

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292549** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.28

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.16

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛО К ОХ40 И ВАРИАНТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 202010304381.8

(32) 2020.04.17

(33) CN

(86) PCT/CN2021/087617

(87) WO 2021/209020 2021.10.21

(71) Заявитель:  
**ХАГЧИСОН МЕДИФАРМА  
ЛИМИТЕД (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ян Ичжэнь, Цай Юй, Ли Сён, Чжоу  
Лэй, Цин Вэйго, Су Вэй-Го (CN)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Согласно настоящему изобретению предложено антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент, способ их получения и применение для лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний.

**A1**

**202292549**

**202292549**

**A1**

## АНТИТЕЛО К OX40 И ВАРИАНТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая заявка основана на и испрашивает приоритет по заявке

- 5 CN 202010304381.8, которая подана 17 апреля 2020 г. и содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки для всех целей.

### **Область техники**

- 10 Настоящее изобретение относится к антителу и, в частности, антителу к OX40 и антигенсвязывающему фрагменту указанного антитела, а также способу получения указанного антитела и применению указанного антитела для лечения или предотвращения связанных с OX40 заболеваний или состояний.

### **Уровень техники**

- 15 OX40 (также называемый CD134, TNFRSF4 и ACT35) является членом суперсемейства факторов некроза опухолей, который в основном экспрессируется на поверхности активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, CD8<sup>+</sup> Т-клеток и регуляторных Т-клеток, а также на поверхности клеток естественных киллеров (NK-клеток). В активированных Т-клетках костимулирующий сигнал, опосредуемый OX40L-OX40, может стимулировать продукцию
- 20 и секрецию цитокинов хелперными Т-клетками, стимулировать высвобождение гранзима и перфорина эффекторными Т-клетками и вызывать пролиферацию эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти. В то же время сигнал OX40L-OX40 также может ингибировать дифференцировку и активность регуляторных Т-клеток и снижать иммуносупрессорную функцию регуляторных Т-клеток, что дополнительно усиливает иммунные реакции.
- 25 Важная роль OX40 в Т-клеточном иммунном ответе делает агонисты OX40 важным кандидатом для иммунотерапии опухоли, в то время как ингибиторы OX40 потенциально можно применять при воспалении, аллергических заболеваниях и аутоиммунных заболеваниях.

- В последние годы, при широком применении методик получения моноклональных
- 30 антител, появились моноклональные антитела, которые специфично связываются с OX40, включая две категории, т.е. агонистов OX40 и ингибиторов OX40. В физиологических условиях OX40 активирует соответствующие сигнальные пути в клетках путем связывания со своим лигандом OX40L и тримеризации. Таким образом, агонистические моноклональные антитела к OX40 всегда нуждаются в перекрестном связывании для
- 35 функционирования в качестве агонистического антитела. В условиях *in vitro* и *in vivo*

перекрестное связывание антитела может быть достигнуто либо путем нанесения покрытия на твердую поверхность, либо с помощью рецепторов Fc, соответственно. Рецепторы Fc представляют собой семейство белковых рецепторов, которые специфично связываются с фрагментом Fc антитела. В частности, рецепторы Fc $\gamma$  могут специфично связываться с IgG и осуществлять функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). Рецепторы Fc $\gamma$  в основном включают Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB и т. д., которые экспрессируются на поверхности различных клеток крови, включая В-лимфоциты, дендритные клетки, клетки естественные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофильные гранулоциты, базофильные гранулоциты, тучные клетки, тромбоциты и т. д. В физиологических условиях рецепторы Fc $\gamma$  могут одновременно связываться с фрагментами Fc одной или более молекул IgG и обеспечивать перекрестное связывание молекул IgG, активируя при этом опосредуемые рецепторами функции. Агонистические антитела к OX40 могут активировать молекулы OX40 путем связывания с рецепторами Fc $\gamma$  и перекрестного связывания. Антагонистические антитела к OX40 могут блокировать связывание OX40L с OX40, предотвращать тримеризацию OX40, что ингибирует активацию Т-клеток, индуцированную активацией OX40, и связанные воспалительные ответы.

Опухолевые клетки могут ускользать от распознавания и атаки иммунной системы посредством множества механизмов для достижения иммунного ускользания, выживаемости в организме и чрезмерной пролиферации. Важным механизмом, который опосредует ускользание опухоли от иммунного надзора, являются костимулирующие молекулы, называемые иммунными контрольными точками, которые экспрессируются на высоких уровнях в иммунных клетках или опухолевых клетках в микроокружении опухоли. Иммунные контрольные точки могут быть разделены на основании их функций на ингибирующие иммунные контрольные точки, представленные PD-1, PD-L1, CTLA-4 и т. д.; и активирующие иммунные контрольные точки, представленные OX40 и 4-1BB. В случае ингибирующих иммунных контрольных точек можно применять лекарственные средства, такие как антитела, для блокирования их ингибирующей функции, что сходно с высвобождением тормозов на иммунных клетках, позволяя иммунным клеткам играть свою роль в уничтожении опухолевых клеток. Иммунотерапия опухоли, представленная PD-1, PD-L1 и CTLA-4, становится очень важным способом лечения и показывает перспективные результаты в клинических приложениях. Применение агонистов для активации агонистических иммунных контрольных точек, что аналогично нажатию на педаль газа после высвобождения тормоза, дополнительно повышает активность иммунных клеток, делая клетки более эффективными в уничтожении опухолевых клеток и, в конечном итоге,

обеспечивая более эффективные терапевтические эффекты в отношении более широкого спектра опухолей.

В недавних исследованиях было обнаружено, что различные инфильтрирующие опухоль Т-клетки экспрессируют OX40, и что пациенты с OX40-положительными опухольями имеют относительно более длительное время выживаемости, это позволяет предположить, что OX40 играет некоторую роль в противоопухолевом иммунитете. Во многих доклинических моделях на животных активация OX40 приводила к стимуляции пролиферации Т-клеток, усилению функции эффекторных Т-клеток и ингибированию функции регуляторных Т-клеток. В клиническом исследовании с использованием агониста OX40 (9B12) для лечения пациентов с метастатическими солидными опухолями было обнаружено, что иммунные функции улучшились у пациентов, имеющих рак, с регрессией по меньшей мере одного метастатического поражения у 12 из 30 пациентов, и что антитело к OX40 хорошо переносилось у пациентов, получавших лечение. В настоящее время агонистические моноклональные антитела к OX40 (например, MOXR0916, PF-04518600, BMS 986178, GSK3174998, MEDI0562, MEDI6469 и MEDI6383) оцениваются в нескольких клинических исследованиях либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с другими иммуномодулирующими агентами.

Аутоиммунные заболевания являются еще одной первостепенной медицинской проблемой, с которой сегодня сталкиваются люди, и ожидается, что ингибиторы OX40 станут потенциальным средством лечения аутоиммунных заболеваний. В доклиническом исследовании было показано, что мыши с дефицитом OX40 или OX40L проявляют значительно уменьшенную функцию клеток Th2 в моделях аллергической астмы на мышях. Ингибиторы OX40 могут облегчать симптомы, связанные с подавлением функции Т-клеток, в модели астмы на мышях. Сходные результаты наблюдали в исследованиях на обезьянах *in vivo*. Кроме того, иммуносупрессия и облегчение симптомов после блокирования сигнального пути OX40-OX40L также наблюдаются в других классических моделях воспаления и аутоиммунных заболеваний, включая такие модели как модель экспериментального аллергического энцефаломиелита (EAE), модель ревматоидного артрита (RA), а также модель колита, модель болезни «трансплантат против хозяина», модель диабета I типа, в которой CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетки играют ключевую роль. Текущие клинические исследования обеспечили предварительные результаты в отношении антагонистических антител к OX40. GRB830 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 человека, разработанное Glenmark Pharmaceuticals Inc., которое блокирует связывание OX40 с OX40L путем связывания со вторым богатым цистеином доменом OX40, что ингибирует активацию Т-клеток, вызванную OX40L.

GBR830 продемонстрировало положительные результаты в продолжающемся клиническом исследовании атопического дерматита умеренной и тяжелой степени тяжести (Phage Па, NCT 02683928). Кроме того, антагонистическое моноклональное антитело к OX40 КНК4083, разработанное японской компанией Kyowa Hakko, показало хорошую переносимость и эффективность в клиническом исследовании I фазы при атопическом дерматите, и клиническое исследование II фазы (NCT 03703102) при атопическом дерматите умеренной и тяжелой степени тяжести было начато в октябре 2018 года.

До настоящего времени не было одобрено ни одного антитела к OX40 с однозначной эффективностью для лечения какого-либо заболевания человека. Большое значение имеет дальнейшая разработка таких лекарственных средств для удовлетворения огромных клинических потребностей.

### **Краткое описание изобретения**

Согласно настоящему изобретению предложено антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент и способы их получения и применения, включая способ лечения связанных с OX40 заболеваний или состояний.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех HCDR (определяющих комплементарность участков тяжелой цепи), выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), причем указанная последовательность аминокислот VH представляет собой SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех LCDR (определяющих комплементарность участков легкой цепи), выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи (VL), причем указанная последовательность аминокислот VL представляет собой SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат три CDR варибельной области тяжелой цепи (VH), т.е. HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три CDR варибельной области легкой цепи (VL), т.е. LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанная последовательность аминокислот VH представляет собой SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, и указанная последовательность аминокислот VL представляет собой SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат

три CDR вариабельной области тяжелой цепи (VH), т.е. HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и три CDR вариабельной области легкой цепи (VL), т.е. LCDR1, LCDR2 и LCDR3; причем указанные VH и VL выбраны из:

5 (1) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6;

(2) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 9;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 9; или

10 (4) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 8.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR), HCDR1, HCDR2 и  
15 HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR), LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот  
25 SEQ ID NO: 16.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR), HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR), LCDR1,  
30 LCDR2 и LCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13, указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот





причем указанная VH содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 8.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению представляет собой мышинное антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое представляет собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело (такое как VHH), Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')<sub>2</sub>, одноцепочечное антитело (такое как scFv), Fv, dAb (доменное антитело) или би/мульти-специфичное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит область Fc. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность аминокислот области Fc идентична последовательности области Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека, или представляет собой ее вариант.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержит варианта области Fc, который представляет собой IgG1 N297A человека. Согласно одному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (1) от одного до трех HCDR, выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), причем указанная последовательность аминокислот VH представляет собой SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5; и/или (2) от одного до трех LCDR, выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (VL), причем указанная последовательность аминокислот VL представляет собой SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10. Согласно другому варианту реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (1) от одного до трех определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR), выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13; и (2) от одного до трех определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR), выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 16.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено агонистическое антитело к ОХ40, содержащее CDR антитела согласно настоящему изобретению и область Fc, связывающуюся с FcγR. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность аминокислот области Fc агонистического антитела к ОХ40 идентична последовательности аминокислот области Fc IgG1 или IgG2 человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антагонистическое антитело к ОХ40, содержащее CDR антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическое антитело к ОХ40 содержит вариант области Fc, причем указанный вариант снижает или устраняет связывание области Fc с FcγR. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическое антитело к ОХ40 содержит вариант области Fc, причем указанный вариант представляет собой IgG1 N297A человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует любое из антител или их фрагментов согласно настоящему изобретению, причем предпочтительно указанная нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь или легкую цепь, или переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор или вектор экспрессии, содержащий одну или более нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, причем указанный вектор подходит для рекомбинантной продукции любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации вектор представляет собой вектор экспрессии.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая одну или более нуклеиновых кислот, или рекомбинантных векторов, или векторов экспрессии согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен иммуноконъюгат или иммунная слитая молекула, содержащая антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина согласно настоящему изобретению и необязательно содержащая по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как фармацевтический носитель или фармацевтическое вспомогательное вещество.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложено применение антитела к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы согласно настоящему изобретению в получении лекарственных средств для лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложено применение агонистического антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению в получении лекарственных средств для лечения разных видов рака.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложено применение антагонистического антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению в получении лекарственных средств для лечения воспаления и/или аутоиммунных заболеваний.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения связанного с ОХ40 заболевания или состояния, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы, или содержащей их фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации связанное с ОХ40 заболевание или состояние представляет собой воспаление и/или аутоиммунное заболевание, такое как болезнь «трансплантат против хозяина». Согласно некоторым вариантам реализации связанное с ОХ40 заболевание или состояние представляет собой разные виды рака, например, меланому, предпочтительно метастатическую меланому.

Антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению также можно комбинировать с другими терапевтическими агентами или процедурами для лечения или предотвращения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложен способ детектирования ОХ40 в образце, используя антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению. Способ можно применять для диагностики/детектирования связанных с ОХ40 заболеваний или состояний.

В объем настоящего изобретения также входят любые комбинации любых вариантов реализации, описанных в настоящей заявке. Любые варианты реализации или любые их комбинации, описанные в настоящей заявке, применимы к любому и ко всем антителам к ОХ40 или фрагментам, способам и вариантам их применения согласно настоящему изобретению, описанным в настоящей заявке.

35

### **Краткое описание чертежей**

На Фигуре 1 показано, что антитело Hu38E11-IgG2 усиливает секрецию IFN- $\gamma$  Т-клетками человека, активированными антителом к CD3.

На Фигуре 2 показана способность антитела Hu38E11 (IgG1 N297A) блокировать связывание OX40 с OX40L, детектированная с помощью ИФА.

На Фигуре 3 показан блокирующий эффект антитела Hu38E11 (IgG1 N297A) на активацию Т-клеток под действием OX40L, детектированный с помощью ИФА.

На Фигуре 4 показана антагонистическая активность антитела Hu38E11 (IgG1 N297A) и агонистическая активность антитела Hu38E11, измеренная с помощью анализа репортерного гена люциферазы.

На Фигуре 5 показан эффект антитела Hu38E11 (IgG1 N297A) на индуцированную мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) человека болезнь «трансплантат против хозяина».

### **15 Подробное описание изобретения**

Согласно настоящему изобретению предложено антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие уникальную последовательность CDR и обладающие высокой аффинностью и специфичностью связывания с OX40 человека. Антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно применять по отдельности или в комбинации с другими видами терапии для лечения заболеваний или состояний, таких как разные виды рака, воспаление или аутоиммунные заболевания.

#### **Определения**

Если не указано иное, настоящее изобретение будет осуществлено, применяя обычные методики в молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в рамках навыков в данной области техники.

Для лучшего понимания настоящего изобретения определения некоторых научных и технических терминов приведены далее. Если в настоящей заявке в прямой форме не приведено иное определение, все научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимают обычные специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Касательно определений и терминологии в данной области техники специалисты могут обратиться к Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). Аббревиатуры аминокислотных остатков представляют

собой стандартные 3-буквенные и/или 1-буквенные коды, используемые для любой из 20 L-аминокислот, обычно используемых в данной области техники. Формы единственного числа (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке), используемые в настоящей заявке и прилагаемой формуле изобретения, включают формы множественного  
5 числа, если иное явно не указано в контексте.

Термин «приблизительно» означает значение или целое число в пределах приемлемого диапазона ошибок конкретного значения или целого числа, который определит обычный специалист в данной области техники, который отчасти зависит от того, как измеряют или определяют значение или композицию, т.е. от ограничений системы измерения. Например,  
10 «приблизительно» может относиться к нахождению в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения согласно применению в данной области техники. В качестве альтернативы, «приблизительно» может относиться к диапазону до 5%, 10% или 20% (т.е.  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$  или  $\pm 20\%$ ).

При использовании для соединения двух или более необязательных единиц термин  
15 «и/или» следует понимать как означающий любую одну из необязательных единиц или любые две или более из необязательных единиц.

