

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 031849

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.03.29

(21) Номер заявки

201500204

(22) Дата подачи заявки

2011.08.23

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ОХ40 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/375,999; 61/380,827

(32) 2010.08.23; 2010.09.08

(33) US

(43) 2015.11.30

(62) 201390278; 2011.08.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ

ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС

СИСТЕМ (US)

(56) WO-A2-2007062245

US-A1-20060281072

REDMOND William L. et al. "Targeting OX40 and OX40L for the Treatment of Autoimmunity and Cancer". Critical Reviews in Immunology, 2007; 27(5): p. 415-436, (реферат), DOI:10.1615/CritRevImmunol.v27.i5.20

DATABASE GenBank: ABY66176.1,

19.01.2008

DATABASE GenBank: AAO23242.1,

21.01.2003

(72) Изобретатель:

Лю Юн-Цзюнь, Ву Куи Синь, Бовер

Лаура, Цурусита Наоя, Тсо Дж. Юнь,

Кумар Шанкар (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение описывает антитела человека, предпочтительно рекомбинантные антитела человека, как гуманизированные, так и химерные, которые специфически связываются с ОХ40 человека. Предпочтительные антитела имеют высокую аффинность к рецептору ОХ40 и активируют рецептор *in vitro* и *in vivo*. Антитело может быть полноразмерным антителом или его антигенсвязывающей детерминантой. Антитела или детерминанты антител полезны в модуляции активности рецептора, например, у людей, страдающих от нарушений, в которых активность ОХ40 вредна. Описаны нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных антител человека и также приведены способы синтеза рекомбинантных антител человека.

B1

031849

031849
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится в основном к модуляции активации рецептора OX40 и более конкретно к модуляции рецептора OX40 для ингибирования иммуносупрессивной функции интерлейкин-10 (ИЛ-10)-продуцирующих CD4⁺ регуляторных Т-клеток 1-го типа ("Tr1-клетки") и Foxp3⁺-экспрессирующих регуляторных Т-клеток (также иногда называемых в настоящем документе "Foxp3⁺ T-reg" клетки) и формирования Tr1-клеток из CD4⁺ клеток или наивных клеток и продукции ИЛ-10.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет заявки на патент США № 61/375999, поданной 23 августа 2010 г., и заявки на патент США № 61/380827, поданной 8 сентября 2010 г. Обе заявки включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Заявление относительно финансирования исследования или разработки из федерального бюджета

Описываемое изобретение сделано при поддержке правительства на основании грантов R01 AI061645-01, R01 AI062888-01 и U19 AI071130-01, выданных National Institute of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Имена сторон соглашения о совместном исследовании

Отсутствуют.

Ссылка на списки последовательностей

Настоящее изобретение содержит списки последовательностей, представленные в виде текстового файла в соответствии с 37 CFR § 1.52 (e) (V), названного sequence listing.txt, созданного 23 августа 2011 г., размером 13836 байт, который включен в настоящий документ в качестве ссылки. Прилагаемые описания последовательностей и списки последовательностей отвечают правилам, регулирующим описание нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей в патентных заявках, как указано в 37 CFR § 1.821-1.825. Списки последовательностей содержат однобуквенный код для символов нуклеотидных последовательностей и трехбуквенные коды для аминокислот, что определено в соответствии со стандартами IUPAC-IUBMB, описанными в Nucleic Acids Res. 13:3021-3030 (1985) и в Biochemical J. 219 (No. 2):345-373 (1984). Символы и формат, используемые для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соответствуют правилам, изложенным в 37 CFR § 1.822.

Известный уровень техники

Tr1-клетки играют важную роль в периферической толерантности. Tr1-клетки являются особенно важными в ограничении повреждения тканей хозяина при воспалительных иммунных ответах. Формирование Tr1-клеток сопровождается как TH1, так и TH2 иммунные ответы *in vivo* и *in vitro*.

Tr1-клетки формируются из наивных CD4⁺ Т-клеток во время антиген-индуцированного Т-клеточного иммунного ответа. Tr1-клетки анергичны в ответ на активацию через рецепторы TCR, CD28 и ИЛ-2 и обладают способностью подавлять антиген-индуцируемую пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток *in vivo* и *in vitro*. Tr1-клетки обладают способностью ингибировать развитие аутоиммунных заболеваний и ограничивать величину иммунного ответа на микробные патогены.

Несмотря на то что были изучены молекулярные сигналы, которые ведут к формированию Tr1-клеток, мало известно о молекулярных сигналах, которые негативно регулируют формирование этих клеток. Хотя иммуносупрессивные препараты, цитокины, ко-стимулирующие молекулы и ДК вовлечены в индукцию Tr1-клеток, сигналы, которые негативно регулируют формирование Tr1-клеток, остаются неуловимыми.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с OX40, содержащее:

- (a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
- (b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;
- (e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
- (f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Вариантом настоящего изобретения является выделенное антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, которая на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

Другим вариантом настоящего изобретения является вышеуказанное выделенное антитело, которое представляет собой моноклональное антитело.

Другим вариантом настоящего изобретения является вышеуказанное выделенное антитело, которое представляет собой гуманизированное антитело.

Другим вариантом настоящего изобретения является выделенное антитело, которое содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, которая на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему фрагменту вышеуказанного антитела, где антигенсвязывающий фрагмент сохраняет способность специфически связываться с OX40 и проявлять активность агониста.

Настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей вышеуказанное антитело или вышеуказанному антигенсвязывающему фрагменту.

Настоящее изобретение относится к выделенной клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеуказанное антитело или вышеуказанный антигенсвязывающий фрагмент.

Настоящее изобретение относится к способу получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающему стадию культивирования вышеуказанной клетки-хозяина *ex vivo*.

Вариантом настоящего изобретения является способ, дополнительно включающий выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина.

Настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного выделенного антитела или вышеуказанного антигенсвязывающего фрагмента в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного антитела или вышеуказанного антигенсвязывающего фрагмента для лечения рака.

Настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного антитела или вышеуказанного антигенсвязывающего фрагмента для получения лекарственного средства, где лекарственное средство предназначено для лечения рака.

Краткое описание чертежей

Манеру, в которой вышеупомянутые признаки, аспекты и преимущества изобретения, а также другое, что станет очевидными, достигаются и могут быть поняты в деталях, более конкретное описание изобретения, кратко изложенное выше, возможно увидеть путем ссылки на варианты его осуществления, которые представлены на фигурах, являющихся частью этого описания изобретения. Следует, однако, отметить, что прилагаемые фигуры иллюстрируют некоторые варианты осуществления изобретения и, следовательно, не должны рассматриваться как ограничивающие рамки изобретения, для изобретения могут быть признаны другие столь же эффективные варианты осуществления изобретения.

Фиг. 1 демонстрирует, что FOXP3⁺ Tregs проникли в ткани фолликулярной лимфомы (ФЛ) человека и ко-локализовались с опухолевыми В-клетками и моноцитами. Слева: Двойное иммунное окрашивание FOXP3⁺ Tregs (красный цвет) и CD20⁺ В-клеток лимфомы (зеленый цвет); справа: FOXP3⁺ Tregs (красный цвет) и CD11c⁺ моноциты/макрофаг/ДК (зеленый цвет).

Фиг. 2А и 2В описывают возросшее число CD4⁺FOXP3⁺ Tregs у пациентов с ФЛ. Опухолевые клетки и МКПК были получены от шести пациентов с ФЛ при начальной диагностике до лечения. МКПК были также получены от шести здоровых доноров для сравнения. Проценты регуляторных Т-клеток от общего числа CD4⁺ Т-клеток определяли с помощью проточного цитометрического анализа CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Treg. Фиг. 2А демонстрирует репрезентативный FACS анализ Tregs. МКПК ФЛ и клетки опухоли ФЛ были взяты от того же пациента. Фиг. 2В демонстрирует процент Tregs всех доноров. Горизонтальная полоса указывает значения.

Фиг. 3 демонстрирует выделение ICOS⁺FOXP3⁺ или ICOS⁻FOXP3⁺ Tregs из ФЛ. Была получена суспензия отдельных клеток из образца селезенки до какого-либо лечения. Клетки оттаивали в день анализа. Обогащенные CD4⁺CD8⁻CD14⁻CD16⁻CD56⁻CD11c⁺TCR $\gamma\delta$ ⁻ Т-клетки были разделены на субпопуляции CD25^{low} и CD25^{high}. CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Tregs были дополнительно разделены на субпопуляции ICOS^{high} и ICOS^{low} на основе поверхностной экспрессии ICOS. Была определена внутриклеточная экспрессия FOXP3 во всех субпопуляциях.

Фиг. 4 демонстрирует ингибирование пролиферации инфильтрирующих CD4⁺CD25⁻ Т-клеток в ФЛ внутриопухолевыми Tregs, и ингибирование может быть частично блокировано анти-ИЛ-10-нейтрализирующими антителами. Меченные CFSE инфильтрирующие опухоль CD4⁺CD25⁻ Т-клетки культивировали с аутологичными опухолевыми клетками, предварительно активированными рекомбинантным CD40L в присутствии или в отсутствии аутологичных ICOS⁺FOXP3⁺ Tregs или ICOS⁻FOXP3⁺ Tregs, или анти-ИЛ-10 (10 мкг/мл). После 72 ч культивирования определяли пролиферацию клеток CD4⁺CD25⁻ при помощи проточного цитометрического анализа разведения CFSE.

Фиг. 5А демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов наивными CD4⁺ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 5В демонстрирует продукцию цитокинов наивными CD4⁺ Т-клетками, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 5С демонстрирует супрессивную функцию ИЛ-10-продуцирующих Tr1-клеток, что установлено захватом [³Н]тимидина в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 6А демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками памяти, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 6В демонстрирует продукцию ИЛ-10 CD4⁺ Т-клетками памяти, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 7А демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 7В демонстрирует продукцию ИЛ-10 naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 7С демонстрирует число жизнеспособных Т-клеток, подсчитанное в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8А демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8В демонстрирует продукцию ИЛ-10 naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8С демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками памяти, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8Д демонстрирует продукцию ИЛ-10 CD4⁺ Т-клетками памяти, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8Е демонстрирует внутриклеточный анализ продукции цитокинов naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8F демонстрирует продукцию ИЛ-10 naïвными CD4⁺ Т-клетками, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 9 демонстрирует продукцию ИЛ-10 регуляторными Т-клетками, что установлено ELISA в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 10 демонстрирует результаты скрининга супернатантов гибридомы анти-OX40 человека на L-OX4 0 против родительских L-клеток, что установлено ELISA.

Фиг. 11 демонстрирует скрининг специфичных моноклональных антител к OX40 человека, что установлено при помощи проточного цитометрического анализа в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фигура 12 демонстрирует подтверждение специфичности моноклональных антител к hOX40, используя клетки SUPM2, экспрессирующие OX40 (SUPM2-OX40) в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 13 демонстрирует специфичные моноклональные антитела к OX40, которые могут ингибиовать формирование ИЛ-10-продуцирующих клеток (Tr1) из CD4⁺ Т-клеток, стимулированное витамином D₃ (0,1 мкМ)/дексаметозон (50 нМ), CD32L/ICOSL и анти-CD3/CD28 (0,2 мкг/мл) в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения. Репрезентативные данные сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) приведены на А, и проценты ИЛ-10-продуцирующих клеток для всех препаратов моноклональных антител к OX40 показаны В.

