшивание может происходить посредством, например, связывания с рецепторами Fcγ CD32A человека (FcγR), экспрессируемыми на поверхности трансфицированных клеток CHO в анализе с использованием совместных культур клеток CHO-CD3-CD32A и

первичных CD4 Т-клеток человека. Сшивание также может происходить, например, путем добавления растворимого поликлонального антитела Fcγ человека в культурах активированных энтеротоксином B стафилококка (SEB) мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC).

Антитела к OX40 с модифицированными константными областями тяжелой цепи (например, константной области IgG1, причем область CH1/шарнир заменена на CH1/шарнирную область hIgG2) может иметь способность изменять активности антител относительно антител с константной областью тяжелой цепи полностью IgG1. Иллюстративные виды активности, которые могут быть изменены, включают в себя, без ограничения: (1) активацию Т-клеток в присутствии или отсутствии сшивания, (2) пролиферацию Т-клеток в присутствии или отсутствии сшивания и/или (3) секрецию цитокинов (например, IFN-γ, IL-2) в присутствии или в отсутствие сшивания. Описанные в примерах способы могут быть использованы для определения того, обладают ли антитела к OX40 с модифицированными константными областями тяжелой цепи этими измененными видами активности (смотрите, например, пример 27). Согласно предпочтительным вариантам осуществления эти измененные активности не оказывают существенного влияния на антигенсвязывающие свойства антител, которые могут быть оценены с использованием, например, FACS, SPR).

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы изменения активности антител к OX40, предусматривающие антитело к OX40, которое содержит шарнир не-IgG2, и замену шарнира не-IgG2 на шарнир IgG2. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир изотипа IgG2 («шарнир IgG2») и домен CH1, CH2 и CH3. Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и домен CH1, CH2 и CH3, причем по меньшей мере один из доменов CH1, CH2 и CH3 не относится к изотипу IgG2. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2 дикого типа, например, человеческий шарнир IgG2 дикого типа (например, ERKCCVECPPCPAPPVAG, SEQ ID NO: 208) или его вариант, при условии, что шарнир IgG2 сохраняет способность придавать антителу измененную активность относительно того же антитела, которое содержит шарнир не-IgG2. Согласно некоторым вариантам осуществления вариант шарнира IgG2 сохраняет ту же жесткость или твердость, что и шарнир IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира может быть определена, например, путем компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (ЯМР),

рентгеновской кристаллографии (B-факторы) или ультрацентрифугирования для аналитического исследования скорости осаждения (AUC) для измерения или сравнения радиуса гирации антител, содержащих шарнир. Шарнир может характеризоваться сходной или более высокой жесткостью относительно другого шарнира, если антитело, содержащее шарнир, имеет значение, полученное в одном из описанных в предыдущем предложении тестов, которое отличается от значения того же антитела с другим шарниром, например, шарниром IgG1, менее чем на 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100%. Специалист в настоящей области техники сможет определить из тестов, характеризуется ли шарнир по меньшей мере аналогичной жесткостью по отношению к другому шарниру, интерпретируя результаты этих испытаний. Иллюстративный вариант шарнира IgG2 человека представляет собой шарнир IgG2, который содержит замену одного или нескольких из четырех остатков цистеина (т.е. C219, C220, C226 и C229). Цистеин может быть замещен серином. Иллюстративный шарнир IgG2 представляет собой шарнир IgG2 человека, содержащий мутацию C219S (например, ERKSCVECPPCPAPPVAG, SEQ ID NO: 209). Другие варианты шарнира IgG2, которые могут быть использованы, включают в себя шарниры IgG2 человека, содержащие замену C220, C226 и/или C229, например, мутацию C220S, C226S или C229S (которая может быть объединена с мутацией C219S). Петля IgG2 также может представлять собой шарнир IgG2, в котором часть шарнира представляет собой часть другого изотипа (т.е. он представляет собой химерный шарнир), при условии, что жесткость химерного шарнира по меньшей мере аналогична жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2, в котором нижний шарнир (как определено в таблице 2) характеризуется изотипом IgG1 и представляет собой, например, нижний шарнир IgG1 дикого типа. Дополнительные мутации IgG2, которые могут быть использованы в шарнире IgG2, включают в себя мутации SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF и GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E).

«Гибридный» или «химерный» шарнир относится к конкретному изотипу, если к этому изотипу относится более половины последовательных аминокислот шарнира. Например, шарнир, содержащий верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1, считается шарниром IgG2.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит шарнир IgG2, содержащий одну из следующих последовательностей:

ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 208);

ERKSCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 209);
ERKCSVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 210);
ERKXCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 211);
ERKCXVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 212);
ERKCCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 213);
ERKSCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 214);
ERKCSVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 215);
ERKXCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 216);
ERKCXVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 217);
ERKCCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 218);
ERKSCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 219);
ERKCCSVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 220);
ERKXCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 221);
ERKCXVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 222);
ERKCCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 223);
ERKSCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 224);
ERKCCSVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 225);
ERKXCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 226);
ERKCXVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 227);
ERKCCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 228);
ERKSCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 229);
ERKCSVECPPCPAP (SEQ ID NO: 230);
ERKXCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 231); или
ERKCXVECPPCPAP (SEQ ID NO: 232),

где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением цистеина,

или любую из вышеуказанных последовательностей, в которых 1-5, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота вставлена между аминокислотными остатками CVE и CPP. Согласно некоторым вариантам осуществления вводится THT или GGG. Согласно некоторым вариантам осуществления 1, 1-2 или 1-3 аминокислоты вставлены между шарниром и доменом CH2. Например, глицин может быть вставлен между шарниром и доменом CH2.

Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211 или 212, где 1, 2, 3 или все 4 аминокислоты P233, V234, A235 и G237 (соответствующие C-концевой аминокислоте 4 «PVAG» (SEQ ID NO: 233) удаляются или заменяются другой аминокислотой, например, аминокислотами C-конца шарнира

IgG1 (ELLG (SEQ ID NO: 234) или ELLGG (SEQ ID NO: 235) Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211 или 212, причем V234, A235 и G237 удаляются или заменяются другой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211 или 212, причем A235 и G237 удаляются или заменяются другой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211 или 212, причем G237 удаляется или заменяется другой аминокислотой. Согласно некоторым вариантам осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 447, 448, 449, 450 или 451, причем V234 и A235 удаляется или заменяется другой аминокислотой. Замена PVAG (SEQ ID NO: 233) в IgG2 соответствующими аминокислотами шарнира IgG1, т.е. (ELLG (SEQ ID NO: 234) или ELLGG (SEQ ID NO: 235)) для получения гибридного шарнира, например, показанного выше, который обеспечивает шарнир, характеризующийся преимуществами шарнира IgG2 и эффекторную функцию шарниров IgG1.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир, который состоит по существу из одной из последовательностей, показанных выше, например, любой из SEQ ID NO: 208-232, и согласно некоторым вариантам осуществления не содержит дополнительных аминокислотных остатков шарнира.

Согласно некоторым вариантам осуществления константная область модифицированной тяжелой цепи содержит домен CH1, который представляет собой домен CH1 дикого типа изотипа IgG1 или IgG2 («домен CH1 IgG1» или «домен CH1 IgG2», соответственно). Также могут быть использованы домены CH1 изотипов IgG3 и IgG4 («домен CH1 IgG3» и« домен CH1 IgG2», соответственно). Домен CH1 также может представлять собой вариант домена CH1 дикого типа, например, вариант домена Ig1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты доменов CH1 включают в себя A114C и T173C и/или C131, например, C131S.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH2, который представляет собой домен CH2 дикого типа изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 («домен CH2 IgG1», «домен CH2 IgG2», «домен CH2 IgG3» или «домен CH2 IgG4», соответственно). Домен CH2 также может представлять собой вариант домена CH2 дикого типа, например, вариант домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты доменов CH2 включают в себя варианты, которые модулируют биологическую активность области Fc антитела,

такую как ADCC или CDC, или модулируют период полужизни антитела или его стабильность. Согласно одному варианту осуществления домен CH2 представляет собой домен IgG1 CH2 человека с мутацией A330S и P331S, причем домен CH2 снижает эффекторную функцию по сравнению с тем же доменом CH2 без мутации. Другие мутации далее излагаются в другом месте настоящего документа.

Согласно некоторым вариантам осуществления модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH3, который представляет собой домен CH3 дикого типа изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 («домен CH3 IgG1», «домен CH3 IgG2», «домен CH3 IgG3» или «домен CH3 IgG4», соответственно). Домен CH3 также может представлять собой вариант домена CH3 дикого типа, например, вариант домена CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты доменов CH3 включают в себя варианты, которые модулируют биологическую активность области Fc антитела, например ADCC или CDC, или модулируют период полужизни антитела или его стабильность.

Как правило, варианты доменов CH1, шарнира, CH2 или CH3 могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций и/или не более чем 10, 9, 8, 7 , 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, или 1-10 или 1-5 мутаций, или содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 96%, 97%, 98% или 99% идентична соответствующему домену дикого типа (домену CH1, шарниру, CH2 или CH3, соответственно) при условии, что константная область тяжелой цепи, содержащая конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

В таблице 3 представлены иллюстративные константные области тяжелой цепи человека, содержащие домены CH1, шарнира, CH2 и/или CH3 человека, причем каждый домен представляет собой либо домен дикого типа, либо его вариант, который обеспечивает желаемую биологическую активность у константной области тяжелой цепи. Незаполненная ячейка в таблице 3 указывает на то, присутствует ли домен или нет, и если он присутствует, может быть любого изотипа, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, антитело, содержащее константную область 1 тяжелой цепи в таблице 3, представляет собой антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере шарнир IgG2, и который также может содержать домен CH1, CH2 и/или CH3, и если он присутствует, то домен CH1, CH2 и/или CH3 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В качестве еще одного примера для понимания таблицы 3 антитело, содержащее константную область 8 тяжелой цепи, представляет собой антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую домен

CH1 IgG1 и шарнир IgG2, домен CH2 IgG1 и которое может содержать или не содержать CH3, который, если присутствует, может иметь изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Таблица 3. Иллюстративные конфигурации константных областей тяжелой цепи человека

MHCCR*	**CH1**	**Шарнир**	**CH2**	**CH3**
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

* Модифицированная константная область тяжелой цепи

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит константную область тяжелой цепи, показанную в таблице 3, и может характеризоваться измененной активностью относительно того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которое не содержит эту конкретную константную область тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, показанную в таблице 3 или 4, может характеризоваться измененной активностью относительно того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2 или такой же шарнир IgG2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, показанную в таблице 3 или 4, может характеризоваться измененной активностью относительно того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая содержит шарнир не IgG2 и содержит, например, шарнир IgG1, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, показанную в таблице 3 или 4, может характеризоваться измененной активностью относительно того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит один или несколько одинаковых доменов CH1, шарнира, CH2 или CH3. Например, согласно некоторым вариантам осуществления антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, показанную в таблице 3 или 4, может характеризоваться измененной активностью относительно того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2 и домен CH1, CH2 и/или CH3 конкретного изотипа. Например, антитело, содержащее константную область 22 тяжелой цепи, показанную в таблице 3, может характеризоваться измененной активностью относительно (i) того же антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2, а содержит, например, шарнир не-IgG2 (например, шарнир IgG1, IgG3 или IgG4); (ii) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2 и CH1 IgG1, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH1 не-IgG1; (iii) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2 и CH2 IgG2, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH2 не-IgG2; (iv) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH3 не-IgG1; (v) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит

шарнир IgG2, CH1 IgG1 и CH2 IgG2, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH1 не-IgG1, и/или CH2 не-IgG2; (vi) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2, CH1 IgG1 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH1 не-IgG1, и/или CH3 не-IgG1; (vii) того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2, CH2 IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH2 не-IgG2 и/или CH3 не-IgG1; (viii) или того же самого антитела, содержащего константную область тяжелой цепи, которая не содержит шарнир IgG2, CH1 IgG1, CH2 IgG2 и CH3 IgG1, а содержит, например, шарнир не-IgG2 и/или CH1 не-IgG1, и/или CH2 не-IgG2, и/или CH3 не-IgG1.

Иллюстративные модифицированные константные области тяжелой цепи, которые могут быть связаны с вариабельными областями анти-OX40, например, описанными в настоящем документе вариабельными областями, представлены в таблице 4, в которой изложена идентификация каждого из доменов.

Таблица 4: Иллюстративные модифицированные константные области тяжелой цепи

Модифицированные константные области тяжелой цепи	**CH1**	**Шарнир**	**CH2**	**CH3**	**SEQ ID NO целой MHCCR**
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO: 202	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:240	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	SEQ ID NO:244
IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:202	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:238	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:245
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1 дикого типа	IgG2C219S/IgG1	IgG1 дикого типа	IgG1 дикого типа	SEQ ID NO:246

	SEQ ID NO:202	SEQ ID NO:241	SEQ ID NO:204	SEQ ID NO:206	
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:202	IgG2 C219S SEQ ID NO:239	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:247
IgG2-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:240	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:248
IgG2-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:238	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:249
IgG2CS-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:241	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:250
IgG2CS-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2 C219S SEQ ID NO:239	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:204	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:251
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:202	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:238	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:243	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO: 252
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:202	IgG2 C219S SEQ ID NO:239	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:243	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO: 253

IgG2-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:238	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:243	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:254
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:203	IgG2 C219S SEQ ID NO:239	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:243	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:206	SEQ ID NO: 255

Дополнительные иллюстративные модифицированные константные области тяжелой цепи представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Конструкции	**SEQ ID NO константной области**	**Описание**
IgG1f	256	IgG1f дикого типа
IgG1.1f	257	стандартный инертный IgG1.1f
IgG2.3	258	форма IgG2 A (C219S)
IgG2.5	259	форма IgG2 B (C131S)
IgG2.3G1-KH	260	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG2.5G1-KH	261	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 IgG2.5, все остальные IgG1f
IgG2.3G1-AY	262	CH1 и верхний шарнир IgG2.3, все остальные IgG1f
IgG2.5G1-AY	263	CH1 и верхний шарнир IgG2.5, все остальные IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	264	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 IgG2.3, все остальные IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	265	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 IgG2.5, все остальные IgG1.1f
IgG2.5G1-V27	266	Вариант формы IgG2-B
IgG2.3G1-V27	297	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - S267E

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую шарнир IgG2, содержащий любую из SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241 и 208-232, или его вариант, такой как шарнир IgG2, содержащий аминокислотную последовательность, которая (i) отличается от любой из SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241 и 208-232 на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, добавлений или делеций; (ii) отличается от любой из SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241 и 208-232 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, добавление или делецию; (iii) отличается от любой из SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241 и 208-232 на 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных замен, добавлений или делеций и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 238, 239, 240, 241 и 208-232, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная константная область тяжелой цепи обеспечивает измененную активность антитела к OX40 относительно другой константной области тяжелой цепи, например, константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1 IgG1, содержащий SEQ ID NO: 202, или домен CH1 IgG2, содержащий SEQ ID NO: 203, или вариант SEQ ID NO: 202 или 203, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 202 или 203 на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, добавлений или делеций; (ii) отличается от SEQ ID NO: 202 или 203 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, добавление или делецию; (iii) отличается от SEQ ID NO: 202 или 203 на 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных замен, добавлений или делеций и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 202 или 203, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная константная область тяжелой цепи может обеспечивать измененную активность антитела к OX40 относительно таковой другой константной области тяжелой цепи, например, константной области тяжелой цепи,

которая содержит шарнир не-IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH2 IgG1, содержащий SEQ ID NO: 204 или 298, или вариант SEQ ID NO: 204 или 298, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: ID NO: 204 или 298 на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, добавлений или делеций; (ii) отличается от SEQ ID NO: 204 или 298 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, добавление или делецию; (iii) отличается от SEQ ID NO: 204 или 298 на 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных замен, добавлений или делеций и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 204 или 298, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная константная область тяжелой цепи может обеспечивать измененную активность антитела к OX40 относительно таковой другой константной области тяжелой цепи, например, константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH3 IgG1, содержащий SEQ ID NO: 206, или вариант SEQ ID NO: 206, причем вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 206 на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, добавлений или делеций; (ii) отличается от SEQ ID NO: 206 не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, добавление или делецию; (iii) отличается от SEQ ID NO: 206 на 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотных замен, добавлений или делеций и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 206, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная константная область тяжелой цепи может обеспечивать измененную активность относительно таковой другой константной области тяжелой цепи, например, константной области тяжелой цепи, которая содержит

шарнир не-IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2.

Модифицированные константные области тяжелой цепи могут также содержать комбинацию описанных выше доменов CH1, шарнира, CH2 и CH3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую любую из SEQ ID NO: 244-281 или вариант любой из SEQ ID NO: 244-281, причем вариант (i) отличается от любой из SEQ ID NO: 244-281 на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных замен, добавлений или делеций; (ii) отличается от любой из SEQ ID NO: 244-281 не более чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, добавление или делецию; (iii) отличается от любой из SEQ ID NO: 244-281 в 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотных замен, добавлений или делеций и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 244-281, причем в любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и причем модифицированная константная область тяжелой цепи может обеспечивать измененную активность относительно таковой другой константной области тяжелой цепи, например, константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир не-IgG2.

Модифицированные константные области тяжелой цепи могут характеризоваться (i) аналогичной, уменьшенной или увеличенной эффекторной функцией (например, связыванием с FcγR) по отношению к константной области тяжелой цепи дикого типа и (ii) аналогичным, уменьшенным или увеличенным периодом полувыведения (или связывания с рецептор FcRn) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа.

III. Антитела, содержащие конкретные последовательные зародышевой линии

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 содержат вариабельную область тяжелой цепи от конкретного гена тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии и/или вариабельную область легкой цепи от конкретного гена легкой цепи иммуноглобулина.

Как обсуждалось в примерах настоящего раскрытия, были получены человеческие антитела, специфичные к OX40, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой продукт или происходит от гена 1-08 VH, гена 6-6 VH, гена 5-51 VH, гена 3-9 VH, гена DP44 VH, гена 3-30.3 VH, гена 3-10 VH и/или гена 3-13 VH зародышевой линии человека. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела, специфичные к OX40 человека, или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой продукт или производное гена зародышевой линии VH человека, выбранного из группы, состоящей из: гена 1-08 VH, гена 6-6 VH, гена 5-51 VH, гена 3-9 VH, гена DP44 VH, гена 3-30.3 VH, гена 3-10 VH и/или гена 3-13 VH.

Были получены специфические к OX40 антитела человека, которые содержат вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт или происходит от гена L5 VK, гена L6 VK, гена L15 VK, гена A27 VK и/или O14/O4 VK зародышевой линии человека. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт или производное гена VK зародышевой линии человека, выбранного из группы, состоящей из гена L5 VK, гена L6 VK, гена L15 VK, гена A27 VK и/или O14/O4 VK.

Предпочтительные описанные в настоящем документе антитела представляют собой те, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая представляет собой продукт или происходит от вышеперечисленных генов VH зародышевой линии человека, а также содержат вариабельную область легкой цепи, которая представляет собой продукт или производное одного из вышеуказанных генов VK зародышевой линии человека.

Как используется в настоящем документе, антитело человека содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепи, которые представляют собой «продукт» или «происходят от» конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные области антитела получены из системы, которая использует гены иммуноглобулина зародышевой линии человека. Такие системы включают в себя иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, представляющим интерес антигеном или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека, отображаемой на фаге с представляющим интерес антигеном. Антитело человека, которое представляет собой «продукт» или «происходит от» последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, можно

идентифицировать как таковое, сравнивая аминокислотную последовательность антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и выбирая последовательность иммуноглобулина зародышевой линии человека, наиболее близкую по последовательности (т.е. с наибольшим % идентичности) по отношению к последовательности антитела человека. Антитело человека, которое представляет собой «продукт» или «происходит от» конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, из-за природных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Однако выбранное человеческое антитело, как правило, по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело человека как человеческое по сравнению с аминокислотной последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательности зародышевой линии мыши). В некоторых случаях антитело человека может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% идентичным по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, антитело человека, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отображать не более 10 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых случаях антитело человека может отображать не более чем 5 или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислотное отличие от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

IV. Гомологичные антитела

В настоящем документе предусмотрены антитела с вариабельными областями тяжелых и легких цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям предпочтительных описанных в настоящем документе антител, и причем антитела сохраняют желаемые функциональные свойства описанных в настоящем документе антител к OX40.

Например, выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающая часть может содержать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем:

(a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы состоящей из SEQ ID NO: 318, 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 318, 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93;

(b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы состоящей из SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94;

(c) антитело специфически связывается с OX40 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все следующие функциональные свойства:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличенное производство IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиленная пролиферация Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкуренция за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкуренция за связывание к OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 или его антигенсвязывающая часть может содержать тяжелую цепь и легкую цепь, причем:

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125;

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) относительно аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122;

(c) антитело специфически связывается с OX40 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все следующие функциональные свойства:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличенное производство IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиленная пролиферация Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкуренция за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкуренция за связывание к OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Также предусмотрены антитела к OX40, содержащие VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и/или VLCDR3, которые отличаются от соответствующей CDR в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и/или 20C1, на 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 аминокислотных изменений (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит 1-5 аминокислотных изменений в каждой из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR относительно соответствующей последовательности в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и/или 20C1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит в общей сложности 1-5 аминокислотных изменений во всех CDR по сравнению с CDR в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и/или 20C1.

Антитела, содержащие последовательности с гомологией относительно таковых в 3F4, 14B6 (14B6-1 и 14B6-2), 23H3, 6E1 (6E1-1 и 6E1-2), 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 (14A2-1 и 14A2-2) и 20C1, например, области V_H и V_L в SEQ ID NO: 17 и 18; 28 и 29; 28 и 30; 37 и 38; 48 и 49; 48 и 50; 57 и 58; 65 и 66; 73 и 74; 84 и 85; 84 и 86; 93 и 94, соответственно, или тяжелые и легкие цепи в SEQ ID NO: 95 и 96; 97 и 98; 99 и 100; 101 и 102; 103 и 104; 105 и 106; 107 и 108; 109 и 110; 111 и 112; 113 и 114; 115 и 116; 117 и 118; 119 и 120; 121 и 122; 123 и 116; 124 и 116; и 125 и 116, соответственно, или CDR могут быть получены путем мутагенеза (например, сайт-направленного или опосредованного ПЦР мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93

и/или SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94, или SEQ ID NO: 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 124 и 125 и/или SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120 и 122 с последующим исследованием кодированного измененного антитела для сохранения функции (т.е. функций, изложенных выше в (1) - (7)) с использованием описанных в настоящем документе функциональных анализов.

V. Антитела с консервативными модификациями

Предусмотренные в настоящем документе антитела к OX40 могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат указанные аминокислотные последовательности на основе описанных в настоящем документе антител (например, 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1) или их консервативных модификаций и причем антитела сохраняют желаемые функциональные свойства описанных в настоящем документе антител к OX40. Соответственно, антитело к OX40 или его антигенсвязывающая часть может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем:

(a) последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89 и их консервативных модификаций, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(b) последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92, и их консервативные модификации, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(c) антитело специфически связывается с OX40 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или все следующие функциональные свойства:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличенное производство IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиленная пролиферация Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкуренция за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкуренция за связывание к OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Согласно предпочтительному варианту осуществления последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76, 88 и 317, и их консервативные модификации, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82 и 91 и их консервативных модификаций, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87, и их консервативных модификаций, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90 и их консервативных модификаций, например, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен.

Согласно различным вариантам осуществления антитела могут представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Консервативные аминокислотные замены могут также быть выполнены в частях антител, отличных от CDR или в дополнение к ним. Например, консервативные аминокислотные модификации могут быть выполнены в каркасной области или в области Fc. Вариабельная область или тяжелая или легкая цепь могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1 -25 или 1-50 консервативных аминокислотных замен относительно последовательностей предусмотренных в настоящем документе антител к OX40. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит комбинацию консервативных и неконсервативных аминокислотных модификаций.

VI. Конкурирующие антитела и те же связывающие эпитоп антитела

Также в настоящем документе предусмотрены антитела, которые конкурируют за связывание с OX40 с описанными в настоящем документе антителами к OX40 (например, антителами 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1). Такие конкурирующие антитела могут быть идентифицированы на основе их способности к конкурентному ингибированию связывания с OX40 одного или нескольких моноклональных антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 в стандартных анализах связывания OX40. Например, могут быть использованы стандартные анализы ELISA или конкурентные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок OX40 человека иммобилизуют на планшете, добавляют различные концентрации немеченого первого антитела, промывают планшет, добавляют второе меченое антитело, промывают и измеряют количество связанной метки. Если увеличение концентрации немеченого (первого) антитела (также называемого «блокирующим антителом») ингибирует связывание меченого (второго) антитела, считается, что первое антитело ингибирует связывание второго антитела с мишенью на планшете или, как говорят, конкурирует за связывание со вторым антителом. Дополнительно или альтернативно, анализ SPR BIACORE® можно использовать для оценки способности антител конкурировать. Способность

исследуемого антитела ингибировать связывание описанного в настоящем документе антитела к OX40 с OX40 показывает, что исследуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с OX40.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены антитела к OX40, которые ингибируют связывание описанных в настоящем документе антител к OX40 с OX40 на клетках, например, активированных Т-клетках, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, используя, например, FACS, как описано в примерах.

Согласно другим вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены антитела к OX40, которые связываются с одним и тем же эпитопом как один или несколько описанных в настоящем документе антител к OX40 (например, антитела 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1), как определено с использованием известных в настоящей области техники способов картирования эпитопов, как таковые, которые описаны ниже.

Известные в настоящей области техники способы картирования эпитопов включают в себя, например, структурные способы, такие как определение кристаллической структуры посредством рентгеновского излучения (например, WO2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая в себя определение ЯМР частоты водород-дейтериевого обмена лабильных амидных водородов в OX40, когда они свободны и связаны в комплексе с представляющим интерес антителом (Zinn-Justin et al. *Biochemistry* 1992;31:11335-47; Zinn-Justin et al. *Biochemistry* 1993;32,6884-91).

Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть осуществлена с использованием любого известного в настоящей области техники способа (например, Giege et al. *Acta Crystallogr* 1994;D50:339-50; McPherson, *Eur J Biochem* 1990;189:1-23), включая в себя микрочип (например, *Structure* 19976;5:1269-74), способ висячей капли посредством диффузии в парах (например, McPherson, *J Biol Chem* 1976;251:6300-3), посев и диализ. Желательно использовать белковый препарат с концентрацией по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизация может быть наилучшим образом достигнута в растворе осадителя, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (ПЭГ, средняя молекулярная масса от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да), предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да, с концентрациями в диапазоне от

приблизительно 10% до приблизительно 30% (мас./об.). Также может быть желательным включение стабилизирующего белок средства, например, глицерина, в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может быть желательной в растворе осадителя, предпочтительно в концентрации в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1000 мМ. Осадок предпочтительно забуферивают до pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, применимые в растворе осадителя, могут варьировать и хорошо известны в настоящей области техники (Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры таких буферов включают в себя, без ограничения, HEPES, Tris, MES и ацетат. Кристаллы могут расти в широком диапазоне температур, включая в себя 2°C, 4°C, 8°C и 26°C. Кристаллы антитела:антигена могут быть изучены с использованием хорошо известных способов рентгеновской дифракции и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространенный Molecular Simulations, Inc, смотрите, например, Blundell & Johnson, *Meth. Enzymol.* 1985;114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press, публикация заявки на выдачу патента США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne, *Acta Cryst* 1993;D49:37-60; Bricogne, *Meth Enzymol* 1997;276A:361-423; Carter & Sweet, eds.; Roversi et al., *Acta Cryst*. 2000;D56:1313-23).

Другие способы картирования эпитопов контролируют связывание антитела с антигенными фрагментами или мутированные вариации антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается показателем компонента эпитопа. Одним из таких способов является сканирующий аланином мутагенез, как описано, например, Cunningham and Wells, *Science* 1989;244:1081-5. Другим подходящим способом является глубокое мутационное сканирование (смотрите, например, Araya et al., *Trends in Biotechnology* 2011;29:435-42; Forsyth et al., *mAbs* 2013;5:523-32).

Дополнительно или альтернативно могут быть использованы вычислительные комбинаторные способы картирования эпитопов, включая в себя картирование конформационных прерывистых эпитопов.

Дополнительно или альтернативно, картирование эпитопов может быть достигнуто путем исследования связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты OX40, например, неденатурированные или денатурированные фрагменты.

Серии перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательность OX40 (например, OX40 человека), могут быть синтезированы и скринированы на предмет связывания, например, в прямом ELISA, конкурентном ELISA (где пептид оценивается по его способности предотвращать связывание антитела с OX40, связанным с лункой микротитровального планшета) или на чипе. Другие способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов (либо в нативной трехмерной форме, либо в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Затем пептиды рассматриваются как лидеры для определения эпитопа, распознаваемого антителом, используемым для скрининга библиотеки пептидов.

Эпитопы также могут быть идентифицированы с помощью основанного на МС футпринтинге белков, такого как обменная масс-спектрометрия на основе водорода/дейтерия (HDX-MS) и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). HDX-MS может быть проведена, например, как описано в примерах в настоящем документе и Wei et al., *Drug Discovery Today* 2014;19:95. FPOP может быть проведено, например, как описано Hambley et al. (*J American Soc Mass Spectrometry* 2005;16:2057).

Антитела, которые конкурируют за связывание с описанными в настоящем документе антителами к OX40, могут быть получены и идентифицированы с использованием известных в настоящей области техники способов. Например, мыши могут быть иммунизированы описанным в настоящем документе OX40 человека, получены гибридомы и полученные в результате моноклональные антитела, подвергнуты скринингу на способность конкурировать с описанным в настоящем документе антителом за связывание с OX40, с использованием описанных выше способов.

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и описанные в настоящем документе антитела к OX40, могут быть получены путем иммунизации мышей меньшим фрагментом OX40, содержащим эпитоп, с которым связывается антитело. Эпитоп или содержащая эпитоп область может быть идентифицирована с использованием описанных выше способов. Альтернативно, способ Jespers et al. (*Biotechnology* 1994;12:899) можно использовать для направления отбора антител, распознающих один и тот же эпитоп и, следовательно, проявляющих сходные свойства с описанными в настоящем документе антителами к OX40. Например, при использовании фагового дисплея сначала тяжелую цепь антитела к OX40 соединяют в пару с репертуаром (предпочтительно человеческим) легких цепей для выбора связывающего OX40

антитела, а затем новую легкую цепь соединяют в пару с репертуаром (предпочтительно человеческим) тяжелых цепей, чтобы выбрать (предпочтительно человеческое) связывающее OX40 антитело, распознающее тот же эпитоп или область эпитопа на OX40 в качестве описанного в настоящем документе антитела к OX40. Альтернативно варианты описанного в настоящем документе антитела могут быть получены путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены антитела, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), соответствующей аминокислотным остаткам 46-62 зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), как определено способами в примерах.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 182), как определено способами в примерах.

Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности PCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 183), как определено способами в примерах.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40, которые связываются со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), дополнительно связываются со всей или частью последовательности QLCTATQDTVCR (SEQ ID NO: 184), как определено способами в примерах.

Согласно дополнительным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 связываются со всей или частью последовательности SQNTVCRPCGPGFYN (SEQ ID NO: 185), как определено способами в примерах.

Согласно дополнительным вариантам осуществления антитело к OX40 связывается в области DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179), соответствующей аминокислотным остаткам 89-124 зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), как определено способами в примерах ,

VII. Сконструированные и модифицированные антитела

Области VH и VL

Также в настоящем документе предусмотрены сконструированные и модифицированные антитела, которые могут быть получены с использованием антитела,

содержащего одну или несколько раскрытых в настоящем документе последовательностей V_H и/или V_L, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может характеризоваться измененными относительно исходного антитела свойствами. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих вариабельных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в пределах одной или нескольких областей CDR и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело может быть сконструировано путем модификации остатков в пределах константной области(ей), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

Один тип конструирования вариабельных областей, который может быть выполнен, представляет собой прививку CDR. Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелых и легких цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR более разнообразны между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических эталонных антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые включают в себя последовательности CDR из конкретного эталонного антитела, привитого на каркасные последовательности из другого антитела с различными свойствами (смотрите, например, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033, патент США № 5225539 на имя Winter и патенты США № 5530101, 5558589, 5697662 и 6180370 на имя Queen *et al.*).

Соответственно, другой вариант осуществления относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащей вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID SEQ ID NO: 11-13; 19-21; 31-33; 39-41; 51-53; 59-61; 67-69; 74-77 и 87-89, соответственно, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14-16; 22-24; 25-27; 34-36; 42-44; 45-47; 54-56; 62-64; 70-72; 78-80; 81-83 и 90-92, соответственно. Таким образом, такие антитела содержат

последовательности CDR V_H и V_L моноклональных антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1, но могут содержать различные каркасные последовательности.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из публичных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают в себя последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельной области тяжелой и легкой цепи человека могут быть найдены в базе данных последовательностей зародышевой линии человека «VBase» (доступно в Интернете по адресу: www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в публикациях Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798 и Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждой из которых явно включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительные каркасные последовательности для применения в описанных в настоящем документе антителах представляют собой такие, которые структурно подобны каркасным последовательностям, используемым в описанных в настоящем документе антителах. Последовательности 2 и 3 CDR1 V_H и последовательности 2 и 3 CDR1 V_L могут быть привиты на каркасные области, которые содержат последовательность, идентичную таковой, обнаруженной в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которой получают каркасную последовательность, или последовательности CDR могут быть привиты на каркасные области, которые содержат до 20 предпочтительно консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях полезно подвергать мутациям остатки в каркасных областях для поддержания или усиления антигенсвязывающей способности антитела (смотрите, например, патенты США №5530101, 5585089, 5693762 и 680370 на имя Queen *et al*).

Сконструированные описанные в настоящем документе антитела включают в себя те, в которых были сделаны модификации в каркасных остатках в пределах V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие каркасные модификации производят для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в том, чтобы «мутировать к первоначальному виду» один или

несколько остатков каркаса до соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать остатки каркаса, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркаса антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получено антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасных областей в их конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации могут быть «мутированы к первоначальному виду» в последовательность зародышевой линии, например, путем сайт-направленного мутагенеза или опосредуемого ПЦР мутагенеза. Такие «мутировавшие к первоначальному виду» антитела также должны быть охвачены.

Другой тип модификации каркаса включает в себя мутирование одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в пределах одной или нескольких областей CDR для удаления эпитопов Т-клеток, чтобы таким образом уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также упоминается как «деиммунизация» и более подробно описан в публикации патента США № 20030153043 на имя Carr *et al.*

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в областях CDR для улучшения одного или нескольких связывающих свойств (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез может быть осуществлен для введения мутации(й), а влияние на связывание антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство может быть оценено в анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе и предусмотрено в примерах. Предпочтительно вводят консервативные модификации (как описано выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные добавки, делеции или, предпочтительно, замены. Кроме того, как правило, изменяется не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в области CDR.

Соответственно, в настоящем документе также предусмотрены моноклональные антитела к OX40 или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) область CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87; (b) область CDR2 V_H, содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76, 88 и 317, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76 и 88; (c) область CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89; (d) область CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90; (e) область CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82 и 91, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82 и 91; и (f) область CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92, или аминокислотную последовательность, содержащую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавок, по сравнению с SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92.

Остатки метионина в CDR антител могут быть окислены, что приводит к потенциальной химической деградации и последующему снижению эффективности антитела. Соответственно, один или несколько остатков метионина в CDR тяжелых и/или легких цепей описанных в настоящем документе антител к OX40 могут быть заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительной деградации.

Аналогичным образом сайты дезамидирования могут быть удалены из антител, особенно в CDR.

Потенциальные сайты гликозилирования в антигенсвязывающем домене предпочтительно удаляются, чтобы предотвратить гликозилирование, которое может препятствовать связыванию антигена. *Смотрите, например*, патент США № 5714350.

Направленное связывание антигена

Согласно различным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела модифицируют для избирательного блокирования связывания антигена в тканях и средах, где связывание антигена было бы вредным, но позволяло бы связывать антиген, где это было бы полезно. Согласно одному варианту осуществления образуется блокирующая пептидная «маска», которая специфически связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связыванию с антигеном, причем эта маска связана с каждым из связывающих плеч антитела с помощью расщепляемого пептидазой линкера. *Смотрите, например*, патент США № 8518404 на имя CytomX. Такие конструкции применимы для лечения злокачественных опухолей, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в опухолевом микроокружении по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет диссоциировать маскирующему/блокирующему пептиду, что позволяет антигену избирательно связываться в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Альтернативно, согласно соответствующему варианту осуществления получают двухвалентное связывающее соединение («маскирующий лиганд»), содержащее два антигенсвязывающих домена, которое связывается как с антигенсвязывающими поверхностями (двухвалентного) антитела, так и мешает связыванию антигена, в котором маски двух связывающих доменов связаны друг с другом (но не с антителом) расщепляемым линкером, например, расщепляемой пептидазой. Смотрите, например, публикацию международной заявки на выдачу патента № WO 2010/077643 на имя Tegopharm Corp. Маскирующие лиганды могут содержать или происходить от антигена, с которым предназначено связывание антитела, или могут быть образованы независимо. Такие маскирующие лиганды применимы для лечения злокачественных опухолей, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в опухолевом микроокружении по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет диссоциировать двум связывающим доменам друг от друга, уменьшая авидность антигенсвязывающих поверхностей антитела. Результирующая диссоциация маскирующего лиганда из антитела позволяет избирательно связывать антиген в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Fc и модифицированные Fc

В дополнение к активности терапевтического антитела, возникающего в результате связывания антигенсвязывающего домена с антигеном (например, блокирование родственного лиганда или рецепторного белка в случае антагонистических антител или индуцированная сигнализация в случае агонистических антител), часть Fc антитела взаимодействует с иммунной системой, как правило, сложными способами для получения любого количества биологических эффектов. Эффекторные функции, такие как область Fc иммуноглобулина, ответственны за многие важные функции антител, такие как антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), приводит к уничтожению клеток-мишеней, хотя и посредством разных механизмов. Существует пять основных классов или изотипов константной области тяжелой цепи (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), каждая с характеристическими эффекторными функциями. Эти изотипы можно дополнительно подразделить на подклассы, например, IgG разделяют на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами рецепторов Fcγ (FcγR), специфичных для класса IgG антител, а именно FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сообщалось, что важные последовательности для связывания IgG с рецепторами FcγR находятся в доменах CH2 и CH3. Период полужизни в сыворотке антитела зависит от способности этого антитела связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут содержать вариабельные домены согласно настоящему изобретению в сочетании с константными доменами, содержащими различные области Fc, выбранные на основе биологической активности (если таковые имеются) антитела для предполагаемого использования. Salfeld (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1369 Например, IgG человека можно разделить на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из них содержит область Fc, имеющую уникальный профиль для связывания с одним или несколькими рецепторами Fcγ (активирующие рецепторы FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32), FcγRIIIA и FcγRIIIB (CD16) и ингибирующий рецептор FcγRIIB) и для первого компонента комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми рецепторами Fcγ; IgG2 связывается с $FcγRIIA_{H131}$ и с более низкой аффинностью с $FcγRIIA_{R131}$ и $FcγRIIIA_{V158}$; IgG4 связывается с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC и $FcγRIIIA_{V158}$; а ингибирующий рецептор FcγRIIB характеризуется более низкой аффинностью к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие рецепторы Fcγ. Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113:3716. Исследования показали, что FcγRI не связывается с IgG2, а FcγRIIIB не связывается с IgG2 или IgG4. В общем,

что касается активности ADCC, IgG1 человека ≧ IgG3 ≫ IgG4 ≧ IgG2. Как следствие, например, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран для использования в лекарственном средстве, где желательно ADCC; IgG3 может быть выбран для активации экспрессирующих FcγRIIIA NK-клеток, моноцитов или макрофагов; и IgG4 может быть выбран, если антитело должно использоваться для десенсибилизации пациентов с аллергией. IgG4 также может быть выбран, если желательно, чтобы у антитела отсутствовала вся эффекторная функция.

Соответственно, описанные в настоящем документе вариабельные области анти-OX40 могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 Fc, которые могут быть любого аллотипа или изоалотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). Смотрите, например, Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1). На выбор аллотипа могут влиять потенциальные проблемы иммуногенности, например, чтобы свести к минимуму образование антител к лекарственным средствам.

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе вариабельные области анти-OX40 связаны с Fc, который связывается с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγI/CD64, FcγIIa/CD32 или FcγIIIa/CD16) и тем самым стимулирует ADCC и может вызвать истощение Т-клеток. Согласно конкретным вариантам осуществления описанные в настоящем документе вариабельные области анти-OX40 связаны с Fc, который вызывает истощение. Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе вариабельные области анти-OX40 связаны с Fc IgG1 или IgG3 человека, т.е. антитела характеризуются изотипом IgG1 или IgG3. Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40 представляют собой истощающие антитела. Например, они могут истощать клетки T_{reg}, которые находятся в опухолевом микроокружении (и тем самым усиливать противоопухолевую активность), но не значительно истощать клетки T_{eff}, которые находятся в опухолевом микроокружении и опосредуют противоопухолевый эффект, и/или не значительно истощать клетки T_{reg} и T_{eff}, которые находятся вне опухоли, например, на периферии. Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40 характеризуются изотипом (либо встречающимся в природе, либо не встречающимся в природе (например, включая в себя мутацию(и)), который стимулирует истощение или элиминацию клеток T_{reg} в опухолевом сайте и сопутствующую активацию клеток T_{eff}.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40 создают повышенное отношение T_{eff} к T_{reg} в опухолевом сайте, что указывает на сильную противоопухолевую активность и предпочтительно без значительного истощения клеток T_{reg} и T_{eff}, которые находятся вне опухоли, например, на периферии.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 блокируют иммуносупрессивную активность T_{reg}. Согласно другим вариантам осуществления антитела к OX40 содержат Fc-рецептор с уменьшенным или исключенным связыванием с FcR, например, уменьшенным связыванием с активирующими FcR. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 содержат Fc, который связывается или улучшает связывание с FcRIIb, что может обеспечить усиленный агонизм. Смотрите, например, публикацию международной заявки WO 2012/087928; Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Wilson *et al.* (2011) *Cancer Cell* 19:101; White *et al.* (2011) *J. Immunol.* 187:1754.

Описанные в настоящем документе вариабельные области анти-OX40 могут быть связаны с не встречающейся в природе областью Fc, например, с лишенной эффекторной функции или главным образом лишенной эффекторной функции Fc (например, IgG2 или IgG4 человека) или, альтернативно, Fc с улучшенным связыванием с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγI, FcγIIa или FcγIIIa), таким как усиление истощения T_{reg} в опухолевой среде.

Описанные в настоящем документе вариабельные области могут быть связаны с Fc, содержащим одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, описанное в настоящем документе антитело может быть химически модифицировано (например, один или несколько химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или оно может быть модифицировано для изменения его гликозилирования, чтобы изменить одно или несколько функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в области Fc относится к индексу EU в Kabat. Раскрытые в настоящем документе варианты последовательностей предусмотрены со ссылкой на номер остатка, за которым следует аминокислота, которой заменена природная аминокислота, необязательно предшествующей природному остатку в этом положении. Если в данном положении могут присутствовать несколько аминокислот, например, если последовательности различаются между встречающимися

в природе изотипами или если несколько мутаций могут быть замещены в положении, они разделяются косой чертой (например, «X/Y/Z»).

Например, можно сделать модификации в области Fc, чтобы получить вариант Fc с (a) увеличенной или уменьшенной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) увеличенной или уменьшенной комплементарноопосредованной цитотоксичностью (CDC), (c) увеличенной или уменьшенной аффинностью к C1q и/или (d) увеличенной или уменьшенной аффинностью к Fc-рецептору относительно исходной Fc. Такие варианты области Fc будут, как правило, содержать по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в области Fc. Считается, что сочетание аминокислотных модификаций является особенно желательным. Например, вариант области Fc может включать в себя две, три, четыре, пять и т.д. замен, например, в определенных положениях области Fc, идентифицированных в настоящем документе. Иллюстративные варианты последовательности Fc раскрыты в настоящем документе и также представлены в патентах США № 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; патентных публикациях PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114.

Уменьшение эффекторной функции

Активность ADCC может быть уменьшена путем изменения области Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления сайты, которые влияют на связывание с Fc-рецепторами, могут быть удалены, предпочтительно сайты, отличные от сайтов связывания рецепторов реутилизации. Согласно другим вариантам осуществления область Fc может быть модифицирована для удаления сайта ADCC. Сайты ADCC известны в настоящей области техники; смотрите, например, Sarmay *et al.* (1992*) Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 в отношении сайтов ADCC в IgG1. Согласно одному варианту осуществления вариант G236R и L328R IgG1 человека эффективно устраняет связывание FcγR. Horton *et al.* (2011) *J. Immunol.* 186:4223 and Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. Согласно другим вариантам осуществления Fc, характеризующийся уменьшенным связыванием с FcγR, состоял из аминокислотных замен L234A, L235E и Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Активность CDC также может быть уменьшена путем модификации области Fc. Мутации в положениях D270, K322, P329 и P331 IgG1, в частности аланиновые мутации

D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела связывать C1q и активировать комплемент. Idusogie *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4178; WO 99/51642. Показано, что модификация положения 331 в IgG1 (например, P331S) уменьшает связывание комплемента. Tao *et al.* (1993*) J. Exp. Med.* 178:661 и Canfield & Morrison (1991*) J. Exp. Med.* 173:1483. В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот с 231 по 239 изменяют таким образом, чтобы уменьшить способность антитела фиксировать комплемент. WO 94/29351.

Согласно некоторым вариантам осуществления Fc с восстановленной комплементарной фиксацией содержит аминокислотные замены A330S и P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Для применений, в которых эффекторную функцию следует избегать вообще, например, когда только антигенное связывание является достаточным для получения желаемого терапевтического эффекта, а эффекторная функция только приводит к (или увеличивает риск) нежелательных побочных эффектов, могут быть использованы антитела IgG4 или антитела или фрагменты, лишенные области Fc или их значительной части, или Fc может быть мутирована для полного устранения гликозилирования (например, N297A). Альтернативно, была создана гибридная конструкция IgG2 человека (домен C_H1 и шарнирная область) и IgG4 человека (домены C_H2 и C_H3), которая лишена эффекторной функции, не обладающая способностью связываться с FcγR (например, IgG2) и неспособная активировать комплемент (например, IgG4). Rother *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256. Смотрите также Mueller *et al.* (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (обсуждение модификаций Fc для уменьшения эффекторной функции в целом).

Согласно другим вариантам осуществления область Fc изменяется посредством замещения по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для уменьшения всей эффекторной функции(й) антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть замещены другим аминокислотным остатком, так чтобы антитело характеризовалось уменьшенной аффинностью к эффекторному лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или C1-компонент комплемента (остатки 297, 318, 320, 322). Патенты США № 5624821 и 5648260, оба на имя Winter *et al.*

В одной ранней патентной заявке были предложены модификации в области Fc IgG для уменьшения связывания с FcγRI, чтобы уменьшить ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или блокировать связывание с компонентом комплемента C1q для устранения CDC (E318A или V/K320A и K322A/Q). WO 88/007089. Смотрите также Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel *et al.* (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036 и Sondermann *et al.* (2000) *Nature* 406:267 (обсуждение влияния этих мутаций на связывание FcγRIII).

Модификации Fc, уменьшающие эффекторную функцию, также включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, такие как 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для уменьшения взаимодействий FcγR и комплемента включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации рассмотрены в публикации Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Эффекторные функции (как ADCC, так и активация комплемента) могут быть уменьшены при сохранении связывания FcR новорожденных (поддерживая период полужизни) путем мутирования остатков IgG в одном или нескольких положениях 233-236 и 327-333, таких как E233P, L234V, L235A , необязательно G236Δ, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236Δ в IgG4; и A330S и P331S в IgG2. Смотрите Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; публикацию международной заявки WO 99/58572. Другие мутации, которые уменьшают эффекторную функцию, включают в себя L234A и L235A в IgG1 (Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537); V234A и G237A в IgG2 (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613, *смотрите также* патент США № 5834597); и S228P и L235E для IgG4 (Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925). Другая комбинация мутаций для уменьшения эффекторной функции в IgG1 человека включает в себя L234F, L235E и P331S. Oganesyan *et al.* (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700. Смотрите в общем Labrijn *et gal.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479. Дополнительные мутации, обнаруженные для снижения эффекторной функции в контексте слитого белка Fc (IgG1) (абатацепт), представляют собой C226S, C229S и P238S (нумерация остатков EC). Davis *et al.* (2007) *J. Immunol.* 34:2204.

Другие варианты Fc с уменьшенной ADCC и/или CDC описаны в Glaesner *et al.* (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A и L235A для уменьшения ADCC и ADCP в IgG4); Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (F234A, G237A и E318A в IgG4); An *et al.* (2009) *MAbs* 1:572 и в публикации заявки на выдачу патента

США 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S и P331S в IgG2); McEarchern *et al.* (2007) *Blood* 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A в IgG1); Vafa *et al.* (2014) *Methods* 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S в IgG2).

Согласно некоторым вариантам осуществления выбирают Fc, который по существу не имеет эффекторной функции, т.е. он характеризуется уменьшенным связыванием с FcγR и уменьшенной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например, Fc IgG1, который лишен эффекторной функции, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289. Иллюстративные тяжелые цепи, содержащие эти мутации, приведены в перечне последовательностей, как описано в таблице 23 (например, SEQ ID NO: 11). Эти пять замен могут быть объединены с N297A для устранения гликозилирования.

Усиление эффекторной функции

Альтернативно, активность ADCC может быть увеличена путем модификации области Fc. Что касается активности ADCC, IgG1 ≧ IgG3 ≫ IgG4 ≧ IgG2 человека, поэтому константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран для использования в лекарственном средстве, где желательна ADCC. Альтернативно, область Fc может быть модифицирована для увеличения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для увеличения аффинности к рецептору Fcγ путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. Смотрите публикацию международного патента WO 2012/142515; смотрите также WO 00/42072. Иллюстративные замены включают в себя 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают в себя 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Например, было показано, что Fc IgG1 человека, содержащие вариант G236A, который необязательно может быть объединен с I332E, увеличивают отношение аффинности связывания FcγIIA/FcγIIB приблизительно в 15 раз. Richards *et al.* (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Другие модификации для улучшения взаимодействий FcγR и комплемента включают в себя, без ограничения, замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S,

298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Конкретно, как ADCC, так и CDC могут быть усилены посредством изменений в положении E333 в IgG1, например, E333A. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Использование мутаций P247I и A339D/Q для повышения эффекторной функции в IgG1 описано в публикации международной заявки WO2006/020114, а D280H, K290S ± S298D/V раскрыто в публикации международной заявки WO 2004/044455. Было показано, что варианты K326A/W и E333A/S повышают эффекторную функцию в IgG1 человека и E333S в IgG2. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

В частности, были описаны сайты связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII, включая в себя комбинированные мутанты T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A (с улучшенным связыванием FcγRIIIa и активностью ADCC). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно усиленным связыванием с FcγRIIIa, включая в себя варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, которые показали наибольшее увеличение аффинности к FcγRIIIa, снижение связывания FcγRIIb и сильную цитотоксическую активность у яванских макаков. Lazar *et al.*(2006) *Proc. Nat'l Acad Sci. (USA)* 103:4005; Awan *et al.* (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфическое), трастузумаб (HER2/neu-специфическое), ритуксимаб (CD20-специфическое) и цетуксимаб (EGFR-специфическое), приводило к значительно усиленной активности ADCC *in vitro*, а вариант S239D/I332E показал повышенную способность к истощению B-клеток у обезьян. Lazar *et al.*(2006) *Proc. Nat'l Acad Sci. (USA)* 103:4005. Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, которые проявили усиленное связывание с FcγRIIIa и одновременно повышенную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих FcγRIIIa человека в моделях злокачественных новообразований B-клеток и злокачественной опухоли молочной железы. Stavenhagen *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:8882; патент США № 8652466; Nordstrom *et al.* (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

Различные изотипы IgG также проявляют различающуюся активность CDC (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dangl *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1989. Для применений, в

которых желательна улучшенная CDC, можно также ввести мутации, которые увеличивают связывание с C1q. Способность захватывать комплемент (CDC) может быть усилена мутациями в K326 и/или E333 в IgG2, например, K326W (что уменьшает активность ADCC) и E333S, чтобы увеличить связывание с C1q, первым компонентом каскада комплемента. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Введение S267E/H268F/S324T (отдельно или в любой комбинации) в IgG1 человека усиливает связывание C1q. Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Область Fc гибридного изотипа IgG1/IgG3 "113F" в Natsume *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (смотрите фиг. 1) также дает усиленную CDC. Смотрите также Michaelsen *et al.* (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 and Redpath *et al.* (1998) *Immunology* 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут увеличивать или уменьшать эффекторную функцию, описаны в Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:1129. *Смотрите также* Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460.

Также могут использоваться варианты Fc, которые усиливают аффинность к ингибирующему рецептору FcγRIIb, например, для усиления индуцирующей апоптозом или адъювантной активности. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)* 109:10966; публикация заявки на выдачу патента США 2014/0010812. Такие варианты могут обеспечивать антитело с иммуномодулирующей активностью, связанной с клетками FcγRIIb$^+$, включая в себя, например, B-клетки и моноциты. Согласно одному варианту осуществления варианты Fc обеспечивают избирательно усиленную аффинность к FcγRIIb относительно одного или нескольких активирующих рецепторов. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают в себя одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332, согласно индекса EU. Иллюстративные замены для усиления аффинности FcγRIIb включают в себя, без ограничения, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Иллюстративные замены включают в себя 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают в себя 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E и 267E/328F. В частности, варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включающие в себя двойной вариант S267E + L328F IgG1 человека имеют особое значение для специфического усиления аффинности к ингибирующему рецептору FcγRIIb. Chu *et al.*

(2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; публикация заявки на выдачу патента США 2006/024298; публикация международной заявки WO 2012/087928. Повышенная специфичность для FcγRIIb (в отличие от $FcγRIIa^{R131}$) может быть получена путем добавления замены P238D. Mimoto *et al.* (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; публикация международной заявки WO 2012/115241.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, это может быть сделано путем увеличения аффинности связывания области Fc для FcRn. Согласно одному варианту осуществления антитело изменяют в области CH1 или CL, чтобы содержать связывающий рецептор реутилизации эпитоп, взятый из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022, выданных Presta *et al.* Другие иллюстративные варианты Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замены в положениях 259, 308 и 434, включая в себя, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают в себя: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 31 1A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604) , 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524). Смотрите патент США № 8367805.

Модификация определенных консервативных остатков в Fc IgG (I253/H310/Q311/H433/N434), такая как вариант N434A (Yeung *et al.*, 2009) *J. Immunol,* 182: 7663), была предложена в качестве способа увеличения аффинности FcRn, тем самым увеличивая период полужизни антитела в кровотоке. WO 98/023289. Было показано, что комбинационный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, увеличивает связывание FcRn и увеличивает период полужизни сыворотки до пяти раз. Zalevsky *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также продлевает период полужизни антител IgG1. Petkova *et al.* (2006*) Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, также показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие варианты M252Y/M428L, M428L/N434H, M428L/N434F, M428L/N434Y, M428L/N434A, M428L/N434M и M428L/N434S, продлевают период полужизни. WO 2009/086320.

Кроме того, комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полужизни почти в 4 раза. Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Родственная модификация IgG1, обеспечивающая повышенную аффинность FcRn, но сниженную зависимость от pH (M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F), была использована для создания конструкции IgG1 («MST-HN Abdeg») для использования в качестве конкурента для предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводит к увеличенному выведению этого другого антитела, либо эндогенного IgG (например, в аутоиммунной постановке), либо другого экзогенного (терапевтического) моноклонального антитела. Vaccaro *et al.* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834.

Другие модификации для увеличения связывания FcRn описаны в Yeung *et al.* (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6277375; 6821505; публикациях международных заявок WO 97/34631; WO 2002/060919.

Согласно некоторым вариантам осуществления гибридные изотипы IgG могут быть использованы для увеличения связывания FcRn и потенциально увеличивают период полужизни. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замены положений IgG1 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG3 в положениях, в которых два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное антитело IgG, которое содержит одну или несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. Согласно другим описанным в настоящем документе вариантам осуществления гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены положений IgG2 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG1 в положениях, в которых два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например, одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236) и 327A. Смотрите патент США № 8629113. Был создан гибрид последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, который предположительно увеличивает период полужизни в сыворотке и улучшает экспрессию. Патент США № 7867491 (порядковый номер 18 в нем).

Период полужизни в сыворотке антител согласно настоящему изобретению также может быть увеличен путем пегилирования. Антитело может быть пегилировано, например, для увеличения биологического (например, сывороточного) периода полужизни антитела. Для пегилирования антитела, антитело или его фрагмент, как

правило, подвергают взаимодействию с реагентом полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, когда одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно, пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Используемый в настоящем документе термин «полиэтиленгликоль» предназначен для охвата любой из форм ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно (C1-C10) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. Согласно некоторым вариантам осуществления подлежащее пегилированию антитело представляет собой агликозилированное антитело. Способы для пегилирующих белков известны в настоящей области техники и могут быть применены к описанным в настоящем документе антителам. Смотрите, например, Европейский патент EP 0154316 на имя Nishimura *et al.* и Европейский патент EP 0401384 на имя Ishikawa *et al.*

Альтернативно, при некоторых обстоятельствах может быть желательным уменьшить период полужизни антитела, а не увеличивать его. Модификации, такие как I253A (Hornick *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R I253A или H310A (Kim *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819), в Fc в IgG1 человека могут уменьшать связывание FcRn, таким образом уменьшая период полужизни (увеличивая выведение) для применения в ситуациях, когда предпочтительным является быстрое выведение, такое как медицинская визуализация. Смотрите также Kenanova *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие способы увеличения выведения включают в себя форматирование антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению в виде фрагментов антител, не обладающих способностью связываться с FcRn, таких как фрагменты Fab. Такая модификация может уменьшить период полужизни в циркулирующем русле антитела с пары недель до нескольких часов. Селективное пегилирование фрагментов антител затем можно использовать для совершенствования (увеличения) периода полужизни фрагментов антитела, если это необходимо. Chapman *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антител также могут быть слиты с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкции слитого белка, чтобы увеличить период полужизни. Yeh *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. Альтернативно, биспецифическое антитело может быть сконструировано с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с

человеческим сывороточным альбумином (HSA). Смотрите публикацию международной заявки на патент WO 2009/127691 и патентные ссылки, цитируемые в ней. Альтернативно, специализированные полипептидные последовательности могут быть добавлены к фрагментам антител для увеличения периода полужизни, например, полипептидные последовательности «XTEN». Schellenberger *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; публикация международной заявки на патент WO 2010/091122.

Дополнительные варианты Fc

При использовании константного домена IgG4 предпочтительно включать замену S228P, которая имитирует шарнирную последовательность в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, например, уменьшая обмен Fab-плечо между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у подвергаемого лечению пациента. Labrijn *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925.

Потенциальный сайт расщепления протеазы в шарнире конструкций IgG1 можно удалить с помощью модификаций D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела. Публикация международной заявки WO 2014/043344.

Аффинности и связывающие свойства варианта Fc для его лигандов (рецепторов Fc) могут быть определены с помощью различных способов анализов *in vitro* (биохимических или иммунологических анализов), известных в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, равновесные способы (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ИФА) или радиоиммуноанализ (RIA)) или кинетику (например, анализ SPR BIACORE®) и другие способы, такие как непрямые анализы связывания, конкурентные ингибирующие анализы, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут использовать метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использовать множество способов обнаружения, включая в себя, без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в публикации Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой основное внимание уделяется взаимодействию антитело-иммуноген.

Согласно другим вариантам осуществления гликозилирование антитела модифицируют для увеличения или уменьшения эффекторной функции. Например, может быть получено агликозилированное антитело, которое не обладает всей эффекторной функцией путем мутации консервативного остатка аспарагина в

положении 297 (например, N297A), тем самым отменяя связывание комплемента и FcγRI. Bolt *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. Смотрите также Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (с использованием N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297).

Хотя агликозилированные антитела, как правило, не обладают эффекторной функцией, для восстановления этой функции могут быть введены мутации. Агликозилированные антитела, например, те, которые возникают в результате мутаций N297A/C/D/или H или производятся в системах (например, *E.coli*), которые не являются гликозилированными белками, могут быть дополнительно мутированы для восстановления связывания FcγR, например, S298G и/или T299A/G/или H (публикация международной заявки WO 2009/079242) или E382V и M428I (Jung *et al.* (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)* 107:604).

Кроме того, антитело с усиленным ADCC может быть получено путем изменения гликозилирования. Например, было показано, что удаление фукозы из связанных с Asn297 тяжелой цепи олигосахаридов усиливает ADCC на основе улучшенного связывания с FcγRIIIa. Shields *et al.* (2002) *JBC* 277:26733; Niwa *et al.* (2005) *J. Immunol. Methods* 306: 151; Cardarelli *et al.* (2009) *Clin. Cancer Res.*15:3376 (MDX-1401); Cardarelli *et al.* (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342) Такие антитела с небольшим содержанием фукозы могут быть получены, например, в нокаутированных клетках яичника китайского хомячка (CHO), лишенных фукозилтрансферазы (*FUT8*) (Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614), или в других клетках, которые производят ацидолизированные антитела. Смотрите, например, Zhang *et al.* (2011) *mAbs* 3:289 и Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (оба описывают производство антител в модифицированном с помощью гликоинженерии *Pichia pastoris*); Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393; Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; Европейский патент EP 1176195B1. ADCC также может быть усилена, как описано в публикации PCT WO 03/035835, в которой раскрывается применение варианта клеточной линии CHO, Lec13, с уменьшенной способностью прикреплять фукозу к связанным с Asn (297) углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессированных в этой клетке-хозяине (смотрите также Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Альтернативно, в культуральную среду могут быть добавлены аналоги фукозы во время производства антител, чтобы ингибировать включение фукозы в углевод на антителе (смотрите, например, публикацию международной заявки WO 2009/135181).

Увеличение скошенных структур GlcNac в прикрепленных к антителам олигосахаридах также усиливает ADCC. Публикация PCT WO 99/54342 от Umana *et al.* описывает клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют увеличенные скошенные структуры GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC антитела (смотрите также Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Были разработаны дополнительные варианты гликозилирования, которые лишены остатков галактозы, сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы GNGN), которые проявляют усиленные ADCC и ADCP, но уменьшенную CDC, а также другие, которые лишены сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы G1/G2), которые демонстрируют усиленные ADCC, ADCP и CDC. Публикация заявки на выдачу патента США № 2013/0149300. Антитела, характеризующиеся этими образцами гликозилирования, необязательно получают в генетически модифицированных растениях *N. benthamiana*, в которых были нокаутированы гены эндогенной ксилозил- и фукозилтрансферазы.

Гликоинжиниринг также может быть использован для модификации противовоспалительных свойств конструкции IgG путем изменения содержания сиалила α2,6 в углеводных цепях, прикрепленных к Asn297 областей Fc, причем повышенная доля α2,6-сиалилированных форм приводит к усилению противовоспалительных эффектов. Смотрите Nimmerjahn *et al.* (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. Напротив, снижение доли антител, содержащих α6,6-сиалилированные углеводы, может быть полезным в случаях, когда противовоспалительные свойства не нужны. Способы модификации содержания α2,6-силилирования антител, например, путем селективной очистки α2,6-сиалилированных форм или путем ферментативной модификации, приведены в публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0206246. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотная последовательность области Fc может быть модифицирована для имитации влияния α2,6-сиалилирования, например, путем включения модификации F241A (смотрите, например, публикацию международной заявки WO 2013/095966).

VIII. Физические свойства антител

Описанные в настоящем документе антитела могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельной области легкой или тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить к повышенной иммуногенности антитела или изменению pK антитела вследствие измененного связывания антигена (Marshall et al (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick et al (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 не содержит гликозилирование вариабельной области. Этого можно достичь либо путем выбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельной области, либо путем мутирования остатков в области гликозилирования.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела не содержат сайты изомеризации аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить на последовательностях N-G или D-G и приводить к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вводит перегиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты). Например, если аминокислотная последовательность Asp-Gly присутствует в последовательностях CDR тяжелой и/или легкой цепи антитела, последовательность заменяется аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации. Согласно одному варианту осуществления антитело содержит последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 76, но причем Asp или Gly в последовательности Asp-Gly (LISY**DG**SRKHYADSVKG; SEQ ID NO: 76) замещают аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации, например, последовательностью Asp-Ser или Ser-Gly. Согласно другому варианту осуществления антитело содержит последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 88, но причем Asp или Gly в последовательности Asp-Gly (AIDT**DG**GTFYADSVRG; SEQ ID NO: 88) замещают аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации, например, последовательностью Ser-Gly, Asp-Ala или Ser-Thr.

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая, как правило, находится в диапазоне pH от 6 до 9,5. pI для антитела IgG1, как правило, находится в диапазоне pH 7-9,5, а pI для антитела IgG4, как правило,

находится в диапазоне pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI вне нормального диапазона могут характеризоваться некоторым разворачиванием и нестабильностью в условиях in vivo. Таким образом, предпочтительно иметь антитело к OX40, которое характеризуется значением pI, попадающим в нормальный диапазон. Это может быть достигнуто либо путем выбора антител с pI в нормальном диапазоне, либо путем мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления с более высокой температурой плавления, что указывает на большую общую стабильность in vivo (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_{M1} (температура начального разворачивания) превышала 60°C, предпочтительно превышала 65°C, еще более предпочтительно превышала 70°C. Точку плавления антитела можно измерить с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

Согласно предпочтительному варианту осуществления выбирают антитела, которые быстро не деградируют. Деградация антитела может быть измерена с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32). Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к OX40 (например, антитело OX40.21) характеризуются повышенной стабильностью.

Соответственно, согласно другим вариантам осуществления выбирают антитела, которые обладают минимальными эффектами агрегации, что может приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, антитела приемлемы с агрегацией 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, еще более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее и даже более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно измерить несколькими способами, включающими в себя гель-проникающую хроматографию (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и светорассеяние.

IX. Способы конструирования антител

Как обсуждалось в настоящем документе, антитела к OX40, содержащие раскрытые в настоящем документе последовательности V_H и V_L, могут быть

использованы для создания новых антител к OX40 путем модификации последовательностей V_H и/или V_L или константной области(ей) антител. Таким образом, согласно другому варианту осуществления структурные особенности описанных в настоящем документе антител к OX40, например, 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1, используются для создания структурно связанных антител к OX40, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство описанных в настоящем документе антител, такое как связывание с OX40 человека и OX40 яванского макака. Например, одна или несколько областей CDR в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1 или их мутации, могут быть рекомбинантно объединены с известными каркасными областями и/или другими CDR для создания дополнительных, рекомбинантно сконструированных антител к OX40, как обсуждалось выше. Другие типы модификаций включают в себя те, которые описаны в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования является одна или несколько последовательностей V_H и/или V_L, предусмотренных в настоящем документе, или одна или несколько областей CDR. Чтобы создать сконструированное антитело, нет необходимости фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько предусмотренных в настоящем документе последовательностей V_H и/или V_L или одну или несколько его областей CDR. Скорее, информация, содержащаяся в последовательности(ях), используется в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) «второго поколения», полученной из исходной последовательности(ей), а затем получают последовательность(и) «второго поколения» и экспрессируют в виде белка.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы получения антител к OX40, предусматривающие:

(a) обеспечение: (i) последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 19, 31, 39, 51, 59, 67, 75 и 87, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 20, 32, 40, 52, 60, 68, 76, 88 и 317, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 21, 33, 41, 53, 61, 69, 77 и 89; и (ii) последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 22, 25, 34, 42, 45, 54, 62, 70, 78, 81 и 90, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 23, 26, 35, 43, 46, 55, 63, 71, 79, 82

и 91, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 24, 27, 36, 44, 47, 56, 64, 72, 80, 83 и 92;

(b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности вариабельной области легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антител; а также

(c) экспрессию измененной последовательности антител в виде белка.

Стандартные способы молекулярной биологии могут быть использованы для получения и экспрессии измененной последовательности антител.

Предпочтительно антитело, кодируемое измененной последовательностью(ями) антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все функциональные свойства описанных в настоящем документе антител к OX40, которые включают в себя:

(1) связывание с растворимым OX40 человека, например, с K_D 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством Biacore;

(2) связывание с мембраносвязанным OX40 человека, например, с EC_{50} 1 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 1 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(3) связывание с OX40 яванского макака, например, связывание с мембраносвязанным OX40 яванского макака, например, с EC_{50} 10 нМ или менее (например, от 0,01 нМ до 10 нМ), например, как измерено посредством FACS;

(4) индуцирование или усиление активации Т-клеток, о чем свидетельствует (i) увеличенное производство IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках и/или (ii) усиленная пролиферация Т-клеток;

(5) ингибирование связывания лиганда OX40 с OX40, например, с EC_{50} 1 нМ или менее, как измерено посредством FACS, например, в анализе с клетками hOX40-293;

(6) связывание с эпитопом на внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2), например, эпитопом в области DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) или DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179);

(7) конкуренция за связывание с OX40 человека с 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 и 20C1;

(8) конкуренция за связывание к OX40 человека с 6E1-1, 6E1-2, 14A2-1 и 14A2-2.

Измененное антитело может проявлять одно или несколько, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или все функциональные свойства, указанные как (1) - (7) выше. Функциональные свойства измененных антител могут быть

оценены с использованием стандартных анализов, доступных в настоящей области техники и/или описанных в настоящем документе, таких как те, которые приведены в примерах (например, ELISA, FACS).

Согласно некоторым вариантам осуществления способов конструирования описанных в настоящем документе антител мутации могут быть введены случайным образом или выборочно вдоль всей или части кодирующей последовательности антитела к OX40, и полученные модифицированные антитела к OX40 могут быть подвергнуты скринингу на активность связывания и/или на другие функциональные свойства, как описано в настоящем документе. Мутационные способы были описаны в настоящей области техники. Например, в публикация PCT WO 02/092780 от Short описаны способы создания и скрининга мутаций антител с использованием насыщающего мутагенеза, сборки посредством синтетического лигирования или их комбинации. Альтернативно, в публикации PCT WO 03/074679 от Lazar *et al.* описаны способы применения вычислительных способов скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

X. Молекулы нуклеиновой кислоты

Также в настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют описанные в настоящем документе антитела. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «приведенной к практически чистой форме» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, стандартными способами, включающими в себя обработку щелочами/ДСН, полоскание CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. Смотрите F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Предусмотренные в настоящем документе нуклеиновые кислоты могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Для

антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученные гибридомой, могут быть получены с помощью стандартной процедуры клонирования ПЦР или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с использованием способов фагового дисплея), кодирующая антитело нуклеиновая кислота может быть извлечена из библиотеки.

Предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот являются те, которые кодируют последовательности VH и VL в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VH в 3F4, 14B6, 23H3, 6E1, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2 и 20C1, представлены в SEQ ID NO: 126, 128, 131, 133, 136, 138, 140, 142, и 145, соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VL в 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1, представлены в SEQ ID NO: 127, 129, 130, 132, 134, 135, 137, 139, 141, 143, 144 и 146, соответственно. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности тяжелой цепи, представлены в SEQ ID NO: 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169171, 173, 175, 176 и 177. Иллюстративные последовательности ДНК, кодирующие последовательности легкой цепи, представлены в SEQ ID NO: 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172 и 174.

Иллюстративные нуклеотидные последовательности, кодирующие зрелые домены VH и VL антитела к OX40, представлены в SEQ ID NO: 145 и 146, соответственно. Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела к OX40, представлена в SEQ ID NO: 177. Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела OX40, представлена в SEQ ID NO: 168.

Способы получения представленных в настоящем документе антител к OX40 могут включать в себя экспрессию тяжелой цепи и легких цепей в клеточной линии, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи с сигнальным пептидом. Клетки-хозяева, содержащие эти нуклеотидные последовательности, также представлены в настоящем документе.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, эти фрагменты ДНК могут быть дополнительно обработаны посредством стандартных техник рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов вариабельной

области в гены цепи полноразмерного антитела, в гены Fab-фрагмента или ген scFv. В этих манипуляциях кодирующий VL или VH фрагмент ДНК функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Используемый в этом контексте термин «функционально связанный» относится к соединению двух фрагментов ДНК, так что аминокислотные последовательности, которые они кодируют, остаются в рамке.

Кодирующая область VH выделенная ДНК может быть превращена в ген полноразмерной тяжелой цепи посредством функционального связывания кодирующей VH ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в настоящей области техники (смотрите, например, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, область IgG1. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента кодирующая VH ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

Кодирующая область VL выделенная ДНК может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания кодирующей VL ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в настоящей области техники (смотрите, например, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

Чтобы создать ген scFv, кодирующие VH и VL фрагменты ДНК функционально связаны с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы как непрерывный одноцепочечный белок с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (смотрите, например, Bird *et al.* (1988) *Science*

242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Также в настоящем документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности VH и VL, которые являются гомологичными последовательностям моноклональных антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2 -2 и 20C1. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют последовательности VH и VL, которые по меньшей мере на 70% идентичны, например, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим последовательности VH и VL моноклональных антител 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20C1. Также в настоящем документе предусмотрены молекулы нуклеиновых кислот с консервативными заменами (т.е. заменами, которые не изменяют полученную аминокислотную последовательность при трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

XI. Получение антител

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть получены с использованием множества известных способов, таких как стандартный способ гибридизации соматических клеток, описанный Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя предпочтительны процедуры гибридизации соматических клеток, в принципе могут быть использованы и другие способы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация B-лимфоцитов, техника фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышиная система. Производство гибридомы у мышей представляет собой очень хорошо зарекомендовавшую себя процедуру. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в настоящей области техники. Также известны партнеры по слиянию (например, мышиные клетки миеломы) и способы слияния.

Описанные в настоящем документе химерные или гуманизированные антитела могут быть получены на основе последовательности мышиного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, может быть получена из представляющей интерес мышиной

гибридомы и сконструирована так, чтобы содержать немышиные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина, используя стандартные способы молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области мыши могут быть связаны с константными областями человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (смотрите, например, патент США № 4816567 на имя Cabilly *et al.*). Для создания гуманизированного антитела области CDR мыши могут быть вставлены в каркас человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (смотрите, например, патент США № 5225539 на имя Winter и патенты США № 5530101, 5558589, 5697662 и 6280370 на имя Queen *et al.*).

Согласно одному варианту осуществления описанные в настоящем документе антитела представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против OX40, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают в себя мышей, которые в настоящем документе называются мышами HuMAb и мышами KM, соответственно, и в совокупности упоминаются в настоящем документе как «мыши с человеческими Ig».

HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, которые кодируют нереаранжированные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой κ цепей иммуноглобулина человека вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепи μ и κ (смотрите, например, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Соответственно, мыши демонстрируют уменьшенную экспрессию мышиного IgM или κ, а в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению классов и соматической мутации для производства высокоаффинного моноклонального антитела IgGκ человека (Lonberg, N. *et al.* (1994), *выше*; в Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и использование мышей HuMab и геномных модификаций, переносимых такими мышами, далее описано в публикациях Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.*

152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591 и Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Смотрите дополнительно патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429, все на имя Lonberg и Kay; патент США 5545807 на имя Surani *et al.*; публикации PCT № WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и публикацию PCT № WO 01/14424 на имя Korman *et al.*

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела наращивают с использованием мыши, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхомосомах, такие как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе «мышами KM», подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 на имя Ishida *et al.*

Кроме того, альтернативные трансгенные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, доступны в настоящей области техники и могут быть использованы для наращивания описанных в настоящем документе антител к OX40. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6169663, на имя Kucherlapati *et al.*

Более того, альтернативные трансхромосомные животные системы, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, доступны в настоящей области техники и могут быть использованы для наращивания описанных в настоящем документе антител к OX40. Например, могут использоваться мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, называемые «мышами TC»; такие мыши описаны в публикации Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, в настоящей области техники описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) и они могут быть использованы для наращивания описанных в настоящем документе антител к OX40.