В настоящей заявке термин «содержать» или «включать» означает включение упомянутых элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любых других элементов, целых чисел или этапов. В настоящей заявке термин «содержать» или  
20 «включать», если не указано иное, охватывает «состоящий из» упомянутых элементов, целых чисел или этапов. Например, при упоминании вариабельной области антитела, «содержащей» определенную последовательность, также предполагается, что в объем данного термина входит вариабельная область антитела, состоящая из указанной определенной последовательности.

Термин «OX40» в настоящей заявке относится к трансмембранному гликопротеину I  
25 типа массой приблизительно 50 кДа, который является членом суперсемейства рецепторов факторов некроза опухолей. OX40 также называют ACT35, CD134 или TNFRSF4. В настоящей заявке термин относится к любому природному OX40, происходящему из любого позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), и  
30 грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В объем указанного термина входит «полноразмерный» непроцессированный OX40 и любая форма OX40 или любой его фрагмент вследствие процессинга в клетке. В объем указанного термина также входят встречающиеся в природе варианты OX40, такие как варианты сплайсинга или аллельные варианты. Согласно некоторым вариантам реализации OX40 относится к полноразмерному  
35 OX40 человека или его фрагменту (такому как зрелый фрагмент, в котором нет сигнального

пептида). Согласно некоторым вариантам реализации ОХ40 человека относится к зрелому ОХ40, идентичному последовательности аминокислот, представленной под номером доступа Uniprot № P43489 (аминокислотные остатки 1-28 представляют собой лидерный пептид), или его фрагменту (такому как его внеклеточный домен). Согласно некоторым вариантам реализации в объем указанного термина также входит слитый белок, содержащий ОХ40 или его фрагмент (такой как его внеклеточный домен), такой как слитый белок, содержащий внеклеточный домен ОХ40 человека и область Fc.

Термин «лиганд ОХ40» или «ОХ40L» в контексте настоящей заявки относится к уникальному лиганду ОХ40, также называемому gp34, CD252 или TNFSF4. Лиганд ОХ40 человека идентичен последовательности аминокислот, представленной под номером доступа Uniprot № P23510, или представляет собой ее вариант. ОХ40L естественным образом образует гомотример на поверхности клетки и в основном экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках (АПК), включая активированные В-клетки, зрелые обычные дендритные клетки (ДК), плазмацитоидные дендритные клетки (пДК), макрофаги и клетки Лангерганса, и может экспрессироваться на других типах клеток, таких как НК-клетки, тучные клетки, субпопуляция активированных Т-клеток, а также клетки эндотелия сосудов и клетки гладких мышц.

Термин «аффинность» в контексте настоящей заявки относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящей заявке «аффинность связывания» относится к свойственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y обычно выражается константой диссоциации ( $K_D$ ). Способы определения аффинности связывания известны в данной области техники, включая поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE) или сходные методики (например, ForteBio).

Термины «антагонист ОХ40», «ингибитор ОХ40», «антагонистическое антитело к ОХ40», «антитело-антагонист к ОХ40» и «антагонист ОХ40, представляющий собой антитело» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо. Эти термины включают антитела, способные ингибировать и/или нейтрализовать ОХ40-опосредуемую активность по передаче биологического сигнала. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическое антитело к ОХ40 ингибирует или подавляет путь передачи сигнала, запускаемый ОХ40, и/или ингибирует или снижает ОХ40-опосредуемый клеточный ответ, такой как пролиферация лимфоцитов, экспрессия цитокинов или выживаемость

лимфоцитов, например, путем блокирования связывания OX40 с лигандом OX40 или существенного снижения связывания OX40 с лигандом OX40.

Термины «агонист OX40», «антитело-агонист к OX40», «агонистическое антитело к OX40» и «агонист OX40, представляющий собой антитело» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо. Эти термины включают антитела, способные стимулировать и/или усиливать OX40-опосредуемую активность по передаче биологического сигнала. Согласно некоторым вариантам реализации агонистическое антитело к OX40 способствует или усиливает путь передачи сигнала, запускаемый OX40, и/или способствует или усиливает OX40-опосредуемый клеточный ответ, такой как пролиферация лимфоцитов, экспрессия цитокинов или выживаемость лимфоцитов, например, путем перекрестного связывания и связывания с OX40 и активации OX40-опосредуемого биологического сигнала.

Термин «связанное с OX40 заболевание или состояние» в контексте настоящей заявки относится к нефизиологическому состоянию, связанному с экспрессией или функцией, или активностью OX40, или активностью OX40-опосредуемой передачи сигнала, включая, но не ограничиваясь перечисленными, разные виды рака, воспаление и аутоиммунные заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации при указанных заболеваниях будет польза от блокирования OX40-опосредуемой передачи сигнала. Согласно некоторым вариантам реализации при указанных заболеваниях будет польза от активации OX40-опосредуемой передачи сигнала.

Термины «иммунный ответ» и «иммунная реакция» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитов и гранулоцитов, и растворимых макромолекул, продуцируемых указанными выше клетками или печенью (включая антитела, цитокины и соединения), которое приводит к селективному повреждению, разрушению или устранению инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случае аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека, из организма человека. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическое антитело к OX40 согласно настоящему изобретению ингибирует или снижает иммунную реакцию, например, снижает иммунное отторжение при болезнях «трансплантат против хозяина». Согласно некоторым вариантам реализации агонистическое антитело к OX40 согласно настоящему изобретению усиливает противоопухолевую иммунную реакцию.

Термин «передача сигнала» в контексте настоящей заявки относится к биохимической причинно-следственной связи, которая обычно инициируется белок-белковым

взаимодействием, таким как связывание OX40L (лиганда) с OX40 (рецептором), что приводит к передаче сигнала от одной части клетки в другую часть клетки. Обычно передача включает специфичное фосфорилирование одного или более остатков тирозина, серина или треонина на одном или более белках в серии реакций, что вызывает передачу  
5 сигнала. Предпоследний процесс обычно включает события в ядре, посредством которых вызываются изменения экспрессии генов.

Выражение «усиление функции Т-клеток» или «агонистическая активность в отношении Т-клеток» в контексте настоящей заявки включает индукцию, запуск или стимуляцию обновления эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти и/или поддержание  
10 или усиление и/или индукцию, запуск или стимуляцию биологической функции эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти. Примеры усиления функции Т-клетки включают: по сравнению с такими уровнями до вмешательства, повышенную секрецию гамма-интерферона (INF- $\gamma$ ) из CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток, повышенную секрецию гамма-интерферона (INF- $\gamma$ ) из CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток, повышенную  
15 пролиферацию CD4<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток памяти, повышенную пролиферацию CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и повышенную антигенную чувствительность (например, клиренс). Согласно одному варианту реализации, по сравнению с уровнем до вмешательства, уровень повышается по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 300%, 500% или более. Способ измерения этого усиления  
20 известен обычному специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации агонистическую активность в отношении Т-клеток антитела согласно настоящему изобретению оценивают путем детектирования воспалительного фактора IFN- $\gamma$ , высвобождаемого активированными Т-клетками в присутствии антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации значение ЭК<sub>50</sub>,  
25 которое способствует высвобождению IFN- $\gamma$  Т-клетками, определяют для антитела согласно настоящему изобретению, причем более низкое значение указывает на то, что антитело обладает более высокой агонистической активностью в отношении Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению обладает более высокой агонистической активностью в отношении Т-клеток по сравнению  
30 с референсным агонистическим антителом к OX40 (например, OX40mAb24).

Выражение «снижение функции Т-клеток» или «антагонистическая активность в отношении Т-клеток» в контексте настоящей заявки включает снижение, блокирование или уменьшение обновления эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти и/или снижение, блокирование или уменьшение биологической функции эффекторных Т-клеток или Т-  
35 клеток памяти. Примеры снижения функции Т-клеток включают: по сравнению с такими

уровнями до вмешательства, снижение секреции гамма-интерферона (INF- $\gamma$ ) из CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток, снижение секреции гамма-интерферона (INF- $\gamma$ ) из CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток, снижение пролиферации CD4<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток памяти, снижение пролиферации CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток и  
5 снижение чувствительности к антигену (например, клиренс). Согласно одному варианту реализации, по сравнению с уровнем до вмешательства, уровень уменьшается по меньшей мере на 50% или 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 300%, 500% или более. Способ измерения этого снижения известен обычному специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическую активность в  
10 отношении Т-клеток антитела согласно настоящему изобретению оценивают путем детектирования воспалительного фактора IFN- $\gamma$ , высвобождаемого активированными Т-клетками в присутствии лиганда OX40, OX40L, и антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации значение ИК<sub>50</sub>, которое приводит к блокированию опосредуемого OX40-OX40L высвобождения IFN- $\gamma$  из Т-клеток,  
15 определяют для антитела согласно настоящему изобретению, причем более низкое значение указывает на то, что антитело обладает более высокой антагонистической активностью. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению обладает более высокой антагонистической активностью в отношении Т-клеток по сравнению с референсным антагонистическим антителом к OX40 (например,  
20 GBR830).

Термины «активность» и «биологическая активность» или термины «биологическое свойство» и «биологический признак» в контексте настоящей заявки используются взаимозаменяемо в настоящей заявке и включают, но не ограничиваются перечисленными: аффинность и специфичность в отношении эпитопа/антигена, способность нейтрализовать  
25 или оказывать антагонистическое действие на активность OX40 *in vivo* или *in vitro*, способность усиливать или активировать OX40 *in vivo* или *in vitro*, агонистическую активность в отношении Т-клеток, ИК<sub>50</sub>, которая приводит к блокированию связывания OX40 с OX40L, ИК<sub>50</sub>, которая приводит к блокированию OX40-OX40L-опосредуемой активации Т-клеток, стабильность *in vivo* антитела и иммуногенность антитела. Другие  
30 идентифицируемые биологические свойства или признаки антител, известные в данной области техники, включают, например, перекрестную реактивность (т.е. перекрестную реактивность обычно с гомологами целевых пептидов вида, не являющегося человеком, или с другими белками или тканями), и способность поддерживать высокие уровни экспрессии антител в клетках млекопитающих. Свойства или особенности, упомянутые  
35 выше, можно наблюдать, определить или оценить, применяя методики, хорошо известные

в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными: твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), сортировку клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или анализ методом плазмонного резонанса BIACORE, анализ нейтрализации *in vitro* или *in vivo*, связывание с рецептором, продукцию и/или секрецию цитокинов или факторов роста, передачу сигнала и иммуногистохимию срезов тканей из различных источников (включая людей, приматов или любые другие источники).

Термин «антитело» в контексте настоящей заявки относится к любой форме антитела, обладающей целевой биологической активностью. Таким образом, его используют в наиболее широком смысле, включая, но не ограничиваясь перечисленными, моноклональное антитело (включая полноразмерное моноклональное антитело), поликлональное антитело, мультиспецифичное антитело (такое как биспецифичное антитело), гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, химерное антитело, антитело CrossMab или верблюдолизированное однодоменное антитело.

Термины «целое антитело», «полноразмерное антитело» и «интактное антитело» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке и относятся к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (далее сокращенно называют VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (далее сокращенно называют VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Область VH и область VL можно дополнительно разделить на гипервариабельные участки (называемые определяющими комплементарность участками (CDR)), перемежающиеся с более консервативными участками (называемыми каркасными участками (FR)). «Определяющий комплементарность участок» или «участок CDR» или «CDR» представляет собой участок в вариабельном домене антитела, который гипервариабелен по последовательности и образует петлю с определенной структурой («гипервариабельную петлю») и/или содержит остатки, контактирующие с антигеном («сайты контакта с антигеном»). CDR преимущественно отвечает за связывание с эпитопами. CDR тяжелой цепи и легкой цепи обычно называют CDR1, CDR2 и CDR3, которые пронумерованы последовательно, начиная с N-конца. CDR, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, называют HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, тогда как CDR, расположенные в вариабельном домене легкой цепи антитела называют LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно. Каждая VH или VL состоит из трех CDR и 4 FR, которые расположены в следующем порядке от аминоконца к

карбоксильному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Константные области непосредственно не участвуют в связывании антитела с антигеном, но проявляют множество эффекторных функций.

В данной последовательности аминокислот VH или VL точную границу последовательности аминокислот каждого CDR можно определить, используя любую из различных хорошо известных схем или их комбинацию, включая, например: схему Chothia (Chothia et al., Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987)); схему Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (Университет Бата) и Contact (Университетский колледж Лондона); схему North (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)). Границу CDR антитела к OX40 в настоящем изобретении можно определить в соответствии с любыми схемами или их комбинацией, известными в данной области техники, и личной оценкой.

Легкие цепи антител могут быть отнесены к одному из двух типов (называемых каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ )) на основании последовательности аминокислот их константного домена. Тяжелые цепи антител можно подразделить на 5 основных различных классов в соответствии с аминокислотной последовательностью их константной области тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из этих классов можно дополнительно подразделить на подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

«Антитело в форме IgG» означает, что константная область тяжелой цепи антитела относится к форме IgG. Например, антитело в форме IgG2 означает, что его константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG2.

В объем термина «антигенсвязывающий фрагмент» антитела в контексте настоящей заявки входят фрагменты или производные указанного антитела. Как правило, антигенсвязывающий фрагмент включает по меньшей мере один фрагмент (такой как один или более CDR) антигенсвязывающей области или вариабельной области антитела, и у него сохраняются по меньшей мере некоторые из свойств связывания антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются перечисленными, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, sc-Fv); и нанотела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Когда активность связывания антигена выражена как молярная концентрация, у связывающих фрагментов или производных обычно сохраняется по меньшей мере 10% активности связывания антигена от таковой у антитела, из которого они произошли. Предпочтительно у связывающих фрагментов или производных сохраняется по

меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или более активности связывания антигена от таковой у антитела, из которого они произошли.

Понятно, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать консервативную или неконсервативную замену аминокислоты, которая не изменяет в значительной степени его биологическую активность (называют «консервативным вариантом» или «функционально консервативным вариантом» антитела). Согласно предпочтительному аспекту консервативную замену получают в результате примерных консервативных замен остатков, показанных ниже в Таблице А, и, предпочтительно, предпочтительных консервативных замен остатков аминокислот, показанных в Таблице А.

10 Таблица А

Исходный остаток	Пример замены	Предпочтительная консервативная замена аминокислоты
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сближенных третичной укладкой белка.

15 Термин «выделенное антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящей заявки относится к очищенному состоянию антитела к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, «выделенный» может означать, что указанная молекула по существу свободна от других биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, сахара или другие вещества, такие как обломки клеток и ростовая среда.

Однако специалисту в данной области техники известно, что термин «выделенный» не подразумевает полное отсутствие таких веществ или отсутствие воды, буфера или соли, если только они не присутствуют в количестве, которое существенно препятствует экспериментальному или терапевтическому применению антител, описанных в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет чистоту более 95%, более 96%, более 97%, более 98% или более 99%, согласно определению, например, с помощью электрофореза (например, ЭФ в ПААГ/ДСН, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Обзор способов оценки чистоты антител см., например, в Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87.

Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящей заявки относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие указанную популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного эпитопа. Напротив, обычные препараты (поликлональных) антител обычно включают различные антитела, направленные против различных эпитопов (или специфичные в отношении различных эпитопов). Определение «моноклональное» указывает на признак антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должно толковаться как требующее какого-либо конкретного способа получения указанного антитела.

Термин «химерное антитело» в контексте настоящей заявки относится к антителу, имеющему переменный домен первого антитела и константный домен второго антитела, причем указанное первое антитело и указанное второе антитело происходят из различных видов. Обычно переменный домен получают из антитела экспериментального животного, такого как грызун, в то время как последовательность константного домена получают из антитела человека так, что полученное химерное антитело с меньшей вероятностью индуцирует нежелательный иммунный ответ у субъектов-людей, чем антитело из экспериментального животного.