Фиг. 14 демонстрирует результаты специфичных моноклональных антител к hOX40, которые ингибируют формирование Tr1-клеток, также стимулируют пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 15А, 15В и 15С детализируют титрацию моноклональных антител к OX40 на их способность ингибировать формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения. Репрезентативные данные FACS приведены на фиг. 15А, а проценты Tr1-клеток после обработки девятью моноклональными антителами к OX40 приведены на фиг. 15В.

Фиг. 16А, 16В и 16С описывают специфичные моноклональные антитела к OX40, которые ингибируют формирование ИЛ-10-продуцирующих Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, также ингибируют продукцию ИЛ-10 ICOS⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ Treg и иммуносупрессивную функцию. Свежеотсортированные

ICOS⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ Tregs (ICOS⁺Tregs) были стимулированы анти-CD3 (0,2 мкг/мл) в присутствии клеток CD32L/ICOSL и клеток CD32L/OX40L (фиг. 16А) или моноклональных антител к OX40 или контрольного антитела (фиг. 16В) пять дней. Далее клетки были повторно стимулированы анти-CD3/CD28 24 ч и супернатанты были оценены на ИЛ-10 твердофазным иммуносорбентным анализом (ELISA). Фиг. 16С - это анализ пролиферации, основанный на моноцитах, показывающий, что два из антител блокировали функцию ICOS⁺Treg.

Фиг. 17А и 17В описывают идентификацию моноклональных антител к hOX40, которые ингибируют

ют формирование Tr1-клеток и блокируют функцию FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} Treg в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения. Репрезентативные анализы методом проточной цитометрии представлены на фиг. 17А. Данные для шести моноклональных антител приведены на фиг. 17В.

Фиг. 18 демонстрирует идентификацию моноклональных антител к hOX40, которые не ингибируют формирование Tr1-клеток, но блокируют функцию FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} Treg в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 19А и 19В описывают агонистичные антитела к hOX40, блокирующие лимфомоопосредованную функцию CD4⁺CD25^{high} Treg в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения. Репрезентативные FACS анализы представлены на фиг. 19А, а данные для всех экспериментов представлены на фиг. 19В.

На фиг. 20 показано, что моноклональные антитела к hOX40 могут связываться с CD4⁺ Т-клетками макаки-резуса. Как показано, шесть из МАт к hOX40 могут связываться с активированными CD4⁺ Т-клетками макаки-резуса и будут связываться с OX40 макаки-резуса и активировать стимуляцию OX40.

Фиг. 21 показывает, что каждое из антител Hu106-222 Серия I и II примера I состоит из тяжелой цепи с молекулярным весом около 50 кДа и легкой цепи с молекулярным весом около 25 кДа. Чистота антител Hu106-222 серия I и II составляет более 95%.

Фиг. 22 демонстрирует анализ связывания мышиных антител 106-122, Ch106 и Hu106-222 (серия II) с клетками L/OX40 (пример I).

Фиг. 23 изображает схематическую структуру вектора экспрессии антитела Hu106 IgG1/каппа (вектор экспрессии). Двигаясь по часовой стрелке с сайта SalII наверху, плазмида содержит транскрипционный участок тяжелой цепи, начинающийся с главного предраннего промотора цитомегаловируса человека (CMV) и энхансера (CMV промотор) для инициации транскрипции гена тяжелой цепи антитела. За CMV-промотором следует экзон VH, геномная последовательность, содержащая гамма-1 константную область тяжелой цепи человека, имеющую экзоны CH1, шарнира, CH2 и CH3 с промежуточными инtronами и сайт полиденилирования за экзоном CH3. После нуклеотидной последовательности гена тяжелой цепи с CMV промотора начинается участок транскрипции легкой цепи, за которым следует экзон VL и геномная последовательность, содержащая экзон цепи каппа константной области человека (CL) с предшествующим инtronом и сайт полиденилирования после экзона CL. После гена легкой цепи следует предранний промотор SV40 (SV40 промотор), ген ксантин-гуанин-фосфорибозил трансферазы E.coli (gpt) и сегмент, содержащий сайт полиденилирования SV40 (SV40 поли(A) сайт). В конце плазмида содержит часть плазмиды pUC19, содержащую бактериальную точку начала репликации (pUC ori) и ген бета-лактамазы (бета-лактамаза). Локализация соответствующих сайтов рестрикции ферментов показана на фигуре.

Фиг. 24 демонстрирует сравнение между связыванием антител Hu 106-222 серия I и II с клетками L/OX40 (пример I ниже).

Фиг. 25 демонстрирует Hu119-122, содержащее тяжелую цепь с молекулярным весом около 50 кДа и легкую цепь с молекулярным весом около 25 кДа. Чистота Hu119 составляет более 95% (пример II ниже).

Фиг. 26 демонстрирует результат FACS анализа антител Ch119-122 и Hu119-122, описанных в настоящем документе (пример II ниже).

Фиг. 27 демонстрирует, что клон 119-122 (Hu119) гуманизированного моноклонального антитела к OX40 человека и его мутировавшее антитело (Hu119-AA), связывающееся Fc-рецептором, усилили пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Hu119-122 вызывал лучшую стимуляцию Т-клеток по сравнению с родительским мышным моноклональным антителом к OX40 человека (Mouse119-122). Однако химерное МАт к OX40 человека (Ch119, мышные VH и VL, но константные области гамма-1 и каппа человека) не усиливала пролиферацию Т-клеток.

Фиг. 28 демонстрирует, что мутировавший клон 106-222 (Hu222AA) МАт к OX40 человека и клон 106-222 (Ch222) химерного МАт к OX40 человека усилил стимулированную анти-CD3 пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Эти антитела имеют схожую стимулирующую активность в сравнении с мышным МАт к OX40 человека (Mouse222). Однако полностью гуманизированное Ат к OX40 человека Hu222 не усиливала Т-клеточную пролиферацию в сравнении с IgG1 человека.

Фиг. 29А и В описывают блокирование супрессивной функции CD4⁺ Treg-клеток гуманизированным и мышным клоном 119-122 МАт к OX40 человека.

Фиг. 30 предоставляет данные, показывающие усиление CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточной пролиферации антителами к OX40 человека, используя антитела, связанные с пластиной.

Фиг. 31 демонстрирует, что гуманизированные и мышные антитела к OX40 человека требуют перекрестного связывания для усиления Т-клеточной пролиферации.

Фиг. 32 демонстрирует блокирование активности CD4⁺FOXP3⁺nTregs антителами к OX40 человека, используя антитела, связанные с пластиной.

Фиг. 33 показывает, что высокая концентрация мышных антител к OX40 человека, предпочтительно, убивает FOXP3⁺ Tregs.

Фиг. 34 показывает, что мышиные моноклональные антитела к ОХ40 человека действуют либо прямо на эффекторные Т-клетки, либо на nTregs для блокирования супрессивной функции Tregs.

Фиг. 35А, 35В и 35С описывают результаты лечения опухоли у мышей при помощи МАт к hOX40, которым были пересажены hOX40⁺CD8⁺ Т-клетки. МАт к ОХ40 человека улучшает Т-клеточную экспансию и выживаемость *in vivo*. На фиг. 35А приведен терапевтический режим вакцинирования. Репрезентативные *in vivo* биolumинесцентные изображения приведены на фиг. 35В. Результаты лечения опухоли антителом приведены на фиг. 35С.

Фиг. 36 демонстрирует расположение аминокислотных последовательностей VH 106-222, гуманизированного 106-222 (Hu106) и человеческого акцептора X61012 (идентификационный номер по GenBank). Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Номера выше последовательностей указывают на локализацию в соответствии с Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, также представлены в списке

Последовательностей и номера позиций могут быть различными. На фиг. 36 CDR последовательности, определенные Kabat et al. (1991), подчеркнуты в VH 106-222. Остатки CDR в VH X61012 пропущены на фигуре. Был проведен поиск последовательностей VH человека, гомологичных каркасным участкам VH 106-222 в базе данных GenBank, и последовательность VH, кодируемая человеческой X61012 кДНК (VH X61012) была выбрана в качестве акцептора для гуманизации. Последовательности CDR VH 106-222 были впервые перенесены в соответствующие позиции VH X61012.

Далее, в каркасных участках, где трехмерная модель вариабельных регионов 106-222 продемонстрировала значительный контакт с CDR, аминокислотные остатки VH 106-222 мыши заменили соответствующие остатки человека. Эти замены были выполнены в позициях 46 и 94 (подчеркнуто в VH Hu106). Кроме того, остаток каркасного участка человека, который оказался атипичными в соответствующей подгруппе области V был заменен на наиболее типичный остаток, чтобы уменьшить возможную иммуногенность. Эта замена была выполнена в положении 105 (дважды подчеркнуто в VH Hu106).

Фиг. 37 демонстрирует расположение аминокислотных последовательностей VL 106-222, гуманизированного 106-222 (Hu106) и человеческого акцептора AJ388641 (идентификационный номер по GenBank). Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Номера выше последовательностей указывают на локализацию в соответствии с Kabat et al. (1991). Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, также представлены в списке Последовательностей, хотя номера позиций могут быть различными. Последовательности CDR, определенные Kabat et al. (1), подчеркнуты в VH 106-222. Остатки CDR в VL AJ388641 пропущены на фигуре. Был проведен поиск последовательностей VL человека, гомологичных каркасным участкам VL 106-222 в базе данных GenBank, и последовательность VL, кодируемая человеческой AJ388641 кДНК (VL AJ388641) была выбрана в качестве акцептора для гуманизации.

Последовательности CDR VL 106-222 были впервые перенесены в соответствующие позиции VL AJ388641. В каркасных участках гуманизированной формы не было проведено никаких замен.

Фиг. 38 демонстрирует нуклеотидную последовательность гена VH Hu106, окруженную сайтами SpeI и HindIII (подчеркнуто), показаны вместе с выведенной аминокислотной последовательностью. Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Последовательность сигнального пептида приведена курсивом. N-конечный аминокислотный остаток (Q) зрелой VH имеет двойное подчеркивание. Последовательности CDR, в соответствии с определением Kabat et al. (1991), подчеркнуты. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке Последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке Последовательностей. Инtronная последовательность выделена курсивом. Фрагмент гена Hu106 VH, окруженный SpeI и HindIII, был клонирован между соответствующими сайтами вектора экспрессии как показано на фиг. 23.

Фиг. 39 демонстрирует последовательность нуклеотидов гена VL Hu106-222, окруженную сайтами NheI и EcoRI (подчеркнуто) показаны вместе с выведенной аминокислотной последовательностью. Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Последовательность сигнального пептида приведена курсивом. N-конечный аминокислотный остаток (D) зрелой VL имеет двойное подчеркивание. Последовательности CDR в соответствии с определением Kabat et al. (1991) подчеркнуты. Инtronная последовательность выделена курсивом. Фрагмент гена VL Hu106, окруженный NheI и EcoRI, был клонирован между соответствующими сайтами вектора экспрессии, как показано на фиг. 23. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке последовательностей.

Фиг. 40 демонстрирует расположение аминокислотных последовательностей VH 119-122, гуманизированного 119-122 (Hu119) и человеческого акцептора Z14189 (идентификационный номер по GenBank). Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Номера выше последовательностей указывают на локализацию в соответствии с Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Последовательности CDR, определенные Kabat et al. (1991), подчеркнуты в VH 119-122. Остатки CDR VH Z14189 пропущены на фигуре. Был проведен поиск последовательностей VH человека, гомологичных каркасным

участкам VH 119-122 в базе данных GenBank, и последовательность VH, кодируемая человеческой Z14189 кДНК (VH Z14189) была выбрана в качестве акцептора для гуманизации. Последовательности CDR VH 119-122 были впервые перенесены в соответствующие позиции VH Z14189.

