

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291502** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.07.12

(22) Дата подачи заявки
2020.11.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИТЕЛ К ОХ40 В
КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ К TIM3**

(31) PCT/CN2019/120040

(32) 2019.11.21

(33) CN

(86) PCT/CN2020/130003

(87) WO 2021/098758 2021.05.27

(71) Заявитель:
БЕЙДЖИН, ЛТД. (KY)

(72) Изобретатель:

Цзян Бэйбэй, Лю Е, Сун Сяоминь
(CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)

(57) В изобретении предложены способы лечения рака или повышения, усиления или стимулирования иммунного ответа с помощью неконкурентных агонистических антител к ОХ40 и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с ОХ40 человека (ACT35, CD134 или TNFRSF4), в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

A1

202291502

202291502

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИТЕЛ К OX40 В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ К TIM3

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] В настоящем документе раскрыт способ лечения рака с применением антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40 человека в комбинации с антителами или антигенсвязывающими фрагментами, которые связывают TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 3) человека.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] OX40 (также известный как ACT35, CD134 или TNFRSF4) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа с молекулярной массой приблизительно 50 кДа и является членом суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли (TNFRSF) (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). Зрелый OX40 человека состоит из 249 аминокислотных (AA) остатков, с цитоплазматическим хвостом из 37 AA и внеклеточной областью из 185 AA. Внеклеточный домен OX40 содержит три полных и один неполный домены, богатые цистеином (CRD (определяющие комплементарность области)). Внутриклеточный домен OX40 содержит один консервативный мотив QEE, связанный с передачей сигнала, который опосредует связывание с несколькими факторами, ассоциированными с TNFR (рецептором фактора некроза опухоли) (TRAF – ассоциированный с TNF фактор), включая TRAF2, TRAF3 и TRAF5, что позволяет OX40 связываться с внутриклеточными киназами (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017).

[0003] Первоначально OX40 обнаружили на активированных CD4⁺ Т-клетках крысы, а затем клонировали мышинные и человеческие гомологи из Т-клеток (al-Shamkhani et al., 1996; Calderhead et al., 1993). В дополнение к экспрессии на активированных CD4⁺ Т-клетках, включая клетки Т-хелперы (Th) 1, Th2-клетки, Th17-клетки, а также регуляторных Т-клетках (Treg), экспрессия OX40 также была обнаружена на поверхности активированных CD8⁺ Т-клеток, естественных киллерных (NK) Т-клеток, нейтрофилов и NK-клеток (Croft, 2010). Напротив, низкая экспрессия OX40 обнаружена на наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, а также на большинстве Т-клеток памяти, находящихся в покое (Croft, 2010; Soroosh et al., 2007). Поверхностная экспрессия OX40 на наивных Т-клетках является временной. После активации TCR (рецептора Т-клетки) экспрессия OX40 на Т-клетках значительно повышается в течение 24 ч, с пиками в приблизительно 2-3 дня, сохраняясь в течение приблизительно 5-6 дней (Gramaglia et al., 1998).

[0004] Лиганд OX40 (OX40L, также известный как gp34, CD252 или TNFSF4) является единственным лигандом для OX40. Подобно другим членам TNFSF (суперсемейство фактора некроза опухоли), OX40L представляет собой гликопротеин II типа, который содержит 183 AA с внутриклеточным доменом из 23 AA и внеклеточным доменом из 133 AA (Croft, 2010; Gough and Weinberg, 2009). OX40L естественным образом образует гомомерный тримерный комплекс на поверхности клетки. Тример лиганда взаимодействует с тремя копиями OX40 на границе раздела мономер-мономер лиганда в основном через области рецептора CRD1, CRD2 и частично CRD3, но без участия CRD4 (Compaan and Hymowitz, 2006). OX40L в основном экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках (АПК), включая активированные В-клетки (Stuber et al., 1995), зрелые традиционные дендритные клетки (ДК) (Ohshima et al., 1997), плазмцитоподобные ДК (ПДК) (Ito et al., 2004), макрофаги (Weinberg et al., 1999) и клетки Лангерганса (Sato et al., 2002). Кроме того, было обнаружено, что OX40L экспрессируется на других типах клеток, таких как NK-клетки, тучные клетки, подмножества активированных Т-клеток, а также сосудистые эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки (Croft, 2010; Croft et al., 2009).

[0005] Тримеризация OX40 путем лигирования с помощью тримерного OX40L или димеризация с помощью агонистических антител способствуют рекрутингу и стыковке адаптерных молекул TRAF2, TRAF3 и/или TRAF5 с его внутриклеточным мотивом QEE (Arch and Thompson, 1998; Willoughby et al., 2017). Рекрутинг и стыковка TRAF2 и TRAF3 могут далее приводить к активации как канонических NF-κB1, так и неканонических NF-κB2 путей, которые играют ключевые роли в регуляции выживаемости, дифференцировки, размножения, продукции цитокинов и эффекторных функций Т-клеток (Croft, 2010; Gramaglia et al., 1998; Huddlestone et al., 2006; Rogers et al., 2001; Ruby and Weinberg, 2009; Song et al., 2005a; Song et al., 2005b; Song et al., 2008).

[0006] В нормальных тканях экспрессия OX40 низкая и происходит в основном на лимфоцитах в лимфоидных органах (Durkop et al., 1995). Однако повышение экспрессии OX40 на иммунных клетках часто наблюдалась как на животных моделях, так и у человеческих пациентов с патологическими состояниями (Redmond and Weinberg, 2007), такими как аутоиммунные заболевания (Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Szybowska et al., 2014) и раковые заболевания (Kjaergaard et al., 2000; Vetto et al., 1997; Weinberg et al., 2000). Примечательно, что повышенная экспрессия OX40 связана с более долгой выживаемостью у пациентов с колоректальным раком и меланомой кожи, а обратно коррелирует с возникновением отдаленных метастазов и более выраженными признаками опухоли (Ladanyi et al., 2004; Petty et al., 2002; Sarff et al., 2008). Также было показано, что

лечение антителом к OX40 может выявлять противоопухолевую эффективность в различных мышинных моделях (Aspeshlagh et al., 2016), указывая на потенциал OX40 в качестве иммунотерапевтической мишени. В первом клиническом исследовании на онкологических пациентах, проведенном Curti и др., с агонистическим моноклональным антителом к OX40 наблюдались свидетельства противоопухолевой эффективности и активации опухолеспецифических Т-клеток, что указывало на то, что антитела к OX40 полезны для усиления противоопухолевых Т-клеточных ответов (Curti et al., 2013).

[0007] Механизм действия агонистических антител к OX40 в опосредовании противоопухолевой эффективности изучали в первую очередь на мышинных моделях опухолей (Weinberg et al., 2000). До недавнего времени механизм действия агонистических антител к OX40 в опухолях объяснялся их способностью запускать костимулирующий путь передачи сигнала в эффекторных Т-клетках, а также ингибирующими эффектами на дифференцировку и функции Treg клеток (Aspeshlagh et al., 2016; Ito et al., 2006; St Rose et al., 2013; Voo et al., 2013). Недавние исследования показали, что как в животных моделях опухолей, так и у онкологических пациентов, проникающие в опухоль Treg клетки экспрессируют более высокие уровни OX40, чем эффекторные Т-клетки (как CD4⁺, так и CD8⁺) и периферические Treg клетки (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016). Следовательно, вторичные эффекты, с помощью которых антитела к OX40 запускают противоопухолевые ответы, зависят от их Fc-опосредованных эффекторных функций при истощении внутриопухолевых OX40⁺ Treg клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) (Aspeshlagh et al., 2016; Bulliard et al., 2014; Marabelle et al., 2013a; Marabelle et al., 2013b; Smyth et al., 2014). Эта работа демонстрирует, что агонистические антитела к OX40 с Fc-опосредованной эффекторной функцией могут предпочтительно истощать внутриопухолевые Treg клетки и улучшать соотношения CD8⁺ эффекторных Т-клеток к Treg клеткам в микроокружении опухоли (ТМЕ), что приводит к улучшению противоопухолевых иммунных ответов, усилению регрессии опухоли и улучшению выживаемости (Bulliard et al., 2014; Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Marabelle et al., 2013b). Основываясь на этих результатах, существует неудовлетворенная медицинская потребность в разработке агонистических антител к OX40, как с агонистической активностью, так и с Fc-опосредованными эффекторными функциями.

[0008] На сегодняшний день клинически применяемые агонистические антитела к OX40 в основном представляют собой лиганд-конкурентные антитела, которые блокируют взаимодействие OX40-OX40L (например, WO2016196228A1). Поскольку взаимодействие

OX40-OX40L необходимо для усиления эффективного противоопухолевого иммунитета, блокада OX40-OX40L ограничивает эффективность этих лиганд-конкурентных антител. Следовательно, агонистические антитела к OX40, которые специфически связываются с OX40, не мешая взаимодействию OX40 с OX40L, пригодны для лечения рака и аутоиммунных расстройств.

[0009] При раке и вирусных инфекциях активация передачи сигналов TIM3 способствует дисфункции иммунных клеток, что приводит к разрастанию рака или длительной вирусной инфекции. Повышение экспрессии TIM3 в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL), макрофагах и опухолевых клетках было зарегистрировано при многих видах рака, таких как рак легких (Zhuang X, et al., *Am J Clin Pathol* 2012 137: 978-985), рак печени (Li H, et al., *Hepatology* 2012 56: 1342-1351), рак желудка (Jiang et al., *PLoS One* 2013 8: e81799), рак почки (Komohara et al., *Cancer Immunol Res.* 2015 3: 999-1000), рак молочной железы (Heon EK, et al., 2015 *Biochem Biophys Res Commun.* 464: 360-6), рак толстой кишки (Xu et al., *Oncotarget* 2015), рак меланоцитов (Gros A, et al., 2014 *J Clin Invest.* 2014 124: 2246-2259) и рак шейки матки (Cao et al., *PLoS One* 2013 8: e53834). Повышенная экспрессия TIM3 при этих видах рака связана с плохим прогнозом выживаемости пациентов. Повышение регуляции передачи сигналов TIM3 играет важную роль не только в иммунной толерантности к раку, но и также к хронической вирусной инфекции. Во время инфекций ВИЧ и ВГС (вирус гепатита С) экспрессия TIM3 на Т-клетках была значительно выше, чем у здоровых людей, и положительно коррелировала с вирусной нагрузкой и прогрессированием заболевания (Jones RB, et al., 2008 *J Exp Med.* 205: 2763-79; Sakhdari A, et al., 2012 *PLoS One* 7: e40146; Golden-Mason L, et al., 2009 *J Virol.* 83: 9122-30; 2012 Moorman JP, et al., *J Immunol.* 189: 755-66). Кроме того, блокада рецептора TIM3 по-отдельности или в комбинации с блокадой PD-1/PD-L1 может спасти функционально «истощенные» Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo* (Dietze KK, et al., 2013 *PLoS Pathog* 9: e1003798; Golden-Mason L, et al., 2009 *J Virol.* 83: 9122-30). Следовательно, модуляция передачи сигналов TIM3 терапевтическими агентами может спасти иммунные клетки, например, Т-клетки, НК-клетки и макрофаги, от толерантности, индуцируя эффективные иммунные ответы для искоренения опухолей или хронических вирусных инфекций.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00010] Настоящее изобретение направлено на комбинацию агонистических антител к OX40 и антигенсвязывающих фрагментов и антител к TIM3 и антигенсвязывающих фрагментов и способы применения комбинации этих антител при лечении рака.

[0011] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены агонистические антитела к OX40 в комбинации с антителами к TIM3 или их антигенсвязывающими фрагментами. В одном аспекте антитело к OX40 по настоящему изобретению не конкурирует с OX40L или не мешает связыванию OX40 с его лигандом OX40L.

[0012] Настоящее изобретение охватывает следующие варианты осуществления.

[0013] Способ лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0014] Способ, в котором антитело к OX40 специфически связывается с OX40 человека и содержит:

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

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

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

(iv) вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающими фрагментами.

Способ, в котором антитело к OX40 или антигенсвязывающий содержит:

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

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

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 16; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 11.

[0015] Способ, в котором антитело к TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую: HCDR1 с SEQ ID NO: 32, HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и HCDR3 с SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, содержащую: LCDR1 с SEQ ID NO: 35, LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

[0016] Способ, в котором антитело к TIM3 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0017] Способ, в котором антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

[0018] Способ, в котором антитело к TIM3 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

[0019] Способ, в котором рак представляет собой рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому или саркому.

[0020] Способ, в котором рак молочной железы представляет собой метастатический рак молочной железы.

[0021] Способ, в котором лечение приводит к устойчивому противораковому ответу у субъекта после прекращения лечения.

[0022] Способ повышения, усиления или стимулирования иммунного ответа или функции, который включает введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0023] Способ, в котором антитело к OX40 специфически связывается с OX40 человека и содержит:

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

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

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

(iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в комбинации с антителом к TIM3.

[0024] Способ, в котором антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 22;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 16; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 11.

[0025] Способ, в котором антитело к TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую: HCDR1 с SEQ ID NO: 32, HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и HCDR3 с SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, содержащую: LCDR1 с SEQ ID NO: 35, LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

[0026] Способ, в котором антитело к TIM3 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[0027] Способ, в котором антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

[0028] Способ, в котором антитело к TIM3 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

[0029] Способ, в котором стимулирование иммунного ответа связано с Т-клетками, НК-клетками (естественные киллерные клетки) и макрофагами.

[0030] Способ, в котором стимулированный иммунный ответ характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

[0031] Способ, в котором Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокина, пролиферацией или цитолитической активностью.

[0032] Способ, в котором Т-клетки представляют собой CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

[0033] Способ, в котором введение приводит к устойчивому иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

[0034] В одном варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

[0035] В другом варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (HCDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 5; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей (LCDR), имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 8.

[0036] В другом варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области (HCDR), которые представляют собой HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 24, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области (LCDR), которые представляют собой LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 25, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0037] В другом варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области (HCDR), которые представляют собой HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области (LCDR), которые представляют собой LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0038] В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCDR3, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0039] В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0040] В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0041] В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[0042] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26; и/или (b) переменную область легкой цепи, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28.

[0043] В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 26; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 28. В другом варианте осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0044] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

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

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

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

[0045] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В более конкретном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен IgG1 дикого типа человека (также называемый IgG1wt или huIgG1 человека) или IgG2. В другом варианте осуществления

антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен IgG4 человека с заменами S228P и/или R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

[0046] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания (K_D) от 1×10^{-6} М до 1×10^{-10} М. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с OX40 с аффинностью связывания (K_D) около 1×10^{-6} М, около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М.

[0047] В другом варианте осуществления антитело к OX40 человека по настоящему изобретению демонстрирует межвидовую активность связывания с OX40 яванского макака.

[0048] В одном варианте осуществления антитело к OX40 по настоящему изобретению связывается с эпитопом OX40 человека вне поверхности взаимодействия OX40-OX40L. В другом варианте осуществления антитело к OX40 по настоящему изобретению не конкурирует с лигандом OX40, связывающимся с OX40. В еще другом варианте осуществления антитело к OX40 по настоящему изобретению не блокирует взаимодействие между OX40 и его лигандом OX40L.

[0049] Антитела по настоящему изобретению являются агонистическими и значительно усиливают иммунный ответ. В изобретении предложен способ тестирования агонистической способности антител к OX40. В варианте осуществления антитело по настоящему изобретению может значительно стимулировать первичную Т-клетку к продуцированию IL-2 при анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ).

[0050] В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению обладают сильными Fc-опосредованными эффекторными функциями. Антитела опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против клеток-мишеней OX40^{Hi}, таких как регуляторные Т-клетки (Treg клетки), посредством NK-клеток. В одном аспекте изобретения предложен способ оценки опосредованного антителом к OX40 истощения *in vitro* специфических подмножеств Т-клеток на основе различных уровней экспрессии OX40.

[0051] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению не блокируют взаимодействие OX40-OX40L. Кроме того, антитела к OX40 проявляют дозозависимую противоопухолевую активность *in vivo*, как показано на животных моделях. Дозозависимую активность дифференцируют от профиля активности антител к OX40, которые блокируют взаимодействие OX40-OX40L.

[0052] Настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте

осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VH SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27 или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27, и кодирует VH область антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Альтернативно или дополнительно, выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VL SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 29 или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 29, и кодирует VL область антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

[0053] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент и необязательно фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0054] В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, который включает введение в терапевтически эффективном количестве антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к OX40 нуждающемуся в этом субъекту. В другом варианте осуществления заболевание, подлежащее лечению антителом или антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой рак или аутоиммунное заболевание.

[0055] Настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к OX40 для лечения заболевания, такого как рак или аутоиммунные заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0056] Фигура 1 представляет собой схематическую диаграмму конструкций OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His. OX40 ECD: внеклеточный домен OX40. N: N-конец. C: C-конец.

[0057] На Фигуре 2 показано определение аффинности очищенных химерных (ch445) и гуманизированных (445-1, 445-2, 445-3 и 445-3 IgG4) антител к OX40 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[0058] На Фигуре 3 показано определение связывания OX40 с помощью проточной цитометрии. OX40-позитивные HuT78/OX40 клетки инкубировали с различными антителами к OX40 (антитела ch445, 445-1, 445-2, 445-3 и 445-3 IgG4) и подвергали сортировке клеток с

активированной флуоресценцией (FACS). Результат проиллюстрирован с помощью средней интенсивности флуоресценции (MFI, ось Y).

[0059] На Фигуре 4 показано связывание антител к OX40 с помощью проточной цитометрии. Клетки HuT78/OX40 и HuT78/супоOX40 окрашивали антителом 445-3, и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, показанную на оси Y) определяли с помощью проточной цитометрии.

[0060] На Фигуре 5 проиллюстрировано определение аффинности Fab 445-3 к OX40 дикого типа и точечным мутантам с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[0061] На Фигуре 6 показаны подробные взаимодействия между антителом 445-3 и его эпитопами на OX40. Антитела 445-3 и OX40 изображены бледно-серыми и черными, соответственно. Водородные связи или солевой мостик, π - π -взаимодействие и ван-дер-ваальсово (VDW) взаимодействие обозначены пунктирными, двойными пунктирными и сплошными линиями, соответственно.

[0062] На Фигуре 7 продемонстрировано, что антитело 445-3 не мешает связыванию с OX40L. Перед окрашиванием НЕК293/OX40L клеток слитый белок OX40-мышинный IgG2a (OX40-mIgG2a) предварительно инкубировали с IgG человека (+ HuIgG), антителом 445-3 (+ 445-3) или антителом 1A7.gr1 (+ 1A7.gr1, см. US 2015/0307617) в молярном соотношении 1 : 1. Связывание OX40L с комплексом OX40-mIgG2a/антитело к OX40 определяли путем совместной инкубации НЕК293/OX40L клеток и комплекса OX40-mIgG2a/антитело к OX40 с последующей реакцией с вторичным антителом к мышинному IgG и проточной цитометрией. Результаты были представлены в виде среднее \pm SD (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения) в двух параллельных измерениях. Статистическая значимость: *: P менее 0,05; **: P менее 0,01.

[0063] На Фигуре 8 показано структурное выравнивание Fab OX40/445-3 с указанным комплексом OX40/OX40L (код PDB (база данных структур белков): 2HEV). OX40L показан белым цветом, Fab 445-3 показан серым цветом, а OX40 показан черным цветом.

[0064] На Фигуре 9A-B показано, что антитело 445-3 к OX40 индуцирует продукцию IL-2 в сочетании со стимуляцией TCR. OX40-позитивные HuT78/OX40 клетки (Фигура 9A) совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (АПК) (НЕК293/OS8^{Low}-Fc γ RI) в присутствии антител к OX40 в течение ночи, а продукцию IL-2 использовали в качестве показаний стимуляции Т-клеток (Фигура 9B). IL-2 в супернатанте культуры обнаруживали с помощью ИФА (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты представлены в виде среднее \pm SD в трех параллельных измерениях.

[0065] Фигура 10 иллюстрирует, что антитела к OX40 усиливают ответы СКЛ. *In vitro* дифференцированные дендритные клетки (ДК) совместно культивировали с аллогенными CD4⁺ Т-клетками в присутствии антител к OX40 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 дней. IL-2 в супернатанте обнаруживали с помощью ИФА. Все испытания проводились в четырех параллельных измерениях, и результаты были показаны в виде среднее \pm SD. Статистическая значимость: *: P менее 0,05; **: P менее 0,01.