Термин «гуманизованное антитело» в контексте настоящей заявки относится к форме антитела, содержащей последовательности из антител человека и антител вида, не являющегося человеком (например, мыши, крысы). Обычно гуманизованное антитело содержит по меньшей мере один и обычно два переменных домена, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют таковым из иммуноглобулина вида,

не являющегося человеком, и все или по существу все каркасные (FR) участки соответствуют таковым из иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc), происходящей из иммуноглобулина человека. В некоторых случаях, известных специалисту в данной области техники, можно ввести мутации аминокислот в гуманизированные антитела (например, в переменные домены, каркасные участки и/или константные области (если они присутствуют)), например, чтобы улучшить некоторые свойства антител; такие формы антител все еще входят в объем термина «гуманизированное антитело» согласно настоящему изобретению.

10 Специалисту в данной области техники известно, что антитело может иметь сахарную цепь, обнаруженную в клетках для продукции антитела. Например, при продуцировании у мышей, в клетках мыши или в гибридомах, происходящих из клеток мыши, антитело может содержать мышиную сахарную цепь. В качестве альтернативы, при продуцировании в крысах, в клетках крысы или в гибридомах, происходящих из клеток крысы, антитело  
15 может содержать сахарную цепь из крысы.

Термин «область Fc» в контексте настоящей заявки используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. В объем указанного термина входит область Fc с нативной последовательностью и варианты области Fc. Область Fc с нативной последовательностью охватывает различные встречающиеся в природе последовательности Fc иммуноглобулина, например, различные подтипы Ig и их аллогенные области Fc (Gestur Vidarsson et al., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520). Согласно одному варианту реализации область Fc тяжелой цепи IgG человека распространяется от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако лизин на C-конце (Lys447) области Fc может присутствовать или  
25 может отсутствовать. Если в настоящей заявке не указано иное, аминокислотные остатки в области Fc или константной области пронумерованы в соответствии с системой нумерации ЕС, также называемой индексом ЕС, описанной в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,  
30 MD, 1991.

Термины «вариант области Fc» и «вариантная область Fc» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке и относятся к полипептиду области Fc, содержащему аминокислотную (ые) модификацию(ии) относительно области Fc с нативной последовательностью. Варианты области Fc согласно настоящему изобретению  
35 определены в соответствии с аминокислотными модификациями, которые их составляют.

Таким образом, например, N297A представляет собой вариант области Fc с заменой аспарагина аланином в положении 297 относительно исходного полипептида, где число соответствует индексу ЕС. Например, IgG1 N297A человека относится к варианту области Fc, имеющему последовательность области Fc IgG1 человека с заменой N297A.

5 Модификации могут представлять собой добавление, делецию или замену. Замены могут включать встречающиеся в природе аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислоты. Вариант может содержать неприродные аминокислоты.

Термин «рецептор Fc» или «FcR» в контексте настоящей заявки описывает рецептор, который связывается с областью Fc антитела. Согласно некоторым вариантам реализации FcR представляет собой FcR человека с нативной последовательностью. Согласно некоторым вариантам реализации FcR представляет собой FcγR (гамма-рецептор), включая рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, а также включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. FcγRII включает FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности и отличаются главным образом их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., например, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Для обзора FcR см., например, Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются термином «FcR» в настоящей заявке. Термин «рецептор Fc» или «FcR» также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)), и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. Известны способы измерения связывания FcRn (см., например, Ghetie and Ward., Immunol. Today 18 (12): 592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15 (7): 637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.)). Связывание *in vivo* с FcRn человека и период полужизни в сыворотке полипептида с высокой аффинностью связывания с FcRn человека можно определить, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных линиях клеток человека, экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводят полипептид с вариантной областью Fc. В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или сниженным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al., J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).

Термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному)), фармацевтическому вспомогательному веществу, фармацевтическому носителю или стабилизатору, и т.д., которые вводят с активным веществом.

5 Термин «фармацевтическая композиция» относится к такой композиции, которая находится в форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в ней, и не содержит дополнительных ингредиентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для субъекта, которому вводят указанную композицию.

10 В данной заявке «иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одним или более другими веществами, включая, но не ограничиваясь цитотоксическими агентами или метками. «Иммунная слитая молекула» представляет собой антитело, которое слито путем ковалентного соединения с одним или более другими пептидами или полипептидами.

15 В объем термина «терапевтический агент», описанного в настоящей заявке, входят любые вещества, которые эффективно предотвращают или лечат соответствующие заболевания, такие как разные виды рака.

Термин «цитотоксический агент» в контексте настоящего изобретения относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает  
20 гибель или разрушение клетки.

«Химиотерапевтические агенты» включают химические низкомолекулярные лекарственные средства, которые можно применять при лечении разных видов рака или заболеваний иммунной системы.

Термин «низкомолекулярное лекарственное средство» относится к соединению с  
25 низкой молекулярной массой, которое может регулировать биологические процессы. «Малая молекула» определяется как молекула с молекулярной массой менее 10 кДа, обычно менее 2 кДа и предпочтительно менее 1 кДа. Малые молекулы включают, но не ограничиваются перечисленными, неорганические молекулы, органические молекулы, органические молекулы, содержащие неорганический компонент, молекулы, содержащие  
30 радиоактивный атом, синтетические молекулы, пептидомиметики и миметики антител. В качестве терапевтических агентов малые молекулы способны лучше проникать через клеточные мембраны, чем большие молекулы, менее подвержены деградации и менее вероятно запустят иммунный ответ.

Термин «иммуномодулятор» в контексте настоящей заявки относится к природному  
35 или синтетическому активному агенту или лекарственному средству, которое модулирует

(например, подавляет или усиливает) иммунный ответ. Иммунный ответ может представлять собой гуморальный ответ или клеточный ответ. В некоторых случаях иммуномодулятор включает иммуносупрессор, который ингибирует иммунный ответ, например, иммуносупрессор, который благоприятно ингибирует иммунный ответ при  
5 воспалении и аутоиммунных заболеваниях. В других случаях иммуномодулятор включает активный агент или лекарственное средство, которое усиливает иммунный ответ, например, активный агент или лекарственное средство, которое благоприятно усиливает противораковый иммунный ответ при лечении рака.

Термины «раковый» и «рак» относятся или описывают физиологические расстройства  
10 у млекопитающих, для которых обычно характерен нерегулируемый рост клеток. Это определение включает доброкачественные и злокачественные опухоли и покоящиеся опухоли или микрометастазы. «Рак» включает, но не ограничивается перечисленными, солидные опухоли и гемобласты. Примеры различных видов рака включают, но не ограничиваются перечисленными, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз.

Термины «воспаление и/или аутоиммунные заболевания» предназначены для  
15 широкого охвата любых воспалительных или иммунных состояний (например, патологического воспаления и аутоиммунных заболеваний). «Аутоиммунные заболевания» представляют собой заболевания или состояния, которые вызваны собственными тканями или органами индивидуума и нацелены на них, или совместно сегрегированные нарушения  
20 или их проявления, или состояния, возникающие из них. Аутоиммунные заболевания могут относиться к состояниям, которые вызваны или усугубляются образованием В-клеток, которые продуцируют антитела, реагирующие с нормальными тканями организма и антигенами. Аутоиммунные заболевания также могут представлять собой заболевания, которые включают секрецию аутоантител, специфичных в отношении эпитопов,  
25 происходящих из аутоантигенов (например, ядерных антигенов).

Термин «вектор» в контексте настоящей заявки относится к любым рекомбинантным  
30 полинуклеотидным конструкциям, которые можно применять с целью трансформации (т.е. введения гетерологичной ДНК в клетки-хозяева). Один тип векторов представляет собой «плазмиду», кольцевую петлю двухцепочечной ДНК, в которую можно лигировать дополнительный сегмент ДНК. Другой тип векторов представляет собой вирусный вектор, в котором в вирусный геном может быть лигирован дополнительный сегмент ДНК. Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например,  
35 неэписомные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина после

внедрения в клетку-хозяина, и посредством этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы могут направлять экспрессию генов, которые функционально связаны. Такие векторы называют в настоящей заявке «вектором экспрессии». Вектор экспрессии относится к нуклеиновой кислоте, которая может реплицировать и экспрессировать целевой ген, когда клетка-хозяин трансформирована, трансфицирована или трансдуцирована указанным вектором. Вектор экспрессии содержит один или более фенотипических селективируемых маркеров и точки начала репликации, чтобы гарантировать сохранение вектора и обеспечить амплификацию в хозяине, при необходимости.

10 Термин «субъект», или «пациент», или «индивид» в данной заявке включает любого человека или не являющегося человеком животного. В объем термина «не являющееся человеком животное» включены все позвоночные, такие как млекопитающие и не млекопитающие, такие как отличные от человека приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, куры, амфибии, рептилии, и т.д.

15 Термины «терапевтически эффективное количество», «терапевтически эффективная доза» и «эффективное количество» в настоящей заявке относятся к количеству антитела к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, которое эффективно предотвращает или улучшает симптомы одного или более заболеваний или состояний или развитие заболеваний или состояний, когда его предоставляют клеткам, тканям или субъектам, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими лекарственными средствами. Терапевтически эффективная доза также относится к количеству антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которого достаточно, чтобы привести к улучшению симптомов, такому как количество для лечения, излечения, предотвращения или улучшения соответствующих медицинских состояний или для увеличения скорости лечения, излечения, предотвращения или улучшения таких состояний. Когда активный ингредиент вводят индивидууму отдельно, терапевтически эффективная доза относится только к указанному ингредиенту. При введении в комбинации терапевтически эффективная доза относится к общему количеству активных ингредиентов, вносящих вклад в терапевтические действия, независимо от того, вводят ли их в комбинации, последовательно или одновременно. Эффективное количество терапевтического агента приведет к улучшению диагностических критериев или параметра по меньшей мере на 10%, обычно по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 50%.

В настоящей заявке «лечить» или «осуществлять лечение», или «лечение» включает 1) терапевтические меры, которые излечивают, облегчают и ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или заболевания и/или останавливают прогрессирующее диагностированное патологическое состояние или заболевание, и 2) 5 предупредительные или профилактические меры, которые предотвращают и/или замедляют развитие патологического состояния или заболевания. Таким образом, субъект, получающий лечение, включает индивидуума, который страдал от заболевания, индивидуума, который имеет предрасположенность к заболеванию, и индивидуума, который хочет предотвратить заболевание. Согласно некоторым вариантам реализации 10 настоящее изобретение относится к лечению заболевания или состояния. В некоторых других вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено предотвращение заболевания или состояния.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, «лечение» заболевания или состояния относится к улучшению заболевания или состояния (т.е., облегчению, или 15 предотвращению, или уменьшению прогрессирующего заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). Согласно некоторым другим вариантам реализации «лечение» относится к ослаблению или улучшению по меньшей мере одного параметра организма, включая такие физические параметры, которые могут быть незаметны для пациента. Согласно некоторым другим вариантам реализации «лечение» относится к 20 регуляции заболевания или состояния физически (например, стабилизация заметного симптома), физиологически (например, стабилизация физического параметра), или обоими путями. Способы оценки лечения и/или предотвращения заболевания обычно известны в данной области техники, если они явно не описаны в настоящей заявке.

В других вариантах реализации настоящего изобретения, «предотвращение» 25 заболевания или состояния включает ингибирование возникновения или развития заболевания или состояния или симптома конкретного заболевания или состояния. В некоторых вариантах реализации субъект с семейным анамнезом рака является кандидатом для профилактической схемы приема. Обычно в случае рака термин «предотвращение» относится к введению лекарственных средств субъекту до начала состояний или симптомов 30 рака, в частности, у субъекта с риском развития рака.

Согласно некоторым вариантам реализации после «лечения» рака с помощью способа согласно настоящему изобретению считают, что отдельный пациент успешно вылечен, если у указанного индивидуума наблюдают одно или более из следующего: число раковых 35 клеток уменьшилось или раковые клетки полностью исчезли; размер опухоли уменьшился; инфильтрация раковых клеток в периферические органы ингибирована или отсутствует,

включая, например, распространение раковых клеток в мягкие ткани и кости; метастазирование опухоли ингибировано или отсутствует; рост опухоли ингибирован или отсутствует; один или более симптомов, связанных с определенным раком, ослаблены; заболеваемость и смертность снижены; качество жизни улучшено; заболеваемость, частота возникновения или онкогенность опухоли снижена; число или частота возникновения раковых стволовых клеток в опухоли снижена; опухолевые клетки дифференцированы в неонкогенное состояние; или комбинацию некоторых из указанных эффектов.

«Ингибирование роста опухоли» относится к любому механизму, посредством которого можно ингибировать рост опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем замедления пролиферации опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем остановки пролиферации опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем уничтожения опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем индукции апоптоза опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем индукции дифференцировки опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем лишения опухолевых клеток питательных веществ. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем предотвращения миграции опухолевых клеток. В некоторых вариантах реализации рост опухолевых клеток ингибируют путем предотвращения инвазии опухолевых клеток.

В данной заявке «идентичность последовательностей» относится к степени идентичности последовательностей, определенной на основании последовательного сравнения нуклеотидов или аминокислот в окне сравнения. «(Процент) идентичности последовательностей» можно рассчитать, как описано далее: сравнение двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определение количества положений с одинаковым основанием нуклеиновой кислоты (например, А, Т, С, G, I) или одинаковым аминокислотным остатком (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) в двух последовательностях с получением количества совпадающих положений, деление количества совпадающих положений на суммарное количество положений в окне сравнения (т.е., размер окна) и умножение результата на 100, с получением процента идентичности последовательностей. Оптимального выравнивания с целью определения процента идентичности последовательностей можно добиться различными способами, известными в данной области техники, например, используя общедоступные компьютерные программы, такие как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN (DNASTAR). Специалисты в

данной области техники способны определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей или целевого участка последовательностей, которые сравнивают. Согласно настоящему изобретению для последовательностей антител процент идентичности последовательности аминокислот определяют путем оптимального выравнивания кандидатной последовательности антитела с референсной последовательностью антитела, и в предпочтительном варианте реализации в соответствии со схемой нумерации Kabat.

В настоящей заявке «GBR830» представляет собой антагонистическое антитело к OX40, полученное путем временной экспрессии в соответствии с последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи VH6/VL9, раскрытыми в WO 2013008171; «OX40mAb24» представляет собой агонистическое антитело к OX40, полученное путем временной экспрессии в соответствии с последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи антитела OX40mAb24, раскрытыми в WO 2016057667; «11D4» представляет собой агонистическое антитело к OX40, полученное путем временной экспрессии в соответствии с последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи антитела 11D4, раскрытыми в WO 2009079335.

### **Антитело к OX40 и его получение**

Антитело согласно настоящему изобретению можно получить с помощью любого подходящего способа получения антитела. Любую подходящую форму OX40 можно использовать в качестве иммуногена (антигена) для получения антител. В качестве примера, но не ограничения, любой вариант OX40 или его фрагмент можно использовать в качестве иммуногена. Согласно некоторым вариантам реализации клетки гибридомы, продуцирующие мышинные моноклональные антитела к OX40 человека, можно получить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Указанные способы включают, но не ограничены гибридомной методикой, изначально разработанной Kohler et al., (1975) (Nature 256: 495-497). Предпочтительно в соответствии со стандартным протоколом выделяют клетки селезенки мыши и осуществляют слияние с линией клеток миеломы мыши с помощью ПЭГ или электрослияния. Затем проводят скрининг клеток гибридомы, секретирующих антитело с OX40-связывающей активностью. Последовательности ДНК переменных областей иммуноглобулина из клеток гибридомы согласно настоящему изобретению можно детектировать с помощью способа на основе ПЦР с вырожденными праймерами.