Далее, в каркасных участках, где трехмерная модель вариабельных областей 119-122 продемонстрировала значительный контакт с CDR, аминокислотные остатки VH 119-122 мыши заменили соответствующие остатки человека. Эти замены были выполнены в позициях 26, 27, 28, 30 и 47 (подчеркнуто в последовательности VH Hu119), как показано на фигуре. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке последовательностей.

Фиг. 41 демонстрирует расположение аминокислотных последовательностей VL 119-122, гуманизированного 119-122 (Hu119) и человеческого акцептора M29469 (идентификационный номер по GenBank). Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Номера выше последовательностей указывают на локализацию в соответствии с Kabat et al. (1991). Последовательности CDR, определенные Kabat et al. (1), подчеркнуты в VL 119-122. Остатки CDR VL M29469 пропущены в последовательности. Был проведен поиск последовательностей VL человека, гомологичных каркасным участкам VL 119-122 в базе данных GenBank, и последовательность VL, кодируемая человеческой M29469 кДНК (VL M29469) была выбрана в качестве акцептора для гуманизации. Последовательности CDR VL 119-122 были впервые перенесены в соответствующие позиции VL M29469. В каркасных участках гуманизированной формы не было проведено никаких замен. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке последовательностей.

Фиг. 42 демонстрирует нуклеотидную последовательность гена VH Hu119, окруженную сайтами SpeI и HindIII (подчеркнуто), показаны вместе с выведенной аминокислотной последовательностью. Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Последовательность сигнального пептида приведена курсивом. N-конечный аминокислотный остаток (E) зрелой VH имеет двойное подчеркивание. Последовательности CDR в соответствии с определением Kabat et al. (1991) подчеркнуты.

Инtronная последовательность выделена курсивом. Фрагмент гена Hu119 VH, окруженный SpeI и HindIII, был клонирован между соответствующими сайтами вектора экспрессии, как показано на фиг. 23. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке последовательностей.

Фиг. 43 демонстрирует последовательность нуклеотидов гена VL Hu119, окруженную сайтами NheI и EcoRI (подчеркнуто) показаны вместе с выведенной аминокислотной последовательностью. Аминокислотные остатки показаны однобуквенным кодом. Последовательность сигнального пептида приведена курсивом. N-конечный аминокислотный остаток (E) зрелой VL имеет двойное подчеркивание. Последовательности CDR в соответствии с определением Kabat et al. (1991), подчеркнуты. Инtronная последовательность выделена курсивом. Фрагмент гена VL Hu119, окруженный NheI и EcoRI, был клонирован между соответствующими сайтами вектора экспрессии, как показано на фиг. 23. Те же последовательности, как заявлено в настоящем документе, приведены в списке последовательностей, хотя номера позиций могут быть разными в списке последовательностей.

Детальное описание изобретения

Термин "антитело" включает молекулу иммуноглобулина, содержащую четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен CL. VH и VL области могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые гипервариабельные области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасные участки (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термин "антигенсвязывающая детерминанта" антитела (или "детерминанта антитела") содержит фрагменты антитела, которые обеспечивают способность специфически связываться с антигеном (например, hOX40). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может обеспечиваться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая детерминанта" антитела включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в районе шарнирной петли; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989), Nature 341:544-546), который состоит из домена VH, и (vi) изолированная гипервариабельная область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных способов, используя

синтетический линкер, что позволяет им быть построенными в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH паруются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (ScFv); см., например, Bird et al. (1988), *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также определяются термином "антигенсвязывающая детерминанта" антитела. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены. Диатела являются бивалентными, биспецифичными антителами, в которых домены VH и VL выражены на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами одной цепи, тем самым вынуждая домены пароваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два сайта связывания антигена (см., например, Holliger, P., et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994), *Structure* 2:1121-1123).

Более того, антитело или его антигенсвязывающая детерминанта могут быть частью более крупных молекул иммуноадгезии, образованных ковалентной или нековалентной ассоциацией антитела или детерминанты антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование области ядра стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1995), *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1994), *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058). Детерминанты антител, такие как Fab и F(ab')₂-фрагменты могут быть получены из целых антител с использованием традиционных способов, таких как расщепление папаином или пепсином, соответственно, целых антител. Более того, антитела, детерминанты антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных способов с применением рекомбинантной ДНК, как описано в настоящем документе. Предпочтительными антигенсвязывающими детерминантами являются полные домены или пары полных доменов.

OX40/лиганд OX40 (рецептор OX40)/(OX40L) представляют собой пару ко-стимулирующих молекул, являющихся важными для Т-клеточной пролиферации, выживаемости, продукции цитокинов и формирования клеток памяти. Предыдущие эксперименты *in vitro* показали, что активация через OX40 на CD4⁺ Т-клетках приводила к формированию TH2, но не формированию TH1. Эти результаты нашли поддержку в исследованиях *in vivo*, которые продемонстрировали, что блокирование взаимодействия OX40/OX40L предотвращало индукцию и поддержание TH2-опосредованных аллергических иммунных ответов. Тем не менее, блокирование взаимодействия OX40/OX40L улучшает или предотвращает TH1-опосредованные заболевания. Кроме того, прием растворимого OX40L или перенос генов OX40L в опухоли продемонстрировали сильное повышение противоопухолевого иммунитета у мышей. Недавние исследования также позволяют предположить, что OX40/OX40L могут играть роль в промотировании CD8 Т-клеточного иммунного ответа. Как уже говорилось в настоящем документе, активация OX40 блокирует ингибирующую функцию натуральных CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток и пара OX40/OX40L играет важную роль в глобальной регуляции периферического иммунитета против толерантности.

Термин "нумерация Kabat", "определение Kabat" и "маркировка Kabat" используются в настоящем документе взаимозаменяющими. Эти термины, которые приняты в данной области, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными) по сравнению с другими аминокислотными остатками вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей детерминанты (Kabat et al. (1971), *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 и, Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Выражение "рекомбинантное антитело человека" включает антитела человека, которые подготовлены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных способов, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, перенесенного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, антитела, выделенные из животных (например, мышиные), которые являются трансгенными по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor, L.D., et al. (1992), *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, которые используют сплайсинг нуклеотидных последовательностей гена иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей зародышевых линий иммуноглобулина человека (см. Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

"Выделенное антитело" включает антитело, которые по существу не содержит других антител, имеющих различные антигенные особенности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с hOX40 практически не содержит антитела, которые специфически связываются с антигениями, отличными от hOX40). Выделенное антитело, которое специфически связывается с hOX40, может связываться с молекулами OX40 других видов. Кроме того, выделенное антитело может быть по существу свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "активность" включает такие свойства, как специфичность /аффинность связывания антитела с антигеном, например, антитело к OX40 человека, которое связывается с антигеном OX40 и/или активационная сила антитела, например, антитело к OX40, чье связывание с рецептором hOX40 активирует биологическую активность hOX40 или активация рецепторного связывания в L/OX40-клеточном анализе человека.

Термин " K_{off} ", используемый в настоящем документе, предназначен для определения константы скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антigen. Термин " K_d ", используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения константы диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Выражение "поверхностный плазмонный резонанс" включает оптическое явление, которое позволяет проводить анализ биоспецифичных взаимодействий в режиме реального времени путем выявления изменений в концентрации белка в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIACore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Для дальнейших описаний, см. пример 5 и Jonsson, U., et al. (1993), Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991), Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995), J. Mol. Recognit. 8:125-131; и Johnnson, B., et al. (1991), Anal. Biochem. 198:268-277.

Термин "вектор" включает молекулу нукleinовой кислоты, способную транспортировать другую нукleinовую кислоту, к которой она была присоединена. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК-петле, в которую могут лигироваться дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они встроены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называются "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии"). В общем, векторы экспрессии, применяемые в технологии рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании изобретения "плазмида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяющими, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Тем не менее, подразумевается, что изобретение включает такие другие формы векторов экспрессии как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефективной репликацией, аденонассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Фраза "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") включает клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены не только для обозначения конкретной клетки, но и для потомства такой клетки. Поскольку могут произойти некоторые изменения в последующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство может не быть на самом деле идентичным родительской клетке, но по-прежнему включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем документе.

Термин "моноклональное антитело" (моноклональное антитело) относится к антителу или популяции других антител, полученных из популяции по существу гомогенных антител и не должно быть истолковано как императивное получение антитела каким-либо конкретным способом, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, которые могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler and Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975), или способами рекомбинантной ДНК. Термин "химерное антитело" (или "химерный иммуноглобулин") относится к молекуле, содержащей тяжелую и/или легкую цепь, которая идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученным от конкретного вида или принадлежащих к антителами определенного класса или подкласса, в то время как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученным от другого вида или принадлежащим к антителам другого класса или подкласса, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (Cabilly et al. (1984), infra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851).

Термин "гуманизированное антитело" относится к формам антител, которые содержат последовательности из нечеловеческих (например, мышиных) антител, а также антител человека. Гуманизированное антитело может включать консервативные аминокислотные замены или ненатуральные остатки одного и того же или других видов, которые существенно не изменяют своей связывающей и/или биологической активности. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческих иммуноглобулинов. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки гипервариабельной области (CDR) реципиента заменены остатками CDR нечеловеческих видов (антитело-донор), таких как мышь, крыса, верблюд, крупный рогатый скот, коза или кролик, имеющих требуемые свойства. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, кото-

рые не найдены ни в антителе-реципиенте, ни в импортированной CDR или каркасных участках. Эти модификации сделаны для дальнейшего улучшения и максимизации параметров антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного и, как правило, из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все области FR из последовательности иммуноглобулина человека. Также гуманизированное антитело необязательно будет содержать по меньшей мере участок константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека (см., например, Cabilly et al., U.S. Pat. No. 4816567; Cabilly et al., European Patent No. 0125023 B1; Boss et al., U.S. Pat. No. 4816397; Boss et al., European Patent No. 0120694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., European Patent No. 0194276 B1; Winter, U.S. Pat. No. 5225539; Winter, European Patent No. 0,239,400 B1; Padlan, E.A. et al., European Patent Application No. 0519596 A1; Queen et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86:10029-10033).

Каждое из антител, описанных и заявленных в настоящем документе, могут быть переданы в единственном или множественном числе, как: "антитело к OX40"; "антитело к hOX40"; "моноклональное антитело к hOX40"; "антитело к OX40 человека"; "МАт к OX40 человека"; "МАт к hOX40"; "специфичное моноклональное антитело к hOX40"; "антитело к OX40L"; "антитело к hOX40L"; "антитело к OX40L человека"; "специфичное антитело к OX40 человека"; "специфичное моноклональное антитело к OX40 человека"; "специфичное антитело к OX40 человека"; "античеловеческое OX40 специфичное антитело"; "моноклональное специфичное антитело к OX40 человека"; "специфичное антитело к h-OX40"; "специфичное моноклональное антитело к h-OX40"; "агонистическое антитело к hOX40"; "антагонист hOX40" и/или другие подобные вариации их же.