[0066] На Фигуре 11 продемонстрировано, что антитело 445-3 к OX40 индуцирует ADCC. Анализ ADCC проводили с применением NK92MI/CD16V клеток в качестве эффекторных клеток и HuT78/OX40 клеток в качестве клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или в качестве контрольных. Равное количество эффекторных клеток и клеток-мишеней совместно культивировали в течение 5 ч до обнаружения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Процент цитотоксичности (ось Y) рассчитывали на основе протокола производителя, как описано в примере 12. Результаты представлены в виде среднее \pm SD в трех параллельных измерениях.

[0067] На Фигуре 12А-12С показано, что антитело 445-3 к OX40 в комбинации с НК-клетками повышает соотношения CD8⁺ эффекторных Т-клеток к Treg клеткам в активированных МКПК (моноклеарных клетках периферической крови человека) *in vitro*. МКПК человека предварительно активировали с помощью РНА-L (лейкоагглютинин) (1 мкг/мл), а затем совместно культивировали с NK92MI/CD16V клетками в присутствии антител к OX40 или контроля. Процентное содержание различных подмножеств Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Далее рассчитывали соотношения CD8⁺ эффекторных Т-клеток к Treg клеткам. На Фигуре 12А показано соотношение CD8⁺ к Общему количеству Т-клеток. На Фигуре 12В проиллюстрировано соотношение Treg клеток к Общему количеству Т-клеток. На Фигуре 12С показано соотношение CD8⁺ к Treg клеткам. Данные приведены в виде среднее \pm SD в двух параллельных измерениях. Показаны статистические значимости между 445-3 и 1A7.gr1 при указанных концентрациях. *: P менее 0,05; **: P менее 0,01.

[0068] На Фигуре 13А-13В показано, что антитело 445-3 к OX40, а не 1A7.gr1, демонстрирует дозозависимую противоопухолевую активность в сингенной модели колоректального рака MC38 у OX40-гуманизированных мышей. Мышиные клетки карциномы толстой кишки линии MC38 (2×10^7) имплантировали подкожно самкам трансгенных мышей, несущих OX40 человека. После рандомизации в соответствии с объемом опухоли животным вводили путем инъекции внутрибрюшинно либо антитела к OX40, либо изотипический контроль раз в неделю три раза, как указано. На Фигуре 13А

сравнивают увеличение доз антитела 445-3 с увеличением доз антитела 1A7.gr1 и снижением роста опухоли. На Фигуре 13В показаны данные по всем мышам, которых лечили этой специфической дозой. Данные представлены в виде средний объем опухоли \pm стандартная ошибка среднего (SEM) по 6 мышам на группу. Статистическая значимость: *: P менее 0,05 в сравнении с изотипическим контролем.

[0069] Фигура 14А-14В представляет собой таблицу изменений аминокислот, которые были сделаны в антителах к ОХ40.

[0070] На Фигуре 15 показана эффективность антител к ОХ40 в комбинации с антителами к ТИМ3 в мышинной модели метастатического рака молочной железы.

[0071] На Фигуре 16 продемонстрировано, что антитела к ОХ40 в комбинации с антителами к ТИМ3 эффективны для мышинной модели рака почки.

Определения

[0072] Если иное не определено нигде в этом документе, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области техники.

[0073] В контексте настоящего документа, включая прилагаемую формулу изобретения, слова в единственном числе включают соответствующие им множественные числа, если из контекста явно не следует иное.

[0074] Термин «или» применяется для обозначения и применяется взаимозаменяемо с термином «и/или», если из контекста явно не следует иное.

[0075] Термин «противораковый агент» в контексте настоящего документа относится к любому агенту, который может применяться для лечения клеточного пролиферативного расстройства, такого как рак, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, агенты для лучевой терапии и радиотерапевтические агенты, нацеленные противораковые агенты и иммунотерапевтические агенты.

[0076] Термин «ОХ40» относится к трансмембранному гликопротеину I типа с молекулярной массой приблизительно 50 кДа, члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. ОХ40 также известен как АСТ35, CD134 или TNFRSF4. Аминокислотную последовательность ОХ40 человека (SEQ ID NO: 1) также можно найти под номером доступа NP_003318, а номер доступа нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ОХ40: X75962.1. Термин «лиганд ОХ40» или «ОХ40L» относится к единственному лиганду ОХ40 и взаимозаменяем с gp34, CD252 или TNFSF4.

[0077] В настоящем документе термины «введение», «вводить», «обработка» и «лечение», когда они применяются к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означают контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает в себя контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, причем жидкость находится в контакте с клеткой. Термин «введение» и «лечение» также означают обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин «субъект» в настоящем документе включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например, крысу, мышь, собаку, кошку, кролика) и наиболее предпочтительно человека. Лечение любого заболевания или расстройства относится в одном аспекте к уменьшению интенсивности заболевания или расстройства (т. е. замедлению или остановке или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте термин «лечить», «лечение» или «обработка» относится к облегчению или уменьшению интенсивности по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут быть неразличимы самим пациентом. В еще другом аспекте «лечить», «лечение» или «обработка» относится к модуляции заболевания или расстройства, либо физически (например, стабилизацией заметного симптома), либо физиологически (например, стабилизацией физического параметра), либо и тем и другим. В еще другом аспекте «лечить», «лечение» или «обработка» относится к предупреждению или задержке начала или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

[0078] Термин «субъект» в контексте настоящего изобретения представляет собой млекопитающее, например, примата, предпочтительно высшего примата, например, человека (например, пациента, имеющего или имеющего риск возникновения расстройства, описанного в настоящем документе).

[0079] В контексте настоящего документа термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном. Внутри антигена переменная область «плеча» антитела взаимодействует через нековалентные взаимодействия с антигеном на многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

[0080] В контексте настоящего документа термин «антитело» относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов, который может связывать соответствующий антиген нековалентно, обратимо и специфично. Например, встречающееся в природе антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две

легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в настоящем документе обозначается как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем документе сокращенно обозначается как VL) и константную области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[0081] Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела. Антитела могут быть любого изотипа/класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

[0082] В некоторых вариантах осуществления антитела к OX40 содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт или по меньшей мере переменную область. В некоторых вариантах осуществления антитела к OX40 содержат антигенсвязывающий фрагмент из антитела к OX40, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к OX40 является выделенным или рекомбинантным.

[0083] Термин «моноклональное антитело» или «mAb» или «Mab» в контексте настоящего документа означает популяцию по существу однородных антител, т. е. молекулы антител, содержащиеся в популяции, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, традиционные (поликлональные) препараты антител обычно содержат множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих переменных доменах, в частности, их определяющие комплементарность области (CDR), которые часто являются специфичными для различных эпитопов. Определение «моноклональное» указывает на то, что антитело

получено из по существу гомогенной популяции антител и что его не следует интерпретировать как требующее продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. См., например, Kohler et al., Nature 1975 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 1992; Harlow et al., АНТИТЕЛА: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 1993. Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть любого класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и любой их подкласс, такой как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Гибридома, продуцирующая моноклональное антитело, может быть культивирована *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры моноклональных антител могут быть получены при продукции *in vivo*, когда клетки из отдельных гибридом вводят путем инъекции внутрибрюшинно мышам, таким как мыши линии Balb/c, для получения асцитной жидкости, содержащей высокие концентрации желаемых антител. Моноклональные антитела изотипа IgM или IgG могут быть очищены от таких асцитных жидкостей или от супернатантов клеточной культуры с помощью способов колоночной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[0084] В целом, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую цепь» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевой фрагмент каждой цепи включает вариабельную область из около 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевой фрагмент тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию. Обычно легкие цепи человека классифицируются как каппа и лямбда легкие цепи. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируются как α , δ , ϵ , γ или μ , и они определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельная и константная области соединены областью «J» из около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область «D» из около 10 или более аминокислот.

[0085] Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепи (VL/VH) образуют сайт связывания антитела. Таким образом, в целом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания являются, в общем, одинаковыми.

[0086] Обычно переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гиперпеременные области, также называемые «определяющими комплементарность областями (CDR)», которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR). CDR обычно выравниваются каркасными областями, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. Обычно от N-конца к C-концу переменные домены как легкой, так и тяжелой цепи содержат FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (или FR3), CDR-3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Положения CDR и каркасных областей могут быть определены с помощью различных хорошо известных в данной области техники определений, например, Кабот, Чотиа и AbM (см., например, Johnson et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). Определения сайтов, объединяющих антиген, также описаны в следующих работах: Ruiz et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); и Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); и Rees et al., In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996). В некоторых вариантах осуществления в комбинированной схеме нумерации по Кабату и Чотиа CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR по Кабату, CDR по Чотиа или и того, и другого. Например, CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HC CDR1), 50-65 (HC CDR2) и 95-102 (HC CDR3) в VH, например, VH млекопитающего, например, VH человека; и аминокислотным остаткам 24-34 (LC CDR1), 50-56 (LC CDR2) и 89-97 (LC CDR3) в VL, например, VL млекопитающего, например, VL человека.

[0087] Термин «гиперпеременная область» означает аминокислотные остатки антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гиперпеременная область содержит аминокислотные остатки из «CDR» (т. е., VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 в переменной области легкой цепи и VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 в переменной домене тяжелой цепи). См., Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (defining the CDR regions of an antibody by sequence); также см. Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (defining the CDR regions of an antibody by structure). Термин «каркасные» или «FR» остатки означает те остатки переменной домена, которые отличаются от остатков гиперпеременной области, определенных в настоящем документе как остатки CDR.

[0088] Если не указано иное, «антигенсвязывающий фрагмент» означает антигенсвязывающие фрагменты антител, т. е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом, например, фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечные Fv (ScFv); нанотела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0089] Антитело «специфически связывается» с белком-мишенью означает, что антитело проявляет предпочтительное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается «специфичным» для его предполагаемой мишени, если его связывание является определяющим для присутствия белка-мишени в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные результаты. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, применяемые в настоящем описании, будут связываться с белком-мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз больше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз больше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз больше, чем аффинность с нецелевыми белками. В настоящем документе считается, что антитело специфически связывается с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например, аминокислотную последовательность молекулы OX40 человека, если оно связывается с полипептидами, содержащими эту последовательность, но не связывается с белками, не имеющими этой последовательности.

[0090] Термин «человеческое антитело» в настоящем документе означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцируется у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши. Аналогично, «мышинное антитело» или «крысиное антитело» означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина мыши или крысы, соответственно.

[0091] Термин «гуманизованное антитело» означает формы антител, которые содержат последовательности нечеловеческих (например, мышинных) антител, а также человеческих антител. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В целом, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых

все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или практически все FR области соответствуют каркасным участкам последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также не обязательно будет содержать по меньшей мере фрагмент константной области иммуноглобулина (Fc), обычно из человеческого иммуноглобулина. Приставка «hum», «hu», «Hu» или «h» добавляется к обозначениям клонов антител, когда необходимо отличить гуманизированные антитела от родительских антител грызунов. Гуманизированные формы антител грызунов, как правило, содержат те же последовательности CDR родительских антител грызунов, хотя определенные аминокислотные замены могут быть включены для увеличения аффинности, повышения стабильности гуманизированного антитела, удаления посттрансляционной модификации или по другим причинам.

[0092] В контексте настоящего документа термин «неконкурентный» означает, что антитело может связываться с рецептором и не мешает связыванию лиганда с рецептором.

[0093] Термин «соответствующая последовательность зародышевой линии человека» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность вариабельной области человека или подпоследовательность, которая имеет самую высокую определенную идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной вариабельной области по сравнению со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми последовательностями вариабельной области иммуноглобулина зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности вариабельной области человека или подпоследовательности с самой высокой идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной вариабельной области по сравнению со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может представлять собой только каркасные области, только определяющие комплементарность области, каркасные и определяющие комплементарность области, вариабельный сегмент (как определено выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат вариабельную область. Идентичность последовательности может быть определена с помощью способов, описанных в настоящем документе, например, выравнивание двух последовательностей с применением BLAST (средство поиска основного локального

выравнивания), ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в данной области техники. Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислоты зародышевой линии человека может иметь по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью варибельной области.

[0094] Термин «равновесная константа диссоциации (K_D , M)» относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹, M⁻¹). Равновесные константы диссоциации могут быть измерены с помощью любого известного способа в данной области техники. Антитела по настоящему изобретению, как правило, имеют равновесную константу диссоциации меньше около 10^{-7} или 10^{-8} M, например, меньше около 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых аспектах меньше около 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

[0095] Термины «рак» или «опухоль» в настоящем документе имеют самое широкое значение, понимаемое в данной области техники, и относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. В контексте настоящего изобретения рак не ограничивается определенным типом или местоположением.

[0096] Термин «комбинированная терапия» относится к введению двух или более терапевтических агентов для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящем изобретении. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических агентов по существу одновременно. Такое введение также включает совместное введение в нескольких или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разведены до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное применение каждого типа терапевтического агента, либо приблизительно в одно и то же время, либо в разное время. В любом случае, схема лечения обеспечит благоприятные эффекты комбинации лекарственного средства при лечении состояний или расстройств, описанных в настоящем документе.

[0097] В контексте настоящего изобретения, когда делается ссылка на аминокислотную последовательность, термин «консервативная замена» означает замену исходной аминокислоты новой аминокислотой, которая существенно не изменяет химические, физические и/или функциональные свойства антитела или фрагмента, например, его аффинность связывания с OX40. В частности, общие консервативные замены аминокислот представлены в следующей таблице и хорошо известны в данной области техники.

Иллюстративные консервативные аминокислотные замены

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

[098] Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, являются алгоритмы BLAST, описанные в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977 и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для осуществления BLAST анализов общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI). Этот алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар последовательностей с максимальным сходством (HSP) путем определения коротких слов длиной W в запрашиваемой

последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому показателю T с положительной оценкой, когда соответствуют слову такой же длины в последовательности базы данных. T называется пороговым показателем сходства соседних слов. Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве значений для начальных поисков более длинных HSP, содержащие их. Совпадения слов продлевается в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько могут быть увеличены совокупные показатели выравнивания. Совокупные показатели рассчитываются для нуклеотидных последовательностей с помощью параметров M (поощрительный показатель для пары с совпадающими остатками, всегда больше 0) и N (штрафной показатель для несовпадающих остатков, всегда меньше 0). Для аминокислотных последовательностей матрица замен применяется для расчета совокупного показателя. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается когда: совокупный показатель выравнивания падает ниже величины X от его полученного максимального значения; совокупный показатель стремится к нулю или ниже из-за накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательным показателем; или достигается конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве значений по умолчанию используются длина слова (W) 11, ожидаемое значение (E) 10, M равное 5, N равное минус 4 и сравнение обоих участков. Для аминокислотных последовательностей в программе BLAST в качестве значений по умолчанию используются длина слова 3 и ожидаемое значение (E) 10, и выравнивания (B) матрицы замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989) 50, ожидаемое значение (E) 10, M равное 5, N равное минус 4 и сравнение обоих участков.

[099] С помощью алгоритма BLAST также осуществляют статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787, 1993). Одно измерение сходства, обеспеченное алгоритмом BLAST, является наименьшей суммарной вероятностью ($P(N)$), которая обеспечивает представление о вероятности, посредством которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет происходить случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет меньше около 0,2, более предпочтительно, меньше около 0,01 и наиболее предпочтительно меньше около 0,001.

[0100] Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17, (1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весовых остатков PAM120, штраф за удлинение пропуска 12 и штраф за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с применением алгоритма Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 444-453, (1970), который был включен в программу GAP в программный пакет GCG с применением либо матрицы BLOSUM62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0101] Термин «нуклеиновая кислота» применяется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одно-, либо в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки остова или связи, которые являются синтетическими, природными и неприродными, которые имеют сходные свойства связывания, как у эталонной нуклеиновой кислоты, и которые метаболизируются способом, подобным эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

[0102] Термин «функционально связанный» в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Обычно термин относится к функциональному взаимодействию транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой экспрессирующей системе. Как правило, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически прилегают к транскрибируемой последовательности, т. е., они являются цис-действующими. Однако некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны физически прилегать или находиться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают.

[0103] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены композиции, например, фармацевтически приемлемые композиции, которые включают антитело к ОХ40, описанное в настоящем документе, составленное вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может быть пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

[0104] Композиции, раскрытые в настоящем документе, могут быть в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Подходящая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные подходящие композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. Одним из подходящих способов введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный). В некоторых вариантах осуществления антитело вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

[0105] В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, которое, при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства, является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, расстройства или симптома. «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от антитела, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста субъекта, подлежащего лечению, и/или веса субъекта, подлежащего лечению. Подходящее количество в любом конкретном случае может быть очевидным для специалистов в данной области техники или может быть определено с помощью рутинных экспериментов. В случае комбинированной терапии термин «терапевтически эффективное количество» относится к общему количеству объектов комбинации для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

[0106] В контексте настоящего документа фраза «в комбинации с» означает, что антитело к ОХ40 вводят субъекту одновременно с, до или после введения антитела к ТИМ3. В некоторых

вариантах осуществления антитело к TIM3 вводят в виде совместного состава с антителом к OX40.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела к TIM3

[0107] Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен 3 (TIM3, NAVCR2 или CD366) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа с молекулярной массой 33 кДа, член Т-клеточного иммуноглобулин- и муцин-домен-содержащего семейства, который играет важную роль в стимулировании истощения Т-клеток как при хронических вирусных инфекциях, так и при ускользании опухоли от иммунного надзора (Monney et al., 2002 Nature 415: 536-541; Sanchez-Fueyo A, et al., 2003 Nat Immunol. 4:1093-101; Sabatos CA, et al., 2003 Nat Immunol. 4:1102-10; Anderson et al., 2006 Curr Opin Immunol. 18:665-669). Гены и кДНК (комплементарные ДНК), кодирующие TIM3, клонировали и характеризовали у мышей и человека (Monney et al., 2002 Nature 415:536-541; McIntire et al., 2001 Nat. Immunol. 2:1109-1116). Зрелый TIM3 человека содержит 280 аминокислотных остатков (номер доступа NCBI: NP_116171.3). Его внеклеточный домен состоит из аминокислотных остатков 1-181, а трансмембранный домен и С-концевой цитоплазматический хвост содержат остатки 182-280. Известных ингибиторных мотивов передачи данных, таких как иммунорецепторный ингибиторный мотив на основе тирозина (ITIM) и тирозиновый переключающий мотив (ITSM), в цитоплазматическом домене не обнаружено.

[0108] Антитела к TIM3 по настоящему изобретению можно найти в WO2018/036561. В настоящем документе также предложено антитело к TIM3, содержащее антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR): HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37. В другом варианте осуществления антитело к TIM3 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который

специфически связывает ТИМЗ человека, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

Антитела к OX40

[0109] В настоящем изобретении предложены антитела, антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают OX40 человека. Кроме того, в настоящем изобретении предложены антитела, которые обладают желательными фармакокинетическими характеристиками и другими желательными признаками, и, таким образом, могут применяться для снижения вероятности рака или лечения рака. В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела, и способы получения и применения таких фармацевтических композиций для предупреждения и лечения рака и связанных с ним расстройств.

[0110] В настоящем изобретении предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные, как описано ниже.

[0111] В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, причем указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 20 или 26 (Таблица 3). В настоящем изобретении также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают OX40, причем указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR VH, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в Таблице 3. В одном аспекте в настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, причем указанные антитела содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VH, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в Таблице 3.

[0112] В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, причем указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат домен VL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 22 или 28 (Таблица 3). В настоящем изобретении также

предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, причем указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR VL, имеющую аминокислотную последовательность любой из CDR VL, перечисленных в Таблице 3. В частности, в изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с OX40, причем указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более CDR VL, имеющих аминокислотную последовательность любой из CDR VL, перечисленных в Таблице 3.

[0113] Другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают аминокислоты, которые были мутированы, но имеющие по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% процент идентичности в областях CDR с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных в Таблице 3. В некоторых аспектах оно включает мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательности, описанной в Таблице 3.

[0114] Другие антитела по настоящему изобретению включают те антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, были мутированы; но еще имеют по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% процент идентичности с последовательностями, описанными в Таблице 3. В некоторых аспектах оно включает мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в переменных областях по сравнению с переменными областями, изображенными в последовательности, описанной в Таблице 3, при сохранении по существу той же терапевтической активности.