Дополнительные описанные в настоящей области техники мышиные системы для наращивания человеческих антител, например, антител к OX40 человека, включают в себя (i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), в которой эндогенные вариабельные области тяжелой и легкой цепей мыши заменены посредством

гомологичной рекомбинации вариабельными областями тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанными с эндогенными константными областями мыши, так что химерные антитела (V человека/C мыши) наращиваются у мышей и затем превращаются в полностью человеческие антитела с использованием стандартных способы рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), в которой мышь содержит нереаранжированные вариабельные области тяжелой цепи человека, но одну реаранжированную общую вариабельную область легкой цепи человека. Такие мыши и их использование для повышения антител описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека также могут быть получены с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека установлены в настоящей области техники. Смотрите, например: патенты США № 5223409; 5403484; и 5 571 698 на имя Ladner *et al.*; патенты США № 5427908 и 5580717 на имя Dower *et al.*; патенты США № 5969108 и 6172197 на имя McCafferty *et al.* и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 на имя Griffiths *et al.*

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека также могут быть получены с использованием мышей SCID, в которых иммунные клетки человека были восстановлены таким образом, что при иммунизации может быть получен ответ человеческого антитела. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767 на имя Wilson *et al.*

Иммунизация

Чтобы получить полностью человеческие антитела к OX40, трансгенные или трансхромосомные мыши, содержащие гены иммуноглобулина человека (например, мыши HCo12, HCo7 или KM), могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом антигена OX40 и/или клеток, экспрессирующих OX40 или его фрагмент, как описано для других антигенов, например, в публикации Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 и публикации международной заявки WO 98/24884. Альтернативно, мыши могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей OX40 человека или его фрагмент. Предпочтительно, мыши будут в возрасте 6-16 недель после первой инфузии. Например,

очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена OX40 может быть использован для иммунизации мышей HuMAb внутрибрюшинно. В том случае, если иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена OX40 не приводит к антителам, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими OX40, например, клеточной линией, для стимулирования иммунных реакций. Иллюстративные клеточные линии включают в себя сверхэкспрессирующие OX40 стабильные клеточные линии CHO и Raji.

Накопленный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши HuMAb лучше всего реагируют, когда первоначально иммунизируют внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном в адъюванте Ribi, а затем каждую неделю иммунизации IP/SC (до 10) антигеном в адъюванте Ribi. Иммунный ответ можно контролировать в течение курса протокола иммунизации, при этом образцы плазмы получают посредством ретроорбитальных кровотечений. Плазму можно подвергать скринингу с помощью ELISA и FACS (как описано ниже), а для слияний можно использовать мышей с достаточным количеством титров иммуноглобулина к OX40 человека. Мышей можно иммунизировать внутривенно антигеном за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что, возможно, потребуется выполнить 2-3 слияния для каждой иммунизации. От 6 до 24 мышей, как правило, иммунизируют для каждого антигена. Как правило, используют штаммы HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, как трансген HCo7, так и HCo12 можно воспроизводить совместно в одной мыше, имеющей два разных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, производящих моноклональные антитела к OX40

Для получения гибридом, производящих описанные в настоящем документе антитела, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия миеломы мыши. Полученные гибридомы можно подвергнуть скринингу для получения антигенспецифических антител. Например, одноцепочечные суспензии селезеночных лимфоцитов от иммунизированных мышей могут быть слиты с несекретирующими клетками миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) с 50% ПЭГ. Клетки высевают в количестве приблизительно 2×10^5 в плоскодонных планшетах, затем проводят двухнедельную инкубацию в селективной среде, содержащей 10% фетальной клон-сыворотки, 18% кондиционированной среды «653», 5% оригена

(IGEN), 4 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанола, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1-кратного HAT (Sigma). Приблизительно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменяют на HT. Затем отдельные лунки можно подвергать скринингу посредством ELISA на моноклональные антитела IgM и IgG человека. После экстенсивного роста гибридомы среду можно наблюдать, как правило, через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы могут быть реплицированы, снова скринированы и, если они еще положительны в отношении IgG человека, моноклональные антитела могут быть субклонированы по меньшей мере дважды посредством ограниченного разведения. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антитела в тканевой культуральной среде для определения характеристик.

Для очистки антител выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых флаконах с перемешиванием для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А-сефароза (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно обменивать на PBS, и концентрацию можно определить с помощью OD280 с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Затем антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Получение трансфектом, производящих моноклональные антитела к OX40

Антитела могут быть получены в трансфектоме клетки-хозяина с использованием, например, комбинации способов рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно в настоящей области техники (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов антител ДНК, кодирующие неполные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, могут быть получены стандартными способами молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует представляющее интерес антитело) и ДНК могут быть вставлены в векторы экспрессии, так что гены функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В этом контексте термин «функционально связанный» означает, что ген антитела лигируют в вектор, так что последовательности контроля транскрипции и

трансляции внутри вектора служат для их предполагаемой функции регулирования транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессионные векторы и последовательности контроля экспрессии выбирают так, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессионной клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно вставлять в отдельный вектор или оба гена вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Гены антител вводят в экспрессионный(ые) вектор(ы) стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе или лигированием тупых концов, если нет сайтов рестрикции). Вариабельные области легкой и тяжелой цепи описанных в настоящем документе антител могут быть использованы для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа антитела путем вставки их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи желаемого изотипа, так что сегмент V_H функционально связан с сегментом(ами) C_H внутри вектора, а сегмент V_L функционально связан с сегментом C_L внутри вектора.

Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антител может быть клонирован в вектор, так что сигнальный пептид связан в рамке с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка неиммуноглобулина). Иллюстративные сигнальные последовательности для использования в тяжелых и легких цепях антитела включают в себя сигнальные последовательности, первоначально обнаруженные в описанных в настоящем документе антителах к OX40.

В дополнение к генам цепи антитела рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Термин «регуляторная последовательность» предназначен для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля за экспрессией (например, сигналов полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что дизайн вектора экспрессии, включая в себя выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как

выбор подвергающейся трансформации клетки-хозяина, уровня экспрессии желаемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии клеток-хозяев млекопитающих включают в себя вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьяны 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP) и полиомы. Альтернативно могут быть использованы невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или промотор β-глобина. Кроме того, регуляторные элементы состоят из последовательностей из разных источников, таких как промоторная система SRα, которая содержит последовательности от раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса лейкоза Т-клеток человека типа 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

В дополнение к генам цепи антитела и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, ориджины репликации) и селектируемые маркерные гены. Селектируемый маркерный ген облегчает выбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (смотрите, например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все на имя Axel *et al.*). Например, как правило, селектируемый маркерный ген обеспечивает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, в клетке-хозяине, в которую был введен вектор. Предпочтительные селектируемые маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в клетках-хозяевах dhfr с селекцией/амплификацией метотрексата) и ген neo (для выбора G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей вектор(ы) экспрессии, кодирующий тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина стандартными способами. Различные формы термина «трансфекция» предназначены для охвата широкого спектра способов, как правило, используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорация, осаждение кальцием-фосфатом, трансфекция DEAE-декстраном и тому подобное. Хотя теоретически возможно экспрессировать описанные в настоящем документе антитела в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно клетках-хозяевах млекопитающих является наиболее предпочтительной, поскольку такие

эукариотические клетки и, в частности, клетки млекопитающих, более схожи, чем прокариотические клетки для сборки и секреции правильно упакованного и иммунологически активного антитела. Сообщалось, что прокариотическая экспрессия генов антитела неэффективна для получения высоких выходов активных антител (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Указанные в настоящем документе антитела также могут быть получены в гликоинжинированных штаммах дрожжей *Pichia pastoris*. Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии описанных в настоящем документе рекомбинантных антител включают в себя яичник китайского хомячка (клетки CHO) (включая в себя клетки dhfr-CHO, описанные в публикации Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селективным маркером DHFR, например, как описано в публикации R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol. 159*:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для использования с клетками миеломы NSO другой предпочтительной системой экспрессии является система экспрессии GS-генов, раскрытая в публикации международной заявки WO 87/04462, WO 89/01036 и Европейском патенте EP 338841. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для того, чтобы допустить экспрессию антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрецию антитела в культуральную среду, в которой растут клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белка.

N- и C-концы полипептидных цепей антител по настоящему изобретению могут отличаться от ожидаемой последовательности из-за обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, C-концевые лизиновые остатки часто отсутствуют в тяжелых цепях антител. Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. N-концевые остатки глутамина и, в меньшей степени, остатки глутамата часто превращаются в остатки пироглутамата как в легких, так и в тяжелых цепях терапевтических антител. Dick *et al.* (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu *et al.* (2011) *JBC* 28611211; Liu *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

XII. Анализы

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть исследованы на связывание с OX40, например, посредством стандартного анализа ИФА. Вкратце,

микротитровальные планшеты покрывают очищенным OX40 в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS и затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Разведения антител (например, разведения плазмы от иммунизированных OX40 мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween, а затем инкубируют со вторичным реагентом (например, для антител человека, козий поликлональный реагент специфичный к Fc IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 часа при 37°C. После промывки планшеты проявляют с подложкой ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем дополнительно подвергают скринингу с помощью проточной цитометрии на связывание с клеточной линией, экспрессирующей OX40 человека, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует OX40. Вкратце, связывание антител к OX40 оценивают путем инкубации экспрессирующих OX40 клеток CHO с антителом к OX40 при разведении 1:20. Клетки промывают, и связывание обнаруживают с помощью меченного PE антитела к человеческому IgG. Проточные цитометрические анализы проводят с использованием проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Предпочтительно мышей, которые вырабатывают самые высокие титры, будут использоваться для слияний.

Описанный выше анализ ИФА можно использовать для скрининга на антитела и, таким образом, гибридомы, которые производят антитела, которые проявляют положительную реактивность с иммуногеном OX40. Гибридомы, которые производят антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с OX40, затем могут быть субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон из каждой гибридомы, который сохраняет реакционную способность исходных клеток (с помощью ИФА), затем может быть выбран для получения банка клеток и для очистки антител.

Для очистки антител к OX40 выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых флаконах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком A-сефароза (Pharmacia, Piscataway, NJ). Элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно обменивать на PBS, и концентрацию можно определить с помощью OD_{280} с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Чтобы определить, связываются ли выбранные антитела к OX40 с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированных моноклональных антител может быть обнаружено с помощью меченого стрептавидином зонда. Конкурентные исследования с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител могут быть выполнены с использованием покрытых OX40 планшетов ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител изотипные анализы ELISA могут быть выполнены с использованием реагентов, специфичных к антителам конкретного изотипа. Например, для определения изотипа моноклонального антитела человека лунки микротитрационных планшетов могут быть покрыты 1 мкг/мл античеловеческого иммуноглобулина в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% БСА планшеты подвергают взаимодействию с 1 мкг/мл или менее исследуемых моноклональных антител или очищенных изотипических контролей при температуре окружающей среды в течение одного-двух часов. Затем лунки могут быть подвергнуты взаимодействию связанными со специфическими к IgG1 либо к IgM человека щелочными фосфатазами зондами. Планшеты проявляют и анализируются, как описано выше.

Чтобы исследовать связывание антител с живыми клетками, экспрессирующими OX40, можно использовать проточную цитометрию, как описано в примерах. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный OX40 (выращенные в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% БСА, при 4°C в течение 1 часа. После промывания клетки подвергают взаимодействию с меченным флуоресцеином антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичного антитела. Образцы могут быть проанализированы с помощью прибора FACScan с использованием свойств светового и бокового рассеяния для получения гейтов на отдельных клетках и определения связывания меченых антител. Альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии может быть использован в дополнение или вместо способа проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может характеризоваться сниженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Антитела к OX40 могут быть дополнительно исследованы на реактивность с антигеном OX40 с помощью Вестерн-блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих OX40, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза отделенные антигены переносят в нитроцеллюлозные мембраны, блокированные 20% мышиной сывороткой, и исследуют с подлежащими тестированию моноклональными антителами. Связывание IgG может быть обнаружено с использованием щелочной фосфатазы к IgG и проявлено с использованием таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания предусматривают стандартные анализы, известные в настоящей области техники, например, анализ SPR BIACORE® с использованием прибора SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 специфически связывается с внеклеточной областью OX40 человека. Например, антитело может специфически связываться с определенным доменом (например, функциональным доменом) внутри внеклеточного домена OX40. Согласно конкретному варианту осуществления антитело специфически связывается с сайтом на OX40, с которым связывается OX40-L. Согласно другим вариантам осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью OX40 человека и внеклеточной областью OX40 яванского макака.

XIII. Иммуноконъюгаты, производные и диагностика антител

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут применяться для диагностических целей, включая в себя исследование образцов и визуализацию *in vivo*, и для этой цели антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с подходящим средством для обнаружения с образованием иммуноконъюгата. В диагностических целях подходящими средствами являются обнаруживаемые метки, которые включают в себя радиоизотопы, для визуализации всего организма, и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие теги антител для исследования образцов.

Обнаруживаемые метки могут представлять собой любые из различных типов, используемых в настоящее время в области диагностики *in vitro*, включая в себя метки-частицы, включая в себя золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как

I^{125} или Tc^{99}, представленные, например, пептидным хелатирующим средством типа N_2S_2, N_3S или N_4, хромофоры, включая флуоресцентные маркеры, биотин, люминесцентные маркеры, фосфоресцентные маркеры и тому подобное, а также метки-ферменты, которые превращают данный субстрат в обнаруживаемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые обнаруживаются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Затем биотинилированное антитело может быть обнаружено связыванием авидина или стрептавидина. Подходящие метки-ферменты включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и тому подобное. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, обнаруженный путем измерения наличия или образования хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантилметоксифосфорилоксифенилдиоксетан (AMPPD), динатрий 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1 3,7}декан}-4-ил)фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных специалистам в настоящей области техники, например, хелаты подходящих лантаноидов, таких как тербий (III) и европий (III). Средства обнаружения определяются выбранной меткой. Проявление метки или продуктов ее реакции может быть достигнуто невооруженным глазом, в случае, когда метка представляет собой частицу и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием таких инструментов, как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т. п., все в соответствии со стандартной практикой.

Предпочтительно, способы конъюгации приводят к связям, которые являются по существу (или почти) неиммуногенными, например, пептидные (т.е. амидные), сульфидные, (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Эти связи почти не иммуногенные и проявляют разумную стабильность в сыворотке (смотрите, например, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244, публикации международных заявок WO 2009/059278, WO 95/17886).

В зависимости от биохимической природы фрагмента и антитела могут быть использованы различные стратегии конъюгации. В случае если фрагмент представляет собой природный или рекомбинантный полипептид, содержащий от 50 до 500 аминокислот, в пособиях описываются химические вещества для синтеза белковых конъюгатов, которые могут быть легко выполнены специалистом в настоящей области техники (смотрите, например, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., Angew. Chem. *Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). Согласно одному варианту осуществления используют реакцию малеинимидогруппы с цистеиновым остатком внутри антитела или

фрагмента. Это особенно подходящая химия сочетания в случае, например, фрагмента Fab или Fab' антитела. Альтернативно, согласно одному варианту осуществления выполняют сочетание с С-концевым концом антитела или фрагмента. С-концевая модификация белка, например, Fab-фрагмента может быть, например, выполнена, как описано (Sunbul, M. and Yin, *J., Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

В общем, сайт-специфическая реакция и ковалентное сочетание основаны на трансформации натуральной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является ортогональной по отношению к реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в контексте редкой последовательности может быть ферментативно преобразован в альдегид (смотрите Frese, M. A., and Dierks, T., ChemBioChem. 10 (2009) 425-427). Также возможно получить желаемую аминокислотную модификацию, используя конкретную ферментативную реакционную способность некоторых ферментов с природной аминокислотой в определенном контексте последовательности (смотрите, например, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. Chem. *Biol.* 15 (2008) 128-136 и катализируемое протеазами образование связей C--N описано в публикации Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403).

Сайт-специфическую реакцию и ковалентное сочетание можно также получить путем селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами.

Реакционная способность N-концевого цистеина с бензонитрилами (смотрите Ren et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) может быть использована для достижения сайт-специфического ковалентного сочетания.

Первичное химическое лигирование также может опираться на С-концевые цистеиновые остатки (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). В Европейском патенте EP 1074563 описан способ конъюгации, основанный на более быстрой реакции цистеина в пределах участка отрицательно заряженных аминокислот, чем цистеина, расположенного на участке положительно заряженных аминокислот.

Этот фрагмент может также представлять собой синтетический пептид или имитатор пептида. В случае химического синтеза полипептида во время этого синтеза могут быть включены аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью (смотрите, например, de Graaf et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Поскольку на карту поставлено большое разнообразие ортогональных функциональных

групп и их можно вводить в синтетический пептид, конъюгация такого пептида с линкером представляет собой стандартную химию.

Чтобы получить мономеченный полипептид, конъюгат со стехиометрией 1:1 можно отделить хроматографией от других побочных продуктов конъюгации. Эту процедуру можно облегчить, используя меченного красителем представителя связывающейся пары и заряженный линкер. Используя этот тип меченого и сильно отрицательно заряженного представителя связывающейся пары, моноконъюгированные полипептиды легко отделяются от немеченных полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку разницу в заряде и молекулярной массе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть применим для очистки комплекса от несвязанных компонентов, например, меченого моновалентного связующего.

Согласно одному варианту осуществления фрагмент, присоединенный к антителу к OX40, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, меченого фрагмента и биологически активного фрагмента.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 также могут быть конъюгированы с терапевтическим средством с образованием такого иммуноконъюгата, как конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC). Подходящие терапевтические средства включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК средства, ДНК-интеркалаторы, сшивающие ДНК средства, ингибиторы гистоновой дезацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимиметические средства. В ADC антитело и терапевтическое средство предпочтительно конъюгируют посредством расщепляемого линкера, такого как пептидиловый, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно, линкер представляет собой такой пептидиловый линкер, как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 180), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC могут быть получены, как описано в патентах США № 7087600; 6989452 и 7129261; публикациях PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях патентов США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Более конкретно, в ADC антитело конъюгируют с лекарственным средством, причем антитело функционирует как нацеливающее средство для направления ADC к

клетке-мишени, экспрессирующей антиген, такой как злокачественная клетка. Предпочтительно антиген представляет собой связанный с опухолью антиген, то есть тот, который однозначно экспрессируется или сверхэкспрессируется злокачественной клеткой. После этого лекарственное средство высвобождается либо внутри клетки-мишени, либо в ее окрестности, чтобы действовать как терапевтическое средство. Для обзора механизма действия и применения ADC в терапии злокачественной опухоли смотрите Schrama *et al.*, *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.

Для лечения злокачественной опухоли лекарственное средство предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель нацеленной злокачественной клетки. Цитотоксические лекарственные средства, которые могут использоваться в ADC, включают в себя следующие типы соединений и их аналоги и производные:

(a) ендиины, такие как калихеамицин (смотрите, например, Lee *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3464 and 3466) и унциаламицин (смотрите, например, Davies *et al.*, WO 2007/038868 A2 (2007) и Chowdari *et al.*, US 8709431 B2 (2012));

(b) тубулизины (смотрите, например, Domling *et al.*, US 7778814 B2 (2010); Cheng *et al.*, US 8394922 B2 (2013) и Cong *et al.*, US № 14/177376, поданный 11 февраля 2014 г.));

(c) CC-1065 и дуокармицин (смотрите, например, Boger, US 65458530 B1 (2003); Sufi *et al.*, US 8461117 B2 (2013) и Zhang *et al.*, US 2012/0301490 A1 (2012));

(d) эпотилоны (смотрите, например, Vite *et al.*, US 2007/0275904 A1 (2007) и US RE42930 E (2011));

(e) ауристатины (смотрите, например, Senter *et al.*, US 684869 B2 (2005) и Doronina *et al.*, US 7498298 B2 (2009));

(f) димеры пирролобезодиазепина (PBD) (смотрите, например, Howard *et al.*, US 2013/0059800 A1 (2013), US 2013/0028919 A1 (2013) и WO 2013/041606 A1 (2013)); а также

(g) майтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (смотрите, например, Chari *et al.*, US 5202020 (1993) и Amphlett *et al.*, US 7374762 B2 (2008)).

В ADC линкер ковалентно связывает антитело и лекарственное средство. Как правило, имеется одна молекула лекарственного средства, прикрепленная к каждому линкеру, но линкер может быть разветвленным, что позволяет прикреплять множество молекул лекарственного средства для увеличения полезной нагрузки лекарственным средством, поставляемым на ADC. Кроме того, каждое антитело может содержать более

одного прикрепленного линкера. Число молекул лекарственного средства, переносимых на ADC, упоминается как отношение лекарственного средства к антителу (DAR). Например, если каждая тяжелая цепь антитела прикреплена к нему одним линкером, который, в свою очередь, прикреплен к одной молекуле лекарственного средства, DAR равно 2. Предпочтительно DAR составляет от 1 до 5, более предпочтительно от 2 до 4. Специалисты в настоящей области техники также будут понимать, что, хотя в каждом отдельном ADC антитело конъюгировано с целым числом молекул лекарственного средства, в целом, получение ADC может анализироваться для нецелого DAR, отражающего статистический средний показатель. Таким образом, архитектура ADC может быть представлена следующей формулой:

[Антитело]-[Линкер-(Лекарственное средство)$_n$]$_m$

где m, как правило, равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 (предпочтительно 2, 3 или 4), а n равно 1, 2 или 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер содержит отщепляемую группу, которая расщепляется внутри или вблизи клетки-мишени, чтобы высвободить лекарственное средство. Согласно другим вариантам осуществления линкер не содержит отщепляемую группу, но, скорее, ADC полагается на катаболизм антитела для высвобождения лекарственного средства.

Один тип расщепляемой группы представляет собой чувствительную к pH группу. Значение pH в плазме крови немного выше нейтрального, в то время как значение pH внутри лизосомы, где большинство ADC заканчивают свое существование после интернализации внутри клетки-мишени, является кислым, приблизительно 5. Таким образом, расщепляемая группа, расщепление которой катализируется кислотой, будет расщепляться со скоростью на несколько порядков выше внутри лизосомы, чем в плазме крови. Примеры кислоточувствительных групп включают в себя цис-аконитиламиды и гидразоны, как описано в Shen *et al.*, US 4631190 (1986); Shen *et al.*, US 5144011 (1992); Shen *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 102, 1048 и Yang *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)*, 1988, 85, 1189; раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому варианту осуществления расщепляемая группа представляет собой дисульфид. Дисульфиды могут расщепляться с помощью механизма тиол-дисульфидного обмена со скоростью, зависящей от концентрации окружающего тиола. Поскольку внутриклеточная концентрация глутатиона и других тиолов выше их концентрации в сыворотке, скорость расщепления дисульфида будет выше

внутриклеточно, то есть после интернализации ADC. Кроме того, скорость тиол-дисульфидного обмена может быть модулирована путем регулирования стерических и электронных характеристик дисульфида (например, алкилариларилдисульфида в сравнении с алкилалкилдисульфидом, замещение на арильном кольце и т.д.), что делает возможным дизайн дисульфидных связей, которые повышают стабильность сыворотки или конкретную скорость расщепления. Для получения дополнительной информации, касающейся дисульфидных расщепляемых групп в конъюгатах, смотрите, например, Thorpe *et al.*, *Cancer Res.* 1988, 48, 6396; Santi *et al.*, US 7541530 B2 (2009); Ng *et al.*, US 6989452 B2 (2006); Ng *et al.*, WO 2002/096910 A1 (2002); Boyd *et al.*, US 7691962 B2 (2010) и Sufi *et al.*, US 2010/0145036 A1 (2010); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительной расщепляемой группой является пептид, который селективно расщепляется протеазой внутри клетки-мишени, в отличие от протеазы в сыворотке. Как правило, отщепляемая пептидная группа содержит от 1 до 20 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот, более предпочтительно от 1 до 3 аминокислот. Аминокислота(ы) может представлять собой природную и/или неприродную α-аминокислоту. Природными аминокислотами являются те, которые кодируются генетическим кодом, а также полученные из них аминокислоты, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, цитруллин и О-фосфосерин. В этом контексте термин «аминокислота» также включает в себя аминокислотные аналоги и миметики. Аналогами являются соединения, характеризующиеся одной и той же общей структурой $H_2N(R)CHCO_2H$ природной аминокислоты, за исключением того, что R-группа не встречается среди природных аминокислот. Примеры аналогов включают в себя гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид и метионинметилсульфоний. Миметик аминокислот представляет собой соединение, которое характеризуется структурой, отличной от общей химической структуры α-аминокислоты, но функционирует аналогично таковой. Аминокислота может характеризоваться стереохимией «L» генетически кодированных аминокислот, а также энантиомерной стереохимией «D».

Предпочтительно, расщепляемая пептидная группа содержит аминокислотную последовательность, которая представляет собой последовательность распознавания расщепления для протеазы. В настоящей области техники известны многие последовательности распознавания расщепления. Смотрите, например, Matayoshi *et al. Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al. Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al. Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al. Meth.*

Enzymol. 244: 595 (1994); Smith *et al. Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994) и Bouvier *et al. Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Более предпочтительно, расщепляемая пептидная группа содержит аминокислотную последовательность, выбранную для расщепления эндосомной или лизосомальной протеазой, особенно последней. Примеры таких протеаз включают в себя катепсины B, C, D, H, L и S, особенно катепсин B. Катепсин B предпочтительно расщепляет пептиды в последовательности -AA^2-AA^1-, где AA^1 представляет собой основную или сильно связывающую водород аминокислоту (такую как лизин, аргинин, или цитруллин), а AA^2 представляет собой гидрофобную аминокислоту (такую как фенилаланин, валин, аланин, лейцин или изолейцин), например Val-Cit (где Cit обозначает цитруллин) или Val-Lys, записанный в направлении от N к C. Для дополнительной информации о группах, расщепляемых катепсином, смотрите Dubowchik *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 3341; Dubowchik *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 3347 и Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 855; раскрытие которых включено посредством ссылки. Другим ферментом, который может быть использован для расщепления пептидильных линкеров, является легумен, лизосомальная цистеиновая протеаза, которая предпочтительно расщепляет Ala-Ala-Asn.

Согласно предпочтительному варианту осуществления линкер в ADC содержит ди- или трипептид, который предпочтительно расщепляется протеазой, расположенной внутри клетки-мишени. Предпочтительно ди- или трипептид расщепляется катепсином B, более предпочтительно дипептид Val-Cit или Val-Lys.

Могут также использоваться расщепляемые пептидные группы с единственной аминокислотой, как описано в Chen *et al.*, US 2010/0113476 A1 (2010), раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

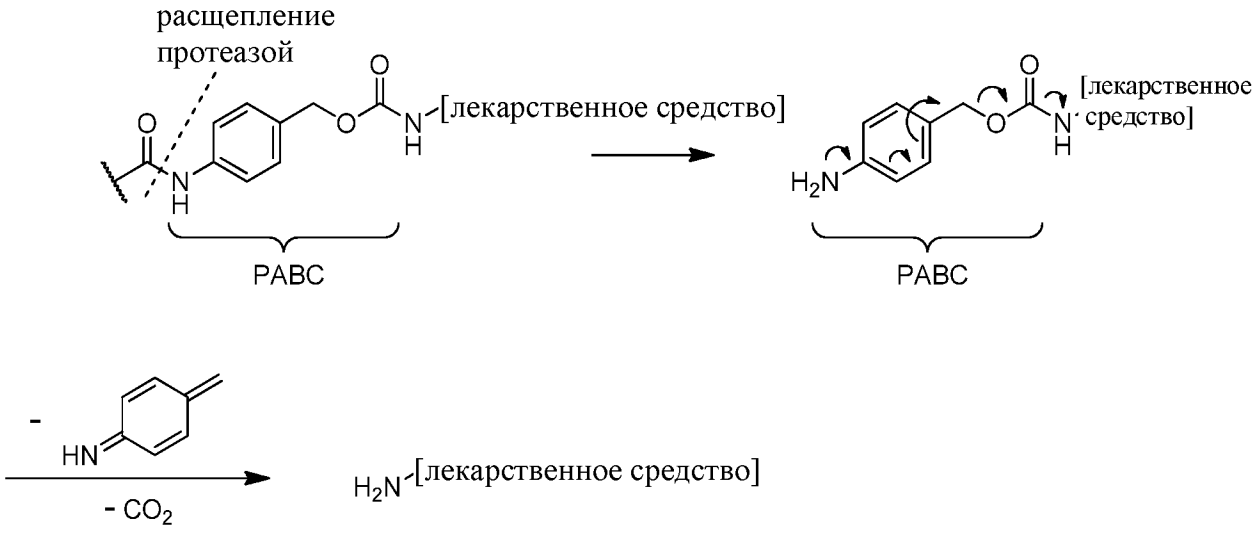
Для конъюгатов, которые не предназначены для интернализации клеткой, расщепляемая группа может быть выбрана так, чтобы она расщеплялась протеазой, присутствующей во внеклеточной матрице вблизи клетки-мишени, например, протеазой, высвобождаемой соседними погибающими клетками или опухолеассоциированной протеазой. Иллюстративные внеклеточные опухолеассоциированные протеазы представляют собой матриксные металлопротеазы (MMP), плазмин, тиметовую олигопептидазу (TOP) и CD10. Смотрите, например, Trouet *et al.*, US 5961216 (1999) и

US 7402556 B2 (2008); Dubois *et al.*, US 7425541 B2 (2008) и Bebbington *et al.*, US 6897034 B2 (2005); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Линкер может выполнять другие функции в дополнение к ковалентной связи антитела и лекарственного средства. Например, линкер может содержать группы поли(этиленгликоля) (ПЭГ), которые повышают растворимость либо во время осуществления химии конъюгации, либо в конечном продукте ADC.

Линкер может дополнительно включать в себя самоуничтожаемый фрагмент, расположенный рядом с отщепляемой пептидной группой. Самоуничтожаемая группа служит в качестве спейсера, который предотвращает стерическое вмешательство антитела и/или лекарственного компонента в расщепление пептидной группы протеазой, но затем самопроизвольно высвобождается (т.е. самоуничтожается), чтобы не мешать действию лекарственного средства. Смотрите Carl *et al.*, *J. Med. Chem.* 1981, 24 (3), 479; Carl *et al.*, WO 81/01145 (1981); Dubowchik *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics* 1999, 83, 67; Firestone *et al.*, US 6214345 B1 (2001); Toki *et al.*, *J. Org. Chem.* 2002, 67, 1866; Doronina *et al.*, *Nature Biotechnology* 2003, 21 (7), 778 (*erratum*, p. 941); de Groot *et al.*, . *Org. Chem.* 2001, 66, 8815; Boyd *et al.*, US 7691962 B2 (2010); Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1 (2008); Sufi *et al.*, WO 2008/083312 A2 (2008); Feng, US 7375078 B2 (2008); Jeffrey, US 8039273 B2 (2011) и Senter *et al.*, US 2003/0096743 A1 (2003); раскрытие которых включено посредством ссылки.

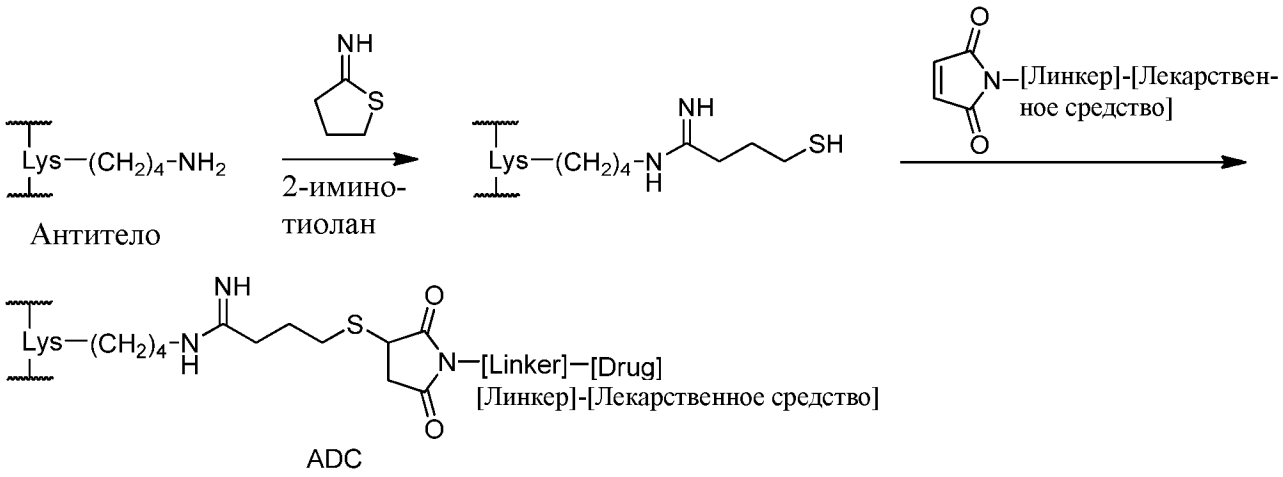
Предпочтительная самоуничтожаемая группа представляет собой группу p-аминобензилоксикарбонила (PABC), структура и механизм действия которой изображены ниже:



Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления ADC содержит линкер, содержащий ди- или трипептид, который предпочтительно

расщепляется протеазой, расположенной внутри клетки-мишени, и прилегающую к ди- или трипептиду самоуничтожаемую группу. Предпочтительно ди- или трипептид расщепляется катепсином B. Предпочтительно самоуничтожаемая группа представляет собой группу PABC.

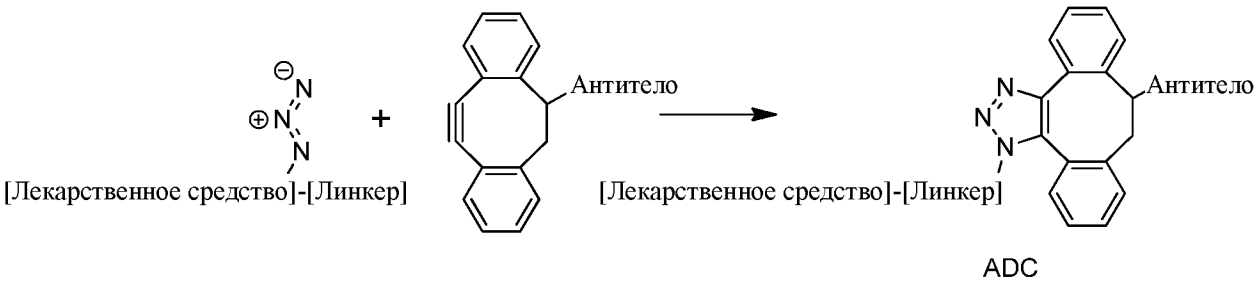
Для конъюгирования антитела и лекарственного средства могут быть использованы многочисленные способы. В предпочтительном случае ε-аминогруппу в боковой цепи лизинового остатка в антителе подвергают взаимодействию с 2-иминотиоланом для введения свободной тиоловой группы (-SH). Тиоловая группа может взаимодействовать с малеимидной или другой нуклеофильной акцепторной группой для осуществления конъюгации, как показано ниже:



Как правило, достигается уровень тиолирования от двух до трех тиолов на антитело. Для типичной процедуры смотрите Chowdari *et al.*, US 8709431 B2 (2014), раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, согласно одному варианту осуществления антитело по настоящему изобретению содержит один или несколько остатков лизина (предпочтительно два или три), модифицированных реакцией с иминотиоланом.

Альтернативная техника конъюгации использует не содержащую меди «клик-химию», в которой азидная группа добавляется через деформированную алкиновую связь циклооктина с образованием 1,2,3-триазольного кольца. Смотрите, например, публикации Agard *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 2004, *126*, 15046; Best, *Biochemistry* 2009, *48*, 6571, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Азид может быть расположен на антителе и циклооктине на фрагменте лекарственного средства или наоборот. Предпочтительная циклооктиновая группа представляет собой дибензоциклооктин (DIBO). Различные реагенты, содержащие группу DIBO, доступны

из Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregon. Нижеприведенная реакция иллюстрирует конъюгацию клик-химии для случая, в котором группа DIBO присоединена к антителю:



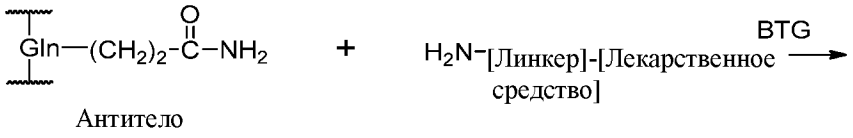
ADC

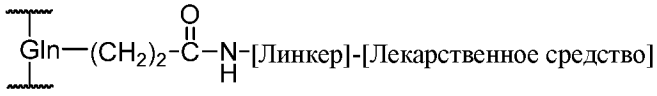
В ADC, выполненном по этой технике, линкер содержит 1,2,3-триазольное кольцо.

Еще один способ конъюгации предусматривает введение неприродной аминокислоты в антитело, причем неприродная аминокислота обеспечивает функциональность для конъюгации с реакционноспособной функциональной группой во фрагменте лекарственного средства. Например, п-ацетилфенилаланин неприродной аминокислоты может быть включен в антитело или другой полипептид, как описано в Tian *et al.*, WO 2008/030612 A2 (2008). Кетоновая группа в п-ацетилфениаланине может представлять собой сайт конъюгации путем образования оксима с гидроксиламиногруппой на фрагменте линкер-лекарственное средство. Альтернативно, п-азидофенилаланин неприродной аминокислоты может быть включен в антитело для обеспечения функциональной группы азида для конъюгации посредством клик-химии, как обсуждалось выше. Неприродные аминокислоты также могут быть включены в антитело или другой полипептид, используя бесклеточные способы, как описано в Goerke *et al.*, US 2010/0093024 A1 (2010) и Goerke *et al., Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102 (2), 400-416. Вышеуказанные раскрытия включены в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, согласно одному варианту осуществления антитело содержит одну или несколько аминокислот, замещенных неприродной аминокислотой, которая предпочтительно представляет собой п-ацетилфенилаланин или п-азидофенилаланин, более предпочтительно п-ацетилфенилаланин.

Еще один способ конъюгации использует фермент трансглутаминазу (предпочтительно бактериальную трансглутаминазу или BTG), как описано в Jeger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, *49*, 9995. BTG образует амидную связь между карбоксамидом боковой цепи глутамина и алкиленаминогруппой, которая может представлять собой, например, ε-аминогруппу лизина или 5-амино-н-пентильную группу. В типичной реакции конъюгации остаток глутамина находится на антителе, тогда как

алкиленаминогруппа расположена на фрагменте линкера с лекарственным средством, как показано ниже:





ADC

Позиционирование остатка глутамина на полипептидной цепи оказывает большое влияние на его восприимчивость к опосредованному BTG трансамидированию. Ни один из остатков глутамина на антителе, как правило, не представляет собой субстрат BTG. Однако, если антитело дегликозилировано, то сайт гликозилирования, представляющий собой аспарагин 297 (N297) – ближайший глутамин 295 (Q295), успешно подвергается действию BTG. Альтернативно, антитело может быть синтезировано без гликозида путем введения мутации N297A в константную область, чтобы исключить сайт гликозилирования N297. Кроме того, было показано, что замена N297Q в антителе не только устраняет гликозилирование, но также вводит второй остаток глутамина (в положении 297), который также представляет собой восприимчивое опосредованное BTG трансамидирование. Таким образом, согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 дегликозилируется. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 содержит замену N297Q. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что дегликозилирование путем модификации после синтеза или путем введения мутации N297A приводит к получению двух BTG-реактивных остатков глутамина на антитело (по одному на тяжелую цепь в положении 295), тогда как антитело с заменой N297Q будет содержать четыре BTG-реактивных остатков глутамина (два на тяжелую цепь, в положениях 295 и 297).

Кроме того, в другой технике конъюгации используется фермент сортаза A, как описано в публикациях Levary *et al.*, *PLoS One* 2011, 6(4), e18342; Proft, *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 1-10; Ploegh *et al.*, WO 2010/087994 A2 (2010) и Mao *et al.*, WO 2005/051976 A2 (2005), раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Мотив распознавания сортазой A (как правило, LPXTG (SEQ ID NO: 181), где X представляет собой любую природную аминокислоту) может быть присоединен к антителу, а

нуклеофильный акцепторный мотив (как правило, GGG) может быть расположен на лекарственном фрагменте, или наоборот.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 также могут быть использованы для обнаружения OX40, такого как OX40 человека, например, OX40 человека в тканях или образцах тканей. Антитела могут быть использованы, например, в анализе ELISA или в проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 контактирует с клетками, например, клетками в ткани, в течение времени, подходящего для специфического связывания, и затем добавляют реагент, например, антитело, которое обнаруживает антитело к OX40. Иллюстративные анализы приведены в примерах. Антитело к OX40 может представлять собой полностью человеческое антитело или может представлять собой химерное антитело, такое как антитело, содержащее вариабельные области человека и константные области мыши или их часть. Иллюстративные способы обнаружения OX40, например, OX40 человека, в образце (образце клетки или ткани) предусматривают (i) контактирование образца с антителом к OX40 в течение времени, достаточного для обеспечения специфического связывания антитела к OX40 с OX40 в образце и (2) контактирование образца с реагентом для обнаружения, например, антителом, которое специфически связывается с антителом к OX40, таким как область Fc антитела к OX40, чтобы таким образом обнаружить OX40, связанный антителом к OX40. Стадии отмывания могут быть включены после инкубации с антителом и/или реагентом для обнаружения. Антитела к OX40 для применения в этих способах не обязательно должны быть связаны с меткой или средствами для обнаружения, так как может использоваться отдельное средство для обнаружения.

XIV. Биспецифические молекулы

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть использованы для образования биспецифических молекул. Например, антитело или его антигенсвязывающие части могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) с образованием биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 может быть связано с антителом или scFv, которое специфически связывается с любым белком, который может быть использован в качестве потенциальных мишеней для

комбинированных воздействий, таких как описанные в настоящем документе белки (например, антитела к PD-1, PD-L1 или LAG-3). Альтернативно, антитело может быть дериватизировано или связано более чем с одной другой функциональной молекулой для получения мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями. Такие мультиспецифические молекулы также должны охватываться используемым в настоящем документе термином «биспецифическая молекула». Для создания описанной в настоящем документе биспецифической молекулы антитело к OX40 может быть функционально связано (например, путем химической связи, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, так что получается биспецифическая молекула.

Соответственно, в настоящем документе представлены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания для OX40 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Согласно одному варианту осуществления биспецифическая молекула представляет собой мультиспецифическую, например, молекула дополнительно включает в себя третью специфичность связывания.

Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические молекулы содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела, включая в себя, например, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в Ladner *et al.*, патент США № 4946778, содержание которого явно включено посредством ссылки.

Хотя человеческие моноклональные антитела являются предпочтительными, другие антитела могут быть использованы в описанных в настоящем документе биспецифических молекулах, включая в себя, например, мышиные, химерные и гуманизированные антитела.

Предусмотренные в настоящем документе биспецифические молекулы могут быть получены путем конъюгации специфических связывающих компонентов с использованием способов, известных в настоящей области техники. Например, каждая связывающая специфичность биспецифической молекулы может быть получена отдельно и затем конъюгирована друг с другом. Когда специфические связывающие

компоненты представляет собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие средства. Примеры сшивающих средств включают в себя белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклохаксан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (смотрите, например, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают в себя описанные в публикациях Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Предпочтительные конъюгирующие средства представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфические связывающие компоненты представляет собой антитела, их можно конъюгировать с помощью сульфгидрильной связи шарнирных областей С-конца двух тяжелых цепей. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления шарнирная область модифицирована таким образом, чтобы содержать нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один, до конъюгации.

Альтернативно, оба специфических связывающих компонента могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно применим, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb x mAb, mAb x Fab, mAb x $(scFv)_2$, Fab x $F(ab')_2$ или лиганд x Fab. Биспецифическое антитело может содержать антитело, содержащее scFv на С-конце каждой тяжелой цепи. Описанная в настоящем документе биспецифическая молекула может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США №5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено с помощью признанных в настоящей области техники способов, таких как ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA),

анализ FACS, биоанализ (например, ингибирование роста) или анализ Вестерн-блоттинг. Каждый из этих анализов, как правило, обнаруживает наличие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного для представляющего интерес комплекса.

XV. Композиции

Дополнительно предусмотрены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител к OX40, отдельно или в комбинации с антителами к другим мишеням, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно или сочетание (например, двух или более разных) антител или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул, описанных в настоящем документе. Например, композиция может содержать комбинацию описанных в настоящем документе антител (или иммуноконъюгатов или биспецифических антител), которые связываются с различными эпитопами на OX40 или которые характеризуются комплементарными активностями.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит антитело к OX40 в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл, 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также могут вводиться при комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать в себя введение описанного в настоящем документе антитела к OX40 в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым и/или стимулирующим Т-клетки (т.е. активирующим) средством. Примеры терапевтических средств, которые можно использовать в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о применении описанных в настоящем документе антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе терапевтические композиции включают в себя другие соединения, лекарственные средства и/или средства, используемые для лечения злокачественной опухоли. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данную злокачественную опухоль. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать в себя, например, одно или несколько из следующего: антитело к CTLA-4,

антитело к PD-1, антитело к PDL-1, антитело к GITR, антитело к CD137 или антитело к LAG-3.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемые носители» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное вещество, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает никакого нежелательного токсикологического воздействия (смотрите, например, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя кислотно-аддитивные соли и соли присоединения основания. Кислотно-аддитивные соли включают в себя соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфорная и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные из таких щелочноземельных металлов, как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из таких нетоксичных органических аминов, как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также могут включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) жирорастворимые

антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие средства металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, такие растительные масла, как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с использованием поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, *выше*, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенольной сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть вызвана включением средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных растворов для немедленного применения для инъекций или дисперсии. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в настоящей области техники. За исключением того, что любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением, рассматривается их применение в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях. Фармацевтическая композиция может содержать консервант или может быть лишена консерванта. В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей

для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композиции изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в состав средства, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним или несколькими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных в настоящем изобретении. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка замораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильно-фильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьировать в зависимости от подлежащего лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, как правило, будет представлять собой такое количество композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет составлять от приблизительно 0,01 процента до приблизительно девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 процента до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 процента до приблизительно 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, несколько разделенных доз можно вводить с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в единичной дозированной форме для удобства введения и единообразия дозировки. Используемая в настоящем документе форма дозирования относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для подлежащих лечению пациентов; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация описанных в настоящем документе единичных дозированных форм продиктована и непосредственно зависит от (a) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничений, присущих области смешивания такого активного соединение для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела к OX40 дозировка составляет от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, приблизительно от 0,01 до 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг/кг или приблизительно от 0,5 до 0,8 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,2 мг/кг массы тела, 0,3 мг/кг массы тела, 0,5 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка составляет 0,2 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка составляет 0,25 мг/кг. Согласно другим вариантам осуществления дозировка составляет 0,5 мг/кг. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз каждые три-шесть месяцев. Иллюстративные схемы дозировки для описанных в настоящем документе антител включают в себя 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном введении, при этом антитело вводится с использованием одного из следующих графиков дозирования: (i) каждые четыре недели до достижения шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела, после чего следует 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

Согласно некоторым вариантам осуществления для комбинированного лечения антителом к OX40 и антителом к PD-1 или к CTLA-4 антитела вводят в фиксированной дозе. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят в фиксированной дозе от приблизительно 25 до приблизительно 320 мг, например, от приблизительно 25 до приблизительно 160 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 80 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг, от приблизительно 40 до приблизительно 320 мг, от приблизительно 40 до приблизительно 160 мг, от приблизительно 40 до приблизительно 80 мг, от приблизительно 80 до приблизительно 320 мг, от приблизительно 30 до приблизительно 160 мг или от приблизительно 160 до приблизительно 320 мг. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 вводят в дозе 20 мг или приблизительно 20 мг. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 вводят в дозе 40 мг или приблизительно 40 мг. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 вводят в дозе 80 мг или приблизительно 80 мг. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 вводят в дозе 160 мг или приблизительно 160 мг. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 вводят в дозе 320 мг или приблизительно 320 мг.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят в фиксированной дозе приблизительно от 100 до 300 мг. Например, дозировка иммуно-онкологического средства может составлять 240 мг или приблизительно 240 мг, 360 мг или приблизительно 360 мг или 480 мг или приблизительно 480 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза антитела к PD1 находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела или приблизительно 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела или приблизительно 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела или приблизительно 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или приблизительно 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или приблизительно 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка антитела к PD-1 составляет 240 мг или приблизительно 240 мг, вводимая один раз каждые 2 недели (Q2W). Эта доза может быть скорректирована пропорционально (при 120 мг в неделю) для более длительного или более короткого периода, например, 360 мг, вводимые один раз каждые 3 недели (Q3W), или 480 мг, вводимые один раз каждые 4 недели (Q4W).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 вводят в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Например, дозировки могут

составлять 1 мг/кг или приблизительно 1 мг/кг или 3 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг массы тела хозяина.

Иллюстративные схемы дозировки для комбинированного лечения антителом к OX40 и к PD-1 или к CTLA-4 представлены *ниже* в разделе «Применение и способы».

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят пациенту с продолжительностью инфузии от приблизительно 15 минут до приблизительно 60 минут, например, приблизительно 30 минут.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 (например, ниволумаб) вводят пациенту с продолжительностью инфузии от приблизительно 15 минут до приблизительно 60 минут, например, приблизительно 30 минут, при введении в дозе 3 мг/кг (0,1 мг/кг/мин). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят пациенту с продолжительностью инфузии приблизительно от 45 минут до 75 минут, например, приблизительно 60 минут, при введении в дозе 10 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 (например, ипилимумаб) вводят пациенту с продолжительностью инфузии приблизительно от 15 минут до 120 минут, например, приблизительно 30 минут, при введении в дозе 3 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 вводят пациенту с продолжительностью инфузии от 15 минут до 120 минут, например, 90 минут, при введении в дозе 10 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам осуществления при введении в тот же день антитело к OX40 вводят перед антителом к PD-1 или к CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления при введении в тот же день антитело к OX40 вводят после антитела к PD-1 или к CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления при введении в тот же день антитело к OX40 вводят одновременно с антителом к PD-1 или к CTLA-4.

Согласно некоторым вариантам осуществления при введении в тот же день антитело к OX40 вводят приблизительно за 15 - 45 минут (например, приблизительно за 30 минут) до антитела к PD-1 или к CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления при введении в тот же день антитело к OX40 вводят приблизительно через 15 - 45 минут (например, приблизительно через 30 минут) после антитела к PD-1 или к CTLA-4.

Альтернативно, предусмотренные в настоящем документе антитела к OX40 можно вводить в постоянной дозе (режим с постоянной дозой).

В некоторых случаях одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания, так что дозировка каждого вводимого антитела находится в пределах указанных выше диапазонов. Кроме того, антитела, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут составлять, например, одну неделю, один месяц, три месяца или один год. Интервалы также могут быть нерегулярными, как указано путем измерения уровня антител к целевому антигену у пациента. В некоторых способах дозировку корректируют для достижения концентрации антитела в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 можно вводить с другим антителом в режиме дозировки другого антитела. Например, антитело к OX40 можно вводить с антителом к PD-1, таким как ниволумаб (OPDIVO), каждые две недели в виде внутривенной инфузии в течение 60 минут до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. Альтернативно, антитело к OX40 можно вводить с пембролизумабом (KEYTRUDA) каждые 3 недели в виде внутривенной инфузии в течение 30 минут до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности.

Антитела можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. В общем, антитела человека демонстрируют самый длинный период полувыведения, за которым следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно низкая дозировка вводится с относительно небольшими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами, пока прогрессия заболевания не будет уменьшена или прекращена, и предпочтительно до тех пор, пока пациент не проявит частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту можно вводить профилактическую схему лечения.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях могут варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа

введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включающих в себя активность конкретных описанных в настоящем документе композиций или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выделения конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни подлежащего лечению пациента и подобных хорошо известных в медицине факторов.

«Терапевтически эффективные дозы» описанных в настоящем документе антител предпочтительно приводят к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидности вследствие заболевания. В контексте злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно приводит к увеличению выживаемости и/или предотвращению дальнейшего ухудшения физических симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Симптомы злокачественной опухоли хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, необычные особенности родинки, изменение внешнего вида родинки, включая асимметрию, границу, цвет и/или диаметр, область недавно пигментированной кожи, аномальную родинку, затемненную область под ногтями, уплотнения в груди, изменения сосков, кисты молочной железы, боль в груди, смерть, потерю массы, слабость, чрезмерную усталость, затрудненное питание, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшение одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь в стуле, тошноту, рвоту, метастазы в печени, метастазы в легких, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие живота, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорации толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, тяжелую потливость, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстой кишке, метастазы в легких, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в кости, метастазы в почках и метастазы в поджелудочной железе, затруднение при глотании и т.п.

Терапевтически эффективная доза может предотвращать или замедлять начало злокачественной опухоли, что, например, может потребоваться, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные исследования,

используемые при диагностике злокачественной опухоли, включают в себя анализ химических веществ (включая измерение содержания OX40), гематологию, серологию и радиологию. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который контролирует любое из вышеизложенного, может быть использован для определения того, является ли конкретное воздействие терапевтически эффективной дозой для лечения злокачественной опухоли. Специалист в настоящей области техники может определить такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и выбранный состав или способ введения.

Описанные в настоящем документе антитела и композиции могут вводиться посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будут варьировать в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекций, и включает в себя, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

Альтернативно, антитело можно вводить с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, композиция с контролируемым высвобождением, включая в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биодеградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких композиций запатентованы или известны специалистам в настоящей области техники. Смотрите, например, публикацию *Sustained*

and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Композиции антител можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в настоящей области техники. Например, согласно одному варианту осуществления композицию вводят с помощью безыгольного инъектора для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для применения при введении антител включают в себя: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарств с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, который раскрывает терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос лекарственных средств для доставки лекарственного средства с высокой скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыта имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, который раскрывает осмотическую систему доставки лекарственного средства, имеющую многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, который раскрывает систему доставки осмотического лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Специалистам в настоящей области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 составляют для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы антитела пересекали BBB (при желании, например, при злокачественной опухоли мозга), они могут быть составлены, например, в липосомах. Способы изготовления липосом смотрите, например, в патентах США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько групп, которые избирательно переносятся в определенные клетки или органы, таким образом повышая целевую доставку лекарственного средства (смотрите, например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные целевые фрагменты включают в себя фолат или биотин (смотрите, например, патент США № 5416016 на имя Low *et al.*); маннозиды (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор белка A поверхностно-активного вещества (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J.*

Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); смотрите также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994*) Immunomethods* 4:273.

XVI. Применение и способы

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 и композиции характеризуются многочисленным применением *in vitro* и *in vivo*, включающим в себя, например, усиление иммунного ответа путем активации передачи сигналов OX40 или обнаружения OX40. Согласно предпочтительному варианту осуществления антитела представляют собой человеческие антитела. Например, описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут контактировать с клетками в культуре, *in vitro* или ex *vivo*, или вводиться людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при различных заболеваниях. Соответственно, в настоящем документе представлены способы модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающей части, так что иммунный ответ у субъекта модифицируется. Предпочтительно, реакция усиливается, стимулируется или регулируется.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, у которых было бы желательным усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей с нарушением, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа, например, антигенспецифического Т-клеточного ответа). Согласно конкретному варианту осуществления способы особенно подходят для лечения злокачественной опухоли *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут вводиться вместе с представляющим интерес антигеном, или антиген может уже присутствовать у подлежащего лечению субъекта (например, несущего опухоль или несущего вирус субъекта). Когда антитела к OX40 вводят вместе с другим средством, их можно вводить отдельно или одновременно.

Также охватываются способы обнаружения наличия антигена OX40 человека в образце или измерения количества антигена OX40 человека, предусматривающие контактирование образца и контрольного образца с описанными в настоящем документе антителами к OX40 (или их антигенсвязывающими частями) в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом и OX40 человека. Затем обнаруживается образование комплекса, причем разность между образованием

комплекса с образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие в образце антигена OX40 человека. Описанные в настоящем документе антитела к OX40 также могут быть использованы для очистки OX40 человека с помощью иммуноаффинной очистки.

Учитывая способность описанных в настоящем документе антител к OX40 стимулировать или костимулировать ответы Т-клеток, например, антиген-специфические ответы Т-клеток, также в настоящем документе предусмотрены *in vitro* и *in vivo* способы применения антител для стимуляции, усиления или повышающего регулирования антигенспецифических ответов Т-клеток, например, противоопухолевых ответов Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления стимуляция CD3 также включена (например, путем совместной инкубации с экспрессирующей мембранный CD3 клеткой), причем стимуляция может быть предусмотрена в одно и то же время, до или после стимуляции антителом к OX40. Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает контактирование Т-клеток с описанным в настоящем документе антителом к OX40 и необязательно с антителом к CD3, так что стимулируется антигенспецифический ответ Т-клеток. Любой подходящий индикатор антигенспецифического ответа Т-клеток может быть использован для измерения антигенспецифического ответа Т-клеток. Неограничивающие примеры таких подходящих индикаторов включают в себя повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или увеличение продукции цитокинов в присутствии антитела. Согласно предпочтительному варианту осуществления стимулируется производство интерлейкина-2 и/или интерферона-γ антигенспецифической Т-клеткой.

Т-клетки, которые могут быть усилены или костимулированы антителами к OX40, включают в себя CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. Т-клетки могут представлять собой клетки T_{eff}, например, клетки CD4+ T_{eff}, клетки CD8+ T_{eff}, Т-хелперные (T_h) клетки и Т-цитотоксические (T_c) клетки.

Также предусмотрены способы стимуляции иммунного ответа (например, антигенспецифического Т-клеточного ответа) у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к OX40, так что иммунный ответ (например, антигенспецифический ответ Т-клеток) у субъекта стимулируется. Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой субъекта с опухолью и у него стимулируется иммунный ответ против опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или жидкую опухоль, например, гематологическую злокачественность. Согласно

некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой неиммуногенную. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой положительную в отношении PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль отрицательная в отношении PD-L1. Субъект также может быть вирусоносителем и у него стимулируется иммунный ответ против вируса.

Дополнительно предусмотрены способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к OX40, так что рост опухоли у субъекта ингибируется. Также предусмотрены способы лечения вирусной инфекции у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к OX40, так что у субъекта лечится вирусная инфекция.

Также в настоящем документе охвачены способы для истощения клеток Treg из опухолевого микроокружения субъекта с опухолью, например, злокачественной опухолью, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к OX40, который содержит Fc, который стимулирует истощение T_{reg} в опухолевом микроокружении. Fc может представлять собой, например, Fc с эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, такой как связывание или обладающее улучшенным связыванием с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами. Согласно предпочтительному варианту осуществления истощение T_{reg} происходит без значительного истощения или ингибирования T_{eff} в опухолевом микроокружении и без значительного истощения или ингибирования клеток T_{eff} и клеток T_{reg} за пределами опухолевого микроокружения, например, на периферии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется более высоким содержанием OX40 на клетках T_{reg}, чем на клетках T_{eff}, например, в опухолевом микроокружении.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта подвергают лечению антителом к OX40, содержащим Fc, который усиливает агонизм, например, связывается или улучшает связывание с ингибирующим FcRIIb. Антитела к OX40 могут истощать Treg в опухолях и/или Treg в инфильтрующих опухоли лимфоцитах (TIL).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 предоставляется субъекту в качестве дополнительной терапии. Лечение субъектов со злокачественной опухолью посредством антитела к OX40 может привести к длительной выживаемости, например, долгосрочному продолжительному ответу относительно современного

стандарта лечения; длительной выживаемости не менее 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет или безрецидивной выживаемости не менее 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение субъекта со злокачественной опухолью антителом к OX40 предотвращает рецидив злокачественной опухоли или задерживает рецидив злокачественной опухоли, например, на 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Лечение антителом к OX40 можно применять в качестве лечения первой, второй или третьей линии.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитело к OX40 не является значительно токсичным. Например, антитело не является значительно токсичным для органа человека, например, одного или нескольких из печени, почки, головного мозга, легких и сердца, как определено, например, в клинических испытаниях. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело не оказывает существенного влияния на нежелательный иммунный ответ, например, аутоиммунитет или воспаление.

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение субъекта антителом к OX40 не приводит к чрезмерной стимуляции иммунной системы до такой степени, что иммунная система субъекта затем атакует самого субъекта (например, аутоиммунному ответу) или не приводит, например, к анафилаксии. Таким образом, антитела предпочтительно не вызывают анафилаксию.

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение субъекта антителом к OX40 не вызывает значительных воспалительных реакций, например, иммуно-опосредованный пневмонит, иммуно-опосредованный колит, иммуно-опосредованный гепатит, иммуно-опосредованный нефрит или почечную дисфункцию, иммуно-опосредованный гипофизит, иммуно-опосредованный гипотиреоз и гипертиреоз или другие иммунно-опосредованные побочные реакции.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 обеспечивает синергические противоопухолевые эффекты в сочетании с другим способом лечения злокачественной опухоли, например, соединением, которое стимулирует иммунную систему (например, иммуно-онкологическое средство), например, описанное в настоящем документе соединение или соединение, модулирующее описанную в настоящем документе мишень.

Эти и другие описанные в настоящем документе способы более подробно обсуждаются ниже.

Злокачественная опухоль

Активация OX40 антителами к OX40 может усиливать иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы лечения субъекта со злокачественной опухолью, предусматривающие введение субъекту описанных в настоящем документе антител к OX40 таким образом, что субъект подвергается лечению, например, таким образом, что рост раковых опухолей ингибируется или снижается и/или что опухоли регрессируют, и/или что достигается продолжительное выживание. Антитело к OX40 можно применять отдельно, чтобы ингибировать рост злокачественных опухолей. Альтернативно, антитело к OX40 можно применять в сочетании с другим средством, например, с другим иммуногенным средством, стандартным лечением злокачественной опухоли или другим антителом, как описано ниже.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы лечения злокачественной опухоли, например, путем ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанных в настоящем документе антител к OX40. Антитело может представлять собой человеческое антитело. Дополнительно или альтернативно антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело.

Также в настоящем документе предусмотрены комбинированные способы лечения, предусматривающие введение антитела к OX40 и антитела к PD-1 или антитела к CTLA-4 для лечения субъектов с опухолями (например, распространенными солидными опухолями).

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены способы лечения злокачественной опухоли, причем антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят пациенту с опухолью (например, распространенной солидной опухолью) в соответствии с определенным клиническим режимом дозирования. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 представляет собой OX40.21. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой BMS-936558 (ниволумаб). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимумаб (Yervoy®). Согласно некоторым вариантам осуществления режимы дозирования корректируются для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, эффективного ответа).

Используемое в настоящем документе дополнительное или комбинированное введение (совместное введение) предусматривает одновременное введение соединений

в той же или различной дозированной форме или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 можно одновременно вводить в одном составе. Альтернативно, антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 могут быть составлены для отдельного введения и введены одновременно или последовательно (например, одно антитело вводят в течение приблизительно 30 минут перед введением второго антитела).

Например, антитело к PD1 или антитело к CTLA-4 можно вводить сначала, а затем (например, сразу после него) вводить антитело к OX40 или наоборот. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят перед введением антитела к OX40. Согласно другому варианту осуществления антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят после введения антитела к OX40. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят одновременно. Такое одновременное или последовательное введение предпочтительно приводит к тому, что оба антитела одновременно присутствуют у получающих лечение пациентов.

Злокачественные опухоли, рост которых может ингибироваться антителами к OX40 или комбинированной терапией антитела к OX40 и антитела к PD-1 или антитела к CTLA-4, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, реагирующие на иммунотерапию, и те, которые, как правило, не реагируют на иммунотерапию. Злокачественные опухоли могут представлять собой злокачественные опухоли с солидными опухолями или злокачественными новообразованиями крови (жидкие опухоли). Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, глиому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль почки (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль толстой и прямой кишок, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, почечно-клеточную карциному (RCC)), злокачественную опухоль предстательной железы (гормонорезистентную злокачественную опухоль предстательной железы), злокачественную опухоль щитовидной железы, нейробластому, злокачественную опухоль поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), злокачественную опухоль шейки матки,

злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль мочевого пузыря, гепатому, злокачественную опухоль молочной железы, карциному толстой кишки и злокачественную опухоль головы и шеи (или карциному), злокачественную опухоль желудка, эмбрионально-клеточную опухоль, детскую саркому, синусальный природный киллер, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль яичек, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкой кишки, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечников, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, солидные опухоли детей, злокачественную опухоль мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль позвоночной оси, злокачественную опухоль головного мозга, глиому головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, вызванные окружающей средой злокачественные опухоли, в том числе индуцированные асбестом, связанные с вирусами злокачественные опухоли или злокачественные опухоли вирусного происхождения (например, вирус папилломы человека (HPV или связанные с ними опухоли)) и гематологические злокачественные опухоли, полученные из двух основных линий клеток крови, то есть линии миелоидных клеток (которая производит гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидную клеточную линию (которая производит B, T, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миеломы, например, острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкоз, такой как острый лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелолейкоз (CML), недифференцированный АМЛ (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкемия (M6), мегакарибластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома

Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточная гематологическая злокачественность, например, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазматическая лимфома, моноцитоидная В-клеточная лимфома, связанная со слизистой оболочкой лимфома (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, взрослая Т-клеточная лимфома/лейкоз, мантийноклеточная лимфома, ангио-иммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома предшественников Т-клеток, Т-лимфобластная лимфома и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная лимфома, В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, лимфобластная лимфома предшественников В-клеток, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая грибовидными микозами или синдромом Сезари) и лимфоплазматическая лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; такие миеломы, как миелома IgG, миелома легкой цепи, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая невыраженная миелома), одиночная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома волосатых клеток; гемопоэтические опухоли миелоидной линии, опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; семинома, тератокарцинома, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая в себя астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимного происхождения, включая в себя фибросаркому, рабдомиосакарму и остеосаркому; и другие опухоли, включая в себя меланому, пигментную ксеродермию, кератоакантому, семиномию, фолликулярную злокачественную опухоль щитовидной железы и тератокарциному, гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, например, опухоли Т-клеток и В-клеток, включая в себя, без ограничения, нарушения Т-клеток, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая в себя мелкоклеточного типа и типа мозговидных клеток; лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (LGL), предпочтительно типа Т-клеток; a/d T-NHL лимфома печени и селезенки; периферическая/посттимическая Т-клеточная лимфома (плеоморфного и иммунобластного подтипа); ангиоцентрическая (назальная) Т-

клеточная лимфома; злокачественная опухоль головы или шеи, почечная злокачественная опухоль, злокачественная опухоль прямой кишки, злокачественная опухоль щитовидной железы; острая миелоидная лимфома, а также любые комбинации указанных видов злокачественной опухоли. Описанные в настоящем документе способы могут быть также применимы для лечения метастатических злокачественных опухолей, неоперабельных и/или рефрактерных злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, устойчивых к предыдущей иммунотерапии, например, с блокирующим антителом CTLA-4 или PD-1), и повторяющихся злокачественных опухолей.

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент, который подвергается лечению антителом к OX40 или комбинацией антитела к OX40 и антитела к PD-1 или к CTLA-4, содержит распространенную солидную опухоль. Например, согласно одному варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием злокачественной опухоли шейки матки. Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием злокачественной опухоли толстой и прямой кишок (CRC). Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием злокачественной опухоли мочевого пузыря (например, неоперабельной местной распространенной или метастатической злокачественной опухоли мочевого пузыря). Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием злокачественной опухоли яичников (например, неоперабельной местной распространенной или метастатической злокачественной опухоли яичников).

Согласно одному варианту осуществления пациент, подвергаемый лечению антителом к OX40 или комбинацией антитела к OX40 и антитела к PD-1 или к CTLA-4, характеризуется наличием немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием плоскоклеточной злокачественной опухоли головы и шеи (SCCHN). Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием неходжкинской В-клеточной лимфомы (B-NHL). Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием миеломы. Согласно другому варианту осуществления пациент характеризуется наличием меланомы. Согласно другому варианту осуществления подлежащий лечению пациент характеризуется наличием диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят пациентам со злокачественной опухолью, которая проявляла неадекватный ответ на предшествующий курс лечения, например, предшествующее лечение иммуно-онкологическим лекарственным средством, или пациентам со злокачественной опухолью которая представляет собой рефрактерную или резистентную, либо внутренне рефрактерную или резистентную (например, устойчивую к антагонисту пути PD-1), или причем резистентное или рефрактерное состояние приобретается. Например, субъекты, которые не отвечают или не в достаточной степени отвечают на первый способ лечения или которые видят прогрессирование заболевания после лечения, например, лечения против PD-1, могут подвергаться лечению путем введения только антитела к OX40 или в сочетании с другим способом лечения (например, способом лечения против PD-1).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят пациентам, которые ранее не получали (т.е. не подвергались лечению) иммуно-онкологическим средством, например, антагонистом пути PD-1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 можно вводить со стандартом лечения (например, хирургическим вмешательством, облучением и химиотерапией). Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, для терапии, которая предназначена для предотвращения возникновения или рецидива опухолей.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 можно вводить с другим лечением, например, облучением, хирургическим вмешательством или химиотерапией. Например, вспомогательную терапию антителом к OX40 можно вводить, когда существует риск того, что могут присутствовать микрометастазы и/или для снижения риска рецидива.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 можно вводить в виде монотерапии или в качестве единственной иммуностимулирующей терапии. Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 можно также комбинировать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая в себя рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены

MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается далее ниже).

Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, такие как меланомы. Путем снижения порога активации Т-клеток посредством активации OX40, опухолевые ответы у хозяина могут быть активированы, что позволяет лечить неиммуногенные опухоли или те, которые имеют ограниченную иммуногенность.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 можно использовать в сочетании с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (смотрите Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; смотрите также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В одной такой стратегии и этих стратегий вакцину готовят с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF представляет собой мощный активатор презентации антигена для опухолевой вакцинации (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

Изучение экспрессии генов и крупномасштабных профилей экспрессии генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессируемые в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что еще более важно, можно показать, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных в хозяине. Активация OX40 может быть использована в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, с целью получения иммунного ответа на эти белки. Эти белки, как правило, воспринимаются иммунной системой как собственные антигены и поэтому терпимы к ним. Опухолевый антиген может включать в себя белковую теломеразу, которая необходима для синтеза теломеров хромосом и которая экспрессируется в более чем 85% злокачественных опухолей человека и только в ограниченном числе соматических тканей (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013).

Опухолевый антиген может также представлять собой «неоантигены», экспрессируемые в злокачественных клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е., bcr-abl в хромосоме Филадельфия) или идиотипом из B-клеточных опухолей.

Другие опухолевые вакцины могут включать в себя белки из вирусов, вовлеченных в злокачественные опухоли человека, таких как вирус папилломы человека (ВПЧ), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы герпеса Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифического антигена, который можно использовать в сочетании с активацией OX40, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP очень эффективны при доставке в антигенпрезентирующие клетки для выявления опухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) представляют собой сильные антигенпрезентирующие клетки, которые могут быть использованы для первичных антигенспецифических ответов. DC могут быть получены *ex vivo* и загружены различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также могут быть трансдуцированы генетическими средствами для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также были слиты непосредственно с опухолевыми клетками в целях иммунизации (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизация DC может эффективно сочетаться с активацией OX40 для активации более мощных противоопухолевых ответов.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 также могут быть объединены с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях может быть возможным уменьшить дозу химиотерапевтического реагента (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Например, антитело к OX40 можно использовать в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. В другом примере антитело к OX40 можно использовать в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения антител к OX40 и химиотерапии заключается в том, что гибель клеток, представляющая собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличению содержания опухолевого антигена в антигенпрезентирующем

пути. Другие комбинированные терапии, которые могут привести к синергии с антителами к OX40 через клеточную гибель, это облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также могут использоваться в комбинации с антителом к OX40. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут подавать антиген опухоли в антигенпрезентирующие пути хозяина.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 также могут быть использованы в сочетании с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецепторы Fcα или Fcγ эффекторные клетки на опухолевые клетки (смотрите, например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела могут использоваться для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела в виде рецептора к Fc/антиопухолевого антигена (например, Her-2/neu) были использованы для нацеливания макрофагов на сайты опухоли. Это нацеливание может более эффективно активировать опухолеспецифические реакции. Т-клеточное плечо этих ответов будет дополнено активацией OX40. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно к DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфичным к дендритным клеткам маркером клеточной поверхности.

Опухоли уклоняются от иммунного надзора хозяев с помощью большого количества механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессивными. Среди них TGF-β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas-лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждому из этих объектов могут применяться в комбинации с антителами к OX40 для противодействия действию иммунодепрессантов и для поддержки иммунных ответов опухоли хозяином.

Другие антитела, которые активируют иммунную реакцию хозяина, могут быть использованы в комбинации с описанными в настоящем документе антителами к OX40. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Антитела к CD40 способны эффективно замещать хелперную активность Т-клеток (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478) и могут использоваться в сочетании с антителами к OX40. Активация антител к Т-клеточным костимулирующим молекулам, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097),

OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997)) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. Ингибиторы PD1 или PD-L1 также могут использоваться в сочетании с антителами к OX40.

Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. В то время как заболевание трансплантат против хозяина является следствием этого лечения, может быть получена терапевтическая польза от реакции трансплантат против опухоли. Антитела к OX40 могут быть использованы для повышения эффективности привитых донором опухолеспецифических Т-клеток.

Существует также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают в себя активацию *ex vivo* и увеличение количества антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти способы также могут быть использованы для активации ответов Т-клеток на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Активация *ex vivo* в присутствии антител к OX40 может увеличить частоту и активность адоптивно переносимых Т-клеток.

Инфекционные заболевания

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения пациентов, подвергшихся воздействию определенных токсинов или патогенов. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанных в настоящем документе антител к OX40 таким образом, что субъект подвергается лечению от инфекционного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 представляет собой химерное или гуманизированное антитело.

Подобно применению к опухолям, как обсуждалось выше, антитела к OX40 могут применяться отдельно или в качестве адъюванта в сочетании с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и собственные антигены. Примерами патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно применим, являются патогены, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины являются менее эффективными. К ним относятся, но не ограничиваются ими, ВИЧ, гепатиты (A, B и C), грипп, герпес, жардиа, малярия, лейшмания, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*. Антитела

к OX40 могут быть применимы против установленных инфекций такими средствами, как ВИЧ, которые представляют собой измененные антигены во время инфекций. Эти новые эпитопы признаны чужеродными во время введения антитела к OX40, что вызывает сильный ответ Т-клеток.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя ВИЧ, гепатиты (A, B или C), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус коксаки, коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя хламидии, риккетсиальные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протеус, серацию, псевдомонас, легионеллу, дифтерию, сальмонеллу, бациллы, холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерии заболевания Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis и т.п.), *Cryptococcus neoformans, Aspergillus* (fumigatus, niger и т.п.), Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum.*

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя *Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba* sp., *Giardia lambia, Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, Nippostrongylus brasiliensis*

Во всех вышеуказанных способах антитела к OX40 могут быть объединены с другими формами иммунотерапии, такими как обработка цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами, которая обеспечивает улучшенную презентацию опухолевых антигенов (смотрите,

например, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Аутоиммунные реакции

Антитела к OX40 могут провоцировать и усиливать аутоиммунные ответы. Действительно, индукция противоопухолевых ответов с использованием опухолевых клеток и пептидных вакцин показывает, что многие противоопухолевые ответы включают в себя аутоиммунные реактивности (van Elsas et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk, et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987; Hurwitz, (2000) выше; Rosenberg & White (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4). Таким образом, антитела к OX40 можно применять в сочетании с различными собственными белками, чтобы разработать протоколы вакцинации для эффективного получения иммунных ответов против этих собственных белков для лечения заболеваний. Например, болезнь Альцгеймера включает в себя нефизиологическое накопление пептида Aβ в амилоидных отложениях в головном мозге; ответы антител к амилоиду способны очищать эти амилоидные отложения (Schenk et al., (1999) *Nature* 400: 173-177).

Другие собственные белки также могут использоваться в качестве мишеней, таких как IgE, для лечения аллергии и астмы, и TNFc для ревматоидного артрита. Наконец, реакции антител на различные гормоны могут быть вызваны применением антител к OX40. Нейтрализующие ответы антител на репродуктивные гормоны могут применяться для контрацепции. Нейтрализующий ответ антител на гормоны и другие растворимые факторы, которые необходимы для роста конкретных опухолей, также можно рассматривать как возможные цели вакцинации.

Аналогичные описанные выше способы для применения антител к OX40 могут быть использованы для индукции терапевтических аутоиммунных ответов для лечения пациентов, имеющих нефизиологическое накопление других собственных антигенов, таких как амилоидные отложения, включающие в себя Aβ при болезни Альцгеймера, цитокины, такие как TNFα, и IgE.

Вакцины

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть использованы для стимуляции антигенспецифических иммунных ответов путем совместного введения антител с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Соответственно, в настоящем документе представлены способы усиления иммунного ответа на антиген у

субъекта, предусматривающие введение субъекту: (i) антигена; и (ii) антитела к OX40, так что иммунный ответ на антиген у субъекта усиливается. Антитело может представлять собой антитело к OX40 человека (такое как любое описанное в настоящем документе антитело к OX40 человека). Согласно другим вариантам осуществления антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя те, которые обсуждались в вышеприведенных разделах, такие как рассмотренные выше опухолевые антигены (или опухолевые вакцины) или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам осуществления пептид или слитый белок, содержащий эпитоп, с которым связывается антитело к OX40, используют в качестве вакцины вместо или в дополнение к антителу к OX40.