Как описано в заявке на патент США 11/659266 под названием "Methods to Treat Disease States by Influencing the Signaling of OX-40-Receptors and High Throughput Screening Methods and Identifying Substrates Thereof", которая включена в настоящий документ в качестве ссылки, было обнаружено, что функцией OX40L является негативная регуляция формирования Tr1-клеток, индуцированного иммуносупрессивными препаратами дексаметазоном и Витамином D₃, ICOSL или незрельми ДК. Это открытие демонстрирует общий механизм, посредством которого OX40L повышает иммунитет и нарушает иммунологическую толерантность.

С помощью иммуногистологического анализа (фиг. 1), внутриклеточного окрашивания (фиг. 2) и сортировки клеток (фиг. 3) авторы изобретения показали, что как ИЛ-10-продуцирующие ICOS⁺, так и ICOS-TGF-β-продуцирующие Tregs инфильтрировали ткани ФЛ человека. Эти ФЛ-опосредованные FOXP3⁺ Tregs могут сильно ингибировать пролиферацию инфильтрирующих опухоль FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в ответ на предварительно активированные лигандом CD40⁺ аутологичные клети лимфомы (фиг. 4). Супрессивная активность ICOS⁺ Tregs может быть частично блокирована нейтрализующим анти-ИЛ-10 антителом, подтверждая роль ИЛ-10-продуцирующих ICOS⁺ Tregs в ФЛ (фиг. 4). В эксперименте на фиг. 2 опухолевые клетки и МКПК были получены от 7 больных с начальной диагностикой до лечения. МКПК были также получены от 7 здоровых доноров для сравнения. Проценты регуляторных Т-клеток в общем числе CD4⁺ Т-клеток определяли с помощью проточного цитометрического анализа CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ Tregs. Фиг. 2А демонстрирует репрезентативный FACS анализ Tregs, а фиг. 2В демонстрирует процент Tregs всех доноров.

Было также обнаружено, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, индуцированное дексаметазоном и витамином D₃. Известно, что сочетание иммуносупрессивных препаратов дексаметазона и витамина D₃ устойчиво индуцирует дифференцировку наивных CD4⁺ Т-клеток в Tr1-клетки. Чтобы исследовать, может ли OX40L ингибировать формирование и функцию Tr1-клеток, наивные CD4⁺ Т-клетки культивировали с моноклональными анти-CD3 плюс анти-CD28 антителами в присутствии или в отсутствии OX40L-трансфицированных L-клеток в четырех различных условиях культивирования, включая (1) Tr1 (дексаметазон и витамин D₃), (2) TH1 (ИЛ-12), (3) TH2 (ИЛ-4) или (4) нейтральное (только среда) в течение 7 дней (фиг. 5А). Продукция ИЛ-10 приморованными Т-клетками была проанализирована внутриклеточным окрашиванием цитокинов и ELISA.

В экспериментах на фиг. 5А был проведен внутриклеточный анализ продукции цитокинов наивными CD4⁺ Т-клетками методом проточной цитометрии. Наивные CD4⁺ Т-клетки культивировали с моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в присутствии ИЛ-2 на родительских L-клетках или OX40L-L-клетках с указанными рекомбинантными цитокинами или реагентами 7 дней. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указаны в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцированное различными поляризационными сигналами. Как показано на фиг. 5А от 2 до 4% Tr1-клеток были получены из наивных CD4⁺ Т-клеток, культивированных в нейтральных или TH1, или TH2 условиях. Более 15% Tr1-клеток были получены в культуре с дексаметазоном плюс витамин D₃. Добавление OX40L полностью блокировало формирование Tr1-клеток, а также содействовало образованию ФНО-α-продуцирующих Т-клеток во всех культуральных условиях.

Эти данные были подтверждены данными ELISA (фиг. 5В). В экспериментах на фиг. 5В продукция

цитокинов наивными $CD4^+$ клетками в супернатантах после повторной стимуляции моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч была измерена с помощью ELISA. Наивные $CD4^+$ Т-клетки культивировали с моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в присутствии ИЛ-2 на родительских L-клетках или OX40L-L-клетках с указанными рекомбинантными цитокинами или реагентами 7 дней. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM) четырех независимых экспериментов. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных $CD4^+$ Т-клеток, индуцированное различными поляризационными сигналами.

Наивные $CD4^+$ Т-клетки, примированные условиями Tr1 (дексаметазон плюс витамин D₃) были энергичны и имели способность подавлять пролиферацию наивных $CD4^+$ Т-клеток в ответ на моноклональные анти-CD3 плюс анти-CD28 антитела (фиг. 5С). В экспериментах на фиг. 5С супрессивную функцию Т-клеток измеряли поглощением [³H]тимидина. Смеси указанных Т-клеточных популяций были повторно стимулированы моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами. Планки погрешностей представляют SEM для трех лунок. Было обнаружено, что наивные $CD4^+$ Т-клетки, примированные теми же условиями Tr1 в присутствии OX40L, энергично пролиферировали и не ингибировали пролиферацию наивных $CD4^+$ Т-клеток в ответ на моноклональные анти-CD3 плюс анти-CD28 антитела. Полученные данные свидетельствуют о том, что OX40L блокирует формирование функциональных Tr1-клеток из наивных $CD4^+$ Т-клеток, индуцированное дексаметазоном и витамином D₃.

Было обнаружено, что Tr1-клетки могут быть получены из $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ Т-клеток памяти и что OX40L может подавлять формирование Tr1-клеток из $CD4^+$ Т-клеток памяти. $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ Т-клетки памяти культивировали в течение 7 дней с моноклональными анти-CD3 плюс анти-CD28 антителами в присутствии или в отсутствии OX40L-трансфицированных L-клеток в условиях Tr1 (дексаметазон плюс витамин D₃). В экспериментах фиг. 6А внутриклеточный анализ продукции цитокинов $CD4^+$ Т-клетками памяти проводился методом проточной цитометрии. $CD4^+CD45RO^+CD25^+$ Т-клетки памяти культивировали с моноклональными анти-CD3, анти-CD28 антителами и ИЛ-2 на родительских L-клетках или OX40L-L-клетках в присутствии или отсутствии дексаметазона плюс витамин D₃ в течение 7 дней. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указан в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из $CD4^+$ Т-клеток памяти в условиях с дексаметазоном плюс витамин D₃. Фиг. 6А показывает, что большое количество Tr1-клеток (>20%) сформировалось из $CD4^+$ Т-клеток памяти в культуре с дексаметазоном плюс витамин D₃. Добавление OX40L полностью блокировало формирование Tr1-клеток и способствовало формированию ФНО- α -продуцирующих клеток из $CD4^+$ Т-клеток памяти.

Способность дексаметазона плюс витамин D₃ активировать продукцию ИЛ-10 $CD4^+$ Т-клетками памяти и что эта способность может быть ингибирована OX40L, было подтверждено анализами ИЛ-10 ELISA (фиг. 6В). В экспериментах на фиг. 6В продукция ИЛ-10 $CD4^+$ Т-клетками памяти была измерена в супернатантах после повторной стимуляции с моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч при помощи ELISA. Данные представлены как среднее \pm SEM четырех независимых экспериментов. Результаты демонстрируют, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из $CD4^+$ Т-клеток памяти в условиях с дексаметазоном плюс витамин D₃.

Кроме того, было обнаружено, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток, в то время как другие члены семейства TNF не ингибируют (GITRL и 4-1BBL). В суперсемействе TNF OX40L, лиганд индуцируемого глюкокортикоидами TNF-рецептора (GITRL) и лиганд 4-1BB (4-1BBL) обладают ко-стимуляторной функцией для Т-клеток. Чтобы исследовать, был ли OX40L уникальным в ингибировании Tr1-клеток, наивные $CD4^+$ Т-клетки культивировали с моноклональными анти-CD3 плюс анти-CD28 антителами с дексаметазоном плюс витамин D₃, с родительскими L-клетками или L-клетками, трансфицированными OX40L, GITRL или 4-1BBL в течение 7 дней. В то время как OX40L, GITRL и 4-1BBL все способствовали образованию ФНО- α -продуцирующих клеток, только OX40L ингибировал формирование Tr1-клеток (фиг. 7А и 7В).

В экспериментах на фиг. 7А внутриклеточный анализ продукции цитокинов наивными $CD4^+$ Т-клетками был проведен методом проточной цитометрии. Наивные $CD4^+$ Т-клетки культивировали с моноклональными анти-CD3, анти-CD28 антителами и ИЛ-2 на родительских L-клетках, OX40L-L-клетками, GITRL-L-клетками или 4-1BBL-L-клетками в присутствии дексаметазона плюс витамин D₃ в течение 7 дней. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указаны в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L, но не GITRL, ни 4-1BBL, подавляет формирование Tr1-клеток.

В экспериментах на фиг. 7В ИЛ-10 наивных $CD4^+$ клеток был измерен в супернатантах после повторной стимуляции с моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч с помощью ELISA. Данные представлены как среднее \pm SEM четырех независимых экспериментов. Результаты показывают, что OX40L, но не GITRL, ни 4-1BBL, подавляет формирование Tr1-клеток.

$OX40L$, GITRL и 4-1BBL все способствовали повышению общего количества Т-клеток (фиг. 7С). В экспериментах на фиг. 7С подсчитывали количество жизнеспособных Т-клеток. Данные представлены как среднее \pm SEM четырех независимых экспериментов.

Как понятно специалистам в данной области, результаты на фиг. 7A, 7B и 7C показывают, что OX40L, но не GITRL, ни 4-1BBL, подавляет формирование Tr1-клеток. Эти данные позволяют предположить, что среди трех членов суперсемейства TNF, которые ко-стимулируют Т-клетки, OX40L имеет новую и уникальную функцию ингибирования образования Tr1-клеток.

Кроме того, было обнаружено, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток, индуцированное ICOSL или незрелыми ДК. ICOS и CD28 представляют собой два положительных ко-стимулирующих рецептора в семействе CD28, экспрессируемых на Т-клетках. Было показано, что активация через ICOS агонистическими антителами или ICOSL промотирует CD4⁺ Т-клетки продуцировать ИЛ-10. Чтобы исследовать, может ли OX40L ингибировать способность ICOS стимулировать продукцию ИЛ-10 CD4⁺ Т-клетками, наивные и CD4⁺ Т-клетки памяти культивировали с анти-CD3 в присутствии ICOSL-трансфицированных L-клеток или ICOSL-трансфицированных L-клеток в присутствии OX40L течение 7 дней.

В экспериментах на фиг. 8A внутриклеточный анализ продукции цитокинов наивными CD4⁺ Т-клетками был проведен методом проточной цитометрии. Наивные CD4⁺ Т-клетки культивировали в течение 7 дней на родительских L-клетках, на смеси ICOSL-L-клеток и L-клеток или на смеси ICOSL-L-клеток и OX40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указаны в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ICOSL.

В экспериментах на фиг. 8B продукция ИЛ-10 наивными CD4⁺ клетками была измерена в супернатантах после повторной стимуляции моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч с помощью ELISA. Наивные CD4⁺ Т-клетки культивировали в течение 7 дней на родительских L-клетках, на смеси ICOSL-L-клеток и L-клеток или на смеси ICOSL-L-клеток и OX40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Данные представлены как среднее ± SEM трех независимых экспериментов. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ICOSL.