[0115] В настоящем изобретении также предложены последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфически связываются с OX40. Такие нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

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

[0116] В настоящем изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с эпитопом OX40 человека. В некоторых аспектах антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с одним и тем же эпитопом OX40.

[0117] В настоящем изобретении также предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к OX40, описанные в

Таблице 3. Таким образом, дополнительные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание, статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с ОХ40 демонстрирует, что тестируемое антитело может конкурировать с этим антителом или его антигенсвязывающими фрагментами за связывание с ОХ40. Такое антитело может, не будучи связанным какой-либо одной теорией, связываться с тем же или связанным (например, структурно подобным или пространственно проксимальным) эпитопом на ОХ40, что и антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, с которыми оно конкурирует. В некотором аспекте антитело, которое связывается с тем же эпитопом на ОХ40, что и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело. Такие человеческие или гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены и выделены так, как описано в настоящем документе.

Дальнейшее изменение каркаса Fc-области

[0118] В еще других аспектах Fc-область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или более аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком, таким образом, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторным лигандом, в отношении которого изменяется аффинность, может быть, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Этот подход описан, например, в патенте США № 5624821 и 5648260 Winter et al.

[0119] В другом аспекте один или более аминокислотных остатков могут быть заменены одним или более различными аминокислотными остатками, таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или отмененную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход описан, например, в патенте США № 6,194,551 Idusogie et al.

[0120] В еще одном аспекте изменяют один или более аминокислотных остатков, тем самым изменяя способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан, например, в публикации PCT WO 94/29351 Vodmer et al. В конкретном аспекте одна или более аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению

заменены одним или более аллотипическими аминокислотными остатками для подкласса IgG1 и каппа изотипа. Аллотипические аминокислотные остатки также включают, но не ограничиваются ими, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи каппа изотипа, как описано в Jefferis et al., *MAbs*. 1:332-338 (2009).

[0121] В другом аспекте Fc-область модифицируют для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела к Fc γ -рецептору путем модифицирования одной или более аминокислот. Этот подход описан, например, в публикации PCT WO 00/42072 Presta. Кроме того, были картированы сайты связывания Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn на IgG1 человека и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, 2001).

[0122] В еще другом аспекте модифицируют гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т. е. антитело не имеет или имеет пониженное гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к «антигену». Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть произведены одна или более аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или более сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы таким образом элиминировать гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Этот подход описан, например, в патенте США № 5714350 и 6350861 Co et al.

[0123] Дополнительно или альтернативно, может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такой как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества остатков фукозила, или антитело, имеющее увеличенные бисекционные структуры GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают ADCC-способность антител. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут быть применены в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела, чтобы таким образом получить антитела с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 Hang et al. описана клеточная линия с функционально разрушенным геном FUT8, который

кодирует фукозилтрансферазу таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835 Presta описан вариант клеточной линии CHO (яичника китайского хомячка), клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также, Shields et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 Umana et al. описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераз III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют повышенные бисекционные структуры GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC в антителах (см. также Umana et al., *Nat. Biotech.* 17:176-180, 1999).

[0124] В другом аспекте, если желательно снижение ADCC, во многих предыдущих докладах было показано, что подкласс антитела человека IgG4 имеет только умеренную ADCC и почти не обладает эффекторной функцией CDC (Moore G L, et al. 2010 *MAbs*, 2:181-189). С другой стороны, было обнаружено, что природный IgG4 менее стабилен в стрессовых условиях, например, в кислотном буфере или при повышающейся температуре (Angal, S. 1993 *Mol Immunol*, 30:105-108; Dall 'Acqua, W. et al, 1998 *Biochemistry*, 37:9266-9273; Aalberse et al. 2002 *Immunol*, 105:9-19). Сниженная ADCC может быть достигнута путем функционального связывания антитела с IgG4, сконструированного с комбинациями изменений, чтобы иметь сниженную или нулевую активности связывания FcγR или связывания C1q, тем самым уменьшая или устраняя эффекторные функции ADCC и CDC. Рассматривая физико-химические свойства антитела как биологического лекарственного средства, одним из менее желательных, присущих IgG4 свойств является динамическое разделение двух его тяжелых цепей в растворе с образованием полуантитела, которое приводит к биспецифическим антителам, получаемым *in vivo* посредством процесса, называемого «обмен Fab-фрагментами» (Van der Neut Kolfshoten M, et al. 2007 *Science*, 317:1554-157). Мутация серина в пролин в положении 228 (система нумерации EU) оказалась ингибирующей для разделение тяжелой цепи IgG4 (Angal, S. 1993 *Mol Immunol*, 30:105-108; Aalberse et al. 2002 *Immunol*, 105:9-19). Сообщалось, что некоторые из аминокислотных остатков в шарнирной области и γFc области оказывают влияние на взаимодействие антитела с Fcγ-рецепторами (Chappel S M, et al. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9036-9040; Mukherjee, J. et al., 1995 *FASEB J*, 9:115-119; Armour, K. L. et al. 1999 *Eur J Immunol*, 29:2613-2624; Clynes, R. A. et al, 2000 *Nature Medicine*, 6:443-446; Arnold J. N., 2007 *Annu Rev immunol*, 25:21-50). Кроме того,

некоторые редко встречающиеся в человеческой популяции зоформы IgG4 также могут проявлять различные физико-химические свойства (Brusco, A. et al. 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). Для получения антител OX40 с низкими ADCC, CDC и нестабильностью можно модифицировать шарнирную область и Fc-область IgG4 человека и внести ряд изменений. Эти модифицированные Fc-молекулы IgG4 можно найти в SEQ ID NO: 83-88, патент США № 8735553 Li et al.

Производство антител к OX40

[0125] Антитела к OX40 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены любыми способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетрамеров антител, тогда как полноразмерные моноклональные антитела могут быть получены, например, гибридомным или рекомбинантным получением. Рекомбинантная экспрессия может происходить из любых подходящих клеток-хозяев, известных в данной области техники, например, клеток-хозяев млекопитающих, клеток-хозяев бактерий, клеток-хозяев дрожжей, клеток-хозяев насекомых и т. д.

[0126] В настоящем изобретении дополнительно предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области тяжелой или легкой цепи или сегменты, содержащие определяющие комплементарность области, как описано в настоящем документе. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность нуклеотидной последовательности с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 21 или 27. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность нуклеотидной последовательности с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 23 или 29.

[0127] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать последовательность переменной области антитела к OX40. Они также могут кодировать как переменную область, так и константную область антитела. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит переменные области, как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из типовых антител к OX40. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют два полипептидных сегмента, которые, соответственно, по

существо идентичны переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи одного из мышечных антител.

[0128] В настоящем изобретении также предложены векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения антител к ОХ40. Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен быть экспрессирован вектор. Обычно векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь антитела к ОХ40 или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах для предотвращения экспрессии внедренных последовательностей применяется индуцибельный промотор, за исключением экспрессии в индуцирующих условиях. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозу, *lacZ*, промотор металлотионеина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть увеличены в неиндуцирующих условиях без смещения популяции для кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, для эффективной экспрессии антитела к ОХ40 или антигенсвязывающего фрагмента также могут потребоваться или могут быть желательны другие регуляторные элементы. Эти элементы обычно включают инициаторный кодон АТГ (последовательность АТГ в эукариотической ДНК) и прилегающий сайт связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения энхансеров, подходящих для применяемой клеточной системы (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153: 516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV могут быть применены для усиления экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

[0129] Клетки-хозяева для сбора и экспрессии цепей антитела к ОХ40 могут быть как прокариотическими, так и эукариотическими. *E.coli* представляет собой одного из прокариотических хозяев, пригодных для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для применения, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также могут быть созданы векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество различных хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно

контролируют экспрессию, необязательно с помощью последовательности оператора и имеют последовательности сайтов связывания рибосом и т. п. для инициирования и завершения транскрипции и трансляции. Другие микробы, такие как дрожжи, также могут быть применены для экспрессии полипептидов к ОХ40. Также могут применяться клетки насекомых в сочетании с векторами бакуловируса.

[0130] В других аспектах клетки-хозяева млекопитающих применяют для экспрессии и получения полипептидов к ОХ40 по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой либо гибридную клеточную линию, экспрессирующую эндогенные гены иммуноглобулина, либо клеточную линию млекопитающего, содержащую экзогенный вектор экспрессии. К ним относятся любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животного или человека. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии СНО, различные клеточные линии COS (почек обезьяны), клетки НЕК 293 (эмбриональной почки человека), клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение культуры клеток ткани млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждалось в целом, в, например, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как начало репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49-68, 1986), и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования, и последовательности транскрипционного терминатора. Эти векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для конкретного типа клеток, специфичными для стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Пригодные промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотioneина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, дексаметазон-индуцируемый промотор вируса ММТV (вирус опухолей молочных желез мышей), промотор вируса SV40 (вирус полиомы), промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPSV (полисахаридная менингококковая вакцина), тетрациклин-индуцируемый промотор CMV (цитамегаловирус) (такой как человеческий предранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области техники.

Способы обнаружения и диагностики

[0131] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы обнаружения ОХ40. В одном аспекте антитела или антигенсвязывающие фрагменты пригодны для обнаружения присутствия ОХ40 в биологическом образце. В контексте настоящего документа термин «обнаружение» включает количественное или качественное обнаружение. В определенных аспектах биологический образец содержит клетку или ткань. В других аспектах такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани, которые экспрессируют ОХ40 на более высоких уровнях по сравнению с другими тканями.

[0132] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения присутствия ОХ40 в биологическом образце. В определенных аспектах способ включает контакт биологического образца с антителом к ОХ40 в условиях, разрешающих связывание антитела с антигеном, и обнаружение образования комплекса между антителом и антигеном. Биологический образец может включать, без ограничения, образцы мочи или крови.

[0133] Также включен способ диагностики расстройства, связанного с экспрессией ОХ40. В определенных аспектах способ включает контакт тестируемой клетки с антителом к ОХ40; определение уровня экспрессии (либо количественно, либо качественно) ОХ40 в тестируемой клетке путем обнаружения связывания антитела к ОХ40 с полипептидом ОХ40; и сравнение уровня экспрессии в тестируемой клетке с уровнем экспрессии ОХ40 в контрольной клетке (например, нормальная клетка того же тканевого происхождения, что и тестируемая клетка или клетка, не экспрессирующая ОХ40), причем более высокий уровень экспрессии ОХ40 в тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие расстройства, связанного с экспрессией ОХ40.

Способы лечения

[0134] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы лечения заболевания или расстройства, связанного с ОХ40. В одном аспекте заболевание или расстройство, связанное с ОХ40, представляет собой рак.

[0135] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения рака. В определенных аспектах указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к ОХ40 или антигенсвязывающего фрагмента. Рак может включать, без ограничения, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому или саркому.

[0136] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозировка может осуществляться любым подходящим способом, например, путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или постоянным. В настоящем документе рассмотрены различные схемы дозировки, включая, но не ограничиваясь ими, одно или множество введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульс-инфузию.

[0137] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению будут составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, область доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-практикам. Антитело необязательно должно быть, но может быть составлено с одним или более агентами, применяемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Как правило, эти другие агенты применяют в тех же дозах и посредством тех же путей введения, как описано в настоящем документе, или в дозах, составляющих около 1-99% от доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и посредством любого пути введения, эмпирически/клинически считающихся подходящими.

[0138] Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, введения антитела в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также на усмотрение лечащего врача. Антитело соответствующим образом вводят пациенту однократно или в ходе серии сеансов лечения. В зависимости от вида и тяжести заболевания, первоначальная предполагаемая дозировка для введения пациенту, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии, составляет от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг антитела. Одна обычная ежедневная доза может находиться в диапазоне от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг или

более в зависимости от вышеупомянутых факторов. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно продолжают до желаемого подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает от около двух до около двадцати доз, или, например, около шести доз антитела). Начальная более высокая нагрузочная доза может быть введена с последующей одной или несколькими более низкими дозами. Однако могут быть пригодны и другие схемы лечения. Ход такого лечения можно контролировать с помощью традиционных методик и анализов.

Комбинированная терапия

[0139] В одном аспекте антитела к OX40 по настоящему изобретению могут применяться в комбинации с другими терапевтическими агентами, например, антителами к TIM3. Другие терапевтические агенты, которые могут применяться с антителами к OX40 по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими: химиотерапевтический агент (например, паклитаксел или агент паклитаксел; (например, Абрахане®), доцетаксел; карбоплатин; топотекан; цисплатин; иринотекан, доксорубицин, леналидомид, 5-азациитидин, ифосфамид, оксалиплатин, динатриевый пеметрексед, циклофосфамид, этопозид, децитабин, флударабин, винкристин, бендамустин, хлорамбуцил, бусульфан, гемцитабин, мелфалан, пентостатин, митоксантрон, ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (например, эрлотиниб), ингибитор мультикиназы (например, MGCD265, RGB-2866), нацеливающий агент CD-20 (например, ритуксимаб, офатумумаб, RO5072759, LFB-R603), нацеливающий агент CD52 (например, алемтузумаб), преднизолон, дарбэпоэтин альфа, леналидомид, ингибитор Vcl-2 (например, облимерсен натрия), ингибитор аврора-киназы (например, MLN8237, TAK-901), ингибитор протеасом (например, бортезомиб), нацеливающий агент CD-19 (например, MEDI-551, MOR208), ингибитор MEK (например, АВТ-348), ингибитор JAK-2 (например, INCB018424), ингибитор киназы mTOR (например, темсиролимус, эверолимус), ингибитор BCR/ABL (например, иматиниб), антагонист рецептора ET-A (например, ZD4054), агонист TRAIL рецептора 2 (TR-2) (например, CS-1008), ингибитор HGF/SF (например, AMG 102), EGEN-001, ингибитор Поло-подобной киназы 1 (например, BI 672).

[0140] Антитело к OX40 в комбинации с антителом к TIM3, как раскрыто в настоящем документе, можно вводить различными известными способами, например, перорально, местно, ректально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея или через имплантированный резервуар, хотя наиболее подходящий путь в любом конкретном случае

будет зависеть от конкретного хозяина, а также от характера и тяжести состояний, для которых вводится активный ингредиент. В контексте настоящего документа термин «парентерально» включает подкожную, внутрикожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, внутриартериальную, внутрисиновиальную, внутригрудинную, интратекальную, внутриочаговую и внутричерепную техники инъекции или инфузии.

[0141] Комбинация антитела к OX40 и антитела к TIM3 может быть введена различными путями. Каждое антитело может быть введено парентерально, например, подкожно, внутрикожно, внутривенно или внутрибрюшинно, независимо от другого антитела.

[0142] В одном варианте осуществления антитело к OX40 или антитело к TIM3 вводят один раз в сутки (раз в сутки, 1 р./сут.), два раза в сутки (дважды в сутки, 2 р./сут.), три раза в сутки, четыре раза в сутки или пять раз в сутки в зависимости от потребности пациента.

Фармацевтические композиции и составы

[0143] Также предложены композиции, включая фармацевтические составы, содержащие антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие антитело к OX40 или антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления композиции содержат одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40, или один или более полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с OX40. Эти композиции могут дополнительно содержать подходящие носители, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области техники.

[0144] Фармацевтические составы антитела к OX40 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе, получают путем смешивания такого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, и включают, но не ограничиваясь ими: буферы, например, фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол);

низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ). В настоящем документе примеры фармацевтически приемлемых носителей дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственного средства в межклеточном пространстве, например, растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины PH-20 гиалуронидазы человека, например, rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Некоторые иллюстративные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентах США № 7871607 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяют с одним или более дополнительными гликозаминогликаназами, например, хондроитиназами.

[0145] Типичные лиофилизированные составы антитела описаны в патенте США № 6267958. Водные составы антитела включают составы, описанные в патенте США № 6171586 и WO2006/044908, причем последние составы содержат гистидин-ацетатный буфер.

[0146] Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул.

[0147] Составы, применяемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение моноклонального антитела к OX40

[0148] Моноклональные антитела к OX40 были получены на основе традиционной технологии слияния гибридом (de St Groth and Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1) с незначительными модификациями. Для дальнейшей характеристики были отобраны антитела с высокой активностью связывания при

твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) и сортировке клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Рекомбинантные белки OX40 для анализов иммунизации и связывания

[0149] кДНК, кодирующая полноразмерный OX40 человека (SEQ ID NO: 1), была синтезирована Sino Biological (Пекин, Китай) на основе последовательности GenBank (номер доступа: X75962.1). Кодирующую область сигнального пептида и внеклеточный домен (ECD), состоящий из аминокислоты (AA) 1-216 из OX-40 (SEQ ID NO: 2), амплифицировали с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) и клонировали в самостоятельно разработанные векторы экспрессии с С-концом, слитым с Fc-доменом мышинового IgG2a, Fc-доменом тяжелой цепи IgG1 дикого типа человека или His-меткой, что привело к трем экспрессионным плазмидам рекомбинантного слитого белка, OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His, соответственно. Схематическое представление слитых белков OX40 показано на Фигуре 1. Для получения рекомбинантного слитого белка экспрессионные плазмиды OX40-mIgG2a, OX40-huIgG1 и OX40-His временно трансфицировали в 293G клетки и культивировали в течение 7 дней в CO₂-инкубаторе, оснащенный вращающимся шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и очищали центрифугированием. OX40-mIgG2a и OX40-huIgG1 очищали с помощью колонки с белком А (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences). OX40-His очищали с помощью колонки с Ni сефарозой (Cat: 17-5318-02, GE Life Science). Белки OX40-mIgG2a, OX40-huIgG и OX40-His подвергали диализу для удаления фосфатно-солевого буфера (PBS) и хранили в морозильной камере при минус 80 °C в небольших аликвотах.

Клеточные линии со стабильной экспрессией

[0150] Для получения стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный OX40 человека (OX40) или OX40 яванского макака (CynoOX40), эти гены клонировали в ретровирусный вектор рFB-Neo (Cat: 217561, Agilent, США). Ретровирусную трансдукцию проводили на основании протокола, описанного ранее (Zhang et al., 2005). Клетки HuT78 и HEK293 ретровирусно трансдуцировали вирусом, содержащим OX40 человека или CynoOX40, соответственно, с получением клеточных линий HuT78/OX40, HEK293/OX40 и HuT78/CynoOX40.

Иммунизация, слияние гибридомы и клонирование

[0151] Восьми-двенадцати недельных мышей линии Balb/c (от HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Пекин, Китай) иммунизировали внутрибрюшинно 200 мкл смеси антигена, содержащей 10 мкг OX40-mIgG2a и иммуноадъюванта Quick-Antibody (Cat: KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай). Процедура повторяли через три недели. Через две недели после 2-й

иммунизации сыворотки мышей оценивали на связывание OX40 с помощью ИФА и FACS. Через десять дней после скрининга сыворотки мышей с самыми высокими титрами антител к OX40 в сыворотке повторно иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции 10 мкг OX40-mIgG2a. Через три дня после повторного иммунизирования выделяли спленоциты и сливали с линией клеток мышинной миеломы, клетками SP2/0 (ATCC, Manassas VA), применяя стандартные способы (Somat Cell Genet, 1977 3:231).

Оценка связывающей активности антител с OX40 с помощью ИФА и FACS

[0152] Супернатанты клонов гибридомы первоначально подвергали скринингу с помощью ИФА, как описано в (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52) с некоторыми модификациями. Кратко, белок OX40-His наносили на 96-луночные планшеты при 4 °C в течение ночи. После промывки PBS/0,05% Tween-20 планшеты блокировали PBS/3% BSA (бычий сывороточный альбумин) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали PBS/0,05% Tween-20 и инкубировали с клеточными супернатантами при комнатной температуре в течение 1 ч. Антитело к IgG мыши, связанное с HRP (пероксидаза хрена) (Cat: 115035-008, Jackson ImmunoResearch Inc, AffiniPure, Антитела козы к IgG мыши, конъюгированные пероксидазой хрена, специфический фрагмент Fc γ) и субстрат (Cat: 00-4201-56, eBioscience, США) использовали для получения сигнала поглощения цвета на длине волны 450 нм, который измеряли с помощью планшет-ридера (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices/PHERAstar, BMG LABTECH). Положительные родительские клоны были отобраны в результате скрининга слияния с помощью непрямого ИФА. ИФА-положительные клоны дополнительно проверяли с помощью FACS с применением клеток HuT78/OX40 и HuT78/cynoOX40, описанных выше. OX40-экспрессирующие клетки (10^5 клеток/луноку) инкубировали с ИФА-положительными супернатантами гибридом с последующим связыванием с антителами к IgG мыши eFluor® 660 (Cat: 50-4010-82, eBioscience, США). Клеточную флуоресценцию количественно определяли с помощью проточного цитометра (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, США).