Подходящие пути введения композиций описанных в настоящем документе антител (например, человеческих моноклональных антител, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов), *in vivo* и *in vitro*, хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны специалистами. Например, композиции антител можно вводить путем инъекций (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта, от концентрации и/или состава композиции антитела.

Как описано выше, описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут вводиться совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксическим средством или иммуносупрессивным средством. Антитело может быть связано со средством (как иммунокомплекс) или может быть введено отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело может вводиться до, после или одновременно со средством или может быть введено совместно с другими известными способами лечения, например, противоопухолевой терапией, например, облучением. Такие терапевтические средства включают в себя, среди прочего, такие противоопухолевые средства, как доксорубицин (адриамицин), цисплатин, блеомицинсульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамид гидроксимочевина, которые сами по себе эффективны только на уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл один раз каждые четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз каждый 21 день.

Совместное введение описанных в настоящем документе антител к OX40 или их антигенсвязывающих фрагментов с помощью химиотерапевтических средств, обеспечивает два противоопухолевых средства, которые действуют через различные механизмы, которые дают цитотоксический эффект опухолевым клеткам человека. Такое совместное введение может решать проблемы, связанные с развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменения антигенности опухолевых клеток, которые делают их неактивными с антителом.

Также в настоящем документе предусмотрены наборы, содержащие композиции описанных в настоящем документе антител к OX40 (например, человеческих антител, биспецифических или мультиспецифических молекул или иммуноконъюгатов) и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных описанных в настоящем документе антител человека (например, антитело человека, характеризующееся дополнительной активностью, которое связывается с эпитопом в OX40, отличном от первого антитела человека). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого комплекта. Термин «этикетка» означает любую запись или записанный материал, поставляемый на комплекте или с комплектом, или который в противном случае прилагается к комплекту.

Протоколы лечения

Подходящие протоколы для лечения солидной опухоли (например, распространенной солидной опухоли) у пациента-человека включают в себя, например, введение пациенту эффективного количества антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две недели (Q2W), причем для каждого из по меньшей мере одного цикла по меньшей мере одну дозу антитела к OX40 вводят в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг.

Другой подходящий протокол для лечения солидной опухоли у пациента-человека предусматривает, например, введение пациенту эффективного количества каждого из:

(a) антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, и

(b) антитела к PD-1, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 302,

причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла по меньшей мере одну дозу антитела к OX40 вводят в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, и по меньшей мере одну дозу антитела к PD-1 вводят в постоянной дозе 240 мг или постоянной дозе приблизительно 240 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 вводят один раз каждые три недели (q3w) в фиксированной дозе 360 мг или раз в четыре недели (q4w) в дозе 480 мг.

Другой подходящий протокол лечения солидной опухоли у пациента-человека предусматривает, например, введение пациенту эффективного количества каждого из:

(a) антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, и

(b) антитела к CTLA-4, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310,

причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в три недели (q3w), причем для каждого из по меньшей мере одного цикла по меньшей мере одну дозу антитела к OX40 вводят в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, и по меньшей мере одну дозу антитела к CTLA-4 вводят в постоянной дозе 1 мг/кг массы тела или постоянной дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела. Согласно одному варианту

осуществления антитело к OX40 вводят вместе с антителом к CTLA-4 в течение по меньшей мере одного цикла с последующей монотерапией антитела к OX40 в течение по меньшей мере одного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят вместе с ипилимумабом для начальных четырех циклов с последующей монотерапией антитела к OX40 для последующих циклов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 и антитело к PD-1 вводят в следующих дозах:

(a) 1 мг/кг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(b) 20 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(c) 40 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(d) 80 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(д) 160 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1; или

(f) 320 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 и антитело к CTLA-4 вводят в следующих дозах:

(a) 1 мг/кг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(b) 20 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(c) 40 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(d) 80 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(д) 160 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; или

(f) 320 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4.

Согласно одному варианту осуществления доза антитела к OX40 и/или антитела к PD-1 или антитела к CTLA-4 рассчитывается на массу тела, например, мг/кг массы тела. Согласно другому варианту осуществления доза антитела к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 представляет собой постоянную фиксированную дозу. Согласно другому варианту осуществления доза антитела к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 изменяется со временем. Например, антитело к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 может быть первоначально введено в высокой дозе и может быть снижено с течением времени. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 первоначально вводят в низкой дозе и со временем увеличивают.

Согласно другому варианту осуществления количество вводимого антитела к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 является постоянным для каждой дозы. Согласно другому варианту осуществления количество вводимого антитела варьирует в зависимости от каждой дозы. Например, поддерживающая (или последующая) доза

антитела может быть выше или такой же, как и начальная доза для введения. Согласно другому варианту осуществления поддерживающая доза антитела может быть ниже или такой же, как и насыщающая доза.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 составляют для внутривенного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 или антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 вводят в первый день каждого цикла.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 и/или к PD-1 или к CTLA-4 вводят один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели или до тех пор, пока наблюдается клиническая польза или до полного ответа, подтвержденного прогрессирующим заболеванием или неуправляемой токсичностью.

Согласно одному варианту осуществления цикл введения составляет две недели, который может быть повторен по мере необходимости. Согласно другому варианту осуществления цикл составляет три недели. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение состоит из восьми циклов. Согласно другим вариантам осуществления лечение состоит из 12 циклов.

Согласно одному варианту осуществления одну дозу каждого антитела к OX40 и антитела к PD-1 вводят в течение двухнедельного цикла. Согласно другому варианту осуществления одну дозу каждого антитела к PD-1 и антитела к OX40 вводят в течение трехнедельного цикла. Согласно другому варианту осуществления одну дозу каждого антитела к PD-1 и антитела к OX40 вводят в течение четырехнедельного цикла.

Согласно одному варианту осуществления одну дозу каждого антитела к OX40 и антитела к CTLA-4 вводят в течение трехнедельного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления одну дозу каждого антитела к OX40 и антитела к CTLA-4 вводят в течение трехнедельного цикла для первых четырех циклов с последующей монотерапией антитела к OX40 для пятого-восьмого циклов.

Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 вводят в качестве первой линии лечения (например, начального или первого лечения). Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 вводят в качестве второй линии лечения (например, после начального или первого лечения, в том числе после рецидива и/или при неудаче первого лечения).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к любому из вышеуказанных вариантов осуществления, при котором антитело к PD-1 заменено или объединено с антителом к PD-L1 или к PD-L2.

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент-человек характеризуется наличием злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли толстой кишки и злокачественной опухоли яичников.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 317, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91, и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 318 и 94, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит последовательности тяжелой и легкой цепей, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 124 и 116, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 303-305, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 306-308, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 содержит последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 301 и 302, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 содержит последовательности тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 299 и 300, соответственно.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 311-313, соответственно, и CDR1,

CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 314-316, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 содержит последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 309 и 310, соответственно.

Результаты

Что касается целевых поражений, ответы на способы лечения могут включать в себя:

Полный ответ (CR) (RECIST V1.1)	Исчезновение всех целевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны характеризоваться уменьшением короткой оси до < 10 мм.
Частичный ответ (PR) (RECIST V1.1)	Уменьшение по меньшей мере на 30% суммы диаметров целевых поражений, принимая во внимание исходные суммы диаметров.
Прогрессирование заболевания (PD) (RECIST V1.1)	Увеличение по меньшей мере на 20% суммы диаметров целевых поражений, принимая во внимание минимальную сумму во время исследования (это включает в себя исходную сумму, если она является наименьшей во время исследования). В дополнение к относительному увеличению на 20% суммы также должно быть абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. (Примечание: появление одного или нескольких новых повреждений также считается прогрессированием).
Стабильное заболевание (SD) (RECIST V1.1)	Отсутствие достаточного уменьшения, чтобы претендовать на PR, либо

	достаточного увеличения, чтобы претендовать на PD, принимая в качестве эталона наименьшие суммы диаметров во время исследования.
Связанный с иммунной системой полный ответ (irCR) (irRECIST)	Исчезновение всех целевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны характеризоваться уменьшением короткой оси до < 10 мм.
Связанный с иммунной системой частичный ответ (irPR) (irRECIST)	Уменьшение по меньшей мере на 30% суммы диаметров целевых поражений и всех новых измеряемых повреждений (т.е. процентное изменение в массе опухоли), принимая во внимание исходные суммарные диаметры. Примечание: появление новых измеряемых поражений учитывается в общей сумме масс опухолей, но автоматически не квалифицируется как прогрессирование заболевание, пока сумма диаметров не увеличится на ≥ 20% по сравнению с нижним порогом.
Связанное с иммунной системой прогрессирование заболевания (irPD) (irRECIST)	Уменьшение по меньшей мере на 20% в массе опухоли (т.е. суммы диаметров целевых поражений и всех новых измеряемых повреждений), принимая во внимание наименьшую сумму во время исследования (это включает в себя исходную сумму, если она является самой маленькой в исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20% суммы также должно быть абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. Оценки опухолей с использованием иммунных критериев для

	прогрессирования заболевания включают в себя вклад новых измеряемых поражений. Каждое процентное изменение в опухолевой массе при оценке учитывает размер и кинетику роста как старых, так и новых поражений по мере их появления.
Связанное с иммунной системой стабильное заболевание(irSD) (irRECIST)	Отсутствие достаточного уменьшения, чтобы претендовать на irPR, либо достаточного увеличения, чтобы претендовать на irPD, принимая в качестве эталона наименьшие суммы диаметров во время исследования.

Что касается нецелевых поражений, ответы на способы лечения могут включать в себя:

Полный ответ (CR) (RECIST V1.1)	Исчезновение всех нецелевых поражений. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось < 10 мм).
не-CR/не-PD (RECIST V1.1)	Стойкость одного или нескольких нецелевых поражений.
Прогрессирование заболевания (PD) (RECIST V1.1)	*Недвусмысленное прогрессирование* существующих нецелевых поражений. Появление одного или нескольких новых повреждений также считается прогрессией.
Связанный с иммунной системой полный ответ (irCR) (irRECIST)	Исчезновение всех нецелевых поражений. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось < 10 мм).
Связанное с иммунной системой прогрессирование заболевания (irPD) (irRECIST)	Увеличение количества или размера нецелевого поражения(й) не представляет собой прогрессирование заболевания, если/до тех пор, пока масса опухолей не увеличится

	на 20% (т.е. сумма диаметров в нижнем пороге целевых поражений и любых новых измеряемых поражений увеличиться на требуемую величину). Нецелевые поражения не рассматриваются в определении «Стабильное заболевание и частичный ответ».

Подвергнутые лечению пациенты в соответствии с описанными в настоящем документе способами, предпочтительно испытывают улучшение по меньшей мере одного признака злокачественной опухоли. Согласно одному варианту осуществления улучшение измеряется уменьшением количества и/или размера измеряемых опухолевых поражений. Согласно другому варианту осуществления поражения могут быть измерены на рентгенограммах грудной клетки или на пленках КТ или МРТ. Согласно другому варианту осуществления для оценки реакции на терапию можно использовать цитологию или гистологию.

Согласно одному варианту осуществления получающий лечение пациент демонстрирует полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD), связанный с иммунной системой полный ответ (irCR), связанный с иммунной системой частичный ответ (irPR) или связанное с иммунной системой стабильное заболевание (irSD). Согласно другому варианту осуществления получающий лечение пациент испытывает сжатие опухоли и/или уменьшение скорости роста, т.е. подавление роста опухоли. Согласно другому варианту осуществления нежелательная клеточная пролиферация снижается или ингибируется. Согласно еще одному варианту осуществления может иметь место одно или несколько из следующего: число злокачественных клеток может уменьшаться; размер опухоли может уменьшаться; инфильтрация злокачественных клеток в периферические органы может ингибироваться, тормозиться, замедляться, или останавливаться; опухолевые метастазы могут замедляться или ингибироваться; рост опухоли может ингибироваться; рецидив опухоли может предотвращаться или задерживаться; один или несколько связанных со злокачественной опухолью симптомов могут в некоторой степени облегчаться.

Согласно другим вариантам осуществления введение эффективных количеств антитела к OX40 и антитела к PD-1 или к CTLA-4 в соответствии с любым из предложенных в настоящем документе способов оказывает по меньшей мере один

терапевтический эффект, выбранный из группы, состоящей из уменьшения размера опухоли, уменьшение количества метастатических поражений, возникающих со временем, полная ремиссия, частичная ремиссия или стабильное заболевание. Согласно другим вариантам осуществления способы лечения приводят к сравнимой частоте клинической эффективности (CBR = CR + PR + SD ≥ 6 месяцев) лучше, чем достигаемая только антителом к OX40 или к PD-1 или антителом к CTLA-4. Согласно другим вариантам осуществления улучшение частоты клинической эффективности составляет приблизительно 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более по сравнению только с антителом к OX40 или к PD-1 или антителом к CTLA-4.

Комбинированная терапия

В дополнение к описанной выше комбинированной терапии описанные в настоящем документе антитела к OX40 могут быть использованы в описанной ниже комбинированной терапии.

Способы комбинированной терапии предусматривают те, при которых антитело к OX40 или комбинацию антитела к OX40 и антитела к PD-1 или антитела к CTLA-4 вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например, с низкомолекулярными лекарственными средствами, антителами или их антигенсвязывающими частями, и которые эффективны в стимулировании иммунных ответов, чтобы тем самым дополнительно усиливать, стимулировать или повышающе регулировать иммунные ответы у субъекта. Например, как показано в примерах, введение антитела к OX40 и антагониста антитела к PD-1 мышам может приводить к синергическому эффекту в ингибировании роста опухоли.

Антитело к OX40 можно комбинировать с (i) агонистом стимулирующей (например, костимулирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала или молекулы (например, рецептора или лиганда) на иммунных клетках, таких как Т-клетки, оба из которых приводят к усилению иммунных реакций, таких как антигенспецифические Т-клеточные ответы. Согласно некоторым аспектам иммуно-онкологическое средство представляет собой (i) агонист стимулирующей (в том числе костимулирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) или (ii) антагонист ингибирующей (в том числе коингибирующей) молекулы (например, рецептора или лиганда) на клетках, участвующих во врожденном иммунитете, например, NK-клетках, и причем иммуно-онкологическое средство повышает врожденный иммунитет. Такие иммуно-онкологические средства часто

упоминаются как регуляторы иммунной контрольной точки, например, ингибитор иммунной контрольной точки или стимулятор иммунной контрольной точки.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят с помощью средства, которое нацеленно воздействует на стимулирующую или ингибирующую молекулу, которая является представителем суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, антитело к OX40 можно вводить субъекту со средством, которое нацеленно воздействует на представителя семейства IgSF для увеличения иммунного ответа. Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 можно вводить со средством, которое нацеленно воздействует (или специфически связывается) с представителем семейства B7 мембраносвязанных лигандов, который включает в себя B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6 или костимулирующий или коингибирующий рецептор, специфически связывающийся с представителем семейства B7.

Антитело к OX40 можно также вводить с помощью средства, которое нацеленно воздействует на представителя семейства молекул TNF и TNFR (лигандов или рецепторов), такого как CD40 и CD40L, GITR, GITR-L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTβR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α/TNFβ, TNFR2, TNFα, LTβR, лимфотоксин α 1β2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR (смотрите, например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Т-клеточные ответы могут стимулироваться комбинацией антител к OX40 и одного или нескольких из следующих средств:

(1) антагониста (ингибитора или блокирующего средства) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунной контрольной точки), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и любого из следующих белков: TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4; и/или

(2) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, GITR, GITR-L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Иллюстративные средства, которые модулируют один из вышеуказанных белков и могут быть объединены с антителом к OX40 для лечения злокачественной опухоли,

включают в себя: Yervoy™ (ипилимумаб) или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7DC), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3), IMP321 (к LAG-3), BMS-663513 (к CD137), PF-05082566 (к CD137), CDX-1127 (к CD27), атацицепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), лукатумумаб (к CD40), дацетузумаб (к CD40), муромонаб-CD3 (к CD3), ипилимумаб (к CTLA-4).

Антитела к OX40 могут также вводиться с пидилизумабом (CT-011).

Другие молекулы, которые могут быть объединены с антителом к OX40 для лечения злокачественной опухоли, включают в себя антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, антитело к OX40 можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами, и антитела к OX40 могут вводиться субъекту, например, со злокачественной опухолью, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к OX40 могут использоваться в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF или семейства B7 или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF-β, VEGF, «иммуносупрессивные цитокины») и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Другие средства для комбинированной терапии включают в себя средства, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая в себя, без ограничения, антагонисты CSF-1R, такие как антагонисты CSF-1R антител, включая в себя RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699 , WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249, WO13169264, WO14/036357).

Антитела к OX40 могут также вводиться со средствами, которые ингибируют передачу сигналов TGF-β.

Дополнительные средства, которые могут быть объединены с описанными в настоящем документе антителами к OX40, включают в себя средства, которые улучшают

презентацию опухолевого антигена, например, дендритные клеточные вакцины, секретирующие клеточные вакцины GM-CSF, олигонуклеотиды CpG и имиквимод или терапевтические средства, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

Другие способы лечения, которые могут быть объединены с антителами к OX40, включают в себя способы лечения, которые истощают или блокируют клетки Treg, например, средство, которое специфически связывается с CD25.

Другой способ лечения, который может быть объединен с антителами к OX40, представляет способ лечения, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота.

Другой класс средств, который может быть использован с антителами к OX40, включает в себя средства, которые ингибируют образование аденозина или ингибируют рецептор A2A аденозина.

Другие способы лечения, которые могут быть объединены с антителами к OX40 для лечения злокачественной опухоли, включают в себя способы лечения, которые обращают/предотвращают толерантность или истощение Т-клеток, и способы лечения, которые запускают врожденную иммунную активацию и/или воспаление в опухолевом сайте.

Антитело к OX40 может быть объединено более чем с одним иммуно-онкологическим средством и может быть, например, объединено с комбинаторным подходом, который нацеленно воздействует на несколько элементов иммунного пути, такой как одно или несколько из следующего: способ лечения, который усиливает презентацию опухолевого антигена (например, дендритная клеточная вакцина, секретирующие GM-CSF клеточные вакцины, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); способ лечения, который ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или истощения или блокирования Treg или других иммуносупрессирующих клеток; способ лечения, который стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с агонистами, которые стимулируют путь CD-137 и/или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; способ лечения, который системно увеличивает частоту противоопухолевых Т-клеток; способ лечения, который истощает или ингибирует Treg, такие как Treg в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или посредством ex vivo истощения гранул анти-CD25; способ лечения, который влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; способ

лечения, который усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклинов); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, включая в себя генетически модифицированные клетки, например, клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (терапия CAR-T); способ лечения, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота; способ лечения, который обращает/предотвращает толерантность или истощение Т-клеток; способ лечения, который вызывает врожденную иммунную активацию и/или воспаление в сайте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов или блокирование иммунорецептивных цитокинов.

Антитела к OX40 могут применяться вместе с одним или несколькими агонистическими средствами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими средствами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистами и одним или несколькими средствами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые преодолевают различные иммунные подавляющие пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют ингибирующие рецепторные взаимодействия (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, с использованием моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или ex vivo истощения гранул анти-CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают толерантность или истощение Т-клеток), и средствами, которые вызывают врожденную иммунную активацию и/или воспаление в опухолевых сайтах.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят субъекту вместе с ингибитором BRAF, если субъект является положительным в отношении мутации V600 BRAF.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят вместе с другим иммуностимулирующим антителом.

В настоящем документе предусмотрены способы стимуляции иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела к OX40 и одно или несколько дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист к PD-1, например, антагонистическое антитело, антагонист к PD-L1, например, антагонистическое антитело, антагонист к CTLA-4, например, антагонистическое антитело и/или антагонист к LAG3, например, антагонистическое антитело, так что у

субъекта стимулируется иммунный ответ, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусного ответа. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антитело к OX40 и антагонистическое антитело к PD-1. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антитело к OX40 и антагонистическое антитело к PD-L1. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антитело к OX40 и антагонистическое антитело к CTLA-4. Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 представляет собой человеческое антитело. Альтернативно, антитело к OX40 может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое антитело к PD-1, антагонистическое антитело к PD-L1, антагонистическое антитело к CTLA-4 и/или антагонистическое антитело к LAG3) представляет собой человеческое антитело. Альтернативно, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышиного антитела к PD-1, к PD-L1, к CTLA-4 и/или к LAG3).

В настоящем документе предусмотрены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к OX40 с антагонистическим антителом к PD-1, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к CTLA-4 или антагонистическим антителом к LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или оба антитела вводят в субтерапевтической дозе. Также в настоящем документе предусмотрены способы изменения нежелательного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающие введение антитела к OX40 и субтерапевтической дозы антитела к PD-1, к PD-L1, к CTLA-4 или к LAG3 субъекту (например, человеку). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 содержит CDR или вариабельные области 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2, и 20C1, или представляет собой другое описанное в настоящем документе агонистическое антитело к OX40.

Подходящие антагонисты PD-1 для применения в описанных в настоящем документе способах включают в себя, без ограничения, лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифические антитела) и многовалентные средства. Согласно одному варианту осуществления антагонист PD-1 представляет собой слитый

белок, например, слитый белок Fc, такой как AMP-244. Согласно одному варианту осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или к PD-L1.

Иллюстративное антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в публикации международной заявки WO 2006/121168. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD1 представляет собой MK-3475 (ламбролизумаб), описанный в публикации международной заявки WO 02012/145493; и AMP-514, описанный в публикации международной заявки WO 2012/145493. Другие известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают в себя те, которые описаны в публикациях международных заявок WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и патентной публикации США № 2009/0317368. Могут также применяться любые антитела к PD-1, описанные в публикации международной заявки WO 023/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из этих антител, также может использоваться в комбинированных лечениях. Другим подходом к нацеливанию на рецептор PD-1 является рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с частью Fc IgG1, называемый AMP-224. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело по меньшей мере приблизительно на 90% идентично аминокислотной последовательности вариабельной области с вышеупомянутыми антителами

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 применяется в комбинации с ниволумабом, который содержит тяжелые и легкие цепи, содержащие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 299 и 300, соответственно, или антигенсвязывающими фрагментами и их вариантами. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области ниволумаба. Соответственно, согласно одному варианту осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 VH ниволумаба, содержащего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 VL ниволумаба, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 302. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 303-305, соответственно, и домены CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 306-308, соответственно. Согласно некоторым вариантам

осуществления антитело содержит области VH и/или VL, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 301 и/или SEQ ID NO: 302, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельная область антитела по меньшей мере приблизительно на 90%, например, по меньшей мере приблизительно на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 302.

Иллюстративные антитела к PD-L1 включают в себя BMS-936559 (обозначенный как 12A4 в публикации международной заявки WO 2007/005874 и патенте США № 7943743) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в публикации PCT WO 07/005874 и в патенте США № 7943743. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как Anti-B7-H1), MPDL3280A (также известное как RG7446), MSB0010718C (публикация международной заявки WO2013/79174) или rHigM12B7. Могут также использоваться любые антитела к PD-L1, описанные в публикациях международных заявок WO 02011/173223, WO 201/63638, WO 02012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и публикации США № 2009/145493.

Иллюстративные антитела к CTLA-4 включают в себя Yervoy™ (ипилимумаб или антитело 10D1, описанные в публикации PCT WO 01/14424), тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206) или антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: публикации международных заявок WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. Могут также использоваться любые антитела к CTLA-4, описанные в публикации международной заявки WO 023/173223.

Иллюстративные антитела к LAG3 включают в себя антитела, содержащие CDR или вариабельные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в патентной публикации № US02011/0150892, публикациях международных заявок WO10/19570 и WO2014/008218. Согласно одному варианту осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие известные в настоящей области техники антитела к LAG-3, которые могут быть использованы, включают в себя IMP731 и IMP-321, описанные в US 2011/007023, WO08/132601 и WO09/44273.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 применяют в комбинации с ипилимумабом. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит CDR тяжелой и легкой цепи или вариабельные области ипилимумаба.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 VH ипилимумаба с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 VL ипилимумаба с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 311-313, соответственно, и домены CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 314-316, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит области VH и/или VL, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 309 и/или SEQ ID NO: 310, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления вариабельная область антитела по меньшей мере приблизительно на 90%, например, по меньшей мере приблизительно на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 309 или SEQ ID NO: 310.

Введение антител к OX40 и антагонистов, например, антагонистических антител, к одному или нескольким целевым антигенам, таким как LAG-3 и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усилить иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Злокачественные опухоли, рост которых может ингибироваться с использованием антител к OX40, включают в себя злокачественные опухоли, которые, как правило, реагируют на иммунотерапию, и те, которые, как правило, не реагируют на иммунотерапию. Типичные примеры злокачественных опухолей для лечения комбинированной терапией согласно настоящему раскрытию включают в себя те злокачественные опухоли, которые перечислены в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления комбинацию обсуждаемых в настоящем документе терапевтических антител можно вводить одновременно в виде единственной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно другому варианту осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Кроме того, если последовательно вводить более одной дозы комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть отменен или сохранен в том же порядке в каждый момент времени введения, и последовательные введения могут быть объединены с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к OX40 и антитела к PD1 (и/или антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с

первым антителом к PD1 и вторым антителом к OX40, а третье введение может быть последовательным с первым антителом к OX40 и вторым антителом к PD1 и т.д. Другая типичная схема дозирования предусматривает первое введение, которое является последовательным с первым антителом к OX40 и вторым антителом к PD1 (и/или антителом к CTLA-4 и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3), а затем введения могут быть одновременными.

Согласно определенному варианту осуществления субъект с заболеванием, который может получить клиническую пользу от стимуляции иммунной системы, например, злокачественной опухолью или инфекционным заболеванием, подвергается лечению путем введения субъекту антитела к OX40 и иммуно-онкологического средства. Примеры иммуно-онкологических средств включают в себя агонисты CD137 (4-1BB) (например, агонистическое антитело CD137, такое как урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433)); агонисты GITR (например, агонистическое антитело к GITR), агонисты CD40 (например, агонистическое антитело CD40); антагонисты CD40 (например, антагонистическое антитело CD40, такое как лукатумумаб (HCD122), дацетузумаб (SGN-40), CP-870,893 или Chi Lob 7/4); агонисты CD27 (например, агонистическое антитело CD27, такое как варлилумаб (CDX-1127)), MGA271 (до B7H3) (WO11/109400)); антагонисты KIR (например, лирилумаб); антагонисты IDO (например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) или F001287); агонисты Toll-подобных рецепторов (например, агонисты TLR2/4 (например, Bacillus Calmette-Guerin), агонисты TLR7 (например, хилтонол или имиквимод), агонисты TLR7/8 (например, резиквимод) или агонисты TLR9 (например, CpG7909)) и ингибиторы TGF-β (например, GC1008, LY2157299, TEW7197 или IMC-TR1).

Согласно одному варианту осуществления антитело к OX40 вводят перед введением второго средства, например, иммуно-онкологического средства. Согласно другому варианту осуществления антитело к OX40 вводят одновременно со вторым средством, например, иммуно-онкологическим средством. Согласно еще одному варианту осуществления антитело к OX40 вводят после введения второго средства. Введение двух средств может начинаться, например, за 30 минут, за 60 минут, за 90 минут, за 120 минут, за 3 часа, за 6 часов, за 12 часов, за 24 часа, за 36 часов, за 48 часов, за 3 дня, за 5 дней, за 7 дней или за одну или несколько недель перед, или введение второго средства может начинаться, например, через 30 минут, через 60 минут, через 90 минут, через 120 минут, через 3 часа, через 6 часов, через 12 часов, через 24 часа, через

36 часов, через 48 часов, через 3 дня, через 5 дней, через 7 дней или через одну или несколько недель после того, как было введено первое средство.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 и второе средство, например, иммуно-онкологическое средство, вводят пациенту одновременно, например, одновременно посредством инфузии, например, в течение 30 или 60 минут. Антитело к OX40 можно совместно составить со вторым средством, например, с иммуно-онкологическим средством.

Необязательно, антитело к OX40 в качестве единственного иммунотерапевтического средства или комбинация антитела к OX40 и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, блокада к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) могут быть дополнительно объединены с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими стимулирующие иммунную систему цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается далее ниже). Комбинация антитела к OX40 и одного или нескольких дополнительных антител (например, блокады CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) также может быть дополнительно объединена со стандартными способами лечения злокачественной опухоли. Например, комбинация антитела к OX40 и одного или нескольких дополнительных антител (например, блокада CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) может эффективно объединяться с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией, можно уменьшить (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Например, такая комбинация может включать в себя антитело к OX40 с дополнительным антителом (например, антителом к CTLA-4 и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3) или без него, далее в сочетании с декарбазином или интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование объединения агонистического антитела к OX40 с блокатором CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией заключается в том, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к

увеличению уровней опухолевого антигена в пути презентации антигена. Другие комбинированные терапии, которые могут приводить к синергизму с комбинацией антитела к OX40 с блокадой CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 или без нее, через клеточную гибель, включают в себя облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также можно сочетать с комбинацией антител к OX40 и блокаторов CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которая может быть источником опухолевого антигена, введенного в антигенпрезентирующие пути хозяина.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 можно применять в качестве единственного иммунотерапевтического средства или комбинация антитела к OX40 и блокирующих антител CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 может также применяться в сочетании с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецептор Fcα или Fcγ эффекторные клетки на опухолевые клетки (смотрите, например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела могут использоваться для нацеливания на два отдельных антигена. Т-клеточный ответ этих ответов был бы дополнен использованием комбинации антитела к OX40 и блокаторов CTLA-4 и/или PD-1 и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В другом примере антитело к OX40 можно применять в качестве единственного иммунотерапевтического средства или комбинацию антитела к OX40 и дополнительного иммуностимулирующего средства, например антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1 и/или средства LAG-3 (например, антитела) можно применять в сочетании с противоопухолевым антителом, таким как Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб), Bexxar® (тозитумомаб), Zevalin® (ибритумомаб), Campath® (алемтузумаб), Lymphocide® (эпртузумаб), Avastin® (бевацизумаб) и Tarceva® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера и без желания связывать себя теорией, лечение протиопухолевым антителом или противоопухолевым антителом, конъюгированным с токсином, может привести к гибели злокачественных клеток (например, опухолевых клеток), которые потенцируют иммунный ответ, опосредованный иммуностимулирующим средством (например, средством OX40, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например, антителом). Согласно иллюстративному варианту осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может предусматривать противоопухолевое средство (например, антитело) в

комбинации с антителом к OX40 и, необязательно, дополнительным иммуностимулирующим средством, например, средством к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3 (например, антителом), одновременно или последовательно, или любую их комбинацию, что может потенцировать противоопухолевые иммунные ответы хозяином.

Опухоли уклоняются от иммунного надзора хозяев с помощью большого количества механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессивными. К ним относятся, в частности, TGF-β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas-лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждому из этих объектов могут быть дополнительно объединены с антителом к OX40 с дополнительным иммуностимулирующим средством или без него, например, средством к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, таким как антитело, для противодействия эффектам иммуносупрессивных средств и благоприятных для противоопухолевого иммунного ответа хозяином.

Другие средства (например, антитела), которые могут быть применены для активации иммунного ответа хозяина, могут быть дополнительно использованы в комбинации с антителом к OX40 с дополнительным иммуностимулирующим средством или без него, таким как антитело к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Антитела к CD40 (Ridge et al., выше) могут быть использованы в сочетании с антителом к OX40 и необязательно дополнительным иммуностимулирующим средством, например, средством к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, например, антителом. Другие активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток Weinberg et al., *выше*, Melero et al., *выше*, Hutloff et al., *выше,* также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

Как обсуждалось выше, трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Иммунотерапию против OX40 самостоятельно или в сочетании с блокаторами CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 можно применять для повышения эффективности привитых донору опухолеспецифических Т-клеток.

Несколько экспериментальных протоколов лечения предусматривают активацию *ex vivo* и увеличение количеств антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос

этих клеток реципиентам для антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell, выше). Эти способы также могут применяться для активации ответов Т-клеток на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии антитела к OX40 с дополнительной иммуностимулирующей терапией или без нее, например, антителами к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, увеличит частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

В настоящем документе предусмотрены способы изменения нежелательного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) посредством иммуностимулирующего средства, предусматривающие введение антитела к OX40 со средством к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3 (например, антителом) субъекту. Например, описанные в настоящем документе способы предусматривают способ снижения частоты индуцированного иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения пациенту неабсорбируемого стероида. Используемый в настоящем документе термин «неабсорбируемый стероид» представляет собой глюкокортикоид, который проявляет обширный метаболизм первого прохода таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. менее чем приблизительно 20%. Согласно одному варианту осуществления неабсорбируемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид представляет собой локально действующий глюкокортикостероид, который интенсивно метаболизируется, прежде всего печенью, после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой pH-зависимый и зависимый от времени пероральный состав будесонида, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и во всю толстую кишку. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения легкой и умеренной степени болезни Крона с участием подвздошной кишки и/или восходящей ободочной кишки. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/сут. ENTOCORT EC® высвобождается в кишечнике до его абсорбирования и удерживается в слизистой оболочке кишечника. После того, как он проходит через ткань слизистой оболочки кишечника, ENTOCORT EC® интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени с метаболитами с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит к улучшению терапевтического соотношения по

сравнению с другими глюкокортикоидами с менее интенсивным метаболизмом первого прохода. Будесонид приводит к меньшему количеству побочных эффектов, в том числе уменьшению гипоталамическо-питуитарной супрессии, чем системно действующие кортикостероиды. Тем не менее, продолжительное введение ENTOCORT EC® может приводить к системным глюкокортикоидным эффектам, таким как гиперкортицизм и подавление надпочечников. Смотрите PDR 58th ed. 2004; 608-610.

Согласно другим вариантам осуществления антитело к OX40 с блокатором CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 (то есть антителом к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) или без него в сочетании с неабсорбируемым стероидом может быть дополнительно объединено с салицилатом. Салицилаты включают в себя средства 5-ASA, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); бальсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и мезаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals, PENTASA®, Shire US, CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc, ROWASA®, Solvay).

В соответствии с описанными в настоящем документе способами салицилат, вводимый в комбинации с антителом к OX40 с антителами к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3 или без них и неабсорбируемым стероидом, может предусматривать любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида с целью снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами. Так, например, способы снижения частоты колита, вызванного описанными в настоящем документе иммуностимулирующими антителами, охватывают введение салицилата и неабсорбируемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 часов после неабсорбируемого стероида) или любой их комбинации. Кроме того, салицилат и неабсорбируемый стероид можно вводить одним и тем же путем (например, оба вводят перорально) или различными путями (например, салицилат вводят перорально, а неабсорбируемый стероид вводят ректально), что может отличаются от маршрута(ов), используемого для введения антитела к OX40 и антител к CTLA-4 и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 и комбинированные антитела могут также использоваться в сочетании с другими хорошо известными способами лечения, которые выбраны для их конкретного подвергаемого лечению условия (например, злокачественной опухоли). Комбинации с антителами к OX40 могут

применяться последовательно с известным фармацевтически приемлемым средством(ами).

Например, описанные в настоящем документе антитела к OX40 и комбинированные антитела могут применяться в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным лечением, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатин-паклитаксела (таксол), доксорубицина, 5-fu или камптотецина + apo2l/TRAIL (6X combo)), один или несколько ингибиторов протеасомы (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитор индоламинадиоксигеназы-1 (например, INCB24360, индоксимод, NLG-919 или F001287), AT-101 (R-(-)-производное госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклакс) или антагонисты MCL-1 (белок 1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонисты iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярный smac-миметик, синтетические smac-пептиды (смотрите Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондезацетилазы), антитела к CD20- (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, нацеленные на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (смотрите Hyer *et al.*, Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточный ингибирующий FLICE пептид) (например, природные и синтетические лиганды PPARγ (активированный пролифератором пероксисом рецептор γ), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналилдомид, ингибиторы GSK3β, ингибиторы IAP и/или генотоксические лекарственные средства.

Описанные в настоящем документе антитела к OX40 и комбинированные антитела могут дополнительно применяться в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые могут применяться в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя, без ограничения, следующие:

Алкилирующие средства (включая в себя, без ограничения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены):

урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™), фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипроброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включая в себя, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пуринов и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, пентастатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинирования с антителами к OX40, без ограничения, таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пеларузид A, эпотилоны, эпотилон A, эпотилон B , эпотилон C, эпотилон D, эпотилон E, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон Bl, [17]-дегидродезоксиэпотилон B, [18]дегидродезоксиэпотилоны B, C12,13-циклопропил-эпотилон A, C6-C8 мостиковый эпотилон A, 9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон B, эпотилон B10, дискодеромолид, патупилон (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин B, эрибулин мезилат (E-7389), гемиастерлин (HTI-286), E-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтансиноидов (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (испинезиб), SB-743921, MK-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-B-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ола, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-диэтил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки средствам, известным в настоящей области техники.

В тех случаях, когда желательно сделать аберрантно пролиферативные клетки неподвижными в сочетании с лечением антителом к OX40 или до него, гормоны и стероиды (включая в себя синтетические аналоги), такие как 17a-этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостонолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилстеростерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоглютетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™, также могут вводиться пациенту. При использовании описанных в настоящем документе способов или композиций другие средства, применяемые для модуляции роста опухоли или метастазирования в клинических условиях, такие как антимиметики, также можно вводить по желанию.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят в комбинации (одновременно или отдельно) с ниволумабом для лечения пациента со злокачественной опухолью, например, злокачественной опухолью толстой и прямой кишок или мочевого пузыря.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к OX40 вводят в комбинации (одновременно или отдельно) с ипилимумабом для лечения пациента со злокачественной опухолью, например, злокачественной опухолью яичников, мочевого пузыря или предстательной железы.

Специалистам в настоящей области техники известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в Справочнике врачей (PDR), например, издание 1996 года (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Химиотерапевтическое средство(а) и/или лучевая терапия могут вводиться в соответствии с терапевтическими протоколами, хорошо известными в настоящей области техники. Специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что введение химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии может варьировать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известных эффектов химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного врача, терапевтические протоколы (например, количество доз и время введения) могут варьировать в зависимости от наблюдаемого влияния вводимых терапевтических средств на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические средства.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны толковаться как дополнительное ограничение. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных заявок на выдачу патентов, приведенных во всей настоящей заявке, явно включено в настоящий документ посредством ссылки.

XVII. Наборы и единичные дозированные формы

Также в настоящем документе предусмотрены наборы, которые включают в себя фармацевтическую композицию, содержащую антитело к OX40 (например, OX40.21) и

антитело к PD-1 (например, ниволумаб) или к CTLA-4 (ипилимумаб), и фармацевтически приемлемый носитель, в терапевтически эффективном количестве, адаптированном для применения в предыдущих способах. Наборы необязательно также могут включать в себя инструкции, например, содержащие графики введения, чтобы позволить специалисту-практику (например, врачу, медсестре или пациенту) вводить содержащуюся в нем композицию пациенту со злокачественной опухолью (например, солидной опухолью). Набор также может включать в себя шприц.

Необязательно, наборы включают в себя несколько упаковок однодозовых фармацевтических композиций, каждый из которых содержит эффективное количество антитела к OX40 или антитела к PD-1 или к CTLA-4 для одного введения в соответствии с вышеописанными способами. Инструменты или устройства, необходимые для введения фармацевтической композиции(й), также могут быть включены в наборы. Например, набор может содержать один или несколько предварительно заполненных шприцев, содержащих количество антитела к OX40 или антитела к PD-1 или к CTLA-4.

Согласно одному варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен набор для лечения солидной опухоли у пациента-человека, причем набор содержит дозу антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, и инструкции по применению в описанных в настоящем документе способах. Согласно некоторым вариантам осуществления набор дополнительно содержит (a) дозу антитела к PD-1, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 302, или (b) дозу антитела к CTLA-4, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, указанной в последовательностях SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которая связывается с OX40 человека и обладает следующими свойствами:

(a) связывается с мембраносвязанным OX40 человека;

(b) связывается с OX40 яванского макака;

(c) связывается с растворимым OX40 человека;

(d) индуцирует или усиливает активацию Т-клеток;

(e) ингибирует связывание лиганда OX40 с OX40;

(f) конкурирует за связывание с OX40 человека с одним или несколькими антителами 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3, 14A2-1, 14A2-2 и 20c1.

2. Антитело по варианту осуществления 1, причем антитело не связывается с OX40 мыши и/или крысы.

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 1 или 2, причем антитело стимулирует противоопухолевый иммунный ответ.

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело стимулирует антигенспецифический ответ Т-клеток.

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело увеличивает производство IL-2 и/или IFN-γ в экспрессирующих OX40 Т-клетках.

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело увеличивает пролиферацию Т-клеток.

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с Fc-рецепторами.

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 7, причем антитело связывается с одним или несколькими активирующими FcγR.

9. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается с растворимым OX40 человека с K_D приблизительно 1 нМ или менее, например, 0,5 нМ или менее или 0,1 нМ или менее,

что измерено посредством анализа Biacore.

10. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается с мембраносвязанным с OX40 человека с EC_{50} 50 нМ или менее, например, 10 нМ или менее или 1 нМ или менее, что измерено посредством FACS.

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с мембраносвязанным OX40 яванского макака с EC_{50} 50 нМ или менее, например, 10 нМ или менее или 1 нМ или менее, что измерено посредством анализа FACS.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело индуцирует или усиливает активацию Т-клеток посредством многовалентного перекрестного сшивания.

13. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с компонентом C1q комплемента человека.

14. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело индуцирует опосредованный NK-клетками лизис активированных CD4+ Т-клеток.

15. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело способствует опосредованному макрофагами фагоцитозу экспрессирующих OX40 клеток.

16. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело ингибирует опосредованное регуляторными Т-клетками подавление пролиферации CD4+ Т-клеток.

17. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывается с последовательностью DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

18. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 1-16, причем антитело связывается с последовательностью DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

19. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с OX40 и содержит три CDR вариабельной области тяжелой цепи и три CDR вариабельной области легкой цепи, которые находятся в парах вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 318 и 94;

(b) SEQ ID NO: 17 и 18;

(c) SEQ ID NO: 28 и 29;

(d) SEQ ID NO: 28 и 30;

(e) SEQ ID NO: 37 и 38;

(f) SEQ ID NO: 48 и 49;

(g) SEQ ID NO: 48 и 50;

(h) SEQ ID NO: 57 и 58;

(i) SEQ ID NO: 65 и 66;

(j) SEQ ID NO: 73 и 74;

(k) SEQ ID NO: 84 и 85;

(l) SEQ ID NO: 84 и 86; а также

(m) SEQ ID NO: 93 и 94.

20. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с OX40, содержащее:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 11-13, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 14-16, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 51-53, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62-64, соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67-69, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 70-72, соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 78-80, соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81-83, соответственно; или

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87-89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно.

21. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с OX40, содержащее:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 90-92, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 11-13, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 14-16, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 22-24, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 19-21, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 39-41, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 51-53, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 62-64, соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 67-69, соответственно, и/или последовательности легкой цепи CDR1, CDR2 и CDR3, состоящие из SEQ ID NO: 70-72, соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 78-80, соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 75-77, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 81-83, соответственно; или

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 87-89, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, состоящие из SEQ ID NO: 90-92, соответственно.

22. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с OX40 и содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 28, 37, 48, 57, 65, 73, 84 и 93.

23. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с OX40 и содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 29, 30, 38, 49, 50, 58, 66, 74, 85, 86 и 94.

24. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с OX40 и содержит последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 85% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 318 и 94;

(b) SEQ ID NO: 17 и 18;

(c) SEQ ID NO: 28 и 29;

(d) SEQ ID NO: 28 и 30;

(e) SEQ ID NO: 37 и 38;

(f) SEQ ID NO: 48 и 49;

(g) SEQ ID NO: 48 и 50;

(h) SEQ ID NO: 57 и 58;

(i) SEQ ID NO: 65 и 66;

(j) SEQ ID NO: 73 и 74;

(k) SEQ ID NO: 84 и 85;

(l) SEQ ID NO: 84 и 86; а также

(m) SEQ ID NO: 93 и 94.

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 24, в котором вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична вариабельным областям тяжелой и легкой цепей, выбранным из группы, состоящей из (a)-(1) варианта осуществления 24.

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 25, в котором вариабельная область тяжелой и легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична вариабельным областям тяжелой и легкой цепей, выбранным из группы, состоящей из (a)-(1) варианта осуществления 24.

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 26, в котором вариабельная область тяжелой и легкой цепей содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из (a)-(1) варианта осуществления 24.

28. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которая связывается с OX40 и содержит последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 124 и 116, соответственно;

(b) SEQ ID NO: 95 и 96, соответственно;
(c) SEQ ID NO: 97 и 98, соответственно;
(d) SEQ ID NO: 99 и 100, соответственно;
(e) SEQ ID NO: 101 и 102, соответственно;
(f) SEQ ID NO: 103 и 104, соответственно;
(g) SEQ ID NO: 105 и 106, соответственно;
(h) SEQ ID NO: 107 и 108, соответственно;
(i) SEQ ID NO: 109 и 110, соответственно;
(j) SEQ ID NO: 111 и 112, соответственно;
(k) SEQ ID NO: 113 и 114, соответственно;
(l) SEQ ID NO: 115 и 116, соответственно;
(m) SEQ ID NO: 117 и 118, соответственно;
(n) SEQ ID NO: 119 и 120, соответственно;
(o) SEQ ID NO: 121 и 122, соответственно;
(p) SEQ ID NO: 123 и 116, соответственно; а также
(q) SEQ ID NO: 125 и 116, соответственно.

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 28, в котором тяжелая и легкая цепи содержат тяжелую и легкую цепи, выбранные из группы, состоящей из (a)-(r) варианта осуществления 28.

30. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которая (a) связывается с одним и тем же эпитопом на OX40, что и антитело по варианту осуществления 27, и/или (b) ингибирует связывание антитела по варианту осуществления 27 с OX40 на активированных Т-клетках по меньшей мере на 95%, как измерено посредством FACS.

31. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 19-30, причем антитело связывается с последовательностью DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

32. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 19-30, причем антитело связывается с последовательностью

DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

33. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из вариантов осуществления 19-31, причем антитело связывается как с OX40 человека, так и с OX40 яванского макака.

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его варианта.

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 34, причем антитело представляет собой антитело IgG1.

36. Антитело по варианту осуществления 35, причем антитело или его антигенсвязывающая часть содержит Fc, характеризующийся улучшенным связыванием с активирующим FcγR.

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором один или несколько остатков метионина в областях CDR заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислению.

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

39. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело не является иммуногенным, как определено в соответствии с примером 21.

40. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором аминокислотная последовательность Asp-Gly, если она присутствует в последовательностях CDR тяжелой и/или легкой цепи, замещена аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации.

41. Антитело или его антигенсвязывающая часть по варианту осуществления 40, причем антитело содержит последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 76, но причем последовательность Asp-Gly замещена аминокислотной последовательностью, которая не подвергается изомеризации.

42. Антитело по варианту осуществления 41, в котором Asp или Gly в последовательности Asp-Gly замещается Ser.

43. Биспецифическая молекула, содержащая антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, связана с молекулой, характеризующейся второй специфичностью связывания.

44. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части по любому из вариантов осуществления 1-42.

45. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 44.

46. Клетка, трансформированная вектором экспрессии по варианту осуществления 45.

47. Иммуноконъюгат, содержащий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-42, связанный со средством.

48. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть, биспецифическую молекулу или иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47 и носитель.

49. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть или биспецифическую молекулу, или иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47 и инструкции по применению.

50. Способ получения антитела OX40 или его антигенсвязывающей части, предусматривающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке по варианту осуществления 46 и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

51. Способ стимуляции антигенспецифического ответа Т-клеток, предусматривающий контактирование Т-клетки с антителом или его антигенсвязывающей частью, биспецифической молекулой или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47, так что стимулируется антигенспецифический ответ Т-клеток.

52. Способ активации или костимуляции эффекторной Т-клетки, предусматривающий контактирование эффекторной Т-клетки с антителом к OX40 или ее антигенсвязывающей частью, биспецифической молекулой или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47, и CD3, причем эффекторная Т-клетка активируется или костимулируется.

53. Способ увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ в Т-клетке, предусматривающий контактирование Т-клетки с эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулой или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47.

54. Способ увеличения пролиферации Т-клеток, предусматривающий контактирование клетки с эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулой или иммуноконъюгатом по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47.

55. Способ увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ в Т-клетках у субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47, для увеличения производства IL-2 и/или IFN-γ из Т-клеток.

56. Способ уменьшения или истощения количества регуляторных Т-клеток в опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47, причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются эффекторной или улучшенной эффекторной функцией, для уменьшения количества регуляторных Т-клеток в опухоли.

57. Способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47 субъекту, так что у субъекта стимулируется иммунный ответ.

58. Способ по варианту осуществления 57, при котором субъект содержит опухоль, а иммунный ответ против опухоли стимулируется.

59. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47, так что рост опухоли ингибируется.

60. Способ лечения злокачественной опухоли, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-43 и 47 для лечения злокачественной опухоли.

61. Способ по варианту осуществления 60, при котором злокачественную опухоль выбирают из группы, содержащей злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль матки/шейки матки, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль толстой и прямой кишок, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль почки,

злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль легких, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль половых клеток, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и связанную с вирусом злокачественную опухоль.

62. Способ по варианту осуществления 60 или 61, при котором злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, рефрактерную злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 56-62, дополнительно предусматривающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

64. Способ по варианту осуществления 63, при котором одно или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой антитело или небольшую молекулу.

65. Способ по варианту осуществления 64, при котором дополнительный способ лечения представляет собой антитело к PD1, антитело к LAG-3, антитело к CTLA-4, антитело к PD-L1 или антитело к TGFβ.

66. Способ лечения солидной опухоли у человека, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла одна доза антитела к OX40 вводится в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг.

67. Способ лечения солидной опухоли у человека, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества каждого из:

(a) антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94,

(b) антитела к PD-1, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 302,

причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в две, три или четыре недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла одна доза антитела к OX40 вводится в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, а одну дозу антитела к PD-1 вводят в дозе 240, 360 или 480 мг или дозе приблизительно 240, 360 или 480 мг.

68. Способ по варианту осуществления 67, при котором антитело к OX40 и антитело к PD-1 вводят в следующих дозах:

(a) 1 мг/кг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(b) 20 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(c) 40 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(d) 80 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1;

(e) 160 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1; или

(f) 320 мг антитела к OX40 и 240 мг, 360 мг или 480 мг антитела к PD-1.

69. Способ лечения солидной опухоли у человека, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества каждого из:

(a) антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94,

(b) антитела к CTLA-4, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310,

причем способ предусматривает по меньшей мере один цикл введения, причем цикл представляет собой период в три недели, причем для каждого из по меньшей мере одного цикла одна доза антитела к OX40 вводится в дозе 1 мг/кг массы тела; фиксированной дозе 20, 40, 80, 160 или 320 мг; дозе приблизительно 1 мг/кг массы тела или фиксированной дозе приблизительно 20, 40, 80, 160 или 320 мг, а одну дозу антитела к CTLA-4 вводят в дозе 1 мг/кг или дозе приблизительно 1 мг/кг,

причем антитело к OX40 вводят вместе с антителом к CTLA-4 в течение по меньшей мере одного цикла с последующей монотерапией антитела к OX40 по меньшей мере в течение одного цикла.

70. Способ по варианту осуществления 67, при котором антитело к OX40 и антитело к CTLA-4 вводят в следующих дозах:

(a) 1 мг/кг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(b) 20 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(c) 40 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(d) 80 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4;

(e) 160 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4; или

(f) 320 мг антитела к OX40 и 1 мг/кг антитела к CTLA-4.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 66-70, при котором антитело к OX40 или антитело к OX40 и антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4 составлены для внутривенного введения.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 67-71, при котором антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 составляют вместе.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 67-71, при котором антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 составляют отдельно.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 66-68 и 71-73, при котором лечение состоит из 12 циклов.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 69-73, при котором лечение состоит из 8 циклов.

76. Способ по варианту осуществления 75, при котором антитело к OX40 вводят вместе с антителом к CTLA-4 в течение первых 4 циклов с последующей монотерапией антитела к OX40 в течение последних 4 циклов.

77. Способ по любому из вариантов осуществления 66-76, при котором антитело к OX40 или антитело к OX40 и антитело к PD-1 или к CTLA-4 вводят в первый день каждого цикла.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 67-77, при котором антитело к OX40 вводят перед введением антитела к PD-1 или к CTLA-4.

79. Способ по варианту осуществления 78, при котором антитело к OX40 вводят в течение приблизительно 30 минут до введения антитела к PD-1 или к CTLA-4.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 67-77, при котором антитело к OX40 вводят после введения антитела к PD-1 или к CTLA-4.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 67-77, при котором антитело к OX40 вводят одновременно с антителом к PD-1 или к CTLA-4.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 66-81, при котором лечение дает по меньшей мере один терапевтический эффект, выбранный из уменьшения размера опухоли, уменьшения количества метастатических поражений с течением времени, полного ответа, частичного ответа и стабильного заболевания.

83. Способ по любому из вариантов осуществления 66-82, при котором солидная опухоль связана со злокачественной опухолью, выбранной из группы, состоящей из

злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли толстой кишки и злокачественной опухоли яичников.

84. Способ по любому из вариантов осуществления 66-83, при котором антитело к OX40 содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 87, 317 и 89 и 90-92, соответственно.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 66-84, при котором антитело к OX40 содержит последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 318 и 94, соответственно.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 66-85, при котором антитело к OX40 содержит последовательности тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 124 и 116, соответственно.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 67, 68 и 71-86, при котором антитело к PD-1 содержит CDR вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 303-305 и 306-308, соответственно.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 67, 68 и 71-87, при котором антитело к PD-1 содержит последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 301 и 302, соответственно.

89. Способ по любому из вариантов осуществления 69-86, при котором антитело к CTLA-4 содержит CDR вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 311-313 и 314-316, соответственно.

90. Способ по любому из вариантов осуществления 69-86 и 89, при котором антитело к CTLA-4 содержит последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, представленные в SEQ ID NO: 309 и 310, соответственно.

91. Набор для лечения солидной опухоли у человека, причем набор содержит дозу антитела к OX40, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 318, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 94, и инструкции по применению.

92. Набор по варианту осуществления 91, дополнительно содержащий (a) дозу антитела к PD-1, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 301, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 302, или (b) дозу антитела к CTLA-4, содержащего домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 309, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 310.

93. Способ обнаружения наличия OX40 в образце, предусматривающий контактирование образца с антителом или его антигенсвязывающей частью по любому из вариантов осуществления 1-38 в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом или связывание антигена.

94. Антитело, которое связывается с OX40, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 282-296.

95. Антитело по варианту осуществления 94, причем антитело содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 282-296.

96. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с OX40, содержащее последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 87, 317 и 89, соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90-92, соответственно.

97. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с OX40, содержащее вариабельные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 318 и 94, соответственно.

98. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с OX40, содержащее тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 124 и 116, соответственно.

99. Выделенное моноклональное антитело, которое связывается с OX40, причем антитело связывается со всей или частью последовательности DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178) OX40 человека (SEQ ID NO: 2).

100. Композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 96-99, и носитель.

101. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антитела по варианту осуществления 96 или 97, или тяжелую и/или легкую цепь по варианту осуществления 98.

102. Набор, содержащий антитело по любому из вариантов осуществления 96-99.

103. Способ стимуляции антигенспецифического ответа Т-клеток, предусматривающий контактирование Т-клетки с антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления 96-99.

104. Способ лечения злокачественной опухоли, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления 96-99 для лечения злокачественной опухоли.

105. Способ по варианту осуществления 104, при котором злокачественная опухоль или солидная опухоль выбраны из группы, состоящей из злокачественной опухоли шейки матки, злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли толстой кишки, злокачественной опухоли яичников, немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение антител к OX40.

Моноклональные антитела к OX40 человека получали в штаммах Hco7, Hco12, Hco17 и Hco38 трансгенных мышей HuMAb® («HuMAb» представляет собой торговую марку Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси) и мышей KM (штамм KM Mouse® содержит трансхромосому SC20, как описано в публикации PCT WO 02/43478) с использованием рекомбинантного антигена гексахистидин-OX40.

В общей сложности 52 мыши, включая 5 генотипов трансгенных мышей (KM, Hco7, Hco12, Hco17 и Hco38), иммунизировали различными стратегиями иммунизации. Иммуноген представлял собой huOX40-6x, который получали на месте и использовали в дозе 2,0 мг/мл для получения общей дозы 20 мкг на мышь. Пути введения включали в себя: инъекцию в основание хвоста, иммунизацию Hock, внутрибрюшинную (ip) и подкожную (sc) инъекцию и адъювант (Ribi, Cat # S6322, Sigma). Проводили и подвергали скринингу 27 слияний от 30 мышей. Из этих 27 слияний идентифицировали 541 ELISA антиген-положительное антитело, и дальнейшая характеристика привела к выделению представляющих особый интерес антител, включая в себя антитела, обозначенные как 3F4, 14B6-1, 14B6-2, 23H3, 6E1-1, 6E1-2, 18E9, 8B11, 20B3 (также называемое OX40.17), 14A2-1, 14A2-2 и 20C1. Их аминокислотные последовательности вариабельных областей и изотип приведены на фиг. 1-9. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 3F4 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 17 и 18. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 14B6-1 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28 и 29. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 14B6-2 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28 и 30. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 23H3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37 и 38. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 6E1-1 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 48 и 49. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 6E1-2 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 48 и 50. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 18E9 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 57 и 58. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 8B11 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 65 и 66. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 20B3 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 73 и 74. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 14A2-1 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84 и 85. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей

14A2-2 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84 и 86. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей 20C1 состоят из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 93 и 94.

Секвенирование кДНК идентифицировало одну тяжелую и одну легкую цепь для каждого из антител 3F4, 23H3, 18E9, 8B11, 20B3 (также называемое OX40.17) и 20C1, а также одну тяжелую цепь и две легкие цепи (легкая цепь 1 или «L1» и легкая цепь 2 или «L2») для каждого из антител 14B6, 14A2 и 6E1. По белковому анализу идентифицировали единственную легкую цепь для антител 14B6, 6E1 и 14A2, а N-концевое секвенирование и определение молекулярной массы показали, что это была легкая цепь L1 для 14B6 и 14A2 и легкая цепь L2 для 6E1. Антитела 14B6-1 и 14B6-2 соответствуют антителу 14B6 с легкой цепью L1 и L2, соответственно. Антитела 14A2-1 и 14A2-2 соответствуют антителу 14A2 с легкой цепью L1 и L2, соответственно. Антитела 6E1-1 и 6E1-2 соответствуют антителу 6E1 с легкой цепью L1 и L2, соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности каждой из легких цепей 3 антител представлены в таблице 23.

Для некоторых из вышеперечисленных антител в HCDR2 сделали замены в исходном антителе, чтобы удалить наличие сайта изомеризации (DG), и ввели каркасные замены (благодаря получению из зародышевой линии DP44), чтобы сделать структуру более похожей на обычно экспрессируемое антитело. Для антител на основе 20C1 три дополнительных необычных каркасных остатка возвращали в зародышевую линию (A2V, D24G и G82bS). Реверсирование каркаса G82bS также исключает сайт дезамидирования (NG). Сводная информация о различных заменах, введенных в последовательности исходного гибридного клона, приведена в таблице 6.

Таблица 6.

Название	Исходный клон гибридомы	Изотип	Замены вариабельной области
OX40.6	23H3	g1f	23H3 анти-OX40 с VH-H13Q/M87T
OX40.7	23H3	g1f	23H3 анти-OX40 с VH-M87T/M95Y
OX40.8	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-G103W
OX40.9	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-M97Y/G103W
OX40.10	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-D53S
OX40.11	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-G54S

OX40.12	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-D53S/G103W
OX40.13	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-G54S/G103W
OX40.14	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-D53S/M97Y/G103W
OX40.15	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-G54S/M97Y/G103W
OX40.16	20C1	g1f	20C1 анти-OX40 с VH-A2V/H13Q/D24G/M87T/G82bS
OX40.17	20B3	g1f	20B3 анти-OX40 (нет замен)
OX40.18	3F4	g1f	3F4 анти-OX40 с VH-N27Y/N72D/P102Y
OX40.19	14A2	g1f	14A2 анти-OX40 с VH-M97L/G103W
OX40.20	20C1	g1f	20C1 анти-OX40 с VH-A2V/H13Q/D24G/D54S/M87T/G82bS
OX40.21	20C1	g1f	20C1 анти-OX40 с VH-A2V/H13Q/D24G/G55A/M87T/G82bS
OX40.22	20C1	g1f	20C1 анти-OX40 с VH-A2V/H13Q/D24G/D54S/G55T/M87T/G82bS

*В зависимости от зародышевой линии могут присутствовать D53 и G54 или D54 и G55 в качестве потенциального места изомеризации.

Пример 2. Связывание антител к OX40 с активированными первичными Т-клетками человека

Моноклональные антитела к OX40 человека, полученные в примере 1, исследовали на способность связываться с активированными первичными Т-клетками человека.

Клетки активировали в течение нескольких дней перед анализом связывания, чтобы индуцировать экспрессию OX40. Вкратце, PBMC культивировали в течение трех или четырех дней с магнитными гранулами, покрытыми анти-человеческими CD3 плюс анти-человеческими CD28, в присутствии рекомбинантного IL-2 человека. В день анализа гранулы удаляли и клетки окрашивали титрованием каждого антителом к OX40. Связанные антитела обнаруживали с помощью флуоресцентно конъюгированного антитела поликлонального вторичного антитела к IgG человека, и клетки совместно окрашивали на CD4 и CD25 для обнаружения активированных CD4 Т-клеток. Интенсивность флуоресценции окрашивания измеряли с использованием проточного цитометра FACSCanto II (Becton Dickinson). Для популяции CD4+ CD25+ (программное

обеспечение FACSDiva) рассчитывали среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (GMFI) или среднюю интенсивность флуоресценции (MedFI) окрашивания антителом к OX40. EC_{50} для связывания антитела рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 11A, антитела к OX40 связывались с активированными первичными Т-клетками человека с субнаномолярным EC_{50}. Примечательно, что OX40.5 показало низкое связывание исследуемых антител к OX40. Тот же эксперимент проводили с антителами к OX40 с вариациями вариабельной области. Начальные эксперименты проводили с использованием антител в форме супернатантов из культур клеток-хозяев, трансфицированных векторами экспрессии рекомбинантного антитела. Как показано на фиг. 11B, некоторые замены вызывали значительную потерю связывания, а именно для антител OX40.7, OX40.9, OX40.14 и OX40.15. Набор антител с заменами вариабельной области анализировали дополнительно с использованием очищенного материала антитела.

Как показано на фиг. 11C и 11D, все исследуемые антитела, связанные с субнаномолярными EC_{50} с OX40, за исключением OX40.18, которое показало более низкое связывание, чем исходный клон 3F4 гибридомы. OX40.5 показало наименьшее связывание с панелью антител, исследованных на фиг. 11B, тогда как OX40.1 показало самое низкое связывание с панелью антител, исследованных на фиг. 11C. Сводная информация о значениях EC_{50} представлена в таблице 7 ниже.

Таблица 7: EC_{50} для связывания антител OX40 с активированными первичными Т-клетками человека.

Название	**EC50 связывания Т-клеток человека (нМ) (среднее ± SD)**	**n**
3F4	**0,19 ± 0,15**	3
8B11	**0,14 ± 0,07**	2
18E9	**0,22 ± 0,12**	2
20B3	**0,34 ± 0,23**	3
20C1	**0,10 ± 0,06**	3
23H3	**0,15 ± 0,09**	3
6E1	**0,97 ± 0,05**	2
14A2	**0,33 ± 0,30**	3

14B6	**0,18 ± 0,16**	2
OX40.6	**0,13 ± 0,06**	7
OX40.8	**0,14 ± 0,07**	7
OX40.16	**0,06 ± 0,03**	5
OX40.17	**0,26 ± 0,17**	3
OX40.18	**3,15 ± 3,9**	2
OX40.21	**0,07 ± 0,02**	5
OX40.1	**0,35 ± 0,09**	2
OX40.4	**0,36 ± 0,06**	2
OX40.5	**3,20 ± 0,00**	2

Пример 3. Связывание антител к OX-40 с активированными первичными Т-клетками яванского макака

Моноклональные антитела к OX-40 человека, которые исследовали на связывание с активированными первичными Т-клетками человека в Примере 1, исследовали на способность связываться с активированными первичными Т-клетками яванского макака.

Вкратце, клетки активировали в течение нескольких дней перед анализом на связывание, чтобы индуцировать экспрессию OX40. Общее количество лейкоцитов выделяли из периферической крови яванского макака путем лизиса эритроцитов с использованием буфера хлорида аммония. Затем лейкоциты культивировали в течение четырех-пяти дней в колбах, предварительно покрытых антителами к CD3 человека плюс к CD28 человека, которые перекрестно реагируют с яванским макаком в присутствии рекомбинантного человеческого IL-2, для того чтобы увеличить количество и активировать Т-клетки. В день анализа клетки собирали и окрашивали титрованием каждого антитела к OX40. Связанные антитела обнаруживали с помощью флуоресцентно конъюгированного поликлонального вторичного антитела к IgG человека, и клетки совместно окрашивали на CD4 и CD25 для обнаружения активированных CD4 Т-клеток. Интенсивность флуоресценции окрашивания измеряли с использованием проточного цитометра FACSCanto II (Becton Dickinson). Для популяции CD4+ CD25+ (программное обеспечение FACSDiva) рассчитывали среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (GMFI) или среднюю интенсивность флуоресценции (MedFI) окрашивания антителом к OX40. EC_{50} для связывания антитела рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Получали

кривые доза-ответ и EC_{50} для связывания антитела рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 12A и 12B, исследуемые антитела к OX40 связывались с высокой активностью с активированными CD4 Т-клетками яванского макака с EC_{50} в диапазоне от 0,068 нМ (20C1) до 1,4 нМ (20B3). 18E9 и 20B3 связывались с EC_{50} от 1 до 1,5 нМ, тогда как остальные антитела связывались с EC_{50} ниже 1 нМ. OX40.1 показало наименьшее связывание среди антител к OX40, исследованных на фиг. 12A, и OX40.5 показало наименьшее связывание среди антител к OX40, исследованных на фиг.12B. Тот же эксперимент проводили с антителами к OX40 с заменами в вариабельной области. Как показано на фиг. 12C, антитела OX40.6, OX40.8 и OX40.21 показали наивысшую эффективность связывания с EC_{50} 0,12 нМ или ниже. OX40.1 показало значительно более низкое связывание с CD4 Т-клетками яванского макака. Не было обнаружено связывания антитела OX40.21 на активированных мышиных или крысиных CD4+ Т-клетках. Сводная информация о значениях EC_{50} представлена в таблице 8 ниже.

Таблица 8:

Название	**EC50 связывания Т-клеток яванского макака (нМ) (среднее ± SD)**	**n**
3F4	0,37 ± 0,13	4
8B11	0,20 ± 0,08	4
18E9	41,70 ± 37,78	4
20B3	1,18 ± 0,27	4
20C1 *	0,17 ± 0,07	4
23H3	0,18 ± 0,10	4
6E1	0,77 ± 0,14	4
14A2	0,27 ± 0,02	4
14B6	0,31	1
OX40.6	0,11 ± 0,01	5
OX40.8	0,10 ± 0,02	4
OX40.16	0,06 ± 0,01	3
OX40.17	0,52 ± 0,12	3
OX40.18		

OX40.21	0,07 ± 0,01	5
OX40.1	23,40 ± 37,75	4
OX40.4	1,3	1
OX40.5	~ 2,2e+012	1

Пример 4. Анализ Скэтчарда связывания антител к OX40 с активированными первичными Т-клетками и клетками, сверхэкспрессирующими OX40 человека и яванского макака

Связывание OX40.21 (изотип IgG1) с активированными Т-клетками человека дополнительно оценивали с использованием анализа Скэтчарда. Вкратце, OX40.21 метили радиоактивным йодом ^{125}I-Na (1mCi, PerkinElmer Catalog NEZ033H001 MC) с использованием реагента IODO-GEN® для твердофазного йодирования (1,3,4,6-тетрахлор-3а-6а-дифенилгликолурил, Pierce Catalog 28601). Активированные CD4+ Т-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), донор W-326470, приобретенных в банке крови Стэнфорда. CD4+ Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции (коктейль обогащения CD4+ Т-клеток человека RosetteSep™, StemCell Technologies Catalog 15062) и замораживания. Выделенные CD4+ Т-клетки активировали в течение четырех дней перед анализом связывания с целью индуцирования экспрессии OX40 следующим образом. Размороженные клетки культивировали в течение четырех дней с магнитными гранулами, покрытыми анти-человеческим CD3 плюс анти-человеческим CD28 (T-Expander CD3/CD28 Dynabeads человека, Invitrogen Catalogue 111.41D) при соотношении гранул 1:1 в присутствии 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека (Peprotech Catalog 200-02).

Связывание меченного радиоактивным йодом OX40.21 IgG1 с активированными Т-клетками человека демонстрировали путем инкубации активированных Т-клеток человека с титрованием ^{125}I-OX40,21 IgG1. Неспецифическое связывание определяли путем связывания в присутствии титрования 100-кратного молярного избытка немеченого антитела и вычитали из общей CPM для расчета специфического связывания. Линейную стандартную кривую концентрации ^{125}I-OX40.21 IgG1 по сравнению с CPM использовали для экстраполяции специфической активности, максимального связанного ^{125}I-OX40.21 IgG1 в нМ и, следовательно, вычисления числа рецепторов на клетку.

Как показано в таблице 9 и на фиг. 13A, насыщенное связывание OX40.21 IgG1 наблюдали на активированных Т-клетках человека, эндогенно экспрессирующих OX40, с K_D 0,05 нМ для каждого из двух доноров Т-клеток.

Таблица 9. Связывание ^{125}I-OX40.21 с активированными Т-клетками человека

Концентрация антитела (нМ)	**Общее связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Неспецифическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Специфическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**	
10	0,0317	0,0292	0,0120	0,0117	0,0197	0,0175
5	0,0283	0,0275	0,0073	0,0072	0,0210	0,0204
2,5	0,0230	0,0256	0,0036	0,0030	0,0195	0,0226
1,25	0,0205	0,0221	0,0029	0,0025	0,0176	0,0196
0,625	0,0197	0,0223	0,0014	0,0017	0,0183	0,0207
0,3125	0,0197	0,0229	0,0013	0,0012	0,0184	0,0217
0,15625	0,0177	0,0201	0,0012	0,0011	0,0165	0,0190
0,078125	0,0140	0,0152	0,0010	0,0011	0,0129	0,0141
0,039063	0,0083	0,0091	0,0007	0,0010	0,0076	0,0081
0,019531	0,0057	0,0057	0,0009	0,0010	0,0049	0,0047
0,009766	0,0024	0,0030	0,0007	0,0008	0,0017	0,0022

Тот же анализ проводили с использованием клеток HEK293, сверхэкспрессирующих OX40 человека («hOX40-293»). Вкратце, связывание меченного радиоактивным йодом OX40.21 со сверхэкспрессированным OX40 человека демонстрировали путем инкубации клеток hOX40-293 с титрованием ^{125}I-OX40.21. Неспецифическое связывание определяли путем связывания в присутствии титрования 100-кратного молярного избытка немеченого антитела и вычитания из общей CPM для расчета специфического связывания. Линейную стандартную кривую концентрации ^{125}I-OX40.21 IgG1 по сравнению с CPM использовали для экстраполяции специфической активности, максимального связанного ^{125}I-OX40.21 IgG1 в нМ и, таким образом, вычисления числа рецепторов на клетку. Как показано на фиг. 13B и в таблице 10, наблюдали насыщающее связывание OX40.21 IgG1 за связывание с OX40, экспрессируемым на клетках hOX40-293. Среднее значение K_D для связывания из двух

условий испытания с использованием различных количеств клеток hOX40-293 на образец составляло 0,22 нМ.

Таблица 10: Связывание OX40.21 с клетками hOX40-293

Концентрация антитела (нМ)	**Общее связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Неспецифическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Специфическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**	
10	0,1866	0,1712	0,0129	0,0137	0,1737	0,1575
5	0,1800	0,1710	0,0080	0,0099	0,1720	0,1611
2,5	0,1799	0,1643	0,0065	0,0065	0,1734	0,1578
1,25	0,1722	0,1628	0,0057	0,0054	0,1665	0,1574
0,625	0,1583	0,1436	0,0067	0,0048	0,1515	0,1388
0,3125	0,0986	0,0936	0,0038	0,0044	0,0948	0,0891
0,15625	0,0624	0,0501	0,0035	0,0048	0,0589	0,0453
0,078125	0,0351	0,0289	0,0035	0,0033	0,0316	0,0255
0,039063	0,0211	0,0162	0,0038	0,0027	0,0173	0,0136
0,019531	0,0117	0,0091	0,0029	0,0028	0,0088	0,0063
0,009766	0,0075	0,0056	0,0027	0,0028	0,0048	0,0028

Тот же анализ проводили с использованием клеток CHO, сверхэкспрессирующих OX40 яванского макака («cynoOX40-CHO»). Вкратце, связывание меченного радиоактивным йодом OX40.21 с OX40 яванского макака демонстрировали путем инкубации клеток cynoOX40-CHO с титрованием ^{125}I-OX40.21. Неспецифическое связывание определяли путем связывания в присутствии титрования 100-кратного молярного избытка немеченого антитела и вычитания из общей CPM для расчета специфического связывания. Линейную стандартную кривую концентрации ^{125}I-OX40.21 IgG1 по сравнению с CPM использовали для экстраполяции максимального связанного ^{125}I-OX40.21 IgG1 в нМ и, таким образом, вычисления числа рецепторов на клетку. Как показано на фиг. 13C и в таблице 11, наблюдали насыщающее связывание OX40.21 IgG1 за связывание с OX40 яванского макака, экспрессируемым на клетках cynoOX40-CHO. Среднее значение K_D для связывания из двух условий испытания с использованием различных количеств клеток на образец составляло 0,63 нМ.

Таблица 11: Связывание OX40.21 с клетками cynoOX40-CHO

Концентрация антитела (нМ)	**Общее связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Неспецифическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**		**Специфическое связывание меченного ^{125}I антитела (нМ)**	
20	0,1781	0,1814	0,0266	0,0414	0,1515	0,1400
10	0,1768	0,1651	0,0161	0,0197	0,1607	0,1454
5	0,1629	0,1820	0,0109	0,0171	0,1520	0,1649
2,5	0,1665	0,1659	0,0080	0,0092	0,1586	0,1567
1,25	0,1197	0,1839	0,0079	0,0084	0,1117	0,1755
0,625	0,0892	0,1197	0,0060	0,0074	0,0832	0,1123
0,3125	0,0630	0,0754	0,0057	0,0053	0,0573	0,0701
0,15625	0,0318	0,0437	0,0049	0,0050	0,0269	0,0386
0,078125	0,0158	0,0212	0,0030	0,0034	0,0128	0,0179
0,039063	0,0082	0,0110	0,0027	0,0029	0,0055	0,0082
0,019531	0,0058	0,0058	0,0026	0,0023	0,0032	0,0035
0,009766	0,0030	0,0032	0,0022	0,0021	0,0009	0,0011

Пример 5: Специфическое связывание антител к OX40 с лимфоцитами

Специфичность различных антител OX40 исследовали на панели из 22 типов нормальных тканей человека, включающих в себя селезенку, миндалину, тимус, головной мозг, мозжечок, сердце, печень, легкое, почку, поджелудочную железу, гипофиз, периферические нервы, желудок, толстый кишечник, тонкий кишечник, щитовидную железу, кожу, скелетную мышцу, предстательную железу, матку, яички и плаценту, посредством иммуногистохимии.

Свежие, замороженные и/или заключенные в OCT человеческие ткани приобретали у нескольких коммерческих сетей/поставщиков тканей (Asterand Inc. Detroit, MI; Cooperative Human Tissue Network, Philadelphia, PA; ProteoGenex Inc, Culver City, CA). Для определения связывания тканей ряд антител к OX40 (OX40.6-FITC, OX40.8-FITC, 6E1-FITC, OX40.16-FITC, OX40.17-FITC, OX40.20-FITC и OX40.21-FITC) метили флуоресцином и применяли к фиксированным в ацетоне криостатическим срезам с последующим мостиковым антителом к FITC и визуализацией системой EnVision+. В

качестве неспецифического меченого флуоресцином IgG1 человека применяли изотипическое контрольное антитело. В качестве положительных контрольных клеток и тканей использовали клетки HT1080, стабильно экспрессирующие OX40 человека (HT1080/huOX40), и гиперпластические срезы ткани миндалины человека. Чтобы определить, оказывает ли конъюгация с FITC какое-либо влияние на связывающие свойства, как конъюгированные с FITC, так и неконъюгированные антитела к OX40 сравнивали в клетках HT1080/huOX40 с использованием анти-huIgG в качестве мостикового антитела. Окрашенные срезы оценивали под световым микроскопом.