Антитела из грызунов (таких как мыши) могут вызывать нежелательную иммуногенность антитела, когда их используют в качестве терапевтических лекарственных средств *in vivo*. Повторное применение вызывает иммунный ответ на терапевтические антитела у людей. Этот вид иммунного ответа приведет по меньшей мере к утрате терапевтической эффективности и, в тяжелых случаях, приведет к потенциально летальной аллергической реакции. Один способ снижения иммуногенности антител грызунов включает получение химерных антител, в которых переменную область мыши сливают с константной областью человека (Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-43). Однако сохранение интактных переменных областей грызунов в химерных антителах все еще может вызывать опасную иммуногенность у пациентов.

Прививку CDR из переменной области грызуна на каркас человека (т.е. гуманизацию) используют, чтобы дополнительно минимизировать последовательность грызуна. Для гуманизованного антитела в соответствии с настоящим изобретением, участки CDR мыши можно встроить в зародышевый каркас человека, применяя способ, известный в данной области техники. См. Winter et al., патент США № 5,225,539 и Queen et al., патент США № 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,762 и US 6,180,370.

Точную границу последовательности аминокислот CDR переменной области антитела согласно настоящему изобретению можно определить, используя любую из множества хорошо известных схем, например, Kabat, Chothia, AbM, Contact или North. Следует отметить, что граница переменного участка CDR одного и того же антитела, полученная с помощью различных систем определений, может отличаться. То есть, последовательности CDR переменной области одного и того же антитела, определенные с помощью различных систем нумерации, различны. Таким образом, касательно определения антитела с определенной последовательностью CDR в соответствии с определением, приведенным в настоящем изобретении, в объем термина «антитело» также входит антитело, последовательность переменной области которого содержит указанную определенную последовательность CDR, но с обозначенной границей CDR, отличной от указанной в настоящем изобретении для определенной последовательности CDR, вследствие применения различных схем (таких как различные системы определения или их комбинации).

Антитела с различными видами специфичности (т.е. различными сайтами связывания для различных антигенов) имеют различные CDR. Тем не менее, хотя CDR отличаются от антитела к антителу, лишь ограниченное число положений аминокислот в CDR непосредственно вовлечено в связывание антигена. Минимальную перекрывающуюся область можно определить, используя по меньшей мере две из схем Kabat, Chothia, AbM и

North, чтобы обеспечить «наименьшую связывающую единицу» для связывания антигена. Наименьшая связывающая единица может представлять собой подгруппу остатков CDR. Специалист в данной области техники поймет, что остатки остальной части последовательности CDR можно определить в соответствии со структурой и белковой  
5 укладкой антитела. Таким образом, согласно настоящему изобретению также предусмотрены любые варианты CDR, представленные в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации в варианте CDR антитела к OX40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению аминокислотные  
10 остатки наименьшей связывающей единицы остаются неизменными, тогда как другие остатки CDR, определенные в соответствии с Kabat или IMGT, можно заменить консервативными аминокислотными остатками.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех определяющих комплементарность участков тяжелой цепи, выбранных из HCDR1, HCDR2  
15 и HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит  
20 последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот, которая идентична  
25 последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 13, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 13.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено  
30 антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие от одного до трех определяющих комплементарность участков легкой цепи, выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены  
35 аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с

последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот, которая идентична последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 16, или имеет по меньшей мере 1 и не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены) по сравнению с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 16.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение включает антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, три HCDR вариабельной области тяжелой цепи которого, по сравнению с тремя HCDR, конкретно раскрытыми в настоящей заявке, содержат в общей сложности по меньшей мере одно и не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены), и/или три LCDR вариабельной области легкой цепи которого, по сравнению с тремя LCDR, конкретно раскрытыми в настоящей заявке, содержат в общей сложности по меньшей мере одно и не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты (предпочтительно замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение включает антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи содержит одно или более (предпочтительно не более 10, более предпочтительно не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1) изменений аминокислот (предпочтительно замен аминокислот, более предпочтительно консервативных замен аминокислот) по сравнению с вариабельной областью тяжелой цепи и/или вариабельной областью легкой цепи антитела, конкретно раскрытыми в настоящей заявке, и предпочтительно изменения аминокислот не происходят в участке CDR.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот, идентичную или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VL содержит последовательность аминокислот, идентичную или имеющую по меньшей мере 90%, 91%,  
5 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10.

Согласно варианту реализации настоящего изобретения изменения аминокислот, описанные в настоящей заявке, включают замены, вставки или делеции аминокислот. Предпочтительно, изменения аминокислот, описанные в данной заявке, представляют  
10 собой замены аминокислот, предпочтительно консервативные замены.

В предпочтительном варианте реализации изменения аминокислот в соответствии с настоящим изобретением происходят на участках вне CDR (например, в FR). Более предпочтительно, изменения аминокислот в соответствии с настоящим изобретением происходят на участках вне переменной области тяжелой цепи и/или вне переменной области легкой цепи. В некоторых вариантах реализации изменения аминокислот  
15 происходят в константной области тяжелой цепи и/или в константной области легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению, содержащие изменения аминокислот, обладают свойствами, сопоставимыми или сходными с таковыми конкретных антител, раскрытых в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 согласно настоящему изобретению включает посттрансляционные модификации в CDR, переменных областях легкой цепи, переменных областях тяжелой цепи, легких цепях или тяжелых цепях.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 согласно настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело, такое  
25 как VHH, Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')<sub>2</sub>, одноцепочечное антитело, такое как scFv, Fv, dAb (доменное антитело) или бис/мульти-специфичное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело в форме любого изотипа IgG, такое как антитело в форме IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения также предложены антитела с измененной (ыми) эффекторной (ыми) функцией(ями). Термин «эффекторные функции» относится к тем видам биологической активности, которые связаны с областью Fc антитела, которая варьируется в зависимости от класса антитела. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них  
35 можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3,

IgG4, IgA1 и IgA2. Эффекторные функции антител включают, например, но не ограничиваются ими: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; привлечение иммунных клеток; и перекрестное связывание антител, опосредуемое связыванием области Fc с рецептором FcR на поверхности клетки. Специалисты в данной области техники поймут, что подходящая последовательность области Fc антитела может быть выбрана в соответствии с потребностями, например, желательно ли привлекать иммунную систему для уничтожения клеток-мишеней или индуцировать перекрестное связывание антитела путем взаимодействия с FcR. Например, когда привлечение иммунной системы и уничтожение клеток-мишеней являются желаемыми свойствами антитела, представляющего интерес, область Fc антитела может быть выбрана или дополнительно модифицирована для обеспечения усиленного связывания с активированными рецепторами FcγR и/или комплементом для стимулирования, например, эффекторных функций АЗКЦ или КЗЦ. В качестве другого примера, если привлечение иммунной системы нежелательно, область Fc антитела может быть выбрана или дополнительно модифицирована для снижения эффекторной функции. Например, может быть использована область Fc подтипа IgG2 или IgG4 человека, или может быть использована область Fc подтипа IgG1 с мутациями, такими как N297A. Кроме того, область Fc может быть выбрана или мутирована таким образом, что антитело, содержащее ее, селективно связывается с одним или более рецепторами Fc, в то время как связывание с другим одним или более FcR снижается или устраняется, чтобы обеспечить регулирование эффекторных функций антитела, таких как усиление перекрестного связывания антител при изменении интенсивности активности АЗКЦ. См., например, Xinhua Wang et al., IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions, Protein Cell 2018, 9 (1): 63-73, DOI 10.1007/s13238-017-0473-8; Shields RL, High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR, 2001, J Biol Chem. 2001 Mar 2; 276 (9): 6591-604. Epub 2000 Nov 28.

Согласно настоящему изобретению предложены варианты антител, обладающие некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают варианты антител желательными кандидатами для приложений, в которых важен период полужизни антитела *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как КЗЦ и АЗКЦ) являются ненужными или вредными. Для подтверждения снижения/истощения активности КЗЦ и/или АЗКЦ могут быть проведены анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, можно провести анализ связывания рецептора Fc (FcR), чтобы убедиться, что антитело не

связывается с FcγR (и, следовательно, может не обладать активностью АЗКЦ или активностью перекрестного связывания антитела), но сохраняет способность связывать FcRn. NK-клетки, основные клетки, которые опосредуют АЗКЦ, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках обобщена в Таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-492 (1991). Изображены сайты связывания с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn на IgG1 человека, а также описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields et al., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604, 2001).

Согласно некоторым вариантам реализации одну или более модификаций аминокислот можно ввести в область Fc антитела согласно настоящему изобретению для получения вариантов области Fc. Вариант области Fc может содержать последовательность области Fc человека (такой как область Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую модификации аминокислот (такие как замены) в одном или более положениях аминокислот. Например, ряд модификаций в IgG1 человека для повышения или снижения его связывания с FcγR и повышения или снижения соответствующей функции обобщен в статье Bruhns and Jönsson, опубликованной в Immunol Rev. 2015 Nov; 268 (1): 25-51, стр. 44.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит вариант области Fc IgG1 человека, который имеет активность связывания FcγR (такую как активность перекрестного связывания антитела), которая снижена или недостаточна. Согласно некоторым вариантам реализации вариант области Fc IgG1 человека содержит одну или более замен аминокислот и, в частности, замену аминокислоты, выбранную из замен аминокислот в положениях E233, L234, L235, N297 и P331 тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации вариант области Fc IgG1 человека содержит одну или более замен аминокислот, выбранных из E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297G, N297D и P331S. Согласно некоторым вариантам реализации замена аминокислоты варианта области Fc IgG1 человека представляет собой N297A. Согласно некоторым другим вариантам реализации вариант области Fc IgG человека не представляет собой N297A.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению не содержит варианта области Fc, который представляет собой IgG1 N297A человека. В некоторых случаях, например, антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать область Fc с нативной последовательностью; и в некоторых других случаях антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариант области Fc, причем указанный вариант не представляет собой IgG1 N297A. Согласно некоторым вариантам

реализации антитело может представлять собой агонист или антагонист, в зависимости от его области Fc.

Согласно одному аспекту антитело согласно настоящему изобретению модифицировано, чтобы повысить или уменьшить степень гликозилирования указанного антитела. Добавления или удаления сайтов гликозилирования антитела можно удобно 5 достичь путем изменения последовательности аминокислот таким образом, чтобы получить или удалить один или более сайтов гликозилирования. Гликозилирование можно изменить, например, чтобы повысить аффинность антитела в отношении «антигена». Эту углеводную модификацию можно осуществить, например, путем изменения одного или 10 более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно ввести одну или более замен аминокислот, что приведет к удалению одного или более сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, посредством чего удаляют гликозилирование в указанном сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность антитела к антигену. Такой способ описан, например, в патенте США № 15 5,426,300. Когда антитело содержит Fc-область, сахараиды, присоединенные к ней, можно изменить. При некоторых применениях пригодны модификации для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, такие как удаление звеньев фукозы, чтобы улучшить функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В других применениях можно ввести модификацию галактозилирования, чтобы модифицировать 20 комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

Согласно некоторым вариантам реализации может потребоваться продуцировать сконструированное с помощью цистеина антитело, например, «тиоМАТ», в котором один или более остатков антитела заменены остатками цистеина.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему 25 изобретению можно дополнительно модифицировать, чтобы оно содержало дополнительные небелковые фрагменты, которые известны в данной области техники и легко доступны. Фрагмент, пригодный для дериватизации антител, включает, но не ограничивается им, водорастворимый полимер. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются перечисленными, 30 полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диалкан, поли-1,3,6-триалкан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля,

сополимеры оксида полипропилена/оксида этилена, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению имеет одно или более из следующих свойств:

- 5 (i) связывается с OX40 человека, в частности, с внеклеточным доменом OX40 человека, с высокой аффинностью, например, со значением  $K_D$  менее 100 нМ, например, менее 50 нМ, например, менее 30 нМ, предпочтительно менее 10 нМ или 5 нМ, причем предпочтительно значение  $K_D$  измеряют с использованием анализа методом поверхностного плазмонного резонанса;
- 10 (ii) связывается с OX40 человека, экспрессируемым на поверхности клеток (таких как Т-клетки), с высокой аффинностью, например, со значением  $ЭК_{50}$  менее 100 нМ, например, менее 50 нМ, например, менее 40 нМ, предпочтительно менее 20 нМ, более предпочтительно менее 10 нМ или 5 нМ, причем предпочтительно значение  $ЭК_{50}$  измеряют с использованием анализа методом FACS;
- 15 (iii) блокирует связывание OX40 человека с его лигандом OX40L с показателем ингибирования по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85% или 90%, например, как определено с помощью ИФА, и предпочтительно со значением  $ИК_{50}$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 1 нМ;
- (iv) проявляет аффинность и/или специфичность связывания, аналогичную или  
20 сходную с таковой любого антитела, перечисленного в Таблице 2;
- (v) ингибирует (например, конкурентно ингибирует) связывание OX40 любого антитела, перечисленного в Таблице 2;
- (vi) связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и любое антитело, перечисленное в Таблице 2;
- 25 (vii) обладает биологической активностью, аналогичной или сходной с таковой любого антитела, перечисленного в Таблице 2.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 согласно настоящему изобретению представляет собой агонистическое антитело, содержащее область Fc, которая связывается с FcR (например, Fc $\gamma$ R), такую как область Fc IgG1, IgG2 или IgG4  
30 человека или ее вариант, предпочтительно область Fc IgG1 или IgG2 человека или ее вариант. Вариант предпочтительно имеет аффинность связывания с Fc $\gamma$ R, сравнимую с аффинностью связывания исходной области Fc (например, области Fc с нативной последовательностью) или превышающую ее. Предпочтительно антитело обеспечивает перекрестное связывание путем связывания его области Fc с Fc $\gamma$ R, экспрессируемым на  
35 поверхности клетки. Предпочтительно антитело содержит последовательность области Fc

IgG1 или IgG2 человека, идентичную последовательности области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21 или 22, или содержит вариант области Fc IgG1 или IgG2 человека, имеющий по меньшей мере 95%, 96%, 97% или 99% идентичности с последовательностью области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21 или 22, или имеющий не более 10, 5 или 1-3 изменений аминокислот относительно последовательности области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21 или 22.

Согласно некоторым вариантам реализации агонистическое антитело к OX40 согласно настоящему изобретению имеет одно или более из следующих свойств:

10 (i) связывается с OX40 человека с высокой аффинностью, например, со значением  $K_D$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 5 нМ, причем предпочтительно значение  $K_D$  измеряют с использованием анализа методом поверхностного плазмонного резонанса;

(ii) связывается с OX40 человека, экспрессируемым на поверхности клеток (таких как активированные  $CD4^+$  Т-клетки), с высокой аффинностью, например, со значением  $ЭК_{50}$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 5 нМ, причем предпочтительно значение  $ЭК_{50}$  измеряют с использованием анализа методом FACS;

(iii) активирует активность по OX40-опосредуемой передаче сигнала;

(iv) обладает агонистической активностью в отношении Т-клеток, причем агонистическую активность антитела в отношении Т-клеток можно оценить, например, путем детектирования цитокинов, таких как  $IFN-\gamma$ , высвобождаемых активированными Т-клетками в присутствии антитела, и в некоторых вариантах реализации значение  $ЭК_{50}$  антитела составляет менее 10 нМ, предпочтительно менее 5 нМ;

(v) ингибирует рост опухоли, например, ингибирует рост клеток меланомы.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к OX40 согласно настоящему изобретению представляет собой антагонистическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит вариант области Fc, причем, например, по сравнению с исходной областью Fc (например, областью Fc с нативной последовательностью), аффинность связывания варианта области Fc с  $Fc\gamma R$  снижена или по существу устранена. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению по существу не связывается с  $Fc\gamma R$ , экспрессируемым на поверхности клетки, и перекрестное связывание антитела, опосредуемое  $Fc\gamma R$ , не происходит. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению, содержащее вариант области Fc, имеет сниженные или устраненные опосредуемые  $Fc\gamma R$  эффекторные функции относительно соответствующего антитела, содержащего исходную область Fc (например, область Fc с нативной последовательностью).