В экспериментах на фиг. 8C внутриклеточный анализ продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками памяти был проведен методом проточной цитометрии. CD4⁺ Т-клетки памяти культивировали в течение 7 дней на родительских L-клетках, на смеси ICOSL-L-клеток и L-клеток или на смеси ICOSL-L-клеток и OX40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указаны в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток памяти, индуцированных ICOSL.

В экспериментах на фиг. 8D продукция ИЛ-10 CD4⁺ Т-клетками памяти была измерена в супернатантах после повторной стимуляции моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч при помощи ELISA. CD4⁺ Т-клетки памяти культивировали в течение 7 дней на родительских L-клетках, на смеси ICOSL-L-клеток и L-клеток или на смеси ICOSL-L-клеток и OX40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Данные представлены как среднее ± SEM трех независимых экспериментов. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток памяти, индуцированных ICOSL.

Результаты экспериментов на фиг. 8A, 8B, 8C и 8D показывают, что ICOSL значительно способствовал образованию Tr1-клеток как из наивных, так и из CD4⁺ Т-клеток памяти. Добавление OX40L полностью ингибировало формирование Tr1-клеток как из наивных, так и из CD4⁺ Т-клеток памяти, в то же время значительно промотируя формирования ФНО- α -продуцирующих клеток.

Известно, что незрелые ДК или ДК, обработанные ИФН- α или ИЛ-10, могут индуцировать наивные CD4⁺ Т-клетки к дифференцировке в Tr1-клетки. Было исследовано, может ли OX40L ингибировать формирование Tr1-клеток, индуцированное ДК. Как показано на фиг. 8E, незрелые ДК или ДК, обработанные ИФН- α или ИЛ-10, все индуцировали формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток более чем на 10%. В противоположность этому ДК, активированные CD40L, индуцируют сильный TH1-ответ, сопровождавшийся формированием около 3% Tr1-клеток. Добавление рекомбинантного OX40L в ДК-Т-клеточные культуры полностью ингибировало формирование Tr1-клеток, индуцированное незрелыми ДК и ДК, обработанными ИЛ-10 и ИФН- α . Кроме того, OX40L также ингибировало формирование остаточного количества Tr1-клеток, индуцированное CD40L-активированными зрелыми ДК. В экспериментах на фиг. 8E внутриклеточный анализ продукции цитокинов наивными CD4⁺ Т-клетками был проведен методом проточной цитометрии. Наивные CD4⁺ Т-клетки со-культивировали в присутствии или в отсутствии растворимого рекомбинантного OX40L в течение 7 дней с незрелыми ДК или ДК, культивированными с ИФН- α , ИЛ-10 и CD40L. Проценты соответствующих цитокин-продуцирующих Т-клеток указаны в каждом профиле дот-блот. Результаты показывают, что OX40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ДК.

Способность OX40L ингибировать формирование Tr1-клеток, индуцированное ДК, была подтверждена данными ELISA (фиг. 8F). В экспериментах на фиг. 8F продукция ИЛ-10 наивными CD4⁺ клетка-

ми была измерена в супернатантах после повторной стимуляции с моноклональными анти-CD3 и анти-CD28 антителами в течение 24 ч при помощи ELISA. Наивные CD4⁺ Т-клетки сокультивировали в присутствии или в отсутствии растворимого рекомбинантного OX40L в течение 7 дней с незрелыми ДК или ДК, культивированными с ИФН- α , ИЛ-10 и CD40L. Данные представлены как среднее \pm SEM трех независимых экспериментов. Результаты показывают, что OX40L ингибитирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ДК. Таким образом, эти данные показывают, что OX40L может ингибировать формирование Tr1-клеток, индуцированное большим количеством физиологических сигналов, передаваемыми ICOSL и ДК.

Ранее было предположено, что регуляторные Т-клетки высоко представлены в В-клеточной области неходжкинской лимфомы и что В-клетки участвуют в накоплении регуляторных Т-клеток в области лимфомы. Было исследовано может ли влияние на активацию рецептора OX40, например, при помощи OX40L, обеспечить терапию против В-клеточной лимфомы. Криоконсервированные образцы от пациентов с В-клеточной лимфомой были использованы для оценки способности OX40L отключать Tr1-клетки. Используемыми образцами была фолликулярная лимфома, полученная из образца селезенки до какого-либо лечения. Клетки оттаивали, из 400×10^6 замороженных клеток получали 127×10^6 живых клеток и $33,9 \times 10^6$ мертвых клеток (79% выживаемости). Достаточное количество CD25⁺ клеток было выявлено путем FACS окрашивания. В экспериментах на фиг. 9 секрецию ИЛ-10 ИЛ-10-продуцирующими ICOS⁺ Tregs определяли при помощи ELISA. Treg клетки культивировали в двух различных условиях. В условии 1, клетки CD25⁺/ICOS⁺ культивировали с анти-CD3 в присутствии ИЛ-2 (900 мкл/мл) на родительских L-клетках или OX40L-L-клетках с анти-ICOS-антителом в течение 3-6 дней. В условии 2, клетки CD25⁺/ICOS⁺ культивировали с анти-CD3 в присутствии ИЛ-2 (900 мкл/мл) на ICOS-L-L-клетках или смеси OX40L-L инфильтрированных ICOS-L-L-клеток от 3 до 6 дней. Продукцию цитокинов в супернатантах измеряли при помощи ELISA. Результаты показывают, что OX40L значительно ингибирует продукцию ИЛ-10 Treg-клетками.

Полученные результаты того, что OX40L имеет способность ингибировать формирование и функцию Tr1-клеток, индуцированные иммуносупрессивными препаратами дексаметазоном плюс витамин D₃, ICOSL или ДК, подчеркивает новый механизм, с помощью которого OX40L повышает иммунитет и нарушает толерантность в различных формах CD4- или CD8-опосредованных иммунных ответов, что понятно специалистам в данной области. Способность OX40L ингибировать формирование Tr1-клеток во время как и ИЛ-12-индуцированных TH1, так и ИЛ-4-индуцированных TH2 ответов дает основания предполагать, что OX40L может контролировать силу TH1- или TH2-опосредованных иммунных ответов. Кроме того, способность OX40L ингибировать формирование Tr1-клеток представляется уникальным свойством OX40L, поскольку два других члена семейства TNF - GITRL и 4-1BBL не имеют этого функционального свойства. Более того, способность OX40L ингибировать продукцию ИЛ-10 Treg-клетки определяет OX40L как сильное лекарство против В-клеточной лимфомы и других видов рака.

Были выявлены многие молекулы, которые промотируют образование Tr1-клеток, включая ИЛ-10, ИФН- α , ICOSL и иммуносупрессивные соединения, такие как дексаметазон плюс витамин D₃. OX40L представляет собой мощный ингибитор образования Tr1-клеток не только из наивных CD4⁺ Т-клеток, но и из CD4⁺ Т-клеток памяти и регуляторных Т-клеток. Это новое свойство OX40/OX40L может объяснить недавний отчет, показывающий, что активация OX40 позволяет анергическим аутореактивным Т-клеткам приобрести эффекторные клеточные функции. Таким образом, таргетинг OX40/OX40L обеспечивает лекарственные средства против аллергических и аутоиммунных заболеваний человека, а также для разработки препаратов для лечения инфекционных заболеваний человека и рака, включая, но не ограничиваясь этим, меланому, рак мозга, рак кости, лейкоз, лимфому, эпителиальную неоплазию (эпителиальный рак), такую как базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, рака желудочно-кишечного тракта, такой как рак губы, рак полости рта, рак пищевода, рак тонкой кишки и рак желудка, рак толстой кишки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак легкого, рак молочной железы и рак кожи, такой как плоскоклеточный рак и базальный рак, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома и другие известные виды рака.

Нарушения или состояния, которые можно предотвратить или лечить антителами и способами, описанными в настоящем документе, включают профилактику или лечение рака, такого как кожный Т-клеточный лейкоз, опухоли головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, глиома высокой степени злокачественности, метастазы мозга, меланома, рак кожи, рак легкого, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, лейкоз, миелодиспластический синдром (предлейкозное состояние) и множественная миелома. В общем, метастазы любого рака возможно предотвратить или лечить соединениями и способами, описанными в настоящем документе. Антитела также могут быть использованы для предотвращения или лечения пролиферативных состояний кровеносных сосудов, включая талангэктомию, венозные ангиомы, гемангиобластому. Другие нарушения, заболевания или состояния включают вирусные заболевания, некоторые из которых могут традиционно считаться "неизлечимыми". Антитела, например, могут также быть использованы для классификации штаммов одного патогена. Исследователи могут использовать антитела, описанные в настоящем документе, чтобы идентифи-

фицировать и отслеживать специфические клетки или молекулы в организме.

Как правило, термин "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. В частности рак, который можно лечить или предотвращать при помощи одного или более антител, описанных в настоящем документе, или их вариантов, включает, но не ограничивается этим, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры такого рака включают в качестве неограничивающих примеров плоскоклеточный рак, рак легких (в том числе мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарцинома легких и плоскоклеточный рак легких), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка (в том числе рак желудочно-кишечного тракта и гастроинтестинальный стромальный рак), рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карцинома эндометрия или карцинома матки, карцинома слюнной железы, рак почки и ренальный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени и различные типы рака головы и шеи, меланома, поверхностно-распространяющаяся меланома, меланома типа злокачественного лентиго, акральные лентигинозные меланомы, узловые меланомы, а также В-клеточная лимфома (в том числе низкодифференцированная/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ); мелколимфоцитарная (МЛ) НХЛ, средней дифференциации/фолликулярная НХЛ, диффузная НХЛ средней дифференциации, иммунобластная злокачественная НХЛ, лимфобластная злокачественная НХЛ, злокачественная мелкоклеточная НХЛ с нерасщепленным ядром, генерализованная лимфаденопатическая НХЛ; лимфома клеток мантии; СПИД-ассоциированная лимфома; и макроглобулинемия Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз; и посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD), а также аномальная пролиферация сосудов, связанная с факоматозом, отек (например, ассоциированный с опухолями головного мозга) и синдром Мейгса.

Способы лечения или профилактики иммунного нарушения также приведены в настоящем документе. Эти способы включают введение эффективного количества антитела субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунологическое нарушение это иммунологическое нарушение или аутоиммунологическое нарушение. Этим нарушением является астма, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, РТПХ и/или системная красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления изобретения нарушение - это заболевание, ассоциированное с вирусом, бактериями или другим инфекционным агентом.

Кроме того, антитела и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для профилактики или лечения воспалительных заболеваний и состояний, таких как остеоартрит, ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит, и аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка и смешанные аутоиммунные заболевания. Например, антитела, описанные в настоящем документе, могут быть полезны в лечении различных аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включаяющих стадию введения терапевтически эффективного количества антитела субъекту, нуждающемуся в этом, где аутоиммунным заболеванием или воспалительным заболеванием является одно или более из следующих заболеваний: инсулиновависимый сахарный диабет (ИЗСД), сахарный диабет, рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, острый рассеянный энцефаломиелит, артрит, ревматоидный артрит, экспериментальный аутоиммунный артрит, миастения гравис, тиреоидит, болезнь Хашимото, первичная миокседема, тиреотоксикоз, первниозная анемия, аутоиммунный атрофический гастрит, болезнь Адисона, преждевременная менопауза, мужское бесплодие, ювенильный диабет, синдром Гуд-пасчера, вульгарный пемфигус, пемфигоид, симпатическая офтальмия, фагогенныйuveит, аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая лейкопения, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит Hb_{s-ve}, криптогенный цирроз, язвенный колит, синдром Шегрена, склеродермия, гранулематоз Вегенера, поли/дерматомиозит, дискоидная КВ, системная красная волчанка, болезнь Крона, псориаз, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидных антител, апластическая анемия, аутоиммунный гепатит, целиакия, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (СГБ), идиопатическая тромбоцитопеническая пурпуря, опсоклонус-миоклонус синдром (ОМС), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, пемфигус, полиартрит, первичный билиарный цирроз, синдром Рейтера, Такаясу, темпоральный артерит, тепловая аутоиммунная гемолитическая анемия, гранулематоз Вегенера, алопеция универсальная, болезнь Бехчета, болезнь Чагаса, синдром хронической усталости, дизавтомия, эндометриоз, гнойный гидраденит, интерстициальный цистит, нейромиотония, саркоидоз, склеродермия, язвенный колит, вити-лиго, вульводиния, воспалительные заболевания кожи, аллергический контактный дерматит; гастрит, ассоциированный с H. pylori, хроническая заложенность носа, атеросклероз и реакция "трансплантат против хозяина".