[0153] Кондиционированные среды из гибридом, которые демонстрировали положительные сигналы и при скрининге ИФА, и при скрининге FACS, подвергали функциональным анализам для идентификации антител с хорошей функциональной активностью в анализах на основе иммунных клеток человека (см. следующие разделы). Антитела с желательной функциональной активностью дополнительно субклонировали и характеризовали.

Субклонирование и адаптация гибридом к бессывороточной или низкосывороточной среде

[0154] После первичного скрининга с помощью ИФА, FACS и функциональных анализов, как описано выше, положительные клоны гибридомы были субклонированы путем

ограничивающего разведения для обеспечения клональности. Лучшие субклоны антител были проверены с помощью функциональных анализов и адаптированы для роста в среде CDM4MAb (Cat: SH30801.02, Nyclone, США) с 3% FBS (эмбриональная бычья сыворотка).

Экспрессия и очистка моноклональных антител

[0155] Клетки гибридомы, экспрессирующие лучшие клоны антител, культивировали в среде CDM4MAb (Cat: SH30801.02, Nyclone) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 5-7 дней при 37 °C. Кондиционированную среду собирали с помощью центрифугирования и фильтровали перед очисткой, пропуская через 0,22 мкм мембрану. Мышиные антитела в супернатантах наносили и связывали с колонкой с белком А (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences) в соответствии с руководством производителя. Процедура обычно давала антитела с чистотой выше 90%. Антитела, очищенные средством к белку А, либо диализировали от PBS, либо, при необходимости, дополнительно очищали с применением колонки HiLoad 16/60 Superdex 200 (Cat: 28-9893-35, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Конечные препараты антител хранили в аликвотах в морозильной камере при температуре минус 80 °C.

Пример 2: Клонирование и анализ последовательности антител к OX40

[0156] Клоны мышинной гибридомы собирали для получения общих клеточных РНК с применением набора Ultrapure РНК (Cat: 74104, QIAGEN, Германия), основываясь на протоколе производителя. Первую цепь кДНК синтезировали с применением набора для синтеза кДНК от Invitrogen (Cat: 18080-051), а амплификацию ПЦР антител гибридомы VH и VL проводили с применением набора для ПЦР (Cat: CW0686, CWBio, Пекин, Китай). Олигопраймеры, применяемые для клонирования кДНК антител варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL), были синтезированы с помощью Invitrogen (Пекин, Китай), основываясь на последовательностях, описанных ранее (Brocks et al. 2001 Mol Med 7:461). Продукты ПЦР применяли непосредственно для секвенирования или субклонировали в вектор клонирования pEASY-Blunt (Cat: CB101 TransGen, Китай) с последующим секвенированием с помощью Genewiz (Пекин, Китай). Аминокислотные последовательности VH и VL областей были выведены из результатов секвенирования ДНК.

[0157] Определяющие комплементарность области (CDR) мышинных антител были определены на основе системы Кабата (Wu and Kabat 1970 J. Exp. Med. 132:211-250) посредством аннотации последовательности и с помощью компьютерной программы анализа последовательности. Аминокислотные последовательности репрезентативного лучшего

клона Mu445 (VH и VL) приведены в Таблице 1 (SEQ ID NO: 9 и 11). Последовательности CDR Mu445 приведены в Таблице 2 (SEQ ID NO: 3-8).

Таблица 1. Аминокислотные последовательности VH и VL областей Mu445

Mu445 VH	SEQ ID NO: 9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYIHHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNEKFKGKATLTSD KSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCARGYYGSSYAMDY WGQGTSVTVSS
Mu445 VL	SEQ ID NO: 11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQ KPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSGTDYFLTISN LEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEKK

Таблица 2. Последовательности CDR (аминокислоты) VH и VL областей мышиноного моноклонального антитела Mu445

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

Пример 3: Гуманизация мышиноного антитела 445 к OX40 человека

Гуманизация и конструирование антитела

[0158] Для гуманизации Mu445 в генах IgG зародышевой линии человека искали последовательности, которые имеют высокую степень гомологии с последовательностями кДНК варибельных областей Mu445, путем сравнения последовательностей с базой данных генов иммуноглобулина человека в IMGT (immunoglobulin gene database). В качестве матриц для гуманизации были выбраны гены IGHV и IGKV человека, которые присутствуют в репертуаре антител человека с высокой частотой (Glanville et al., 2009 PNAS 106:20216-20221) и в высокой степени гомологичны с Mu445.

[0159] Гуманизацию проводили с помощью CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering, Methods and Protocols, Vol 248: Humana Press), а гуманизированные антитела конструировали в формате IgG1 дикого типа человека с применением

самостоятельно разработанного вектора экспрессии. На начальном этапе гуманизации мутации от мышинных остатков аминокислот к человеческим в каркасных областях определяли с помощью имитированного 3D-структурного анализа, а остатки мышинных каркасов со структурной значимостью для поддержания канонических структур CDR сохраняли в первом варианте гуманизованного антитела 445 (см. 445-1, Таблица 3). Шесть CDR из 445-1 имеют аминокислотные последовательности HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 13), HCDR3 (SEQ ID NO: 5) и LCDR1 (SEQ ID NO: 6), LCDR2 (SEQ ID NO: 7) и LCDR3 (SEQ ID NO: 8). Варибельная область тяжелой цепи 445-1 имеет аминокислотную последовательность (VH) SEQ ID NO: 14, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 15, и варибельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность (VL) SEQ ID NO: 16, которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17. В частности, LCDR Mu445 (SEQ ID NO: 6-8) прививали в каркас варибельного гена зародышевой линии человека IGVK1-39 с сохранением двух мышинных остатков каркаса (I₄₄ и Y₇₁) (SEQ ID NO: 16). HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 13) и HCDR3 (SEQ ID NO: 5) прививали в каркас варибельного гена зародышевой линии человека IGHV1-69 с сохранением двух мышинных остатков каркаса (L₇₀ и S₇₂) (SEQ ID NO: 14). В вариантах гуманизации антитела 445 (445-1) прививали только N-концевую половину HCDR2 по Кабату, поскольку только N-концевая половина, согласно прогнозам, важна для связывания антигена в соответствии с имитированной 3D-структурой.

[0160] Антитело 445-1 конструировали в виде гуманизованного полноразмерного антитела с применением самостоятельно разработанных векторов экспрессии, которые содержат константные области IgG1 дикого типа человека (IgG1wt) и каппа-цепь, соответственно, с легкими адаптационными сайтами субклонирования. Антитело 445-1 экспрессировали путем совместной трансфекции двух вышеуказанных конструкций в клетки 293G и очищали с применением колонки с белком А (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences). Очищенное антитело концентрировали до 0,5-10 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при минус 80 °C.

[0161] С помощью антитела 445-1, было сделано несколько одиночных аминокислотных изменений, преобразующих удерживаемые мышинные остатки в каркасной области VH и VL в соответствующие остатки зародышевой линии человека, такие как I44P и Y71F в VL и L70I и S72A в VH. Кроме того, в CDR было внесено несколько одиночных аминокислотных изменений для снижения потенциального риска изомеризации и повышения уровня гуманизации. Например, изменения T51A и D50E были сделаны в LCDR2, а изменения D56E, G57A и N61A были сделаны в HCDR2. Все изменения гуманизации осуществляли с

помощью праймеров, содержащих мутации в определенных положениях, и набора для сайт-направленного мутагенеза (Cat: AP231-11, TransGen, Пекин, Китай). Желательные изменения проверяли с помощью секвенирования.

[0162] Аминокислотные изменения в антителе 445-1 оценивали по их связыванию с OX40 и термической стабильности. Антитело 445-2, содержащее HCDR1 из SEQ ID NO: 3, HCDR2 из SEQ ID NO: 18, HCDR3 из SEQ ID NO: 5, LCDR1 из SEQ ID NO: 6, LCDR2 из SEQ ID NO: 19 и LCDR3 из SEQ ID NO: 8 (см. Таблицу 3), было сконструировано из комбинации конкретных изменений, описанных выше. При сравнении двух антител результаты показали, что оба антитела 445-2 и 445-1 демонстрировали сопоставимую аффинность связывания (см. ниже в Таблице 4 и Таблице 5).

[0163] Начиная с антитела 445-2, несколько дополнительных аминокислотных изменений в каркасной области VL были сделаны для дальнейшего улучшения аффинности/кинетики связывания, например, изменения аминокислот G41D и K42G. Кроме того, несколько одиночных аминокислотных изменений в CDR как VH, так и VL были сделаны с целью снижения риска иммуногенности и повышения термической стабильности, например, S24R в LCDR1 и A61N в HCDR2. Полученные изменения показали либо улучшенную активность связывания, либо термическую стабильность по сравнению с 445-2.

[0164] Гуманизированные антитела 445 были дополнительно сконструированы путем введения конкретных аминокислотных изменений в CDR и каркасные области, чтобы улучшить молекулярные и биофизические свойства для терапевтического применения на людях. Факторы, которые нужно учитывать, включали удаление вредных посттрансляционных модификаций, улучшенную термостабильность (T_m), поверхностную гидрофобность и изоэлектронные точки (pI).

[0165] Гуманизированное моноклональное антитело 445-3, содержащее HCDR1 из SEQ ID NO: 3, HCDR2 из SEQ ID NO: 24, HCDR 3 из SEQ ID NO: 5, LCDR1 из SEQ ID NO: 25, LCDR2 из SEQ ID NO: 19 и LCDR3 из SEQ ID NO: 8 (см. Таблицу 3), было сконструировано в ходе процесса созревания, описанного выше, и подробно описано. Антитело 445-3 также получали в версии IgG2 (445-3 IgG2), содержащей Fc-домен тяжелой цепи IgG2 дикого типа человека, и версии IgG4, содержащей Fc-домен IgG4 человека с мутациями S228P и R409K27 (445-3 IgG4). Результаты показали, что антитела 445-3 и 445-2 демонстрировали сопоставимую аффинность связывания (см. Таблицу 4 и Таблицу 5).

Таблица 3. Последовательности антитела 445

Антитело	SEQ ID NO		Последовательность
----------	-----------	--	--------------------

445-1	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (по Кабару)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (по Кабару)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (по Кабару)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (по Кабару)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 7	LCDR2 (по Кабару)	DTSTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (по Кабару)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYKF TSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGT RYNQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTV SS
	SEQ ID NO: 16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISN YLNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSR FSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCQQYS KLPYTFGGGTKVEIK
445-2	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (по Кабару)	SYIIIH
	SEQ ID NO: 18	HCDR2 (по Кабару)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (по Кабару)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 6	LCDR1 (по Кабару)	SASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (по Кабару)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (по Кабару)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYKF

			TSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGT RYAQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTV TVSS
	SEQ ID NO: 22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISN YLNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYS KLPYTFGGGKVEIK
445-3	SEQ ID NO: 3	HCDR1 (по Кабаты)	SYIIH
	SEQ ID NO: 24	HCDR2 (по Кабаты)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	SEQ ID NO: 5	HCDR3 (по Кабаты)	GYYGSSYAMDY
	SEQ ID NO: 25	LCDR1 (по Кабаты)	RASQGISNYLN
	SEQ ID NO: 19	LCDR2 (по Кабаты)	DASTLYS
	SEQ ID NO: 8	LCDR3 (по Кабаты)	QQYSKLPYT
	SEQ ID NO: 26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYKF TSYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGT RYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARGYYYGSSYAMDYWGQGT VTVSS
	SEQ ID NO: 28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISN YLNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQY SKLPYTFGGGKVEIK

Пример 4: Определение кинетики и аффинности связывания антител к OX40 с помощью ППР (Поверхностный плазмонный резонанс)

[0166] Антитела к OX40 характеризовали по их кинетике и аффинности связывания с помощью ППР анализов с применением BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Кратко, антитело

к IgG человека иммобилизовали на активированном биосенсорном чипе CM5 (Cat: BR100530, GE Life Sciences). Антитело с Fc-областью IgG человека пропускали по поверхности чипа и захватывали антителом к IgG человека. Затем по поверхности чипа пропускали серийно разбавленный рекомбинантный белок OX40 с His-меткой (Cat: 10481-N08H, Sino Biological) и анализировали изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса, чтобы рассчитать скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) с помощью модели связывания «один-к-одному» Лэнгмюра (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_d к k_a . Результаты определенных с помощью ППР профилей связывания антител к OX40 обобщены на Фигуре 2 и в Таблице 4. Профиль связывания со средним значением K_D у антитела 445-3 (9,47 нМ) был немного лучше, чем у антитела 445-2 (13,5 нМ) и у 445-1 (17,1 нМ), и аналогичен таковому у ch445. Профиль связывания у 445-3 IgG4 был аналогичен профилю связывания у 445-3 (с Fc IgG1), что указывает на то, что изменение в Fc между IgG4 и IgG1 не меняло специфическое связывание антитела 445-3.

Таблица 4. Аффинности связывания антител к OX40 с помощью ППР

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

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

Пример 5: Определение аффинности связывания антител к OX40 с экспрессируемым на клетках HuT78 OX40

[0167] Чтобы оценить активность связывания антител к ОХ40 с ОХ40, экспрессируемым на поверхности живых клеток, клетки NuT78 трансфицировали с ОХ40 человека, как описано в Примере 1, для создания экспрессирующей линии ОХ40. Живые клетки NuT78/ОХ40 высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с серийно разбавленными различными антителами к ОХ40. Козье антитело к IgG-FITC человека (Cat: A0556, Beyotime) применяли в качестве вторичного антитела для обнаружения связывания антитела с поверхностью клетки. Значения EC_{50} (полуМаксимальная эффективная концентрация) для дозозависимого связывания с ОХ40 человека определяли путем подгонки данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с помощью GraphPad Prism. Как показано на Фигуре 3 и в Таблице 5, антитела к ОХ40 имели высокую аффинность к ОХ40. Также было обнаружено, что антитела к ОХ40 по настоящему изобретению имели относительно более высокий верхний уровень интенсивности флуоресценции, измеренный с помощью проточной цитометрии (см. последний столбец в Таблице 5), что указывает на более медленную диссоциацию антитела из ОХ40, что является более желательным профилем связывания.

Таблица 5. EC_{50} дозозависимого связывания гуманизированных вариантов 445 с ОХ40

Антитело	EC_{50} (мкг/мл)			Лучшая (MFI)
	Тест 1	Тест 2	Среднее	Среднее
ch445	0,321	0,277	0,299	725
445-1	0,293	0,278	0,285	525
445-2	0,323	0,363	0,343	620
445-3	0,337	0,319	0,328	910
445-3	0,263	Н/Д (Нет данных)	0,263	892

Пример 6: Определение перекрестной реактивности антител к ОХ40

[0168] Чтобы оценить перекрестную реактивность антитела 445-3 к ОХ40 человека и яванского макака, клетки, экспрессирующие ОХ40 человека (NuT78/ОХ40) и ОХ40 яванского макака (NuT78/СупоОХ40), высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с серией разведений антител к ОХ40. Козье антитело к IgG-FITC человека (Cat: A0556, Beyotime) применяли в качестве вторичного антитела для обнаружения. Значения EC_{50} для дозозависимого связывания с нативными ОХ40 человека и яванского макака определяли путем подгонки данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с

помощью GraphPad Prism. Результат показан на Фигуре 4 и ниже в Таблице 6. Антитело 445-3 вступает в перекрестную реакцию как с OX40 человека, так и с OX40 яванского макака с аналогичными значениями EC₅₀, как показано ниже.

Таблица 6. EC₅₀ связывания антитела 445-3 с OX40 человека и яванского макака

Клеточная линия	EC ₅₀ (мкг/мл) 445-3	Лучшая (MFI)
HuT78/OX40	0,174	575
HuT78/CynoOX40	0,171	594

Пример 7: Сокристаллизация и структурное определение OX40 с Fab 445-3

[0169] Для понимания механизма связывания OX40 с антителами по настоящему изобретению была решена сокристаллическая структура OX40 и Fab 445-3. Мутации в остатки T148 и N160 были введены для блокирования гликозилирования OX40 и улучшения гомогенности белка. ДНК, кодирующую мутантный OX40 человека (M1-D170 остатки с двумя мутированными сайтами, T148A и N160A), клонировали в вектор экспрессии с включением гекса-His-метки, и эту конструкцию временно трансфицировали в клетки 293G для экспрессии белка при 37 °C в течение 7 дней. Клетки и супернатант собирали и инкубировали с аффинной смолой с His меткой при 4 °C в течение 1 ч. Смолу трижды промывали буфером, содержащим 20 mM Трис, pH 8,0, 300 mM NaCl и 30 mM имидазола. Затем белок OX40 элюировали буфером, содержащим 20 mM Трис, pH 8,0, 300 mM NaCl и 250 mM имидазола, с последующей дополнительной очисткой Superdex 200 (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM Трис, pH 8,0, 100 mM NaCl.

[0170] Кодированные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Fab 445-3 клонировали в вектор экспрессии с включением гекса-His-метки на C-конце тяжелой цепи, и их временно совместно трансфицировали в клетки 293G для экспрессии белка при 37 °C в течение 7 дней. Стадии очистки Fab 445-3 были такими же, как и в случае мутантного белка OX40 выше.

[0171] Очищенные OX40 и Fab 445-3 смешивали в молярном соотношении 1 : 1 и инкубировали в течение 30 мин на льду с последующей дополнительной очисткой Superdex 200 (GE Healthcare) в буфере, содержащем 20 mM Трис, pH 8,0, 100 mM NaCl. Пик комплекса собирали и концентрировали до приблизительно 30 мг/мл.

[0172] Скрининг сокристаллов проводили путем смешивания белкового комплекса с раствором резервуара в объемном соотношении 1 : 1. Сокристаллы получали из висячих капель, культивируемых при 20 °C с помощью паровой диффузии с раствором резервуара,

содержащим 0,1 М HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), pH 7,0, 1% ПЭГ 2000 ММЕ и 0,95 М сукцината натрия.

[0173] Нейлоновые петли использовали для сбора сокристаллов, и кристаллы погружали в резервуарный раствор с добавлением 20% глицерина в течение 10 с. Дифракционные данные собирали на синхротроне BL17U1 в Шанхайском центре синхротронного излучения и обрабатывали с помощью программы XDS. Фазу решали в программе PHASER с помощью структуры Fab IgG (цепи C и D в PDB: 5CZX) и структуры OX40 (цепь R в PDB: 2HEV) в качестве моделей для поиска для молекулярного замещения. Графический интерфейс Phenix.refine применялся для уточнения твердого тела, TLS (трансляционные/либрационные/винтовые колебания) и ограниченного уточнения по рентгеновским данным с последующей корректировкой с помощью программы COOT и дальнейшим уточнением в программе Phenix.refine. Статистика сбора и уточнения рентгеновских данных обобщена в Таблице 7.

Таблица 7. Статистика сбора и уточнения данных

Сбор данных	
Источник излучения	BL17U1, SSRF
Пространственная группа	P 31 2 1
Размеры ячейки (Å)	a = 183,96 b = 183,96 c = 79,09
Углы (°)	$\alpha = 90,00$ $\beta = 90,00$ $\gamma = 120,00$
Разрешение (Å)	159,3-2,55 (2,63-2,55)
Общее количество рефлексов	988771 (81305)
Количество уникальных рефлексов	50306 (4625)
Полнота (%)	99,9 (99,9)
Повторяемость	19,7 (17,6)
Rmerge ^a	0,059 (0,962)
I/sigma (I)	29,4 (3,5)
Коэффициент Вильсона B (Å)	73,9
Уточнение	
Разрешение (Å)	60,22-2,55
Количество рефлексов	50008

rmsd (среднеквадратическое отклонение) длин связей (Å)	0,010
rmsd углов связей (°)	0,856
R _{work} ^b (%)	19,27
R _{free} ^c (%)	21,60
Средние B-факторы белка	97,10
Карта Рамачандрана (%)	
Подходящее	96,34
Допустимое	3,48
Выпадающие показатели	0,17

Значения в скобках относятся к оболочке с наибольшим разрешением.