Предпочтительно область Fc антитела содержит мутацию, выбранную из: E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297G, N297D, P331S или их комбинации. Более предпочтительно область Fc антитела представляет собой область Fc IgG1 человека, содержащую мутацию N297A. Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит последовательность

5 области Fc IgG1 человека, идентичную последовательности области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21, или содержит вариант области Fc IgG1 человека, имеющий по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21, или имеющий не более 10, 5 или 1-3 изменений аминокислот

10 относительно последовательности области Fc из последовательности константной области согласно SEQ ID NO: 21, и содержит мутацию(ии), которая снижает аффинность связывания области Fc с FcγR, предпочтительно мутацию N297, более предпочтительно N297A.

Согласно некоторым вариантам реализации антагонистическое антитело к OX40

15 согласно настоящему изобретению имеет одно или более из следующих свойств:

(i) связывается с OX40 человека с высокой аффинностью, например, со значением  $K_D$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 5 нМ, причем предпочтительно значение  $K_D$  измеряют с использованием анализа методом поверхностного плазмонного резонанса;

(ii) связывается с OX40 человека, экспрессируемым на поверхности клеток (таких как

20 активированные  $CD4^+$  Т-клетки), с высокой аффинностью, например, со значением  $ЭК_{50}$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 5 нМ, причем предпочтительно значение  $ЭК_{50}$  измеряют с использованием анализа методом FACS;

(iii) блокирует связывание OX40 с его лигандом OX40L с показателем ингибирования по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, 85% или 90%, например,

25 как определено с помощью ИФА, и предпочтительно со значением  $ИК_{50}$  менее 10 нМ, более предпочтительно менее 1 нМ;

(iv) блокирует активность по OX40-опосредуемой передаче сигнала;

(v) обладает антагонистической активностью в отношении Т-клеток, причем антагонистическую активность антитела в отношении Т-клеток можно оценить, например,

30 путем детектирования цитокинов, таких как IFN-γ, высвобождаемых активированными Т-клетками в присутствии антитела и лиганда OX40L, чтобы оценить ингибирование OX40L-опосредуемой активации Т-клеток антителом, и в некоторых вариантах реализации значение  $ИК_{50}$  антитела составляет менее 5 нМ, предпочтительно менее 1 нМ;

(vi) проявляет активность, направленную против иммунного отторжения, такую как

35 снижение иммунного отторжения при болезнях «трансплантат против хозяина».

## Экспрессия антитела

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей один или более векторов экспрессии, и способу получения любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, очистку и выделение указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая любое из описанных выше антител к ОХ40 или их антигенсвязывающих фрагментов. Например, согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота, кодирующая сегмент, содержащий тяжелую цепь, легкую цепь, переменную область или определяющий комплементарность участок, описанные в настоящей заявке. Согласно некоторым аспектам нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 17 или 18. Согласно некоторым аспектам нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи, имеет по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 19 или 20.

Согласно одному аспекту предложен один или более векторов, содержащих указанную нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации вектор представляет собой вектор экспрессии. Выбор вектора экспрессии зависит от клетки-хозяина, в которой указанный вектор будут экспрессировать. Обычно вектор экспрессии содержит промотор и другую регуляторную последовательность (например, энхансер), функционально связанную с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации вектор экспрессии дополнительно содержит последовательность, кодирующую константную область антитела.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных антител согласно настоящему изобретению, включая прокариотические или эукариотические клетки. Согласно некоторым вариантам реализации *Escherichia coli* представляет собой прокариотического хозяина, которого можно применять для клонирования и экспрессии нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Другие подходящие микробные хозяева включают бациллы,

такие как *Bacillus subtilis*, и другие *Enterobacteriaceae*, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно получить векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии (например, точку начала репликации), которые совместимы с указанными клетками-хозяевами. Согласно некоторым вариантам реализации клетки-хозяева млекопитающих используют для экспрессии и продукции полипептидов антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой линии клеток гибридомы, экспрессирующие гены эндогенных иммуноглобулинов, или линии клеток млекопитающих с экзогенными векторами экспрессии, включая нормальные клетки человека, или иммортализованные клетки животного или человека. Например, было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактный иммуноглобулин, включая линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки НЕК293, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела к ОХ40, причем указанный способ включает введение вектора экспрессии в клетку-хозяина из млекопитающего, и обеспечение экспрессии антитела в клетке-хозяине путем культивирования клетки-хозяина в течение достаточного периода времени, или, более предпочтительно, секрецию антитела в среду, в которой выращивают клетку-хозяина, для получения антитела. Для выделения антител из культуральной среды можно применять стандартные способы очистки белка. Молекулу антитела, полученную, как описано в данной заявке, можно очистить с помощью известных доступных методик, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, электрофорез в геле, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, и т.д. Фактические условия, используемые для очистки определенного белка, также зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность и гидрофильность, которые понятны для специалиста в данной области техники. Чистоту молекулы антитела согласно настоящему изобретению можно определить с помощью любого из различных хорошо известных аналитических способов, включая эксклюзионную хроматографию, электрофорез в геле, высокоэффективную жидкостную хроматографию и т.д.

Антитела, экспрессированные различными линиями клеток или экспрессированные в трансгенных животных, вероятно, будут иметь отличный друг от друга тип гликозилирования. Однако все антитела, кодируемые нуклеиновыми кислотами, предложенными в настоящей заявке, или содержащие последовательности аминокислот, предложенные в настоящей заявке, входят в объем настоящего изобретения, независимо от типов гликозилирования указанных антител.

## Анализы

Физические/химические свойства и/или виды биологической активности антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению можно определить, подвергнуть скринингу или охарактеризовать с помощью различных анализов, известных в данной области техники. Согласно одному аспекту исследовали антигенсвязывающую активность антитела согласно настоящему изобретению, например, с помощью известного способа, такого как ИФА и Вестерн-блоттинг. Способы, известные в данной области техники, можно применять для определения связывания с ОХ40, и примерные способы раскрыты в настоящей заявке.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ анализа для идентификации антител к ОХ40 с целевой биологической активностью. Виды биологической активности могут включать, например, связывание с ОХ40 (например, связывание с ОХ40 человека), увеличение ОХ40-опосредуемой передачи сигнала (например, увеличение NFκB-опосредуемой транскрипции), усиление функции эффекторных Т-клеток (например, путем увеличения пролиферации эффекторных Т-клеток и/или увеличения продукции цитокинов (например, гамма-интерферона) эффекторными Т-клетками) и т.д. Также предложены антитела, обладающие таким видами биологической активности *in vivo* и/или *in vitro*.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела согласно настоящему изобретению исследуют на такие виды биологической активности.

Клетки для применения в любом из упомянутых выше способов анализа *in vitro* включают линии клеток, которые естественным образом экспрессируют ОХ40 или сконструированы для экспрессии ОХ40, такие как линии опухолевых клеток. Такие клетки также включают линии клеток, которые обычно не экспрессируют ОХ40 и которые трансфицированы ДНК, кодирующей ОХ40, для экспрессии ОХ40.

Понятно, что иммуноконъюгаты или иммунные слитые молекулы согласно настоящему изобретению можно применять вместо антитела к ОХ40 или в дополнение к нему для выполнения любого из упомянутых выше способов анализа.

Понятно, что комбинацию антитела к ОХ40 и другого активного агента можно применять для выполнения любого из упомянутых выше способов анализа.

## Имуноконъюгат и иммунная слитая молекула

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен иммуноконъюгат, содержащий любое антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и другое вещество. Согласно одному варианту

реализации настоящего изобретения другое вещество представляет собой, например, цитотоксический агент.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена иммунная слитая молекула, содержащая любое антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Согласно некоторым вариантам реализации иммуноконъюгат и иммунную слитую молекулу применяют для предотвращения или лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний.

## 10 Фармацевтическая композиция

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать антитело согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Согласно некоторым другим вариантам реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть включена в фармацевтический набор. Согласно некоторым другим вариантам реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть включена в набор, такой как диагностический набор.

В настоящей заявке «фармацевтический носитель» включает любой и все растворители, дисперсионную среду, изотонические агенты, замедляющие всасывание агенты, и т.д., которые физиологически совместимы. Фармацевтические носители, подходящие для настоящего изобретения, могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая таковые нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло, и т.д. Вода представляет собой предпочтительный носитель, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Также возможно применение солевых растворов, водной декстрозы и растворов глицерина в качестве жидких носителей, особенно для инъеклируемых растворов.

Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, диол, воду, этанол, и т.д. Применения вспомогательных веществ и их использование см. также в «Handbook of Pharmaceutical Excipients», пятое издание, R.C. Rowe, P.J. Seskey и S.C. Owen, Pharmaceutical Press, Лондон, Чикаго. Композиция также может содержать небольшое количество смачивающего агента или эмульгатора, или рН-буферного вещества. Эти композиции могут находиться в виде растворов, суспензий,

эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, агентов замедленного высвобождения, и т.д. Состав для перорального применения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин фармацевтической степени чистоты, и т.д.

5 Согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более моноклональных антител, связывающихся с ОХ40, или их антигенсвязывающих фрагментов, или нуклеиновых кислот, векторов или клеток-хозяев, или иммуноконъюгатов, или иммунных слитых молекул. Следует понимать, что антитело к ОХ40 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, 10 нуклеиновую кислоту, вектор или его клетку-хозяина, или иммуноконъюгат, или иммунную слитую молекулу в фармацевтической композиции можно изготовить с подходящими фармацевтическими носителями, вспомогательными веществами и другим совместно вводимым агентом, подходящим для применения в фармацевтическом препарате, чтобы обеспечить улучшенный перенос, доставку, переносимость, и т.д.

15 Фармацевтический препарат, содержащий антитело к ОХ40, описанное в настоящей заявке, можно получить путем смешивания антитела к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению, имеющих желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми вспомогательными 20 веществами, предпочтительно в форме водных растворов или лиофилизированных препаратов. Примерные лиофилизированные препараты антител описаны в патенте США № 6,267,958. Водные препараты антител включают те, которые описаны в патенте США № 6,171,586 и WO 2006/044908, в последнем из них описан препарат, содержащий гистидин-ацетатный буферный агент.

Фармацевтические композиции или препараты согласно настоящему изобретению 25 также могут содержать один или более других активных ингредиентов, которые необходимы для лечения конкретных заболеваний, предпочтительно активных ингредиентов с дополняющими видами активности, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Например, желательно, чтобы также были включены другие терапевтические агенты. Согласно некоторым вариантам реализации другие 30 терапевтические агенты представляют собой химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, вакцины, другие антитела, иммуномодуляторы или другие биомакромолекулярные лекарственные средства.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую 35 антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент.

## Способы и варианты применения

Согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения, диагностики или лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний. Способ включает введение 5 пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата, или иммунной слитой молекулы, или фармацевтической композиции, содержащей их, или нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина, описанных в настоящей заявке.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено применение антитела 10 к ОХ40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата, или иммунной слитой молекулы, или фармацевтической композиции, содержащей их, для изготовления или получения лекарственных средств для предотвращения или лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний у субъектов.

Согласно одному аспекту антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению и их 15 антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтическую композицию, содержащую их, можно применять в качестве терапевтического агента для предотвращения или лечения связанных с ОХ40 заболеваний или состояний у субъекта. При связанных с ОХ40 заболеваниях у субъектов, обнаруженных с использованием стандартных способов, можно вводить антитела к ОХ40 и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем 20 изобретении, и фармацевтические композиции, или иммуноконъюгаты, или иммунные слитые молекулы, содержащие их, или нуклеиновые кислоты, векторы или клетки-хозяева, описанные в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации способы и варианты применения, описанные в настоящей заявке, дополнительно включают введение индивидууму 25 эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента или процедуры. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтические агенты представляют собой, например, химиотерапевтические агенты, радиотерапевтические агенты, цитокины, вакцины, другие антитела, иммуномодуляторы или другие биомолекулярные лекарственные средства. Согласно некоторым вариантам 30 реализации терапевтические процедуры включают хирургическое вмешательство; и лучевую терапию, местное облучение или облучение очага, и т.д.

Упомянутая выше комбинированная терапия включает комбинированное введение (при котором два или более терапевтических агентов содержатся в одном и том же или в отдельных препаратах) и отдельное введение, причем введение антитела к ОХ40 или его 35 антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может происходить

до, одновременно или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адьюванта, и/или процедуры.

Согласно некоторым вариантам реализации связанные с OX40 заболевания или состояния согласно настоящему изобретению относятся к заболеваниям или состояниям, связанным с аномальной экспрессией, активностью и/или передачей сигнала OX40 у субъекта, включая, но не ограничиваясь перечисленными, разные виды рака, воспаление и аутоиммунные заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации при связанных с OX40 заболеваниях или состояниях повышена нуклеиновая кислота (уровень или содержание), кодирующая OX40, или повышена экспрессия OX40, или повышен уровень белка или активность OX40, или повышена опосредуемая OX40 передача сигнала. Согласно некоторым другим вариантам реализации при связанных с OX40 заболеваниях или состояниях снижена нуклеиновая кислота (уровень или содержание), кодирующая OX40, или снижена экспрессия OX40, или снижен уровень белка или активность OX40, или снижена опосредуемая OX40 передача сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации при лечении указанных заболеваний или состояний будет польза от ингибирования OX40 на уровне нуклеиновой кислоты или белка, или от блокирования связывания OX40 с его лигандом, или от ингибирования опосредуемой OX40 передачи сигнала.

Согласно некоторым другим вариантам реализации при лечении указанных заболеваний или состояний будет польза от увеличения OX40 на уровне нуклеиновой кислоты или белка или польза от усиления опосредуемой OX40 передачи сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации связанные с OX40 заболевания или состояния представляют собой разные виды рака. В частности, разные виды рака включают, но не ограничиваются перечисленными, солидные опухоли, рак молочной железы, уротелиальный рак, меланому, рак почек, рак яичников, рак головы и шеи, рак желудка, рак печени, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому, рак предстательной железы, лимфатический лейкоз и саркому. Предпочтительно антитело для предотвращения, диагностики или лечения связанных с OX40 видов рака представляет собой агонист OX40.

Согласно некоторым вариантам реализации связанные с OX40 заболевания или состояния представляют собой воспаление и/или аутоиммунные заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации связанное с OX40 воспаление и/или аутоиммунные заболевания выбраны из идиопатического дерматита, ревматоидного артрита, астмы (например, аллергической астмы), ХОБЛ, аутоиммунного увеита, рассеянного склероза, волчанки (такой как системная красная волчанка), язвенного колита, склеродермии и

болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ). Предпочтительно антитело для лечения или предотвращения связанного с ОХ40 воспаления и/или аутоиммунных заболеваний представляет собой антагонист ОХ40.

5 Согласно некоторым вариантам реализации субъект может представлять собой млекопитающее, например, примата, предпочтительно высшего примата, например, человека (например, индивидуума, страдающего от заболевания, описанного в настоящей заявке, или имеющего риск пострадать от заболевания, описанного в настоящей заявке). В одном варианте реализации субъект страдает или имеет риск пострадать от заболевания, описанного в данной заявке (например, рака). Согласно определенным вариантам  
10 реализации субъект получает или получил другие виды лечения, такие как химиотерапия и/или лучевая терапия.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить любым подходящим способом, включая пероральное, парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если необходимо топическое лечение, его  
15 можно вводить внутрь очага. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Введение можно осуществить с помощью любого подходящего пути, например, с помощью инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, отчасти, в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В данной заявке предложены  
20 различные схемы введения, включая, но не ограничиваясь перечисленными: разовое или многократные введения в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению будут входить в состав и будут введены способом, соответствующим надлежащей  
25 медицинской практике. Факторы, рассматриваемые в этом случае, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину заболевания, место доставки лекарственного средства, способ введения, режим дозирования и другие факторы, известные практикующим врачам. Необязательно антитело изготавливают с одним или более  
30 агентами, которые на сегодняшний день применяют для предотвращения или лечения заболевания. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в препарате, состояния, подлежащего лечению, или терапевтического режима, и других факторов, которые обсуждались выше.