Более конкретно, "аутоиммунное заболевание", о котором говорится в настоящем документе, это заболевание или расстройство, вызванное и направленное против собственных тканей или органов индивида, или совместная косегрегация, или их проявление или вызванное этим состояние. Аутоиммунное заболевание может относиться к состоянию, которое является результатом или усугубляется продукцией антител В-клетками, которые реактивны на нормальные ткани организма и антигены. Кроме того, ауто-

иммунным заболеванием является заболевание, которое может включать секрецию аутоантител, которые являются специфичным для эпитопа аутоантгена (например, ядерный антиген).

Аутоиммунные заболевания или нарушения, которые поддаются лечению и/или предотвращаются с помощью одного или более из антител, описанных в настоящем документе, включают в качестве неограничивающих примеров артрит (ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагру или подагрический артрит, острый подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, индуцированный коллагеном II типа артрит, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псoriатический артрит, болезнь Стилла, позвоночный артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, анкилозирующий спондилартрит), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшковидный псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопия, в том числе такие атопические заболевания как сенная лихорадка и синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетiformный дерматит, монетовидный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный раздражающий контактный дерматит и атопический дерматит, X-сцепленный гипер-IgM-синдром, аллергические интраокулярные воспалительные заболевания, крапивницу, такую как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, миозит, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (включая системную склеродерию), склероз, такой как системный склероз, рассеянный склероз (РС), такой как спинооптический РС, первичный прогрессирующий РС (ППРС) и ремиттирующе-рецидивирующий РС (РРРС), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, болезнь Шарко-Бюльвиана, атаксический склероз, оптиконейромиелит (НМО), воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона, аутоиммunoопосредованные гастроинтестинальные заболевания, колит, такой как неспецифический язвенный колит, язвенный колит, микроскопический колит, коллагеновый колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), воспаление кишечника, гангренозную пиодермию, узелковую эритему, первичный склерозирующий холангит, респираторный дистресс-синдром, включающий респираторный дистресс-синдром взрослых или острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глаза, ирит, хориоидит, аутоиммунное гематологическое нарушение, ревматоидный спондилит, ревматоидный синовит, наследственный анигионевротический отек, повреждение черепного нерва как при менингите, гестационный герпес, пемфигоид беременных, зуд мошонки, аутоиммунное преждевременное угасание функции яичников, внезапная потеря слуха вследствие аутоиммунного состояния, IgE-опосредованные заболевания, такие как анафилаксия и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит и/или энцефалит ствола головного мозга,uveит, такая как передний uveit, острый передний uveit, гранулематозный uveit, негранулематозный uveit, факоантогенный uveit, задний uveit, или аутоиммунный uveit, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом и без него, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный ГН, иммуноопосредованный ГН, мембранный ГН (мембранные нефропатии), идиопатический мембранный ГН или идиопатическая мембранные нефропатии, мембрano- или мембрano-пролиферативный ГН (МПГН), в том числе тип I и тип II, и быстро прогрессирующий ГН, пролиферативный нефрит, аутоиммунная полигландулярная эндокринная недостаточность, баланит, включая ограниченный плазмоклеточный баланит, баланопостит, центробежная кольцевидная эритема, стойкая дисхромическая эритема, мультиформная эритема, кольцевидная гранулема, блестящий лишай, склеротический атрофический лишай, простой хронический лишай, шиповидный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предраковый кератоз, гангренозная пиодермия, аллергические состояния и ответы, аллергическая реакция, экзема, включая аллергическую или атопическую экзему, астматозную экзему, дисгидротическую экзему и пузырчатую ладонно-подошвенную экзему, астму, такую как бронхиальная астма и аутоиммунная астма, состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные ответы, иммунные реакции против чужеродных антигенов, такие как группы крови А-В-О плода при беременности, хроническое легочное воспалительное заболевание, аутоиммунный миокардит, недостаточность адгезии лейкоцитов, волчанку, включая волчаночный нефрит, волчаночный энцефалит, педиатрическую волчанку, непочечную волчанку, экстравенальную волчанку, дискоидную волчанку и дискоидную красную волчанку, волчаночную алопецию, системную красную волчанку (СКВ), такую как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, неонатальный волчаночный синдром (НЛЕ), и диссеминированная красная волчанка, юношеский (типа I) сахарный диабет, включая детский инсулин-зависимый сахарный диабет (ИЗСД), сахарный диабет взрослых (диабет типа II), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетическое нарушение крупных артерий, иммунные ответы, ассоциированные с острой или замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, включая лимфоматоидный гра-

нулематоз, гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулиты, включая васкулит, васкулит крупных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный (Такаясу) артериит), васкулит сосудов среднего калибра (включая болезнь Кавасаки и узелковый полиартериит/узелковый периартериит), микроскопический полиартериит, иммуноваскулит, васкулит ЦНС, кожный васкулит, васкулит вследствие гиперчувствительности, некротизирующий васкулит, такой как системный некротизирующий васкулит и АНЦА-ассоциированный васкулит, такой как васкулит Черджа-Страсса или синдром (СЧС) и АНЦА-ассоциированный васкулит сосудов мелкого калибра, темпоральный артериит, апластическую анемию, аутоиммунную апластическую анемию, анемию с положительным тестом Кумбса, анемию Даймонда-Блэкфана, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), пернициозную анемию (anemia perniciosa), болезнь Адисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (ИЭА), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, панцитопению, лейкопению, заболевания, включающие диапедез лейкоцитов, воспалительные нарушения ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром полиорганных повреждения, такой как вторичные синдромы септицемии, травмы или кровоизлияния, опосредованные комплексами антиген-антитело заболевания, болезнь антител к базальной мемbrane клубочков, синдром антифосфолипидных антител, аллергический неврит, болезнь/синдром Бехчета, синдром Кастлмена, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и пемфигоид кожи, пемфигус (в том числе вульгарный пемфигус, эксфолиативная пузырчатка, пемфигусный пемфигоид слизистой оболочки и пемфигусный эритематоз), аутоиммунные полизендокринопатии, болезнь Рейтера или синдром, термическая травма, преэклампсия, нарушение вследствие иммунных комплексов, такое как нефрит иммунных комплексов, антителоопосредованный нефрит, полинейропатии, хроническую нейропатию, такую как IgM-полинейропатии или IgM-опосредованная нейропатия, тромбоцитопению (например, как развивается у пациентов с инфарктом миокарда), включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпур (ТТП), посттрансфузионную пурпур (РТП), гепарининдуцированную тромбоцитопению и аутоиммунную или иммуноопосредованную тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпур (ИТП), включая хроническую или острую ИТП, склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит, аутоиммунное заболевание семенников и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз, гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото), или подострый тиреоидит, аутоиммунную болезнь щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, болезнь Грейвса, полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные полигландулярные синдромы (или полигландулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, включая неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона, синдром застывшего человека или застывшего индивидуума, энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), миастению гравис, такую как ассоцииированную с тимомой миастению гравис, дегенерацию мозжечка, нейромиотонию, опсоклонус или опсоклонус-миоклонус синдром (ОМС) и сенсорную нейропатию, мультифокальную моторную нейропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (ЛИП), облитерирующий бронхиолит (нетрансплантатный) против NSIP, синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA дерматоз, острый фебрильный нейтрофильный дерматоз, субкорнеальный пустулезный дерматоз, транзиторный акантолитический дерматоз, цирроз, такой как первичный биллиарный цирроз и пневмоноцирроз, аутоиммунный синдром энтеропатии, целиакию, целиакию-спру (глютеновая энтеропатия), рефракторную спру, идиопатическую спру, криоглобулинемию, боковой амиотрофический склероз (БАС, болезнь Лу Герига), ишемическую болезнь сердца, аутоиммунное заболевание ушей, такое как аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ), аутоиммунная потеря слуха, полихондрит, такой как рефракторный или рецидивирующий полихондрит, легочный альвеолярный протеиноз, синдром Когана/несифилитический интерстициальный кератит, паралич Белла, болезнь/синдром Свита, аутоиммунная розацеа, боль, связанная с опоясывающим лишаем, амилоидоз, не-злокачественный лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию и моноклональную гаммапатию неопределенного значения, МГНЗ), периферическую нейропатию, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные нарушения, глухота, слепота, периодический паралич и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительная миопатия, фокальный или сегментарный или фокально-сегментарный глюмерулосклероз (ФСГС), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное гепатологическое нарушение, фибромиалгию, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, адреналит, атрофию желудка, пресенильную деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные демиелинизирующие заболевания и хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Дреесслера, очаговую алопецию, тотальную алопецию, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, эзофагальная дискинезия, склеродактилия и телангиектазия).