Первоначальные исследования показали, что как неконъюгированные, так и конъюгированные с FITC антитела к OX40 специфически окрашивают цитоплазму и мембрану трансфицированных клеток OX40 человека, но не исходные клетки HT1080. Не было различий между неконъюгированными и конъюгированными с FITC антителами к OX40. Эти результаты показывают, что антитела были пригодны для анализа иммуногистохимии и что конъюгация FITC не влияет на свойства связывания с тканями.

Все исследуемые антитела к OX40 демонстрировали положительное окрашивание в небольшом подмножестве, как в виде рассеянных, так и небольших кластеров мононуклеарных клеток (MNC) в лимфоидных тканях (миндалине, селезенке и тимусе) и богатых лимфоцитами тканях (толстой кишки, желудка и тонкого кишечника), а также нескольких рассеянных MNC в нескольких тканях (легкое, кожа и щитовидная железа). Основываясь на морфологии, эти положительные клетки являются прежде всего лимфоцитами.

В дополнение к окрашиванию подмножества лимфоцитов антитело OX40.6, блокирующий лиганд, проявляло сильное окрашивание в подмножествах эндотелиального/субэндотелиального матрикса и интерстициальных элементах, чаще связанных с малыми артериями и адвентицией сосуда и его окружающих соединительных тканей, практически всех исследованных тканей (фиг. 14A), а также специализированных интерстициальных тканевых элементах, таких как оболочечный интерстиций, окружающий семенной каналец в яичке. Антитело OX40.8, неблокирующий лиганд, положительно метил подобные миофиламентам структуры в мышцах сердца (фиг. 14A) и подобные мезангиальным клетки в клубочках почек. Окрашивание другим неблокирующим лигандом, то есть антителом 6E1, также выявило окрашивание в клетках сердечной мышцы, а также в нейронах и нейропилах головного мозга и мозжечка и подмножестве эпителиальных клеток канальцев в почках. В целом

окрашивание нелимфоцитов было обнаружено только тогда, когда антитела использовали в относительно высоких концентрациях (3 или 5 мкг/мл), но не в более низких концентрациях (1 мкг/мл), что указывало на низкую аффинность связывания или потенциальное нецелевое связывание.

Дальнейшее исследование других блокирующих лиганд антител, OX40.16 (фиг. 14A) и OX40.17, показало чистое окрашивание подмножества лимфоцитов без какого-либо специфического окрашивания других тканевых элементов для всех исследованных тканей. Антитело OX40.21, вариант антитела OX40.16, имело аналогичный профиль связывания, что и антитело OX40.16 (фиг. 14B). Иммуногистохимия в подобной панели нормальных тканей яванского макака показала очень похожее окрашивание у человека, демонстрируя полезность яванского макака в качестве соответствующего доклинического вида.

Пример 6: Экспрессия OX40 при злокачественных опухолях

Образцы опухолевой ткани FFPE (фиксированные в формалине заключенные в парафин) приобретали у коммерческих торговцев тканями (n = 12-20 для каждого типа опухоли). Для обнаружения связывания с тканями разработали автоматизированный анализ IHC с коммерческим антителом к OX40 человека с использованием платформы Leica BondRX. Вкратце, получение индуцированного нагреванием антигена (HIER) проводили в буфере ER2 pH9 (Leica) в течение 20 минут при 95°C. Клон моноклонального антитела мыши к OX40 человека ACT35 (BD Pharmingen) инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в течение 60 минут с последующим полимером Novolink Max (Leica) в течение 30 минут. Наконец, срезы подвергали взаимодействию с субстратом DAB-хромогенным раствором в течение 6 минут, контрастировали посредством гематоксилина Майера, обезвоживали, очищали и покрывали с помощью Permount. Белковый блок Dako использовали в качестве разбавителя для первичного антитела.

Для профилирования TIL использовали коммерчески доступные моноклональные антитела к CD3 (T-клеточный маркер) и к FoxP3 (маркер Treg) для окрашивания соседних срезов. Коммерческий мышиный IgG1 использовался в качестве отрицательного контроля, а гиперплазированную ткань миндалины человека использовали в качестве положительного контроля. После иммуноокрашивания срезы вручную оценивали под световым микроскопом.

В четырех исследованных опухолях CD3+ TIL присутствовали во всех исследованных образцах, причем количество TIL варьировало в образцах, и распределение в пределах одной и той же ткани было гетерогенным. В некоторых случаях TIL были более широко распределены в области опухоли и хозяина, как и ожидалось. Большинство TIL были локализованы в стромальной опухоли в большинстве образцов ткани. Однако во многих случаях они были легко обнаружены во внутриопухолевых гнездах. Положительное окрашивание OX40 наблюдалось в небольшой доле TIL и в основном распределялось в строме опухоли. В общем, обилие OX40+ TIL было пропорциональным таковому CD3+ TIL. Среди четырех исследованных типов опухолей OX40+ TIL были более многочисленными в HCC и CRC (фиг. 15A-15C).

Пример 7: Моноклональные антитела к OX40 человека, которые блокируют связывание OX-40L с OX-40

Несколько антител к OX40 исследовали на их способность блокировать связывание рекомбинантного растворимого OX40L с трансфицированными OX40 клетками 293 человека. Вкратце, клетки 293, стабильно трансфицированные OX40 человека, сначала предварительно инкубировали с различными концентрациями антител к OX40. Затем добавляли фиксированную концентрацию (0,2 мкг/мл) рекомбинантного растворимого меченного his OX40L человека (OX40L-His, R & D Systems) и образцы инкубировали дополнительно. После промывания клеток связанный OX40L-His обнаруживали с использованием собственного меченого APC антитела с меткой His. Интенсивность флуоресценции окрашивания измеряли с использованием проточного цитометра FACSCanto II (Becton Dickinson). Рассчитывали геометрическое среднее интенсивности флуоресценции (GMFI) окрашивания антитела APC-анти-His/OX40L-His для популяции клеток (программное обеспечение FACSDiva). Получали кривые зависимости реакции от дозы и EC_{50} для блокирования антителом связывания OX40L, рассчитанные с использованием программного обеспечения GraphPad Prism; EC_{50} представлены в таблице 12.

Таблица 12. Значения EC50 для блокирования взаимодействия OX40L/OX40, измеренного посредством FACS.

Клон антитела	EC50 (нМ)
14B6.C5.C8	1,0

3F4.G11.D2	0,54
8B11.H9.C1	0,45
18E9.G5.H4	0,48
20B3.G12.A2	0,93
20C1.F2.D1	0,34
6E1.A12.A2	*нет блокирования*
23H3.C6	0,38
OX40.4	*нет блокирования*
OX40.5	~ 1,2e+013

Как показано на фиг. 16, большинство исследуемых антител к OX40 полностью блокировали связывание растворимого OX40L человека с OX40 человека на поверхности трансфицированных клеток, за исключением 6E1, OX40.4 и OX40.5. Недостаточная блокировка OX40.5 может быть обусловлена более низкой эффективностью связывания с OX40 человека, чем с другими исследованными антителами, или связывания с перекрывающимся, но другим эпитопом. Напротив, 6E1 и OX40.4 не блокировали связывание OX-40L человека с OX40. Это отсутствие блокирования, вероятно, связано со связыванием с другим эпитопом, чем с остальными антителами.

Пример 8: Конкуренция/сортировка антител

Эксперименты по сортировке антител проводили следующим образом. Одно или несколько антител к OX40 покрывали непосредственно на чип Biacore CM5 с использованием химии связи аминов. Антитела к OX40, последовательно разведенные (1:3) от начальной концентрации 60 мкг/мл, инкубировали с 20 нМ антигена OX40-6X-His в течение по меньшей мере 1 часа. Инкубированный комплекс пропускали через связанные с антителом поверхности и наблюдали на перекрестное блокирование. Исследование повторяли с несколькими антителами на поверхности, чтобы создать карту эпитопов, основанную на взаимном перекрестном блокировании всех антител. Также покрывали поверхность OX40L, чтобы идентифицировать и сортировать антитела, которые способны блокировать взаимодействие OX40-OX40L. Эксперименты проводили на приборах SPR Biacore T200 или Biacore 3000.

Как суммировано на фиг. 17, антитела 20C1, 20B3, 8B11, 23H3, 18E9, 14B6, OX40.1 и OX40.2 представляли собой блокаторы лигандов; антитело 3F4 представляло собой частичный блокатор лигандов; а 14A2, 6E1 и OX40.5 представляли собой неблокаторы лигандов.

Пример 9: Биофизические свойства антител OX40

Аффинность нескольких антител к OX40 к растворимому OX40 человека исследовали с помощью анализа SPR. Вкратце, измерения аффинности проводили путем захвата 1-10 мкг/мл соответствующего антитела на чипе CM5, покрытом анти-человеческим CH1. Использовали антиген OX40-6XHIS человека либо в единственной концентрации 400 нМ, либо в серийном разведении 1:2 от 400 нМ. Эксперименты проводили на приборах SPR BIACORE® T200 или BIACORE® 3000. Данные приспосабливали для модели 1:1.

Как показано в таблице 13, исследуемые антитела к OX40 характеризовались константами диссоциации (KD) в диапазоне от 10^{-8} М до 10^{-9} М.

Таблица 13: Значения K_D для антител OX-40

Клон	K_D (M)	k-on (1/Mc)	k-off (1/c)
3F4	7,13 e-9	5,31 e4	3,79 e-4
8B11	1,05 e-8	4,8 e4	5,1 e-4
14B6	8,84 e-9	7,4 E4	6,54 e-4
6E1	1,1 e-8	1,28 e5	1,41 e-3
14A2	1,51 e-9	1,46 e5	2,2 e-4
18E9	2,04 e-9	6,83 E4	1,39 e-4
20B3	3,71 e-9	5,42 e4	2,01 e-4
23H3	3,6 e-9	1,1 E5	3,95 e-4
20C1	3,22 e-9	6,48 E4	2,09 e-4
OX40.21	1,49 e-9	9,41e+5	0,0014

Также исследовали термическую стабильность антитела OX40.21, результаты обобщены в таблице 14. Термическую стабильность определяли с использованием GE Healthcare CAP-DSC. Образцы прогоняли при концентрации 250 мкг/мл в PBS. Частота сканирования составляла 60°C/час. Данные приспосабливали для модели не с двумя

состояниями. Было определено, что антитело OX40.21 представляет собой одно из более стабильных исследованных антител при рассмотрении вместе с другими признаками (например, с низкими нецелевыми эффектами, иммуногенностью и т.д.).

Таблица 14:

Клон	Tm1	Tm2	Tm3	% обратимости
3F4		68	83	
8B11		72,7	82,9	
14B6		66,3	70,5	
18E9		65,8	71,2	
23H3		72,3	82,7	
20C1		68,0	83,0	
OX40.21	72,2		79,5	48% при 80°C

Также исследовали фармакокинетику антитела OX40.21 после однократного внутривенного введения яванским макакам. Антитело OX40.21 проявляло приемлемые фармакокинетические (PK) свойства после однократного внутривенного введения (IV) яванским макакам с линейной PK (0,4-4 мг/кг) и длительным периодом полужизни (6 дней).

Таблица 15: Фармакокинетические параметры OX40.1 после внутривенного введения у яванских макаков (N = 3)

Доза (мг/кг)	**AUC(INF)* (мкг/мл×день)**	**$t_{1/2}$ (день)**	**CLT (мл/ч/кг)**	**Vss (мл/кг)**
0,4	86 ± 5	5,6 ± 0,5	0,20 ± 0,01	36 ± 2
4	785 ± 138	6,2 ± 0,6	0,22 ± 0,04	49 ± 12

Параметры PK рассчитывали по некомпартментному способу. Значения представляют собой среднее значение ± SD.

* Параметры PK рассчитывали с использованием концентрации в плазме до 10 дней, кроме обезьяны 2 в дозе 0,4 мг/кг до 7 дней

* % AUCextra варьировал от 24% до 42%

Параметры PK человека для OX40.21 спроецировали из данных PK яванского макака с использованием аллометрического масштабирования (при условии, что показатель мощности = 0,85 для CLT и 1 для Vss). Проецируемый человеческий $t_{1/2}$ составлял 10 дней (таблица 16). Параметры PK рассчитывали двухкомпартментным способом.

Таблица 16: Проецированные фармакокинетические параметры OX40.21 человека

Антитело	Доза (мг/кг)	AUC(INF) (мкг/мл×день)	$t_{1/2}$ (день)	CLT (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)
OX40.21	1	303	10	0.14	47

Пример 10: Перекрестное блокирование FACS меченного PE клона антитела OX40 L106 с помощью панели немеченных антител к OX40

Несколько антител к OX40 исследовали на их способность блокировать связывание меченного PE клона антитела к OX40 L106 с трансфицированными OX40 клетками 293 человека. Вкратце, клетки 293, стабильно трансфицированные OX40 человека, сначала инкубировали с различными концентрациями немеченых антител к OX40. Затем клетки промывали и инкубировали с фиксированной концентрацией 2,5 мкг/мл меченного PE антитела L106 (BD Biosciences). Интенсивность флуоресценции окрашивания измеряли с использованием проточного цитометра FACSCanto II (Becton Dickinson). Вычисляли среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (GMFI) окрашивания антител PE-L106 для популяции клеток (программное обеспечение FACSDiva). Кривые доза-ответ для блокирования связывания L106 получали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 18, антитела 18E9 и OX40.1 полностью блокировали связывание L106 с клетками, трансфицированными OX40 человека, тогда как 20B3 проявляли частичное блокирование. Остальные антитела практически не блокировали, что указывает на то, что 18E9 и OX40.1 связываются с другим эпитопом на OX40, в отличие от других исследуемых антител.

Пример 11: Анализ перекрестного блокирования антител к OX40

Этот эксперимент проводили для проверки свойств перекрестного блокирования различных антител к OX40 для оценки специфичности связывания. Вкратце, OX40-антитело OX40.1 конъюгировали с аллоцикоцианином (APC), а человеческие OX40-антитела OX40.4 и OX40.5 биотинилировали. Панель неконъюгированных антител к OX40 человека применяли в дозе для конструированных клеточных линий 293 или HT1080, которые сверхэкспрессируют белок OX40 человека на своей поверхности, и им позволяли связываться при 4°C в течение 30 мин. Без отмывания неконъюгированного антитела, применяли APC-OX40.1 (1 мкг/мл), биотин-OX40,4 (0,4 мкг/мл) или биотин-OX40,5 (0,4 мкг/мл) к анализируемым лункам и давали возможность связываться при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали и при необходимости дополнительно инкубировали в присутствии конъюгата стрептавидин- APC в тех же условиях. После окончательной промывки клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto (BD Bioscience, San Jose, CA). Сигнал средней интенсивности флуоресценции (MFI) был пропорционален связанному конъюгированному антителу.

Как показано на фиг. 19A-19C, связывание APC-OX40.1 с клетками, сверхэкспрессирующими белок OX-40 человека, блокировалось OX40.2 и OX40.5, но лишь незначительно, если вообще блокировалось, OX40.4. Связывание APC-OX40.1 блокировалось 8B11.H9, 3F4.G11, 20B3.G2 и 14B6.C5, но не 6E1.A12 и 14A2.B9. Диаграмма наблюдаемых отношений связывания между антителами, оцененными на фиг. 19A-19C, показана на фиг. 19H.

На фиг. 19D-19E показано, что связывание биотина-OX40.4 сильно блокировалось 20B3.G2, умеренно блокировалось 20C1.F2, слабо блокировалось, если вообще блокировалось, 3F4.G11 и 23H3.C6, и не блокировалось 14A2 .B9. Связывание биотина-OX40.5 сильно блокировалось 20B3.G2, 23H3.C6 и 20C1.F2, умеренно блокировалось 3F4.G11 и слабо блокировалось 14A2.B9.

На фиг. 19F-19G показано, что связывание биотина-OX40.4 не блокировалось OX40.1 или OX40.8 и слабо блокировалось, если вообще блокировалось, OX40.5 или OX40.6. Связывание биотина-OX40.5 блокировалось OX40.1, умеренно блокировалось OX40.6 и очень слабо блокировалось, если вообще блокировалось, OX40.4 или OX40.6.

Диаграмма наблюдаемых отношений связывания между антителами, оцененная на фиг. 19D-19G, показана на фиг. 19I.

Пример 12. Антитела к OX40 связываются с конформационным эпитопом/картированием эпитопов

Этот пример показывает, что OX40.21 связывается с неденатурированным OX40 человека, но не с денатурированным OX40 человека, и это связывание не зависит от N-гликозилирования.

Связывание OX40.21 с нативным или денатурированным OX40, которое содержит N-связанное гликозилирование или нет, определяли следующим образом. Образцы нативного (т.е. неденатурированного) и денатурированного OX40 человека инкубировали с ферментом N-гликаназой PNGase F или без него для удаления N-гликозилирования. Образцы природного OX40 человека с N-связанным гликозилированием или без него подвергали электрофорезу в ДСН-геле, а образцы денатурированного OX40 человека с N-связанным гликозилирование или без него подвергали электрофорезу в денатурирующем ДСН-геле.

Как показано на фиг. 20A, OX40.21 связывается только с природным OX40, а не с денатурированной формой, а наличие или отсутствие гликозилирования не влияет на связывание с OX40. На фиг. 20B и 20C показано, что два N-гликопептида идентифицировали путем пептидного картирования после дегликозилирования (60% заполняемости для AspN118 и AspN12).

Эти данные свидетельствуют о том, что OX40.21 связывается с эпитопом, который представляет собой конформационный и независимый от N-связанного гликозилирования.

Исследования картирования эпитопов также проводились с использованием масс-спектрометрии. Пептидные фрагменты меченного his OX40 человека («hOX40») получали посредством ферментативного расщепления эндопротеиназами. ЖХ-МС выполняли с использованием AB Sciex 5600 Triple-TOF.

Как показано на фиг. 20D и 20E, эксперименты по связыванию с нативным hOX40 с помощью ограниченного протеолиза показали, что OX40.16 и OX40.21 связывались преимущественно с пептидом DVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 178), который соответствует аминокислотам 46-62 внеклеточной части зрелого OX-40 человека (SEQ ID NO: 2). Антитело OX40.8 связывалось с пептидом DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK (SEQ ID NO: 179), который соответствует аминокислотам 89-124 внеклеточной части зрелого OX40 человека (SEQ ID NO: 2). Расположение эпитопа, связанного OX40.21, перекрывает часть сайта связывания лиганда OX40, как определено посредством кристаллической структуры комплекса OX40/OX40L человека (идентификационный код 2HEV банка белковых структур (PDB)). Дополнительные пептиды, идентифицированные способом масс-

спектрометрии для OX40.21, показаны на верхней панели на фиг. 20E и включают в себя QLCTATQDTVCR (SEQ ID NO: 184), SQNTVCRPCGPGFYN (SEQ ID NO: 185), SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 182) и PCKPCTWCNLR (SEQ ID NO: 183).

Пример 13: Антитела к OX-40 способствуют пролиферации Т-клеток и индуцируют секрецию IFN-γ и IL-2 из Т-клеток

Антитела к OX-40 исследовали на их способность индуцировать активность Т-клеток *in vitro* путем измерения пролиферации и количества IL-2 и IFN-γ, выделенных Т-клетками, инкубированными с антителами.

Трансфицированную клеточную линию CHO получали для применения в качестве искусственных антигенпрезентирующих клеток в первичном анализе активации Т-клеток. Клеточная линия CHO-CD3-CD32A экспрессирует антитело к CD3 человека в одноцепочечном Fv-формате вместе с рецептором Fc CD32A человека для презентации антитела к OX40 на поверхности клеток CHO. Вкратце, первичные CD4 Т-клетки человека выделяли путем отрицательной селекции (RosetteSepTM, StemCell Technologies) и совместно культивировали с облученными клетками CHO-CD3-CD32A при соотношении T:CHO 8:1 в присутствии градуированных доз антител к OX40 или изотипического контрольного антитела. Через 3-4 дня в культуре при 37°C собирали супернатанты для оценки активации Т-клеток посредством измерения секретируемого человеческого IFNγ либо с помощью ELISA (BD Biosciences), либо способом HTRF (Cisbio), следуя рекомендациям производителей. Затем добавляли тритированный тимидин в течение окончательных приблизительно 18 часов культивирования для измерения пролиферации Т-клеток путем включения тритированного тимидина в качестве дополнительной оценки активации Т-клеток.

Как показано на фиг. 21A-21D и 22A-22D (и суммировано в таблице 17 ниже), большинство исследуемых антител к OX40 сильно потенцировали активацию CD4 Т-клеток человека, стимулированных клетками CHO-CD3-CD32, дозозависимым образом, что измерено посредством пролиферации и секреции IFNγ. Панель антител, исследованных в этом анализе, костимулировала активацию Т-клеток по меньшей мере так же или даже лучше, чем OX40.1, OX40.4 и OX40.5.

Таблица 17.

Название	EC_{50} (нМ) пролиферации (среднее± SD)	n	IFNγ EC_{50} (нМ) (среднее ± SD)	n
3F4	0,016 ± 0,008	5		
8B11	0,022 ± 0,027	3		
18E9	0,010 ± 0,005	3		
20B3	0,008 ± 0,003	3		
20C1	0,008 ± 0,006	4		
23H3	0,028 ± 0,017	3		
6E1	0,014 ± 0,008	2		
14A2	0,037 ± 0,044	4		
14B6	0,012 ± 0,008	3		
OX40.6	0,032 ± 0,028	2	0,033 ± 0,004	2
OX40.8	0,043 ± 0,037	2	0,024	1
OX40.16	0,017	1	0,044	1
OX40.17	0,009 ±	1	0,044	1
OX40.18	0,230 ±	1	0,490	1
OX40.21	0,011 ± 0,006	9	0,043 ± 0,023	9
OX40.1	0,024 ± 0,012	4		
OX40.4	0,094	1	~ 2,3 e+009	1
OX40.5	1,900	1	~ 37	1

Антитела к OX40 человека также исследовали на их воздействие на стимуляцию первичных Т-клеток в культурах активированных энтеротоксином B (SEB) мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC). Цельную кровь человека получали от AllCells, Inc. (Berkeley, CA) или от доноров в Bristol-Myers Squibb, Redwood City, CA под эгидой собственной программы флеботомии. PBMC выделяли путем градиентной очистки в градиенте фиколла и культивировали в течение 3 дней в культуральной среде с добавлением фиксированного субоптимального (85 нг/мл) суперантигена энтеротоксина B стафилококка (SEB; Toxin Technologies, Sarasota, FL) в присутствии градуированных доз антител OX40 или изотипических контрольных антител вместе с 2-5 мкг/мл растворимого сшивающего антитела, козьего F(ab')2 к Fcγ человека. После культивирования в течение 3 дней при 37°C супернатанты собирали для оценки активации Т-клеток с помощью анализа ELISA секретируемого IL-2 человека.

Вкратце, супернатанты культуры разбавляли 1:10 в разбавителе образца и исследовали на наличие IL-2 человека с помощью ELISA (BD Bioscience) согласно рекомендованному изготовителем протоколу. После добавления субстрата TMB аналитические планшеты считывали на ридере Spectramax 340PC с использованием программного обеспечения Softmax при длине волны 650 нм. Измеренные оптические плотности хромогенного субстрата были пропорциональны связанному детектирующему антителу.

Данные из PBMC, выделенных из разных доноров, показаны на фиг. 23A-23F. В общем, растворимый перекрестно сшитый клон 20C1.F2 вызывал более устойчивый ответ цитокинов (EC50 1,3 - 2,0 нМ) по сравнению с растворимыми перекрестно сшитыми клонами 23H3.C6, 8B11.H9, 3F4.G11, 18E9.G5, 6E1.A12 и 20B3.G2 (фиг. 23A-23C). Что касается антител с мутациями вариабельной области, то, как правило, OX-40.21 вызывал более устойчивый ответ цитокинов по сравнению с растворимыми перекрестно сшитыми антителами OX-40.17, OX40.18, OX40.6 и OX40.8 (фиг. 23D-23F). Данные от этих доноров вместе с данными от 8 дополнительных доноров, в которых исследовали дополнительные антитела к OX40, в совокупности демонстрируют, что в среднем OX40.21 проявляет превосходную эффективность в повышении ответов T-клеток по сравнению с OX40.1, OX40.2, OX40.4, OX40.5, OX40.17 и OX40.18. Эти результаты еще раз показывают, что OX40.21 вызывает ответы, которые сопоставимы с ответами, вызванными OX40.6 и OX40.8 (таблица 18).

Таблица 18:

№ донора		OX40.21	OX40.17	OX40.18	OX40.6	OX40.8				
BMS-009	EC50 (нМ)	0.34	0.97	3.21	0.45	0.50				
BMS-012	EC50 (нМ)	0.29	1.74	~1.67	0.66	0.09				
BMS-016	EC50 (нМ)	0.04	1.40	>100	0.29	0.09				
№ донора		OX40.21	OX40.17	OX40.18	OX40.6	OX40.8	OX40.1	OX40.2	OX40.4	OX40.5
WB10024	EC50 (нМ)	0.82	1.06	~3.17	~0.42	~0.44	1.87	2.53	1.25	~1.83
WB10025	EC50 (нМ)	1.31	1.35	~1.14	~0.85	0.79	2.08	~3.26	1.08	3.07
WB10026	EC50 (нМ)	0.79	1.68	3.02	0.28	0.63	2.24	3.16	1.14	2.59
WB10027	EC50 (нМ)	1.08	1.15	~3.27	0.45	~0.46	1.26	2.26	0.93	~3.09
№ донора		OX40.21	OX40.17	OX40.18	OX40.6	OX40.8	OX40.1	OX40.2	OX40.4	OX40.5
WB10137	EC50 (нМ)	0.56	0.92	>100	0.56	0.42	~1.824	>100	1.37	>100
BMS-001	EC50 (нМ)	0.41	0.41	~84.76	0.49	~0.42	0.64	4.95	~0.89	~0.43
BMS-004	EC50 (нМ)	~0.84	1.03	2.43	0.48	0.55	2.52	13.89	0.84	1.94
BMS-015	EC50 (нМ)	0.76	1.16	>100	~0.46	~0.42	2.41	>100	0.91	1.92
Среднее EC50 (нМ)		0.64	1.17	2.89	0.46	0.44	1.86	5.36	1.07	2.38

* Каждый набор экспериментов выполнялся в разные дни.

Пример 14: Содействие антитела к OX40 опосредованному NK92 клеточному лизису с использованием клеточных линий

Несколько антител к OX40 человека исследовали на их способность содействовать опосредованному NK92 лизису активированных $CD4^+$ Т-клеток с использованием высвобождения кальцеина в качестве считывания. Вкратце, $CD4^+$ Т-клетки для использования в качестве клеток-мишеней отделяли отрицательной селекцией с использованием магнитных гранул и активировали в течение 72 часов с помощью гранул, покрытых анти-CD3 и анти-CD28. Через три дня клетки NK92 высевали с меченными кальцеином AM активированными $CD4^+$ клетками в соотношении 5 к 1. Затем добавляли титрование каждого антитела к OX40 и клетки инкубировали в течение двух часов. Выделение кальцеина измеряли, считывая интенсивность флуоресценции среды с использованием планшетного ридера Envision (Perkin Elmer). Процент антителозависимого клеточного лизиса рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI) по следующей формуле: [(исследуемая MFI - средний фон)/(средний максимум - средний фон)] × 100.

Как показано на фиг. 24, OX40.8 и OX40.16 вызывали наибольшее количество специфического лизиса клеток-мишеней (соответственно 60% и 30%). EC_{50} OX40.8 составлял 16 нг/мл, а для OX40.16 - 4 нг/мл. Все другие исследуемые антитела вызывали ADCC на уровнях, слишком низких для точного количественного определения.

Пример 15: Содействие антитела к OX40 опосредованному NK клеточному лизису первичных CD4+ Т-клеток человека

Несколько антител к OX40 человека исследовали на их способность содействовать первичному опосредованному NK лизису активированных $CD4^+$ Т-клеток. Вкратце, $CD4^+$ Т-клетки для применения в качестве клеток-мишеней отделяли от PBMC от двух доноров магнитной селекцией и активировали в течение 72 часов с помощью гранул, покрытых анти-CD3 и анти-CD28. NK-клетки для применения в качестве эффекторов отделяли от отдельного донора отрицательной селекцией с использованием магнитных гранул и активировали IL-2 в течение 24 часов. После периода активации NK эффекторные клетки смешивали с меченными кальцеином целевыми Т-клетками в соотношении 20:1, 10:1 или 5:1 в присутствии антитела в концентрации 1 мкг/мл в течение 2 часов. Уровень кальцеина, выделяемого лизированными клетками-мишенями, измеряли, считывая интенсивность флуоресценции среды с использованием планшетного ридера Envision (Perkin Elmer).

Процент антителозависимого клеточного лизиса рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI) по следующей формуле: [(исследуемая MFI - средний фон)/(средний максимум - средний фон)] × 100.

Как показано на фиг. 25A и 25B, активированные целевые CD4+ Т-клетки от двух доноров наиболее эффективно лизировали с помощью OX40.8. Более низкие уровни активности ADCC наблюдались как с OX40.21, так и с OX40.1.

Пример 16: Содействие антитела к OX40 опосредованному макрофагами клеточному фагоцитозу экспрессирующих OX40 клеток HEK293

Чтобы определить опосредованную антителом фагоцитарную активность нескольких антител к OX40, первичные макрофаги человека культивировали в течение четырех часов с меченными CellTrace Violet клетками HEK293/OX40 и титрованием антител к OX40. Через четыре часа клетки собирали, окрашивали анти-CD64-APC и прогоняли на проточном цитометре. Клетки, которые были двойными положительными на CD64 и CellTrace Violet, считались фагоцитированными. Процент фагоцитированных целевых клеток рассчитывали по формуле: 100 x (количество двойных положительных клеток/общее количество положительных в отношении CellTrace Violet клеток).

Как показано на фиг. 26, все исследуемые антитела к OX40 индуцировали фагоцитоз экспрессирующих OX40 клеток-мишеней дозозависимым образом. OX40.8 характеризовался самым высоким общим уровнем фагоцитоза и самой низкой концентрацией EC_{50} 6,2 нг/мл. Это демонстрирует, что человеческие IgG1 антитела к OX40 индуцируют опосредованный FcR фагоцитоз дозозависимым образом.

Пример 17: Антитела к OX40 связывают компонент C1q комплемента человека

Колориметрический анализ ELISA разработали для оценки того, связывается ли компонент C1q комплемента сыворотки человека с антителом OX40.21. Планшет для иммуноанализа с высоким связыванием покрывали всеми исследуемыми антителами в концентрации 10 мкг/мл. После блокирования незанятых сайтов связывания белка в лунки добавляли градуированные дозы C1q человека (3,125-200 мкМ), включая в себя блокированные пустые лунки, которые служили контрольной группой для неспецифического фонового связывания C1q с аналитическим планшетом. Связывание C1q с иммобилизованными антителами обнаруживали с использованием комбинации биотинилированного мышиного антитела к C1q и стрептавидина-поли-HRP вместе с

тетраметилбензидиновым субстратом. Результаты представлены в виде оптической плотности, считываемой при 450 нм - 630 нм.

Как показано на фиг. 27, C1q связывался с OX40.21 (закрашенные квадраты) и изотипическим контролем IgG1 человека (незакрашенные круги) зависимым от дозы образом. Однако уровень связывания C1q с OX40.21 был ниже, чем с антителом изотипического контроля IgG1. Как и ожидалось, наблюдался незначительный фоновый сигнал (серые круги) и отсутствие явного связывания C1q с изотипическим контролем IgG1.1 (закрашенные черные круги). Антитело IgG1.1 содержит пять мутаций в части Fc, предназначенных для устранения связывания C1q и взаимодействия FcR. Этот результат демонстрирует, что компонент C1q комплемента сыворотки человека может связываться с OX40.21 и указывает на то, что OX40.21 может индуцировать опосредованный комплементом лизис экспрессирующих OX40 клеток *in vivo*.

Пример 18: OX40 экспрессируется в инфильтрующих опухоли лимфоцитах

OX-40 экспрессируется в инфильтрующих опухоли лимфоцитах с профилем, который, как правило, ограничен клетками CD4+ (фиг. 28A) с минимальной экспрессией на CD8+ Т-клетках (фиг. 28B) при злокачественной опухоли толстой и прямой кишок, легкого и яичника (фиг. 28C).

Аналогично, OX40 экспрессируется CD4+ Т-клетками и Treg в опухолях Sa1N мышей (фиг. 28D) и опухолях MC38 мышей (фиг. 28E). Чтобы проверить экспрессию OX-40 мыши в опухолях, $2x10^6$ клеток саркомы SA1N или $2x10^6$ клеток MC38 имплантировали подкожно в мышей AJ или B6, соответственно. На 15-й день после имплантации опухоли собирали, диссоциировали в одноклеточные суспензии и окрашивали для проточной цитометрии. Т-клеточные популяции идентифицировали на основании их экспрессии CD8, CD4 и Foxp3. Для опухолей Sa1N клетки CD4+ Foxp3+ из опухоли показаны на красной гистограмме, клетки CD4+ Foxp4- показаны на синей гистограмме, а клетки CD8+ показаны на оранжевой гистограмме (фиг. 28D). Окрашенные изотипическим контролем клетки показаны на зеленой гистограмме. Для опухолей MC38 Treg показаны на синей гистограмме, клетки CD4+ показаны на зеленой гистограмме и клетки CD8+ показаны на красной гистограмме (фиг. 28E).

Пример 19: Отмена антителами к OX40 опосредованного клетками Treg подавления

Несколько антител к OX40 человека исследовали на их способность отменять опосредованное регуляторными Т-клетками (Treg) подавление пролиферации $CD4^+$ Т-клеток человека. Вкратце, клетки Treg и иммунореактивные Т-клетки (Tresp) выделяли путем обогащения PBMC $CD4^+$ клетками посредством сепарации магнитными гранулами, а затем сортировкой клеток $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ Treg и $CD4^+CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RO^+$ Tresp. Затем клетки Tresp метили красителями на пролиферацию и покрывали титровальными количествами клеток Treg, начиная с соотношения 1:1. Культуры стимулировали 3 мкг/мл связанного с планшетом антитела к CD3, 1 мкг/мл растворимого антитела к CD28 и 2 мкг/мл связанного с планшетом антитела к OX40 или изотипическим контролем. Через 96 часов измеряли пролиферацию клеток Tresp путем оценки разбавления красителя с использованием проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 29, как в присутствии, так и в отсутствии клеток Treg антитела к OX40 увеличивали пролиферацию клеток Tresp по сравнению с изотипическим контролем. Это говорит о том, что исследуемые антитела к OX40 меняют супрессивные эффекты клеток Treg на пролиферацию клеток Tresp.

Пример 20: Исследования токсичности

OX40.6 (2 мг/кг) вводили внутривенно обезьянам в дни 1 (фиг. 30A) и 29 (фиг. 30B) для оценки любых связанных токсических эффектов. Не было обнаружено никаких признаков нарушений переносимости или клинической патологии. OX40.6 стимулировал усиленный иммунный ответ на KLH, что характеризовалось тенденцией к усилению экспрессии CD69 в CD4+ Т-клетках в анализе вторичного иммунного ответа KLH ex vivo. Две из четырех обезьян демонстрировали ускоренное очищение, что коррелировало с образованием антител к лекарственным средствам.

Концентрацию OX40,6 в образцах сыворотки яванских макаков для эксперимента выше анализировали с помощью иммуноферментного анализа хемилюминесценции (CL). Антитело OX40.6 применяли для получения калибраторов и образцов контроля качества (QC). Биотинилированный OX40-his человека иммобилизовали на покрытых стрептавидином микропланшетах (Greiner Bio-one) в качестве молекулы захвата для OX40.6. Образцы, стандарты и образцы контроля качества, доведенные до значения конечной матрицы 10% сыворотки яванского макака, инкубировали на планшетах. Образцы анализировали при минимальном требуемом разбавлении 10% в 1% BSA/PBS/0,05% Tween 20 (PTB), содержащем 2% мышиной сыворотки. Несвязанный

материал отмывали, и фиксированное антитело к OX40.6 обнаруживали с использованием меченного HRP мышиного моноклонального антитела к IgG человека, в качестве молекулы обнаружения. После добавления хемилюминесцентного субстрата SuperSignal ELISA Pico (Thermo Scientific) концентрацию OX40.6 в образцах сыворотки яванского макака рассчитывали по интенсивности люминесценции, измеренной с помощью планшетного ридера M5 с использованием 4-параметрической логистической (4-PL) калибровочной кривой, полученной из калибраторов антител OX40.6. Диапазон калибровочной кривой антитела OX40.6 составлял от 5 до 5000 нг/мл в сыворотке яванского макака. Верхний и нижний пределы количественной оценки составляли 5000 и 10 нг/мл, соответственно (то есть ULOQ 5000 нг/мл, LLOQ 10 нг/мл). Образцы контроля качества готовили в концентрации 3750, 400 и 20 нг/мл в сыворотке яванских макаков и анализировали на каждом планшете для обеспечения приемлемых результатов анализа. Калибраторы, QC и образцы разбавляли в 5 раз в PTB, содержащем 2% сыворотку мыши. Для анализа образцов использовали четыре планшета со стрептавидином. Производительность анализа была в приемлемом диапазоне: % CV между планшетами стандартов был ниже 25%, а восстановление QC составляло ± 30% номинальных значений.

Наличие антител к лекарственным средствам к OX40.6 в сыворотке яванского макака в описанном выше эксперименте определяли с помощью мостикового иммуноанализа электрохемилюминесценции (ECL). В частности, для получения положительного контроля использовали мышиное моноклональное антитело к Fc IgG человека. Биотинилированное антитело к OX40:к hOX40-his использовали в концентрации 25 нг/мл в качестве молекулы захвата, а рутенилированное антитело к OX40: к hOX40-his использовали в концентрации 25 нг/мл в качестве молекулы обнаружения. Образцы анализировали при 100-кратном разведении в смеси 1% BSA/PBS/0,05% Tween 20 (PTB), содержащей молекулы захвата и обнаружения. После 2 часов инкубации в планшетах из полипропилена смесь образцов переносили в покрытые стрептавидином MSD планшеты. После одночасовой инкубации несвязанный материал отмывали, добавляли буфер считывания MSD и измеряли ECL с помощью планшетного ридера MSD SI6000. Положительный контроль (мышиное антитело к Fc IgG человека) готовили в концентрации 1000 (HPC), 100 (MPC) и 10 нг/мл (LPC) в сыворотке яванского макака. Объединенную сыворотку яванского макака использовали как отрицательный контроль (NC). Отношение сигналов для HPC, MPC и LPC в сравнении с NC составляло 102, 10 и 2, соответственно. Для анализа образцов использовали один планшет со

стрептавидином. Производительность анализа была в пределах допустимого диапазона: % CV PC был ниже 10%, а необработанный сигнал для отрицательного контроля (54 RLU) был сопоставим с необработанным сигналом для образцов до воздействия (48-55 RLU).

Пример 21: Исследование оценки риска иммуногенности

Анализы пролиферации Т-клеток *in vitro* проводили для нескольких антител к OX40 человека для оценки их потенциальной иммуногенности для человека. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от здоровых добровольцев выделяли с помощью фиколла (GE Healthcare) и градиентного центрифугирования, а класс II лимфоцитов человека (HLA) характеризовали посредством амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации с олигонуклеотидными зондами (ProImmune).

Для проведения анализа использовали панель из 40 доноров PBMC, имеющих типы HLA класса II, которые были близки к частотам мировых популяций. PBMC метили с помощью CFSE (Invitrogen) для контроля пролиферации и высевали на 96-луночные планшеты в 6 повторах в количестве 200000 клеток на лунку в RPMI (Lonzo), содержащем 10% AB человека (Bioreclamation), незаменимые аминокислоты (Gibco) пенициллин-стептомицин (Gibco). Антитела к OX40 человека, контрольные белки, контрольные антитела и ConA культивировали с PBMC в концентрации 1 мкМ в течение 7 дней, после чего среду отмывали и клетки метили моноклональным антителом APC к CD4 человека (BD science). После удаления несвязанного антитела к CD4 со стадией промывки клетки фиксировали формалином в концентрации 3,7% (Sigma) в PBS и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения процента пролиферирующих CD4+ клеток.

Процент 40 доноров, которые показали положительный ответ (определяемый как значительное увеличение пролиферирующих CD4+ Т-клеток по сравнению с инкубированными в среде PBMC) для различных антител к OX40 человека, показан на фиг. 31. Все варианты антител к OX40 человека показали низкий потенциал для активации CD4+ клеток в этом анализе, сравнимый с низким белком QC, за исключением OX40.16 и OX40.21, который не показал положительного ответа на пролиферацию CD4 у любого из 40 доноров. Эти результаты свидетельствуют о том, что эти антитела к OX40 человека характеризуются низким потенциалом в отношении индукции ответа антител к лекарственным средствам у людей.

Пример 22. Связывание с активированными рецепторами Fc повышает анти-mOX40 активность в модели карциномы толстой кишки

Чтобы исследовать роль связывания FcR в активности антител к OX40 мыши в моделях опухолей мыши, исследовали антитела к OX40 разных изотипов. Мышам C57BL/6 подкожно вводили 2 миллиона опухолевых клеток MC38. Через 7 дней определяли объемы опухолей и мышей рандомизировали в группы лечения, чтобы иметь сопоставимые средние объемы опухолей. Антитела, составленные в PBS, вводили внутрибрюшинно на 7, 10 и 14 дни в количестве 200 мкг на дозу в объеме 200 мкл.

В синергичных мышиных опухолевых моделях моноклональные антитела к OX40 мыши (например, OX86, IgG1 крысы) проявляют противоопухолевую активность. Поскольку варьирование изотипа многих антител, специфичных к рецепторам поверхности Т-клеток (как костимулирующим, так и коингибирующим), может изменять противоопухолевую активность этих антител, варианты изотипа Fc мыши OX86, получали антитело, которое не блокирует взаимодействие OX40/OX40L. Как показано на фиг. 32A-32C, OX86, отформатированный как Fc IgG2a мыши (фиг. 32C), обеспечивает превосходную противоопухолевую активность по сравнению с OX86, отформатированным в виде IgG1 мыши (фиг. 32B). Это, вероятно, связано как с истощением клеток Treg в опухолевом сайте, так и с увеличением количества эффекторных Т-клеток из опосредованного антителом агонизма OX40.

Для подтверждения влияния различных изотипов антител на популяции инфильтрирующих опухоль Т-клеток, опухоли от мышей MC38, которые были обработаны различными изотипами, оценивали с помощью проточной цитометрии. Отобранных мышей умерщвляли, а опухоли и селезенки собирали для анализа на 15-й день после имплантации опухоли. Одноклеточные суспензии получали путем диссоциации опухоли и лимфатического узла задней частью шприца в 24-луночном планшете. Клеточные суспензии пропускали через фильтры размером 70 мкм, гранулировали, ресуспендировали и подсчитывали. Клетки затем помещали в 96-луночные планшеты с количеством клеток $1x10^6$ на лунку для окрашивания. Затем образцы анализировали на проточном цитометре FACS Canto (BD). Анализ селезенок и опухолей несущих опухоли мышей, обработанных антителами к OX40, показывает, что изотип IgG2a может истощать CD4+ Treg в опухолях (фиг. 33A) и что изотипы IgG1 и IgG2a могут активировать увеличение количества Т-клеток на периферии (фиг. 33B) и приводить к увеличению числа клеток в селезенке (фиг. 33C). Эти результаты

показывают, что агонизм OX40 (но не обязательно блокирование взаимодействия OX40/OX40L) и связывание Fc-рецептора антитела OX86 способствует противоопухолевой активности.

Роль Fc и FcR человека исследовали с использованием мышей, где мышиные FcR подвергали нокдауну и заменяли человеческими FcR. Эти эксперименты проводили с использованием системы химера костного мозга, в которой были облучены конгенные CD45.1 хозяина, затем восстановлены с помощью FcR трансгенных клеток костного мозга человека. Этим мышам затем позволяли восстанавливаться в течение 8 недель перед инокулированием опухолевых клеток MC38 в количестве $2x10^6$. Через 7 дней определяли объемы опухолей и мышей рандомизировали в группы лечения, чтобы иметь сопоставимые средние объемы опухолей. Антитела, составленные в PBS, вводили внутрибрюшинно на 7, 10 и 14 дни в количестве 200 мкг на дозу в объеме 200 мкл. Мышей обрабатывали либо контрольным человеческим IgG1 (фиг. 34A), либо химерным гибридным антителом G1 человека OX-86 (фиг. 34B), либо гибридом G1 человека OX-86 с мутацией S267E (фиг. 34C). Результаты были схожи с тем, что было обнаружено с помощью изотипов мыши, т.е. антитело IgG1 человека имело значительный противоопухолевый эффект, поскольку оно может связываться для активации FcR, тогда как мутация S267E, которая увеличивает связывание как с CD32B, так и с CD32A, имеет более высокую активность (фиг. 34A-34C). Этот более высокий уровень активности, вероятно, обусловлен усиленным агонизмом на эффекторных Т-клетках, а также усиленным истощением Treg в опухолевом сайте.

Т-клеточные популяции в опухолевом сайте и селезенках несущих опухоли мышей исследовали, как описано ранее. Treg в меньшей степени превалировали у мышей, обработанных либо антителом G1, либо G1 S267E, с большим эффектом, наблюдаемым с изотипом S267E (фиг. 35A). Было также очевидным увеличение процентного содержания CD8+ Т-клеток (фиг. 35B) и эффектора CD4+ (фиг. 35C) и в опухолевом сайте, и эти увеличения были выше с антителом G1 S267E. Также отмечалась повышенная клеточность в селезенках мышей, обработанных антителами к OX-40 (фиг. 35D). Эти результаты показывают, что антитело OX86-hIgG1 проявляло сильную противоопухолевую активность (фиг. 34A-34C) и измеряемое истощение Treg (фиг. 35A-35D).

Пример 23: Блокирующее антитело к OX40 проявляет противоопухолевую активность в опухолевой модели мыши

Проводили следующий эксперимент для определения того, проявляет ли антитело, которое блокирует взаимодействие между OX40/OX40L, сильную противоопухолевую активность. С этой целью получали антитело хомячка к OX40 мыши, которое блокирует взаимодействие OX40/OX40L (антитело хомячка IgG1 8E5) и исследовали на его противоопухолевую активность в модели подкожной опухоли CT-26 мыши. CT-26 представляет собой клеточную линию опухоли аденокарциномы толстой кишки мыши, рост солидной опухоли которой можно контролировать у мышей BALB/c, когда клетки трансплантируются подкожно.

Самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) акклиматизировали в течение как минимум трех дней до начала исследований. Мышей размещали по 5 животных на клетку, а клетки помещали в вентилируемый микроизолятор. Животных содержали при температуре в пределах 18-26°C и относительной влажности 50 + 20% по меньшей мере с двенадцатью проветриваниями в час. Сохраняли 12-часовой цикл смены дня/ночи. Животные получали санированную диету лабораторных грызунов и муниципальную воду без ограничений.

Клетки CT-26 поддерживали в среде RPMI-1640 (Hyclone, № в каталоге SH30096.01), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Hyclone, № в каталоге SH30071.03). Приблизительно два раза в неделю клетки, содержащиеся в одной колбе T175, разделяли и разводили до четырех колб T175 при разведении 1:5 до тех пор, пока не было получено достаточное количество клеток для имплантации опухоли. Клетки собирали при приблизительно 80% конфлюэнтности, промывали и ресуспендировали в PBS.

В день 0 мышам имплантировали 1×10^6 клеток CT-26 с использованием шприца объемом 1 куб.см (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и иглы калибра 27 длиной 5/8 дюйма. Затем опухоли измеряли два раза в неделю в трех измерениях с помощью электронного калипера (Mitutoyo, Aurora, Illinois) и записывали. Объемы опухолей ($мм^3$) рассчитывали по формуле: ширина x длина x высота x 0,5. После измерения объема опухоли на 6-й день после имплантации мышей классифицировали по стадиям в соответствии с объемом опухоли. Мышей со средним объемом опухоли 26 $мм^3$ рандомизированы на группы и подвергали лечению, как показано в таблице 19.

Антитело изотипического контроля хомячка представляет собой инертное моноклональное антитело IgG (mAb) армянского хомячка к GST (клон PIP, № в каталоге BE0260, BioXcell, Западный Ливан, NH). Его готовили в PBS непосредственно перед

введением для обеспечения дозы 10 мг/кг на мышь с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции в дни 6, 10 и 14, как показано в таблице 19.

Моноклональное антитело к OX40 мыши (клон 8E5) готовили в PBS непосредственно перед введением для получения доз 10, 3, 1 или 0,3 мг/кг на мышь с помощью внутрибрюшинной инъекции в дни 6, 10 и 13, как показано в таблице 19.

Таблица 19:

Воздействие	**Доза**	**Кол-во**	**Путь**	**График введений**
Изотипический контроль моноклонального антитела IgG хомячка	10 мг/кг	12	IP	Дни 6, 10, 14
Моноклональное антитело хомячка к OX40 мыши (клон 8E5)	10 мг/кг	12	IP	Дни 6, 10, 14
Моноклональное антитело хомячка к OX40 мыши (клон 8E5)	3 мг/кг	12	IP	Дни 6, 10, 14
Моноклональное антитело хомячка к OX40 мыши (клон 8E5)	1 мг/кг	12	IP	Дни 6, 10, 14
Моноклональное антитело хомячка к OX40 мыши (клон 8E5)	0.3 мг/кг	12	IP	Дни 6, 10, 14

Животных ежедневно проверяли на наличие постуральных, гигиенических и респираторных изменений, а также на летаргии. Животных взвешивали два раза в неделю и умерщвляли, если потеря веса составляла $\geq$ 20%. Мышей проверяли на наличие и размер опухолей два раза в неделю до смерти или эвтаназии. Опухоли измеряли в трех измерениях с помощью электронного калипера (Mitutoyo, Aurora, Illinois) и записывали. Реакцию на соединения для лечения измеряли в зависимости от роста опухоли. Если опухоль достигала объема $\geq$ 1500 мм^3 или появлялось изъязвление, животных подвергали эвтаназии.

Как показано на фиг. 36A-36E, моноклональное антитело хомячка к OX40 мыши (клон 8E5, фиг. 36B-36E, на которых показано воздействие различными дозами 8E5) продемонстрировало мощную противоопухолевую активность в подкожной модели CT-26 по сравнению с контрольной группой изотипа IgG хомячка (фиг. 36A). Антитело 8E5 вводили в дозах в диапазоне от 0,3 до 10 мг/кг и даже при самой низкой дозе (0,3 мг/кг)

10 из 12 мышей были без опухолей (TF) в конце периода исследования (день 72). Несмотря на то, что количество мышей без опухолей существенно не различалось в каждой дозовой группе, причем в каждой группе было 9 или 10 мышей без опухолей к концу периода исследования, у мышей, получавших одну из двух самых высоких доз (3 или 10 мг/кг) была показана большая задержка роста опухоли по сравнению с мышами, получавшими две самые низкие дозы (0,3 или 1 мг/кг). В группе, получавшей изотипический контроль, не было мышей без опухолей; всех мышей в этой группе умерщвляли к 39-му дню в результате изъязвления или опухолевой нагрузки (> 1500 $мм^3$).

Эти данные показывают, что антитело к OX40, которое блокирует взаимодействие между OX40 и OX40-L, демонстрирует сильную противоопухолевую активность в мышиной модели подкожной опухоли CT-26 при введении мышам с установленными опухолями.

Пример 24. Агонизм OX40 действует синергически с блокадой PD-1 в мышиной модели карциномы толстой кишки MC38

Чтобы проверить синергическое действие между воздействиями антитела к OX-40 и антитела к PD-1, комбинации этих антител исследовали в модели опухоли MC38 мыши. Мышам C57BL/6 подкожно вводили 2 миллиона опухолевых клеток MC38. Через 7 дней определяли объемы опухолей, и мышей рандомизировали в группы лечения, чтобы иметь сопоставимые средние объемы опухолей. Антитела, составленные в PBS, вводили внутрибрюшинно на 7, 10 и 14 дни в количестве 200 мкг на дозу в объеме 200 мкл.

Как показано на фиг. 37A-37D, как антитело к PD-1 (фиг. 37B), так и антитело к OX40 (фиг. 37C) показали минимальную активность при использовании отдельно, но имели значительную противоопухолевую активность при комбинировании (фиг. 37D), при этом 5 из 8 мышей были без опухоли.

Пример 25: Агонизм OX40 усиливает ответ на вакцины у яванских макаков

Измеряли усиление иммунных ответов на вакцины для оценки способности антитела OX40.6 стимулировать иммунные реакции у яванских макаков. Этот подход был выбран потому, что желаемый эффект, т.е. усиление иммунных ответов на опухоли, нельзя оценивать у здоровых нечеловекообразных приматов, поскольку они не содержат опухоли.

Обезьян иммунизировали гемоцианином фисуреллы (KLH) в 1-й день (10 мг, внутримышечно) и поверхностным антигеном вируса гепатита B (HBsAg) (ENGERIX-B) (20 мкг внутримышечно в 1 и 29 дни). После введения вакцин обезьянам вводили внутривенно 0 или 2 мг/кг антитела OX40.6 в дни 1 и 29. Иммунные ответы измеряли в дни 22 и 41 посредством ответа Т-клеток *ex vivo* на KLH и ответов зависимых от Т-клеток антител на KLH и HBsAg. Как показано на фиг. 38A и 38B, связанные с OX40.6 результаты в дозе 2 мг/кг в дни 22 (фиг. 38A) и 41 (фиг. 38B) включали в себя усиление вторичного ответа *ex vivo* на KLH, характеризующееся увеличением среднего процента CD69+, IFN-гамма+ и TNF-α+, экспрессирующих CD4+ CD8- Т-клетки.

Пример 26: Связывание Fc-рецептора для антител со сконструированными константными доменами

Этот пример демонстрирует, что антитела с модифицированными константными области тяжелой цепи, содержащие CH1 и шарнир IgG2, связываются с FcγR, когда они содержат домены CH2 и CH3 IgG1.

В дополнение к связыванию антигена с помощью вариабельных доменов антитела могут взаимодействовать с рецепторами Fc-гамма (FcgR) посредством взаимодействия с константными доменами. Эти взаимодействия опосредуют эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Эффективность функциональной активности высока для изотипа IgG1, но очень низкая или отсутствует для IgG2 и IgG4 из-за этих изотипов, характеризующихся низкой аффинностью к FcgR. Кроме того, эффекторная функция IgG1 может быть модифицирована путем мутации аминокислотных остатков в константных областях для изменения аффинности и селективности FcgR.

Связывание антител с рецепторами Fc-гамма (FcγR или FcgR) изучали с использованием биосенсорных технологий, включающих в себя поверхностный плазмонный резонанс Biacore (SPR) и интерферометрию Fortebio Biolayer (BLI). Исследования SPR проводили на приборе Biacore T100 (GE Healthcare) при температуре 25°C. Фрагмент Fab из мышиного антитела к 6xHis иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с использованием EDC/NHS с плотностью ~ 3000 RU. Различные меченные his FcgR (7 мкг/мл) захватывали с помощью C-концевой метки his с использованием времени контакта 30 с при 10 мкл/мин, и связывание 1,0 мкМ антитела оценивали в рабочем буфере 10 мМ NaPO4, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T), pH 7,1. Используемые для этих экспериментов FcgR включали в себя CD64 (FcgRI), CD32a-H131 (FcgRIIa-

H131), CD32a-R131 (FcgRIIa-R131), CD32b (FcgRIIb), CD16a-V158 (FcgRIIIa-V158), CD16b-NA1 (FcgRIIIb-NA1) и CD16B-NA2 (FcgRIIIb-NA2). Эксперименты BLI проводили на инструменте RED Fortebio Octet (Pall, Fortebio) при 25°C в 10 мМ NaPO4, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T), pH 7,1. Антитела захватывали из неразбавленных экспрессирующих супернатантов на покрытых белком A сенсорах с последующим связыванием 1мкМ аналитов hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 или 0,1 мкМ hCD64.

Сначала получали антитела, которые содержали модифицированные домены Fc IgG1, содержащие замены S267E (SE) и S267E/L328F (SELF), а также различные комбинации мутаций P238D, P271G, H268D, A330R, G237D, E233D, называемые V4 , V7, V8, V9 и V12. Связывание этих антител изучали с помощью SPR Biacore со сравнением с антителами IgG1f, IgG2.3 (IgG2-C219S) и IgG4.1 (IgG4-S228P), а также с антителом IgG1.1f, которое было сконструировано для уменьшения связывания со всеми FcgR. Результаты, показанные на фиг. 70, демонстрируют ожидаемые связывающие свойства FcgR для IgG1f, IgG2.3 и IgG4.1 и мутированных антител IgG1, включая в себя увеличенное связывание CD32a-H131, CD32a-R131 и CD32b для SE и SELF, а также повышенную селективность мутантов V4, V7, V8, V9 и V12 для CD32b по сравнению с CD32a-H131 и CD32a-R131 (фиг. 39).

Следующий набор конструкций использовали для создания эффекторной функции в отрицательном в отношении эффекторной функции изотипе IgG2. Для этого исследования описанные выше мутации вводили в контексте константной области IgG2.3 или гибридного IgG2.3/IgG1f, называемого IgG2.3G1-AY (таблица 20). Антитела экспрессировали в малых масштабах в виде супернатантов и исследовали на связывание с FcgR с использованием биосенсорной технологии Fortebio Octet BioLayer Interferometry. Поскольку антитела присутствовали в низкой концентрации в супернатантах, эксперимент проводили путем захвата антител из супернатантов с использованием покрытых белком A сенсоров с последующим связыванием анализируемых FcgR в растворе. Для сравнения также были включены очищенный и супернатантный контроль IgG1f, включая в себя антитела IgG1, SE, P238D, V4 и V12 дикого типа, и каждое из этих контрольных антител продемонстрировало ожидаемые связывающие свойства FcgR (фиг. 40). Антитело IgG2.3 также продемонстрировало ожидаемый профиль связывания с заметным связыванием только с CD32a-H131. Однако все мутации для введения мутаций S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D или E233D в IgG2.3 не смогли повторить аффинность FcgR соответствующих

сконструированных моноклональных антител IgG1 (фиг. 40). Напротив, конструкция IgG2.3G1-AY смогла полностью сохранить связывающие свойства FcgR IgG1 дикого типа, сохранив при этом CH1 и шарнирные области IgG2.3. Кроме того, все мутанты IgG2.3G1-AY, содержащие S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D и E233D, демонстрировали свойства связывания FcgR, сравнимые с моноклональными антителами версии IgG1, содержащие те же самые мутации (фиг. 40). Это демонстрирует успешное конструирование антител с CH1 и шарнирными областями IgG2 в сочетании с эффекторной функцией IgG1 дикого типа или мутантного IgG1.

Таблица 20: Сконструированные конструкции IgG2

Набор	**ID**	**Конструкция**	**Seq ID#**
1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	258
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S – P238D	267
	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G	268
	IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G	269
	IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R	270
	IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G,A330R	271
	IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S – S267E	272
	IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F	273
2	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f	262
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D	274
	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G	275
	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G	276
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G,A330R	277
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G,A330R	278

	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	279
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	280
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E	266
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E,L328F	281

Эту стратегию конструирования дополнительно изучали, производя другие антитела, с заданным форматом IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27), а также вариантами формы IgG2-B (IgG2,5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27), и другие гибридные антитела, содержащие различные комбинации константных доменов IgG1 и IgG2, и исследуя связывания этих антител с захваченными анти-his Fab меченными his FcgR с использованием технологии SPR Biacore. В соответствии с данными супернатанта Octet данные SPR показали, что антитела IgG2.3G1-AY и IgG2.3G1-AY-V27 обладают сравнимыми связывающими свойствами FcgR с IgG1f и IgG1f-S267E, соответственно, несмотря на то, что они содержат CH1 и шарнирные области антитела IgG2 A-формы (IgG2.3) (таблица 21). Аналогичные данные были получены с использованием антител IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27, что демонстрирует успешное конструирование антител IgG2 B-формы (содержащих мутацию C131S, называемую IgG2.5), содержащих подобные IgG1f или модифицированным IgG1f эффекторные функции. Данные для нескольких других антител с константными областями IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY или IgG2.5G1-AY-V27, но с разными вариабельными областями показывают, что эта стратегия конструирования широко применима к другим антителам, не зависимо от вариабельных доменов (таблица 21).

Таблица 21: Значения %Rmax для 1 мкМ антител, связывающихся с захваченными анти-his Fab белками FcgR-his

Моноклональное антитело	**hCD64**	**hCD32a-H131**	**hCD32a-R131**	**hCD32b**	**hCD16a-V158**	**hCD16B-NA2**
mAb8-IgG1f	80%	82%	51%	27%	51%	21%
mAb9-IgG1f	70%	33%	19%	4%	28%	10%

mAb11-IgG2.3	2%	44%	17%	5%	1%	0%
mAb6-IgG2.3	3%	66%	14%	3%	1%	0%
mAb4-IgG2.3	1%	39%	6%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.3	6%	100%	30%	4%	3%	0%
mAb12-IgG2.3	2%	39%	7%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.3	2%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb11-IgG2.5	0%	40%	13%	3%	0%	-1%
mAb7-IgG2.5	4%	72%	19%	2%	2%	0%
mAb8-IgG2.5	3%	59%	14%	3%	2%	0%
mAb10-IgG2.5	1%	29%	5%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.5	3%	75%	17%	4%	2%	0%
mAb4-IgG2.5	2%	46%	8%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.5	6%	89%	26%	5%	4%	1%
mAb12-IgG2.5	1%	36%	6%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.5	-2%	39%	4%	-2%	0%	-2%
mAb8-IgG2.3G1-AY	77%	61%	38%	10%	38%	13%
mAb10-IgG2.3G1-AY	67%	23%	14%	4%	24%	8%
mAb7-IgG2.5G1-AY	80%	73%	45%	12%	47%	19%
mAb8-IgG2.5G1-AY	77%	70%	45%	17%	48%	22%
mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84%	68%	92%	76%	26%	7%
mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78%	67%	80%	67%	24%	7%
mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69%	24%	57%	40%	12%	3%
mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81%	74%	89%	84%	32%	9%
mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77%	76%	79%	77%	33%	10%

Пример 27: Влияние антител к OX40 с модифицированными константными областями тяжелых цепей на пролиферацию Т-клеток и секрецию IFN-γ и IL-2 из Т-клеток с перекрестными сшивками или без них.

Антитела к OX40 с модифицированными областями CH1/шарнира IgG2 могут обладать способностью стимулировать активацию Т-клеток в отсутствие перекрестного сшивания и, таким образом, могут стимулировать активацию Т-клеток *in vivo* в отсутствие экспрессии или при низкой экспрессии типов клеток, экспрессирующих FcγR, и, возможно, стимулировать противоопухолевую активность в более широком диапазоне типов опухолей, чем антитела изотипа IgG1.

Альтернативно, антитела с модифицированными областями CH1/шарнира могут по-прежнему нуждаться в перекрестном сшивании, чтобы способствовать активации Т-клеток, но могут характеризоваться повышенной активностью агонистов при связывании с FcγR по сравнению с антителами изотипа IgG1 и, таким образом, быть более эффективными в стимулировании активации Т-клеток и противоопухолевой активность.

Антитела к OX40 с модифицированными константными областями тяжелых цепей, содержащими последовательности, показанные в таблице 22, производят и исследуют в отношении их влияния на пролиферацию Т-клеток и секрецию IFN-γ и IL-2 из Т-клеток с перекрестным сшиванием или без него с использованием описанных ниже анализов. Последовательности легких цепей для антител OX40.6, 40.8, 40.16 и 40.21 соответствуют SEQ ID NO: 96, 110 и 116 (как для OX40.16, так и 40.21), соответственно.

Таблица 22.

Конструкции	**SEQ ID NO**
OX40.6-Vh-hHC-IgG2.3	282
OX40.8-Vh-hHC-IgG2.3	283
OX40.16-Vh-hHC-IgG2.3	284
OX40.6-Vh-hHC-IgG2.3G1	285
OX40.8-Vh-hHC-IgG2.3G1	286
OX40.16-Vh-hHC-IgG2.3G1	287
OX40.6-Vh-hHC-IgG2.3G1-V27	288
OX40.8-Vh-hHC-IgG2.3G1-V27	289
OX40.16-Vh-hHC-IgG2.3G1-V27	290

OX40.6-Vh-hHC-IgG2.5	291
OX40.8-Vh-hHC-IgG2.5	292
OX40.16-Vh-hHC-IgG2.5	293
OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5	294
OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5G1	295
OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5G1-V27	296

Анализ CHO-CD3 +/- CD32

Антитела к OX-40 с последовательностями, показанными в таблице 22, исследовали на их способность индуцировать активность Т-клеток *in vitro* путем измерения пролиферации и количества IL-2 и IFN-γ, секретируемых Т-клетками, инкубированными с антителами.

Трансфицированные клеточные линии CHO получают для применения в качестве искусственных антигенпрезентирующих клеток в первичном анализе активации Т-клеток. Клеточная линия CHO-CD3-CD32A экспрессирует антитело к CD3 человека в одноцепочечном формате Fv вместе с Fc-рецептором (FcR) CD32A человека, чтобы представить антитела к OX40 на поверхности клеток CHO. Клеточная линия CHO-CD3 экспрессирует антитело к CD3 человека в одноцепочечном Fv-формате без FcR.

Вкратце, первичные CD4 Т-клетки человека выделяют путем отрицательной селекции (RosetteSep™, StemCell Technologies) и совместно культивируют либо с облученными клетками CHO-CD3-CD32A, либо с облученными клетками CHO-CD3 в соотношении T:CHO 8:1 в присутствии градуированных доз антител к OX40 или антитела изотипического контроля. Через 3-4 дня в культуре при 37°C собирают супернатанты для оценки активации Т-клеток посредством измерения секретируемого человеческого IFN-γ с помощью анализа либо ELISA (BD Biosciences), либо HTRF (Cisbio), следуя рекомендациям производителей. Затем добавляют тритированный тимидин для окончательного культивирования в течение приблизительно 18 часов для измерения пролиферации Т-клеток путем включения тритированного тимидина в качестве дополнительной оценки активации Т-клеток.

Анализ SEB PBMC

Антитела к OX-40 с последовательностями, показанными в таблице 22, исследовали в отношении их влияния на стимуляцию первичных Т-клеток в культурах

активированных энтеротоксином B стафилококка (SEB) мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC). Образцы человеческой цельной крови получают от AllCells, Inc. (Berkeley, CA) или от доноров в Bristol-Myers Squibb, Redwood City, CA под эгидой собственной программы флеботомии. PBMC выделяют путем градиентной очистки в градиенте плотности Ficoll-Hypaque и культивируют в течение 3 дней в культуральной среде с добавлением фиксированного субоптимального (85 нг/мл) суперантигена энтеротоксина B стафилококка (SEB; Toxin Technologies, Sarasota, FL) в присутствии градуированных доз антител OX40 или антитела изотипического контроля. В некоторых случаях к культурам также добавляют 2-5 мкг/мл растворимого сшивающего антитела, козьего F(ab')2 к Fcγ человека. После культивирования в течение 3 дней при 37°C супернатанты собирают для оценки активации T-клеток с помощью анализа ELISA секретируемого IL-2 человека. Вкратце, супернатанты культуры разбавляют 1:10 в разбавителе образца и исследуют на наличие IL-2 человека с помощью ELISA (BD Bioscience) согласно рекомендованному изготовителем протоколу. После добавления субстрата TMB аналитические планшеты считывают на считывателе Spectramax 340PC с использованием программного обеспечения Softmax на длине волны 650 нм. Измеренные оптические плотности хромогенного субстрата были пропорциональны связанному антителу для обнаружения.

Анализ MLR

Антитела к OX-40 с последовательностями, показанными в таблице 22, исследовали в отношении их способности потенцировать первичную пролиферацию T-клеток человека и секрецию IFN-γ в реакции аллогенных смешанных лимфоцитов T-клеток: дендритных клеток (T:DC AlloMLR). Все T-клетки выделяют из периферической крови у здоровых доноров-людей путем отрицательной селекции (RosetteSep, Stemcell Technologies). Моноциты выделяют из периферической крови от здоровых доноров-людей с использованием микрогранул CD14 (Miltenyi) и культивируют в течение шести дней в присутствии GM-CSF и IL-4 для получения незрелых дендритных клеток (DC). DC и T-клетки совместно культивируют в присутствии градуированных доз антител OX40 или антител изотипического контроля. В некоторых случаях к культурам также добавляют 2 - 5 мкг/мл растворимого перекрестно сшивающего антитела, такого как козий F(ab')2 к Fcγ человека. Супернатант из каждого образца собирают между 4-м днем и 7-м днем для измерения секретируемого IFN-γ с помощью анализа ELISA (BD Biosciences) или HTRF (Cisbio), следуя рекомендациям производителей. После сбора

супернатанта культуры клеток подвергают импульсному воздействию 1 мкКи/лунку посредством ^{3}[H]-тимидина в течение последних 16-18 часов культивирования. Клетки собирают на фильтровальные планшеты, а подсчеты ^{3}[H] в минуту введенного в клетку ^{3}[H]-тимидина считывают как меру пролиферации Т-клеток.

Пример 28: Противоопухолевая активность моноклонального антитела-агониста OX40 с блокатором CTLA-4 в модели CT26

Чтобы проверить синергичность действия между антителом к OX-40 и антителом к CTLA-4, комбинации этих антител исследовали в мышиной модели опухоли CT26. Мышей инокулировали опухолями CT26, и введение моноклональных антител начинали на 3-й день после инокуляции (дозировано в дни 3, 7 и 10) в дозе 200 мкг/мышь антител, показанных на фиг. 41A-41D.

Как показано на фиг. 41A-41D, как антитело к CTLA-4 (фиг. 41B), так и антитело к OX40 (фиг. 41C) показали минимальную активность при применении отдельно (1 из 8 мышей без опухоли для обоих воздействий), но характеризовались значительной противоопухолевой активностью при комбинировании (фиг. 41D), при этом 4 из 8 мышей характеризовались отсутствием опухоли.

Пример 29: Фаза 1/2a клинического испытания у субъекта с солидными опухолями

Изучение фазы 1/2a для OX40.21, вводимого отдельно или в сочетании с ниволумабом или ипилимумабом, проводят у пациентов с распространенными солидными опухолями, чтобы продемонстрировать эффективность введения только OX40.21 или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом.

1. Цель

Основной целью исследования является оценка безопасности, переносимости, дозолимитирующей токсичности (DLT) и максимальной переносимой дозы (MTD)/рекомендуемой дозы фазы 2 (RP2D) OX40.21, вводимого отдельно или в сочетании с ниволумабом или ипилимумабом, у субъектов с распространенными злокачественными опухолями.

Вторичные цели включают в себя исследование предварительной противоопухолевой активности OX40.21, вводимого отдельно или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, у субъектов с распространенными злокачественными

опухолями; характеристика PK OX40.21, вводимого отдельно и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом; и характеристика иммуногенности OX40.21, вводимого отдельно или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, и иммуногенности ниволумаба или ипилимумаба, вводимого с OX40.21. Дополнительные исследовательские цели включают в себя изучение потенциальных связей между противоопухолевой активностью и измерениями селективных биомаркеров в образцах опухолевой биопсии и периферической крови до лечения и после введения OX40.21 отдельно или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом; оценку потенциального влияния монотерапии и комбинированной терапии OX40.21 на интервал QTc; характеристику PK ниволумаба у субъектов, получающих комбинацию ниволумаба и OX40,21; характеристику PK ипилимумаба у субъектов, получающих комбинацию ипилимумаба и OX40.21; оценку общей выживаемости (OC) у пациентов, получавших только OKC40.21 и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом; и исследование потенциальных зависимостей между дозой/экспозицией и противоопухолевой активностью, фармакодинамическими (PD) эффектами (выбранными биомаркерами в образцах периферической крови и опухолевых биопсий) и ключевыми мерами безопасности у пациентов, получавших только OX40.21 и в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом.

2. Дизайн и продолжительность исследования

Это фаза 1/2a открытого исследования OX40.21 у пациентов с распространенными солидными опухолями, которое объединяет первоначальную монотерапию OX40.21 с последующей комбинированной терапией с ниволумабом или ипилимумабом.

Разделы исследования (повышение дозы и повышение дозы до максимально переносимой) проходят поэтапный подход, основанный на данных по безопасности, PK и PD. Первый раздел исследования начинается с повышения дозы монотерапии OX40.21 в когортах. Клинические данные из первых 3 когорт доз монотерапии служат основой для начала повышения доз OX40.21 в комбинации с ниволумабом. Клинические данные из первых трех когорт с дозой монотерапии в дополнение к клиническим данным из первой когорты OX40.21 в комбинации с ниволумабом служат основой для начала повышения дозы OX40.21 в комбинации с ипилимумабом. После установления переносимого и фармакологически активного RP2D OX40.21 в разделе повышения дозы

начинается повышение дозы до максимально переносимой в определенных опухолевых когортах.

3. Повышение дозы

Схема дизайна исследования для части 1A показана на фиг. 42.

Фаза повышения дозы исследования оценивает безопасность и переносимость OX40.21, отдельно или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, у пациентов с распространенными солидными опухолями.

Начальный уровень дозы OX40.21 составляет 20 мг. Решения по повышению дозы для последующих доз основываются на DLT с использованием модели BLRM (для монотерапии OX40.21) или модели BLRM (-Copula) (для OX40.21 в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом). Период DLT составляет 28 дней для частей повышения дозы как для монотерапии, так и для комбинированной терапии. Частота DLT определяется на основании частоты, тяжести и продолжительности AE, которые происходят в течение периода DLT и для которых не может быть идентифицирована альтернативная причина. Выбор дозы для следующей когорты монотерапии/уровня дозы учитывает рекомендацию BLRM (-Copula) в сочетании со всеми доступными данными по PK, PD и клинической и лабораторной безопасности всех субъектов. Выбор начальной дозы OX40.21 для части 2A определяют с использованием данных, представленных в части 1A, включая в себя оценки клинической и лабораторной безопасности, данные PK/PD и рекомендации по моделированию в рамках моделирования байесовских иерархических сетей путем включения профилей токсичности одного средства как OX40.21 (часть 1A), так и ниволумаба (CA209 003). Выбор начальной дозы OX40.21 для части 3A определяют с использованием данных, представленных в частях 1A и 2A, включая в себя оценки клинической и лабораторной безопасности, данные PK/PD и рекомендации по моделированию в рамках моделирования байесовских сетей путем включения профилей токсичности одного средства как для OX40.21 (часть 1A), так и ипилимумаба (CA184-022). Фактические дозы могут быть модифицированы для BLRM (-Copula), но не превышать удвоение ранее исследуемой дозы.

Во время повышения дозы для всех когорт доз исходный субъект (сигнальный субъект) наблюдают в течение 5 дней, перед тем как дополнительных субъектов в этой когорте подвергают лечению исследуемым лекарственным средством.

В каждой части повышения дозы включают приблизительно 30 субъектов. Количество субъектов в каждой когорте повышения дозы варьирует в зависимости от рекомендаций BLRM (-Copula). Первоначально приблизительно 3 субъекта подвергают лечению на начальных уровнях дозы OX40.21 или OX40.21 в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом. Дополнительные когорты из приблизительно 3 оцениваемых субъектов подвергают лечению в рекомендуемых дозах на BLRM (-Copula) во время фазы повышения дозы. По меньшей мере 6 субъектов, у которых оценивают DLT, подвергают лечению в MTD.

Часть 1A: Зачисление начинается в часть 1A, повышение дозы монотерапии OX40.21. Начальная доза OX40.21 для части 1A составляет 20 мг, с ожидаемыми последующими дозами 40, 80, 160 и 320 мг. Фактические дозы могут быть изменены для BLRM, но не превышать удвоение ранее исследуемой дозы.

Часть 2A: Часть 2A представляет собой комбинированную группу лечения OX40.21 с ниволумабом, которая начинается после того, как установлено, что по меньшей мере 3 уровня дозы при повышении дозы в монотерапии были переносимы или была определена MTD при повышении дозы монотерапии (часть 1A). Начальная доза OX40.21 в части 2A по меньшей мере на 1 уровень дозы ниже дозы, которая, как было показано, была переносима в части 1A, чтобы обеспечить дополнительную безопасность комбинации. Ни в коем случае доза для OX40.21 в части 2A не должна превышать максимально допустимую дозу в части 1A. Ниволумаб вводят в постоянной дозе 240 мг. Каждый цикл лечения длится 2 недели, а исследуемые лекарственные средства вводятся каждые 2 недели, начиная с 1-го дня каждого цикла в течение до 12 циклов.