Для того чтобы предотвратить или лечить заболевания антитело или  
35 антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению (при использовании

отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами) будут вводить в подходящей дозировке в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антител, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело с целью предотвращения или лечения, предшествующего лечению, истории болезни пациента и ответа на антитело, и решения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту за один раз или серией введений.

Согласно определенным вариантам реализации любое антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно применять для детектирования наличия ОХ40 в биологическом образце. Термин «детектирование», когда его используют в настоящей заявке, включает количественное или качественное детектирование. Согласно определенным вариантам реализации биологический образец представляет собой кровь, сыворотку или другие жидкие образцы биологического происхождения. Согласно определенным вариантам реализации биологический образец содержит клетки или ткани. Согласно некоторым вариантам реализации биологический образец получен из гиперпролиферативных поражений или поражений, связанных с раковым поражением.

Согласно одному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно применять для диагностики связанных с ОХ40 заболеваний или состояний, таких как разные виды рака, например, для оценки (например, отслеживания) лечения или прогрессирования заболеваний, описанных в настоящей заявке, и их диагностики и/или определения стадии у индивидуума. Согласно определенным вариантам реализации предложено меченое антитело к ОХ40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Метки включают, но не ограничиваются перечисленными, метки или фрагменты, которые детектируются напрямую (такие как флуоресцентные метки, хромофорные метки, электроноплотные метки, хемилюминесцентные метки и радиоактивные метки), и фрагменты, которые детектируются опосредованно, такие как ферменты или лиганды, например, путем ферментативных реакций или межмолекулярных взаимодействий. Согласно некоторым вариантам реализации предложен набор для диагностики связанных с ОХ40 заболеваний, причем указанный набор содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации образец получают до лечения антителом к ОХ40 или его антигенсвязывающим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации образец получают до лечения другими видами терапии. В некоторых вариантах реализации образец получают во время или после лечения другими методами лечения.

Настоящее изобретение включает любые комбинации конкретных вариантов реализации, описанных в данной заявке. Должно быть понятно, что хотя конкретное содержание и примеры описаны для иллюстрирования предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения, они лишь иллюстрирующие и используются в качестве примеров. В объем настоящего изобретения дополнительно входят измененные варианты реализации на основе предпочтительных вариантов реализации в соответствии с настоящим изобретением, которые понятны для специалиста в данной области техники. Все публикации, патенты и заявки на патент, цитированные в настоящей заявке, включая приведенные в них ссылки, будут полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1 Получение и скрининг происходящих из гибридомы антител**

Антитела к OX40 получали с помощью гибридомной методики. Рекомбинантный белок OX40-Fc (R & D, № по каталогу 3388-OX), содержащий внеклеточный домен OX40 человека с Fc-меткой, использовали в качестве антигена для иммунизации мышей. Вкратце, мышей C57BL/6 и BALB/c иммунизировали OX40-Fc, смешанным и эмульгированным с полным или неполным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich). Проводили один раунд иммунизации (полный адьювант Фрейнда) и два раунда бустер-иммунизации (неполный адьювант Фрейнда) мышей, и собирали кровь после каждой бустер-иммунизации. Активность связывания сыворотки, собранной у мышей после каждого раунда бустер-иммунизации, детектировали с помощью ИФА с рекомбинантным белком OX40-His человека (R & D Systems, № по каталогу 9969-OX), а активность связывания сыворотки с клетками CHO (сконструированными с помощью GenScript), сверхэкспрессирующими OX40 человека, детектировали с помощью проточной цитометрии (FACS). Мышей с высоким титром в сыворотке отбирали для слияния. За 4 дня до слияния рекомбинантный белок OX40-Fc вводили путем внутривбрюшинной инъекции мышам для окончательной бустер-иммунизации. В день слияния мышей умерщвляли, а затем у мышей собирали селезенку и гомогенизировали с получением суспензии отдельных клеток. Клетки селезенки мышей сливали с клеточной линией миеломы мыши SP2/0 (приобретенной у ATCC) посредством устройства для электрослияния. Слитые клетки ресуспендировали в среде, содержащей Nat (гипоксантин, аминоптерин и дезоксинуклеотид тимидин, GIBCO, № по каталогу 21060017), инокулировали в 96-луночный планшет и культивировали при 37°C в течение 7 дней. Антитела, секретлируемые клетками гибридомы в супернатант, идентифицировали с помощью функциональных анализов, связанных с OX40 (таких как

специфичность связывания с ОХ40 человека и активность в отношении активации Т-клеток). Положительные клоны гибридомы субклонировали в течение одного или нескольких раундов с получением моноклона. После скрининга 38E11 наконец отобрали в качестве оптимального клона гибридомы (антитело, секретируемое таким образом, упоминается как 38E11).

Проводили культивирование с целью размножения кандидатных клеток гибридомы 38E11, и после 7-10 дней культивирования супернатант собирали, центрифугировали и фильтровали для удаления клеток и обломков. Супернатант пропускали через очищающую колонку с белком А (Genscript), затем колонку промывали и уравнивали буфером, содержащим 0,05 М Трис и 1,5 М NaCl (pH 8,0), а затем элюировали 0,1 М цитратом натрия (pH 3,5); и элюент незамедлительно нейтрализовали одной девятой объема 1 М Трис-HCl (pH 9), а затем проводили диализ в фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Наконец, получали происходящее из гибридомы антитело 38E11 для дальнейшей характеристики.

1.1 Детектирование активности связывания антител с белком внеклеточного домена ОХ40 с помощью ИФА

96-луночные планшеты покрывали рекомбинантным ОХ40-His человека (R & D, № по каталогу 9969-ОХ). После блокирования добавляли серийно разведенную мышиную сыворотку или антитела и инкубировали. После промывки планшетов ФСБ, содержащим 0,5% твин-20, ПХ-меченое вторичное антитело к IgG мыши добавляли для инкубации, и окрашивание в планшетах проявляли с помощью TMD, а значение OD450 считывали с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

В Таблице 1 показано, что полученное в результате этого антитело 38E11, происходящее из гибридомы, обладало высокой активностью связывания с белком ОХ40 человека с ЭК<sub>50</sub> 0,276 нМ.

1.2 Детектирование активности связывания антител с ОХ40 на активированных Т-клетках с помощью FACS

Первичные МКПК человека выделяли из цельной крови, полученной от здоровых доноров, путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, № по каталогу 17-1440-02). После центрифугирования клетки в среднем слое собирали и промывали 3 раза ФСБ с получением МКПК. Затем выделяли Т-клетки человека с помощью набора для выделения общей популяции Т-клеток (Miltenyi biotec, № по каталогу 130-096-535) с помощью метода выделения на основе магнитных гранул в соответствии с протоколом, рекомендованным инструкциями. Т-клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (содержащей 10% ФБС и биантибиотики пенициллин/стрептомицин) и добавляли РНА-L и IL-2 (или Con-A и hIL-2) для 2-дневной стимуляции, чтобы

индуцировать экспрессию OX40 на Т-клетках. Активированные Т-клетки промывали один раз ФСБ, содержащим 2% ФБС, добавляли серийно разведенные антитела к OX40 и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Клетки дважды промывали ФСБ, содержащим 2% ФБС, добавляли PE-меченое вторичное антитело к IgG человека (Biolegend, № по каталогу 409304) (или PE-меченое вторичное антитело к IgG мыши (Biolegend, № по каталогу 405307)) и APC-CY7-меченое антитело к CD4 человека (Biolegend, № по каталогу 300518). Связывание антитела к OX40 на поверхности CD4-положительных Т-клеток детектировали с помощью проточной цитометрии BD CantoII. Кривую аппроксимировали в соответствии с медианным значением интенсивности флуоресценции, и рассчитывали ЭК<sub>50</sub>.

В Таблице 1 показано, что происходящее из гибридомы антитело 38E11 имеет активность связывания с OX40 на активированных Т-клетках человека с ЭК<sub>50</sub> 0,8 нМ.

### 1.3 Определение агонистической активности антител в отношении Т-клеток

Агонистическую активность антитела в отношении Т-клеток оценивают путем детектирования цитокина IFN-γ, высвобождаемого активированными Т-клетками. Вкратце, первичные МКПК человека выделяли из цельной крови, полученной от здоровых доноров, путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, № по каталогу 17-1440-02). После центрифугирования клетки в среднем слое собирали и промывали 3 раза ФСБ с получением МКПК. Затем выделяли Т-клетки человека с помощью набора для выделения общей популяции Т-клеток (Miltenyi biotec, № по каталогу 130-096-535) с помощью метода выделения на основе магнитных гранул в соответствии с протоколом, рекомендованным инструкциями. Т-клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (содержащей 10% ФБС и биантибиотики пенициллин/стрептомицин). После смешивания антитела к CD3 (eBioscience, № по каталогу 16-0037-85) и серийно разведенных антител к OX40 смесь добавляли в 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку, и планшет покрывали при 37°C в течение 2 часов. Несвязанные антитела удаляли путем промывания ФСБ, и в лунки добавляли выделенные Т-клетки. Супернатанты собирали через 3 дня культивирования, и концентрации IFN-γ в супернатантах детектировали с помощью ИФА (R & D, № по каталогу SIF50) в соответствии со стандартным методом детектирования, рекомендованным инструкциями.

В Таблице 1 показано, что происходящее из гибридомы антитело 38E11 способствовало секреции IFN-γ Т-клетками со значением ЭК<sub>50</sub> 1,4 нМ.

В Таблице 1 также показана функциональная активность референсных антител к OX40 11D4 и OX40mAb24, полученных путем временной экспрессии.

Таблица 1 Функциональная активность происходящего из гибридомы антитела 38E11

Идентификационный номер клона	Связывание с белком OX40 человека (ИФА, ЭК <sub>50</sub> , нМ)	Связывание с OX40 на поверхности активированных Т-клеток человека (FACS) (ЭК <sub>50</sub> , нМ)	Усиление продукции IFN- $\gamma$ активированными Т-клетками человека (ИФА) (ЭК <sub>50</sub> , нМ)	Отношение максимального эффекта IFN- $\gamma$ к фону (кратность)
11D4	—	0,4	8,0	5,6
OX40mAb24	—	1,3	14,7	9,4
38E11	0,276	0,8	1,4	7,6

\*Фон: Контроль без антитела к OX40

## Пример 2 Гуманизация происходящего из гибридомы антитела

2.1 Определение последовательностей варибельной области происходящего из гибридомы антитела

Используя способ секвенирования гибридомы, проводили культивирование клеток клона гибридомы 38E11 с целью размножения; общую РНК экстрагировали с помощью TRIzol (приобретен у Ambio) и осуществляли обратную транскрипцию с получением ДНК с помощью специфичных для антитела праймеров (Такага, набор для синтеза 1 цепи кДНК PrimerScript); амплифицировали фрагмент гена, кодирующего область V иммуноглобулина мыши, с помощью специфичных для антитела праймеров, и клонировали. Последовательности варибельной области получали с помощью секвенирования, причем нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 38E11 представляет собой SEQ ID NO: 17, и нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 38E11 представляет собой SEQ ID NO: 18.

2.2 Гуманизованная конструкция антитела, происходящего из гибридомы

Для гуманизации антитела, во-первых, в базе данных антител PDB проводили поиск гена иммуноглобулина зародышевой линии человека, высоко гомологичного последовательности варибельной области мышинового антитела. Варибельная область тяжелой цепи и варибельная область легкой цепи 38E11 имеют более высокую гомологию последовательностей с зародышевой линией IGHV1-46\*01 человека и зародышевой линией IGKV4-1\*01 человека, соответственно. Затем последовательности аминокислот CDR варибельных областей и их точную границу определяют с помощью нумерации по Kabat. В целом, IGVH и IGVk человека с высокой гомологией с варибельными областями мышинового антитела выбирают в качестве матриц, и прививку CDR используют для гуманизации.

Для поддержания активности в гуманизованном антителе обычно также анализируют последовательности аминокислот переменных областей и окружающих каркасных участков, используя технологию компьютерного моделирования и молекулярную стыковку, и изучают их трехмерные пространственные способы связывания.

5 Путем вычисления электростатической силы, силы Ван-дер-Ваальса, гидрофильности и гидрофобности, а также энтропии, анализируют ключевые остатки в отдельных последовательностях кандидатного антитела, которые могут взаимодействовать с OX40 или сохранять пространственную структуру, и которые могут быть привиты обратно на каркас выбранного гена антитела человека. На этом основании отмечают положения  
10 аминокислот в каркасном участке, которые необходимо сохранить, а затем синтезируют гуманизованное антитело. Для обратных мутаций отобрали 7 сайтов в переменной области тяжелой цепи антитела 38E11: V20L, M48I, R67K, M70L, R72V, V79A и T91S. В соответствии с числом и расположением обратных мутаций конструировали четыре различные гуманизованные тяжелые цепи VH1 (SEQ ID NO: 2), VH2 (SEQ ID NO: 3),  
15 VH3 (SEQ ID NO: 4) и VH4 (SEQ ID NO: 5), соответственно. Для обратных мутаций отобрали 3 сайта в переменной области легкой цепи антитела 38E11: M4L, V62I и L82V, и конструировали четыре различные гуманизованные легкие цепи VL1 (SEQ ID NO: 7), VL2 (SEQ ID NO: 8), VL3 (SEQ ID NO: 9) и VL4 (SEQ ID NO: 10), соответственно. Таким образом, конструировали и дополнительно характеризовали гуманизованное антитело  
20 38E11, Hu38E11, и его варианты Hu38E11-v1, Hu38E11-v2, Hu38E11-v3 и Hu38E11-v4. Последовательности аминокислот, содержащиеся в каждом антителе, показаны в Таблицах 2 и 3.

### 2.3 Экспрессия гуманизованных антител.

Вариабельные области, происходящие из антитела 38E11, происходящего из  
25 гибридомы, или их гуманизованные последовательности амплифицировали и клонировали в вектор, содержащий константную область IgG человека, для получения экспрессируемой плазмиды. Константные области тяжелой цепи этих антител могут быть получены из любого подтипа IgG человека (например, последовательностей аминокислот константных областей тяжелой цепи IgG1 человека, таких как те, которые представляют собой SEQ ID NO:21, и последовательностей аминокислот константных областей тяжелой  
30 цепи IgG2 человека, таких как те, которые представляют собой SEQ ID NO:22), или его вариантов. Однако, если конкретно не указано иное, константные области тяжелой цепи Hu38E11 и их варианты были идентичны последовательности константной области тяжелой цепи IgG1 человека. Клетки 293 совместно трансфицировали векторами  
35 экспрессии, содержащими тяжелые и легкие цепи. После культивирования при 37°C в

течение 4-6 дней супернатанты собирали, и в соответствии с описанным выше способом получали рекомбинантные антитела с помощью аффинной очистки на белке А для дальнейшей характеристики антител.