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

^bR_{work} = $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, где F_o и F_c представляют собой наблюдаемые и рассчитанные амплитуды факторов структуры, соответственно.

^cR_{free} = $\frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$, рассчитано с помощью набора тестовых данных, причем 5% от общего объема данных случайным образом выбрано из наблюдаемых рефлексов.

Пример 8: Идентификация эпитопа антитела 445-3 с помощью ППР

[0174] Руководствуясь сокристаллической структурой OX40 и антитела Fab 445-3, авторы изобретения выбрали и получили серию одиночных мутаций в белке OX40 человека для дальнейшей идентификации ключевых эпитопов антител к OX40 по настоящему изобретению. В слитой конструкции OX40/IgG1 человека с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза (Cat: AP231-11, TransGen) были сделаны одноточечные мутации. Желательные мутации проверяли с помощью секвенирования. Экспрессию и получение мутантов OX40 достигали путем трансфекции в клетки 293G и очищали с применением колонки с белком А (Cat: 17-5438-02, GE Life Sciences).

[0175] Аффинность связывания точечных мутантов OX40 с Fab 445-3 характеризовали с помощью ППР анализов с применением VIAcore 8K (GE Life Sciences). Кратко, мутанты OX40 и дикого типа OX40 иммобилизовали на биосенсорном чипе CM5 (Cat: BR100530, GE Life Sciences) с помощью EDC (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) и NHS (N-гидроксисукцинимид). Затем серийно разбавленный Fab 445-3 в буфере HBS-EP⁺ (Cat: BR-1008-26, GE Life Sciences) пропускали по поверхности чипа со временем контакта 180 с и со

временем диссоциации 600 с при 30 мкл/мин. Изменения в сигналах поверхностного плазмонного резонанса анализировали для расчета скоростей ассоциации (k_a) и скоростей диссоциации (k_d) с применением модели связывания Ленгмюра «один к одному» (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_d к k_a . Кратность сдвига K_D для мутанта рассчитывали как соотношение K_D мутанта к K_D WT (дикого типа). Профили идентификации эпитопа, определенные с помощью ППР, обобщены на Фигуре 5 и в Таблице 8. Результаты показали, что мутация остатков H153, I165 и E167 в аланин в OX40 значительно снижает связывание антитела 445-3 с OX40, и мутация остатков T154 и D170 в аланин умеренно снижает связывание антитела 445-3 с OX40.

[0176] Подробные взаимодействия между антителом 445-3 и остатками H153, T154, I165, E167 и D170 в OX40 показаны на Фигуре 6. Боковая цепь H153 на OX40 была окружена небольшим карманом 445-3 на поверхности взаимодействия, образуя водородные связи с тяжелыйS31 и тяжелыйG102 и π - π взаимодействие с тяжелыйY101. Боковая цепь E167 образует водородные связи с тяжелыйY50 и тяжелыйN52, в то время как D170 образует водородную связь и соляной мостик с тяжелыйS31 и тяжелыйK28, соответственно, которые могут дополнительно стабилизировать комплекс. Ван-дер-ваальсовы (VDW) взаимодействия между T154 и тяжелыйY105, I165 и тяжелыйR59 способствовали высокой аффинности антитела 445-3 к OX40.

[0177] В заключение, остатки H153, I165 и E167 в OX40 были идентифицированы как важные остатки для взаимодействия с антителом 445-3. Кроме того, аминокислоты T154 и D170 в OX40 также являются важными контактными остатками для антитела 445-3. Эти данные указывают на то, что эпитопы антитела 445-3 представляют собой остатки H153, T154, I165, E167 и D170 в OX40. Эти эпитопы находятся в последовательности HTLQPASNSSDAICEDRD (SEQ ID NO: 30) с важными контактными остатками, выделенными жирным шрифтом и подчеркнутыми.

Таблица 8. Идентификация эпитопа антитела 445-3, определенного с помощью ППР

Мутанты	K_D Мутанта / K_D WT
H153A	Связывание не обнаружено
T154A	8
Q156A	1,9
S161A	1,1
S162A	0,6
I165A	28

E167A	135
D170A	8

Значительное влияние: Связывание не обнаружено, или значение K_D Мутанта / K_D WT было больше 10.

Умеренное влияние: K_D Мутанта / K_D WT было оценено между 5 и 10.

Незначительное влияние: Значение K_D Мутанта / K_D WT было меньше 5.

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

[0178] Чтобы определить, мешает ли антитело 445-3 взаимодействию OX40-OX40L, был проведен клеточный анализ проточной цитометрии. В этом анализе антитело 445-3, эталонное антитело 1A7.gr1, контрольный huIgG или только среду предварительно инкубировали со слитым белком OX40 человека и Fc мышинового IgG2a (OX40-mIgG2a). Затем комплекс антитела и слитого белка добавляли к клеткам НЕК293, экспрессирующим OX40L. Если антитело к OX40 не мешает взаимодействию OX40-OX40L, то комплекс антитело к OX40-OX40-mIgG2a все равно будет связываться с поверхностью OX40L, и это взаимодействие обнаруживается с помощью вторичного антитела к Fc мыши.

[0179] Как показано на Фигуре 7, антитело 445-3, даже в высокой концентрации, не снижает связывание OX40 с OX40L, что указывает на то, что 445-3 не мешает взаимодействию OX40-OX40L. Это указывает на то, что 445-3 не связывается в сайте связывания OX40L или связывается достаточно близко, чтобы стерически мешать связыванию OX40L. Напротив, положительный контроль антитела 1A7.gr1 полностью блокирует связывание OX40 с OX40L, как показано на Фигуре 7.

[0180] Кроме того, сокристаллическая структура OX40 в комплексе с Fab 445-3 была решена и выровнена с комплексом OX40/OX40L (код PDB: 2HEV), как показано на Фигуре 8. Триммер лиганда OX40 взаимодействует с OX40 главным образом через CRD1 (домен, богатый цистеином), CRD2 и частичные области CRD3 в OX40 (Compaan and Hymowitz, 2006), в то время как антитело 445-3 взаимодействует с OX40 только через область CRD4. Таким образом, антитело 445-3 и тример OX40L связываются в различных соответствующих областях OX40, и антитело 445-3 не мешает взаимодействию OX40/OX40L. Этот результат коррелирует с данными картирования эпитопов, описанными в Примерах выше. CRD4 в OX40 находится в положении аминокислот 127-167, и эпитоп антитела 445-3 частично перекрывается этой областью. Последовательность OX40 CRD4 (аминокислоты 127-167)

показана ниже, а частичное перекрытие эпитопа 445-3 выделено жирным шрифтом и подчеркнуто: PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICE (SEQ ID NO: 31).

Пример 10: Агонистическая активность антитела 445-3 к OX40

[0181] Чтобы исследовать агонистические функции антитела 445-3, OX40-позитивную Т-клеточную линию (HuT78/OX40) совместно культивировали с линией искусственных антигенпрезентирующих клеток (АПК) (HEK293/OS8^{low}-FcγRI) в присутствии или в отсутствие 445-3 или 1A7.gr1 в течение ночи, а продукцию ИЛ-2 применяли в качестве показателя стимуляции Т-клеток. В клетках HEK293/OS8^{Low}-FcγRI гены, кодирующие мембраносвязанное антитело ОКТ3 (OS8) к CD3 (как раскрыто в патенте США № 8735553) и FcγRI человека (CD64), стабильно совместно трансдуцировали в клетки HEK293. Поскольку индуцированная антителом к OX40 иммунная активация зависит от сшивания антитела (Voo et al., 2013), FcγRI на HEK293/OS8^{Low}-FcγRI обеспечивает основу для опосредованного антителом к OX40 сшивания OX40 при двойном взаимодействии антитела к OX40 как с OX40, так и с FcγRI. Как показано на Фигуре 9, антитело 445-3 к OX40 обладало высокой эффективностью в усилении передачи сигналов TCR дозозависимым образом с EC₅₀, равной 0,06 нг/мл. Также наблюдались слегка более слабые активности эталонного антитела 1A7.gr1. Напротив, контроль IgG человека (10 мкг/мл) или холостой контроль не оказывали влияния на продукцию ИЛ-2.

Пример 11: Антитело 445-3 к OX40 стимулировало иммунные ответы при анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ)

[0182] Чтобы определить, может ли антитело 445-3 стимулировать активацию Т-клеток, проводили анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), как описано ранее (Tourkova et al., 2001). Кратко, зрелые ДК индуцировали из миелоидных клеток CD14⁺, полученных из МКПК человека, путем культивирования с GM-CSF и ИЛ-4 с последующей стимуляцией ЛПС (липосахарид). Затем ДК, обработанные митомицином С, совместно культивировали с аллогенными CD4⁺ Т-клетками в присутствии антитела 445-3 к OX40 (0,1-10 мкг/мл) в течение 2 дней. Продукция ИЛ-2 в совместной культуре была обнаружена с помощью ИФА в качестве показаний ответа СКЛ.

[0183] Как показано на Фигуре 10, антитело 445-3 значительно стимулировало продукцию ИЛ-2, что указывает на способность 445-3 активировать CD4⁺ Т-клетки. Напротив, эталонное антитело 1A7.gr1 продемонстрировало значительно (Р менее 0,05) более слабую активность при анализе СКЛ.

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

[0184] Чтобы выяснить, может ли антитело 445-3 уничтожить клетки-мишени, экспрессирующие OX40^{Hi}, был проведен анализ ADCC на основе высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Клеточную линию NK92MI/CD16V получали в виде эффекторных клеток путем совместной трансдукции генов CD16v158 (аллель V158) и FcR γ в клеточную линию NK, NK92MI (ATCC, Manassas VA). В качестве клеток-мишеней применяли линию Т-клеток, экспрессирующую OX40, HuT78/OX40. Равное количество (3×10^4) клеток-мишеней и эффекторных клеток совместно культивировали в течение 5 ч в присутствии антитела к OX40 (0,004-3 мкг/мл) или контрольных антител. Цитотоксичность оценивали путем высвобождения ЛДГ, применяя набор для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, Madison, WI). Специфический лизис рассчитывали по формуле, приведенной ниже.

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

[0183] Как показано на Фигуре 11, антитело 445-3 демонстрировало высокую эффективность в уничтожении мишеней OX40^{Hi} с помощью ADCC дозозависимым образом (EC₅₀: 0,027 мкг/мл). Эффект ADCC антитела 445-3 был аналогичен таковому у контрольного антитела 1A7.gr1. Напротив, 445-3 с форматом Fc IgG4 с мутациями S228P и R409K (445-3-IgG4) не продемонстрировало каких-либо значимых эффектов ADCC по сравнению с контролем IgG человека или холостым контролем. Результаты согласуются с предыдущими выводами о том, что Fc IgG4 является слабой или бессимптомной для ADCC (An Z, et al. mAb 2009).

Пример 13: Антитело 445-3 к OX40 предпочтительно истощает CD4⁺ Treg клетки и увеличивает соотношения между CD8⁺ Teff и Treg клетками *in vitro*

[0184] На нескольких животных моделях опухолей было показано, что антитела к OX40 могут истощать проникающие в опухоль OX40^{Hi} Treg клетки и увеличивать соотношение между CD8⁺ Т-клеток и Treg клетками (Bulliard et al., 2014; Carboni et al., 2003; Jacquemin et al., 2015; Marabelle et al., 2013b). Следовательно, иммунный ответ усиливается, приводя к регрессии опухоли и улучшению выживаемости.

[0185] Учитывая тот факт, что *in vitro* активированные или внутриопухолевые CD4⁺ Foxp3⁺ Treg клетки преимущественно экспрессируют OX40, в отличие от других субпопуляций Т-клеток (Lai et al., 2016; Marabelle et al., 2013b; Montler et al., 2016; Soroosh et al., 2007; Timperi et al., 2016), был проведен анализ на основе МКПК человека для исследования способности антитела 445-3 уничтожать клетки OX40^{Hi}, в частности Treg клетки. Кратко, МКПК

предварительно активировали в течение 1 дня с помощью РНА-L (1 мкг/мл) для индукции экспрессии OX40 и применяли в качестве клеток-мишеней. Затем эффекторные клетки NK92MI/CD16V (как описано в Примере 12, 5×10^4) совместно культивировали с равным количеством клеток-мишеней в присутствии антител к OX40 (0,001-10 мкг/мл) или плацебо в течение ночи. Процентное содержание каждого из подмножеств Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фигурах 12А и 12В, обработка антителом 445-3 индуцировала увеличение процентного содержания CD8⁺ Т-клеток и снижение процентного содержания CD4⁺ Foxp3⁺ Treg клеток дозозависимым образом. В результате были значительно улучшены соотношения между CD8⁺ Т-клетками и Treg клетками (Фигура 12С). Более плохие результаты были получены при обработке 1A7.gr1. Этот результат демонстрирует терапевтическое применение 445-3 в индуцировании противоопухолевого иммунитета путем усиления функций CD8⁺ Т-клеток, но ограничивая опосредованную Treg иммунную толерантность.

Пример 14: Антитело 445-3 к OX40 проявляет дозозависимую противоопухолевую активность на модели опухоли мышей

[0186] Эффективность антитела 445-3 к OX40 была продемонстрирована на модели опухоли мышей. Мышиные опухолевые клетки толстой кишки MC38 подкожно имплантировали трансгенным мышам C57, несущим OX40 человека (Biocytogen, Пекин, Китай). После имплантации опухолевых клеток объемы опухоли измеряли дважды в неделю и рассчитывали в мм³ по формуле: $V = 0,5 (a \times b^2)$, где а и b представляют собой размеры по длинной и короткой осям опухоли, соответственно. Когда опухоли по размеру достигали среднего объема приблизительно 190 мм³, мышей рандомизировано распределяли на 7 групп и вводили путем инъекции внутрибрюшинно либо антитело 445-3, либо антитело 1A7.gr1 один раз в неделю в течение трех недель. IgG человека вводили в качестве изотипического контроля. Частичную регрессию (PR) определяли как объем опухоли менее 50% от начального объема опухоли в первый день введения дозы в трех последовательных измерениях. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ торможения роста} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(\text{обработанный объем } t) - (\text{обработанный объем } t_0)}{(\text{объем плацебо } t) - (\text{объем плацебо } t_0)} \right) \right),$$

обработанный объем t представляет собой обработанный объем опухоли в момент времени t, обработанный объем t₀ представляет собой обработанный объем опухоли в момент времени 0,

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

объем плацебо t_0 представляет собой объем опухоли плацебо в момент времени 0.

[0187] Результаты показали, что 445-3 обладало дозозависимой противоопухолевой эффективностью в виде внутрибрюшинной инъекции с дозами 0,4 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг. Введение 445-3 приводило к торможению роста опухоли на 53% (0,4 мг/кг), 69% (2 мг/кг) и 94% (10 мг/кг) и приводило к частичной регрессии на 0% (0,4 мг/кг), 17% (2 мг/кг) и 33% (10 мг/кг) относительно исходного уровня. Напротив, при применении антитела 1A7.gr1 частичной регрессии не наблюдалось. Данные *in vivo* показывают, что лиганд-неблокирующее антитело 445-3 лучше подходит для противоопухолевой терапии, чем антитело 1A7.gr1 блокирующее OX40-OX40L (Фигуры 13А и 13В, Таблица 9).

Таблица 9. Эффективность 445-3 и 1A7.gr1 на мышинной модели опухоли толстой кишки MC38

Лечение	Доза 1 раз в неделю (мг/кг)	N	Скорость частичной регрессии	Средний объем опухоли на 21-й день (мм ³)	ТРО на 21-й день (%)
445-3	0,4	6	0%	953	53
	2	6	17%	696	69
	10	6	33%	280	94
1A7.gr1	0,4	6	0%	886	57
	2	6	0%	1163	41
	10	6	0%	1030	49

Пример 15: Аминокислотные изменения антител к OX40

[0188] Несколько аминокислот были выбраны для изменения с целью улучшения антител к OX40. Аминокислотные изменения были сделаны для улучшения аффинности или для увеличения гуманизации. Наборы праймеров для ПЦР были разработаны для соответствующих аминокислотных изменений, синтезированы и применены для модификации антител к OX40. Например, изменение K28T в тяжелой цепи и S24R в легкой цепи привело к увеличению EC_{50} в 1,7 раза, определенному с помощью FACS, по сравнению с исходным антителом 445-2. Изменение Y27G в тяжелой цепи и S24R в легкой цепи привело к увеличению K_D в 1,7 раза, определенному с помощью Biacore, по сравнению с исходным антителом 445-2. Эти изменения обобщены на Фигурах 14А-14В.

Пример 16: Антитела к OX40 в комбинации с антителами к TIM3 в сингенной мышинной модели MMTV-ПуМТ

[0189] MMTV-ПуМТ представляет собой мышиную модель метастазирования рака молочной железы, где MMTV-LTR применяется для сверхэкспрессии среднего Т-антигена полиомавируса в молочной железе. У мышей развиваются высокометастатические опухоли, и эта модель обычно применяется для изучения прогрессирования рака молочной железы.

[0190] Самкам мышей FVB/N имплантировали 1×10^6 внутримозговых опухолевых клеток MMTV-ПуМТ, полученных из спонтанной развившейся опухоли у трансгенных мышей MMTV-ПуМТ. После инокуляции в течение 8 дней животных рандомизировано распределяли на 4 группы по 15 животных в каждой группе. Затем мышей обрабатывали носителем (PBS) в качестве положительного контроля.

[0191] OX86 представляет собой крысиное антитело к OX40 мыши, ранее раскрытое в WO2016/057667, которое дополнительно конструировали с константными областями IgG2a мыши для снижения его иммуногенности, а также сохранения его Fc-опосредованных функций в исследованиях на мышах. Области VH и VL в OX86 приведены ниже. Как сообщалось ранее в научной литературе, OX86 имеет механизм действия, аналогичный антителу 445-3, в том смысле, что оно не блокирует взаимодействие между OX40 и лигандом OX40 (al-Shamkhani Al, et al., Euro J. Immunol (1996) 26(8);1695-9, Zhang, P. et al. Cell Reports 27, 3117–3123).

OX86VH	SEQ ID NO: 42	QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPP GKGLEWMGR MRYDGDYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDDT AIYYCTRDGRG DSFDYWGQGVMVTVSS
OX86VL	SEQ ID NO: 43	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWFL QRPGQSPQLLT YWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISRVAEDAGVYYCQ QVREYPFTFGS GTKLEIK

[0192] Мышиное специфическое антитело к TIM3 (RMT3-23) было приобретено у Bioxcell (New Hampshire Cat # BP0115) и вводилось в дозе 3 мг/кг один раз в неделю путем внутрибрюшинной инъекции. OX86 в комбинации с RMT3-23 вводили в качестве комбинированной терапии в тех же дозах, что и описанные выше дозы для монотерапии. Объем опухоли и массу тела определяли два раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля и выражали в мм³ с помощью формулы: $V = 0,5(a \times b^2)$, где a и b представляют собой размеры по длинной и короткой осям опухоли, соответственно. Данные представлены в виде средний объем опухоли ± стандартная ошибка среднего (SEM). Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по следующей формуле:

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

обработанный объем t представляет собой обработанный объем опухоли в момент времени t, обработанный объем t₀ представляет собой обработанный объем опухоли в момент времени 0,

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

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

[0193] Ответ сингенной модели MMTV-РyMT на лечение OX86 в комбинации с RMT3-23 показан на Фигуре 15 и в Таблице 10. На 21-й день каждый из OX86 и RMT3-23, вводимых в виде одиночного агента, тормозил рост опухоли с ТРО, равным 31% и -5%, соответственно. Напротив, OX86 в комбинации с RMT3-23 значительно улучшало противоопухолевую активность с ТРО, равным 63%, причем наблюдалось увеличение на 32% по сравнению с введением OX86 в качестве одиночного агента и явное увеличение ТРО в RMT3-23, который действовал аналогично контролю PBS (p менее 0,001, комбинация по сравнению с наполнителем; p менее 0,01, комбинация по сравнению с монотерапией OX86; и p менее 0,001, комбинация по сравнению с монотерапией RMT3-23).

[0194] Эти данные указывают на то, что антитело к OX40 в комбинации с антителом к TIM3 было более эффективным, чем любой агент, вводимый по-отдельности. Комбинированная терапия не оказывала существенного влияния на массу тела животного ни в одной группе лечения на протяжении всего исследования.