Часть 3A: Часть 3A представляет собой комбинацию группы лечения OX40.21 с ипилимумабом, которая начинается только после того, как было установлено, что по меньшей мере 3 уровня дозы в повышении дозы монотерапии были переносимы или MTD определяют при повышении дозы монотерапии (часть 1A), и по меньшей мере одна дозовая когорта была переносима в части повышения дозы OX40.21 с ниволумабом. Начальная доза OX40.21 в части 3A по меньшей мере на 1 уровень дозы ниже дозы, которая, как было показано, была переносимой в части 1A. Ни в коем случае доза для OX40.21 в части 3A не должна превышать максимально допустимую дозу в части 1A, чтобы дополнительно обеспечить безопасность комбинированных доз у получавших лечение пациентов. Ипилимумаб вводят в дозе 1 мг/кг. Каждый цикл лечения длится 3 недели. OX40.21 вводят каждые 3 недели, начиная с 1-го дня 1-го цикла, вплоть до 8

циклов, а ипилимумаб вводят каждые 3 недели, начиная с 1-го дня, в течение 4 циклов. В последние 4 цикла вводят только OX40.21.

Повышение дозы до максимально переносимой:

Лечение в когортах повышения дозы до максимально переносимой начинается, когда была определена MTD/RP2D на основании оценки совокупности доступной клинической безопасности (DLT, значительных AE, возникающих после периода DLT), PK, PD и данных моделирования из части повышения дозы (части 1A, 2A и 3A). Приблизительно 110 субъектов подвергаются лечению во всех когортах повышения дозы до максимально переносимой.

Часть 1B представляет собой когорту повышения дозы до максимально переносимой монотерапии OX40.21 у пациентов со злокачественной опухолью шейки матки при MTD/RP2D, определенных в части 1A. Дозирование OX40.21 начинается в день 1 каждого цикла и вводится каждые 2 недели в течение 12 циклов. Приблизительно 12 субъектов подвергается лечению в этой когорте повышения дозы до максимально переносимой.

Части 2B представляют собой часть повышения дозы до максимально переносимой комбинированной терапии (OX40.21 с ниволумабом) для субъектов с CRC при MTD/RP2D, определенной в части 2A. Ниволумаб вводят в постоянной дозе 240 мг. Каждый цикл лечения длится 2 недели, а исследуемые лекарственные средства вводят каждые 2 недели, начиная с 1-го дня каждого цикла до 12 циклов. Приблизительно 35 субъектов подвергаются лечению в этой когорте повышения дозы до максимально переносимой.

Часть 2C представляет собой часть повышения дозы до максимально переносимой комбинированной терапии (OX40.21 с ниволумабом) для субъектов с BC при MTD/RP2D, определенных в части 2A. Каждый цикл лечения длится 2 недели, а исследуемые лекарственные средства вводят каждые 2 недели, начиная с 1-го дня каждого цикла до 12 циклов. Приблизительно 27 субъектов подвергаются лечению в этой когорте повышения дозы до максимально переносимой.

Часть 3B представляет собой часть повышения дозы до максимально переносимой комбинированной терапии (OX40.21 с ипилимумабом) у субъектов с OC при MTD/RP2D, определенных в части 3A. Каждый цикл лечения длится 3 недели. Ипилимумаб вводят в начальные 4 цикла в комбинации с OX40.21. Затем субъект продолжает монотерапию OX40.21 в течение до 4 дополнительных циклов в общей

сложности до 24 недель (8 циклов) лечения. Приблизительно 35 субъектов с ОС подвергаются лечению в этой когорте повышения дозы до максимально переносимой.

Краткое описание периодов исследования:

Субъекты проходят до 5 периодов в исследовании: отбор (до 28 дней), лечение (до 24 недель), последующее наблюдение для оценки безопасности (минимум 100 дней), последующее наблюдение для оценки ответа и последующее длительное наблюдение для оценки выживаемости (до приблизительно 2 лет от первой дозы), как описано ниже. Схема визита исследования показана на фиг. 43.

Период отбора:

Период отбора длится до 28 дней. Период отбора начинается с установления первоначального соответствия критериям субъекта и подписания формы информированного согласия. Субъекты включаются с использованием интерактивной технологии связи (IRT).

Период лечения:

Период лечения включает в себя до 24 недель дозированного введения. После каждого цикла лечения решение о лечении субъекта в следующем цикле исследуемой терапии, до 24 недель лечения, основывается на оценке риска/пользы и опухоли. Оценки опухоли выполняются каждые 8 недель для каждой 2-недельной (q2w) схемы дозирования и каждые 9 недель для каждой 3-недельной (q3w) схемы дозирования. Оценки частичного ответа (PR) и полного ответа (CR) подтверждают не менее чем через 4 недели после первоначальной оценки. Конечные точки прогрессирования опухоли или ответа оценивают с использованием критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST) v1.1.

Субъекты с ответом стабильного заболевания (SD), PR или CR в конце данного цикла продолжают следующий цикл лечения. Субъектам, как правило, разрешается продолжить исследуемую терапию до первого появления одного из следующего: 1) завершение максимального количества циклов; 2) прогрессирование заболевания; 3) клиническое ухудшение, предполагающее, что никакой дополнительной пользы от лечения не будет; 4) непереносимость терапии или 5) соответствие критериям прекращения исследуемой терапии.

Последующее наблюдение для оценки безопасности:

По завершении исследуемой терапии субъекты входят в период последующего наблюдения для оценки безопасности. После визита завершения периода лечения (EOT) субъекты подвергаются оценке по любым новым нежелательным явлениям (AE) в течение по меньшей мере 100 дней после последней дозы терапии. Последующие визиты происходят в дни 30, 60 и 100 после последней дозы или даты прекращения. Субъекты (за исключением тех, кто досрочно исключил согласие на участие в исследовании) завершают 3 клинических визита последующего наблюдения для оценки безопасности, независимо от того, начинают ли они новую противоопухолевую терапию.

Последующее наблюдение для оценки выживаемости:

После завершения периода последующего наблюдения для оценки безопасности субъекты входят в период наблюдения для оценки выживаемости. Субъектов наблюдают приблизительно каждые 3 месяца (12 недель) до смерти, выхода из последующего наблюдения, отмены согласия или завершения исследования, в зависимости от того, что наступит раньше. Продолжительность этой фазы составляет до 2 лет после первой дозы исследуемого лекарственного средства.

Последующее наблюдение для оценки ответа:

После завершения периода наблюдения для оценки безопасности все субъекты с текущими SD, PR или CR при визите EOT входят в период последующего наблюдения для оценки ответа, который происходит одновременно с периодом наблюдения для оценки выживаемости. Эти субъекты продолжают получать рентгенологические и клинические оценки опухоли каждые 3 месяца (12 недель) во время периода наблюдения для оценки ответа или до прогрессирования заболевания или отмены согласия на исследование. Радиологические оценки опухоли для субъектов, которые характеризуются наличием продолжающейся клинической пользы, продолжают собираться после завершения фазы для оценки выживаемости исследования. Субъекты, у которых наблюдается прогрессирование заболевания после начальной курса исследуемой терапии, не оцениваются на ответ после визита EOT, и им разрешается получать другую направленную на опухоль терапию.

Продолжительность исследования:

Общая продолжительность времени исследования для любого отдельного субъекта составляет приблизительно 2 года. Исследование заканчивается, когда последний субъект завершает свой последний визит по исследованию, который происходит приблизительно через 4 года после начала исследования.

Количество субъектов:

Будут зачислены приблизительно 225 субъектов и приблизительно 200 субъектов будут подвергаться лечению в исследовании.

Исследуемая выборка:

Субъекты не моложе 18 лет и характеризующиеся наличием гистологического или цитологического подтверждения злокачественности, которая представляет собой распространенную (метастатическую, рецидивирующую, рефрактерную и/или неоперабельную) с измеряемым заболеванием по RECIST v1.1.

Правила повышения дозы и остановки

В частях 1A, 2A и 3A модели BLRM и BLRM (-Copula) используются для рекомендаций по повышению дозы после того, как информация о DLT становится доступной для каждой когорты субъектов. Выбор дозы OX40.21 для следующего уровня когорты/дозы учитывает рекомендацию BLRM (-Copula) в сочетании с клинической рекомендацией и всеми доступными данными о PK, PD и клинической и лабораторной безопасности всех субъектов.

Дозолимитирующие токсичности

Для направления повышения дозы DLT определяют на основании частоты, интенсивности и продолжительности AE, для которых не выявлено четкой альтернативной причины. Период DLT составляет 28 дней после начала исследования исследуемого лекарственного средства(средств). Для управления субъектами AE, которое соответствует критериям DLT, независимо от цикла, в котором оно происходит, приводит к прекращению использования исследуемого лекарственного средства. Субъекты, которые выходят из исследования во время интервала оценки DLT по причинам, отличным от DLT, могут быть заменены новым субъектом с одинаковым уровнем дозы. Частота DLT в течение периода оценки DLT используется в решениях о повышении дозы и определении MTD. AE, возникающие после периода DLT,

рассматриваются для целей определения MTD, если они не имеют четкой альтернативной причины и не связаны с прогрессированием заболевания. Субъекты, испытывающие DLT, не отступают от исследуемого лекарственного средства и вступают в период наблюдения для оценки безопасности. AE оценивают в соответствии с Общими критериями терминологии нежелательных явлений (CTCAE) Национального института онкологии (NCI) v4.03.

Негематологическая DLT:

A. Действующая на печень DLT

• Любое повышение ≥ 3 степени уровня AST, ALT или общего билирубина

• AST, ALT или общий билирубин,

• 2 степень AST или ALT с симптоматическим воспалением печени (например, болезненность в правом верхнем квадранте, желтуха, зуд)

• AST или ALT > 3 x ULN и одновременный общий билирубин > 2 x ULN без начальных данных о холестазе (повышенной сывороточной щелочной фосфатазе [ALP]) (например, результаты, соответствующие закону Хая или определению FDA потенциального вызванного лекарством повреждения печени или pDILI)

B. Действующая не на печень DLT

• Увеит, эписклерит или ирит 2-й степени или более

• Любые другие боли в глазах 2-й степени или помутнение зрения, которое не отвечает на местное лечение и не улучшается до степени тяжести 1 в течение 2 недель или требует системного лечения

• Пневмонит, бронхоспазм, неврологическая токсичность, реакция гиперчувствительности или инфузионная реакция 3-й степени или выше

• Недерматологическая, непеченочная токсичность 3-й степени или выше будет рассматриваться как DLT со следующими особыми исключениями:

• Отклонения электролита 3-й или 4-й степени, которые не осложняются связанными с клиническим нежелательным опытом, последние менее 72 часов, и либо разрешается спонтанно или отвечает на обычное медицинское вмешательство

• Тошнота, рвота или диарея 3-й степени, которая длится менее 72 часов, и либо разрешается спонтанно или отвечает на обычное медицинское вмешательство

• Повышение содержания амилазы или липазы степени 3 или 4, не связанное с клиническими или радиографическими данными о панкреатите

• Отдельная лихорадка 3-й степени, не связанная с гемодинамическими нарушениями (например, гипотензией, клиническими или лабораторными данными об ухудшении состояния конечного органа перфузии)

• Эндокринопатия 3-й степени, которая хорошо контролируется гормон-заместительной терапией

• Транзиторное усугубление клинических проявлений опухоли 3-й степени (определяемое как боль, раздражение или сыпь, которая локализуется в участках известной или подозреваемой опухоли)

• Усталость 3-й степени в течение менее 7 дней

• Инфузионная реакция 3-й степени, которая возвращается к 1-й степени менее чем за 6 часов

Дерматологическая DLT

• Сыпь 4-й степени

• Сыпь 3-й степени, если не улучшается (например, разрешение до ≤ 1-й степени) после задержки инфузии от 1 до 2 недель. Субъекты, которые не испытывали кожные AE 3-й степени, могут возобновить лечение при наличии кожной токсичности 2-й степени.

Гематологическая DLT

• Нейтропения 4-й степени ≥ 5 дней

• Тромбоцитопения 4-й степени или тромбоцитопения 3-й степени с клинически значимым кровотечением или любые требования к переливанию тромбоцитов

• Анемия 4-й степени, не объясняемая основным заболеванием

• Фебрильная нейтропения 4-й степени

• Фебрильная нейтропения 3-й степени, которая длится > 48 часов

• Гемолиз степени ≥ 3 (то есть, требующий переливания или медицинского вмешательства, такого как стероиды)

Лечение с дополнительными циклами свыше 24 недель

Субъекты подвергаются лечению в течение 24 недель, если критерии отмены исследуемого лекарственного средства не встречались ранее. Субъекты, завершающие приблизительно 24 недели лечения с постоянным контролем за заболеванием (CR, PR или SD), имеют право на дополнительную 24-недельную исследуемую терапию в монотерапии (часть 1) и комбинированной терапии (части 2 и 3) после первых 24 недель,

когда оценка риска/пользы способствует продолжению терапии. По завершении дополнительной 24-недельной исследуемой терапии субъекты входят в период наблюдения для оценки безопасности.

Лечение вне прогрессирования

Лечение, выходящее за рамки прогрессирования, разрешено у отдельных субъектов с первоначальным прогрессирующим заболеванием, основанным на RECIST v1.1, после определения того, что оценка пользы/риска способствует продолжению приема исследуемой терапии (например, субъекты продолжают испытывать клиническую пользу, переносить лечение и соответствовать другим критериям).

Повторное лечение

Повторное лечение разрешается, если происходит подтвержденное прогрессирование заболевания во время периода наблюдения для оценки ответа. Субъекты, завершающие приблизительно 24 недели (или дополнительные циклы лечения, если это необходимо) терапии, которые вступают в период наблюдения для оценки ответа с постоянным контролем над заболеванием (CR, PR или SD) без какой-либо значительной токсичности, имеют право на повторное лечение. Такие субъекты имеют право на повторное лечение в каждом конкретном случае после оценки и определения того, поддерживает ли отношение риск/польза введение дальнейшей исследуемой терапии и продолжает ли субъект удовлетворять критериям приемлемости для лечения посредством исследуемой терапии. Субъекты, отвечающие критериям для повторного лечения, подвергаются лечению посредством первоначально назначенной схемы лечения в виде монотерапии или комбинированной терапии (например, та же доза и график дозы, который вводится в течение первых 24 недель), если только эта доза и график не будут впоследствии превышать MTD, в случае чего субъект подвергается лечению следующей более низкой дозой, считающейся допустимой/безопасной.

Критерии включения

1) Подписанное письменное информированное согласие

a) Субъект должен подписать форму информированного согласия до выполнения любых связанных с исследованием процедур, которые не считаются частью SOC.

b) Согласие на образцы биопсии опухоли (обязательные биопсии до и после лечения необходимы для когорт повышения дозы до максимально переносимой, а также

для дополнительных субъектов, добавленных к любой из ранее завершенных когорт повышения дозы и необязательно для когорты повышения дозы).

2) Целевая выборка

Субъекты должны быть не моложе 18 лет и иметь гистологическое или цитологическое подтверждение злокачественности, которая представляет собой распространенную (метастатическую, рецидивирующую, устойчивую и/или неоперабельную) с измеряемым заболеванием по RECIST v1.1.

A. Повышение дозы:

Субъекты должны были получить, а затем прогрессировать или быть устойчивыми или не переносить по меньшей мере 1 стандартную схему лечения в терапии распространенной или метастатической формы злокачественной опухоли, если такая терапия существует. Субъектам, не имеющим права на любую стандартную терапию, разрешается регистрироваться, если их несоответствие требованиям задокументировано в медицинских документах. Следующие опухолевые гистологии разрешены, за исключением субъектов с опухолями первичной центральной нервной системы (ЦНС) или метастазами ЦНС как единственным участком активного заболевания.

(i) Меланома: мутационный статус BRAF должен быть задокументирован, если известен.

(ii) Мутационный статус NSCLC: EGFR, ALK, KRAS и ROS1 должен быть задокументирован, если известен

(iii) Злокачественная опухоль головы и шеи, ограниченная плоскоклеточной карциномой. Статус ВПЧ должен быть задокументирован, если известен

(iv) Транзитно-клеточная карцинома мочеполового тракта

(v) Почечно-клеточная карцинома

(vi) Аденокарцинома поджелудочной железы

(vii) CRC: статус MSI, KRAS и BRAF должен быть задокументирован, если известен.

(viii) Злокачественная опухоль шейки матки: статус ВПЧ должен быть задокументирован, если известен.

(ix) Тройной негативный рак молочной железы. Статус HER2, ER и PR должен быть задокументирован

(x) Аденокарцинома эндометрия

(xi) Злокачественная опухоль яичников

(xii) Аденокарцинома предстательной железы

(xiii) Гепатоцеллюлярная злокачественная опухоль - только класс по Чайлд-Пью

(xiv) Мелкоклеточная злокачественная опухоль легких

(xv) Злокачественная опухоль желудочно-кишечного тракта и желудка: статус HER2 должен быть задокументирован, если известен.

B. Повышение дозы до максимально допустимой: части 1B, 2B, 2C и 3B

Будут разрешены следующие типы опухолей:

(a) Злокачественная опухоль шейки матки - часть 1B

(i) Гистологически подтвержденная злокачественная опухоль шейки матки, которая представляет собой неоперабельную, метастатическую или рецидивирующую с задокументированной прогрессией заболевания

(ii) Задокументированный статус опухолевого ВПЧ, если он известен. Если неизвестен, субъекты должны согласиться, чтобы их образец отправленной архивной опухолевой ткани (блок или неокрашенные срезы) был исследован.

(iii) Предварительная потребность в терапии:

1. Должен был получить, а затем прогрессировать или не переносить или быть устойчивым по меньшей мере к 1 стандартной системной терапии для метастатического и/или неоперабельного заболевания (например, паклитаксел/цисплатин, паклитаксел/цисплатин/бевацизумаб). Параллельная химиотерапия, проводимая с первичным облучением и дополнительной химиотерапией, полученная после завершения лучевой терапии, не считается системной схемой химиотерапии.

(b) Злокачественная опухоль толстой кишки - Часть 2B

(i) Гистологически подтвержденная CRC, которая представляет собой метастатическую или рецидивирующую с задокументированной прогрессией заболевания

(ii) Задокументированный статус MSI, MMR, KRAS и BRAF, если он известен. Если неизвестен, субъекты должны согласиться, чтобы их образец отправленной архивной опухолевой ткани (блок или неокрашенные срезы) были исследованы.

(iii) Предварительная потребность в терапии:

Субъекты должны были получать, а затем прогрессировать или не переносить или быть устойчивыми по меньшей мере к одной стандартной системной терапии, для метастатического и/или неоперабельного заболевания (или прогрессировать в течение 6 месяцев после дополнительной терапии).

(c) Злокачественная опухоль мочевого пузыря - часть 2C

(i) Гистологически или цитологически подтвержденная уротелиальная карцинома (включая в себя смешанные гистологии уротелиальной карциномы с элементами других подтипов) почечной лоханки, мочеточника, мочевого пузыря или мочеиспускательного канала с прогрессирующим или устойчивым заболеванием

(ii) Предварительная потребность в терапии:

Субъекты должны были получать, а затем прогрессировать или не переносить, или быть устойчивыми по меньшей мере к 1 стандартной системной схеме лечения (например, основанной на платине химиотерапии) для лечения метастатического (стадия IV) или локально распространенного неоперабельного заболевания.

(d) Злокачественная опухоль яичника - Часть 3B

(i) Гистологически или цитологически подтвержденная карцинома яичника (включая эпителиальную ОС, первичную перитонеальную или фаллопиевую карциному) с задокументированной прогрессией заболевания

(ii) Зарегистрированный мутационный статус BRCA зародышевой линии, если он известен. Если неизвестен, субъекты должны согласиться, чтобы их образец отправленной архивной опухолевой ткани (блок или неокрашенные срезы) был исследован.

(iii) Предварительная потребность в терапии:

Субъекты должны были получать, а затем прогрессировать или не переносить, или быть устойчивыми по меньшей мере к 1 стандартной системной терапии (например, основанной на платине химиотерапии) для лечения метастатического или неоперабельного заболевания.

3) Общее состояние онкологического больного по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG) ≤ 1.

4) Наличие по меньшей мере 1 поражения с измеряемым заболеванием, как определено RECIST v1.1 для оценки ответа. Субъектам с поражениями в ранее облученном поле в качестве единственного сайта измеряемого заболевания разрешено регистрироваться, если поражение(я) продемонстрировало четкую прогрессию и может быть точно измерено.

5) Для субъектов, нуждающихся в новой биопсии опухоли, субъекты должны иметь по меньшей мере одно поражение, доступное для биопсии до и после лечения, в дополнение к минимальному измеренному поражению RECIST v1.1, требуемому для оценки ответа. Это поражение должно быть отличимым от индекса(-ов) поражения, которое оценивается для радиологического ответа.

6) Субъектам, которые подвергались предшествующей терапии любым средством, специально нацеленным на ингибирование пути контрольной точки (например, антитело к PD-1, к PD-L1, к PD-L2, к LAG-3 и к CTLA-4), разрешено участие после периода вымывания в любое время более 4 недель после последнего лечения.

Примечание: *(i) Субъекты, которые испытывали предшествующие связанные с терапией контрольных точек иммунно-опосредованные АЕ 1 и 2 степени, должны подтвердить восстановление после этих событий во время входа в исследование,* ***за исключением эндокринопатий, подвергавшихся лечению с восполняющим введением****, как описано в разрешении всех связанных клинических симптомов, аномальных результатов на физическом обследовании и/или связанных с ними лабораторных аномалий. Там, где это применимо, у этих субъекты также должен быть завершен прием стероидов для лечения этих АЕ минимум за 14 дней до начала лечения посредством исследуемой терапии. (ii) Приемлемость субъектов с предшествующими связанными с терапией контрольных точек иммунно-опосредованными АЕ ≥ 3 степени, будет рассматриваться в каждом конкретном случае после обсуждения с медицинским наблюдателем (например, разрешено включение при асимптоматическом выделенном повышении липазы 3 степени без клинических или радиологических признаков панкреатита).*

7) Субъекты с предшествующей терапией любым средством, конкретно нацеленным на пути костимуляции Т-клеток, за исключением антитела к OX40, к CD137, антитела к GITR и к CD27, разрешены после периода вымывания в любое время более 4 недель после последнего воздействия.

8) Предварительная паллиативная лучевая терапия должна быть завершена не менее чем за 2 недели до первой дозы исследуемого лекарственного средства. Субъектам с симптоматическими опухолевыми поражениями на исходном уровне, которые могут потребовать паллиативной лучевой терапии в течение 4 недель после первой дозы исследуемого лекарственного средства, настоятельно рекомендуется получать паллиативную лучевую терапию до включения в исследование.

9) Субъекты, включенные в когорты повышения дозы и повышения дозы до максимально переносимой, должны согласиться на получение существующей фиксированной в формалине заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани, либо блока, либо минимум 15 неокрашенных срезов (предпочтительно 25 срезов) для выполнения коррелятивных исследования. Если архивный образец недоступен, субъект должен согласиться на биопсию опухоли до лечения. Субъекты, которые неспособны предоставить заархивированный образец опухоли и которые либо не соглашаются на биопсию опухоли перед лечением, либо не имеют доступных повреждений, не соответствуют критериям отбора. (Тем не менее, субъекты, чья биопсия до лечения приводит к недостаточному количеству или качеству ткани, не будут исключаться только на этом основании). Для любых дополнительных субъектов, добавленных к любой из ранее завершенных когорт с повышением дозы, необходимы обязательные биопсии до и после лечения.

10) Субъекты, включенные в группу повышения дозы до максимально переносимой или добавленные к любой ранее завершенной когорте повышения дозы, должны пройти обязательную биопсию до и после лечения с приемлемым клиническим риском. (a) Образец ткани солидной опухоли должен представлять собой пункционную, эксцизионную или инцизионную биопсию. Тонкоигольная пункционная биопсия, дренаж плевральных выпотов цитоцентрифугами или штанцевая биопсия не считаются адекватными для обзора биомаркеров. Биопсии костных повреждений, которые не имеют компонентов мягкой ткани или опухолевых образцов декальцинированной кости, также неприемлемы. (b) Биопсии поражений должны отличаться от индексного поражения(-й), которые оцениваются для радиологического ответа

11) Адекватная функция органа для субъектов определяется следующим:

(a) Нейтрофилы ≥1500/мкл (стабильные от любого фактора роста в течение 4 недель после первого введения исследуемого лекарственного средства)

(b) Тромбоциты ≥80 × 10^3/мкл (переливание для достижения этого уровня не допускается в течение 2 недель после первого введения исследуемого лекарственного средства)

(c) Гемоглобин ≥8 г/дл (переливание для достижения этого уровня не допускается в течение 2 недель после первого введения исследуемого лекарственного средства)

(d) ALT и AST ≤3 × верхняя граница нормы (ULN)

(e) Общий билирубин ≤1,5 × ULN (кроме субъектов с синдромом Гилберта, которые должны иметь нормальный прямой билирубин)

(f) Нормальная функция щитовидной железы или стабильная гормональная добавка по оценке исследователя

(g) Альбумин ≥ 2 мг/дл

(h) Креатинин сыворотки ≤ 1,5 × ULN или клиренс креатинина (CrCl) ≥40 мл/мин (измеряется с использованием формулы Кокрофта-Голта ниже):

Женский CrCl = (140 - возраст в годах) × массу в кг × 0,85

72 × креатинин сыворотки в мг/дл

Мужской CrCl = (140 - возраст в годах) × массу в кг × 1,00

72 × креатинин сыворотки в мг/дл

12) Способность соблюдать условия лечения, сбор образцов PK и PD и последующее наблюдение.

Возраст и репродуктивный статус

a) Мужчины и женщины, возраст ≥ 18 лет на момент информированного согласия.

b) Женщины репродуктивного возраста (WOCBP) должны иметь отрицательный тест на беременность в сыворотке или моче (минимальная чувствительность 25 МЕ/л или эквивалентные единицы хорионического гонадотропина человека [hCG]) в течение 24 часов до начала исследования лекарственного средства.

c) Женщины не должны кормить грудью.

d) WOCBP должны согласиться следовать инструкциям по способу(-ам) контрацепции на время лечения исследуемым лекарственным средством OX40.21 плюс 5 периодов полувыведения исследуемого лекарственного средства плюс 30 дней.

Эта продолжительность должна составлять 12 недель для субъектов части 1 и 3 (50 дней плюс 30 дней) или 23 недели для субъектов части 2 (130 дней плюс 30 дней [продолжительность овуляторного цикла]), в общей сложности до 160 дней после завершения лечения.

e) Мужчины, которые сексуально активны с WOCBP, должны согласиться следовать инструкциям по способу(ам) контрацепции на время лечения исследуемым лекарственным средством OX40.21 плюс 5 периодов полувыведения исследуемого лекарственного средства плюс 90 дней. Продолжительность должна составлять 20 недель для субъектов части 1 и 3 (50 дней плюс 90 дней) или 31 неделя для субъектов части 2 (130 дней после завершения). Кроме того, мужчины должны быть готовы воздержаться от донорства спермы в течение этого времени.

f) Мужчины с азооспермией освобождаются от требований к контрацепции. WOCBP, которые в течение длительного времени не гетеросексуально активные, также освобождаются от требований к контрацепции, но все же проходят тестирование на беременность.

Критерии исключения

1) Исключения для целевого заболевания

a) Субъекты с известными или подозреваемыми метастазами в ЦНС или не подвергнутыми лечению метастазами ЦНС или с ЦНС как единственным сайтом заболевания исключаются. Однако субъекты с контролируемыми метастазами в головном мозге могут включаться в исследование. Контролируемые метастазы в головном мозге определяются как отсутствие радиографического прогрессирования в течение по меньшей мере 4 недель после облучения и/или хирургического лечения (или 4 недель наблюдения, если отсутствует клиническое вмешательство), а также от стероидов в течение как минимум 2 недель, и отсутствие новых или прогрессирующих неврологических признаков и симптомов.

b) Субъекты с карциноматозным менингитом

c) Для злокачественной опухоли яичников:

i) Субъекты со злокачественной опухолью яичников с обструкцией кишечника в анамнезе в течение предшествующих 6 месяцев или с катетером Тенкхоффа исключаются.

ii) Допускается до 4 предшествующих противоопухолевых процедур (то есть химиотерапия, лучевая терапия, гормональная или иммунотерапия). Повторное начало такой же схемы лечения после перерыва по применению лекарственных средств может считаться одной схемой лечения; однако это будет считаться двумя схемами лечения, если между ними существовала какая-либо другая схема лечения.

2) Медицинский анамнез и сопутствующие заболевания

a) Субъекты с предшествующей злокачественностью, отличной от той, которая используется для включения в это исследование, диагностированной менее чем за 2 года до вступления в исследование, исключаются (за исключением случаев немеланомных злокачественных опухолей кожи и in situ таких злокачественных опухолей, как мочевого пузыря, толстой кишки, шейки матки/дисплазии, меланомы или груди). К тому же, пациентов с другими вторичными злокачественными новообразованиями, диагностированными более 2 лет назад, которые получили направленную на излечение терапию без признаков заболевания в течение этого интервала, которые характеризуются низким риском рецидива, имеют право на участие.

b) Другая активная злокачественность, требующая одновременного вмешательства.

c) Предшествующий органный аллотрансплантат.

d) Предыдущее лечение:

i) Допускаются предшествующее лечение против злокачественной опухоли (т. е. химиотерапия, лучевая терапия, гормональная или иммунотерапия).

ii) Токсичность (за исключением алопеции), связанная с предшествующей противоопухолевой терапией и/или хирургией, должна либо разрешиться, либо вернуться на исходный уровень, либо до степени 1 или быть признана необратимой.

iii) Для цитотоксических средств по меньшей мере 4 недели должно пройти между последней дозой до противоопухолевого лечения и началом исследуемого лечения.

iv) Для нецитотоксических средств по меньшей мере 4 недели или 5 периодов полужизни (в зависимости от того, что меньше) должно пройти от последней дозы предшествующей противоопухолевой терапии и начала исследуемой терапии.

e) Предшествующая терапия с антителом к OX40.

f) Субъекты с активным, известным или подозреваемым аутоиммунным заболеванием исключаются. Субъектам с витилиго, сахарным диабетом 1-го типа, остаточным гипотиреозом из-за аутоиммунного состояния, требующим только гормон-заместительной терапии, субъектам с нормальной функцией щитовидной железы с заболеванием Грейвса в анамнезе (субъекты с подозрением на аутоиммунные нарушения щитовидной железы должны быть отрицательными в отношении тиреоглобулиновых и тиреоидных пероксидазных антител и тиреотропного иммуноглобулина до первой дозы исследуемого лекарственного средства), псориазом, не требующим системного лечения, или условиями, которые не ожидаются, что повторятся в отсутствие внешнего триггера,

разрешено зачисление в исследование. Субъекты с хорошо контролируемой астмой и/или мягким аллергическим ринитом (сезонные аллергии) имеют право на участие.

g) Субъекты с опасной для жизни токсичностью в анамнезе, связанной с предшествующей иммунной терапией (например, лечение антителом к CTLA-4 или к PD-1/PD-L1 или любым другим антителом или лекарственным средством, специально предназначенным для стимуляции Т-клеток или путей иммунных контрольных точек), за исключением тех, которые вряд ли будут повторяться со стандартными ответными мерами (например, гормон-заместительная терапия после кризиса надпочечников).

h) Субъекты с интерстициальным заболеванием легких, которое представляет собой симптоматическое или может мешать обнаружению или лечению ожидаемой легочной токсичности, связанной с лекарственными средствами.

i) Хроническое обструктивное заболевание легких, требующее повторной пульс-терапии стероидами или хроническими стероидами в дозах более 10 мг/сут преднизона или эквивалента.

j) Субъекты с состоянием, требующим системного лечения либо кортикостероидами (> 10 мг суточных эквивалентов преднизона), либо другими иммуносупрессивными препаратами в течение 14 дней после введения исследуемого лекарственного средства, за исключением доз замещения стероидов надпочечников > 10 мг в сутки эквивалента преднизона в отсутствие активного аутоиммунного заболевания. **Примечание**: Лечение коротким курсом стероидов (<5 дней) до 7 дней до начала исследования лекарственного средства разрешено.

k) Неконтролируемое или значительное сердечно-сосудистое заболевание, включая в себя, без ограничения, одно из следующих:

i) инфаркт миокарда или инсульт/преходящая ишемическая атака в течение последних 6 месяцев;

ii) неконтролируемая ангина в течение последних 3 месяцев;

iii) любая клинически значимая аритмия в анамнезе (такая как желудочковая тахикардия, фибрилляция желудочков или двунаправленная тахикардия);

iv) другие клинически значимые заболевания сердца в анамнезе (например, кардиомиопатия, застойная сердечная недостаточность с функциональной классификацией III-IV Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, перикардит, значительный перикардиальный выпот);

v) связанное с сердечно-сосудистым заболеванием требование в ежедневной дополнительной кислородной терапии;

vi) интервал QT, скорректированный на частоту сердечных сокращений, с использованием формулы Фридеричиа (QTcF) > 480 мс.

l) Любой хронический гепатит в анамнезе, о чем свидетельствует следующее:

i) положительный тест на поверхностный антиген гепатита B;

ii) положительный тест на качественную вирусную нагрузку на гепатит C (с помощью ПЦР).

Примечание: Субъекты с положительным антителом к гепатиту C и отрицательным количественным гепатитом C по ПЦР имеют право на участие. Разрешенная вирусная инфекция гепатита A в анамнезе не является критерием исключения. Разрешено дополнительное исследование или заменяющее исследование при институциональном руководстве для исключения инфекции.

м) Доказательства активной инфекции, которая требует системной антибактериальной, противовирусной или противогрибковой терапии ≤ 7 дней до начала терапии исследуемым лекарственным средством (не относится к вирусным инфекциям, которые предположительно связаны с основным типом опухоли, необходимым для зачисления в исследование).

n) Известное положительное тестирования на ВИЧ или синдром приобретенного иммунодефицита в анамнезе.

o) Свидетельство об активной или скрытой инфекции туберкулеза, в том числе PPD, недавно преобразованный в положительный; рентгенография грудной клетки с признаками инфекционного инфильтрата; недавние необъяснимые изменения в профилях лихорадки/озноба или наличие их в анамнезе.

p) Любая крупная операция в течение 4 недель после введения исследуемого лекарственного средства. Субъекты должны оправиться от последствий крупной операции или значительного травматического повреждения по меньшей мере за 14 дней до первой дозы исследуемого лекарственного средства.

q) Использование не-онкологических вакцин, содержащих живой вирус, для профилактики инфекционных заболеваний в течение 4 недель до начала исследования лекарственного средства. Использование инактивированных сезонных вакцин против гриппа, например, Fluzone®, разрешается.

r) Применение трансфузии pRBC или тромбоцитов в течение 2 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства.

s) Известное или лежащее в основе медицинское или психиатрическое состояние и/или социальная причина, которая может привести к тому, что введение исследуемого

лекарственного средства будет опасно для субъектов или может отрицательно повлиять на способность субъекта соблюдать или переносить исследование.

3) Аллергия и нежелательная реакция на лекарственные средства

a) Аллергия на ниволумаб или ипилимумаб в анамнезе (только части 2 и 3, соответственно).

b) В анамнезе любая значительная лекарственная аллергия (такая как анафилаксия или гепатотоксичность) до предшествующей противоопухолевой иммуномодулирующей терапии (например, ингибиторов контрольной точки, костимулирующих антител Т-клеток).

Оценки исследований:

Медицинские осмотры, измерения основных показателей жизнедеятельности, электрокардиограммы в 12 отведениях (ЭКГ) и клинические лабораторные оценки выполняют в выбранные моменты времени в течение интервала дозирования. Субъектов тщательно контролируют на наличие АЕ на протяжении всего исследования.

• Оценки безопасности: АЕ оценивают во время исследования и в течение 100 дней после последнего лечения. Оценки АЕ оценивают в соответствии с NCI CTCAE v4.03. За субъектами наблюдают до тех пор, пока все связанные с лечением АЕ не восстановятся до исходного уровня или не будут считаться необратимыми.

• Оценки эффективности: оценка заболевания с помощью КТ и/или МРТ по мере необходимости проводится в начале и каждые 8 недель (± 1 неделя) для схемы дозирования q2w и каждые 9 недель (± 1 неделя) для схемы дозирования q3w, затем каждые 12 недель на протяжении фазы наблюдения за лечением и ответом до прекращения лечения или ухода из исследования. Оценки опухолей в другие моменты времени выполняют, если есть опасения относительно прогрессирования опухоли. Оценка ответа опухоли производится в соответствии с RECIST v1.1 для субъектов со злокачественными опухолями.

• Оценка фармакокинетики и иммуногенности: образцы для оценки РК и иммуногенности собирают для субъектов, получающих ОХ40.21 отдельно или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом. РК ОХ40.21 характеризуется посредством способа неселективного анализа (NCA). Образцы иммуногенности анализируют на антитела к ОХ40.21 и/или антитела к ниволумабу и/или антитела к ипилимумабу с помощью проверенных иммунологических анализов.

• Экспериментальные оценки биомаркеров. Чтобы исследовать потенциальные прогностические маркеры для клинического ответа на OX40.21 по отношению к дозе и PK, получают 3 типа образцов от всех субъектов для исследования биомаркеров: (i) цельная кровь, (ii) сыворотка/плазма и (iii) опухолевая ткань.

Статистические аспекты

Определение размера выборки

Повышение дозы:

В качестве фазы 1 клинического испытания повышения дозы размер выборки для каждой когорты повышения зависит от наблюдаемой токсичности и вывода апостериорного распределения. Приблизительно 30 субъектов подвергаются лечению во время каждой части повышения дозы (монотерапия OX40.21 [часть 1A], OX40.21 в комбинации с ниволумабом [часть 2A] и OX40.21 в комбинации с ипилимумабом [часть 3A]) для общего количества приблизительно 90 субъектов в частях 1A, 2A и 3A. Первоначально приблизительно 3 субъекта подвергаются лечению на начальных уровнях дозы OX40.21 или OX40.21 в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом. Дополнительные когорты из приблизительно 3 оцениваемых субъектов подвергаются лечению в рекомендуемых дозах по рекомендации BLRM (-Copula) во время фазы повышения дозы. По меньшей мере 6 субъектов с оцениваемой DLT подвергаются лечению в MTD.

Повышение дозы до максимально допустимой:

В общих чертах, установление размера фазы повышения дозы до максимально допустимой основывается на частоте целевого ответа (частоте целевого общего ответа) и способности идентифицировать сигнал для такого клинического ответа, который превышает стандарт лечения (историческую частоту общего ответа).

Приблизительно 12 субъектов подвергаются лечению в части 1B когорты повышения дозы до максимально допустимой. Приблизительно 35 субъектов подвергаются лечению в части 2B когорты повышения дозы до максимально допустимой. Приблизительно 27 субъектов подвергаются лечению в части 2C когорты повышения дозы до максимально допустимой. Приблизительно 35 субъектов подвергаются лечению в части 3B когорты повышения дозы до максимально допустимой.

Конечные точки

Первичные конечные точки

Оценка безопасности основана на распространенности AE, серьезных AE, AE, ведущих к прекращению и смерти. Кроме того, исследуются аномалии клинических лабораторных испытаний.

Вторичные конечные точки

Эффективность: противоопухолевую активность только OX40.21 и OX40.21 в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом измеряют по ORR, длительности ответа и выживаемости без прогрессирования (PFSR) в течение 24 недель на основе RECIST v1.1. Вышеуказанное определение основано на измерениях опухолей, происходящих на исходном уровне, каждые 8 недель (± 1 неделя) для схемы дозирования q2w и каждые 9 недель (± 1 неделя) для схемы дозирования q3w в течение периода лечения и каждые 3 месяца (12 недель) во время периода наблюдения для оценки выживаемости.

• Лучший общий ответ (BOR) оценивают по критериям RECIST 1.1.

• ORR представляет собой долю всех подвергаемых лечению субъектов, у которых BOR представляет собой CR или PR.

• Продолжительность ответа, рассчитанная для всех подвергаемых лечению субъектов с BOR CR или PR, представляет собой время между датой первого ответа и датой прогрессирования заболевания или смерти, в зависимости от того, что произойдет раньше.

• PFSR через 24 недели определяется как доля подвергаемых лечению субъектов без прогрессирования и выживших через 24 недели. Доля рассчитывается по оценке Каплана-Мейера, которая учитывает цензурированные данные.

Фармакокинетика

Такие выбранные параметры, как Cmax, Tmax, AUC(0-t) и AUC(TAU), оценивают в 2 цикла в зависимости от графика для монотерапии или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом. Такие параметры, как Ctau, CLT, Css-avg, индекс накопления (AI) и эффективный период полужизни (T-HALFeff), оценивают во втором цикле при собранном интенсивном PK.

Иммуногенность

Вторую цель иммуногенности оценивают по частоте положительного ADA к OX40.21 или ниволумабу или ипилимумабу.

Поисковые конечные точки

Поисковые цели, связанные с OS, оценивают по частоте OS в определенный момент времени (например, 2 года). Частота OS представляет собой долю субъектов, живущих в данный момент времени. OS для субъекта определяется как время от даты первой дозы исследуемого лекарственного средства до даты смерти по любой причине. Поисковые цели, связанные с биомаркерами, оценивают путем изменения от исходного уровня измерений биомаркеров в периферической крови (например, растворимых факторов, включая в себя, без ограничения, цитокины и хемокины) или опухолевой ткани (например, инфильтрующие опухоли лимфоциты).

Для субъектов с несколькими измерениями ЭКГ дополнительно оценивают следующие параметры: изменения интервалов ЭКГ QT, QTc, QRS и интервала P-R от исходных значений.

Анализ

Анализ безопасности: все зарегистрированные AE перечисляют и заносят в таблицу по классу органа системы, предпочтительному сроку и лечению. Показатели жизненно важных функций и результаты клинических лабораторных испытаний перечисляют и обобщают по лечению. Также отмечают любые важные результаты исследования физических показателей и результаты клинических лабораторных исследований. Оценивают результаты ЭКГ и отмечают аномалии, если они присутствуют.

Анализ эффективности. Перечень измерений опухоли предоставляют по субъекту и дню исследования в каждой лечебной группе и уровню дозы. Индивидуальный BOR субъекта указывают на основании RECIST 1.1. Чтобы описать противоопухолевую активность только OX40.21 или в комбинации с ниволумабом или ипилимумабом, рассчитывают ORR. ORR и соответствующий 2-сторонний 95% CI по способу Клоппера-Пирсона предоставляют по лечению и/или уровню дозы, а также типу опухоли. Медианная продолжительность ответа и соответствующий 2-сторонний 95% CI сообщают по лечению и/или дозе и типу опухоли. Длительность ответа анализируют с использованием способа Каплана-Мейера. Кроме того, PFSR, вероятность того, что у субъекта не будет прогрессирования или он выживет через 24 недели, оценивают по способу Каплана-Мейера по лечению, типу опухоли и уровню дозы. Соответствующий

95% CI получают на основе формулы Гринвуда. OS наносится на график по способу Каплана-Мейера. Сообщают об медианной OS и соответствующем 2-стороннем 95% CI.

Фармакокинетические анализы: все индивидуальные параметры PK перечисляют для каждого аналита, включая в себя любые исключения и причины исключения из обобщения. Сводные статистические данные приводят для каждого параметра PK по лечению. Геометрические средства и коэффициенты вариации представлены для Cmax, AUC(0-t), AUC(TAU), Ctau, CLT, Cssavg и AI. Медианы и диапазоны представлены для Tmax. Значения и стандартные отклонения представлены для всех других параметров PK (например, T-HALFeff).

Зависимость дозы OX40.21 оценивают в монотерапии повышения дозы. Чтобы описать зависимость от дозы OX40.21, для каждого измеренного дня предоставляют графики рассеяния Cmax, AUC(0-t) и AUC(TAU) в зависимости от дозы. Проводят поисковую оценку пропорциональности дозы на основе модели мощности и CI вокруг коэффициента мощности. Конец инфузии ниволумаба и ипилимумаба и остаточные концентрации (Ctrough) и остаточную концентрацию OX40.21 сводят в таблицу в зависимости от лечения и дня исследования с использованием сводной статистики. Эти данные также могут быть объединены с другими наборами данных для анализа PK выборки.

Анализ иммуногенности: все доступные данные по иммуногенности предоставляются в зависимости от лечения, дозы и иммуногенности. Определяют частоту субъектов с положительной оценкой ADA OX40.21, ниволумаба и ипилимумаба.

Поисковый анализ биомаркеров: сводные статистические данные для биомаркеров и их соответствующие изменения (или процентные изменения) по сравнению с исходными значениями приведены в таблице в зависимости от запланированного дня исследования и дозы в каждой группе. Временная динамика мер биомаркера представлена графически. Если с течением времени наблюдается индикация значимой структуры, для характеристики отношения выполняется дополнительный анализ (например, линейная смешанная модель). Такие способы, как без ограничения, логистическая регрессия, используются для изучения возможных ассоциаций между мерами биомаркера из периферической крови или биопсии опухоли и клинических исходов.

Таблица 23. Сводная таблица последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	Предшественник OX40 человека	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTY PSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYN DVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCR AGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN CTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPA RPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFR TPIQEEQADAHSTLAKI
2	Внеклеточный домен зрелого OX40 человека	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVC RPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTA TQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDN QACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQ PQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGR AVAA
3	OX40 яванского макака	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAKLHCVGDTY PSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSQNTVCRPCGPGFY NDVVSAKPCKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDTVCR CRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWT NCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPP ARPTTVQPTEAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPAVAAILGL GLALGLLGPLAMLLALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGS FRTPIQEEQADAHSALAKI
4	OX40-L человека	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL*
5	Константный домен IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

		EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
6	Константный домен IgG1 человека (аллотипический вариант)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
7	Легкая цепь каппа IgG1 человека	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	Альтернативный С-конец константной области тяжелой цепи	LSPGK
9	Альтернативный С-конец константной области тяжелой цепи	LSPG
10	Константная область легкой цепи каппа (CL) IgG1 человека	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	CDR1 VH 3F4	SYDVN
12	CDR2 VH 3F4	WMNPNSGNTGYAPKFQG
13	CDR3 VH 3F4	IYSSSYNWFDP
14	CDR1 VL 3F4	RASQSVSSYLA
15	CDR2 VL 3F4	DASNRAT
16	CDR3 VL 3F4	QQRSNWPLT
17	VH 3F4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTSYDVNW VRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAPKFQGRVTM TRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYSSSYNWFD PWGQGTLVTVSS

18	VL 3F4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK
19	CDR1 VH 14B6	SNWIG
20	CDR2 VH 14B6	FIYPGDSDTRYSPSFQG
21	CDR3 VH 14B6	YGDDWYFDL
22	CDR1 VL1 14B6	RASQSVSSYLA
23	CDR2 VL1 14B6	DASNRAT
24	CDR3 VL1 14B6	QQRGDWPIT
25	CDR1 VL2 14B6	RASQGISSWLA
26	CDR2 VL2 14B6	AASSLQS
27	CDR3 VL2 14B6	QQYNSYPRIT
28	VH 14B6	EVQLEQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSNWIGWV RQMPGKGLEWMGFIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDIAMYYCARYGDDWYFDLWGR GTLVTVSS
29	VL1 14B6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWFQQ RPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFSLTISS LEPEDFAVYYCQQRGDWPITFGQGTRLEIK
30	VL2 14B6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYNSYPRITFGQGTRLEIK
31	CDR1 VH 23H3	NYAMY
32	CDR2 VH 23H3	AIGIGGDTFYTDSVKG
33	CDR3 VH 23H3	MGTGYFFDY
34	CDR1 VL 23H3	RASQSVSSYLA
35	CDR2 VL 23H3	DASNRAT
36	CDR3 VL 23H3	QQRSNWPLT
37	VH 23H3	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDMAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSS

38	VL 23H3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGPGTKVDIK
39	CDR1 VH 6E1	SFAMH
40	CDR2 VH 6E1	VISYDGSIKYYTDSVKG
41	CDR3 VH 6E1	DGNYGSARYFQH
42	CDR1 VL1 6E1	RASQGISSWLA
43	CDR2 VL1 6E1	AASSLQS
44	CDR3 VL1 6E1	QQYNSYPRT
45	CDR1 VL2 6E1	RASQSVSSYLA
46	CDR2 VL2 6E1	DASNRAT
47	CDR3 VL2 6E1	QQRSNWPYT
48	VH 6E1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFAMHW VRQAPGKGLEWVTVISYDGSIKYYTDSVKGRFTFSRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDGNYGSARYFQ HWGQGTLVTVSS
49	VL1 6E1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK
50	VL2 6E1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPYTFGQGTKLEIK
51	CDR1 VH 18E9	SSAMH
52	CDR2 VH 18E9	AIGTGGDTYYADSVKG
53	CDR3 VH 18E9	DFYDILTGIFDY
54	CDR1 VL 18E9	RASQGISSWLA
55	CDR2 VL 18E9	AASSLQS
56	CDR3 VL 18E9	QQANSFPST
57	VH 18E9	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAHSGFTFTSSAMHW VRQAPGKGLEWISAIGTGGDTYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQINSLRAEDMAVYYCARDFYDILTGIFDYW GQGTLVTVSS

58	VL 18E9	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ HKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQANSFPSTFGQGTKVEIK
59	CDR1 VH 8B11	SDAMY
60	CDR2 VH 8B11	AIGIGGDTYYTDSVMG
61	CDR3 VH 8B11	LGMGYYFDY
62	CDR1 VL 8B11	RASQSVSSYLA
63	CDR2 VL 8B11	DASNRAT
64	CDR3 VL 8B11	QQRSNWPPT
65	VH 8B11	MEFVLSWVFLVAILKGVQCEIQLVQSGGGLVHPGGSL RLSCAGSGFTFSSDAMYWVRQAPGKGLEWVSAIGIGG DTYYTDSVMGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARLGMGYYFDYWGQGTLVTVSS
66	VL 8B11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
67	CDR1 VH 20B3	SYDMH
68	CDR2 VH 20B3	VIGTAGDTYYPGSVKG
69	CDR3 VH 20B3	GGMGNYFDY
70	CDR1 VL 20B3	RASQSVSSYLA
71	CDR2 VL 20B3	DASNRAT
72	CDR3 VL 20B3	QQRSNWPLT
73	VH 20B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHW VRQTTGKGLEWVSVIGTAGDTYYPGSVKGRFTISREN AKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARGGMGNYFDYW GQGTLVTVSS
74	VL 20B3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK
75	CDR1 VH 14A2	NYALH
76	CDR2 VH 14A2	LISYDGSRKHYADSVKG
77	CDR3 VH 14A2	LTMVREGG
78	CDR1 VL1 14A2	RASQSVSSSYLA

79	CDR2 VL1 14A2	GASSRAT
80	CDR3 VL1 14A2	QQYGSSPFT
81	CDR1 VL2 14A2	RVSQGISSYLN
82	CDR2 VL2 14A2	SASNLQS
83	CDR3 VL2 14A2	QRTYNAPYT
84	VH 14A2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREGGQGT LVTVSS
85	VL1 14A2	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
86	VL2 14A2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISSYLNWYRQ KPGKVPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDVATYYGQRTYNAPYTFGGGTKVEIK
87	CDR1 VH 20C1	SYAMY
88	CDR2 VH 20C1	AIDTDGGTFYADSVRG
89	CDR3 VH 20C1	LGEGYFFDY
90	CDR1 VL 20C1	RASQSVSSYLA
91	CDR2 VL 20C1	DASNRAT
92	CDR3 VL 20C1	QQRSNWPPT
93	VH 20C1	EAQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCADSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNGLRAEDMAVYFCARLGEGYFFDYWG QGTLVTVSS
94	VL 20C1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGGGTKVEIK
95	Тяжелая цепь OX40.6	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

		VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
96	Легкая цепь OX40.6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
97	Тяжелая цепь OX40.7	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARYGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
98	Легкая цепь OX40.7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

99	Тяжелая цепь OX40.8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
100	Легкая цепь OX40.8	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
101	Тяжелая цепь OX40.9	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTYVREWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
102	Легкая цепь OX40.9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS

		VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
103	Тяжелая цепь OX40.10	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYSGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREGGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
104	Легкая цепь OX40.10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	Тяжелая цепь OX40.11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDSSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREGGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

106	Легкая цепь OX40.11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
107	Тяжелая цепь OX40.12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYSGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
108	Легкая цепь OX40.12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
109	Тяжелая цепь OX40.13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDSSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

		TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
110	Легкая цепь OX40.13	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
111	Тяжелая цепь OX40.14	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYSGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTYVREWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	Легкая цепь OX40.14	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
113	Тяжелая цепь OX40.15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDSSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTYVREWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH

		TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
114	Легкая цепь OX40.15	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
115	Тяжелая цепь OX40.16	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
116	Легкая цепь OX40.16 (содержится в OX40.20, OX40.21, OX40.22)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
117	Тяжелая цепь OX40.17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHW VRQTTGKGLEWVSVIGTAGDTYYPGSVKGRFTISREN

		AKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARGGMGNYFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
118	Легкая цепь OX40.17	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
119	Тяжелая цепь OX40.18	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDVNW VRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAPKFQGRVTM TRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYSSSYNWFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
120	Легкая цепь OX40.18	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPS

		VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
121	Тяжелая цепь OX40.19	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTLVREWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
122	Легкая цепь OX40.19	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
123	Тяжелая цепь OX40.20	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTSGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS

		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
---	Легкая цепь OX40.20	SEQ ID NO: 116
124	Тяжелая цепь OX40.21	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
---	Легкая цепь OX40.21	SEQ ID NO: 116
125	Тяжелая цепь OX40.22	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTSTGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
---	Легкая цепь OX40.22	SEQ ID NO: 116
126	VH (нуклеотидная последовательность) 3F4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG

		CTTCTGGAAACACCTTCACCAGTTATGATGTCAACT GGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGG ATGGGATGGATGAACCCTAACAGTGGTAACACAGG CTATGCACCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGA CCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTTTAT TACTGTGCGAGAATATATAGCAGCTCGTACAACTGG TTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
127	VL 3F4	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
128	VH 14B6	GAGGTGCAGCTGGAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAA AAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGG GTTCTGGATACAGCTTTACCAGCAACTGGATCGGCT GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGGTTCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGG TACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGG AGCAGCCTCAAGGCCTCGGACATCGCCATGTATTAC TGTGCGAGATATGGGGATGACTGGTACTTCGATCTC TGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
129	VL1 14B6	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTTC CAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC

		AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCTCT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTGGCGACTGGCCCATC ACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
130	VL2 14B6	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGG GCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTC GGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT AAA
131	VH 23H3	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGG CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTATGTACTG GGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGG TATCAGCCATTGGTATTGGTGGTGACACATTCTATA CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATGCCAAGAACTCCTTGTCTCTTCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAATGGGAACTGGGTACTTCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
132	VL 23H3	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTC ACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

133	VH 6E1	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTTTGCTATGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGACAGTTATTTCATATGATGGAAGCATTAAATACT ACACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTACGAGAGATGGAAACTATGGTTCGGCGAGATAC TTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
134	VL1 6E1	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGG GCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTAT CAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTC GGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
135	VL2 6E1	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGTAC ACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
136	VH 18E9	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCACAC TCTGGATTCACCTTCACTAGCTCTGCTATGCACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAATGGAT

		ATCAGCTATTGGTACTGGTGGTGACACATACTATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATAAACA GCCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTATATTACTGTG CAAGAGACTTTTACGATATTTTGACTGGTATCTTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
137	VL 18E9	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGG GCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTAT CAGCATAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG CAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTCCCTT CGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
138	VH 8B11	ATGGAGTTTGTGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTA TATTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAATTCAGCTGGTGC AGTCTGGGGGAGGCTTGGTACATCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACCTTCA GTAGCGATGCTATGTACTGGGTTCGCCAGGCTCCAG GAAAAGGTCTGGAGTGGGTATCAGCTATTGGTATTG GTGGTGACACATACTATACAGACTCCGTGATGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCT TGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ATGGCTGTGTATTACTGTGCAAGGCTGGGGATGGGG TACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
139	VL 8B11	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC

		AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCG ACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
140	VH 20B3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACGACATGCACTG GGTCCGCCAAACTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGG TCTCAGTTATTGGTACTGCTGGTGACACATACTATC CAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG AAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGGGGGGATGGGGAACTACTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
141	VL 20B3	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
142	VH 14A2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGGGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

143	VL1 14A2	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA A
144	VL2 14A2	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGG GTGAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAAATTGGTAT CGGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGAT CTATAGTGCATCCAATTTGCAATCTGGAGTCCCATC TCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC TCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGC AACTTATTACGGTCAACGGACTTACAATGCCCCTTA CACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
145	VH 20C1	GAGGCTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGAC TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGTACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGT ATCAGCTATTGATACTGATGGTGGCACATTCTATGC AGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACGG CCTGAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACTTGGGGAAGGGTACTTCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
146	VL 20C1	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC

		TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
147	Тяжелая цепь OX40.6	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGG CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTATGTACTG GGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGG TATCAGCCATTGGTATTGGTGGTGACACATTCTATA CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATGCCAAGAACTCCTTGTCTCTTCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAATGGGAACTGGGTACTTCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA

		AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCCCCGGGT
148	Легкая цепь OX40.6	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTC ACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
149	Тяжелая цепь OX40.7	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACATCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGG CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTATGTACTG GGTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGG TATCAGCCATTGGTATTGGTGGTGACACATTCTATA

		CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATGCCAAGAACTCCTTGTCTCTTCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGATATGGAACTGGGTACTTCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCCCCGGGT

150	Легкая цепь OX40.7	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTC ACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
151	Тяжелая цепь OX40.8	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC

		TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
152	Легкая цепь OX40.8	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC

		GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
153	Тяжелая цепь OX40.9	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTTACGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC

		AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
154	Легкая цепь OX40.9	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT

155	Тяжелая цепь OX40.10	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATAGTGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGGGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC

		ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
156	Легкая цепь OX40.10	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
157	Тяжелая цепь OX40.11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATAGTAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGGGGGGCCA

		GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
158	Легкая цепь OX40.11	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC

		ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
159	Тяжелая цепь OX40.12	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATAGTGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA

		GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
160	Легкая цепь OX40.12	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC

		AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
161	Тяжелая цепь OX40.13	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATAGTAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTATGGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG

		TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
162	Легкая цепь OX40.13	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
163	Тяжелая цепь OX40.14	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG

		GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATAGTGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTTACGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA

		TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
164	Легкая цепь OX40.14	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
165	Тяжелая цепь OX40.15	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATAGTAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTTACGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC

		TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
166	Легкая цепь OX40.15	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT

		TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
167	Тяжелая цепь OX40.16	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGC TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGTACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGT ATCAGCTATTGATACTGATGGTGGCACATTCTATGC AGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACTTGGGGAAGGGTACTTCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC

		ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
168	Легкая цепь OX40.16 (содержится в OX40.20, OX40.21, OX40.22)	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG

		TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TAG
169	Тяжелая цепь OX40.17	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACGACATGCACTG GGTCCGCCAAACTACAGGAAAAGGTCTGGAGTGGG TCTCAGTTATTGGTACTGCTGGTGACACATACTATC CAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG AAAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGGGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGGGGGGATGGGGAACTACTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA

		GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
170	Легкая цепь OX40.17	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TAG
171	Тяжелая цепь OX40.18	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACCAGTTATGATGTCAACT GGGTGCGACAGGCCACTGGACAAGGGCTTGAGTGG ATGGGATGGATGAACCCTAACAGTGGTAACACAGG CTATGCACCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGA

		CCAGGGACACCTCCATAAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTTTAT TACTGTGCGAGAATATATAGCAGCTCGTACAACTGG TTCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTTG A

172	Легкая цепь OX40.18	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTAC CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TAG
173	Тяжелая цепь OX40.19	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGCTCTGCACTG GGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCACTTATATCATATGATGGAAGCAGGAAACACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAGTATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA CTGTGCGAGTCTTACTCTGGTTCGGGAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC

		ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGTAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCCCCGGGT
174	Легкая цепь OX40.19	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTT TGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACC ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAA

		ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
175	Тяжелая цепь OX40.20	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGC TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGTACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGT ATCAGCTATTGATACTAGTGGTGGCACATTCTATGC AGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACTTGGGGAAGGGTACTTCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT

		CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
---	Легкая цепь OX40.20	SEQ ID NO: 168
176	Тяжелая цепь OX40.21	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGC TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGTACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGT ATCAGCTATTGATACTGATGCTGGCACATTCTATGC AGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACTTGGGGAAGGGTACTTCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC

		ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
---	Легкая цепь OX40.21	SEQ ID NO: 168
177	Тяжелая цепь OX40.22	GAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTT CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGGC TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGTACTGG GTTCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGTCTGGAGTGGGT ATCAGCTATTGATACTAGTACTGGCACATTCTATGC AGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACTCCTTGTATCTTCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACTTGGGGAAGGGTACTTCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC

		CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
---	Легкая цепь OX40.22	SEQ ID NO: 168
178	Эпитоп hOX40	DVVSSKPCKPCTWCNLR
179	Эпитоп hOX40	DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK
180	Пептидный линкер	PVGVV
181	Мотив распознавания сортазы A	LPXTG, где X представляет собой любую аминокислоту

182	Эпитоп hOX40	QNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR
183	Эпитоп hOX40	PCKPCTWCNLR
184	Эпитоп hOX40	QLCTATQDTVCR
185	Эпитоп hOX40	SQNTVCRPCGPGFYN
186	C_H1 С-конца IgG1 (такой же для IgG3 (17-15-15-15), igG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4	VDKRV
187	C_H1 С-конца IgG2	VDKTV
188	Верхний шарнир IgG1	EPKSCDKTHT
189	Верхний шарнир IgG3 (17-15-15-15) (такой же для IgG3 (17-15-15) и IgG3 (17-15))	ELKTPLGDTTHT
190	Верхний шарнир IgG3 (15-15-15) (такой же для IgG3(15))	EPKS
191	Верхний шарнир IgG4	ESKYGPP
192	Средний шарнир IgG1	CPPCP
193	Средний шарнир IgG2	CCVECPPCP
194	Средний шарнир IgG3 (17-15-15-15)	$CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$
195	Средний шарнир IgG3 (17-15-15)	$CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)_2$
196	Средний шарнир IgG3 (17-15)	$CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)_1$
197	Средний шарнир IgG3 (15-15-15)	$CDTPPPCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)_2$
198	Средний шарнир IgG3 (15)	CDTPPPCPRCP
199	Средний шарнир IgG4	CPSCP

200	Нижний шарнир IgG1 (такой же для IgG3 (17-15-15-15), IgG3 (17-15-15), IgG3 (17-15), IgG3 (15-15-15), IgG3 (15) и IgG4)	APELLGG
201	Нижний шарнир IgG2	APPVAG
202	CH1 IgG1 дикого типа человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
203	CH1 IgG2 дикого типа человека	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
204	CH2 IgG1 дикого типа человека	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
205	CH2 IgG2 дикого типа человека	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
206	CH3 IgG1 дикого типа человека	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
207	CH3 IgG2 дикого типа человека	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
208	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPPVAG
209	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPPVAG
210	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAPPVAG
211	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPPVAG
212	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPPVAG
213	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPPVAGX
214	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPPVAGX
215	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAPPVAGX

216	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPPVAGX
217	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPPVAGX
218	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPELLGG
219	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPELLGG
220	Альтернативный шарнир	ERKCCSVECPPCPAPELLGG
221	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPELLGG
222	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPELLGG
223	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPELLG
224	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPELLG
225	Альтернативный шарнир	ERKCCSVECPPCPAPELLG
226	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPELLG
227	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPELLG
228	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAP
229	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAP
230	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAP
231	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAP
232	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAP
233	Часть шарнира	PVAG
234	Часть шарнира	ELLG
235	Часть шарнира	ELLGG
236	Часть шарнира	SCDKTHT
237	Часть шарнира	CCVE
238	Шарнир IgG2 дикого типа человека	ERKCCVECPPCPAPPVAG
239	Шарнир с C219S IgG2 дикого типа человека	ERKSCVECPPCPAPPVAG
240	Шарнир IgG2/IgG1	ERKCCVECPPCPAPELLGG
241	Шарнир IgG2 (C219S)/IgG1	ERKSCVECPPCPAPELLGG
242	Шарнир IgG1 дикого типа человека	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

243	CH2 с A330S/P331S IgG1 человека	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK
244	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
245	IgG1-IgG2-1gG1f2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
246	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
247	IgG1-IgG2CS-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCPAPP

		VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
248	IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
249	IgG2-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
250	IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

251	IgG2CS-IgG1f2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
252	IgG1-IgG2-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
253	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
254	IgG2-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE

		PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
255	IgG2CS-IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
256	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
257	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
258	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP

		VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
259	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
260	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
261	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

262	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
263	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
264	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
265	IgG2.5G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE

		PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
266	IgG2.5G1-V27	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
267	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
268	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED**G** EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
269	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF

		GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**ED**G** EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
270	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED**G** EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP**R**PIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
271	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**ED**G** EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP**R**PIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
272	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**E**HEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE

		SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
273	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**E**HEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKG**F**PAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
274	IgG2.3G1-AY-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
275	IgG2.3G1-AY-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED**G** EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
276	IgG2.3G1-AY-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**ED**G**

		EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
277	IgG2.3G1-AY-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED**G** EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**R**PIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
278	IgG2.3G1-AY-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGG**D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**ED**G** EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**R**PIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
279	IgG2.3G1-AY-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLG**DD**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**ED**G** EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**R**PIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

280	IgG2.3G1-AY-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAP**D** LLG**DD**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS**D**EDG EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**R**PIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
281	IgG2.3G1-AY-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV**E**HEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKA**F**PAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
282	OX40.6-Vh-hHC-IgG2.3	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
283	OX40.8-Vh-hHC-IgG2.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG

		TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
284	OX40.16-Vh-hHC-IgG2.3	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
285	OX40.6-Vh-hHC- IgG2.3G1	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCV ECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

286	OX40.8-Vh-hHC-IgG2.3G1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
287	OX40.16-Vh-hHC-IgG2.3G1	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
288	OX40.6-Vh-hHC-IgG2.3G1-V27	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCV ECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
289	OX40.8-Vh-hHC- IgG2.3G1-V27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
290	OX40.16-Vh-hHC- IgG2.3G1-V27	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
291	OX40.6-Vh-hHC-IgG2.5	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSNYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIGIGGDTFYTDSVKGRFTISRDN AKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARMGTGYFFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC

		VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
292	OX40.8-Vh-hHC-IgG2.5	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYALHW VRQAPGKGLEWVALISYDGSRKHYADSVKGRFSISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLTMVREWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
293	OX40.16-Vh-hHC-IgG2.5	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDGGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
294	OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ

		GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
295	OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5G1	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
296	OX40.21-Vh-hHC-IgG2.5G1-V27	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

297	IgG2.3G1-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
298	CH2 с A330S/P331S IgG1 человека	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK
299	Тяжелая цепь – ниволумаб	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGL EWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQ MNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK**
300	Легкая цепь – ниволумаб	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLI

		YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQSSNWPR TFGQGTKVEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**
301	Вариабельная область тяжелой цепи – ниволумаб	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISR DNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVTVSS
302	Вариабельная область легкой цепи – ниволумаб	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK
303	HCDR1 – ниволумаб	NSGMH
304	HCDR2 – ниволумаб	VIWYDGSKRYYADSVKG
305	HCDR3 – ниволумаб	NDDY
306	LCDR1 – ниволумаб	RASQSVSSYLA
307	LCDR2 – ниволумаб	DASNRAT
308	LCDR3 – ниволумаб	QQSSNWPRT
309	Вариабельная область тяжелой цепи – ипилимумаб (от WO01/014424)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHW VRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWG QGTLVTVSS
310	Вариабельная область легкой цепи – ипилимумаб (от WO01/014424)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
311	HCDR1 – ипилимумаб (от WO01/014424)	SYTMH
312	HCDR2 – ипилимумаб (от WO01/014424)	FISYDGNNKYYADSVKG

313	HCDR3 – ипилимумаб (от WO01/014424)	TGWLGPFDY
314	LCDR1 – ипилимумаб (от WO01/014424)	RASQSVGSSYLA
315	LCDR2 – ипилимумаб (от WO01/014424)	GAFSRAT
316	LCDR3 – ипилимумаб (от WO01/014424)	QQYGSSPWT
317	HCDR2 в OX40.21	AIDTDAGTFYADSVRG
318	VH в OX40.21	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMYW VRQAPGKGLEWVSAIDTDAGTFYADSVRGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLGEGYFFDYWGQ GTLVTVSS

В таблице 23 представлены последовательности зрелых вариабельных областей тяжелых и легких цепей и указаны последовательности с сигнальными пептидами.

Эквиваленты:

Специалисты в настоящей области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ стимуляции антигенспецифического ответа Т-клеток, предусматривающий контактирование Т-клетки с выделенным антителом, которое связывается с OX40 (антитело к OX40), так что стимулируется антигенспецифический ответ Т-клеток, и где анти-OX40-антитело содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 87, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 317, и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность 89, и CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 90, CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 91 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 92.

2. Способ уменьшения или истощения количества регуляторных Т-клеток в опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела, которое связывается с OX40 (антитело к OX40), так что количество регуляторных Т-клеток уменьшается или истощается, и где анти-OX40-антитело содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 87, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 317, и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность 89, и CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 90, CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 91 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 92.

3. Способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела, которое связывается с OX40 человека (антитело к OX40), так что рост опухолевых клеток ингибируется, и где анти-OX40-антитело содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 87, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 317, и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность 89, и CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 90, CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 91 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 92.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором анти-OX40-антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 318 и вариабельную область легкой цепи включает последовательность SEQ ID NO: 94.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором анти-OX40-антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 124, а легкая цепь содержит последовательность SEQ. ID №: 116.

6. Способ по любому из пп. 1, 4 и 5, в котором контактирование осуществляют in vitro или у субъекта in vivo.

7. Способ по любому из пп. 1 и 4-6, в котором Т-клетки представляют собой эффекторные Т-клетки (клетки Teff), вспомогательные Т-клетки (клетки Th), цитотоксические Т-клетки (клетки Tc) или их комбинации.

8. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств субъекту.

9. Способ по п. 8, в котором один или несколько дополнительных терапевтических средств представляют собой антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3, антитело против CTLA-4, антитело против TGFβ. или их комбинации.

10. Способ по п.8 или 9, где один или несколько дополнительных терапевтических средств вводят субъекту одновременно с антителом против OX40.

11. Способ по любому из пп. 1 и 4-10, в котором субъект имеет опухоль.

12. Способ по любому из пп. 2-11, в котором опухоль ассоциирована с раком, выбранным из рака шейки матки, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи. или их комбинации.