Таблица 2 Последовательности аминокислот, содержащиеся в антителах к OX40

38E11 и его варианты	Последовательность аминокислот VH	Последовательность аминокислот VL
38E11	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6
Hu38E11	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 7
Hu38E11-v1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9
Hu38E11-v2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7
Hu38E11-v3	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 9
Hu38E11-v4	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 8

5

Таблица 3 Последовательности аминокислот CDR, содержащиеся в антителах к OX40 (определение по Kabat)

CDR	Последовательности аминокислот
HCDR1	SEQ ID NO: 11
HCDR2	SEQ ID NO: 12
HCDR3	SEQ ID NO: 13
LCDR1	SEQ ID NO: 14
LCDR2	SEQ ID NO: 15
LCDR3	SEQ ID NO: 16

### Пример 3 Детектирование активности связывания гуманизованных антител с OX40 на активированных Т-клетках с помощью FACS

10

В соответствии со способом детектирования, описанным в предшествующем Примере 1.2, FACS применяли для анализа активности связывания гуманизованных антител с OX40 на активированных Т-клетках человека.

15

Результаты: Как показано в Таблице 4, гуманизованное антитело Hu38E11 и его варианты показали лучшую активность связывания с OX40 на поверхности активированных Т-клеток человека.

Таблица 4 Активность связывания антитела Hu38E11 и его вариантов с OX40 на активированных Т-клетках

Антитело	ЭК <sub>50</sub> , нМ
OX40mAb24	6,23

Hu38E11	4,56
Hu38E11-v1	5,03
Hu38E11-v2	3,35
Hu38E11-v3	3,48
Hu38E11-v4	3,02

#### Пример 4 Определение агонистической активности гуманизированных антител в отношении Т-клеток

В соответствии со способом, описанным в предшествующем Примере 1.3, агонистическую активность гуманизированного антитела в отношении Т-клеток оценивали путем детектирования воспалительного цитокина IFN- $\gamma$ , высвобождаемого активированными Т-клетками в присутствии антитела.

Как показано в Таблице 5, гуманизированное антитело Hu38E11 и его варианты могут эффективно стимулировать высвобождение IFN- $\gamma$  активированными Т-клетками, т.е. гуманизированное антитело Hu38E11 и его варианты обладают агонистической активностью в отношении Т-клеток. По сравнению с референсным антителом OX40mAb24 гуманизированное антитело Hu38E11 и его варианты показали более низкое значение ЭК<sub>50</sub> (показатель активности, направленной на стимуляцию высвобождения IFN- $\gamma$  Т-клетками), что указывает на более значительную агонистическую активность.

Таблица 5 Агонистическая активность антитела Hu38E11 и его вариантов в отношении Т-клеток

Антитело	ЭК <sub>50</sub> (нМ) (максимальная концентрация IFN- $\gamma$ (нг/мл))
OX40mAb24	7,1 (27370)
Hu38E11	2,4 (24821)
Hu38E11-v1	0,7 (21649)
Hu38E11-v2	1 (22517)
Hu38E11-v3	1,7 (22480)
Hu38E11-v4	0,9 (21720)

#### Пример 5 Детектирование активности связывания гуманизированных антител с OX40 человека с помощью Biacore

Biacore применяют, чтобы определить параметры кинетики связывания путем измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Эту технологию применяли для детектирования микроскопических констант скорости связывания ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) антитела и антигена. На основании значений  $k_a$  и  $k_d$  получают значение аффинности антитела в отношении антигена. Как устройство Biacore, так и реагенты приобретали у GE Healthcare. В частности, антитело к Fc человека иммобилизовали на сенсорном чипе CM5.

Супернатанты, содержащие экспрессированное антитело или очищенные антитела, разбавляли в буфере подвижной фазы (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% твин-20, pH 7,4), и пропускали через чип CM5, покрытый антителом к Fc человека. Затем серийно разведенные слитые белки OX40 человека-His пропускали через детектирующий чип, чтобы измерить связывание антигена с антителом, а затем буфер подвижной фазы пропускали через чип для детектирования диссоциации антигена от антитела. Собирали данные сигналов связывания и диссоциации антигена и антитела при различных концентрациях и аппроксимировали при 1:1 с помощью модели Ленгмюра, чтобы рассчитать аффинность между антигеном и антителом.

10 Как показано в Таблице 6, Hu38E11 связывается с OX40 человека с высокой аффинностью со значением  $K_D$   $2,36 \times 10^{-9}$  (M).

Таблица 6 Детектирование кинетических констант связывания гуманизированных антител с OX40 человека с помощью Biacore

Антитело	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)
OX40mAb24	$2,95 \times 10^5$	$3,52 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-8}$
11D4	$1,73 \times 10^5$	$4,35 \times 10^{-4}$	$2,51 \times 10^{-9}$
Hu38E11	$1,67 \times 10^5$	$3,94 \times 10^{-4}$	$2,36 \times 10^{-9}$

### 15 **Пример 6 Агонистическая активность гуманизированного антитела Hu38E11 в отношении Т-клеток**

В соответствии со способом, описанным в предыдущем Примере 1.3, агонистическую активность Hu38E11 (IgG2) с подтипом антитела IgG2 в отношении Т-клеток оценивали путем детектирования воспалительного цитокина IFN- $\gamma$ , высвобождаемого Т-клетками.

20 Результаты: Как показано на Фигуре 1, при условии, что планшет был покрыт антителом, Hu38E11 (IgG2) также показало агонистическую активность в отношении Т-клеток с ЭК<sub>50</sub> 1,6 нМ, которая была ниже, чем у референсного антитела 11D4 (ЭК<sub>50</sub> = 5,3 нМ).

### 25 **Пример 7 Блокирующий эффект гуманизированных антител на связывание OX40 с OX40L**

30 В этом эксперименте применяли метод ИФА для определения активности антитела Hu38E11 в блокировании связывания OX40 с его лигандом OX40L. Вкратце, OX40 (R & D Systems, № по каталогу 3388-OX) разбавляли ФСБ, затем добавляли в 96-луночный планшет, и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали 3 раза ФСБ,

содержащим 0,5% твин-20, для удаления несвязанных белков, затем планшеты блокировали путем добавления ФСБ, содержащего 1% БСА, при 200 мкл/лунку при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки планшета 3 раза ФСБ, содержащим 0,5% твин-20, серийно разведенные антитела к ОХ40 добавляли в 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза ФСБ, содержащим 0,5% твин-20. Затем добавляли ОХ40L (R & D Systems, № по каталогу 1054-ОХ) в конечной концентрации 50 нг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки планшета 3 раза добавляли меченое биотином антитело к ОХ40L (R & D Systems, № по каталогу BAF1054) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем планшет промывали, а затем добавляли ПХ-меченый стрептавидин (R & D Systems, № по каталогу DY998) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет промывали. В каждую лунку добавляли 200 мкл раствора ТМВ для проявления окрашивания, чтобы проявить окрашивание, и реакцию останавливали 2 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Значение O.D. детектировали при 450 нм и фоновое значение O.D. измеряли при 570 нм на считывающем устройстве для микропланшетов.

Как показано на Фигуре 2, Hu38E11 (IgG1 N297A) блокировало связывание ОХ40 с ОХ40L с максимальным показателем ингибирования 90%, который превышал максимальный показатель ингибирования в 50% референсных антител GBR830 и ОХ40mAb24. Значения ИК<sub>50</sub> Hu38E11 (IgG1 N297A) и GBR830 составляли приблизительно 0,3 нМ, а значение ИК<sub>50</sub> ОХ40mAb24 составляло приблизительно 1,2 нМ.

### **Пример 8 Блокирующее действие гуманизированных антител на ОХ40-ОХ40L-опосредуемую активацию Т-клеток**

Первичные МКПК человека выделяли из цельной крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, № по каталогу 17-1440-02). Средний слой собирали и промывали 3 раза ФСБ с получением МКПК. Затем выделяли первичные Т-клетки человека с помощью набора для выделения общей популяции Т-клеток (Miltenyi Biotec, № по каталогу 130-096-535), используя магнитные гранулы в соответствии со способом, рекомендованным инструкциями. Т-клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 (содержащей 10% ФБС и биантибиотики пенициллин/стрептомицин). Антитело к CD3 ОКТ3 (eBioscience, № по каталогу 16-0037-85) добавляли в 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку и покрывали при 37°C в течение 2 часов. Несвязанные антитела удаляли путем промывки ФСБ. Серийно разведенные антитела к ОХ40 смешивали с ОХ40L (R & D Systems, № по каталогу 1054-ОХ) в конечной концентрации 664 нг/мл. Смеси добавляли в покрытый 96-луночный планшет, а

выделенные Т-клетки добавляли в лунки и культивировали в течение 3 дней, а затем собирали супернатант. Концентрацию IFN- $\gamma$  в супернатанте детектировали методом ИФА (R&D, № по каталогу SIF50) в соответствии со стандартным методом детектирования, рекомендованным инструкциями.

5 В функциональном эксперименте с Hu38E11 (IgG1 N297A), блокирующим взаимодействие OX40L-OX40: планшет покрывали антителом к CD3, и для стимуляции Т-клеток добавляли OX40L в качестве нативного лиганда OX40, одновременно с этим в культуральную систему добавляли свободное антитело к OX40, чтобы детектировать блокирующее действие антитела на функцию, индуцированную связыванием OX40L с  
10 OX40. Поскольку планшет не был покрыт антителом к OX40, молекула антитела к OX40 не могла стимулировать секрецию IFN- $\gamma$  Т-клетками в отсутствие перекрестного связывания. Кроме того, антитело к OX40 связывалось с OX40 на поверхности клетки и блокировало связывание OX40L с OX40, ингибируя посредством этого OX40L-индуцированную секрецию IFN- $\gamma$  Т-клетками.

15 В соответствии с результатами, показанными на Фигуре 3, антитело Hu38E11 (IgG1 N297A) может ингибировать секрецию IFN- $\gamma$ , стимулированную OX40L, в более высоких концентрациях, это указывает на блокирующий эффект антитела на активацию Т-клеток под действием OX40L. По сравнению с GBR830 Hu38E11 (IgG1 N297A) обладало более сильной активностью по блокированию OX40L-опосредуемой активации Т-клеток и имело  
20 более низкое значение ИК<sub>50</sub> (0,3 нМ для Hu38E11 (IgG1 N297A) и 1,1 нМ для GBR830).

### **Пример 9 Влияние областей Fc гуманизированных антител на агонистическую активность в отношении Т-клеток**

Агонистическую активность Hu38E11 с другой областью Fc в отношении Т-клеток  
25 можно оценить путем измерения стимулирующего эффекта антитела на NF- $\kappa$ B-опосредуемую активацию транскрипции в анализе репортерного гена люциферазы. Конструировали рекомбинантные клетки Jurkat (Jurkat-OX40-NF- $\kappa$ B-Luc; приобретенные у Chempartner), которые сверхэкспрессируют OX40 человека и имеют репортерный ген люциферазы (Luc) под контролем передачи сигналов NF- $\kappa$ B. Антитело к CD3 (eBioscience,  
30 № по каталогу 16-0037-85) добавляли в 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку, и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Несвязанное антитело удаляли с помощью промывки ФСБ. Затем клетки Jurkat-OX40-NF- $\kappa$ B-Luc и клетки Raji смешивали в соотношении 1:1 и затем добавляли в покрытый 96-луночный планшет и после этого добавляли серийно разведенные Hu38E11 (IgG1), Hu38E11 (IgG1 N297A) или hIgG1. Через

5 часов инкубации относительное количество экспрессии люциферазы детектировали с использованием реагента для детектирования Steady-Glo (Promega).

В этом эксперименте Hu38E11 (IgG1) инициировало нисходящую передачу сигнала OX40 путем перекрестного связывания за счет рецепторов FcγR на поверхности клеток Raji.

5 Это вызывало экспрессию репортерного гена под контролем NF-κB ( $EC_{50} = 0,70$  нМ).  
Напротив, из-за мутации N297A Hu38E11 (IgG1 N297A) не может связываться с рецепторами FcγR и не может быть перекрестно связано, и, таким образом, не может активировать нисходящую передачу сигнала OX40. Кроме того, за счет блокирования связывания OX40 с OX40L, экспрессируемым на поверхности клеток Raji, антитело  
10 показало значительный ингибирующий эффект на экспрессию репортерного гена люциферазы под контролем NF-κB ( $IC_{50} = 0,20$  нМ) (как показано на Фигуре 4).

### **Пример 10 Противоопухолевая активность гуманизированного антитела Hu38E11 в ксенотрансплантатной модели подкожной опухоли B16F10**

15 Чтобы исследовать противоопухолевую активность антитела согласно настоящему изобретению, создавали модель подкожной опухоли B16-F10 у трансгенных мышей C57BL/6-Tnfrsf4<sup>em1Clin(hTBFRSF4)</sup>, экспрессирующих OX40 человека.

Клетки меланомы мыши B16-F10 (ATCC<sup>®</sup> CRL-6475<sup>™</sup>) культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Опухолевые клетки  
20 суспендировали в RPMI1640 и имплантировали подкожно в правый бок самок трансгенных мышей (Jiangsu GemPharmatech Biotechnology Co., Ltd.) в дозе  $1 \times 10^5$  клеток/мышь.

В день инокуляции опухолевых клеток (день 1) мышей случайным образом разделяли на 3 группы в соответствии с их массой тела, 12 мышей в первой группе (h-IgG2), 13 мышей во второй группе (11D4 (IgG2)) и 13 мышей в третьей группе (Hu38E11 (IgG2)). Антитела  
25 разбавляли ДФСБ и вводили путем однократной внутривенной инъекции в дозе 10 мг/кг. Объемы опухолей (объем опухоли =  $0,5 \times \text{длинный диаметр} \times \text{короткий диаметр}^2$ ) и массу тела мышей регулярно измеряли. Рассчитывали показатели ингибирования опухоли антителом на день 15 и день 16 после введения.

Формула для расчета показателя ингибирования опухоли приведена далее: [(объем  
30 опухоли в контрольной группе - объем опухоли в группе лечения)/объем опухоли в контрольной группе]  $\times$  100%. Формула для расчета относительной массы тела мыши приведена далее: (масса тела мыши в день измерения/масса тела мыши во время распределения по группам)  $\times$  100%.

Результаты: 11D4 (референсное антитело) и Hu38E11 (IgG2, антитело согласно  
35 настоящему изобретению) в дозе 10 мг/кг показали показатели ингибирования роста

опухоли 33,2% и 48,1%, соответственно. Кроме того, в ходе исследования масса мышей в каждой группе быстро увеличивалась, при этом не наблюдали аномального поведения, это указывает на то, что антитела хорошо переносятся всеми животными.

#### 5 **Пример 11 Активность гуманизованного антитела Hu38E11 (IgG1 N297A), направленная против иммунного отторжения**

10 Модель болезни «трансплантат против хозяина» (РТПХ) создавали путем трансплантации первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека (чМКПК) от здоровых добровольцев иммунодефицитным мышам NOD-Prkdc<sup>em26Cd52</sup>Il2rg<sup>em26Cd22</sup>/Nju (NCG) и использовали для исследования активности антитела согласно настоящему изобретению, направленной против иммунного отторжения.

Первичные МКПК человека выделяли из цельной крови, полученной от здоровых доноров, путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque, и МКПК суспендировали в фосфатном буфере (ФСБ).

15 За день до трансплантации МКПК (день -1) мышей случайным образом разделяли на 7 групп в соответствии с их массой тела. Группы показаны в Таблице 7. В день трансплантации (день 0) всех мышей облучали  $\gamma$ -излучением <sup>137</sup>Cs в однократной дозе 1,5 Гр ТВІ (общее облучение тела), затем антитело Hu38E11 (IgG1 N297A) и GBR830, разбавленные ФСБ, вводили в/в еженедельно через хвост в дозе 1 мг/кг и в объеме 5 мл/кг, 20 и, наконец, мыши получали однократную инъекцию МКПК в хвостовую вену  $2,5 \times 10^7$  клеток/мл при 0,2 мл/мышь. Выживаемость мышей контролировали каждый день, и массу тела мышей регулярно измеряли. Конечной точкой для эвтаназии было достижение относительной потери массы тела до 20%, и время выживаемости регистрировали.