Таблица 10. Эффективность комбинирования антител к OX40 и к TIM3 на мышинной модели рака молочной железы

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	N	ТРО (%) на 21-й день	Средний объем опухоли на 21-й день (мм ³ ; среднее ± SEM)	P (по сравнению с комбинированной группой) на 21-й день
Носитель	0	15	-	587,3 ± 45,9	0,0000
OX86	0,4	15	31	404,7 ± 50,8	0,0046
RMT3-23	3	15	-5	614,6 ± 45,0	0,0000
OX86+ RMT3-23	0,4 + 3	15	63	219,7 ± 29,7	N/O ^b

^aВсе дозы вводились один раз в неделю. ^b Не определено

Пример 17: Антитела к OX40 в комбинации с антителами к TIM3 в мышинной модели рака почки

[0195] Самкам мышей линии BALB/c подкожно имплантировали на правый бок 2×10^5 клеток рака почки (Rensa) в 100 мкл PBS. После инокуляции в течение 8 дней животных рандомизированно распределяли на 4 группы по 15 животных в каждой группе в соответствии с порядком инокуляции. После инокуляции в течение 8 дней животных рандомизированно распределяли на 4 группы по 15 животных в каждой группе. Затем мышей обрабатывали носителем (PBS) в качестве контроля. В качестве монотерапии мышинное специфическое антитело к OX40 (OX86) вводили в дозе 0,4 мг/кг один раз в неделю (1 р./нед.) путем внутрибрюшинной инъекции. Мышиное специфическое антитело к TIM3 (RMT3-23, описанное выше) вводили в дозе 3 мг/кг 1 р./нед. путем внутрибрюшинной инъекции. В качестве комбинированной терапии антитело к OX86 в комбинации с RMT3-23 вводили в той же дозе и тем же путем, как описано выше для каждого отдельного антитела. У мышей два раза в неделю проверяли объем опухоли и массу тела.

[0196] Ответ сингенной мышинной модели Rensa на OX86 в комбинации с лечением RMT3-23 показан на Фигуре 16 и в Таблице 11. На 17-й день каждая из монотерапий OX86 и RMT3-23 тормозила рост опухоли с ТРО, равным 61% и 2%, соответственно. Лечение RMT3-23 в качестве одного агента было очень похоже на контроль PBS. Напротив, лечение OX86 в комбинации с RMT3-23 продемонстрировало значительно улучшенную противоопухолевую

активность с ТРО, равным 80% (p менее 0,001, комбинация по сравнению с носителем). Эти данные указывают на то, что антитело к ОХ40 в комбинации с антителом к ТИМЗ эффективно в этой мышинной модели рака почки. На протяжении всего исследования ни в одной группе лечения значимого влияния на массу тела животных не наблюдалось.

Таблица 11. Эффективность комбинирования антител к ОХ86 и к ТИМЗ на сингенной модели Rensa

Тестовый образец	Доза ^a (мг/кг)	N	ТРО (%) на 17-й день	Средний объем опухоли на 17-й день (мм ³ ; среднее ± SEM)	p (по сравнению с комбинированной группой) на 17-й день
Носитель	0	15	-	1255,6 ± 159,1	0,0001
ОХ86	0,4	15	61	495,4 ± 153,5	0,1466
RMT3-23	3	15	2	1224,4 ± 104,9	0,0000
ОХ86+ RMT3-23	0,4 + 3	15	80	245,6 ± 59,7	Н/О ^b

^aВсе дозы вводились один раз в неделю. ^b Не определено

Ссылки

1. al-Shamkhani, A., Birkeland, M.L., Puklavec, M., Brown, M.H., James, W., and Barclay, A.N. (1996). OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European journal of immunology* 26, 1695-1699.
2. An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. (2009). IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. *MAbs*. 1,572-579.
3. Arch, R.H., and Thompson, C.B. (1998). 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Molecular and cellular biology* 18, 558-565.
4. Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J.C., Zitvogel, L., and Marabelle, A. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 52, 50-66.

5. Bulliard, Y., Jolicoeur, R., Zhang, J., Dranoff, G., Wilson, N.S., and Brogdon, J.L. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγR3s, leading to antitumor efficacy. *Immunology and cell biology* 92, 475-480.
6. Calderhead, D.M., Buhlmann, J.E., van den Eertwegh, A.J., Claassen, E., Noelle, R.J., and Fell, H.P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. *J Immunol* 151, 5261-5271.
7. Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., and Penarossi, C. (2003). CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 145, 1-11.
8. Compaan, D.M., and Hymowitz, S.G. (2006). The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* 14, 1321-1330.
9. Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annual review of immunology* 28, 57-78.
10. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews* 229, 173-191.
11. Curti, B.D., Kovacovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwsen, T., Fox, B.A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer research* 73, 7189-7198.
12. Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P., and Stein, H. (1995). Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. *British journal of haematology* 91, 927-931.
13. Gough, M.J., and Weinberg, A.D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Advances in experimental medicine and biology* 647, 94-107.
14. Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161, 6510-6517.
15. Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *Journal of translational medicine* 11, 215.
16. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
17. Huddleston, C.A., Weinberg, A.D., and Parker, D.C. (2006). OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. *European journal of immunology* 36, 1093-1103.

18. Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172, 4253-4259.
19. Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X., and Liu, Y.J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13138-13143.
20. Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159-1170.
21. Kjaergaard, J., Tanaka, J., Kim, J.A., Rothchild, K., Weinberg, A., and Shu, S. (2000). Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer research* 60, 5514-5521.
22. Ladanyi, A., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I., and Timar, J. (2004). T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 521-530.
23. Lai, C., August, S., Albibas, A., Behar, R., Cho, S.Y., Polak, M.E., Theaker, J., MacLeod, A.S., French, R.R., Glennie, M.J., et al. (2016). OX40+ Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 4236-4248.
24. Marabelle, A., Kohrt, H., and Levy, R. (2013a). Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5261-5263.
25. Marabelle, A., Kohrt, H., Sagiv-Barfi, I., Ajami, B., Axtell, R.C., Zhou, G., Rajapaksa, R., Green, M.R., Torchia, J., Brody, J., et al. (2013b). Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of clinical investigation* 123, 2447-2463.
26. Montler, R., Bell, R.B., Thalhoffer, C., Leidner, R., Feng, Z., Fox, B.A., Cheng, A.C., Bui, T.G., Tucker, C., Hoen, H., and Weinberg, A. (2016). OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer. *Clinical & translational immunology* 5, e70.

27. Morris, N.P., Peters, C., Montler, R., Hu, H.M., Curti, B.D., Urba, W.J., and Weinberg, A.D. (2007). Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Molecular immunology* 44, 3112-3121.
28. Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159, 3838-3848.
29. Petty, J.K., He, K., Corless, C.L., Vetto, J.T., and Weinberg, A.D. (2002). Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *American journal of surgery* 183, 512-518.
30. Redmond, W.L., and Weinberg, A.D. (2007). Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Critical reviews in immunology* 27, 415-436.
31. Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.
32. Ruby, C.E., and Weinberg, A.D. (2009). OX40-enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age. *J Immunol* 182, 1481-1489.
33. Sarff, M., Edwards, D., Dhungel, B., Wegmann, K.W., Corless, C., Weinberg, A.D., and Vetto, J.T. (2008). OX40 (CD134) expression in sentinel lymph nodes correlates with prognostic features of primary melanomas. *American journal of surgery* 195, 621-625; discussion 625.
34. Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L.C., and Sugamura, K. (2002). Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *European journal of immunology* 32, 3326-3335.
35. Smyth, M.J., Ngiow, S.F., and Teng, M.W. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. *Immunology and cell biology* 92, 473-474.
36. Song, A., Tang, X., Harms, K.M., and Croft, M. (2005a). OX40 and Bcl-xL promote the persistence of CD8 T cells to recall tumor-associated antigen. *J Immunol* 175, 3534-3541.
37. Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., and Croft, M. (2005b). Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* 22, 621-631.
38. Song, J., So, T., and Croft, M. (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol* 180, 7240-7248.

39. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 179, 5014-5023.
40. St Rose, M.C., Taylor, R.A., Bandyopadhyay, S., Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Vella, A.T., and Adler, A.J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-gamma maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and cell biology* 91, 173-183.
41. Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., and Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2, 507-521.
42. Szybowska, A., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Luczynski, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4(+)CD25(high) cells in children with type 1 diabetes. *Advances in medical sciences* 59, 39-43.
43. Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., Caronna, R., Del Bene, G., Longo, F., Ciardi, A., et al. (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 5, e1175800.
44. Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunology letters* 78, 75-82.
45. Vetto, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M., and Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers. *American journal of surgery* 174, 258-265.
46. Voo, K.S., Bover, L., Harline, M.L., Vien, L.T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L.W., and Liu, Y.J. (2013). Antibodies targeting human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *J Immunol* 191, 3641-3650.
47. Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J.T., Urba, W.J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol* 164, 2160-2169.
48. Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C., and Whitham, R.H. (1999). Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 162, 1818-1826.
49. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M.S. (2017). OX40: Structure and function - What questions remain? *Molecular immunology* 83, 13-22.

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

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

52. Zhang, P., Tu H. G., Wei. J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., Yeung Y. A. (2019) Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. *Cell Reports* 27, 3117–3123.

53. al-Shamkhani A1, Birkeland ML, Puklavec M, Brown MH, James W, Barclay AN. (1996) OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *European Journal of Immunology* 26(8):1695-9.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

2. Способ по п. 1, в котором антитело к OX40 специфически связывается с OX40 человека и содержит:

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

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

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

(iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающими фрагментами.

3. Способ по п. 1, в котором антитело к OX40 или антигенсвязывающий содержит:

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

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 22;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 16; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 11.

4. Способ по п. 1, в котором антитело к TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую: HCDR1 с SEQ ID NO: 32, HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и HCDR3 с SEQ ID NO: 34; и переменную область легкой цепи, содержащую: LCDR1 с SEQ ID NO: 35, LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

5. Способ по п. 1, в котором антитело к TIM3 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

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

7. Способ по п. 1, в котором антитело к TIM3 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

8. Способ по п. 1, в котором рак представляет собой рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак желудка, рак почки, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому или саркому.

9. Способ по п. 8, в котором рак молочной железы представляет собой метастатический рак молочной железы.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором лечение приводит к устойчивому противораковому ответу у субъекта после прекращения лечения.

11. Способ повышения, усиления или стимулирования иммунного ответа или функции, который включает введение субъекту эффективного количества неконкурентного антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом к TIM3 или его антигенсвязывающим фрагментом.

12. Способ по п. 11, в котором антитело к OX40 специфически связывается с OX40 человека и содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR (определяющую комплементарность область тяжелой цепи) 1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 24 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR (определяющую комплементарность область легкой цепи) 1 с

SEQ ID NO: 25, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 19 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8;

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

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

(iv) переменную область тяжелой цепи, которая содержит (a) HCDR1 с SEQ ID NO: 3, (b) HCDR2 с SEQ ID NO: 4 и (c) HCDR3 с SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит: (d) LCDR1 с SEQ ID NO: 6, (e) LCDR2 с SEQ ID NO: 7 и (f) LCDR3 с SEQ ID NO: 8, в комбинации с антителом к TIM3.

13. Способ по п. 11, в котором антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

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

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 22;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 16; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 11.

14. Способ по п. 11, в котором антитело к TIM3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую: HCDR1 с SEQ ID NO: 32, HCDR2 с SEQ ID NO: 33 и HCDR3 с SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, содержащую: LCDR1 с SEQ ID NO: 35, LCDR2 с SEQ ID NO: 36 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37.

15. Способ по п. 11, в котором антитело к TIM3 содержит антигенсвязывающий домен антитела, который специфически связывает TIM3 человека, и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

16. Способ по п. 11, в котором антитело к OX40 или антигенсвязывающий

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

17. Способ по п. 11, в котором антитело к TIM3 или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂.

18. Способ по п. 11, в котором стимулирование иммунного ответа связано с Т-клетками, НК-клетками (естественные киллерные клетки) и макрофагами.

19. Способ по п. 18, в котором стимулированный иммунный ответ характеризуется повышенной чувствительностью к антигенной стимуляции.

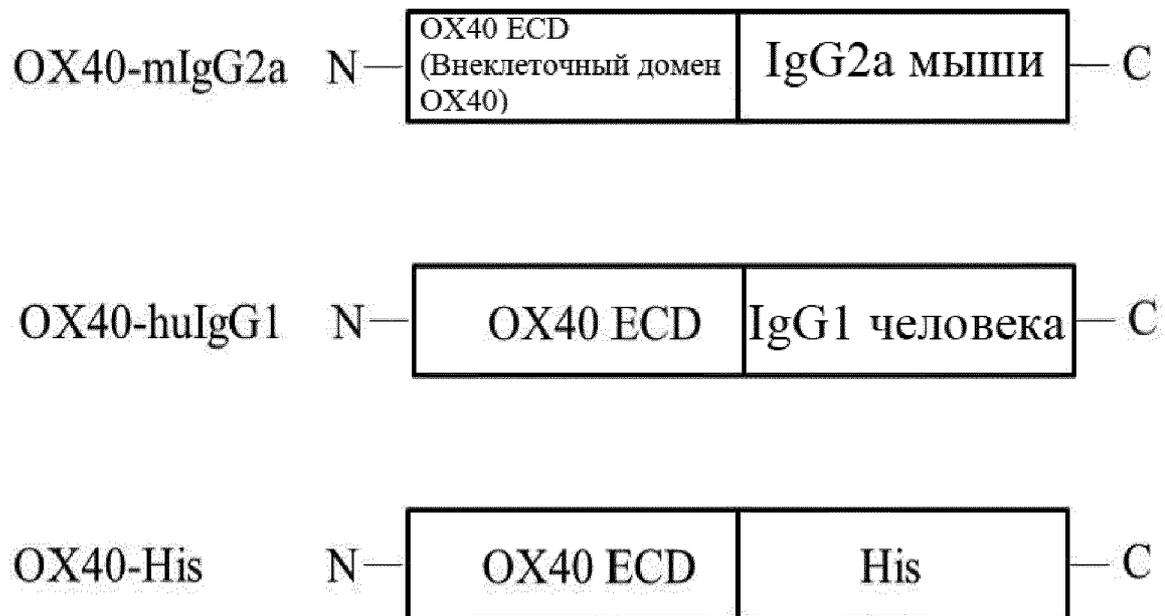
20. Способ по п. 18, в котором Т-клетки обладают повышенной секрецией цитокина, пролиферацией или цитолитической активностью.

21. Способ по любому из пп. 18-20, где Т-клетки представляют собой CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

22. Способ по любому из пп. 11-21, в котором введение приводит к устойчивому иммунному ответу у субъекта после прекращения лечения.