VH антитела 3F4 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: 1-08
Сегмент D: 6-6
Сегмент J: JH5b

```
          Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S
1         CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA

                                                          CDR1
          V   K   V   S   C   K   A   S   G   N   T   F   T   S   Y   D   V
52        GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA AAC ACC TTC ACC AGT TAT GAT GTC

                                                                  CDR2
          N   W   V   R   Q   A   T   G   Q   G   L   E   W   M   G   W   M
103       AAC TGG GTG CGA CAG GCC ACT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATG

          N   P   N   S   G   N   T   G   Y   A   P   K   F   Q   G   R   V
154       AAC CCT AAC AGT GGT AAC ACA GGC TAT GCA CCG AAG TTC CAG GGC AGA GTC

          T   M   T   R   N   T   S   I   S   T   A   Y   M   E   L   S   S
205       ACC ATG ACC AGG AAC ACC TCC ATA AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC

                                                          CDR3
          L   R   S   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   I   Y   S   S
256       CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AGA ATA TAT AGC AGC

          S   Y   N   W   F   D   P   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S
307       TCG TAC AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

          S
358       TCA
```

Фиг. 1A

VK антитела 3F4 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK4

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205       ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   L   T   F   G   G   G   T
256       TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307       AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 1B

VH антитела 14B6 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: 5-51
Сегмент D: 3-9
Сегмент J: JH2

```
          E   V   Q   L   E   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   E   S
1     GAG GTG CAG CTG GAG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT

                                                        CDR1
          L   K   I   S   C   K   G   S   G   Y   S   F   T   S   N   W   I
52    CTG AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC AAC TGG ATC

                                                            CDR2
          G   W   V   R   Q   M   P   G   K   G   L   E   W   M   G   F   I
103   GGC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG TTC ATC

          Y   P   G   D   S   D   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   Q   V
154   TAT CCT GGT GAC TCT GAT ACC AGG TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC

          T   I   S   A   D   K   S   I   S   T   A   Y   L   Q   W   S   S
205   ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC

                                                        CDR3
          L   K   A   S   D   I   A   M   Y   Y   C   A   R   Y   G   D   D
256   CTC AAG GCC TCG GAC ATC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA TAT GGG GAT GAC

          W   Y   F   D   L   W   G   R   G   T   L   V   T   V   S   S
          TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA
```

Фиг. 2A

VK1 антитела 14B6 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK5

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1       GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  _CDR1___________________________________
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52      AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  _CDR2____
          W   F   Q   Q   R   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103     TGG TTC CAA CAG AGA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          _______________________
          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154     TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   S   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205     ACA GAC TTC TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      _CDR3_____________________________
          Y   Y   C   Q   Q   R   G   D   W   P   I   T   F   G   Q   G   T
256     TAT TAC TGT CAG CAG CGT GGC GAC TGG CCC ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA

          R   L   E   I   K
307     CGA CTG GAG ATT AAA
```

Фиг. 2B

VK2 антитела 14B6 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L15
Сегмент J: JK5

```
          D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1         GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
          R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52        AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103       TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

          S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205       ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   R   I   T   F   G   Q   G
256       TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CGG ATC ACC TTC GGC CAA GGG

          T   R   L   E   I   K
307       ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

Фиг. 2C

VH антитела 23H3 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: DP-44
Сегмент J: JH4b

```
          E   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   H   P   G   G   S
1     GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC

                                                        CDR1
          L   R   L   S   C   A   G   S   G   F   T   F   S   N   Y   A   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GCT ATG

                                                                CDR2
          Y   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   A   I
103   TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTA TCA GCC ATT

          G   I   G   G   D   T   F   Y   T   D   S   V   K   G   R   F   T
154   GGT ATT GGT GGT GAC ACA TTC TAT ACA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC

          I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   S   L   Q   M   N   S   L
205   ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCC TTG TCT CTT CAA ATG AAC AGC CTG

                                                    CDR3
          R   A   E   D   M   A   V   Y   Y   C   A   R   M   G   T   G   Y
256   AGA GCC GAG GAC ATG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA ATG GGA ACT GGG TAC

          F   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307   TTC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 3A

VK антитела 23H3 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK3

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205       ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   L   T   F   G   P   G   T
256       TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC

          K   V   D   I   K
307       AAA GTG GAT ATC AAA
```

Фиг. 3B

VH антитела 6E1 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: 3-30.3
Сегмент D: 3-10
Сегмент J: JH1

```
          Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1     CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                          _CDR1_____________
          L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   F   A   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TTT GCT ATG

                                                                  _CDR2____
          H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   T   V   I
103   CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG ACA GTT ATT

          S   Y   D   G   S   I   K   Y   Y   T   D   S   V   K   G   R   F
154   TCA TAT GAT GGA AGC ATT AAA TAC TAC ACA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

          T   F   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205   ACC TTC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACT CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                          _CDR3_____________
          L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   T   R   D   G   N   Y
256   CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAT GGA AAC TAT

          G   S   A   R   Y   F   Q   H   W   G   Q   G   T   L   V   T   V
307   GGT TCG GCG AGA TAC TTC CAG CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC

          S   S
358   TCC TCA
```

Фиг. 4A

VK1 антитела 6E1 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L15
Сегмент J: JK1

```
          D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1     GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
          R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52    AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

          S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154   TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205   ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T
256   TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307   AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 4B

VK2 антитела 6E1 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK2

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205       ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   Y   T   F   G   Q   G   T
256       TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

          K   L   E   I   K
307       AAG CTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 4C

VH антитела 18E9 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: DP-44
Сегмент D: 3-9
Сегмент J: JH4b

```
          E   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   H   P   G   G   S
1     GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTT CAT CCT GGG GGG TCC

                                                          CDR1
          L   R   L   S   C   A   H   S   G   F   T   F   T   S   S   A   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA CAC TCT GGA TTC ACC TTC ACT AGC TCT GCT ATG

                                                              CDR2
          H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   I   S   A   I
103   CAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAA TGG ATA TCA GCT ATT

          G   T   G   G   D   T   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T
154   GGT ACT GGT GGT GAC ACA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC

          I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   I   N   S   L
205   ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATA AAC AGC CTG

                                                      CDR3
          R   A   E   D   M   A   V   Y   Y   C   A   R   D   F   Y   D   I
256   AGA GCC GAG GAC ATG GCT GTA TAT TAC TGT GCA AGA GAC TTT TAC GAT ATT

          L   T   G   I   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S
307   TTG ACT GGT ATC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

          S
358   TCA
```

Фиг. 5A

VK антитела 18E91 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L5
Сегмент J: JK1

```
          D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   V   S   A   S   V   G   D
1         GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC GTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
          R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52        AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   H   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   A   A
103       TGG TAT CAG CAT AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA

          S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205       ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   A   N   S   F   P   S   T   F   G   Q   G   T
256       TAC TAT TGT CAA CAG GCT AAT AGT TTC CCT TCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307       AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 5B

VH антитела 8B11 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: DP-44
Сегмент J: JH4b

```
          E   I   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   H   P   G   G   S
1     GAA ATT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC

                                                          CDR1
          L   R   L   S   C   A   G   S   G   F   T   F   S   S   D   A   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC GAT GCT ATG

                                                              CDR2
          Y   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   A   I
103   TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTA TCA GCT ATT

          G   I   G   G   D   T   Y   Y   T   D   S   V   M   G   R   F   T
154   GGT ATT GGT GGT GAC ACA TAC TAT ACA GAC TCC GTG ATG GGC CGA TTC ACC

          I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L
205   ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG

                                                      CDR3
          R   A   E   D   M   A   V   Y   Y   C   A   R   L   G   M   G   Y
256   AGA GCC GAG GAC ATG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGG CTG GGG ATG GGG TAC

          Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307   TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 6A

VK антитела 8B11 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK1

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205       ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   P   T   F   G   Q   G   T
256       TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307       AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 6B

VH антитела 20B3 к OX40 (hIgG2)

Сегмент V: 3-13
Сегмент J: JH4b

```
          E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
1         GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC

                                                        _CDR1_____________
          L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   D   M
52        CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC GAC ATG

          ____                                                      _CDR2____
          H   W   V   R   Q   T   T   G   K   G   L   E   W   V   S   V   I
103       CAC TGG GTC CGC CAA ACT ACA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT

          ____________________________________________________________
          G   T   A   G   D   T   Y   Y   P   G   S   V   K   G   R   F   T
154       GGT ACT GCT GGT GAC ACA TAC TAT CCA GGC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC

          I   S   R   E   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L
205       ATC TCC AGA GAA AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG

                                                    _CDR3_________________
          R   A   G   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   M   G   N
256       AGA GCC GGG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GGG GGG ATG GGG AAC

          ____________________
          Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307       TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 7A

VK антитела 20B3 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: L6
Сегмент J: JK4

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
          W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103       TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

          S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154       TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205       ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                      CDR3
          Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   L   T   F   G   G   G   T
256       TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307       AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 7B

VH антитела 14A2 к OX40 (hIgG1)

Сегмент V: 3-30.3
Сегмент J: JH5b

```
        Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1       CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                        CDR1
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   A   L
52      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GCT CTG

                                                            CDR2
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   L   I
103     CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA

        S   Y   D   G   S   R   K   H   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154     TCA TAT GAT GGA AGC AGG AAA CAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        S   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205     AGT ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                        CDR3
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   S   L   T   M   V
256     CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGT CTT ACT ATG GTT

        R   E   G   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307     CGG GAG GGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 8A

VK1 антитела 14A2 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: A27
Сегмент J: JK3

```
          E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1         GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
          R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52        AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

                                                                        CDR2
          A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103       GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

          A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154       GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

          G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205       GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

                      CDR3
          V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   F   T   F   G   P   G
256       GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG

          T   K   V   D   I   K
307       ACC AAA GTG GAT ATC AAA
```

Фиг. 8B

VK2 антитела 14A2 к OX40 (hKappa)

Сегмент V: O14/O4
Сегмент J: JK4

```
          D   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1     GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                CDR1
          R   V   T   I   T   C   R   V   S   Q   G   I   S   S   Y   L   N
52    AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GTG AGT CAG GGC ATT AGC AGT TAT TTA AAT

                                                                CDR2
          W   Y   R   Q   K   P   G   K   V   P   K   L   L   I   Y   S   A
103   TGG TAT CGG CAG AAA CCA GGG AAA GTT CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA

          S   N   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154   TCC AAT TTG CAA TCT GGA GTC CCA TCT CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   V   A   T
205   ACA GAT TTC ACT CTC ACT ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT

                    CDR3
          Y   Y   G   Q   R   T   Y   N   A   P   Y   T   F   G   G   G   T
256   TAT TAC GGT CAA CGG ACT TAC AAT GCC CCT TAC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307   AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 8C

VH антитела 20C1 к OX40 (hIgG1)