зия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие антител к сперматозоидам, смешанное поражение соединительной ткани, болезнь Чагаса, ревматическую лихорадку, привычный выкидыши, легкое фермера, мультиформную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, легкое птицевода, аллергический гранулематозный ангит, доброкачественный лимфоцитарный ангит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, трансфузионную реакцию, лепру, малярию, паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, кипаносомиоз, шистозомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Сэмптера, синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, муковисцидоз, эндофталмит, стойкую возвращающуюся эритему, эритробластоз плода, эозинофильный фасциит, синдром Шульмана, синдром Фелти, флариаз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фукса, пурпуре Шенлейн-Геноха, инфекцию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), ТКИН, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), эховирусную инфекцию, сепсис, эндотоксемию, панкреатит, тиреотоксикоз, парвовирусную инфекцию, инфекцию вирусом краснухи, поствакцинальные синдромы, врожденную инфекцию краснухи, инфекцию вирусом Эпштейна-Барра, эпидемический паротит, синдром Эвана, аутоиммунное поражение гонад, хорею Сиденгама, постстрептококковый нефрит, облитерирующий тромбангит, тиреотоксикоз, сухотку спинного мозга, хорионит, гигантоклеточную полимиалгию, хронический гиперчувствительный пневмонит, сухой кератоконъюнктивит, эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический почечный синдром, нефропатию с минимальными изменениями, доброкачественная семейная недостаточность и недостаточность вследствие ишемии-реперфузии, реперфузия трансплантированного органа, аутоиммунная реакция на сетчатку, воспаление суставов, бронхит, хроническую обструктивную болезнь дыхательных путей/легких, силикоз, афту, афтозный стоматит, артериосклеротические нарушения, аспернионез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемию, контрактуру Дюпюитрена, факоанафилактическую эндофталмии, аллергический энтерит, лепрозную узловую эритему, идиопатический лицевой паралич, синдром хронической усталости, ревматическую лихорадку, болезнь Хаммена-Рича, сенсоневральную потерю слуха, пароксизмальную гемоглобинурию, гипогонадизм, региональный илеит, лейкопению, инфекционный мононуклеоз, поперечный миелит, первичную идиопатическую миокседему, нефроз, симпатическую офтальмию, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангреноznую пиодермию, тиреоидит Квервайна, приобретенную атрофию селезенки, незлокачественную тимому, витилиго, синдром токсического шока, пищевое отравление, состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток, недостаточность адгезии лейкоцитов, иммунные ответы, ассоциированные с острой или замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, включающие лейкоцитарный диапедез, синдром полиорганной недостаточности, заболевания, опосредованные комплексами антиген-антитело, заболевание, обусловленное антителами к базальной мемbrane клубочков, аллергический неврит, аутоиммунные полиэндокринопатии, оофорит, первичную миокседему, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическую офтальмию, ревматические заболевания, смешанное поражение соединительной ткани, нефротический синдром, инсульт, полизэндокринная недостаточность, аутоиммунный полигландулярный синдром типа I, идиопатический гипопаратиреоз взрослых (АОИН), кардиомиопатию, такую как дилатационная кардиомиопатия, приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ), гемохроматоз, миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или негнойный синусит, острый или хронический синусит, этмоидный, фронтальный, максиллярный или сфеноидный синусит, нарушение, связанное с эозинофилами, такое как эозинофилия, легочная инфильтрирующая эозинофилия, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Лефлера, хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия, бронхопневмонический аспергиллез, аспергиллему или гранулемы, содержащие эозинофилы, анафилаксию, серонегативные спондилоартриты, полизэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склерозный, эпиклерозный, хронический кожно-слизистый кандидоз, синдром Брутона, преходящую гипогаммаглобулинемию детского возраста, синдром Вискотта-Олдрича, синдром атаксии-телеангиэктазии, ангиэктазию, аутоиммунные нарушения, ассоциированные с коллагеновым заболеванием, ревматизм, неврологическая болезнь, лимфаденит, снижение артериального давления срабатывания, сосудистая дисфункция, повреждение тканей, сердечно-сосудистая ишемия, гипералгезия, почечная ишемия, ишемия головного мозга и заболевание, сопровождающее васкуляризацию, аллергические расстройства чувствительности, гломерулонефриты, реперфузионное повреждение, ишемическое реперфузионное повреждение, реперфузионная травма миокардиальной или других тканей, лимфоматозный трахеобронхит, воспалительные дерматозы, дерматозы с острыми воспалительными компонентами, полиорганическую недостаточность, буллезные заболевания, почечный кортикальный некроз, острый гнойный менингит или другие воспалительные нарушения центральной нервной системы, окулярные и орбитальные воспалительные нарушения, гранулоцитарные синдромы, ассоциированные с трансфузией, индуцированную цитокинами токсичность, нарколепсию, острое тяжелое воспаление, хроническое не поддающееся лечению воспаление, пиелит, эндартериальную гиперплазию, пептическую язву, вальвулит и эндометриоз.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут иметь различное научное, медицинское и ком-

мерческое использование. Антитела могут быть использованы в различных типах диагностических тестов, например, для обнаружения широкого спектра заболеваний или наличия препаратов (лекарственных средств), токсинов или других белков, в том числе гормонов либо *in vitro*, либо *in vivo*. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть полезны при тестировании на наличие болезни, например, в сыворотке или крови пациентов. Болезнь может включать OX40-опосредованные заболевания или заболевания или показания, не связанные с OX40, в том числе различные виды рака, воспалительное или аутоиммунное заболевание. Антитела также могут быть использованы в радиоиммуноанализе и радиоиммунотерапии рака и некоторые новые способы тестирования могут использовать эти описанные антитела для нацеливания только на клеточные мембранны специфических типов клеток, например, рака.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть частью набора или другого диагностического пакета. Как таковой в настоящем документе приведен диагностический набор или изделие для использования со способом предварительной обработки в настоящем документе. Диагностический набор может содержать один или более из следующих: антагонист/антитело/референтный препарат, позитивное контрольное нейтрализующее антитело (предпочтительно, козы или яванского макака); протеин-A+G-колонку (например, протеин-A/G-колонка); обезжирающий реагент; буфер(ы) для аффинной очистки иммуноглобулина (например, связывающий, элюирующий и нейтрализующий буферы); комплементарную сыворотку; раствор для разведения клеток, инструкции по эксплуатации или литературу; виал замороженных клеток (например, клетки WIL2); реагент для мечения клеток (такой как CELL TITER GLO.RTM) и т.д. Как пример, диагностический набор может включать, но не ограничиваться этим: (а) обезжирающий реагент; (б) буфера (например, связывающий и элюирующий буферы) для аффинной очистки иммуноглобулинов, а также (в) инструкцию, инструктирующую пользователей диагностического набора как использовать набор для предварительной обработки биологических образцов от субъекта с аутоиммунным заболеванием или раком до проведения клеточного биотестирования (такого, как анализ нейтрализующего антитела) на образце (например, во избежание сывороточной интерференции). Диагностический набор необязательно дополнительно включает один или более из: референтный препарат, позитивное контрольное нейтрализующее антитело, комплементарную сыворотку, раствор для разведения клеток и реагент для мечения клеток и т.д.

Антитела и другие открытия, описанные в настоящем документе, также обеспечивают высокопроизводительные скрининговые способы. Более конкретно и, как понятно специалистам в данной области, стали возможными высокопроизводительные способы для выявления антагонистических или агонистических моноклональных антител, или малых молекул, которые связываются с рецепторами OX40 и могут ингибировать формирование и функцию Tr1-клеток или способствовать образованию и функции Tr1-клеток. В одном из таких способов линия Т-клеток человека (SU-DHL-1), имеющих способность продуцировать ИЛ-10, была трансфицирована геном OX40 человека (SUOX40). 100000 клеток SUOX40 культивировали либо с 100000 мышиных фибробластов (L-клеток), либо с 100000 мышиных фибробластов, экспрессирующих лиганд OX40 человека (лиганд OX40 L-клеток) в 96-луночном планшете. После 48 ч культивирования супернатанты культуры собирали для измерения ИЛ-10 ИЛ-10-специфическим ELISA. В репрезентативном эксперименте 100 000 клеток SUOX40, культивируемые в отсутствии лиганда OX40, секретировали до 6000 пг/мл ИЛ-10. В присутствии лиганда OX40 100000 клеток SUOX40 секретировали менее 1000 пг/мл ИЛ-10. Этот способ культивирования может быть использован для скрининга, в частности, антагонистических моноклональных антител или малых молекул, которые блокируют способность лиганда OX40 ингибировать продукцию ИЛ-10 клетками SUOX40. В качестве альтернативного варианта этот способ культивирования может быть изменен путем замены L-клеток, экспрессирующих лиганд OX40, потенциальными агонистическими моноклональными антителами или малыми молекулами, специфичными к OX40, чтобы определить, в частности, их способность ингибировать продукцию ИЛ-10 клетками SUOX40.

Антитела к OX40, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве анализа или в анализе для тестирования или измерения активности препарата или другой молекулы, обнаруженной в организме или органическом образце. Они также могут быть использованы в количественном анализе для измерения количества вещества в образце. Биотестирования и иммунотестирования являются одними из многих разновидностей специализированных биохимических анализов, которым эти антитела могут быть использованы. Антитела к OX40, изложенные в настоящем документе, могут быть использованы в других тестах для оценки процессов, таких как активность фермента, захват антигена, активность стволовых клеток и конкурентное белковое связывание.

Человеческие L-клетки, экспрессирующие GITRL, OX40L, 4-1BBL, ICOSL, были получены ретровирус-опосредованной трансдукцией, что понятно специалистам в данной области. Вкратце, полноразмерная кодирующая последовательность GITRL человека (идентификационный номер NM_005092), OX40L (идентификационный номер NM_003326), 4-1BBL (идентификационный номер NM_003811), ICOSL (идентификационный номер NM_015259) была амплифицирована ОТ-ПЦР с РНК, полученной из HSV-1, стимулированного МКПК. Затем кДНК клонировали в ретровирусный вектор pMIGW2 на основе MSCV и полученные плазмиды были верифицированы расщеплением рестриктазой и секвенированием ДНК. Для получения рекомбинантного ретровируса, каждый вектор котрансфицировали упаковочными

конструкциями pCL-gp (gag/pol) и pHCMV-VSVg (VSV-гликопротеиновый внешний слой) в клетках HEK293T. Два дня спустя собирали супернатанты вируссодержащих культур и использовали для инфицирования CD32 L-клеток при ПУМ 100. При этом условии >95% клеток были продуктивно трансдудированы.

Изолированные CD14⁺ моноциты (чистота >94%) культивировали в присутствии 100 нг/мл GM-CSF и 50 нг/мл ИЛ-4 (оба от R&D) в течение 5 дней, что понятно специалистам в данной области. Полученные незрелые ДК промывали и культивировали в течение 24 ч с ИФН- α (1000 ед/мл, PBL Biomedical Laboratories), ИЛ-10 (10 нг/мл, R&D) и облученными CD40L-трансфицированными L-клетками (соотношение ДК к L-клеткам 4:1) для получения зрелых ДК, что понятно специалистам в данной области.

Наивные CD4⁺ Т-клетки и CD4⁺ Т-клетки памяти (каждые чистотой >99%) были выделены из МКПК использованием набора II для выделения CD4⁺ Т-клеток (Miltenyi Biotec) с последующей сортировкой клеток (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻CD25⁻-фракция как наивные Т-клетки и CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD25⁺-фракция как Т-клетки памяти), что понятно специалистам в данной области. 4×10^4 свежих очищенных аллогенных наивных CD4⁺ Т-клеток были со-культурированы с незрелыми или культивированными ДК (соотношение ДК к Т 1:10) в присутствии или в отсутствии рекомбинантного OX40L человека (R&D, 100 нг/мл) в круглодонных 96-луночных планшетах для культуры в течение 7 дней, что понятно специалистам в данной области. Очищенные CD4⁺ Т-клетки также культивировали с ИЛ-12 (10 нг/мл, R&D), ИЛ-4 (25 нг/мл, R&D) или с комбинацией дексаметазона (5×10^{-8} М, Life Technologies) и 1альфа, 25-дигидроксивитамина D₃ (10^{-7} М) в течение 7 дней в присутствии растворимого моноклонального антитела (CD28.2, 1 мкг/мл) и ИЛ-2 (50 ед/мл, R&D) на облученных CD32/OX40L-L-клетках, CD32/GITRL-L-клетках, CD32/4-1BBL-L-клетках или родительских CD32-L-клетках, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом (OKT3, 0,2 мкг/мл) в 48-луночных планшетах для культуры (соотношение Т-клетки к L-клетке 2,5:1), что понятно специалистам в данной области. В некоторых экспериментах CD4⁺ Т-клетки культивировали в течение 7 дней на CD32-L-клетках, смеси CD32-L-клеток и CD32/ICOSL-L-клеток (соотношение 1:1) или смеси CD32/ICOSL-L-клеток и CD32/OX40L-L-клеток (соотношение 1:1), предварительно покрытых моноклональным анти-CD3 антителом (0,2 мкг/мл) в 48-луночных планшетах для культуры, что понятно специалистам в данной области. Для культур была использована RPMI 1640 с добавлением 10% FCS, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, пенициллина G и стрептомицина, что понятно специалистам в данной области.