25 Формула для вычисления относительной массы тела мыши приведена далее: (масса тела мыши в день измерения/масса тела мыши во время распределения по группам)  $\times$  100%.

Таблица 7 Распределение по группам и режимы дозирования для лечения Hu38E11 (IgG1 N297A) в модели индуцированной чМКПК болезни «трансплантат против хозяина»

Группы	Модельная обработка	Введенная доза (мг/кг)	Число животных (День 64/День 0)	Режимы дозирования
Группа ТВІ	Облучение 1,5 Гр	-	6/6	-
Группа ТВІ + hIgG1		1	6/6	Инъекция в хвостовую вену 5 мл/кг IgG1, 1 раз в неделю

Группа TBI + Hu38E11 (IgG1 N297A)		1	6/6	Инъекция в хвостовую вену 5 мл/кг Hu38E11 (IgG1 N297A), один раз в неделю
Группа чМКПК + hIgG1		1	0/6	Инъекция в хвостовую вену 5 мл/кг hIgG1, 1 раз в неделю
Группа чМКПК + GBR830	1,5 Гр облучение, 5×10 <sup>6</sup> клеток чМКПК/мышь	1	4/6	Инъекция в хвостовую вену 5 мл/кг GBR830, 1 раз в неделю
Группа чМКПК + Hu38E11 (hIgG1 N297A)		1	6/6	Инъекция в хвостовую вену 5 мл/кг Hu38E11 (IgG1 N297A), один раз в неделю

Экспериментальные результаты показаны на Фигуре 5. В этом эксперименте все мыши из модельной контрольной группы (группа чМКПК+ hIgG1) умерли на 48 день с медианным временем выживаемости 32,5 дня; все мыши, получавшие антитело Hu38E11 (IgG1 N297A) согласно настоящему изобретению в дозе 1 мг/кг, выжили до 64 дня эксперимента, медианное время выживаемости не может быть рассчитано, и было существенное различие по сравнению с модельной контрольной группой (группа чМКПК+ hIgG1) (\*\*:  $p < 0,01$ ). Показатель выживаемости мышей, получавших положительное референсное антитело GBR830 в дозе 1 мг/кг, составлял 66,7% на 64 день эксперимента, медианное время выживаемости не может быть рассчитано, и не было статистического различия по сравнению с модельной контрольной группой.

#### Описание перечня последовательностей

Серийный номер (SEQ. ID NO.)	Последовательность
1	QVQLQQPGAELVRPGSSVQLSCKASGYTFTSYWVDWVKQRP GQGLQWIGNIYPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARSYGYGTWFAFWGQGLTVTSA
2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWVDWVRQAP GQGLEWMGNIYPSDSETHYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSYGYGTWFAFWGQGLTVTSS

3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWVDWVRQAP GQGLEWIGNIYPSDSETHYNQKFKDRVTMTVDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARSYGYGGTWFAYWGQGTLVTVSS
4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWVDWVRQAP GQGLEWIGNIYPSDSETHYNQKFKDRVTMTVDTSTSTAYMEL SSLRSEDSAVYYCARSYGYGGTWFAYWGQGTLVTVSS
5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTSYWVDWVRQAP GQGLEWIGNIYPSDSETHYNQKFKDKVTLTVDTSTSTAYMELS SLRSEDSAVYYCARSYGYGGTWFAYWGQGTLVTVSS
6	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDSSGNSFMHWYQQK PGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVA TYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIK
7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSSGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIK
8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSSGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIK
9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSSGNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDV AVYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIK
10	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDSSGNSFMHWYQQK PGQPPKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIK
11	SYWVD
12	NIYPSDSETHYNQKFKD
13	SYGYGGTWFAY
14	RASESVDSSGNSFMH
15	RASNLES
16	QQSNEDPWT
17	CAGGTCCA ACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGC CTGGGTCTTCAGTGCAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAC ACCTTCACCAGCTACTGGGTGGATTGGGTGAAGCAGAGGCC TGGACAAGGCCTTCAATGGATTGGTAACATTTACCCTTCTG ATAGTGAACTCACTACAATCAAAAAGTTCAAGGACAAGGC CACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC

	AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTAC TGTGCAAGATCTTATGGTTACTACGGGACCTGGTTTGCTTA CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
18	CAGGTTTCAGTTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACC TGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACA CCTTTACCAGCTACTGGGTGCGACTGGGTCCGACAGGCTCCT GGACAAGGACTGGAATGGATGGGCAACATCTACCCCTCCG ACTCCGAGACACACTACAACCAGAAATCAAGGACCGCGT GACCATGACCAGAGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATG GAACTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGCGCCAGATCCTACGGTACTACGGCACTTGGTTTGCTT ATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCAACGTTTCTTCC
19	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCT CTAGGGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAA GTGTTGATAGTTCTGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAG CAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCGTGC ATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTG GAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAA TGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAAGTAA ATCAAA
20	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTGACAGCCTGGCTGTGTC TCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAGAGCCTCTGAGT CCGTGGACTCCTCCGGCAACTCTTTCATGCACTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACAGAGC CTCCAACCTGGAATCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCT CTGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTG CAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAA CGAGGACCCCTGGACATTTGGCGGGCGGAACAAAGCTGGAA ATCAAG
21	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPPKPDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

5 (1) от одного до трех HCDR, выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), причем последовательность аминокислот указанной VH представлена в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5; и/или

(2) от одного до трех LCDR, выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи (VL), причем последовательность аминокислот указанной VL  
10 представлена в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10.

причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержит варианта области Fc, который представляет собой IgG1 N297A человека.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие HCDR1,  
15 HCDR2 и HCDR3 из VH и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 из VL, причем указанные VH и VL выбраны из:

(1) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6;

(2) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и VL,  
20 содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 9;

(3) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 9; или

(4) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 8.

25

3. Выделенное антитело к OX40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(1) от одного до трех определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR), выбранных из HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит  
30 последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13; и/или

(2) от одного до трех определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR), выбранных из LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит  
35 последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит

последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, и указанный Lcdr3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 16;

причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не содержит варианта области Fc, который представляет собой IgG1 N297A человека.

5

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащие:

(1) определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR), HCDR1, HCDR2 и HCDR3, причем указанный HCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 11, указанный HCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 12, и указанный HCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 13; и/или

(2) определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR), LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем указанный LCDR1 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 14, указанный LCDR2 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 15, и указанный LCDR3 содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 16.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащие:

(1) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5; и/или

(2) переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность аминокислот, идентичную или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот согласно SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот согласно любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5, и указанная VL содержит последовательность аминокислот согласно любой из SEQ ID NO: 7, 8, 9 или 10.

35

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанные VH и VL выбраны из:

- (1) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 1, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 6;
- (2) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 9;
- (3) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 3, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 9; или
- (4) VH, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 4, и VL, содержащей последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7 или 8.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 2, и причем указанная VL содержит последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 7.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое(ый) представляет собой мышиное антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое(ый) представляет собой полноразмерное антитело, однодоменное антитело (такое как VHH), Fab, антитело Fab', Fab'-SH, антитело (Fab')<sub>2</sub>, одноцепочечное антитело (такое как scFv), Fv, dAb (доменное антитело) или бис(мульти)-специфичное антитело.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, содержащие область Fc, причем указанная последовательность аминокислот области Fc идентична последовательности области Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека, или представляет собой их вариант.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое(ый) имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с OX40 человека менее 10 нМ.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое(ый) блокирует связывание OX40 с его лигандом OX40L.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, которое(ый) представляет собой антитело-агонист к OX40 и обладает активностью в отношении активации OX40-опосредуемой передачи сигнала.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 14, содержащие область Fc, которая связывается с FcγR.

10

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 14, содержащие область Fc, причем последовательность аминокислот указанной области Fc идентична последовательности области Fc IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

15 17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, которое(ый) представляет собой антитело-антагонист к OX40 и обладает активностью в отношении блокирования OX40-опосредуемой передачи сигнала.

20 18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17, содержащие вариант области Fc, причем связывание указанного варианта области Fc с FcγR снижено или устранено.

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

25

20. Рекombинантный вектор или вектор экспрессии, содержащий одну или более нуклеиновых кислот по п. 19, причем указанный вектор подходит для рекombинантной продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-18.

30 21. Клетка-хозяин, содержащая один или более рекombинантных векторов или векторов экспрессии по п. 20.

22. Иммуноконъюгат или иммунная слитая молекула, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18.

35

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18, нуклеиновую кислоту по п. 19, вектор по п. 20, клетку-хозяина по п. 21, или иммуноконъюгат или иммунную слитую молекулу по п. 22, и необязательно содержащая по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

24. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-18, нуклеиновой кислоты по п. 19, вектора по п. 20, клетки-хозяина по п. 21 или иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы по п. 22 при получении лекарственного средства для лечения или предотвращения связанного с ОХ40 заболевания или состояния.

25. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 14-16, нуклеиновой кислоты по п. 19, вектора по п. 20, клетки-хозяина по п. 21 или иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы по п. 22 при получении лекарственного средства для лечения или предотвращения рака, такого как меланома, предпочтительно метастатическая меланома.

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 17-18, нуклеиновой кислоты по п. 19, вектора по п. 20, клетки-хозяина по п. 21 или иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы по п. 22 при получении лекарственного средства для лечения или предотвращения воспаления и/или аутоиммунного заболевания, такого как болезнь «трансплантат против хозяина».

27. Способ лечения или предотвращения связанного с ОХ40 заболевания или состояния, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-18, нуклеиновой кислоты по п. 19, вектора по п. 20, клетки-хозяина по п. 21 или иммуноконъюгата или иммунной слитой молекулы по п. 22.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанное связанное с ОХ40 заболевание или состояние представляет собой воспаление и/или аутоиммунное заболевание, такое как болезнь «трансплантат против хозяина».

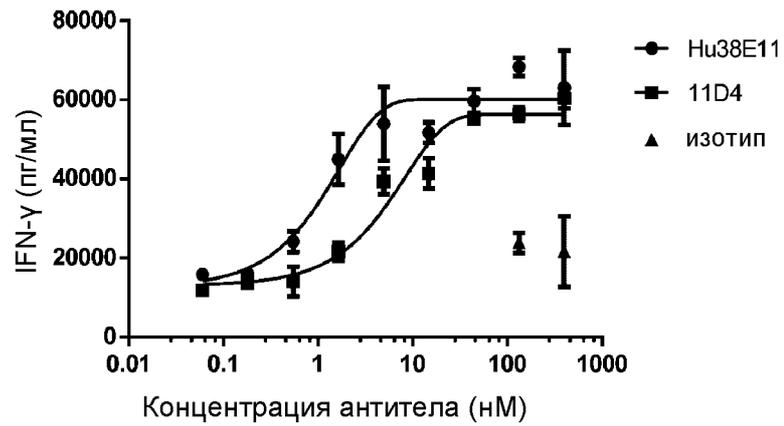
29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанное связанное с ОХ40 заболевание или состояние представляет собой рак, такой как меланома, предпочтительно метастатическая меланома.

5 30. Способ детектирования ОХ40 в образце, включающий:

(а) приведение указанного образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-18 или иммуноконъюгатом или иммунной слитой молекулой по п. 22; и

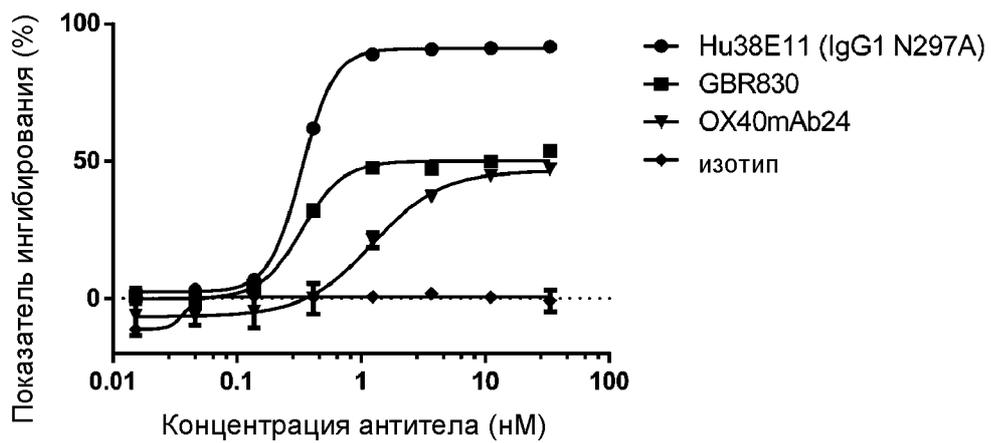
10 (b) детектирование образования комплекса указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата, или иммунной слитой молекулы с белком ОХ40.

Антитело Hu38E11-IgG2 усиливает секрецию IFN- $\gamma$  Т-клетками человека, предварительно активированными антителом к CD3



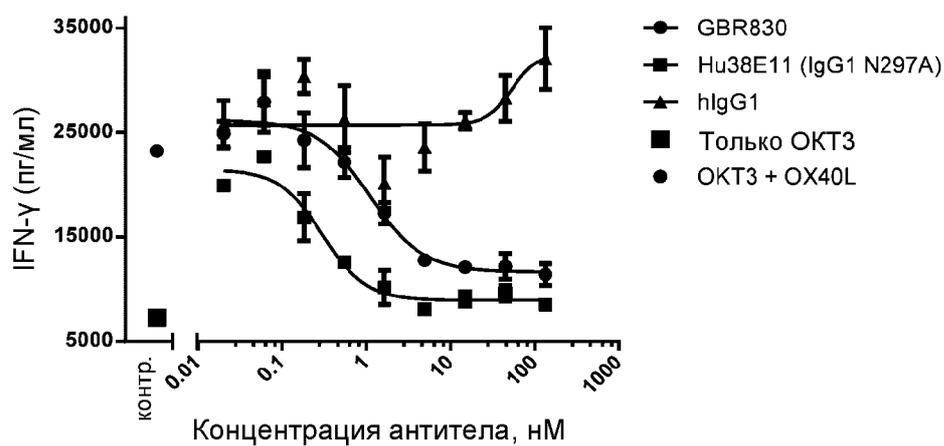
Фиг. 1

Антитело Hu38E11 блокирует связывание OX40 с OX40L

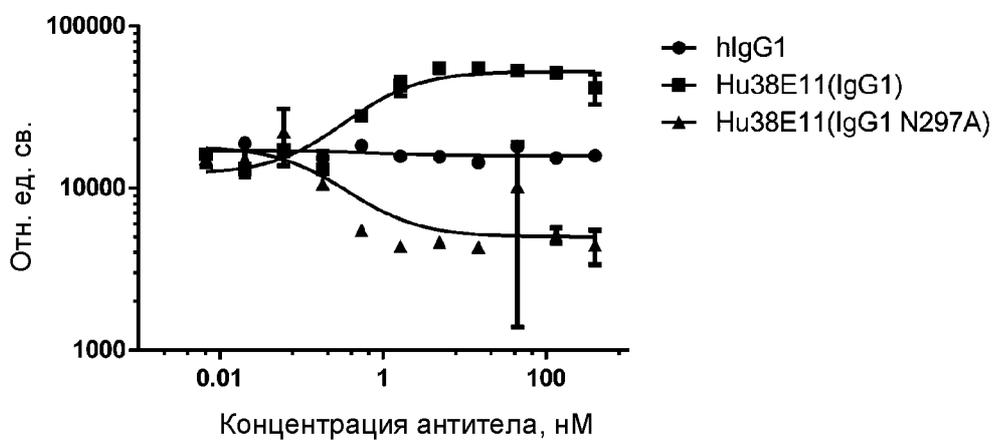


Фиг. 2

Эффект блокировки антителом OX40L-индуцированной секреции  
IFN- $\gamma$  Т-клетками человека



Фиг. 3



Фиг. 4