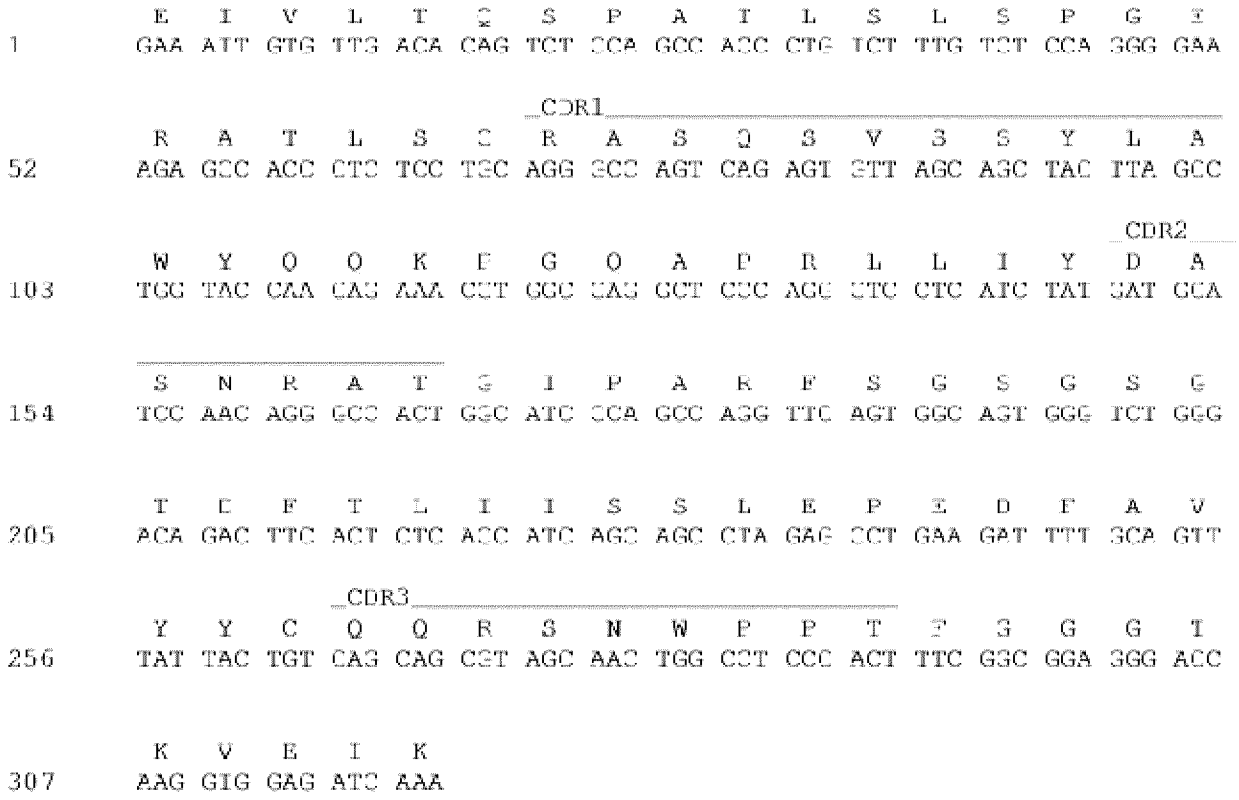
Сегмент V: DP-44
Сегмент J: JH4b

```
          E   A   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   H   P   G   G   S
1     GAG GCT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTT CAT CCT GGG GGG TCC

                                                        _CDR1_____________
          L   R   L   S   C   A   D   S   G   F   T   F   S   S   Y   A   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GAC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG

      _____                                                     _CDR2_____
          Y   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   A   I
103   TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTA TCA GCT ATT

      ____________________________________________________________________
          D   T   D   G   G   T   F   Y   A   D   S   V   R   G   R   F   T
154   GAT ACT GAT GGT GGC ACA TTC TAT GCA GAC TCC GTG CGG GGC CGA TTC ACC

          I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   G   L
205   ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC GGC CTG

                                                    _CDR3_________________
          R   A   E   D   M   A   V   Y   F   C   A   R   L   G   E   G   Y
256   AGA GCC GAG GAC ATG GCT GTG TAT TTC TGT GCA AGA CTT GGG GAA GGG TAC

      ________________________
          F   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307   TTC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 9A

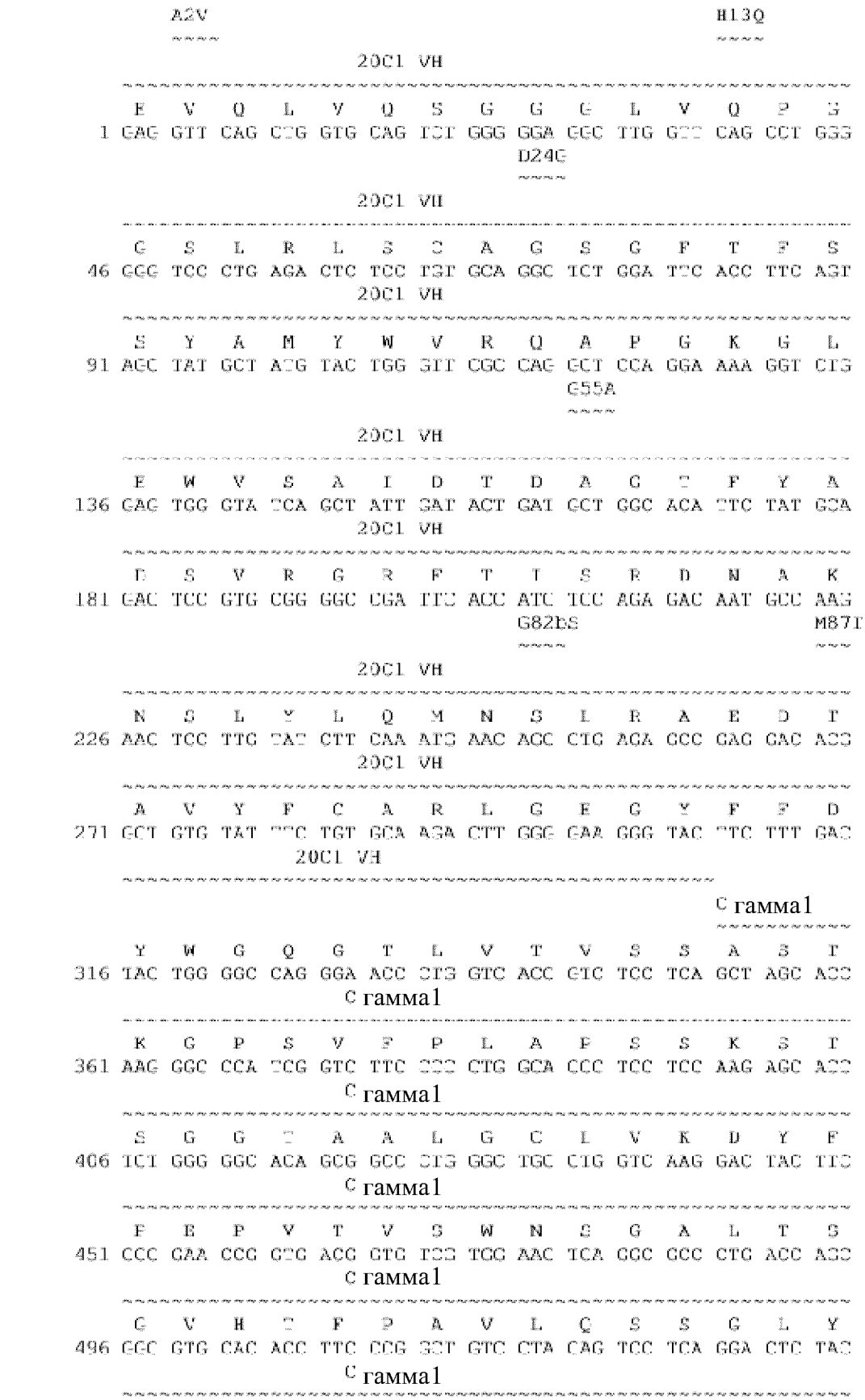
VK антитела 20C1 к OX40 (hKappa)

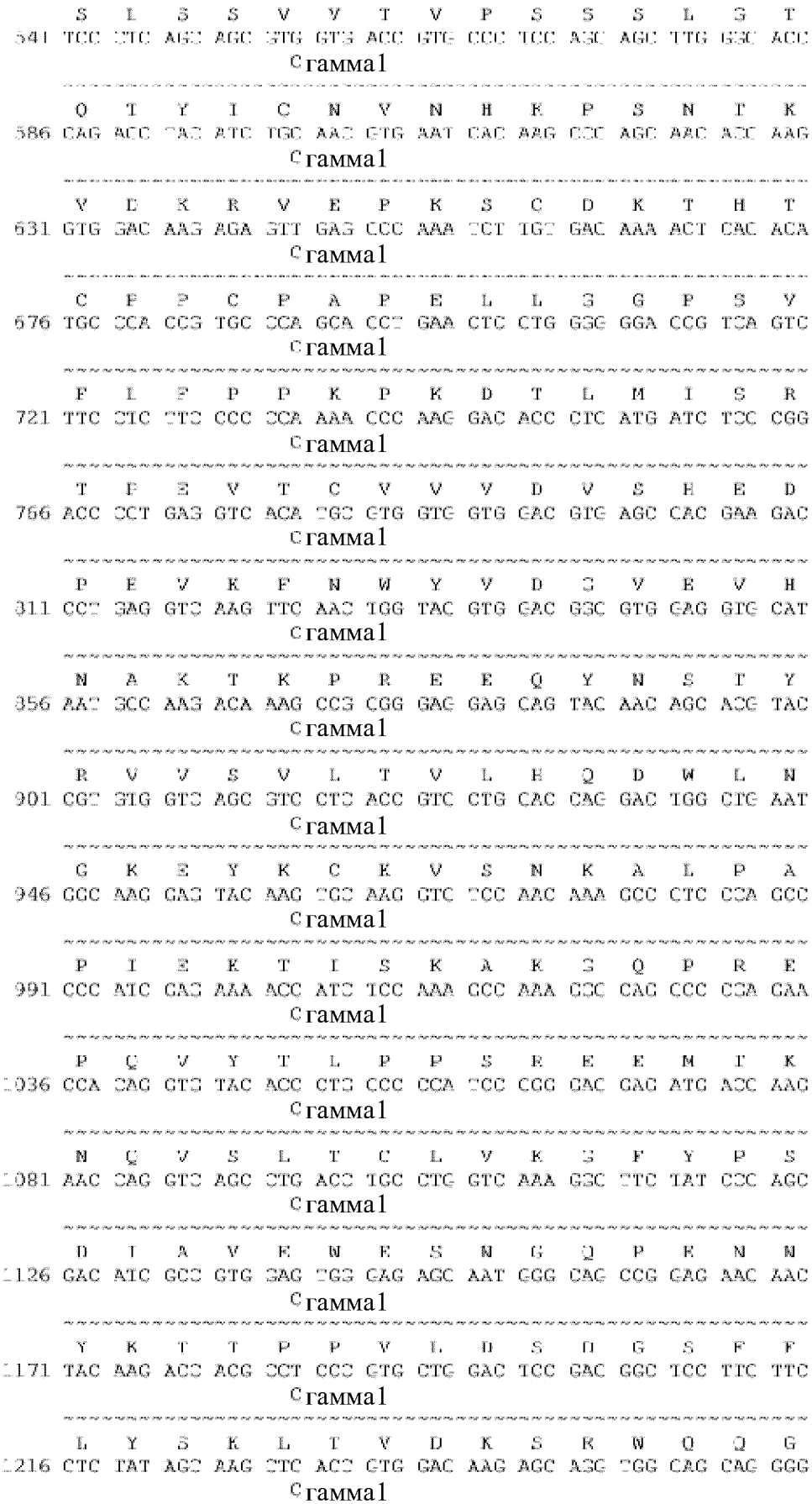
Сегмент V: L6
Сегмент J: JK4

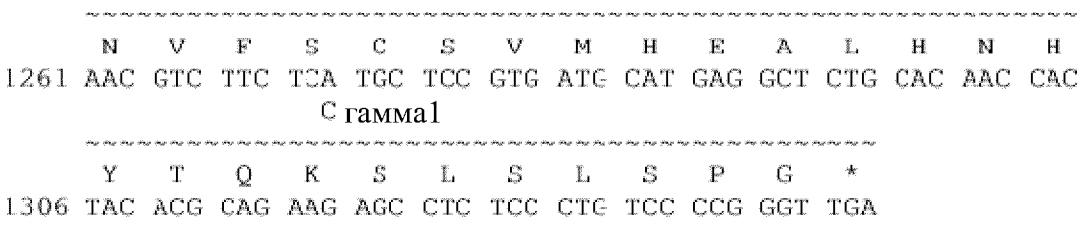


Фиг. 9B

VH антитела OX-40.21

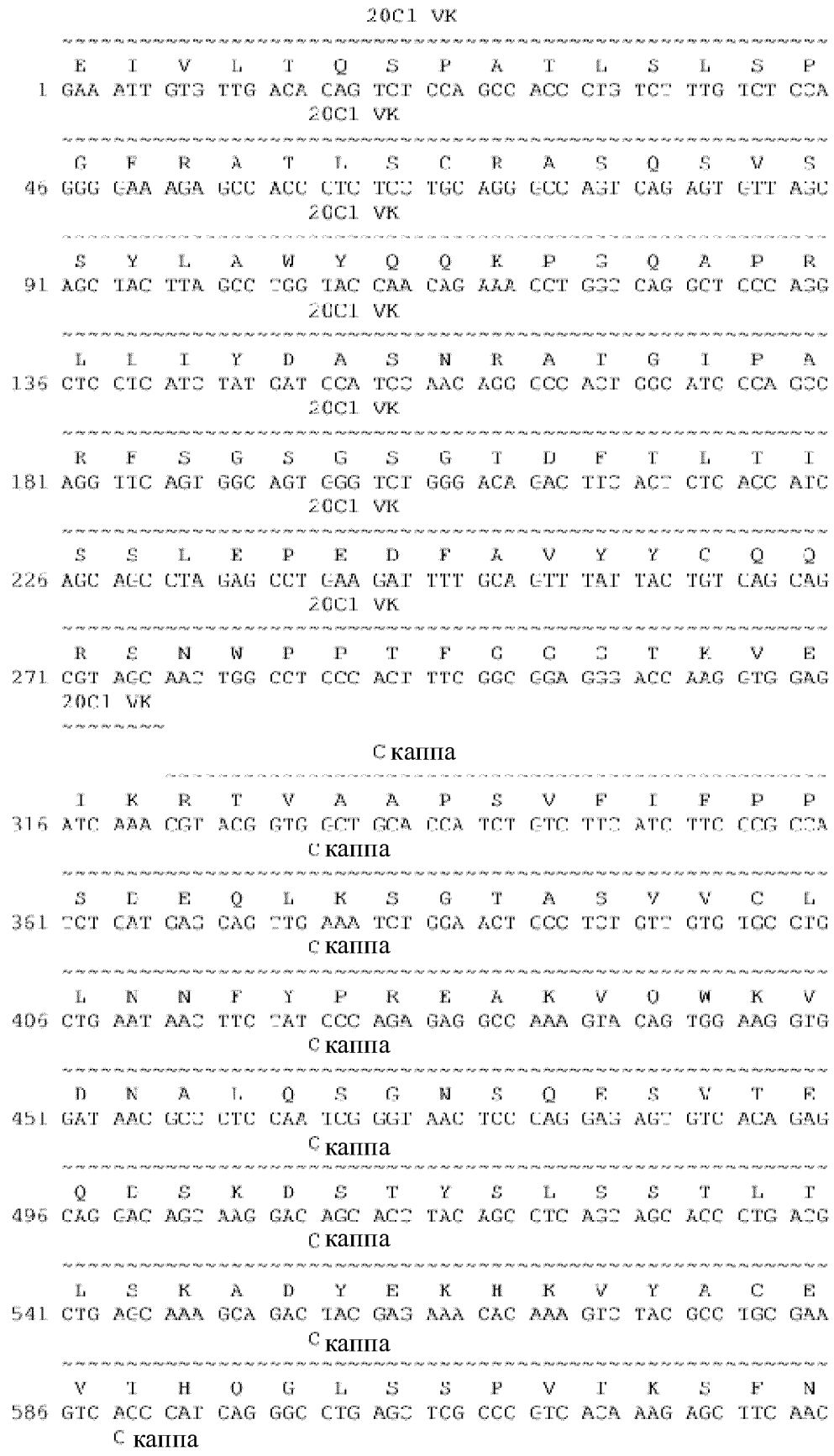



S L S S V V T V P S S S L G T
541 TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC
Cгамма1
Q T Y I C N V N H K P S N T K
586 CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
Cгамма1
V D K R V E P K S C D K T H T
631 GTG GAC AAG AGA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
Cгамма1
C P P C P A P E L L G G P S V
676 TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
Cгамма1
F L F P P K P K D T L M I S R
721 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
Cгамма1
T P E V T C V V V D V S H E D
766 ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC
Cгамма1
P E V K F N W Y V D G V E V H
811 CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
Cгамма1
N A K T K P R E E Q Y N S T Y
856 AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
Cгамма1
R V V S V L T V L H Q D W L N
901 CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
Cгамма1
G K E Y K C K V S N K A L P A
946 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC
Cгамма1
P I E K T I S K A K G Q P R E
991 CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGC CAG CCC CGA GAA
Cгамма1
P Q V Y T L P P S R E E M T K
1036 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAC GAG ATG ACC AAG
Cгамма1
N Q V S L T C L V K G F Y P S
1081 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC
Cгамма1
D I A V E W E S N G Q P E N N
1126 GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
Cгамма1
Y K T T P P V L D S D G S F F
1171 TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC
Cгамма1
L Y S K L T V D K S R W Q Q G
1216 CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG
Cгамма1


N V F S C S V M H E A L H N H
1261 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC
C гамма1
Y T Q K S L S L S P G *
1306 TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCC CCG GGT TGA

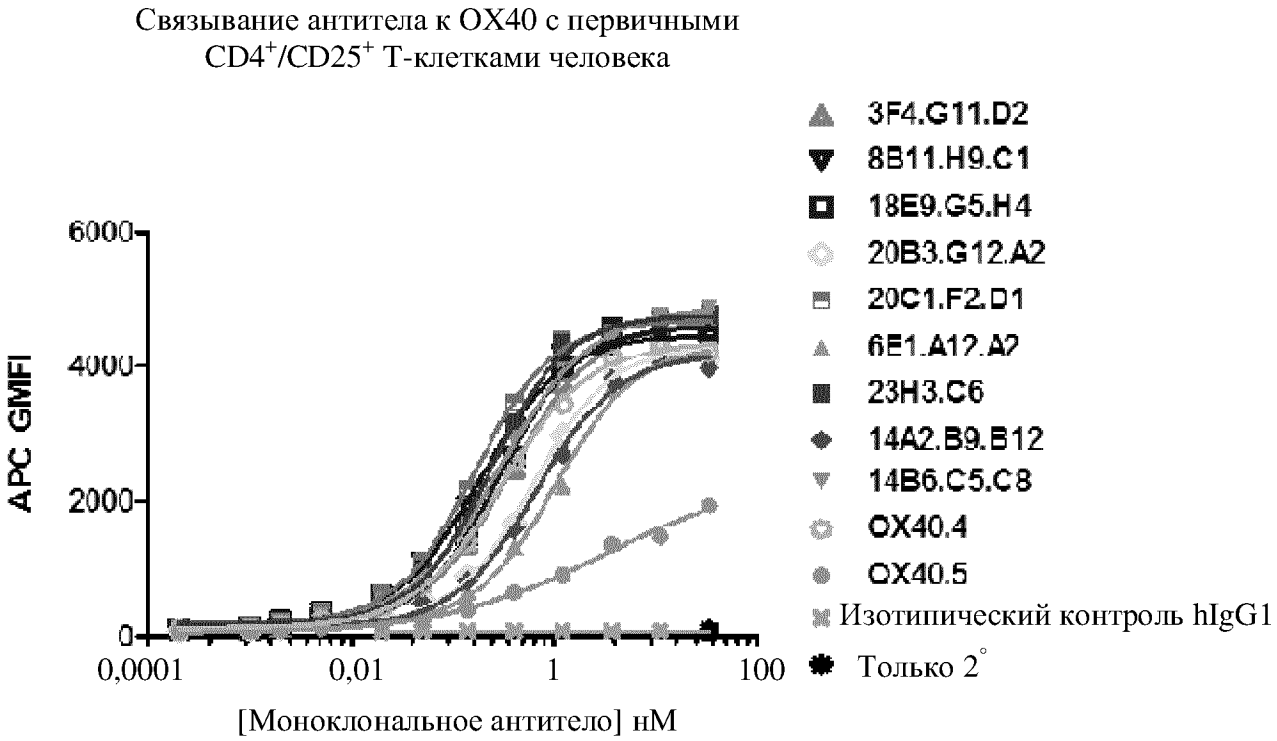
Фиг. 10A

VK антитела OX-40.21

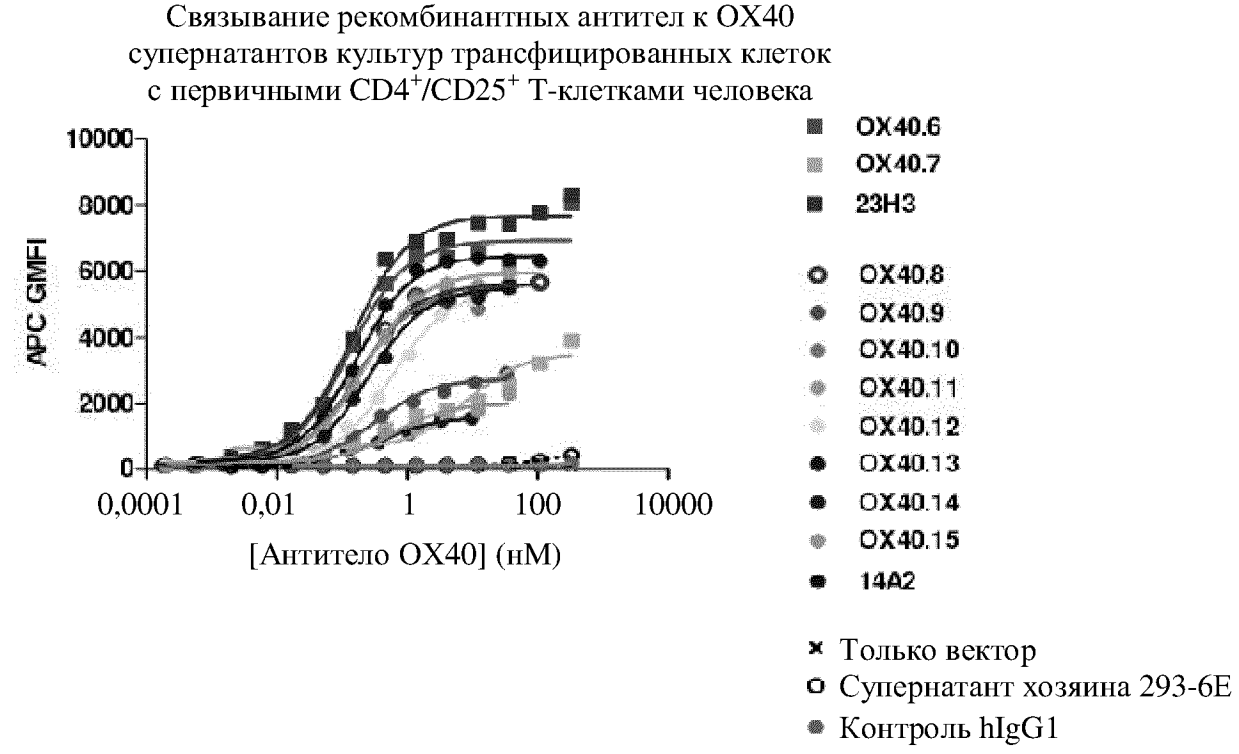




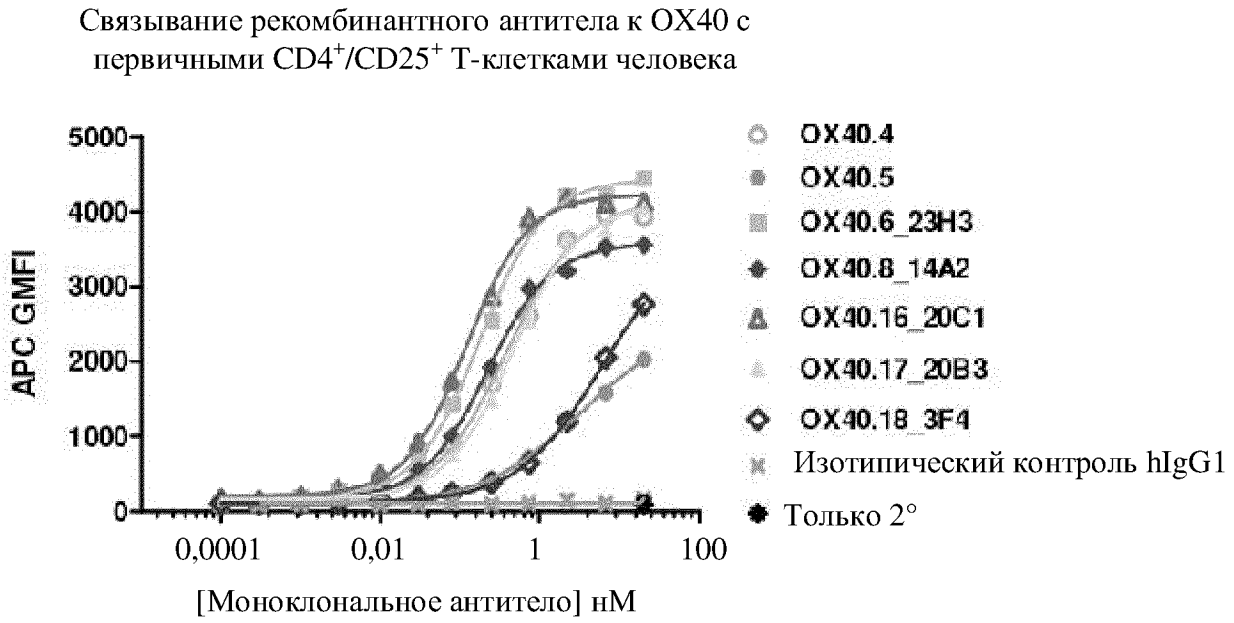
Фиг. 10B



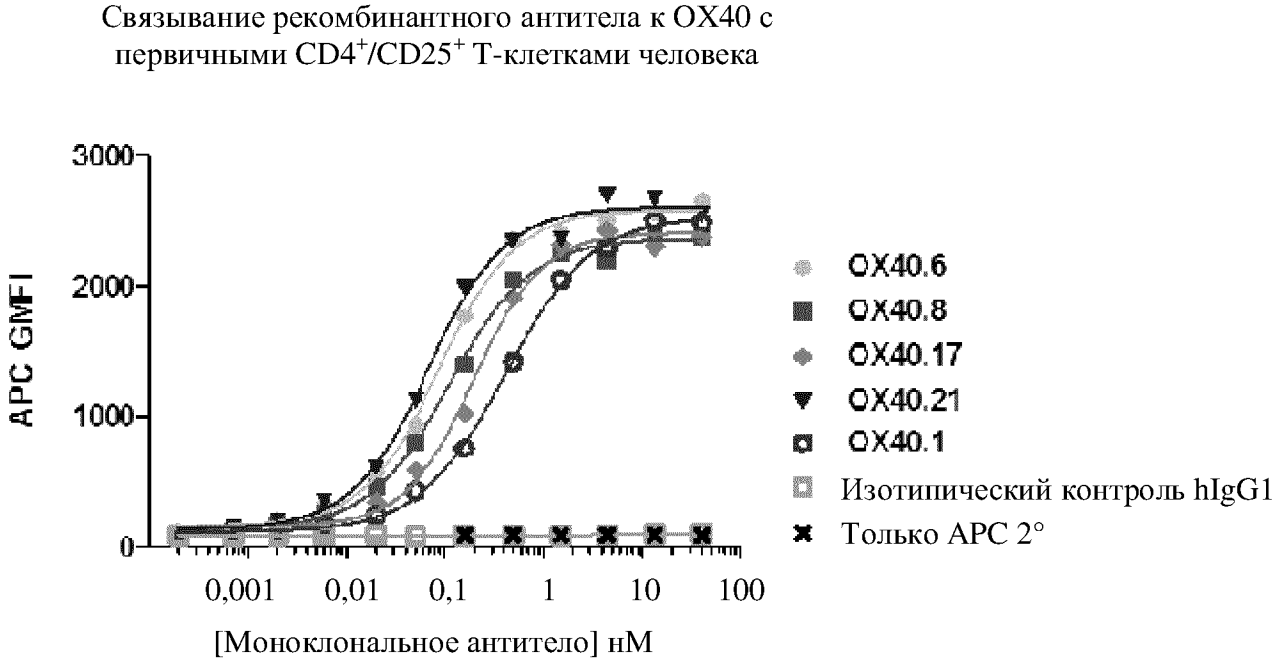
Фиг. 11A



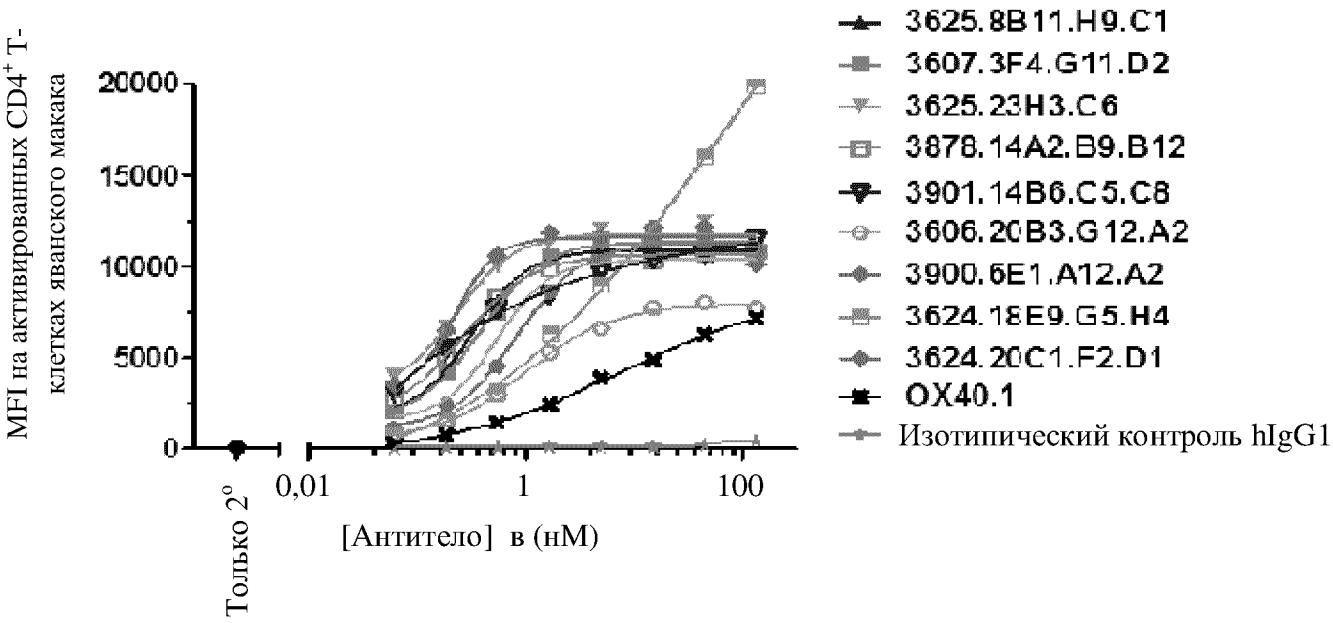
Фиг. 11B



Фиг. 11C

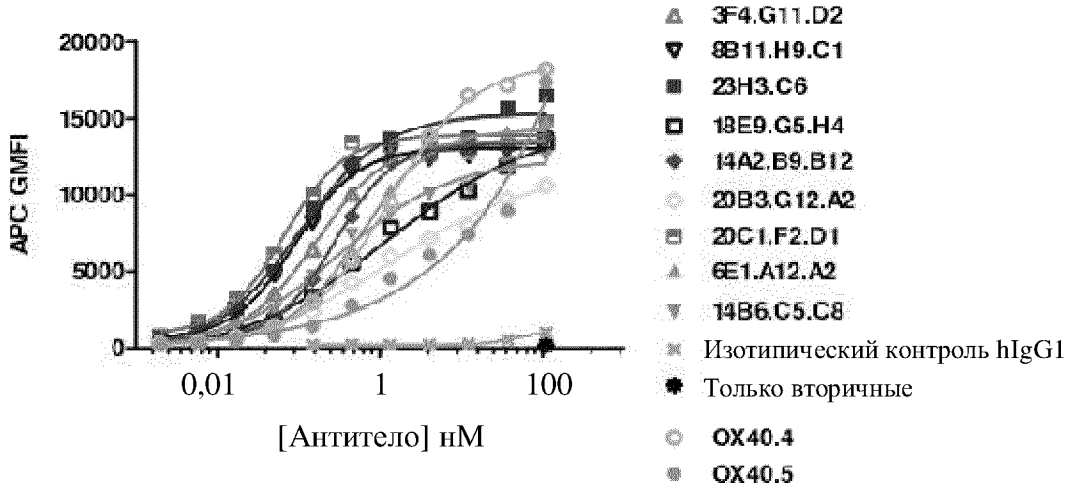


Фиг. 11D



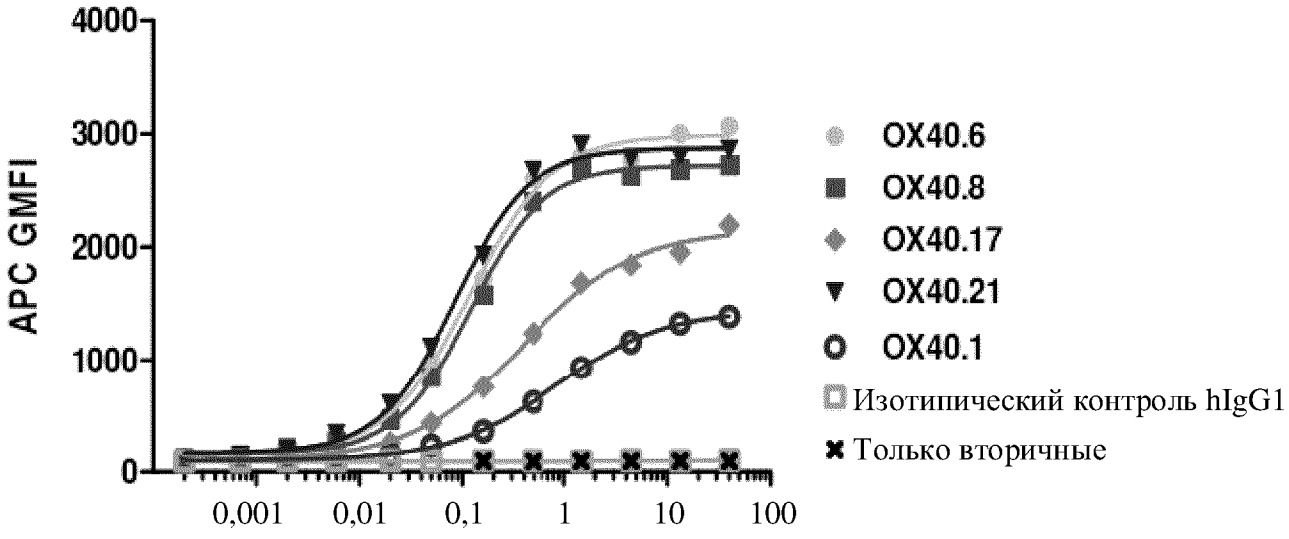
Фиг. 12A

Связывание антитела к OX40 с первичными CD4+/CD25+ Т-клетками яванского макака

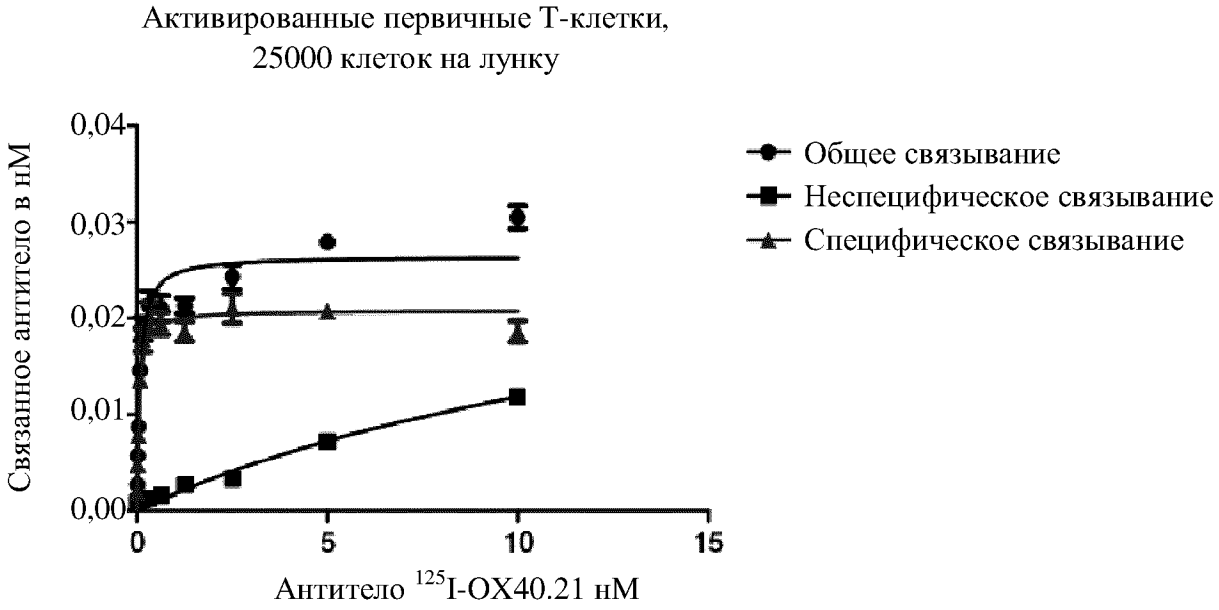


Фиг. 12B

Связывание рекомбинантного антитела к OX40 с
первичными $CD4^+/CD25^+$ Т-клетками яванского макака



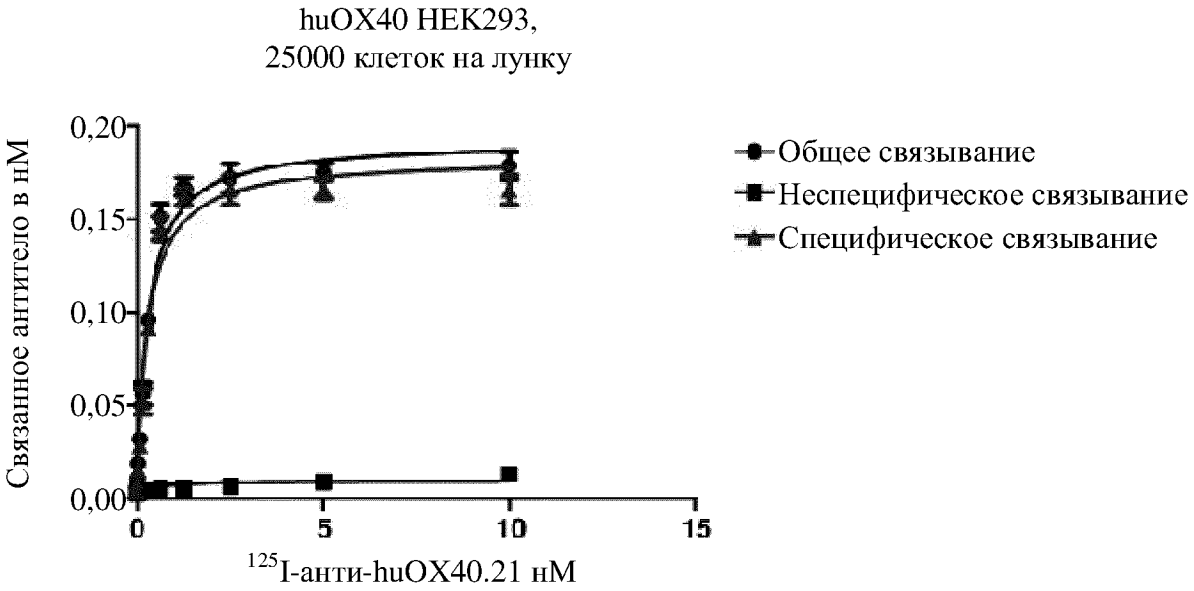
Фиг. 12C



	Специфическое связывание, донор 6, 25e3
Bmax	0,02081
Kd	0,04966

Рецепторов на клетку = Bmax (6e10)/кол-во клеток на лунку
= 0,021*6e10/25000
= 50400 рецепторов OX-40 на клетку

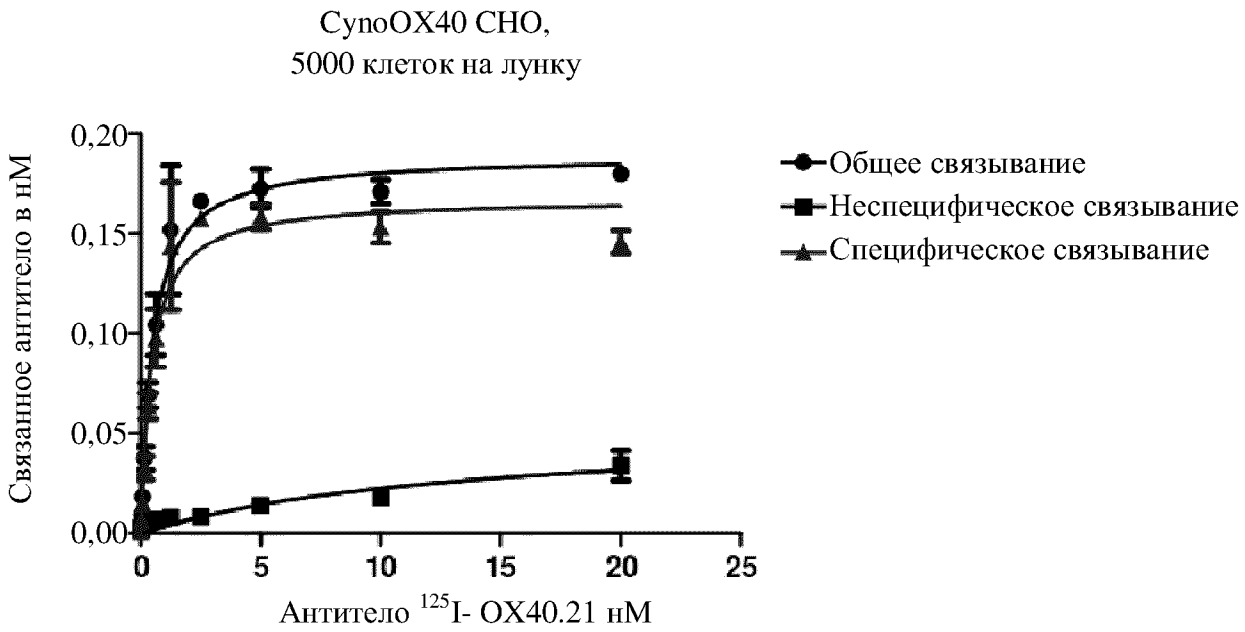
Фиг. 13A



	Специфическое связывание huOX 25e3
Bmax	0,1829
Kd	0,2911

Рецепторов на клетку = Bmax (6e10)/кол-во клеток на лунку
= 0,183*6e10/25000
= 439200 рецепторов OX-40 на клетку

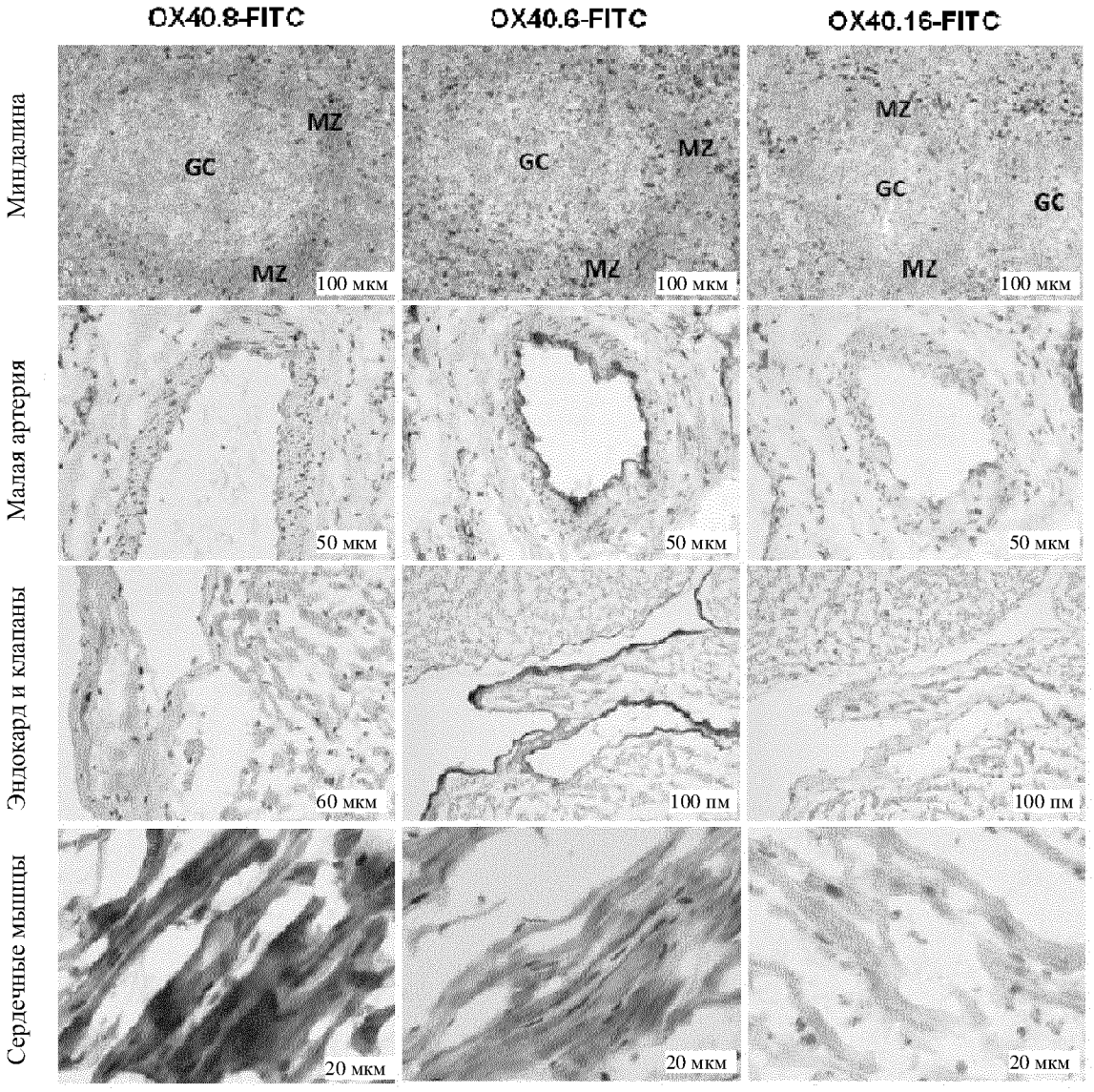
Фиг. 13B



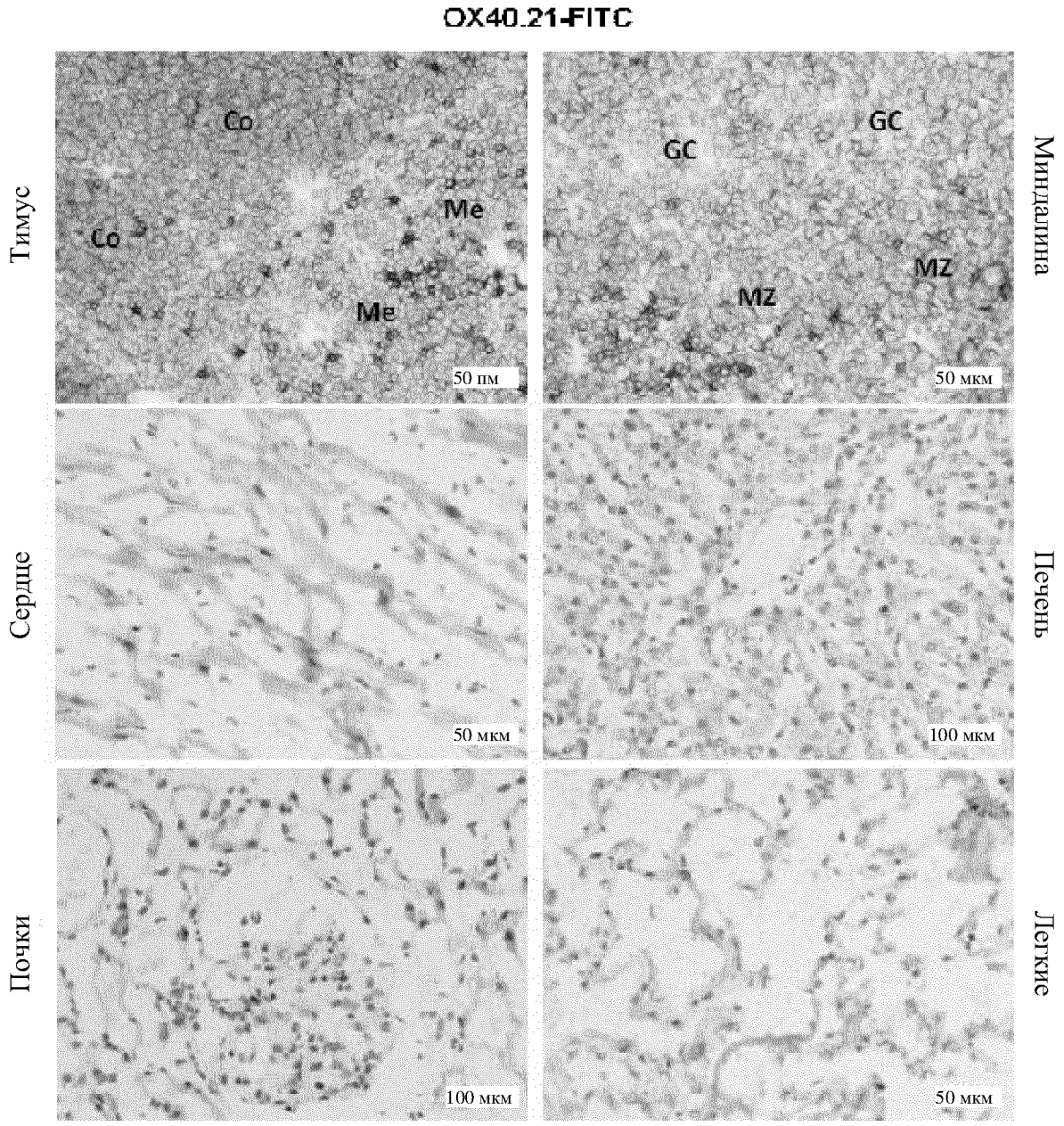
	Специфическое связывание CynoOX40 5e3
Bmax	0,1674
Kd	0,4422

Рецепторов на клетку = Bmax (6e10)/кол-во клеток на лунку
= 0,167*6e10/5000
= 2004000 рецепторов OX-40 на клетку

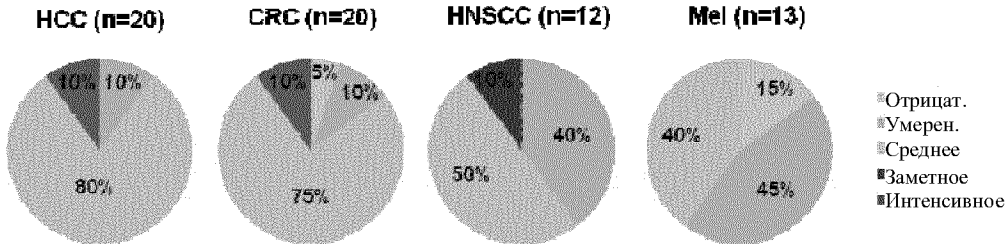
Фиг. 13C


OX40.8-FITC
OX40.6-FITC
OX40.16-FITC
Миндалина
Малая артерия
Эндокард и клапаны
Сердечные мышцы
MZ
GC
100 мкм
50 мкм
60 мкм
100 пм
20 мкм

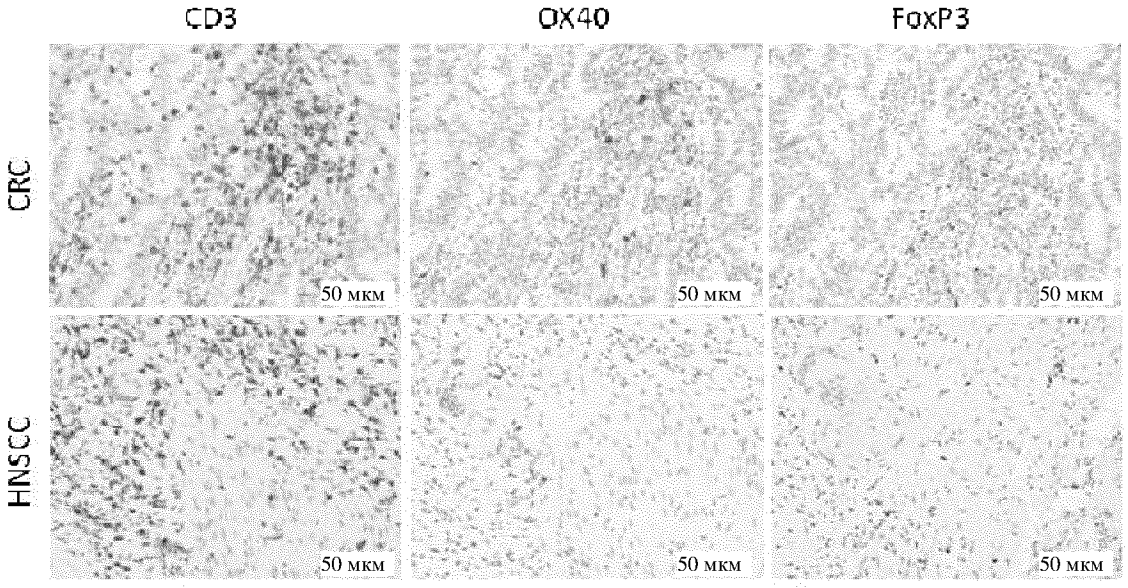
Фиг. 14A


OX40.21-FITC
Тимус
Co
Co
Me
Me
50 пм
Миндалина
GC
GC
MZ
MZ
50 мкм
Сердце
50 мкм
Печень
100 мкм
Почки
100 мкм
Легкие
50 мкм

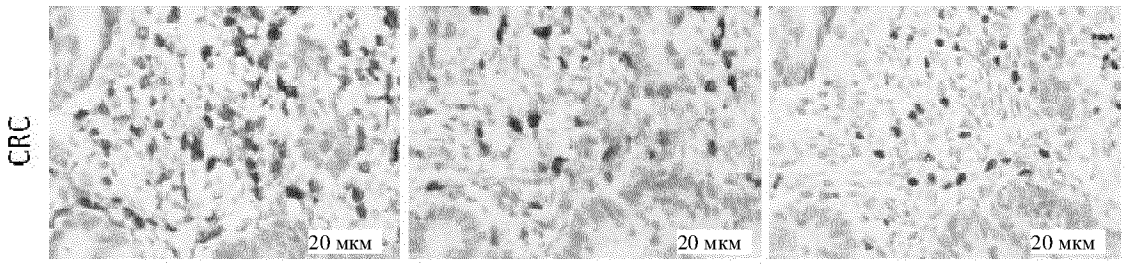
Фиг. 14B



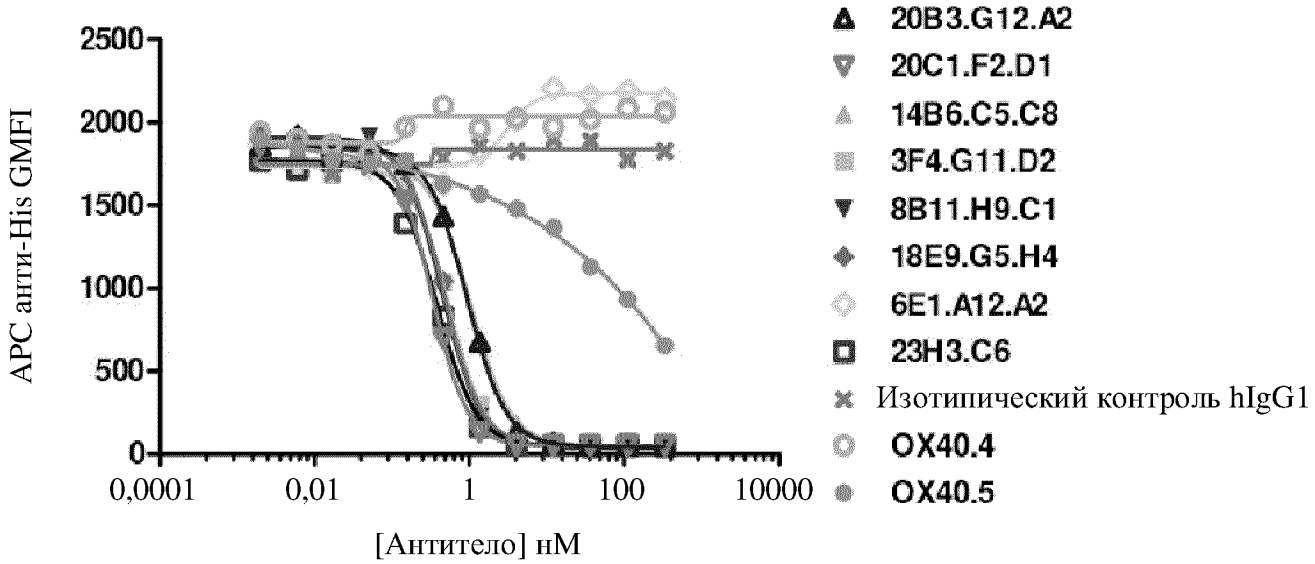
Фиг. 15A



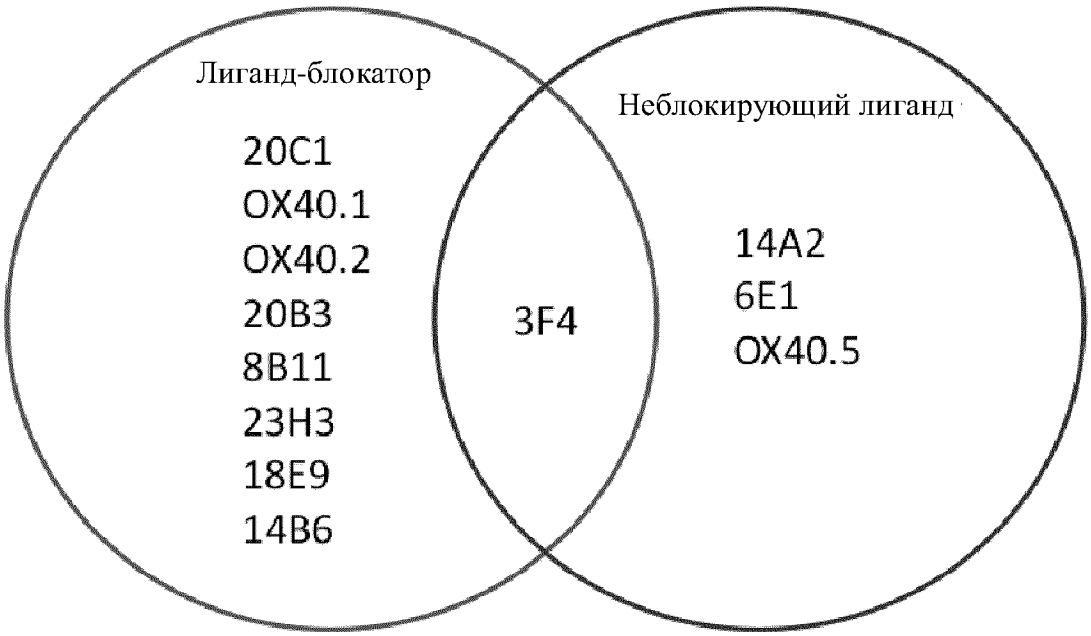
Фиг. 15B



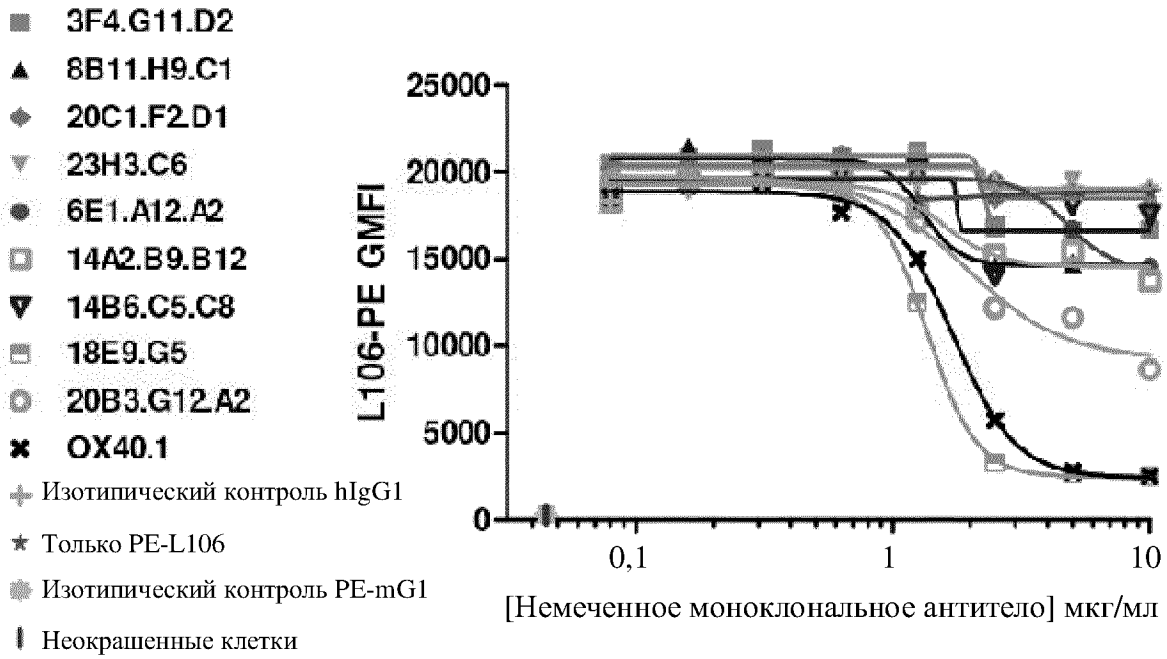
Фиг. 15C


APC анти-His GMFI
2500
2000
1500
1000
500
0
0,0001
0,01
1
100
10000
[Антитело] нМ
20B3.G12.A2
20C1.F2.D1
14B6.C5.C8
3F4.G11.D2
8B11.H9.C1
18E9.G5.H4
6E1.A12.A2
23H3.C6
Изотипический контроль hIgG1
OX40.4
OX40.5

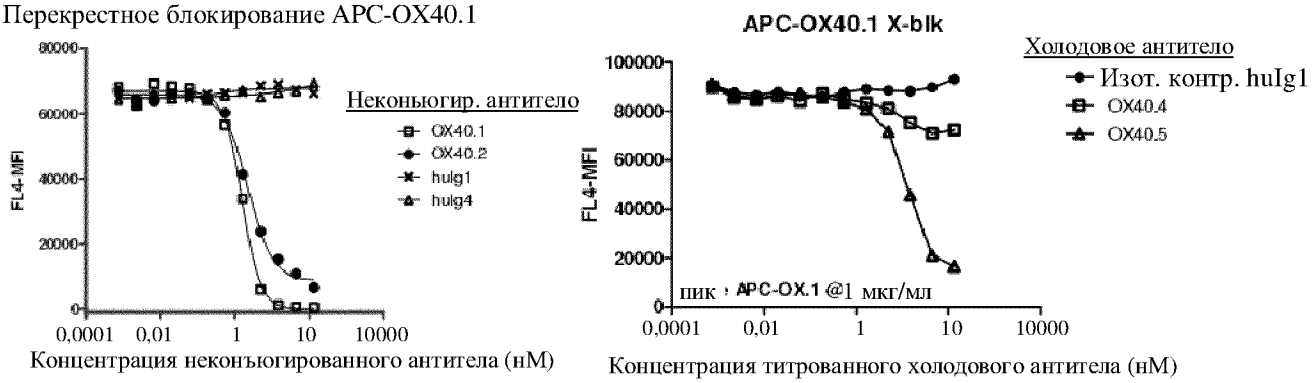
Фиг. 16


Лиганд-блокатор
20C1
OX40.1
OX40.2
20B3
8B11
23H3
18E9
14B6
3F4
Неблокирующий лиганд
14A2
6E1
OX40.5

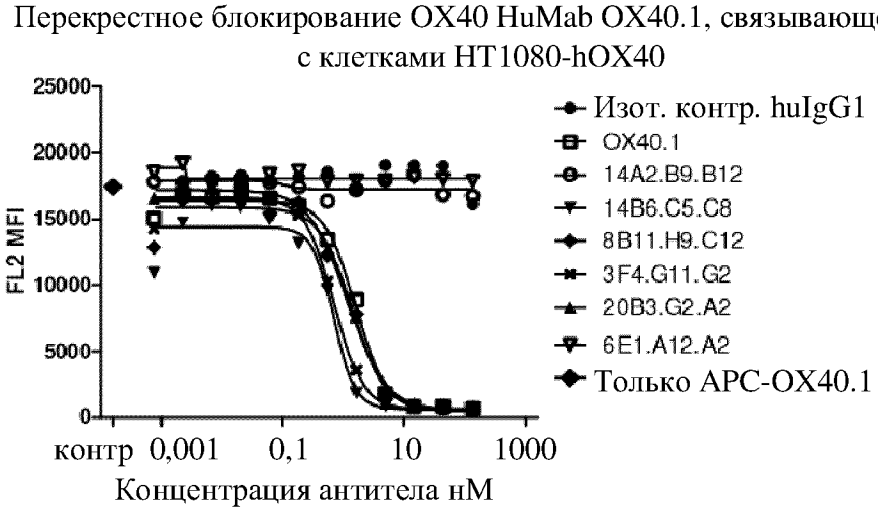
Фиг. 17


3F4.G11.D2
8B11.H9.C1
20C1.F2.D1
23H3.C6
6E1.A12.A2
14A2.B9.B12
14B6.C5.C8
18E9.G5
20B3.G12.A2
OX40.1
Изотипический контроль hIgG1
Только PE-L106
Изотипический контроль PE-mG1
Неокрашенные клетки
L106-PE GMFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,1
1
10
[Немеченное моноклональное антитело] мкг/мл

Фиг. 18



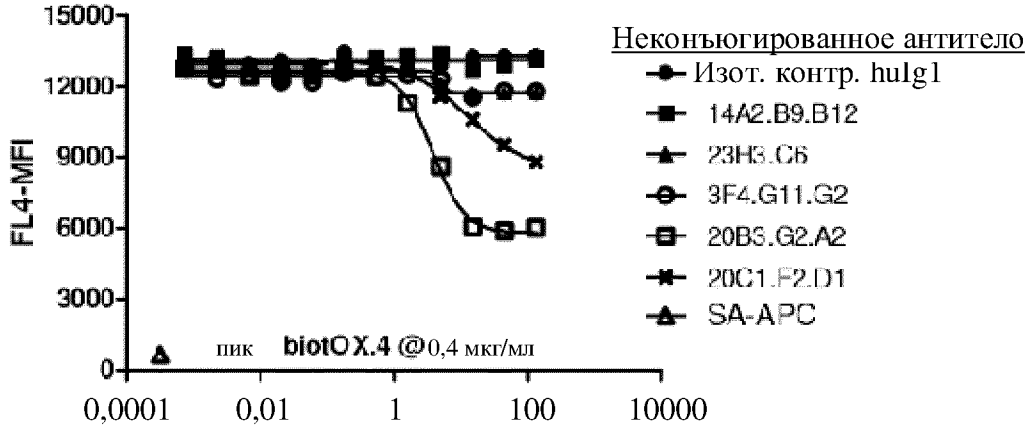
Фиг. 19A **Фиг. 19B**



	IC50
OX40.1	1.589
14A2.B9.B12	0.1037
14B6.C5.C8	0.6997
8B11.H9.C12	1.410
3F4.G11.G2	0.7062
20B3.G2.A2	1.165
6E1.A12.A2	~ 0.002489

Фиг. 19C

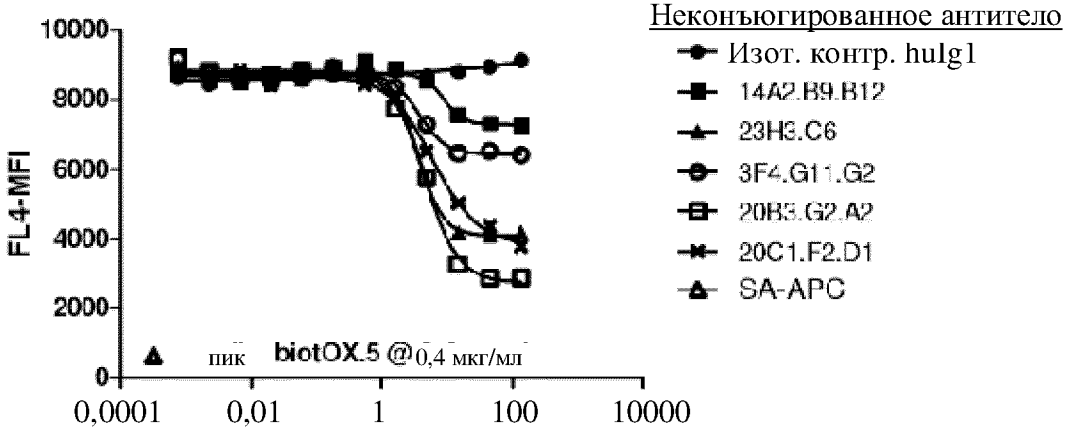
Перекрестное блокирование связывания biotOX40.4



	14A2.B9.B12	23H3.C6	3F4.G11.G2	20B3.G2.A2	20C1.F2.D1
EC50				3.862	12.06

Фиг. 19D

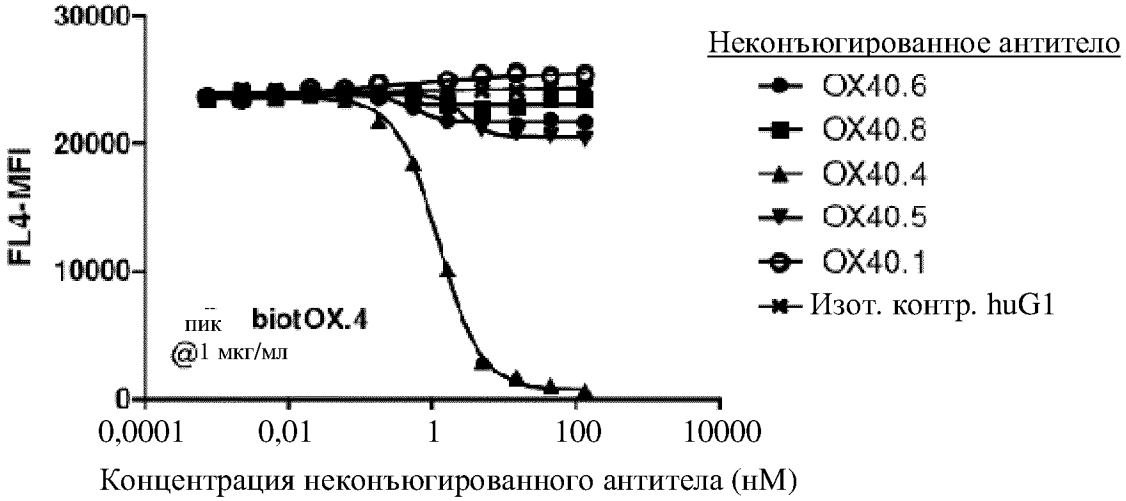
Перекрестное блокирование связывания biotOX40.4



	14A2.B9.B12	23H3.C6	3F4.G11.G2	20B3.G2.A2	20C1.F2.D1
EC50	8.888	3.684	3.714	4.539	6.134

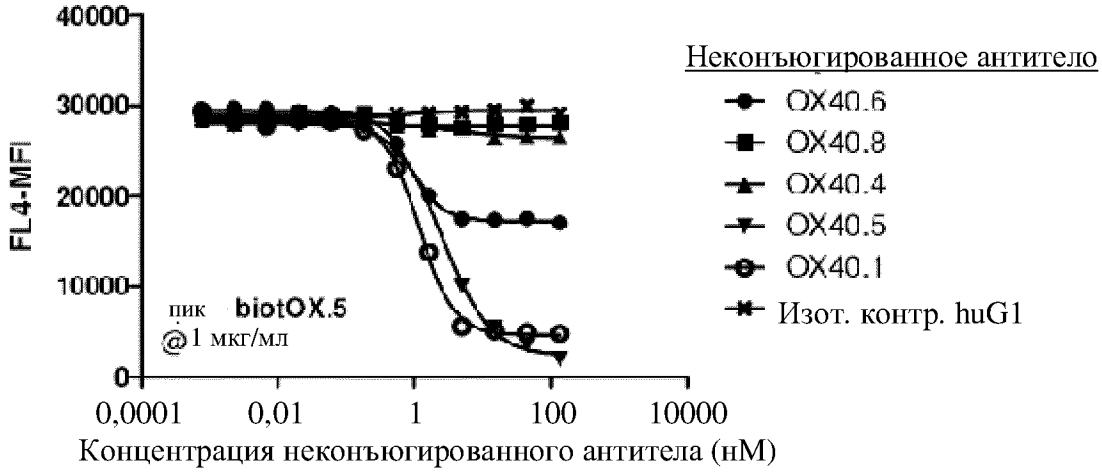
Фиг. 19E

Перекрестное блокирование связывания biotOX40.4



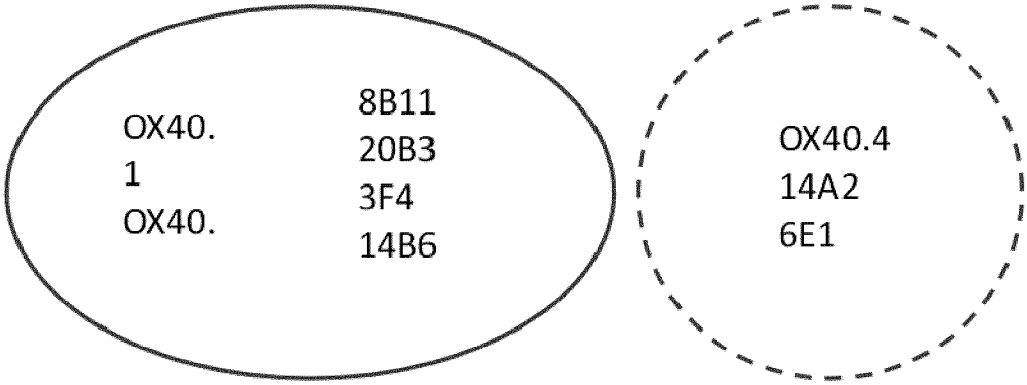
Фиг. 19F

Перекрестное блокирование связывания biotOX40.4

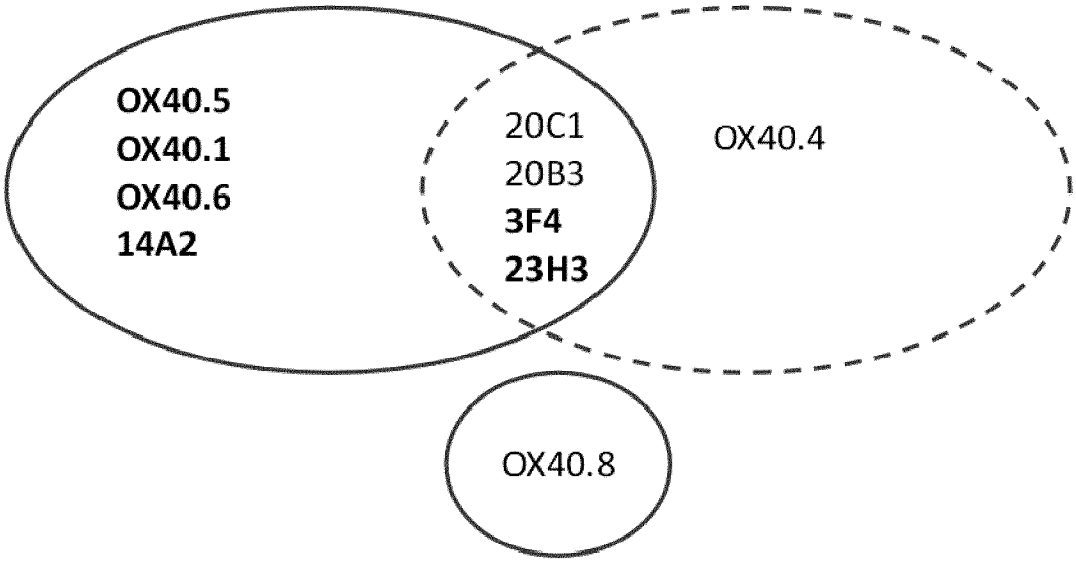


	OX40.6	OX40.8	OX40.4	OX40.5	OX40.1
EC50	0.857			2.669	1.190

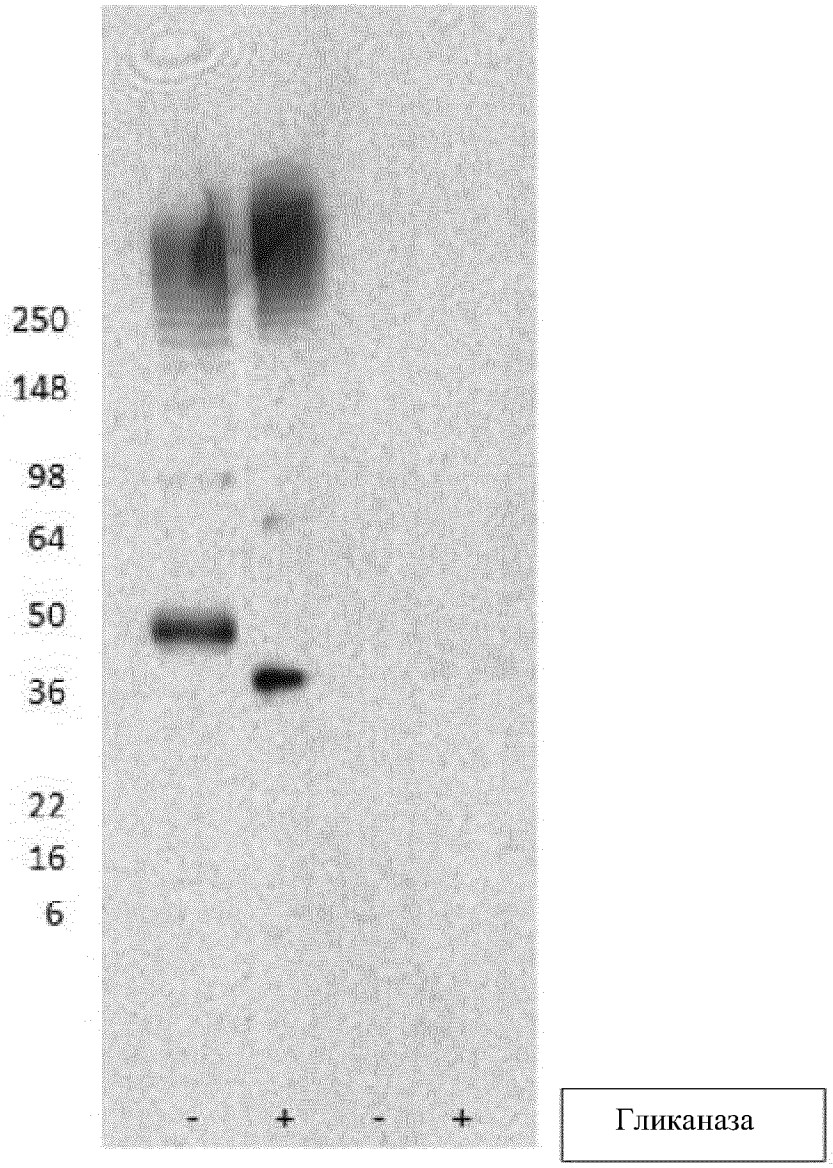
Фиг. 19G



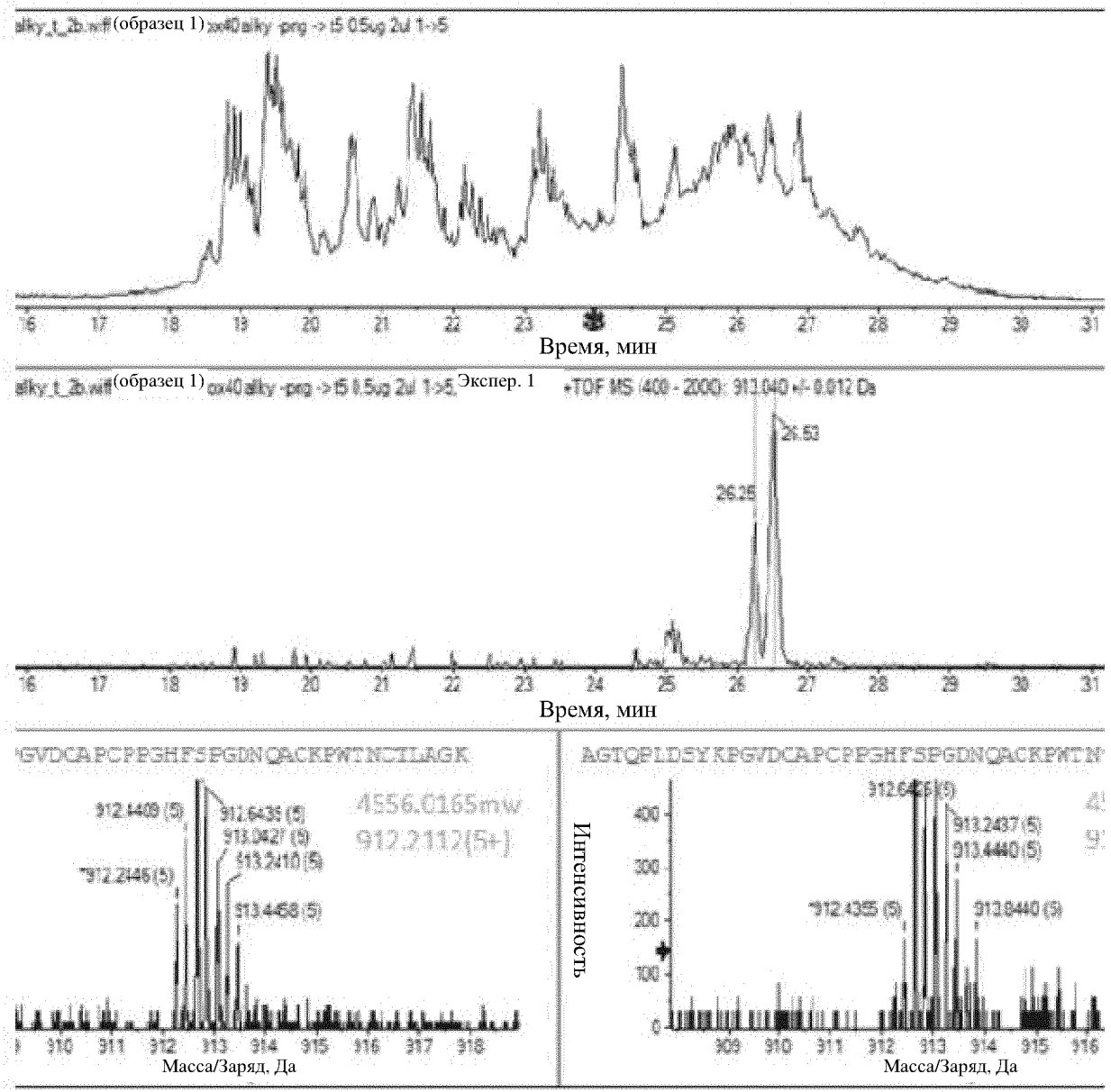
Фиг. 19H



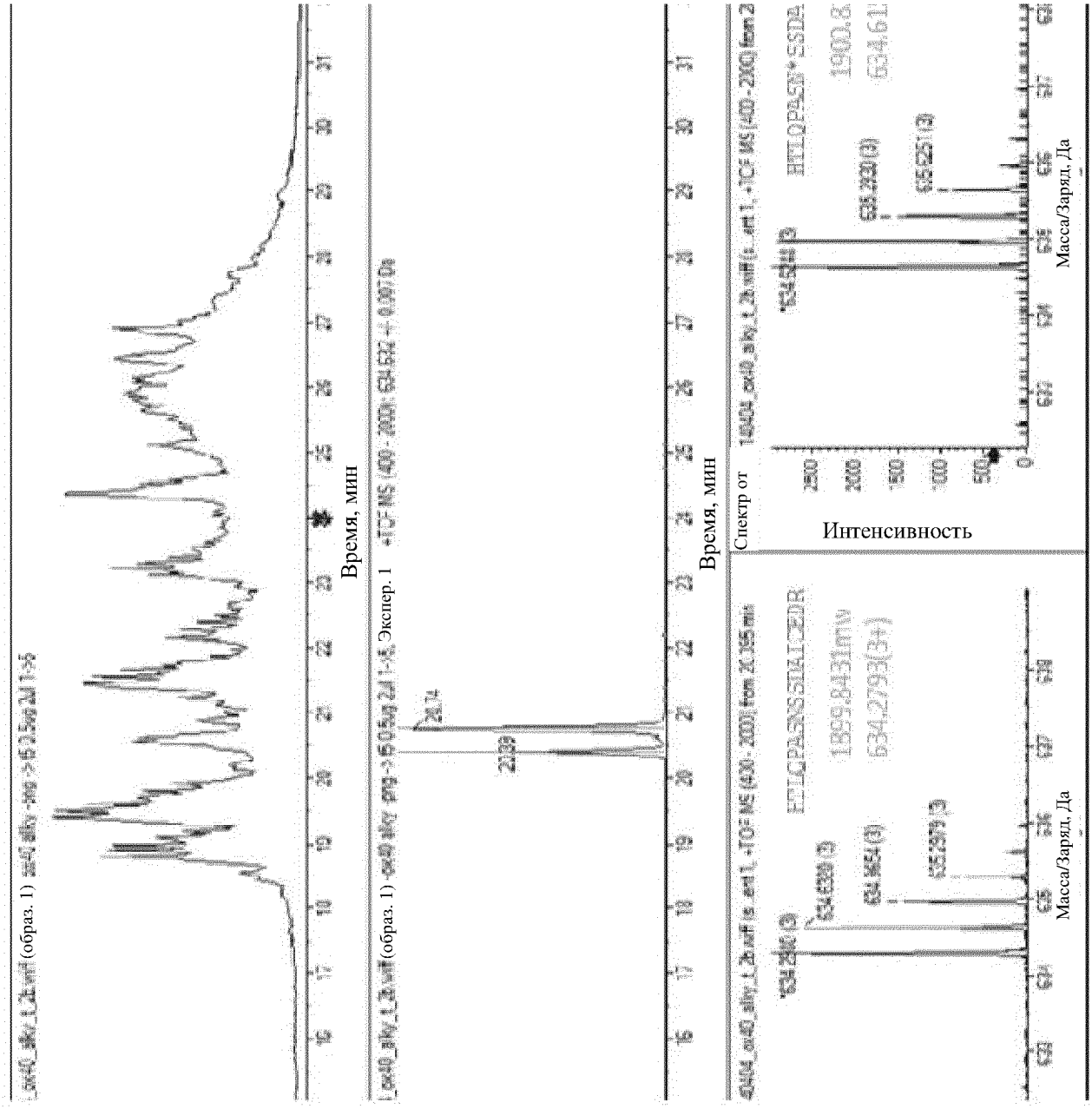
Фиг. 19I



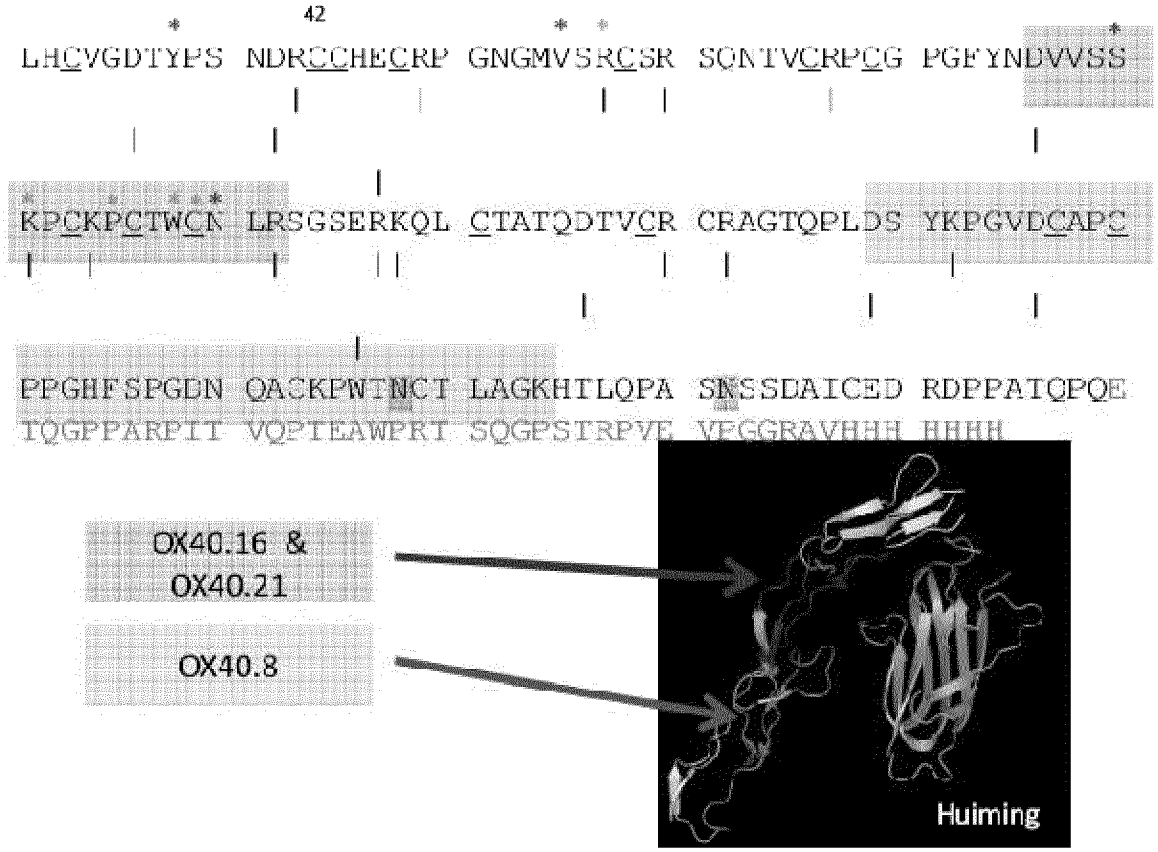
Фиг. 20A


(образец 1)
Время, мин
(образец 1)
Экспер. 1
+TOF MS (400 - 2000): 913.040 +/- 0.012 Da
26.53
26.25
Время, мин
4556.0165mw
912.2112(5+)
Масса/Заряд, Да
Интенсивность
Масса/Заряд, Да

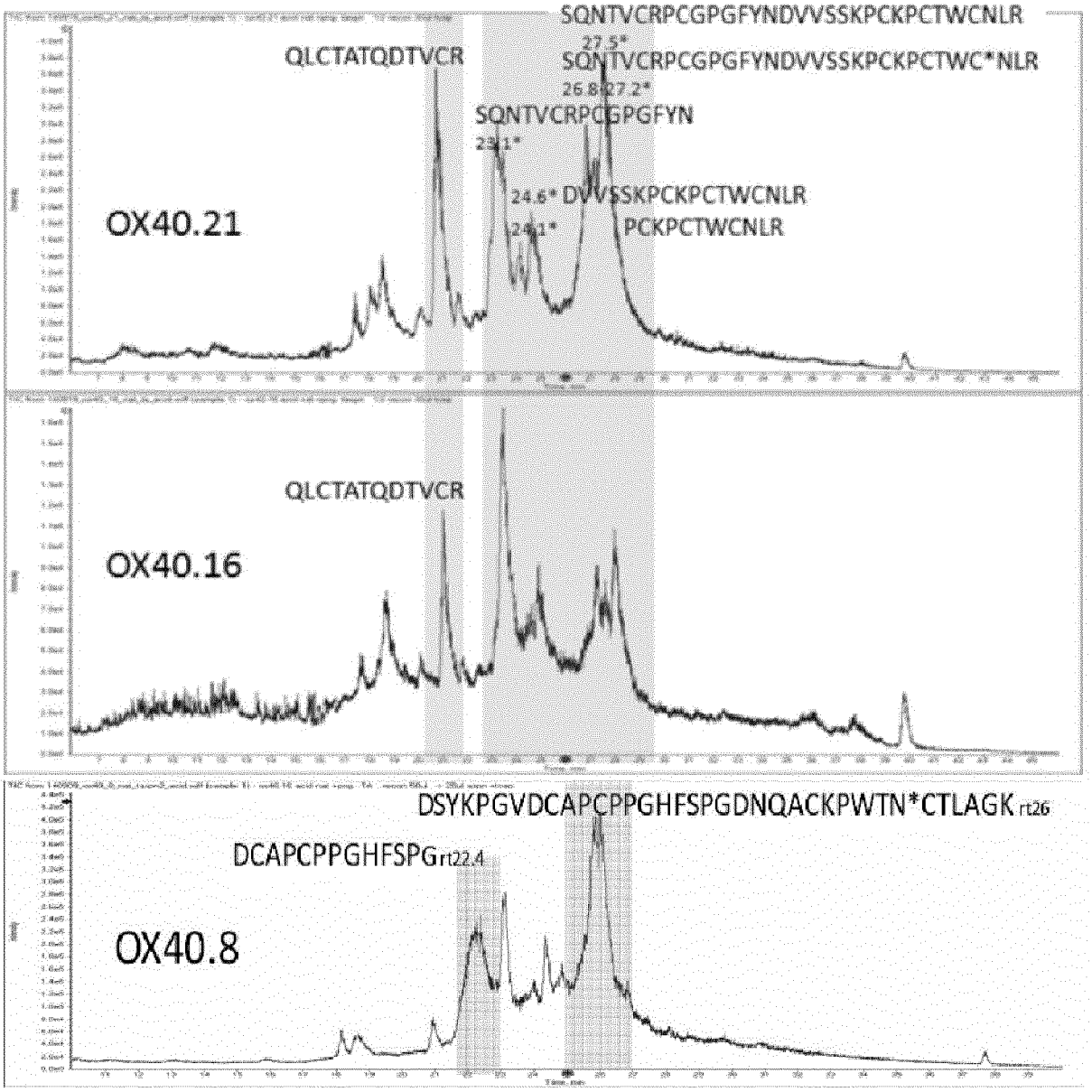
Фиг. 20В


Время, мин
Время, мин
Интенсивность
Масса/Заряд, Да
Масса/Заряд, Да

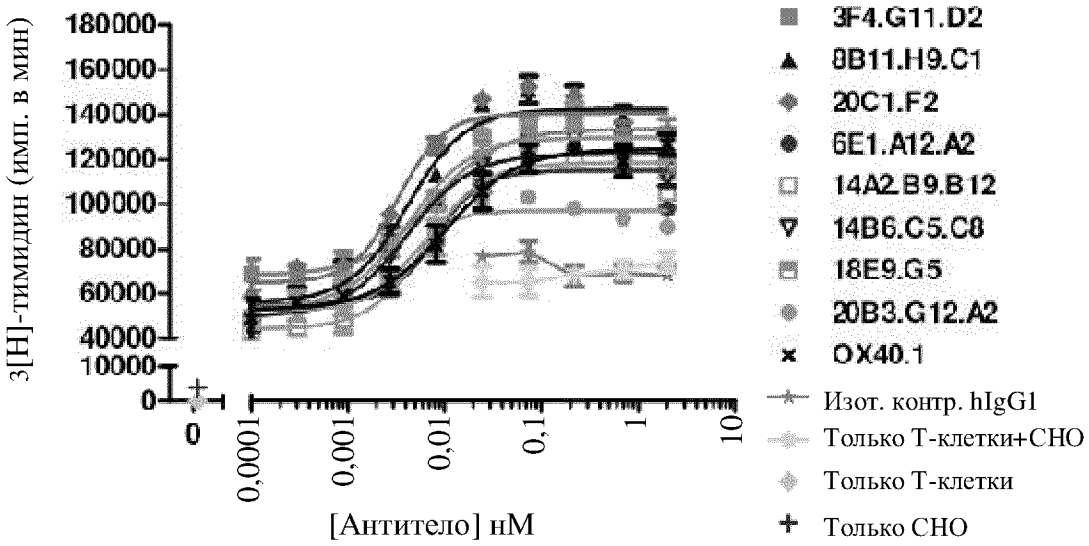
Фиг. 20C


42
LHCVGDTYPS NDRCCHECRP GNGMVSRCSR SQNTVCRPCG PGFYNDVVSS
KPCKPCTWCN LRSGSERKQL CTATQDTVCR CRAGTQPLDS YKPGVDCAPC
PPGHFSPGDN QACKPWTNCT LAGKHTLQPA SNSSDAICED RDPPATQPQE
TQGPPARPIT VQPTEAWPRT SQGPSTRPVE VEGGRAVHHH HHHH
OX40.16 &
OX40.21
OX40.8
Huiming

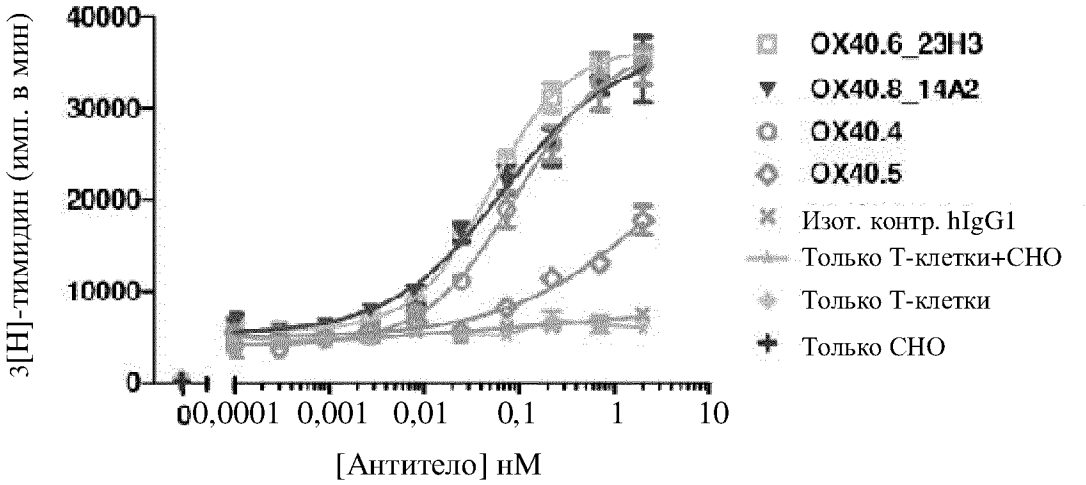
Фиг. 20D


SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLR
27.5*
QLCTATQDTVCR
SQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWC*NLR
26.8 27.2*
SQNTVCRPCGPGFYN
23.1*
24.6* DVVSSKPCKPCTWCNLR
OX40.21
24.1* PCKPCTWCNLR
QLCTATQDTVCR
OX40.16
DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN*CTLAGK rt26
DCAPCPPGHFSPG rt22.4
OX40.8

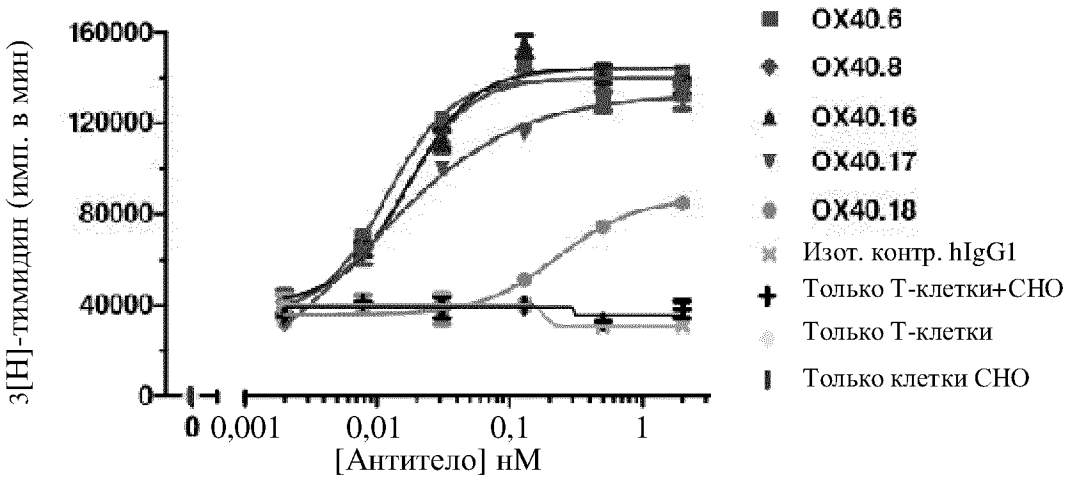