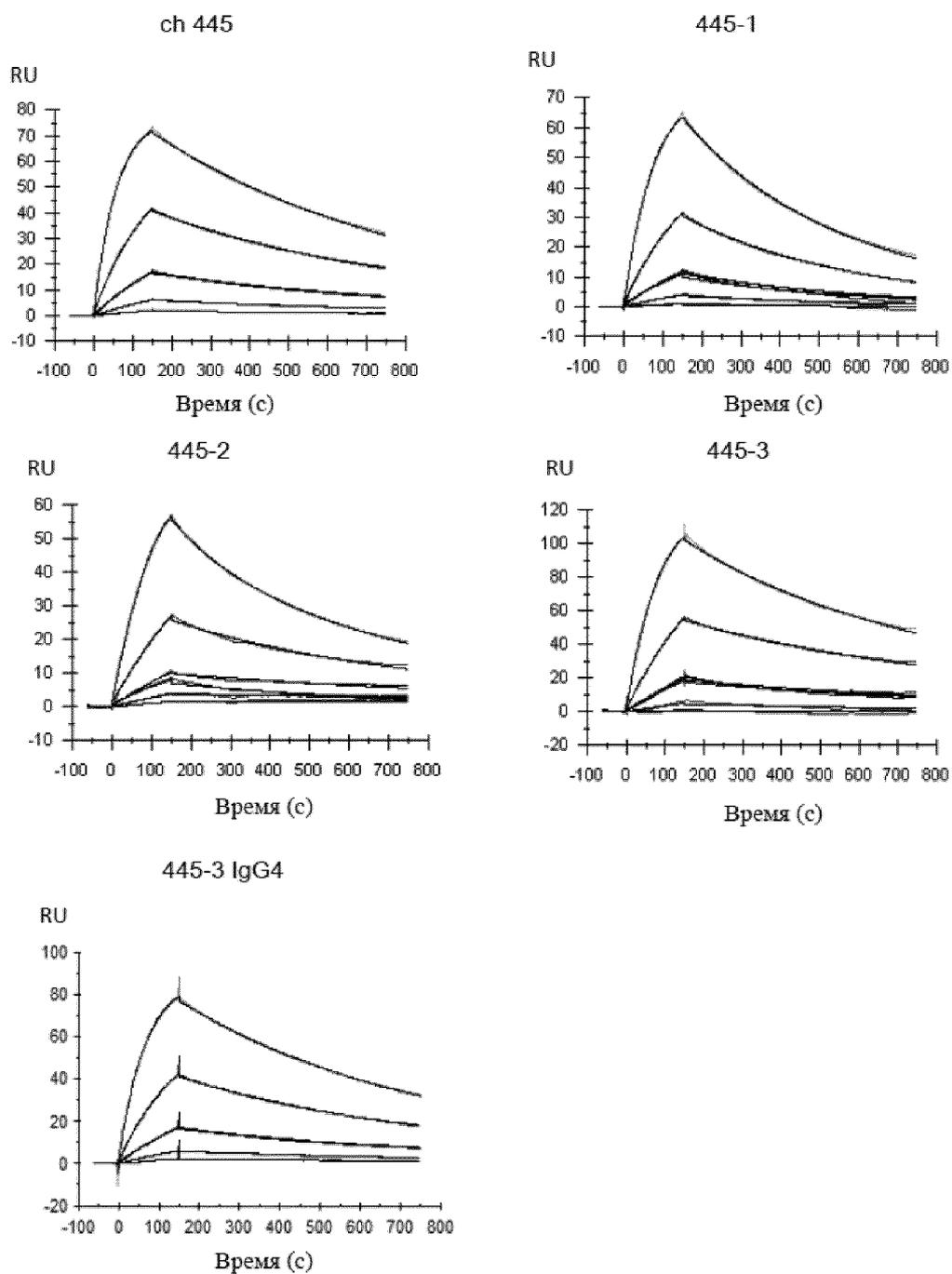
Фигура 1

1/18



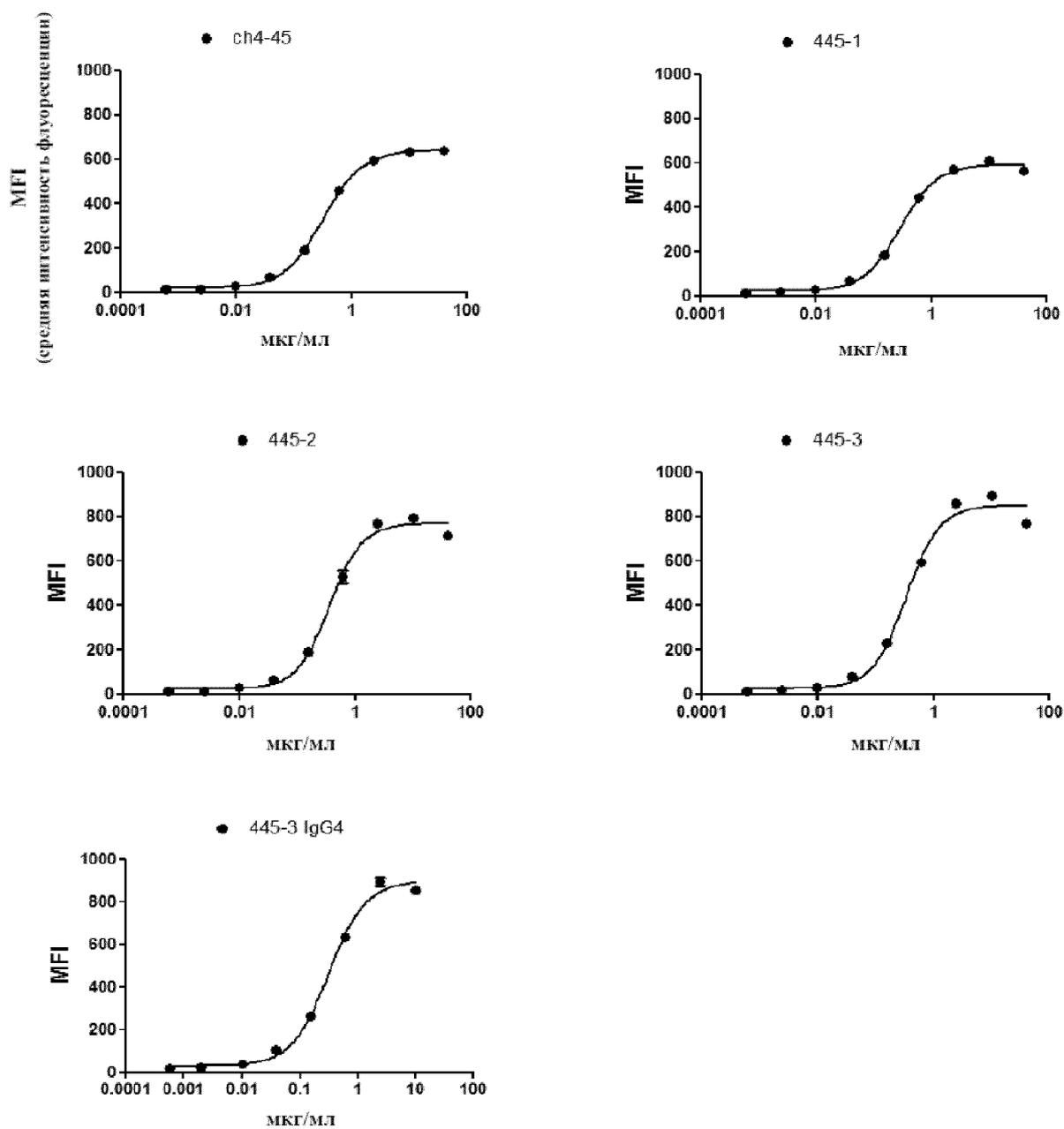
Фигура 2

2/18



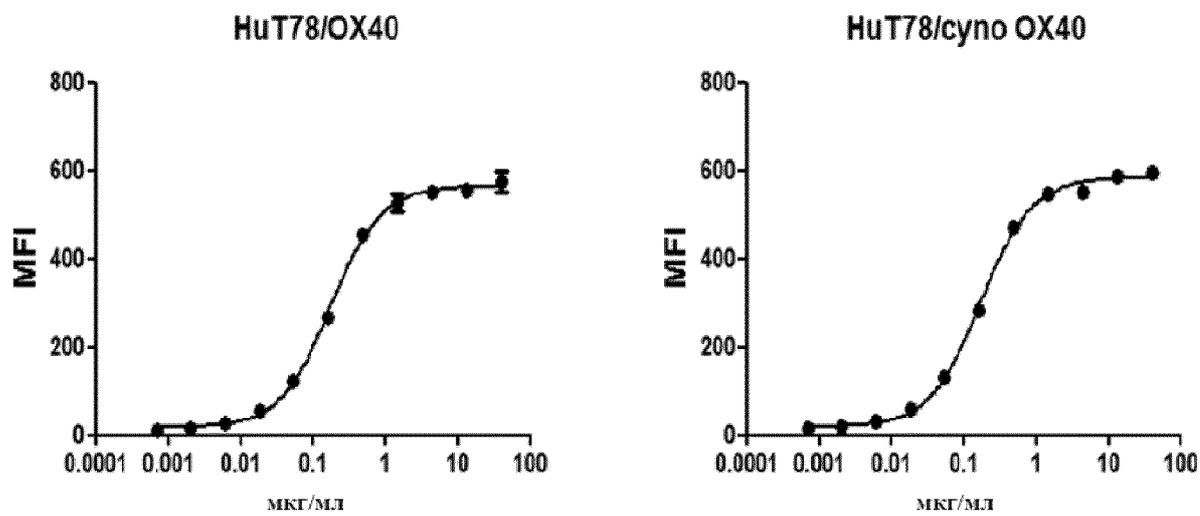
Фигура 3

3/18



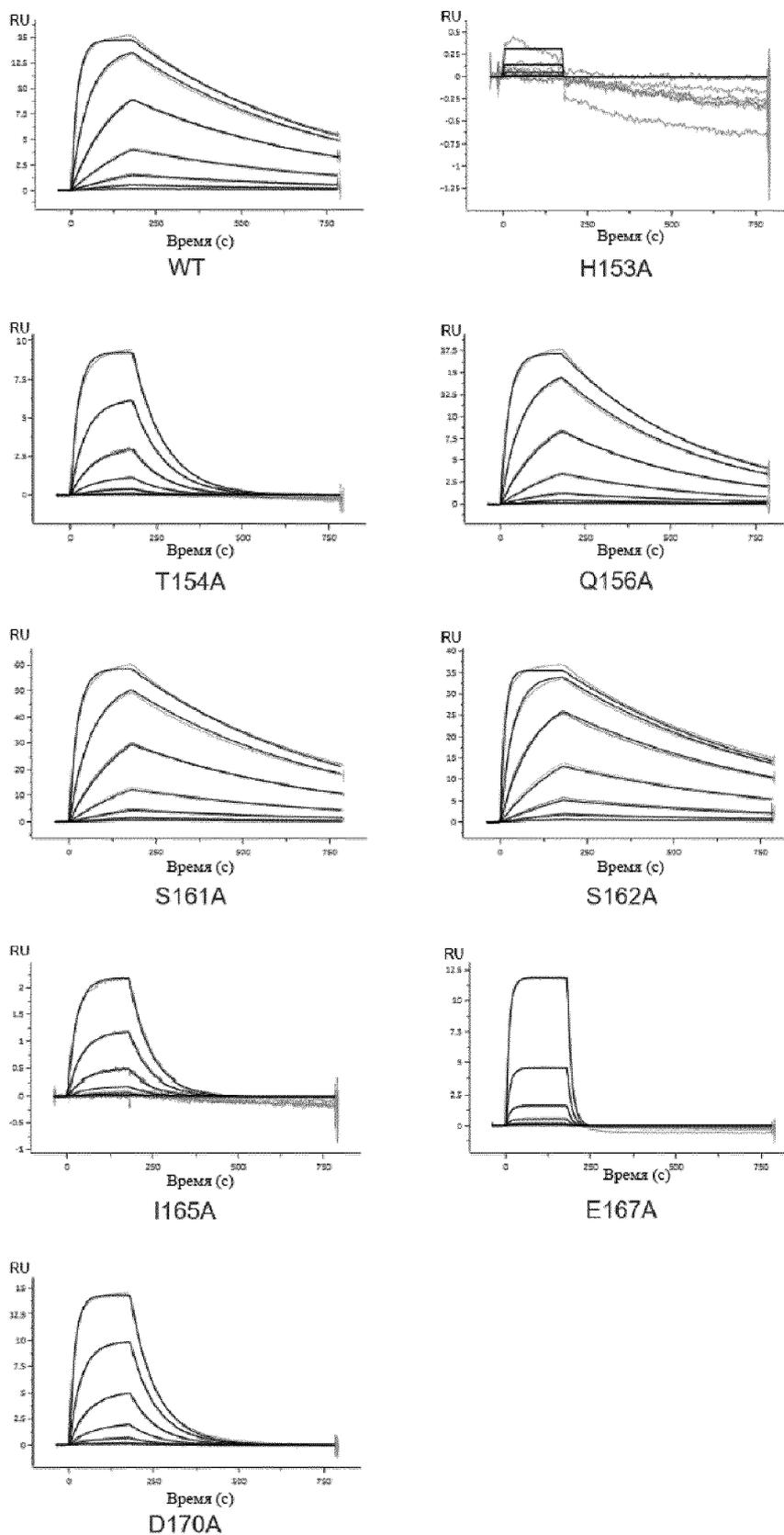
Фигура 4

4/18



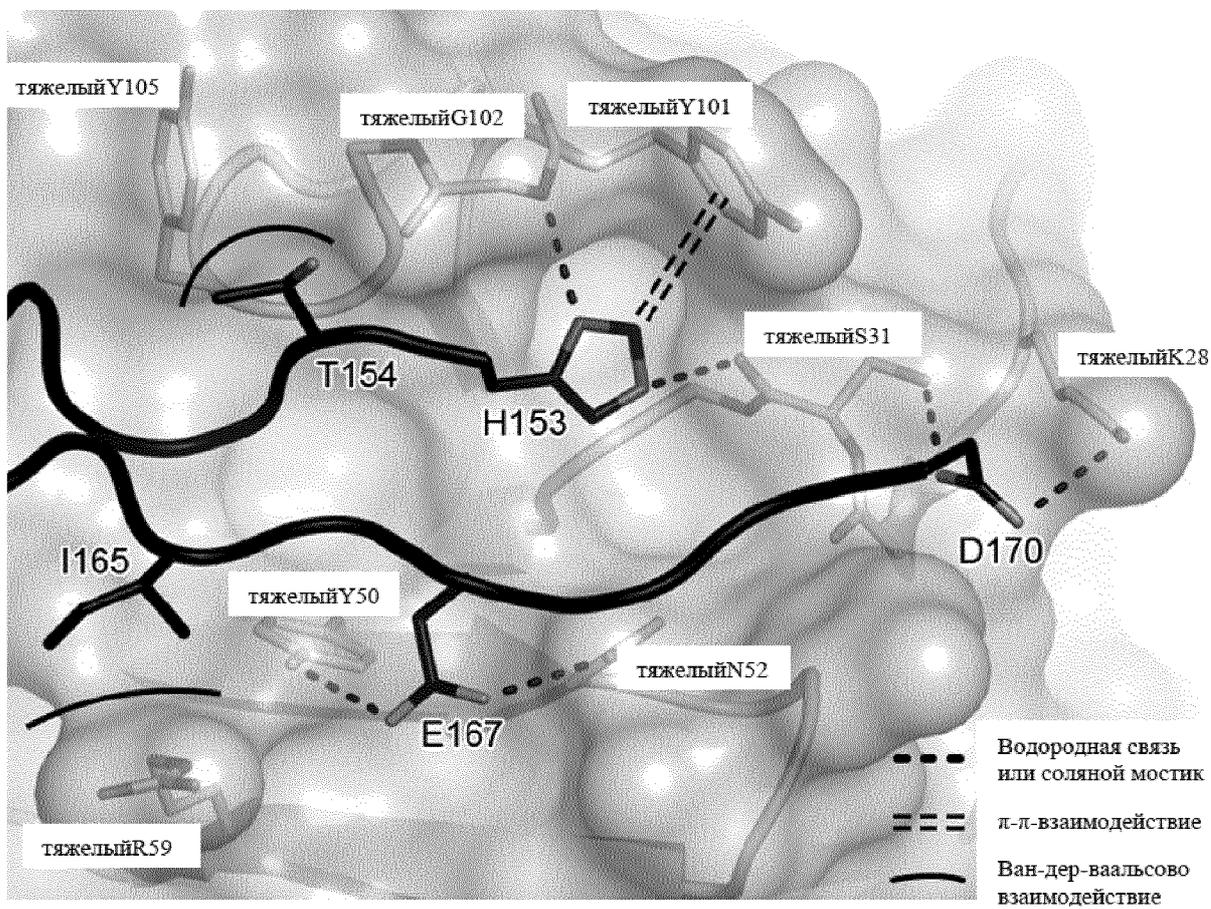
Фигура 5

5/18



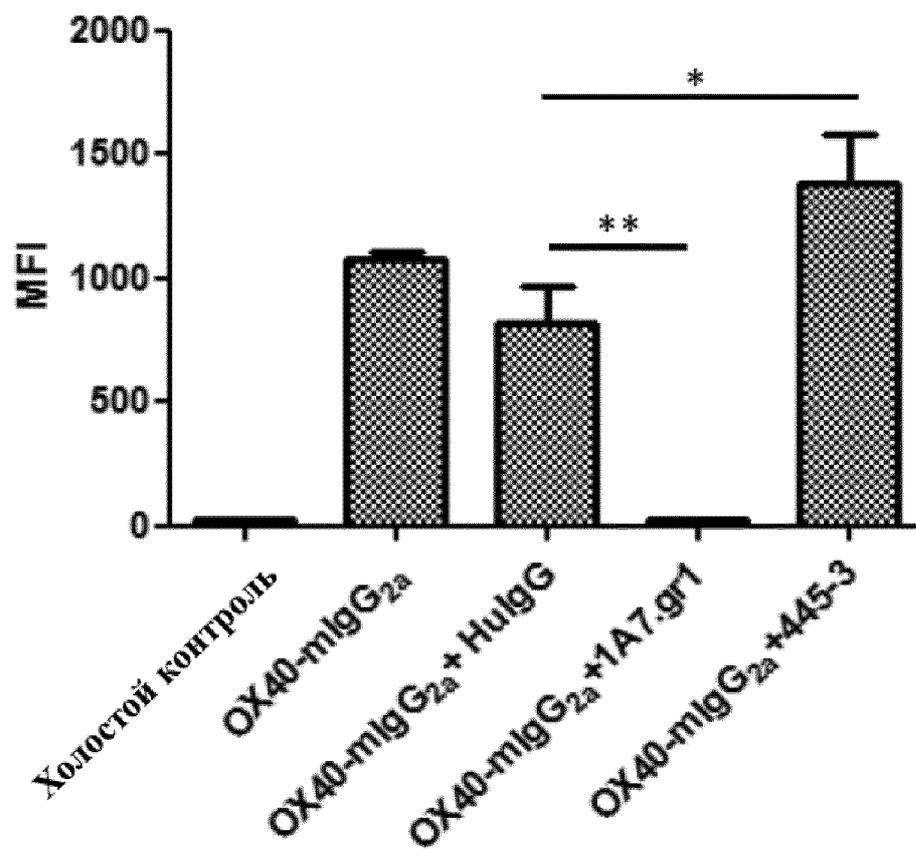
Фигура 6

6/18



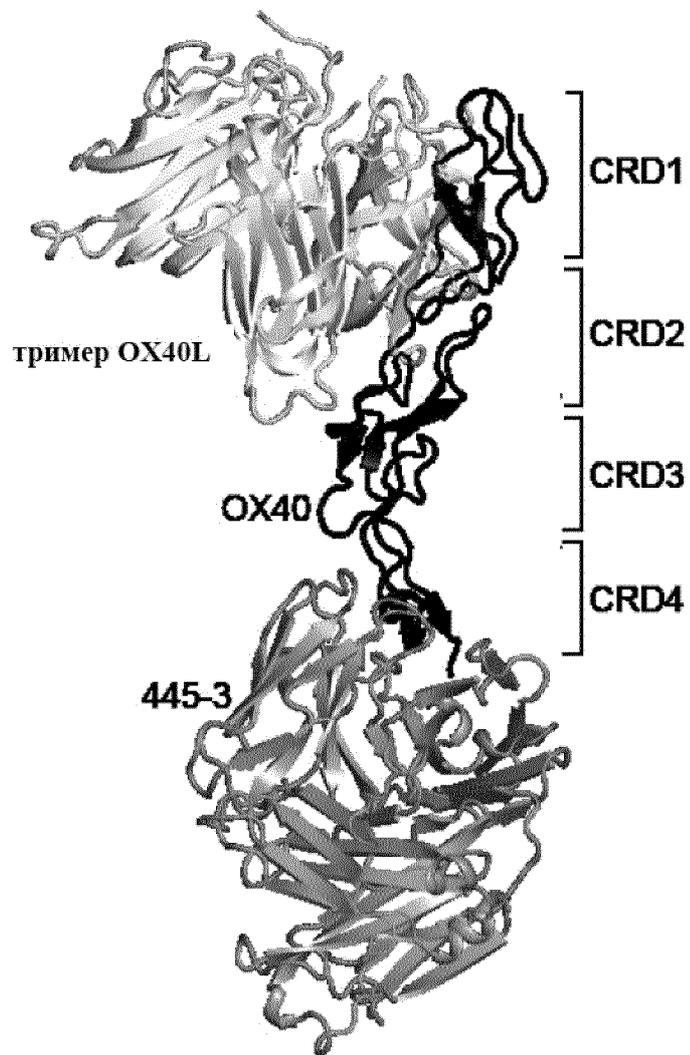
Фигура 7

7/18



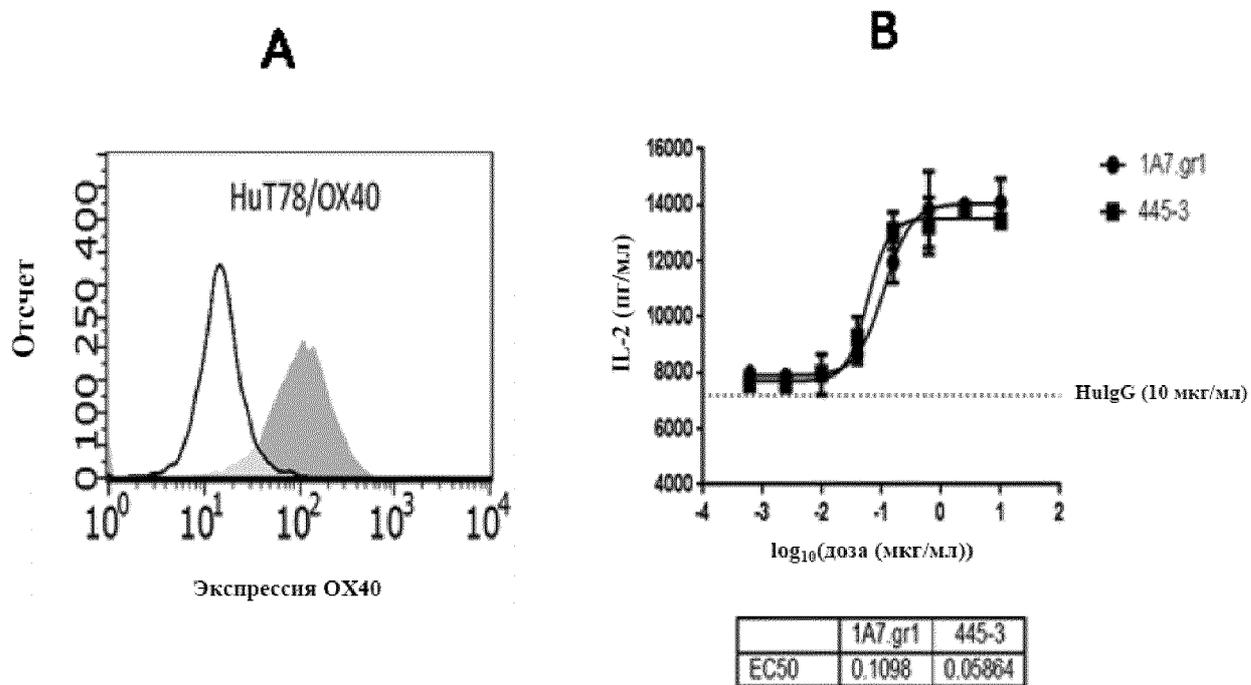
Фигура 8

8/18



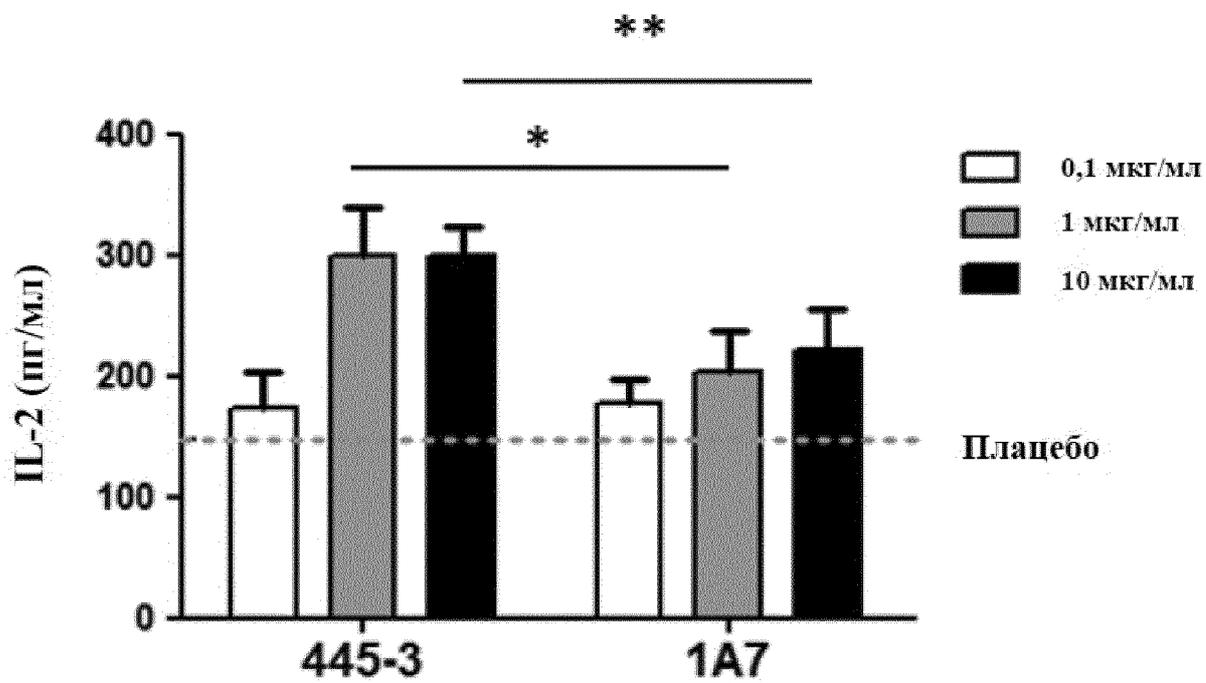
Фигура 9

9/18



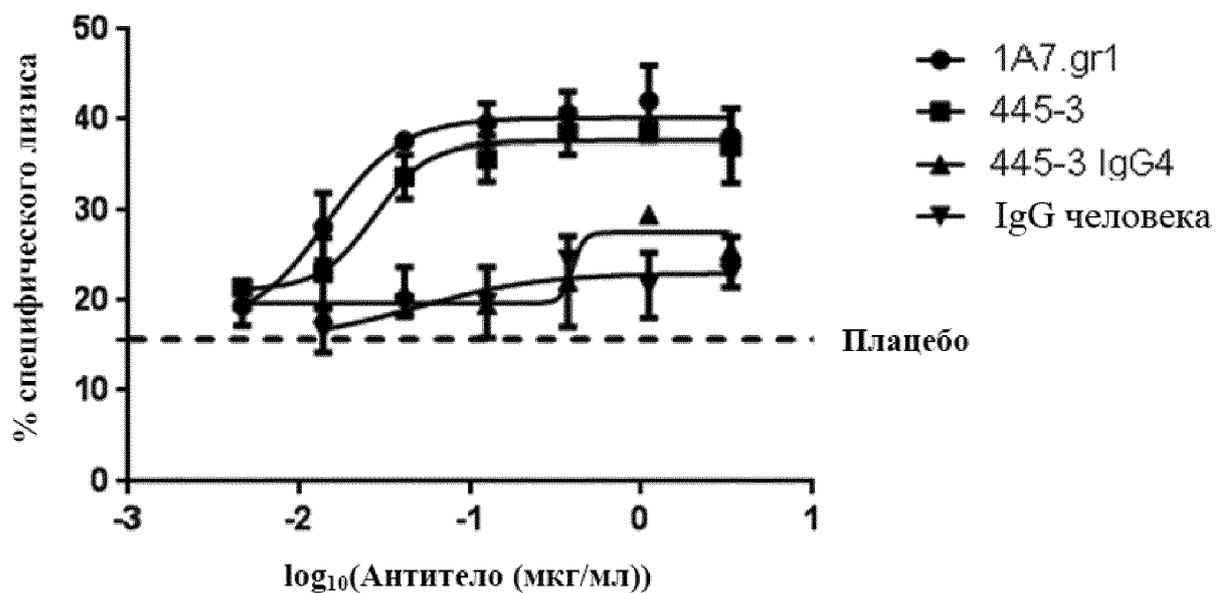
Фигура 10

10/18



Фигура 11

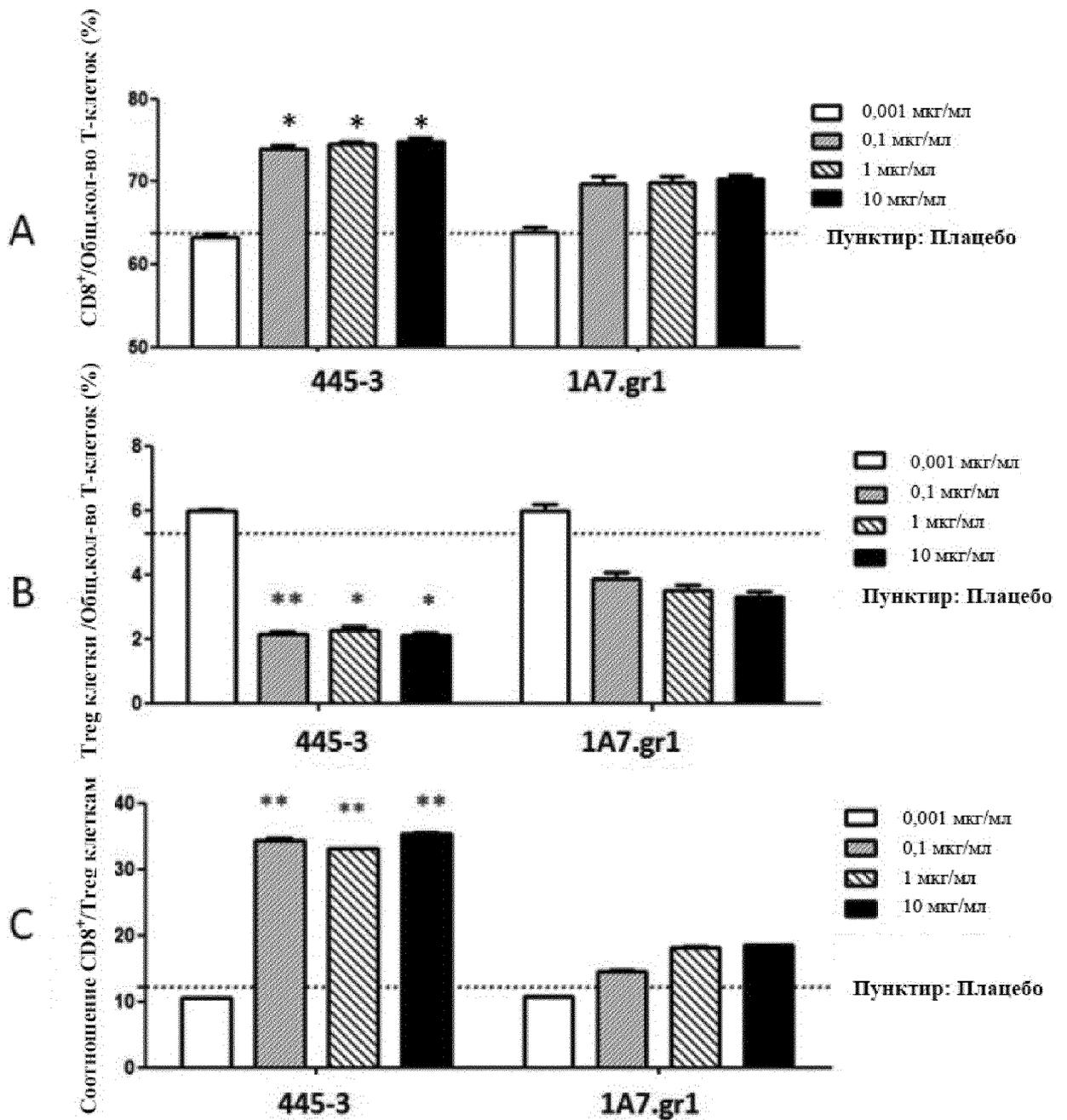
11/18



	1A7.gr1	445-3
EC50	0.01441	0.02754

Фигура 12

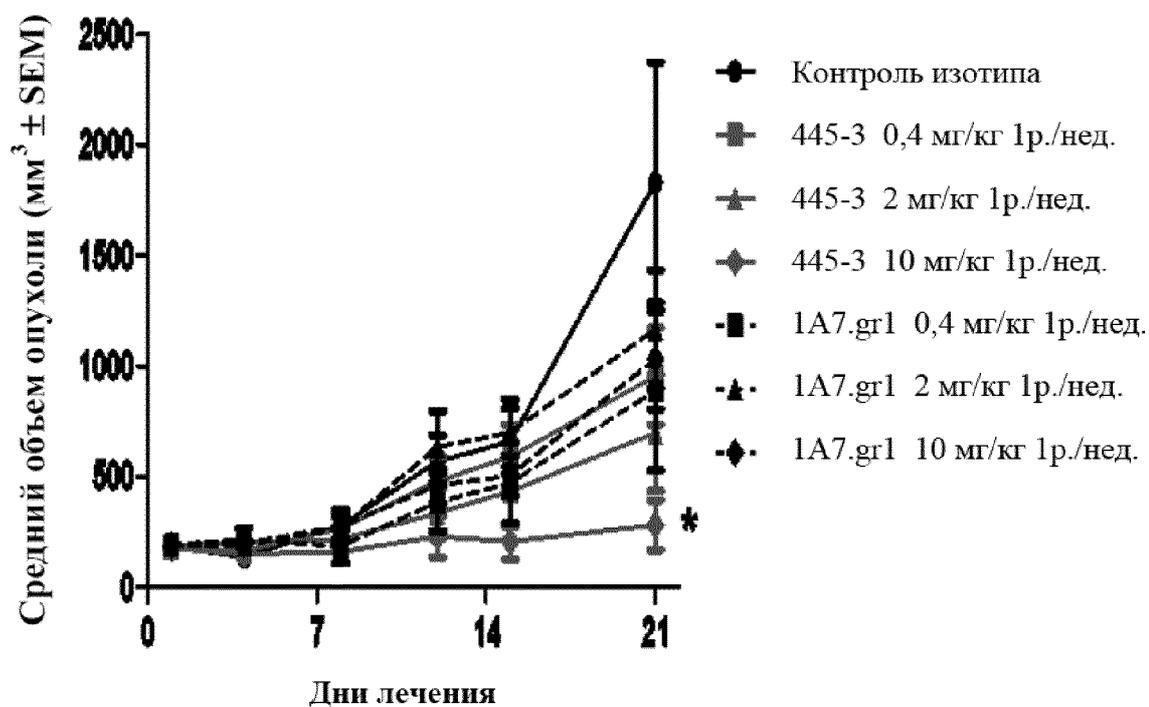
12/18

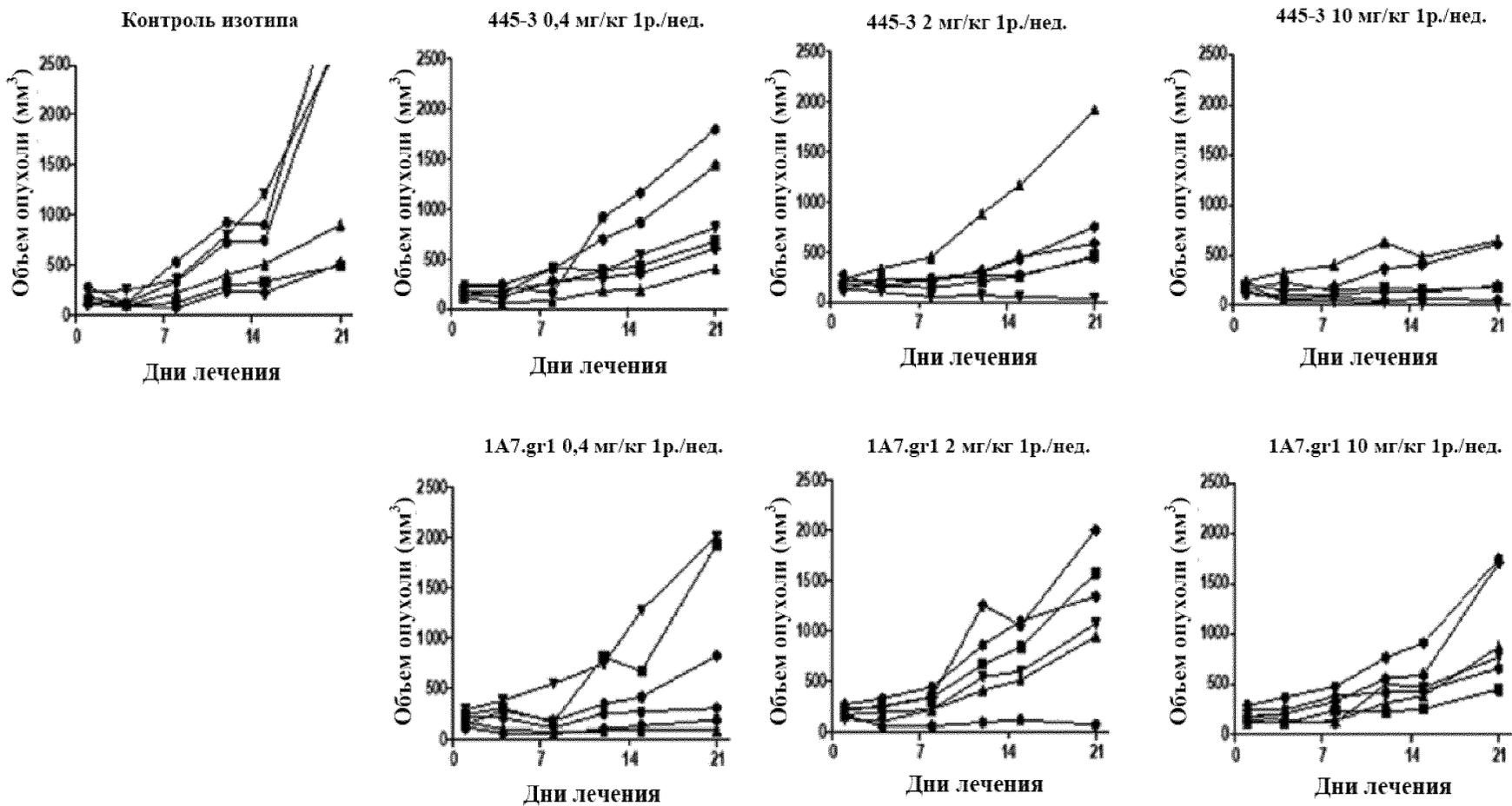


Фигура 13А

13/18

Рост опухоли





Фигура 13В
14/18

Фигура 14А
15/18

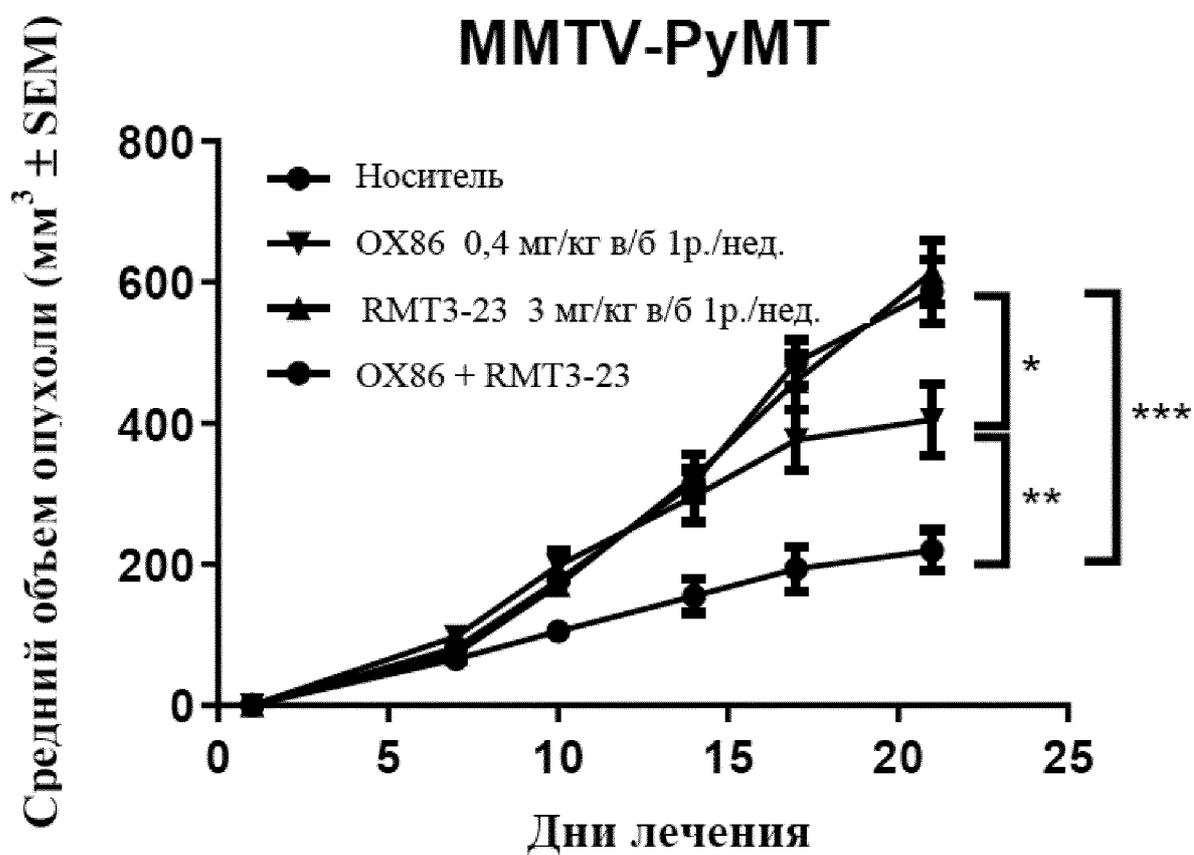
Тяжелая цепь		Легкая цепь		Совместная трансфекция с тяжелой цепью и легкой цепью	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Антитело ID	EC ₅₀ (нг/мл)	Лучшая (MFI)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (с ⁻¹)	K _D (M)
445-1VH	-	445-1VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.89E-03	1.64E-08
445-1VH-M48I	FR2	445-1VL	-	445-2(M48I)-1 (445-1 с мутацией M48I на VH)	353	480	2.30E+05	3.56E-03	1.55E-08
445-1VH	-	445-1VL-S24G	CDR1	445-2(S24G) (445-1 с мутацией S24G на VL)	307	470	2.22E+05	3.60E-03	1.62E-08
445-1VH	-	445-1VL-S10T/E81D/D70E	FR1/FR3	445-2(S10T/E81D/D70E) (445-1 с мутациями S10T, E81D и D70E на VL)	280	510	2.28E+05	3.40E-03	1.49E-08

Фигура 14В
16/18