Фиг. 20E



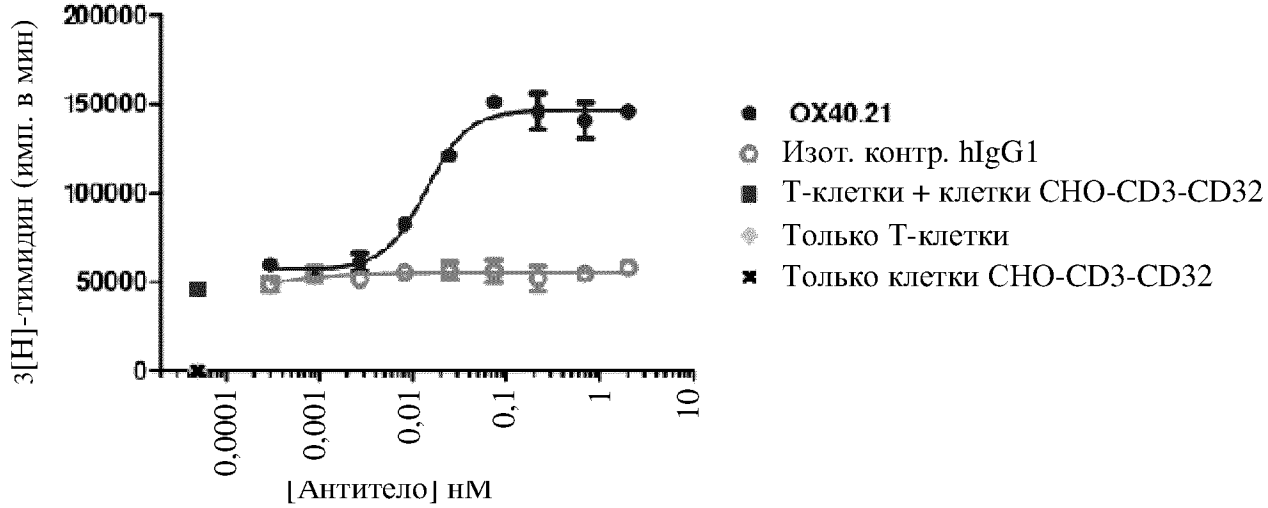
Фиг. 21A



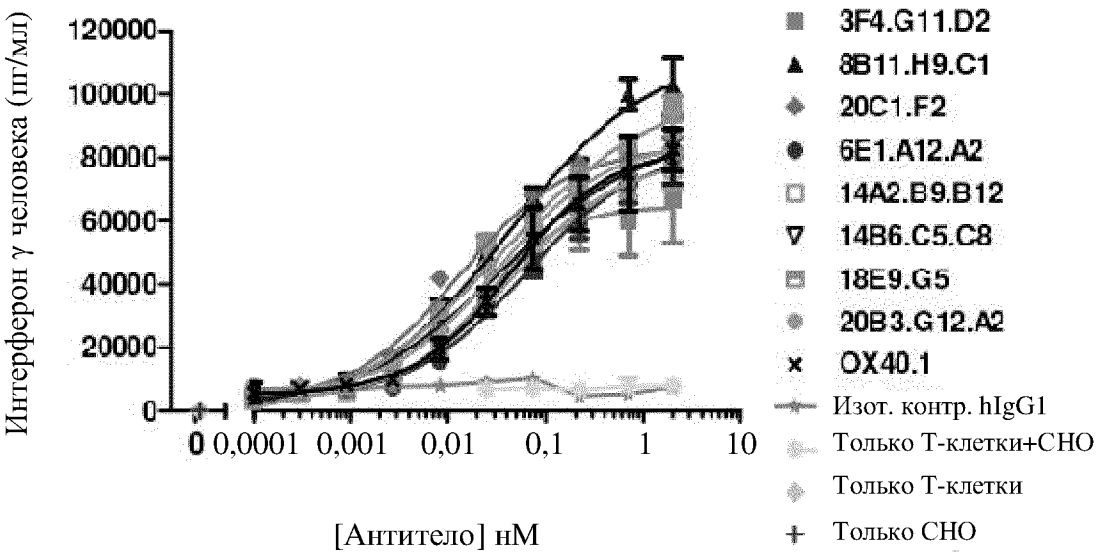
Фиг. 21B



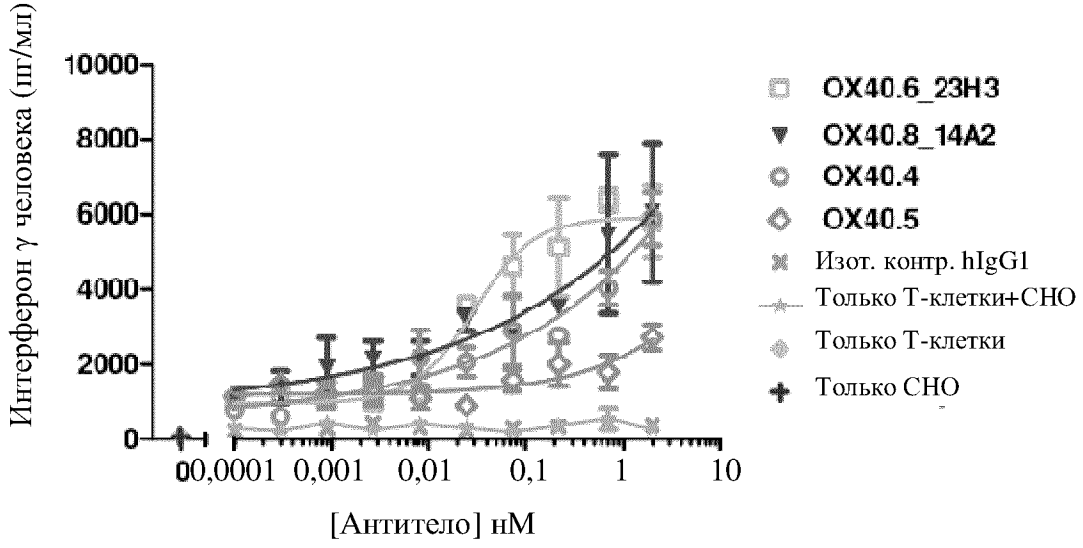
Фиг. 21C



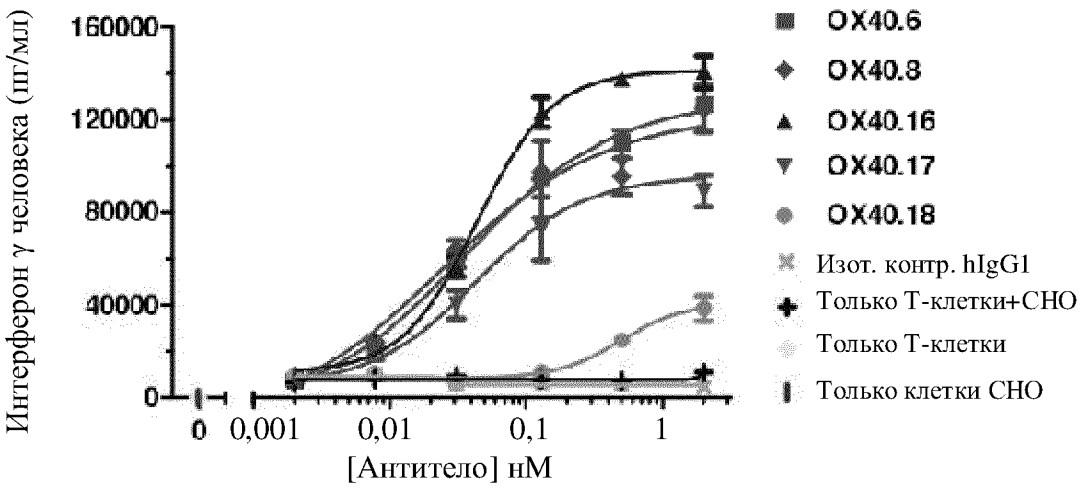
Фиг. 21D



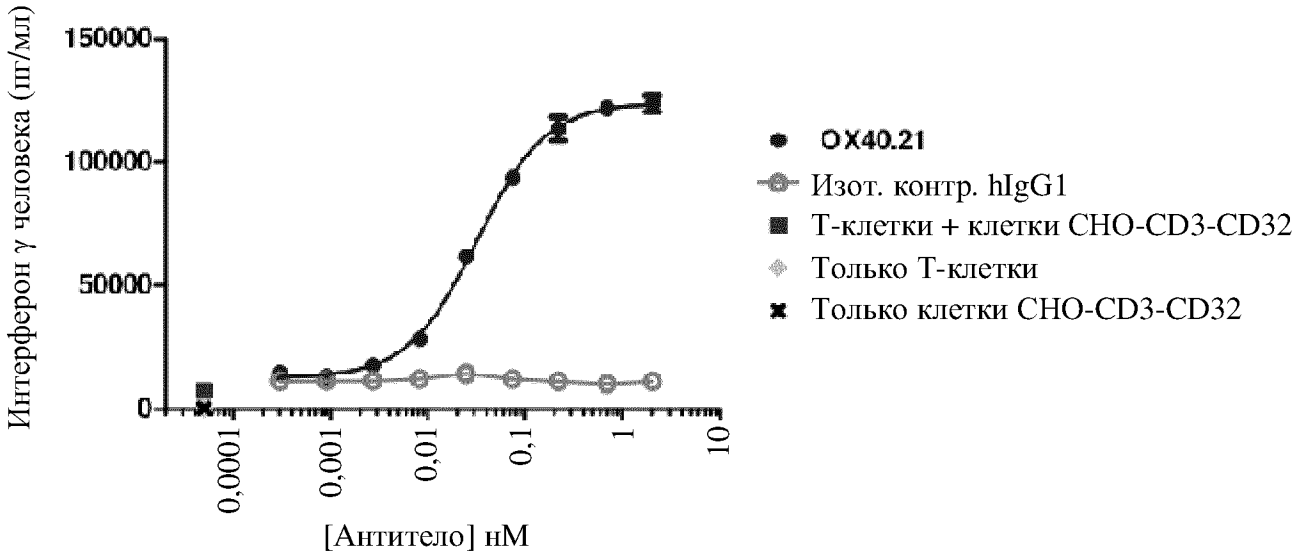
Фиг. 22A



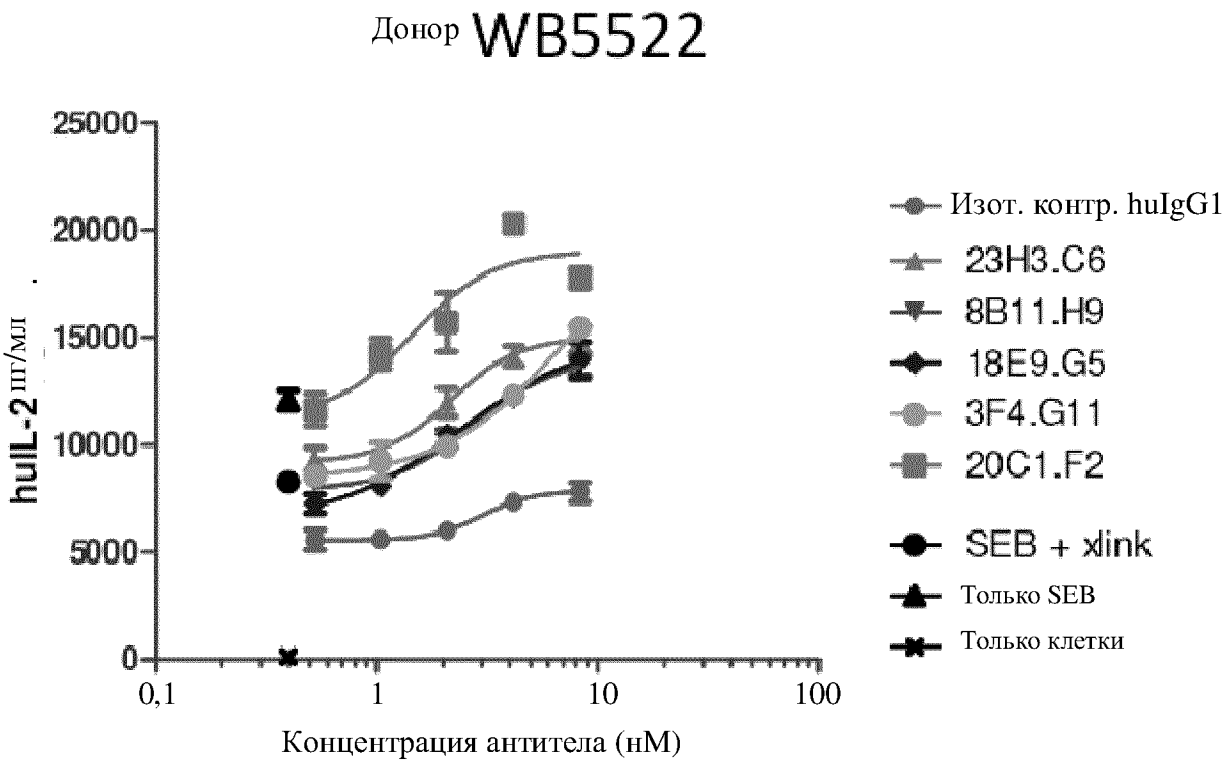
Фиг. 22B



Фиг. 22C

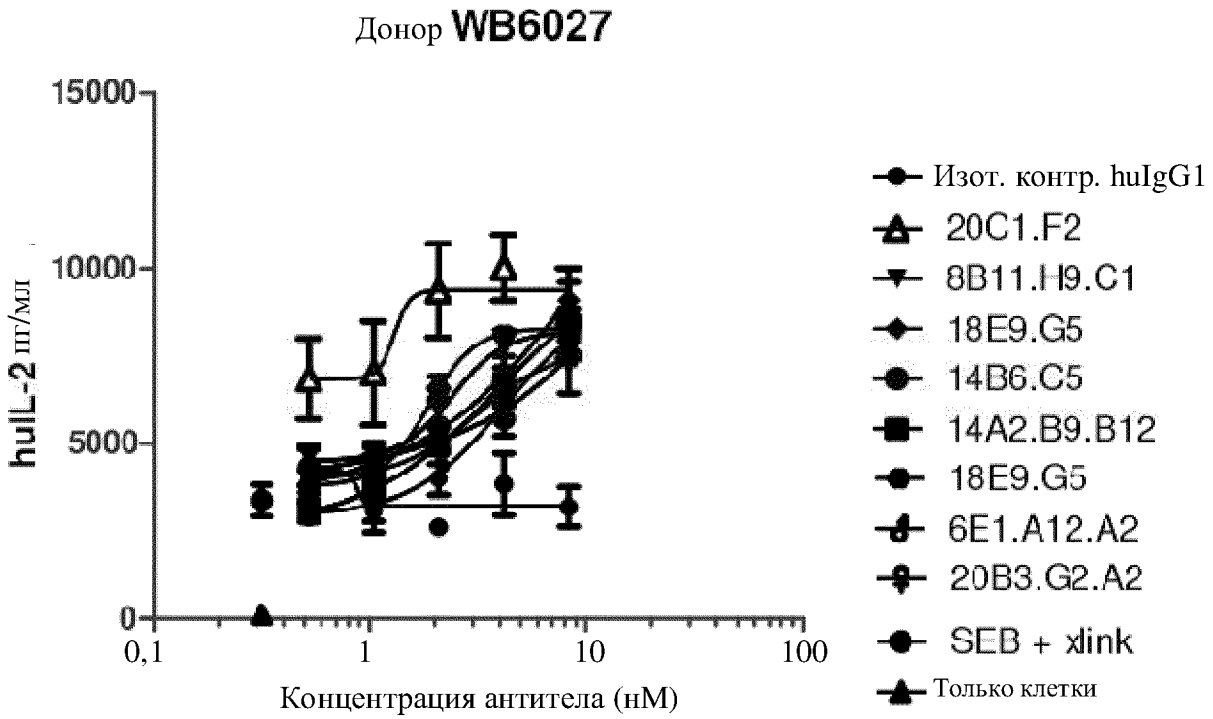


Фиг. 22D



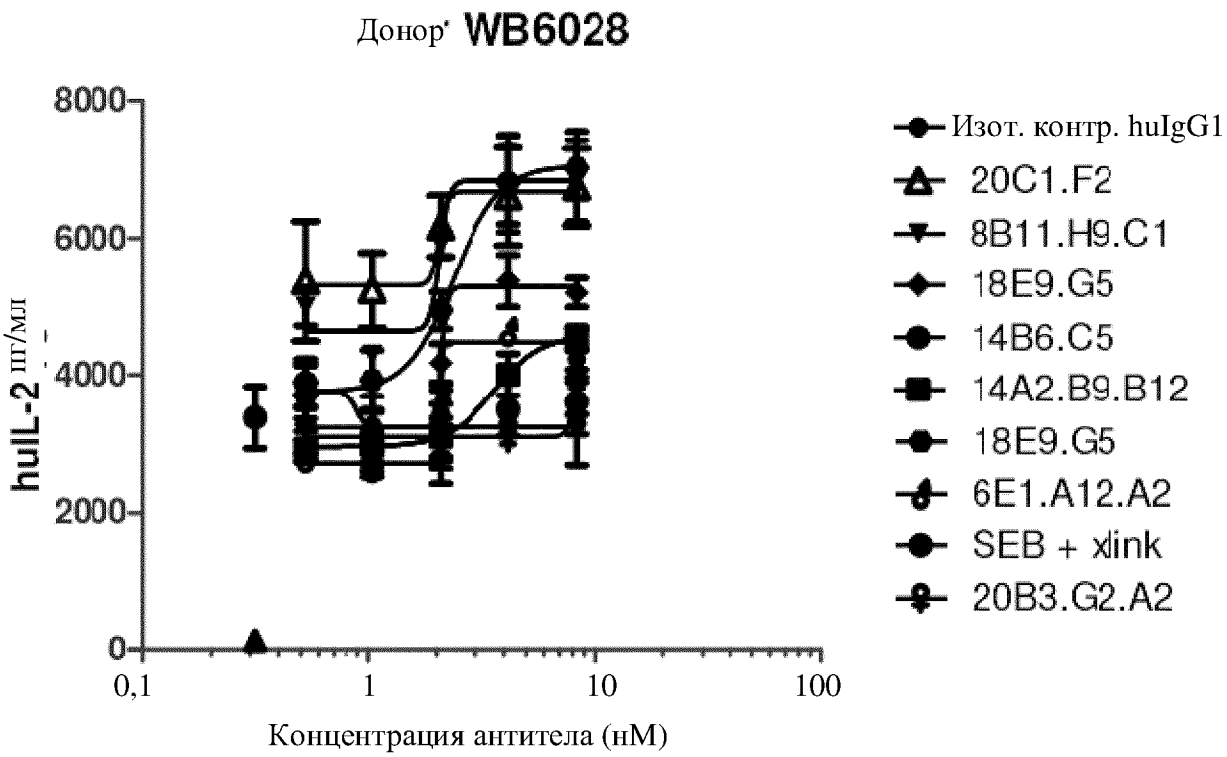
	EC50 (нМ)
23H3.C6	2.177
8B11.H9	2.801
18E9.G5	2.395
3F4.G11	6.916
20C1.F2	1.459

Фиг. 23A



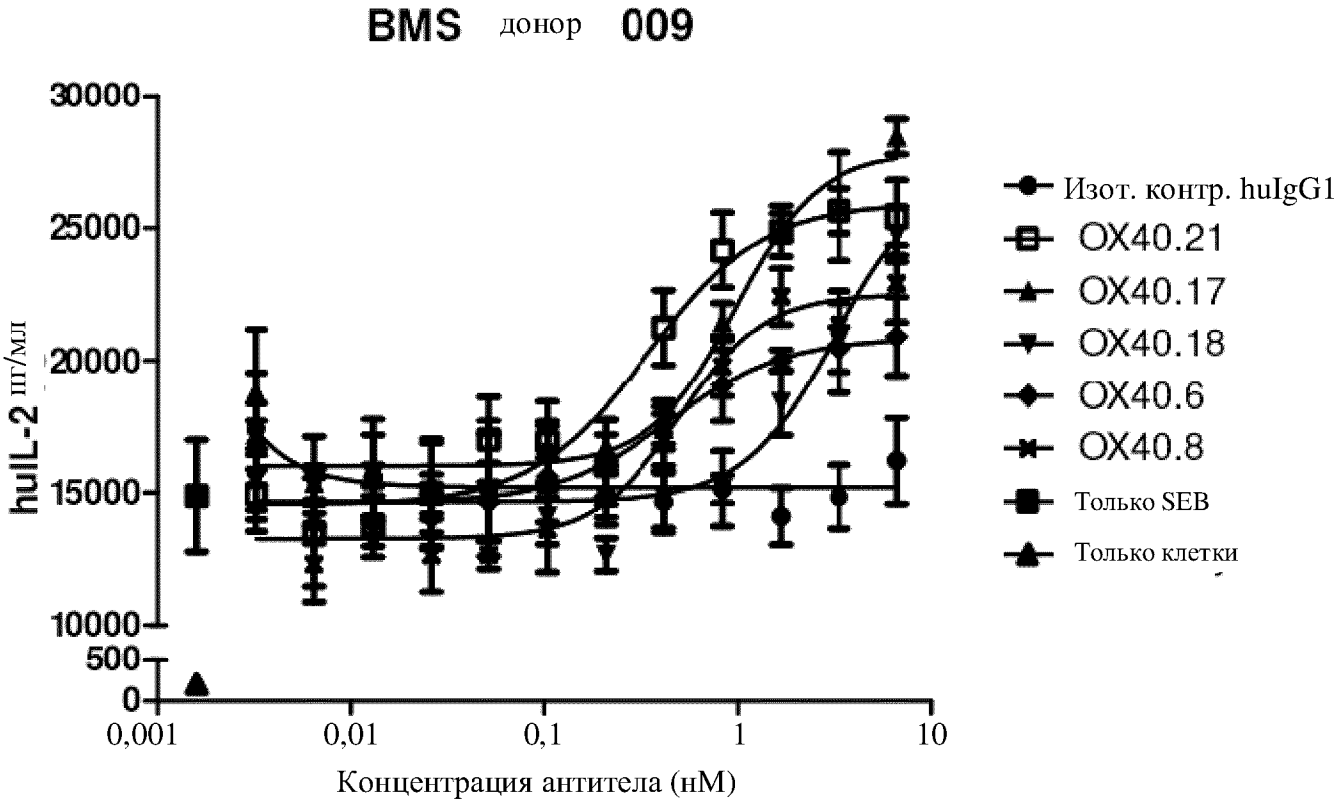
	EC50 (нМ)
20C1.F2	1.30
8B11.H9.C1	2.409
3F4.G11.D2	11.94
14B6.C5	~ 1274
14A2.B9.B12	3.816
18E9.G5	1.865
6E1.A12.A2	4.113
20B3.G2.A2	3.112

Фиг. 23B



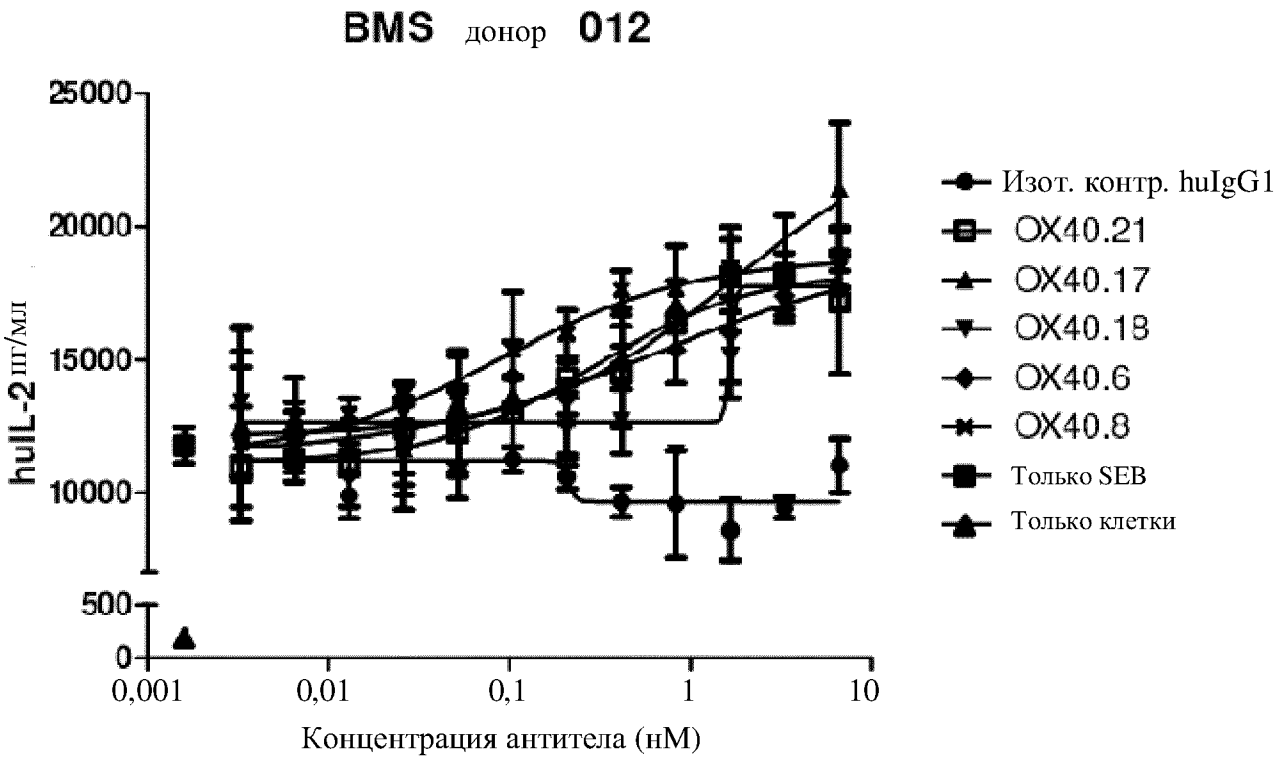
	EC50
20C1.F2	~ 2.045
8B11.H9.C1	~ 2.061
3F4.G11.D2	~ 2.099
14B6.C5	
14A2.B9.B12	3.608
18E9.G5	2.379
6E1.A12.A2	~ 2.092
20B3.G2.A2	~ 8.295

Фиг. 23C



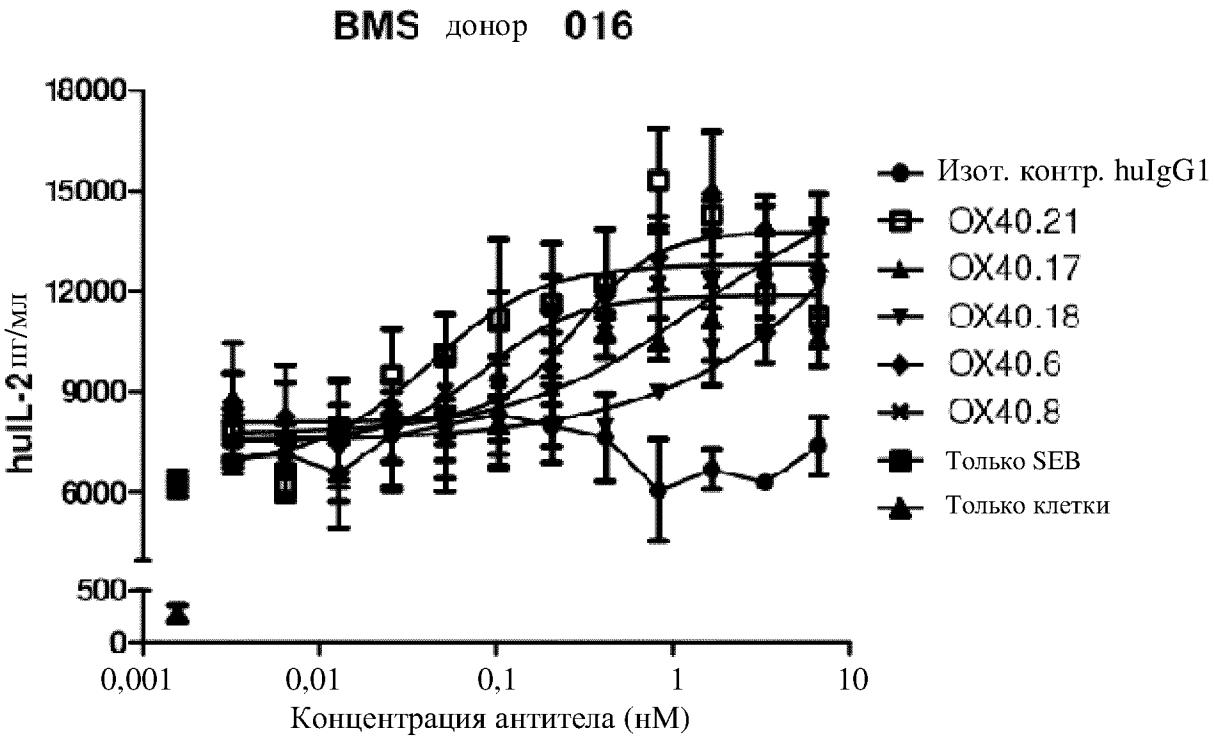
	EC50
OX40.21	0.343
OX40.17	0.965
OX40.18	3.210
OX40.6	0.451
OX40.8	0.503

Фиг. 23D



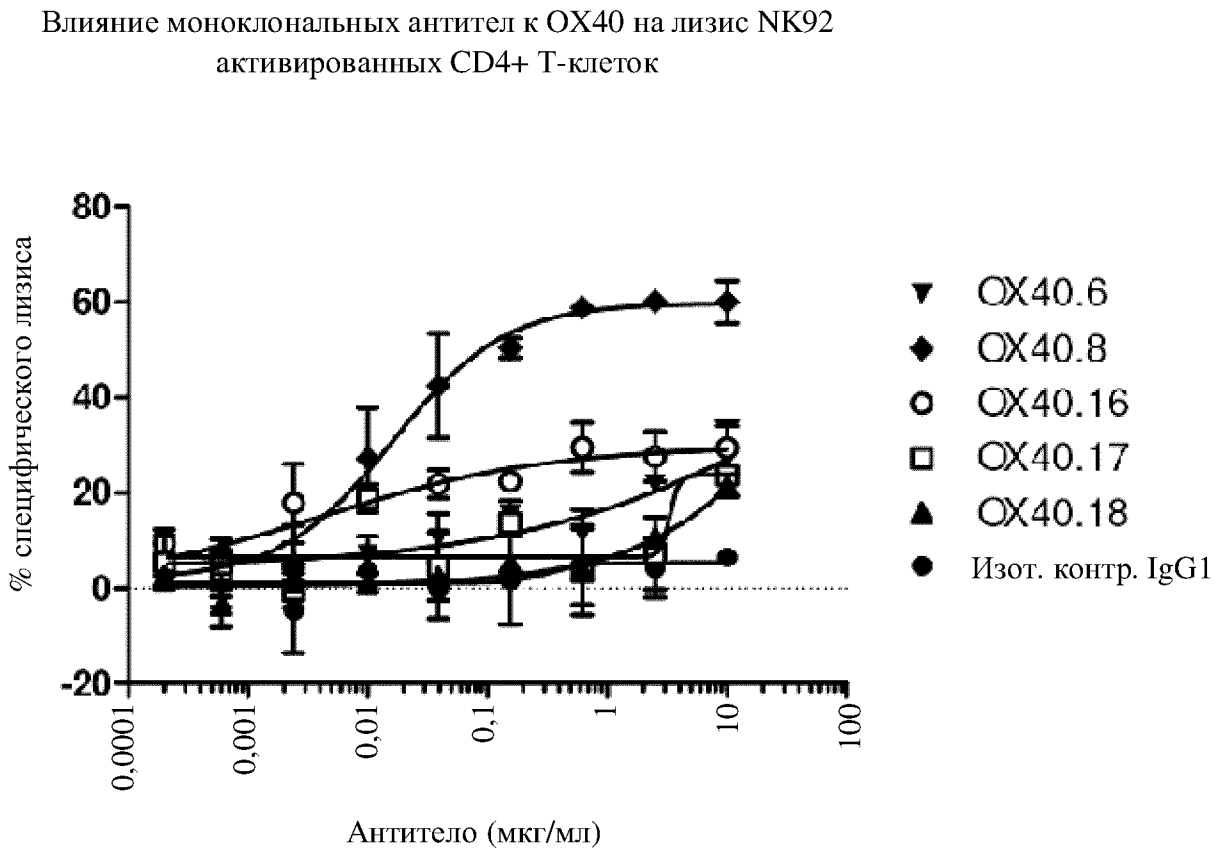
	EC50
OX40.21	0.288
OX40.17	1.741
OX40.18	~ 1.659
OX40.6	0.656
OX40.8	0.093

Фиг. 23E



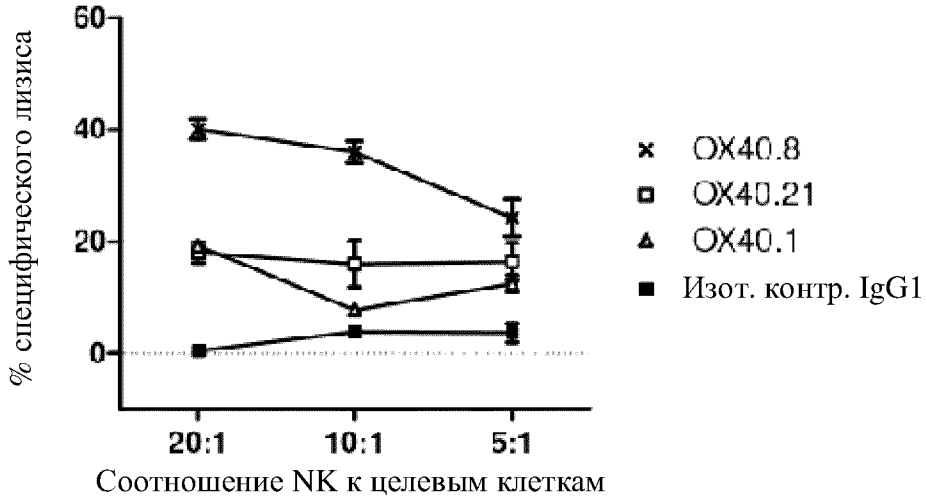
	EC50
OX40.21	0.042
OX40.17	1.396
OX40.18	~ 100.8
OX40.6	0.287
OX40.8	0.089

Фиг. 23F


Влияние моноклональных антител к OX40 на лизис NK92 активированных CD4+ Т-клеток
% специфического лизиса
80
60
40
20
0
-20
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Антитело (мкг/мл)
OX40.6
OX40.8
OX40.16
OX40.17
OX40.18
Изот. контр. IgG1

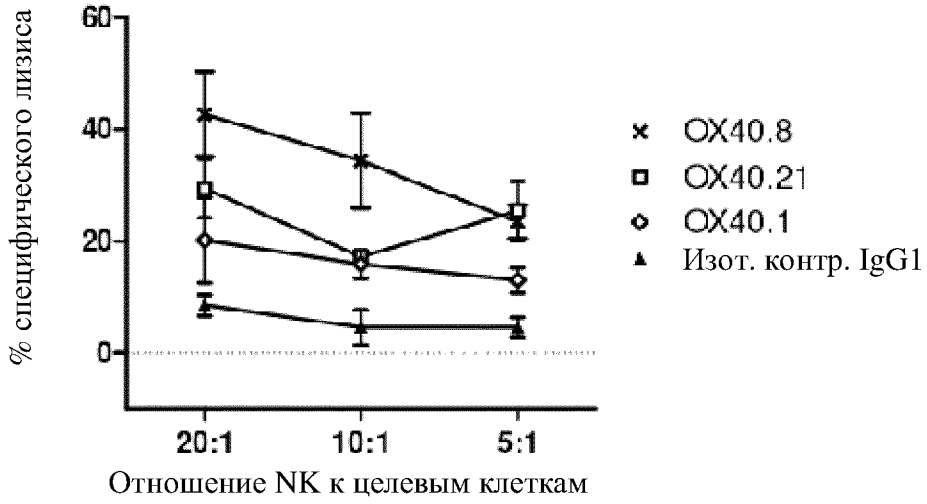
Фиг. 24

Донор 1 целевых клеток

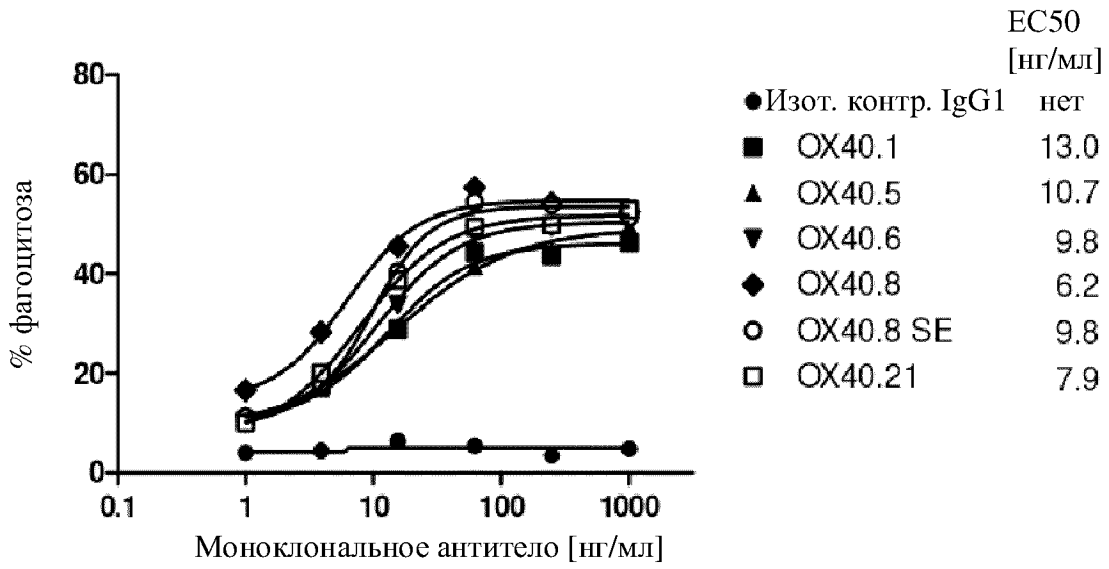


Фиг. 25A

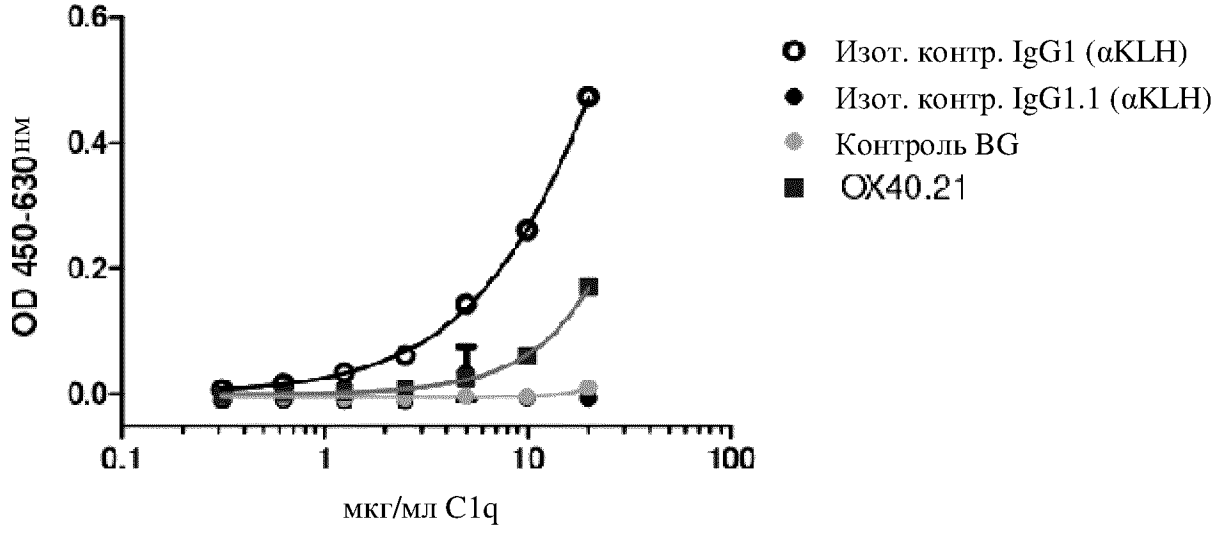
Донор 2 целевых клеток



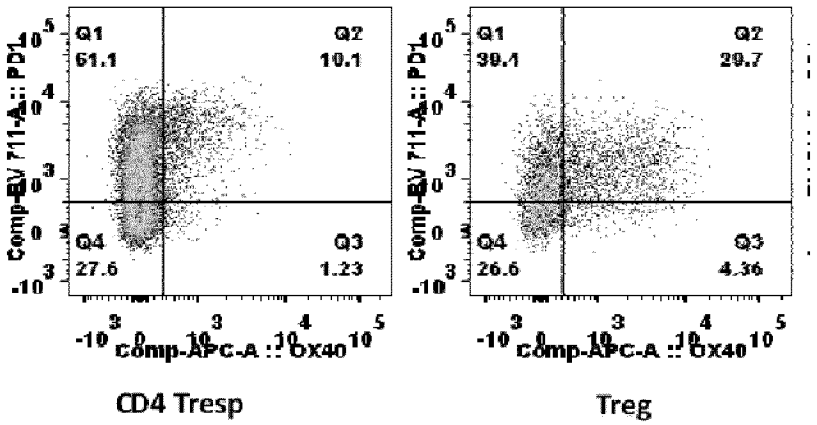
Фиг. 25B


% фагоцитоза
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
Моноклональное антитело [нг/мл]
EC50 [нг/мл]
Изот. контр. IgG1 нет
OX40.1 13.0
OX40.5 10.7
OX40.6 9.8
OX40.8 6.2
OX40.8 SE 9.8
OX40.21 7.9

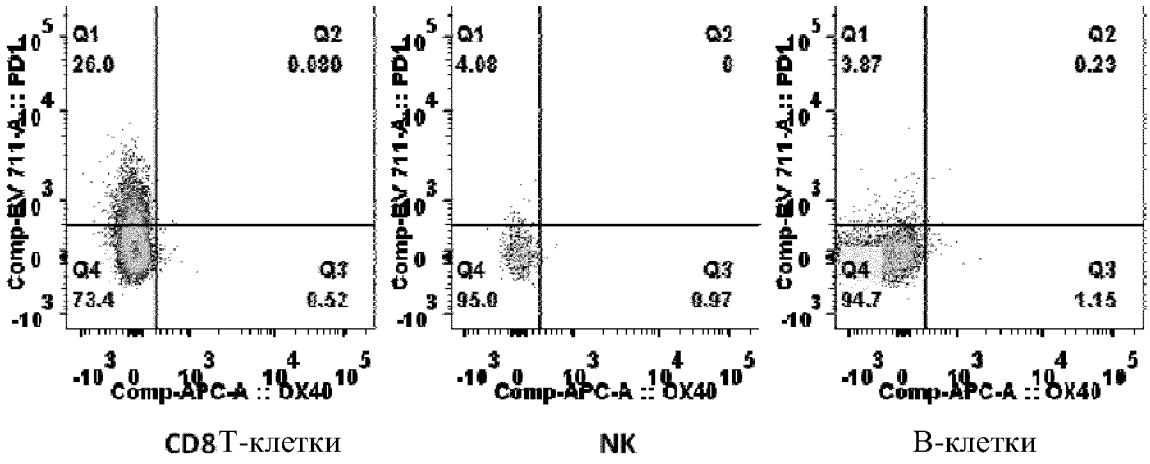
Фиг. 26


0.6
0.4
0.2
0.0
OD 450-630нм
0.1
1
10
100
мкг/мл C1q
Изот. контр. IgG1 (αKLH)
Изот. контр. IgG1.1 (αKLH)
Контроль BG
OX40.21

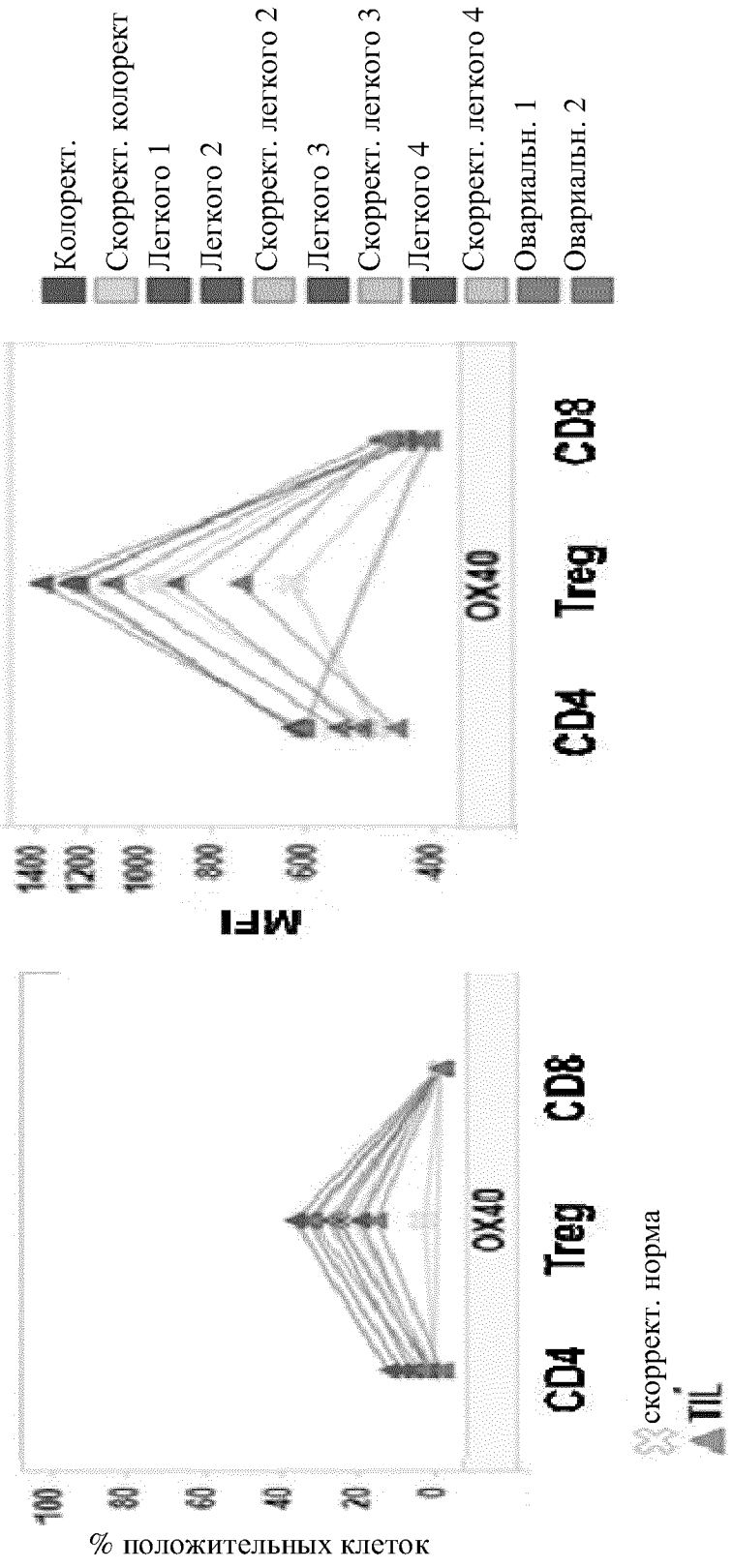
Фиг. 27



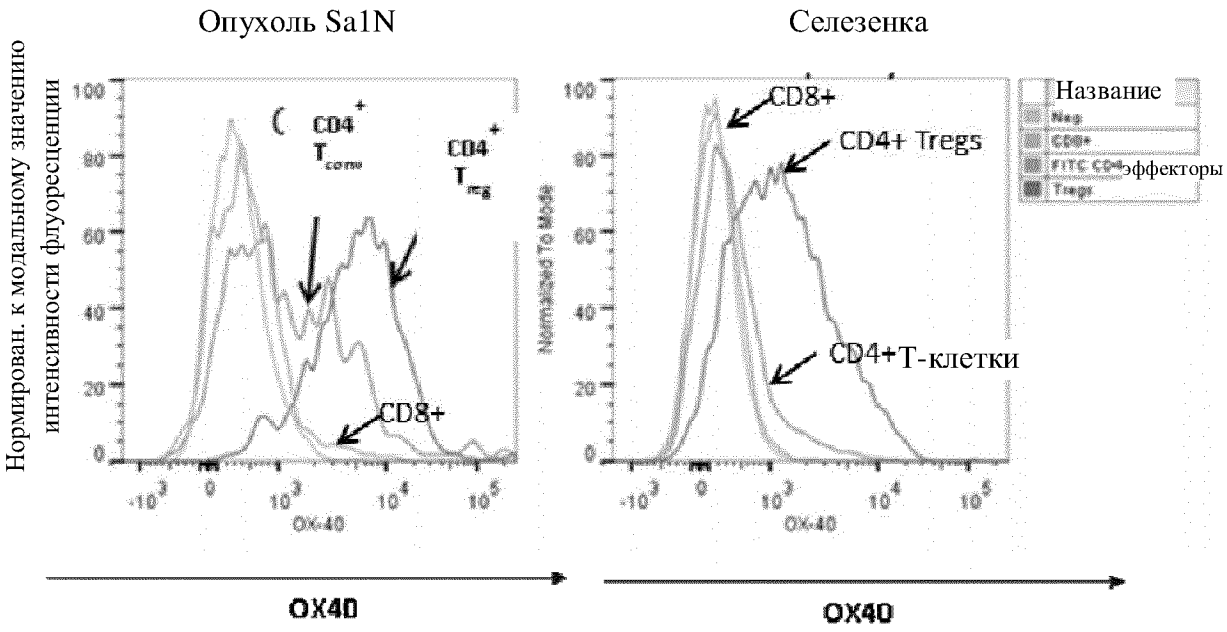
Фиг. 28A



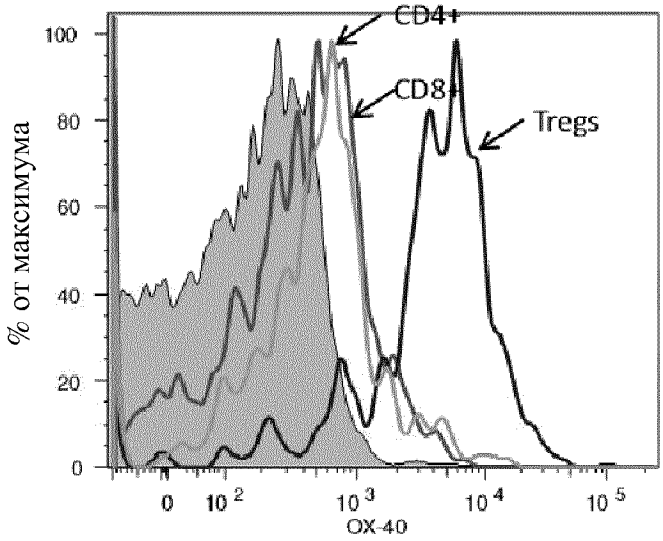
Фиг. 28B


Колоректк.
Скоррект. колоректк
Легкого 1
Легкого 2
Скоррект. легкого 2
Легкого 3
Скоррект. легкого 3
Легкого 4
Скоррект. легкого 4
Овариальн. 1
Овариальн. 2
MFI
1400
1200
1000
800
600
400
CD4
Treg
CD8
OX40
% положительных клеток
100
80
60
40
20
0
скоррект. норма
TIL

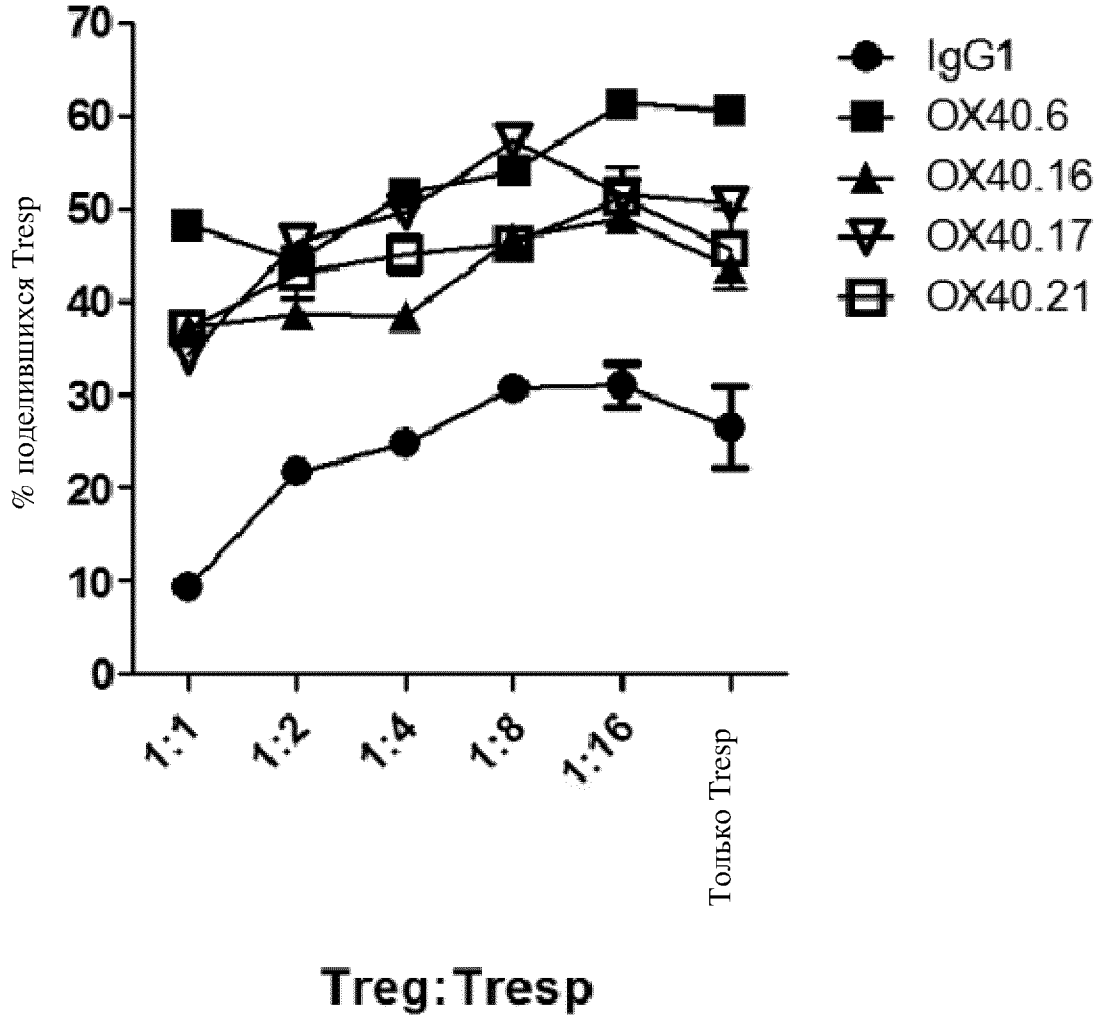
Фиг. 28C



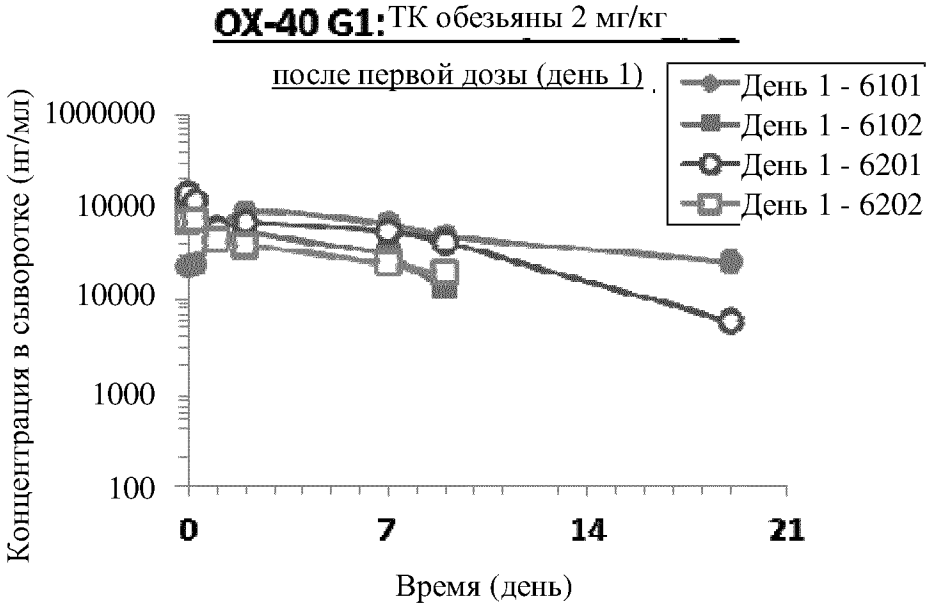
Фиг. 28D



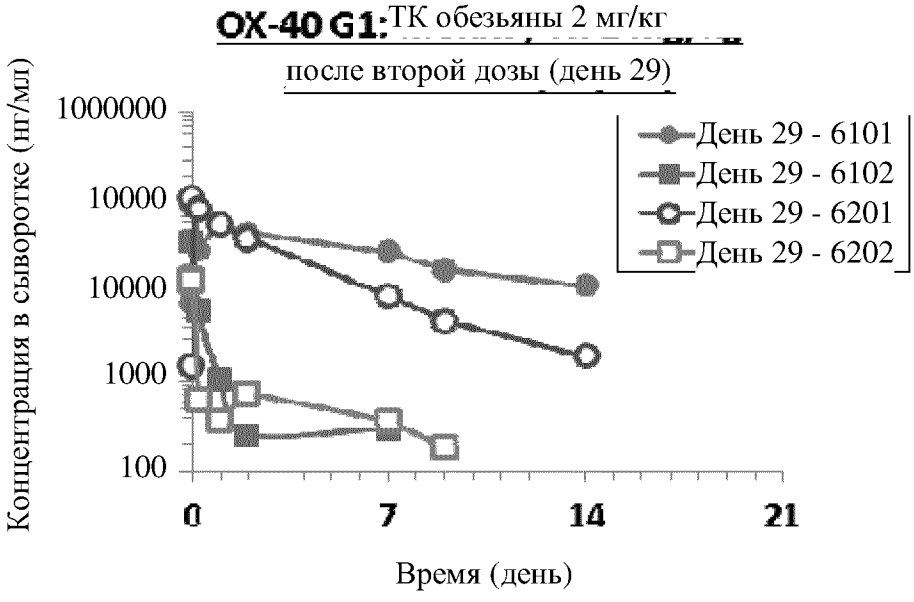
Фиг. 28E


% поделившихся Tresp
70
60
50
40
30
20
10
0
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
Только Tresp
Treg:Tresp
IgG1
OX40.6
OX40.16
OX40.17
OX40.21

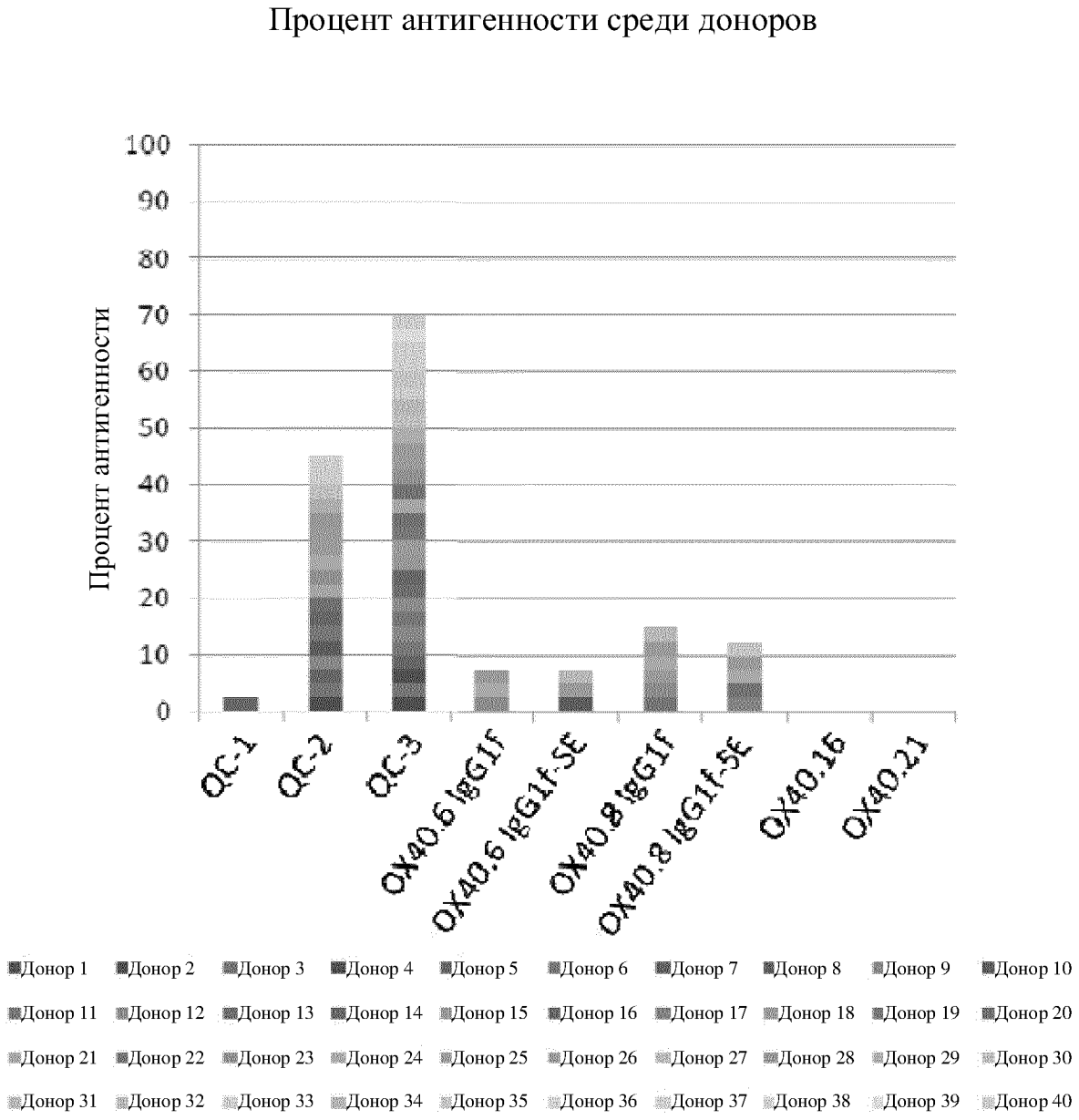
Фиг. 29



Фиг. 30A

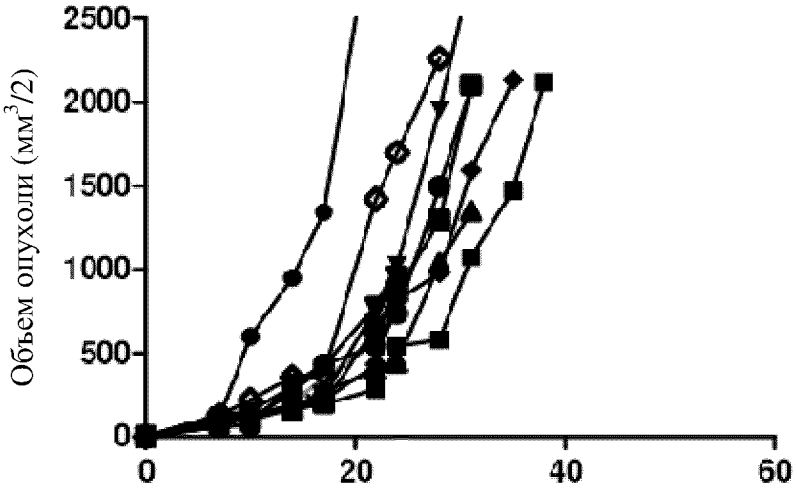


Фиг. 30B

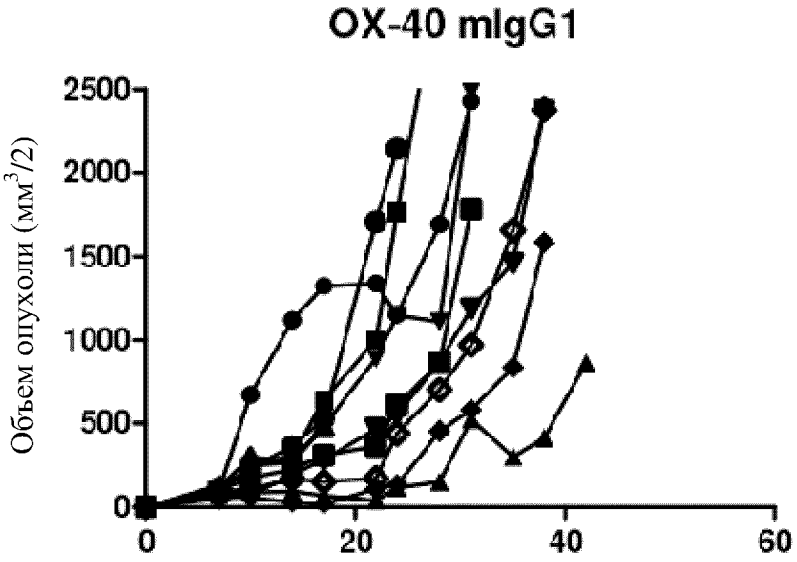

Процент антигенности среди доноров
Процент антигенности
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
QC-1
QC-2
QC-3
OX40.6 IgG1f
OX40.6 IgG1f-5E
OX40.8 IgG1f
OX40.8 IgG1f-5E
OX40.16
OX40.21
Донор 1
Донор 2
Донор 3
Донор 4
Донор 5
Донор 6
Донор 7
Донор 8
Донор 9
Донор 10
Донор 11
Донор 12
Донор 13
Донор 14
Донор 15
Донор 16
Донор 17
Донор 18
Донор 19
Донор 20
Донор 21
Донор 22
Донор 23
Донор 24
Донор 25
Донор 26
Донор 27
Донор 28
Донор 29
Донор 30
Донор 31
Донор 32
Донор 33
Донор 34
Донор 35
Донор 36
Донор 37
Донор 38
Донор 39
Донор 40

Фиг. 31

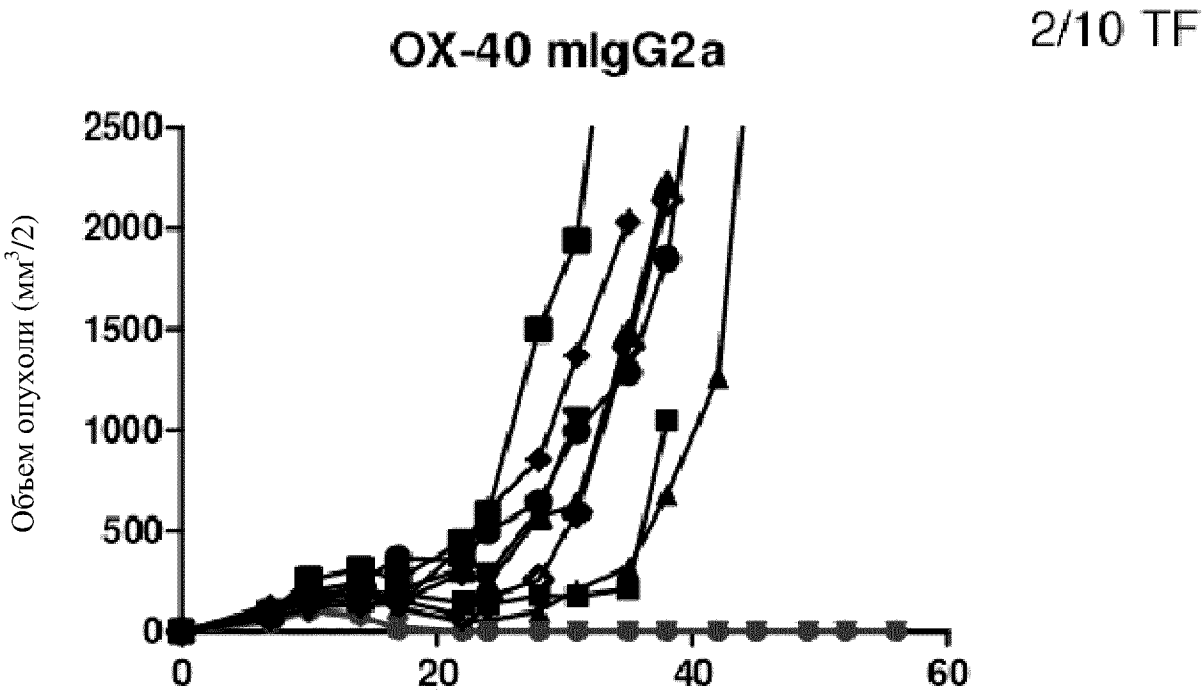
Контроль



Фиг. 32A

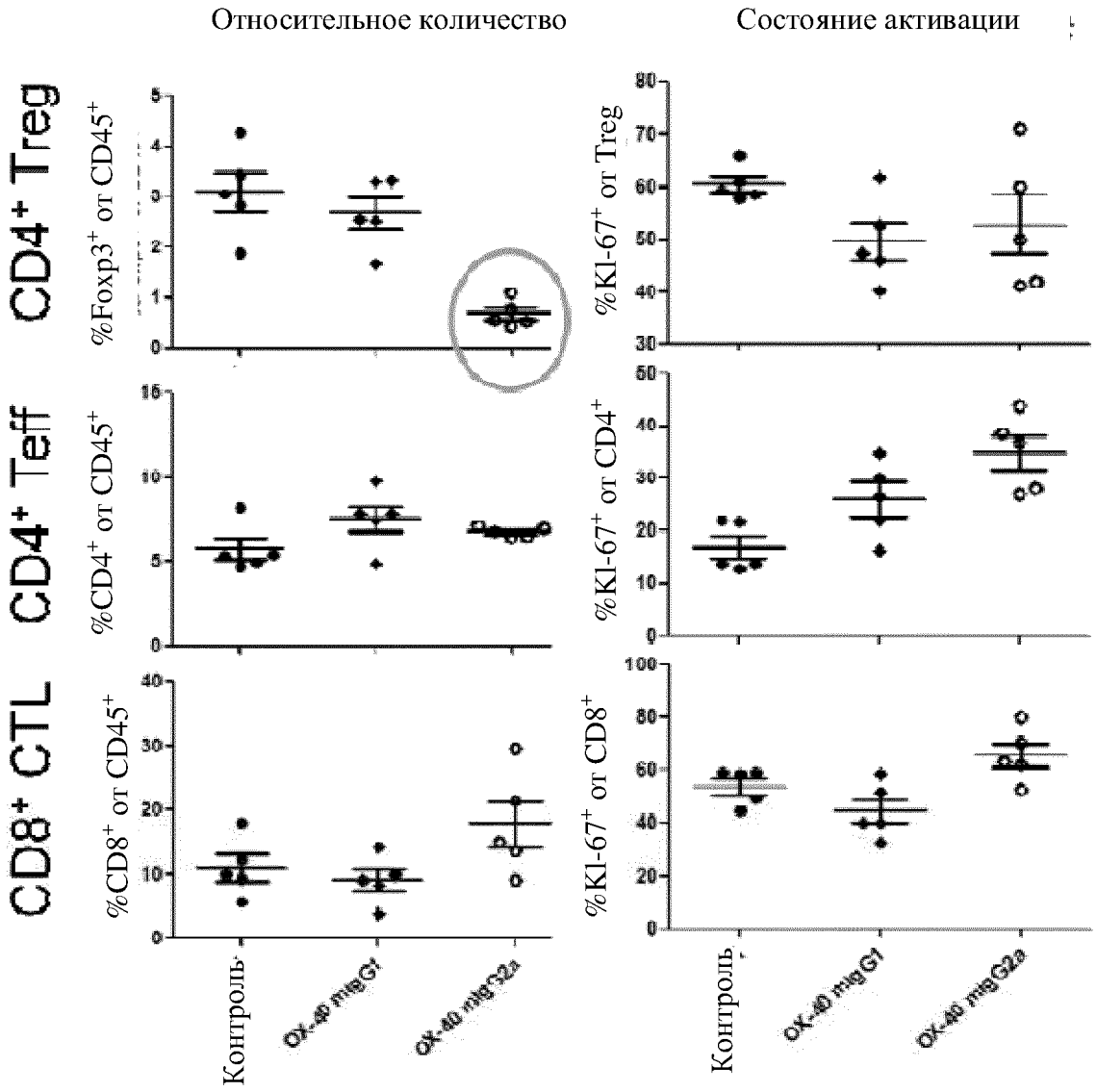


Фиг. 32B


2/10 TF
OX-40 mIgG2a
Объем опухоли (мм3/2)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60

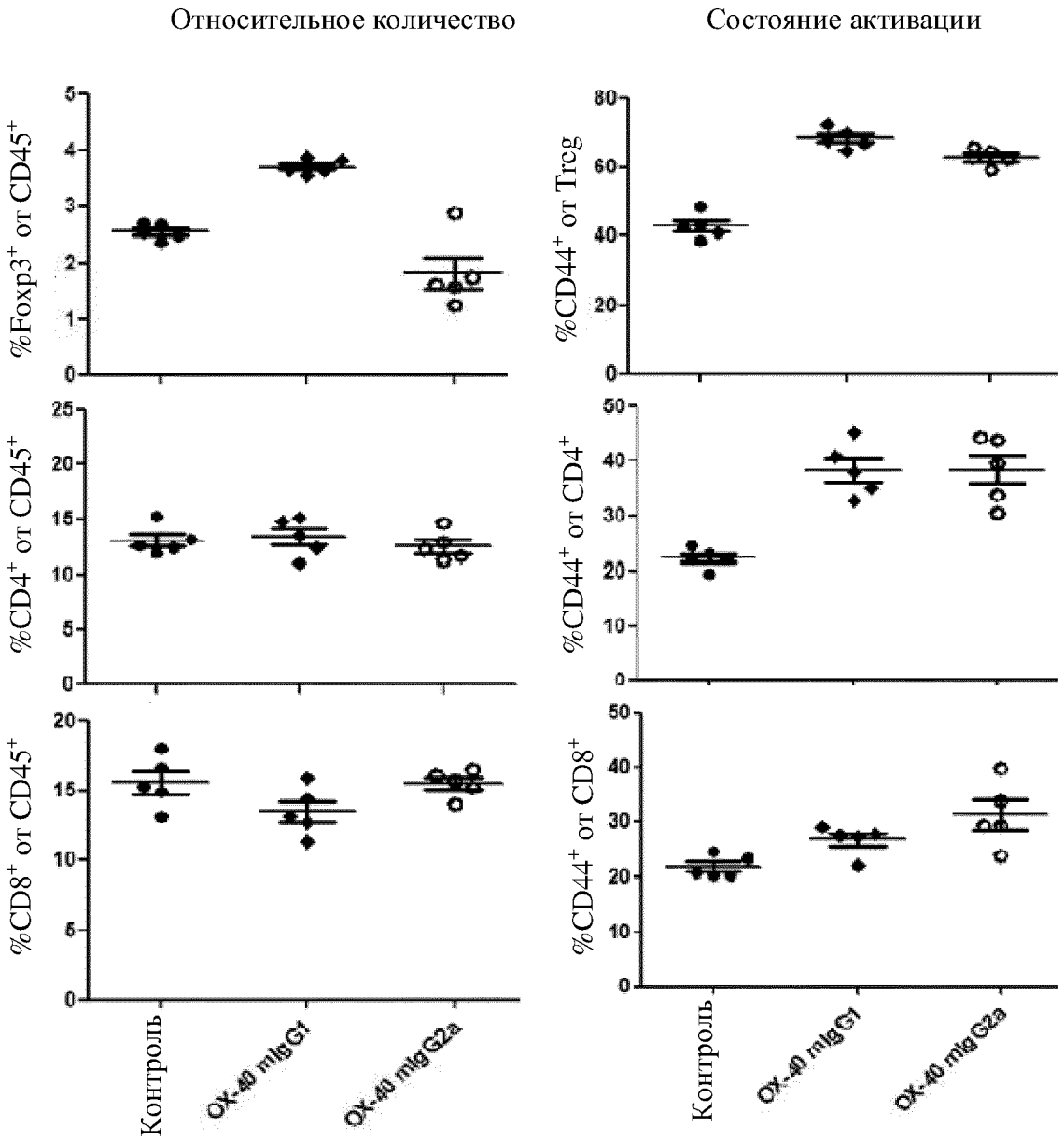
Фиг. 32C

Опухоль



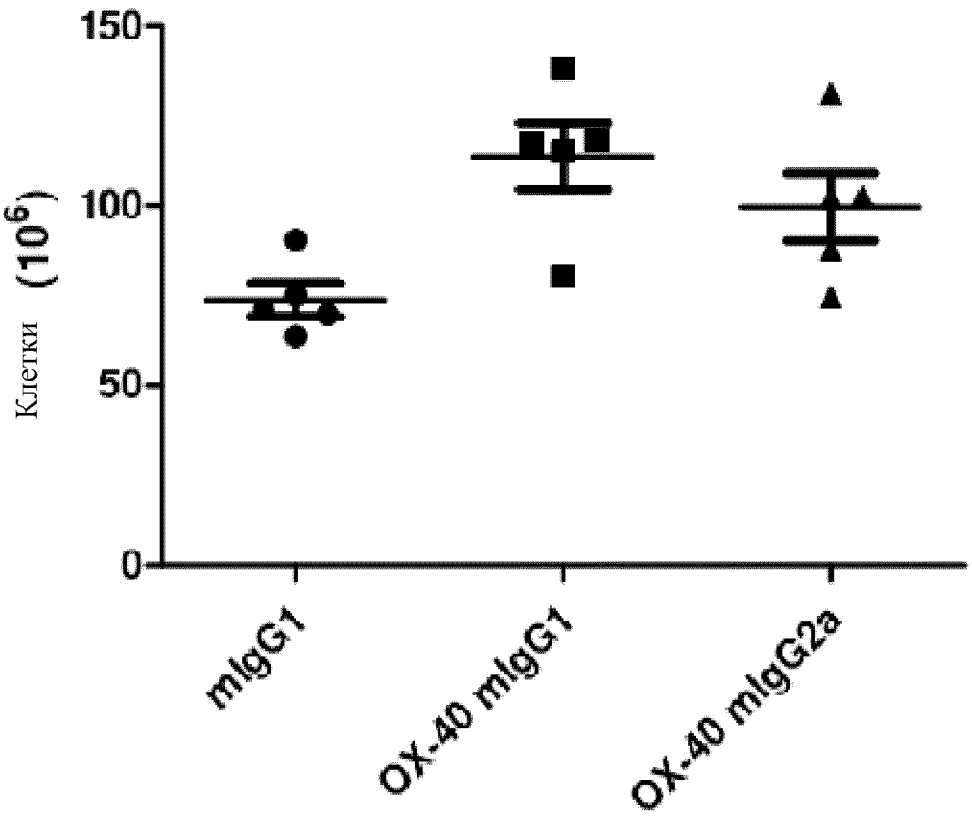
Фиг. 33A

Периферия



Фиг. 33B

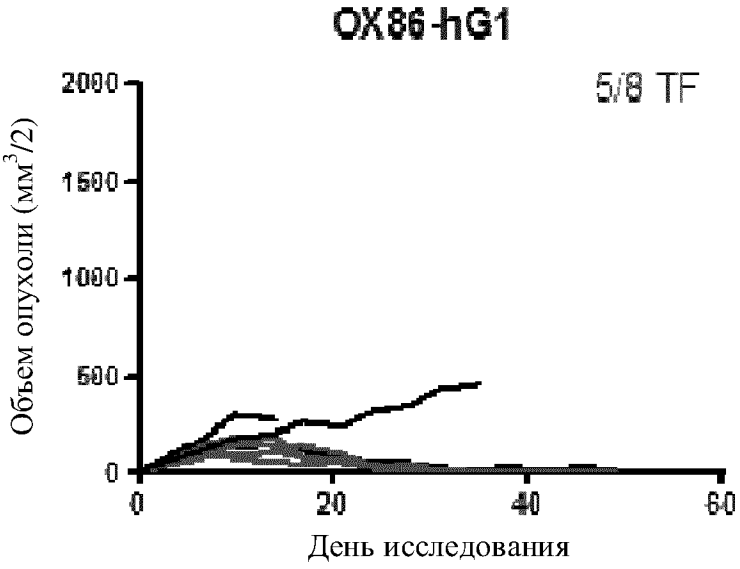
Клеточность селезенки



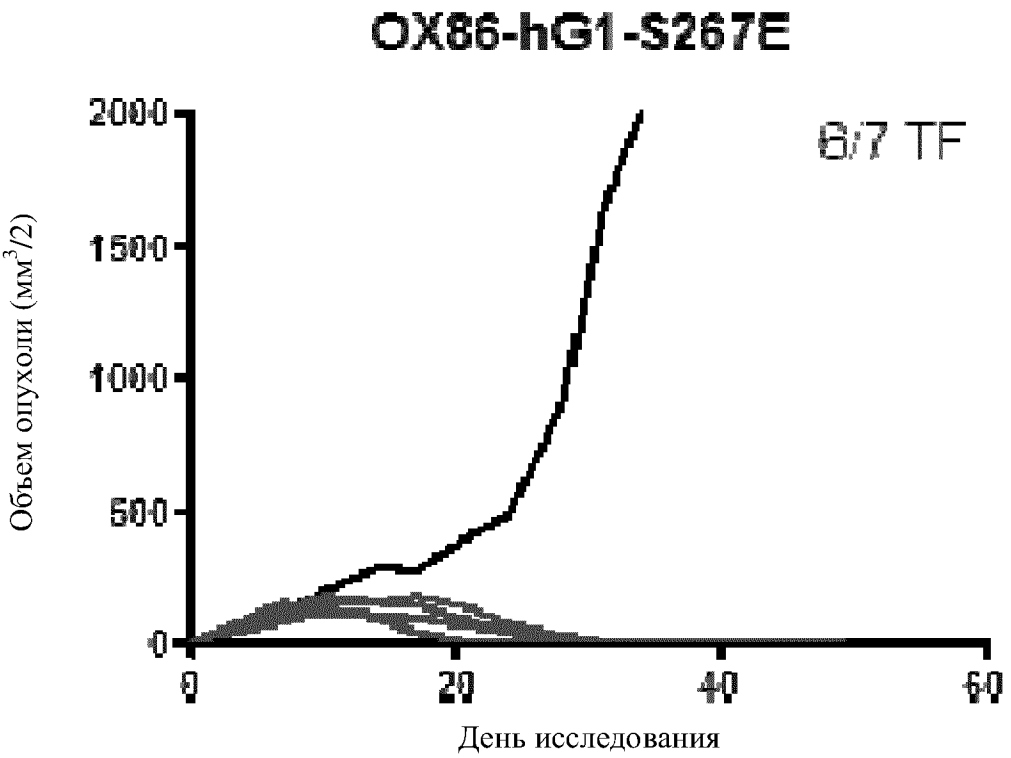
Фиг. 33C



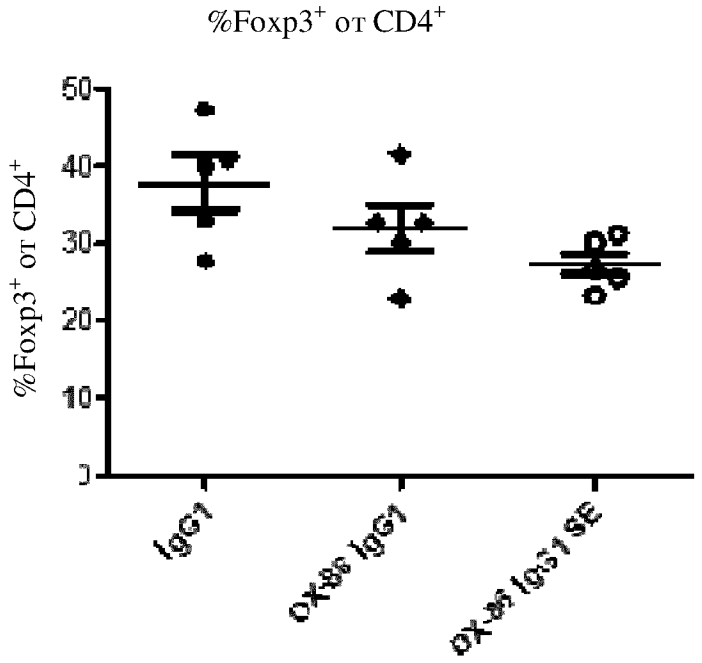
Фиг. 34A



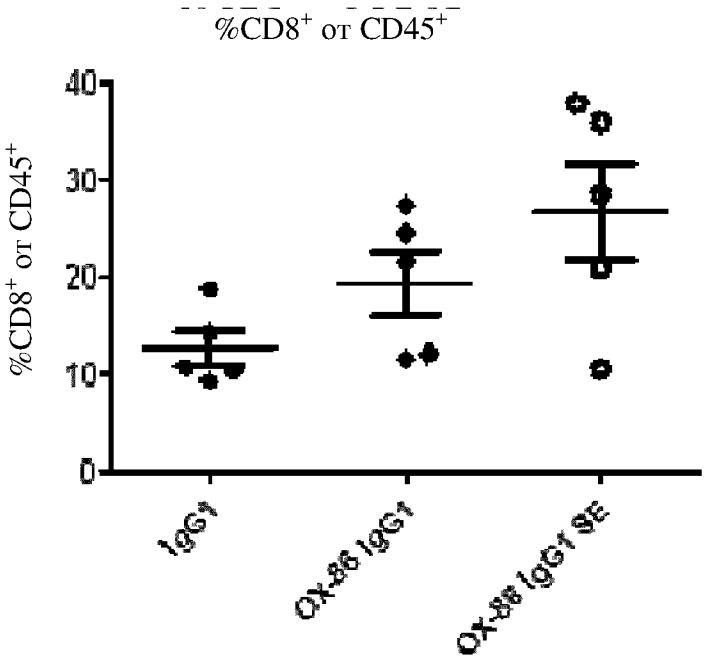
Фиг. 34B


OX86-hG1-S267E
6/7 TF
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
Объем опухоли (мм3/2)
День исследования

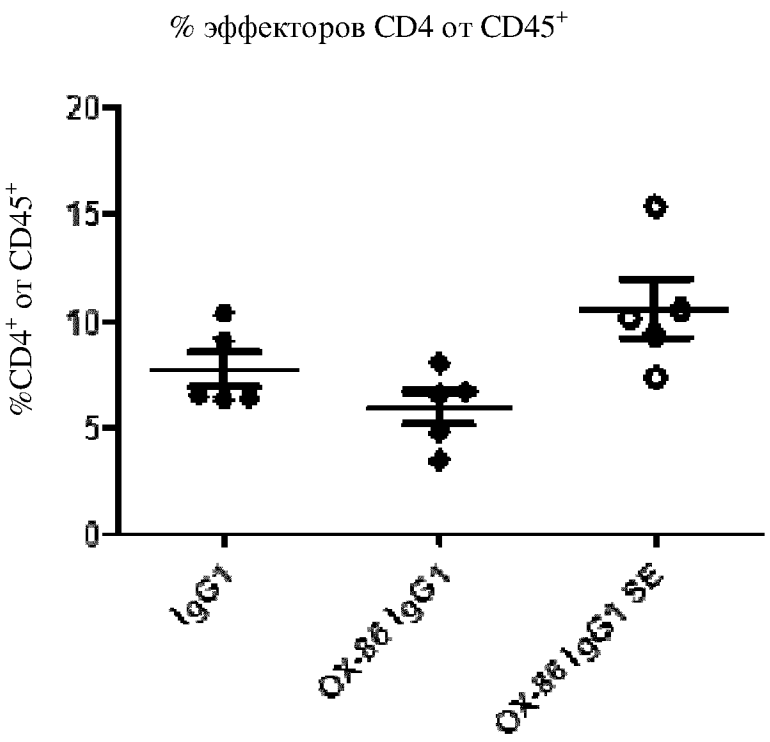
Фиг. 34C



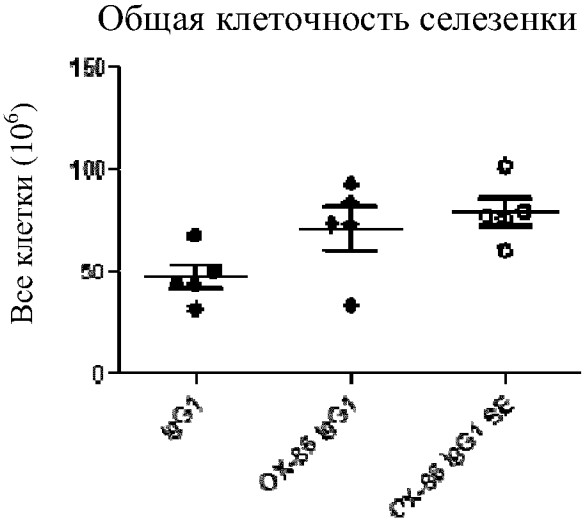
Фиг. 35A



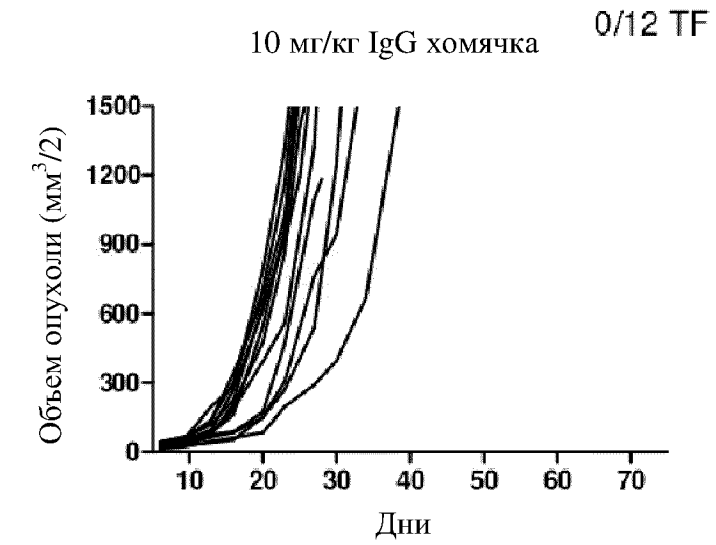
Фиг. 35B



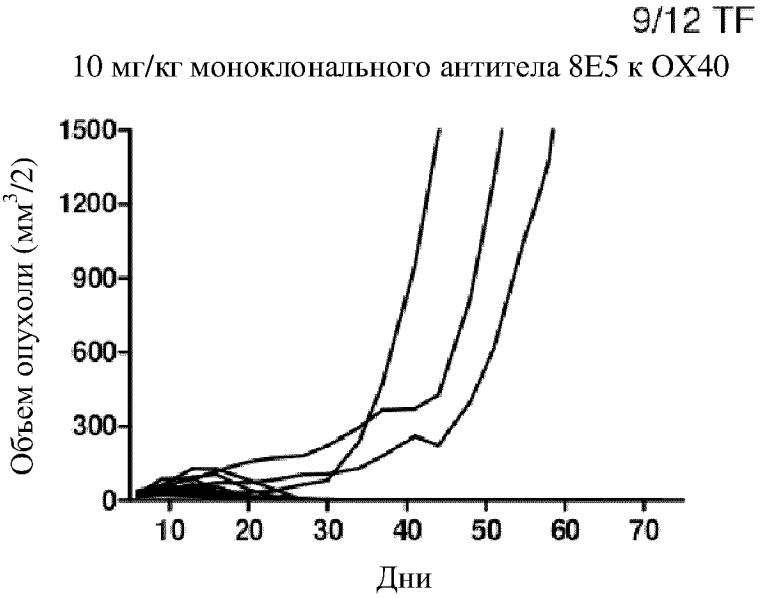
Фиг. 35C



Фиг. 35D



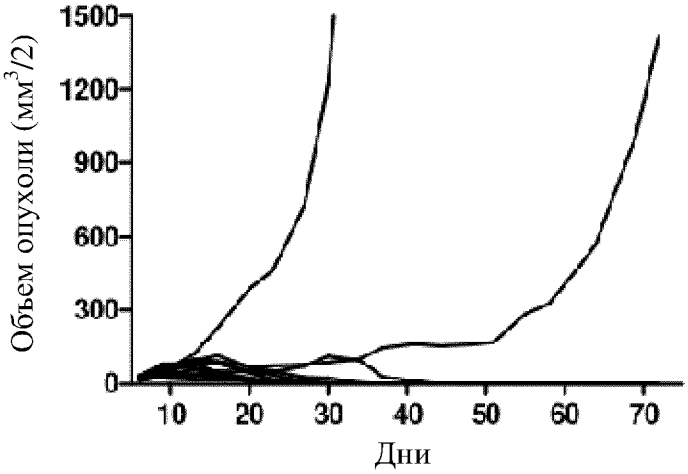
Фиг. 36A



Фиг. 36B

10/12 TF

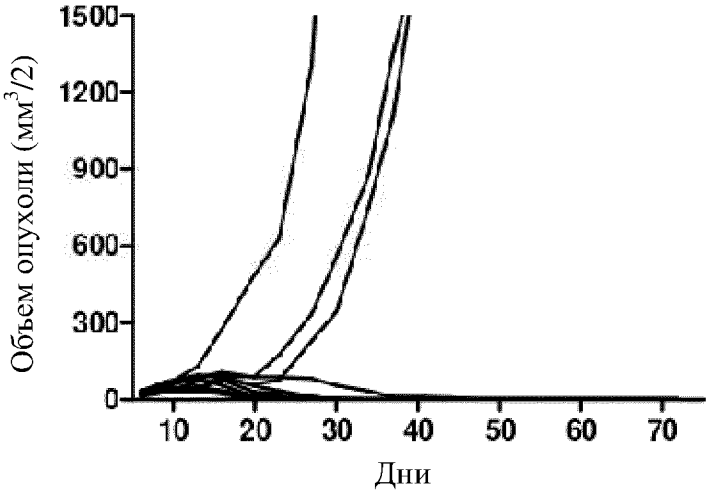
3 мг/кг моноклонального антитела 8E5 к OX40



Фиг. 36C

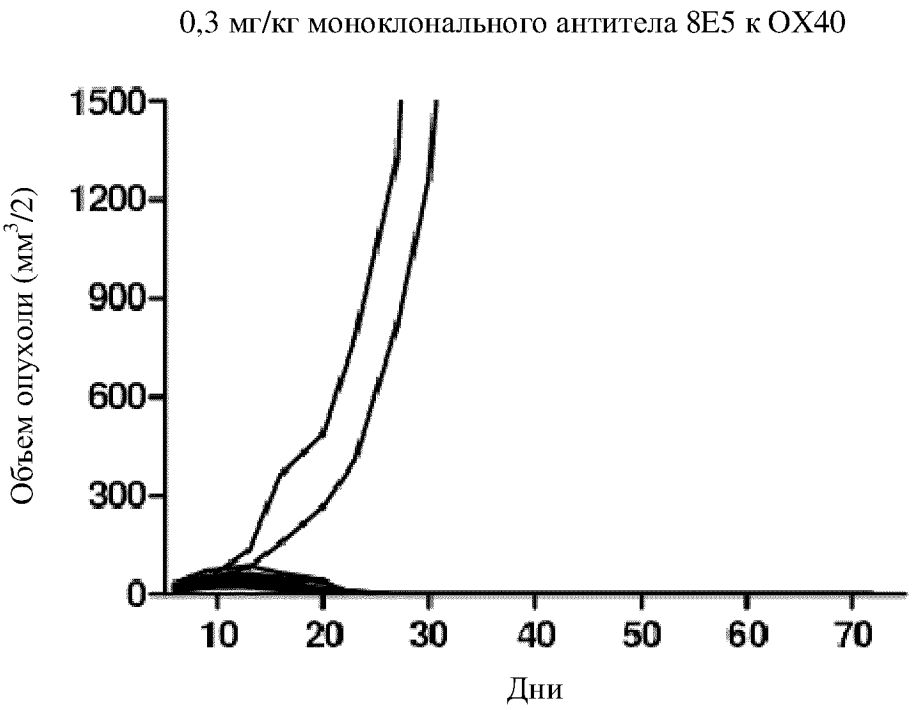
9/12 TF

1 мг/кг моноклонального антитела 8E5 к OX40

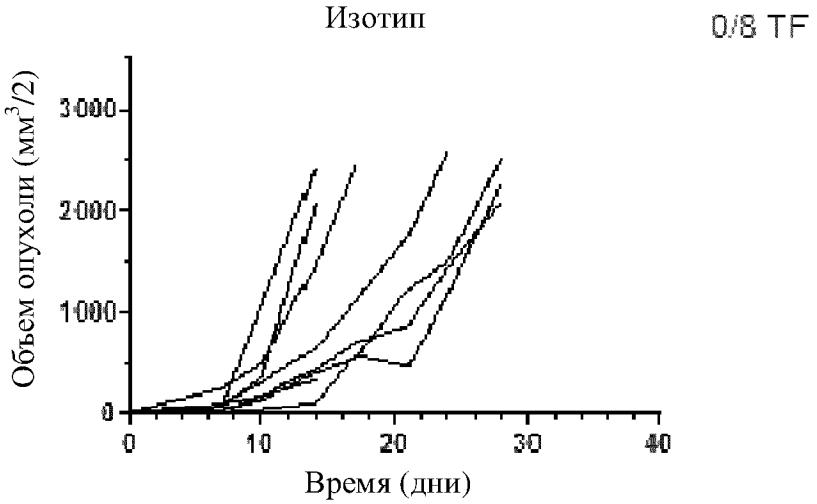


Фиг. 36D

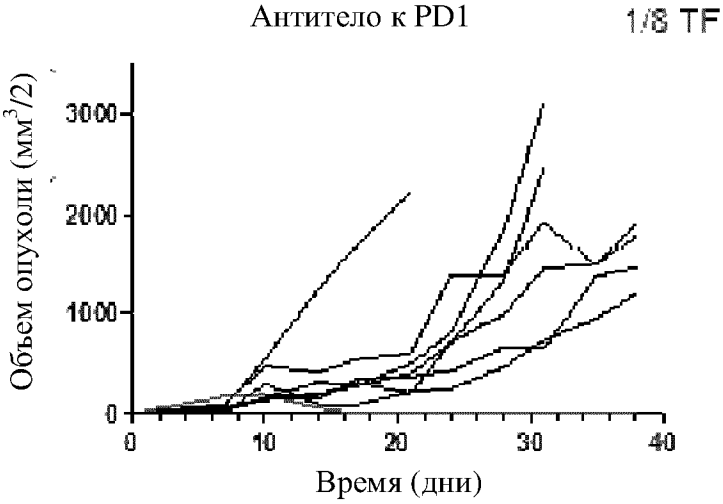
10/12 TF



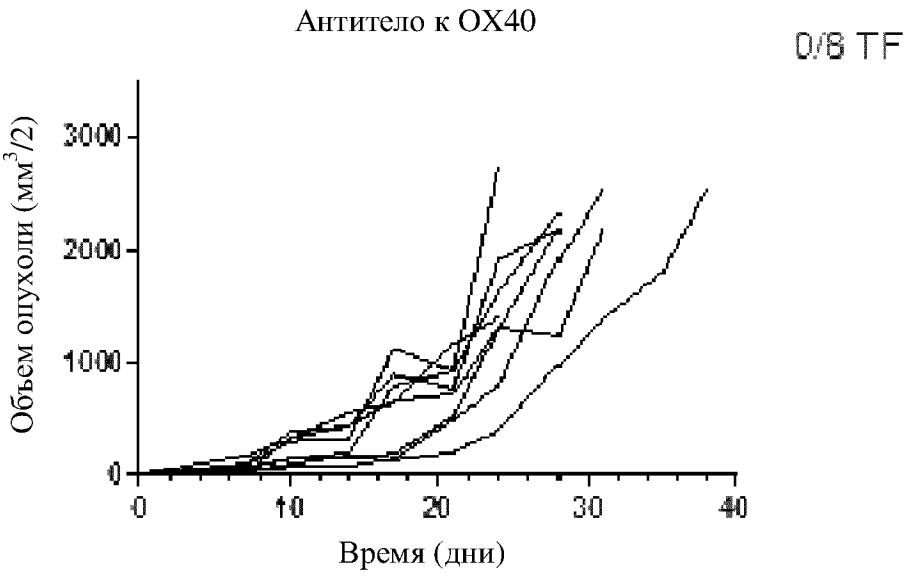
Фиг. 36E



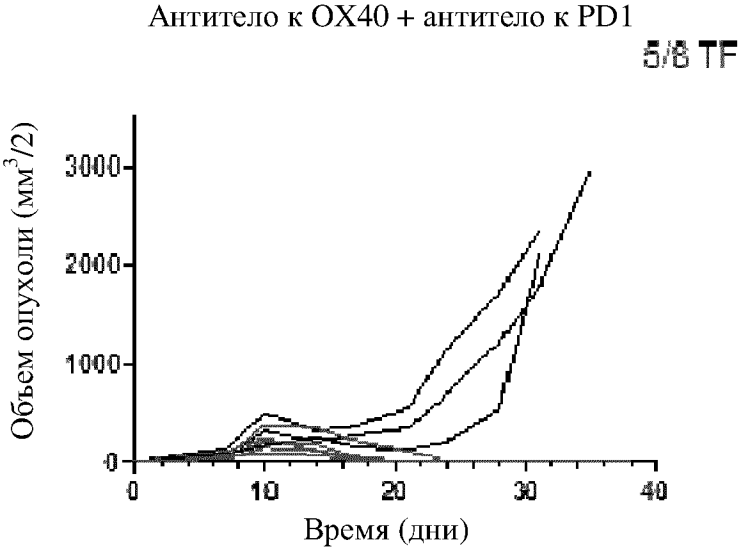
Фиг. 37A



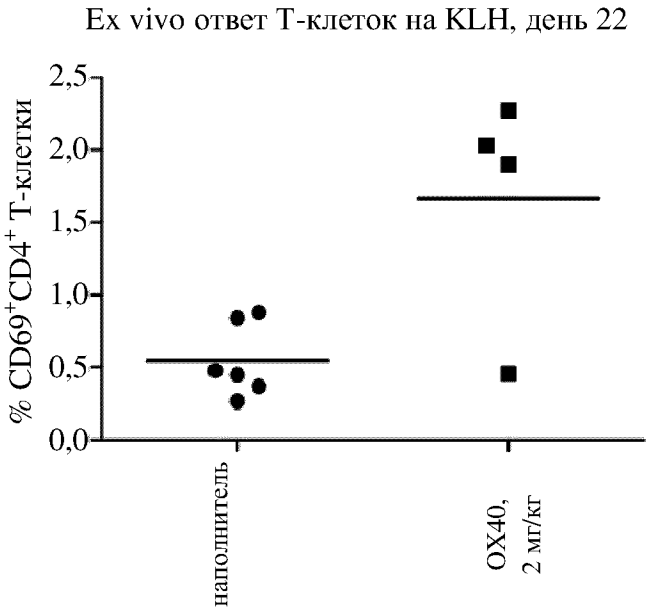
Фиг. 37B



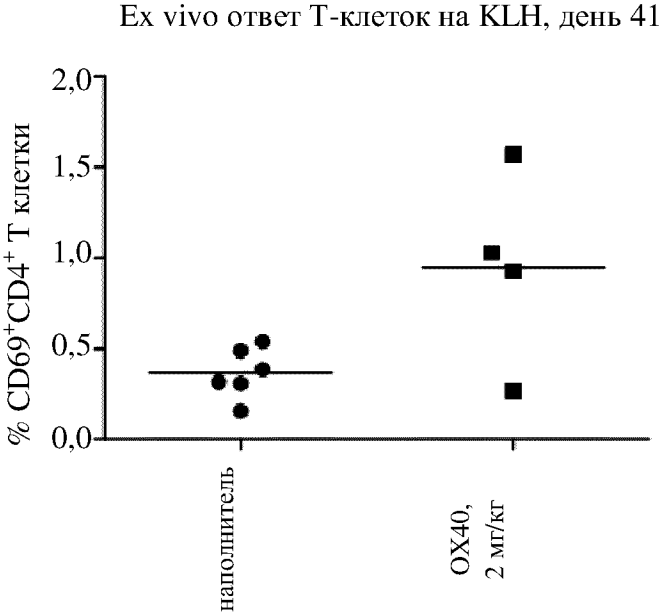
Фиг. 37C



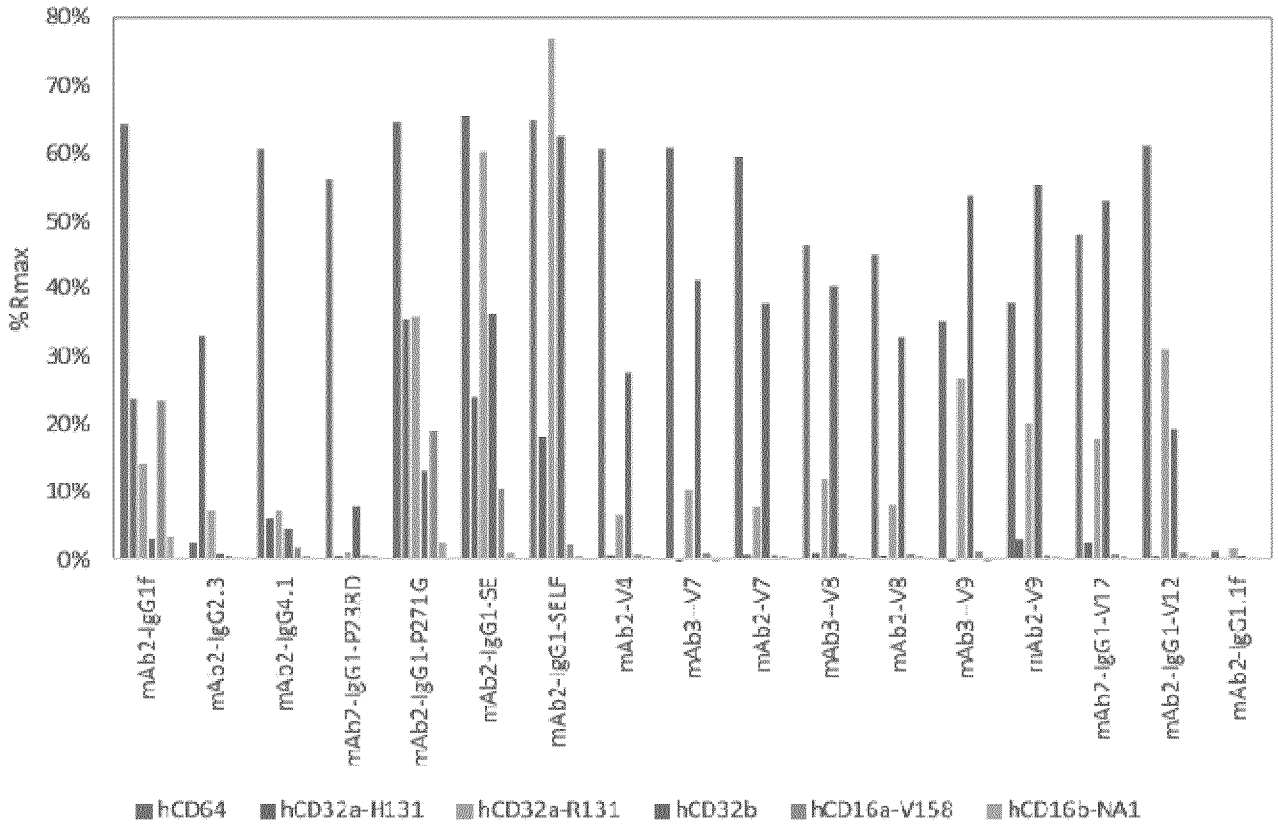
Фиг. 37D



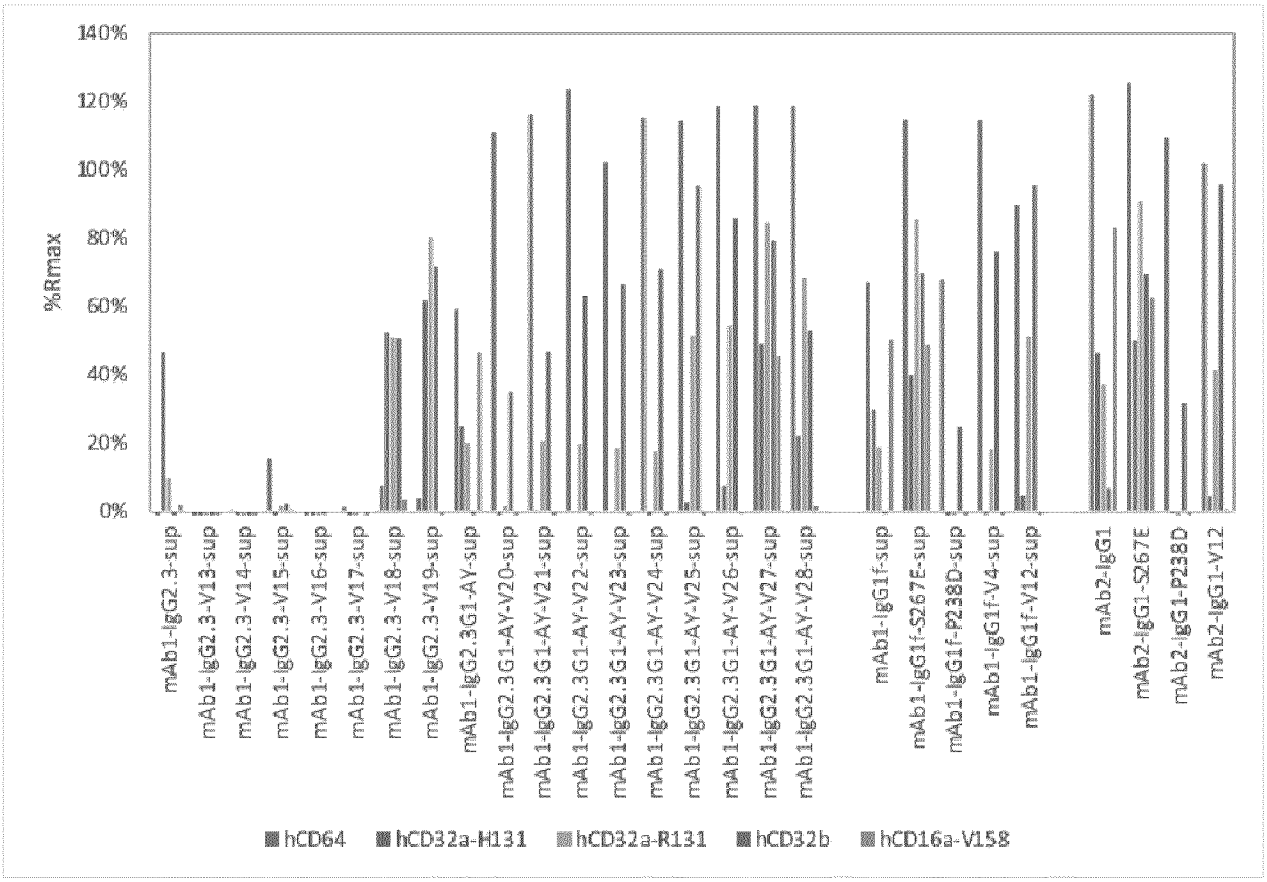
Фиг. 38A



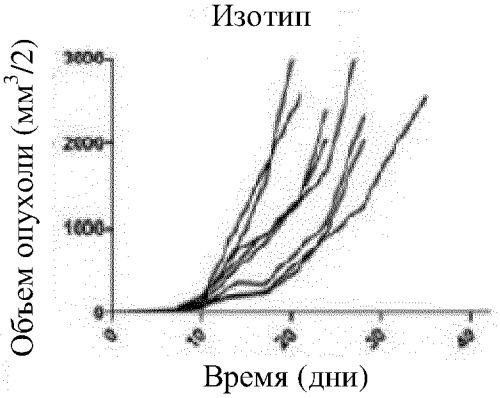
Фиг. 38B


80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
%Rmax
mAb2-IgG1f
mAb2-IgG2.3
mAb2-IgG4.1
mAb2-IgG1-P238D
mAb2-IgG1-P271G
mAb2-IgG1-SE
mAb2-IgG1-SELF
mAb2-V4
mAb2-V7
mAb2-V7
mAb2-V8
mAb2-V8
mAb2-V9
mAb2-V9
mAb2-IgG1-V12
mAb2-IgG1-V12
mAb2-IgG1.1f
hCD64
hCD32a-H131
hCD32a-R131
hCD32b
hCD16a-V158
hCD16b-NA1

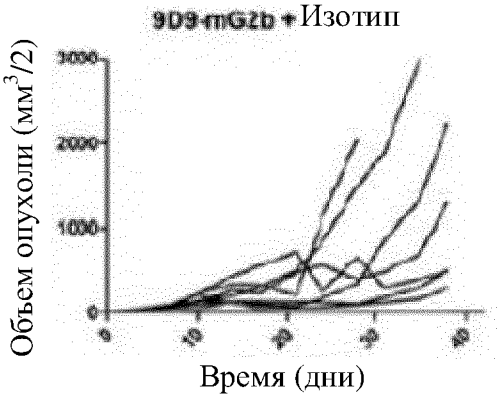
Фиг. 39


140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
%Rmax
mAb1-IgG2.3-sup
mAb1-IgG2.3-V13-sup
mAb1-IgG2.3-V14-sup
mAb1-IgG2.3-V15-sup
mAb1-IgG2.3-V16-sup
mAb1-IgG2.3-V17-sup
mAb1-IgG2.3-V18-sup
mAb1-IgG2.3-V19-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V20-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V21-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V22-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V23-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V24-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V25-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V26-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V27-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V28-sup
mAb1-IgG1f-sup
mAb1-IgG1f-S267E-sup
mAb1-IgG1f-P238D-sup
mAb1-IgG1f-V4-sup
mAb1-IgG1f-V12-sup
mAb2-IgG1
mAb2-IgG1-S267E
mAb2-IgG1-P238D
mAb2-IgG1-V12
hCD64
hCD32a-H131
hCD32a-R131
hCD32b
hCD16a-V158

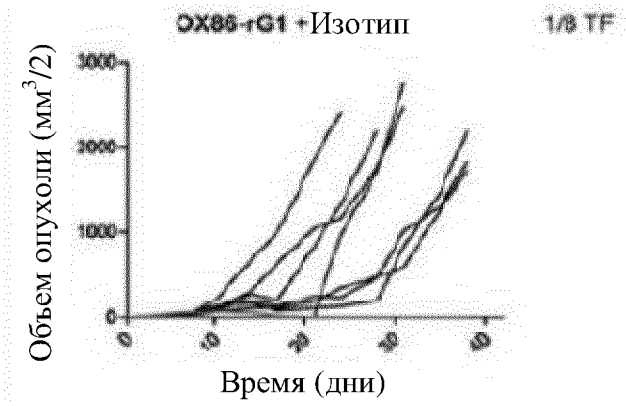
Фиг. 40



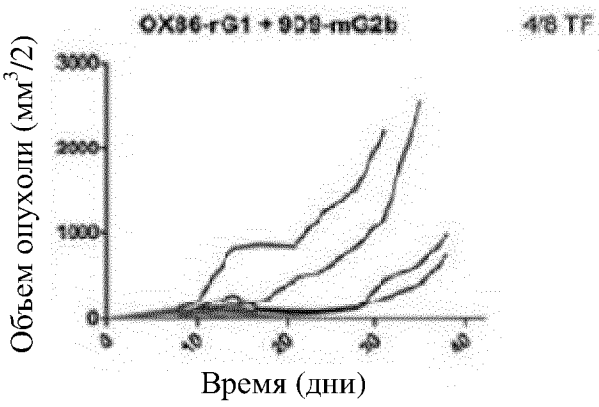
Фиг. 41A



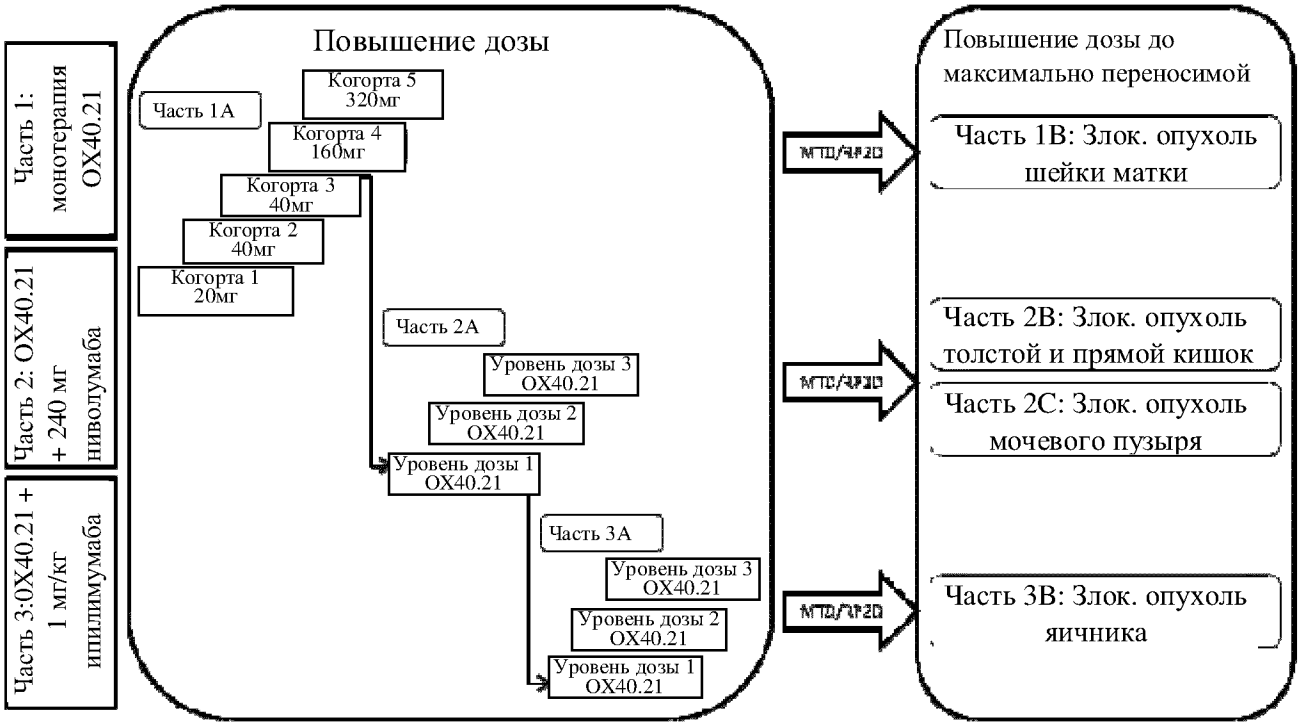
Фиг. 41B



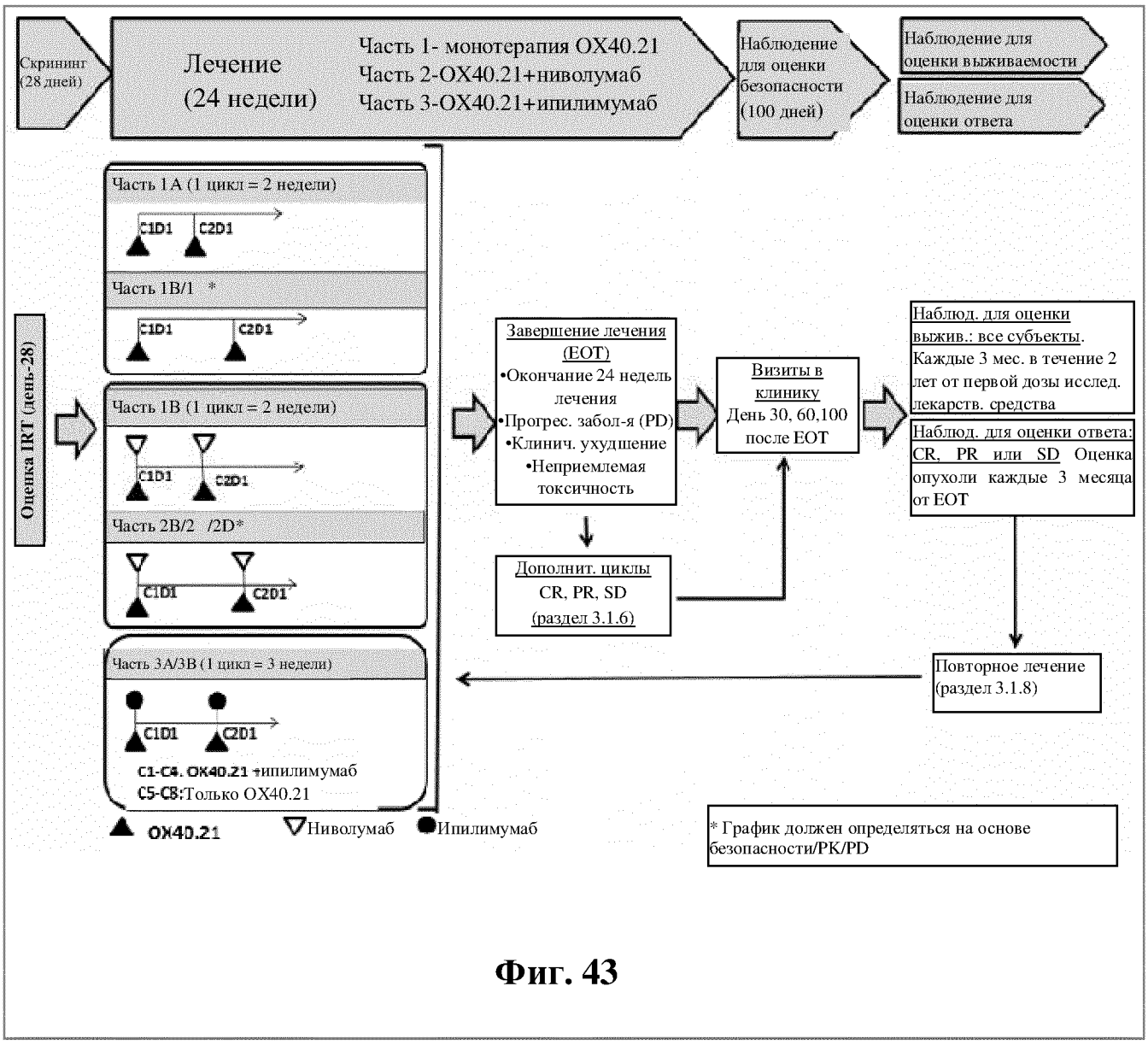
Фиг. 41C



Фиг. 41D


Часть 1: монотерапия OX40.21
Часть 2: OX40.21 + 240 мг ниволумаба
Часть 3:0X40.21 + 1 мг/кг ипилимумаба
Повышение дозы
Часть 1A
Когорта 5 320мг
Когорта 4 160мг
Когорта 3 40мг
Когорта 2 40мг
Когорта 1 20мг
Часть 2A
Уровень дозы 3 OX40.21
Уровень дозы 2 OX40.21
Уровень дозы 1 OX40.21
Часть 3A
Уровень дозы 3 OX40.21
Уровень дозы 2 OX40.21
Уровень дозы 1 OX40.21
Повышение дозы до максимально переносимой
Часть 1B: Злок. опухоль шейки матки
Часть 2B: Злок. опухоль толстой и прямой кишок
Часть 2C: Злок. опухоль мочевого пузыря
Часть 3B: Злок. опухоль яичника

Фиг. 42


Скрининг (28 дней)
Лечение (24 недели)
Часть 1- монотерапия OX40.21
Часть 2-OX40.21+ниволумаб
Часть 3-OX40.21+ипилимумаб
Наблюдение для оценки безопасности (100 дней)
Наблюдение для оценки выживаемости
Наблюдение для оценки ответа
Оценка ИКТ (день-28)
Часть 1A (1 цикл = 2 недели)
C1D1
C2D1
Часть 1B/1 *
Часть 1B (1 цикл = 2 недели)
Часть 2B/2 /2D*
Часть 3A/3B (1 цикл = 3 недели)
C1-C4. OX40.21 +ипилимумаб
C5-C8:Только OX40.21
Завершение лечения (EOT)
•Окончание 24 недель лечения
•Прогрес. забол-я (PD)
•Клинич. ухудшение
•Неприемлемая токсичность
Дополнит. циклы
CR, PR, SD
(раздел 3.1.6)
Визиты в клинику
День 30, 60,100 после EOT
Наблюд. для оценки выжив.: все субъекты. Каждые 3 мес. в течение 2 лет от первой дозы исслед. лекарств. средства
Наблюд. для оценки ответа: CR, PR или SD Оценка опухоли каждые 3 месяца от EOT
Повторное лечение (раздел 3.1.8)
OX40.21
Ниволумаб
Ипилимумаб
* График должен определяться на основе безопасности/PK/PD

Фиг. 43