Тяжелая цепь		Легкая цепь		Совместная трансфекция с тяжелой цепью и легкой цепью	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Антитело ID	EC ₅₀ (нг/мл)	Лучшая (MFI)	ка (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	K _D (M)
445-2VH	-	445-2VL	-	445-2	397	760	2.06E+05	2.64E-03	1.28E-08
445-2VH-Q62E-Q65K	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E/Q65K)-3(S24R) (445-2 с мутациями Q62E и Q65K на VH и мутацией S24R на VL)	318	790	1.87E+05	2.32E-03	1.24E-08
445-2VH-Q62E	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Q62E)-3(S24R) (445-2 с мутацией Q62E на VH и мутацией S24R на VL)	363	760	1.94E+05	2.27E-03	1.17E-08
445-2VH-K28T	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(K28T)-3(S24R) (445-2 с мутацией K28T на VH и мутацией S24R на VL)	660	750	4.44E+05	5.74E-03	1.29E-08
445-2VH-Y27G	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(Y27G)-3(S24R) (445-2 с мутацией Y27G на VH и мутацией S24R на VL)	755	630	6.25E+04	1.35E-03	2.15E-08
445-2VH-T30S	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-3(T30S)-3(S24R) (445-2 с мутацией T30S на VH и мутацией S24R на VL)	405	800	2.91E+05	3.81E-03	1.31E-08
445-3VH	-	445-3VL	-	445-3	462	990	1.74E+05	1.48E-03	8.51E-09
445-2VH-A61N-K28R	CDR2/FR1	445-3VL	-	445-3(A61N-K28R)-3 (445-2 VH с мутациями A61N и K28R и 445-3 VL)	369	1080	1.57E+05	1.15E-03	7.35E-09
445-2VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N-K63R)-3 (445-2 VH с мутациями A61N и K63R и 445-3 VL)	483	1100	1.61E+05	1.55E-03	9.65E-09
445-3VH	-	445-2VL-G41D-K42G-S24R-K93R	FR2/CDR1/CDR3	445-3-3(G41D-K42G-S24R-K93R) (445-3 VH и 445-2 VL с мутациями G41D, K42G, S24R и K93R)	337	1050	2.12E+05	1.68E-03	7.90E-09

Фигура 15

17/18



Фигура 16

18/18

Рак почки