Культивированные Т-клетки были собраны и промыты, затем повторно стимулированы анти-CD3, связанными с пластиной (5 мкг/мл) и растворимым анти-CD28 (2 мкг/мл) в концентрации 1×10^6 клеток/мл в течение 24 ч, что понятно специалистам в данной области. Уровни ИЛ-4, ИЛ-10, ФНО- α и ИФН- α в супернатантах измеряли при помощи ELISA (все комплекты R&D), что понятно специалистам в данной области. Для внутриклеточной продукции цитокинов, культивированные Т-клетки повторно стимулировали 50 нг/мл PMA плюс 2 мкг/мл иономицина в течение 6 ч. Брефелдин А (10 мкг/мл) был добавлен в течение последних 2 ч, что понятно специалистам в данной области. Клетки окрашивали комбинацией меченых фикоэритрином моноклональных антител к ИЛ-4 или ФНО- α с FITC-меченными моноклональными антителами к ИФН- α и меченными аллофикационным анти-ИЛ-10 (все от BD) с использованием набора FIX и PERM (CALTAG), что понятно специалистам в данной области.

Т-клетки были собраны и ресуспендированы в среде, содержащей ЭДТА, чтобы диссоциировать кластеры, что понятно специалистам в данной области. Подсчитывали живые клетки методом исключения мертвых клеток трипановым синим, что понятно специалистам в данной области. Для анализа суппрессивной функции наивные CD4⁺ Т-клетки (A) и Tr1-клетки, образованные из наивных CD4⁺ Т-клеток под действием моноклонального анти-CD3 антитела, моноклонального анти-CD28 антитела, ИЛ-2, дексаметазона и витамина D₃ в присутствии родительских L-клеток (B) или OX40L-L-клеток (C), этих трех типов клеток и их смеси в соотношении 1:1 затем повторно стимулировали в течение 5 дней культивированием в присутствии 5 мкг/мл моноклонального анти-CD3 антитела и 1 мкг/мл моноклонального анти-CD28 антитела, после чего клеточную пролиферацию оценивали по захвату [³H]тимидина, что понятно специалистам в данной области.

Получение специфичных моноклональных антител к OX40 человека.

Авторы получили множественные агонистические мышиные моноклональные антитела к OX40 человека. Антигенспецифичная связывающая способность антител была подтверждена методом проточной цитометрии (фиг. 10-12). Агонистическая активность антител была подтверждена с помощью функциональных анализов. Изобретатели обнаружили, что девять из 20 специфичных антител к OX40 могут блокировать витамин D₃/дексаметазон-индуцированное формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток (фиг. 13), усиливать CD4⁺ Т-клеточную пролиферацию (фиг. 14) и подавлять продукцию ИЛ-10 ICOS⁺CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg (фиг. 16). Изобретатели титровали антитела и обнаружили, что пятеро обладали мощной активностью в подавлении формирования Tr1-клеток в концентрациях всего 4 нг/мл (фиг. 15).

Антитела к OX40 ингибируют функцию CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg.

Некоторые из моноклональных антител к OX40 ингибируют супрессивную функцию FOXP3⁺ Treg

(фиг. 17). Из пяти антител (119-8B, 119-43, 119-122, 119-173B и 106-222), которые мощно ингибируют продукцию ИЛ-10 Tr1-клетками и CD4⁺CD25^{high}CD127⁺FOXP3⁺ Tregs, три (119-43, 119-122 и 106-222) были мощными в блокировании функции CD4⁺CD25^{high}CD127⁺FOXP3⁺ Treg (фиг. 17). Тем не менее, два (119-33 и 120-140A) из 11 антител, которые не имеют активности против продукции ИЛ-10, блокируют функцию CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg (фиг. 18).

Моноклональные антитела к OX40 человека.

Получение моноклональных антител к OX40 человека было проведено, например, путем иммунизации 6-8-недельных мышей линии BALB/C линии мышиных клеток, трансфицированных OX40 человека в соответствии с установленными протоколами. Клоны гибридомы, секрецирующие моноклональное антитело, которое специфически окрашивало клетки OX40⁺, были установлены и в дальнейшем проанализированы.

Авторы изобретения разрабатывают исчерпывающий скрининг для выявления тех клонов, которые триггируют активацию OX40 (например, агонистические антитела) путем ингибиции образования и функции Tr1-клеток. Эти клоны в дальнейшем очищались. Агонистические антитела к hOX40 могут быть гуманизированы и использованы в клинических протоколах для противоопухолевой терапии у человека, либо самостоятельно, либо в комбинации с противоопухолевой вакцинацией и другими адьювантами. Несколько различных типов опухолей могут быть целью этих антител, в том числе меланома, лимфома и рак молочной железы.

В другом варианте осуществления изобретения для иммунизации путем инъекции в подушечки лап или подкожной иммунизации использовали 6-8 недельных самок мышей линии BALB/C. Каждой мыши вводили 5 млн мышиных L-клеток, трансфицированных OX40 человека (L-OX40) 6 раз с интервалом в 3 дня. Через три дня после шестой инъекции мышей умерщвляли и удаляли подколенные лимфатические узлы (при иммунизации путем инъекции в подушечки лап) или селезенку (при подкожной иммунизации) и клетки сливали с клетками миеломы SP2.0 или миеломы NSO в соотношении 1 к 1 для получения гибридомных клонов, используя установленные протоколы. Клоны гибридом, секрецирующие моноклональное антитело, были затем проверены на их аффинность связывания с клетками L-hOX40 анализами ELISA. Супернатанты гибридом, которые связываются с клетками L-hOX40, но не с родительскими L-клетками, были дополнительно подтверждены на связывание с клетками L-hOX40 и SUPM2-hOX40 проточным цитометрическим анализом.

В эксперименте на фиг. 10 супернатанты гибридомы hOX40 были проверены против L-L hOX40 по сравнению с родительскими L-клетками при помощи ELISA. Были выбраны двадцать специфичных моноклональных антител к hOX40. Двадцать миллионов L-клеток или L-клеток, экспрессирующих OX40 человека (L-hOX40), наносили на 96-луночный планшет, смешивая клетки с 0,01% хлоридом магния кальция в PBS и оставляли высыхать в течение ночи в ламинарном шкафу. Планшеты затем замораживали при температуре -20°C по крайней мере за день до использования. Для реакции преципитации антител замороженные клетки регидратировали с PBS и промывали промывочным буфером, содержащим PBS плюс 0,05% Твин-20 и блокировали 2% BSA в промывочном буфере. Высушенные клетки затем были использованы для связывания с антителами к OX40 супернатантов. Связывание антитела с клеткам затем обнаруживали с вторичным антителом, антимышинным IgG FC HRP. Гибридомные специфичные hOX40 супернатанты узнают L-клетки, экспрессирующие OX40, но не родительские L-клетки.

В эксперименте на фиг. 11 моноклональные специфичные антитела к hOX40 были исследованы с помощью проточного цитометрического анализа. Равное число (100k) L-клеток и L-hOX40 были смешаны в буфере FACS (1% FCS/2 mM ЭДТА/ФСБ) и инкубировали с 0,5 мкг антител, очищенных FPLC (Protein A HiTrap/Gentle Ag/Ab элюирующий буфер). Затем клетки промывали и окрашивали с вторичным антителом, фикоэритринкононьютированным анти-IgG мыши. Два пика указывают на положительную и отрицательную окраску моноклональным антителом к hOX40. Один пик говорит об отсутствии связывания или неспецифическом связывании антител. Двадцать специфичных моноклональных антител к hOX40 были подтверждены методом проточной цитометрии.

В эксперименте на фиг. 12 специфичность моноклональных антител к hOX40 была подтверждена с помощью клеток SUPM2, экспрессирующих hOX40 (SUPM2-hOX40). Равное число (100k) SUPM2 и SUPM2-hOX40-клеток были смешаны в буфере FACS (1% FCS/2 mM ЭДТА/ФСБ) и использованы для связывания моноклональных антител к hOX40, как на фиг. 11. Специфичность связывания каждого антитела была проанализирована методом проточной цитометрии. Два пика указывают на положительную и отрицательную окраску моноклональным антителом к hOX40, в то время как один пик говорит об отсутствии связывания или неспецифическом связывании антител. Двадцать специфичных моноклональных антител к hOX40 были подтверждены.

В эксперименте на фиг. 13 авторы изобретения попытались идентифицировать специфичные моноклональные антитела к OX40 человека, которые могут ингибировать формирование Tr1-клеток из CD4⁺ T-клеток, стимулированных витамином D₃ (10 микромоль mM)/дексаметазоном (50 наноМ), CD32L/ICOSL и анти-CD3/CD28 (0,2 микрограмм/мл). Моноклональные антитела к hOX40 были добавлены на день 0 культуры клеток и CD4⁺ T-клетки после 7 дней стимуляции были подвергены внутриклеточному окрашиванию ИЛ-10 с последующим анализом методом проточной цитометрии. Данные реpre-

зентативного анализа с помощью активизированной флюоресценцией сортировки клеток (FACS) приведены на А и проценты Tr1-клеток для всех обработок моноклональными антителами к hOX40 показаны на В. Используя клетки, полученные в этом эксперименте, авторы изобретения попытались выявить специфичные моноклональные антитела к hOX40, которые стимулируют CD4⁺ Т-клеточную пролиферацию (фиг. 14, клетки подсчитывали на 7 день после стимуляции) и ингибируют формирование Tr1 из CD4⁺ (фиг. 13).

Для того чтобы идентифицировать такие моноклональные антитела к hOX40 на их способность ингибировать образование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, Tr1-клетки были получены и культивированы, как описано в экспериментах на фиг. 13 выше. Репрезентативные данные FACS приведены на А и проценты Tr1-клеток после обработки девятыю моноклональными антителами к hOX40 приведены на В. Пять специфичных моноклональных антител к hOX40 сильно ингибировали формирование Tr1-клеток в концентрации 4 нг/мл (фиг. 15).

В эксперименте на фиг. 16А, 16В и 16С свежеотсортированные ICOS⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{high} Т-клетки стимулировали анти-CD3 (0,2 мкг/мл) в присутствии CD32L/ICOSL-клеток и CD32L/hOX40L-клеток или моноклональных антител к hOX40 или контрольного антитела в течение 5 дней. Затем клетки подсчитывали и 5×10^4 клеток повторно стимулированы с анти-CD3/CD28 в течение 24 ч и супернатанты анализировали на продукцию ИЛ-10 набором Elisa. Авторы изобретения идентифицировали специфичные моноклональные антитела к hOX40, которые ингибируют формирование Tr1 из CD4⁺ Т-клеток, также подавляют продукцию ИЛ-10 натуральными ICOS⁺CD4⁺CD25^{high} Т-клетками.

Свежеотсортированные ICOS⁺ ICOS⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{high} Tregs культивировали с меченными CFSE клетками CD4⁺CD25^{low} в присутствии облученных моноцитов и анти-CD3 (0,3 мкг/мл) и МАт к hOX40. Через 3,5 дня культивирования пролиферацию клеток оценивали разведением CFSE в клетках FACS анализом (фиг. 16С).

Фиг. 17А и 17В описывают идентификацию моноклональных антител к hOX40, которые ингибируют формирование Tr1-клеток и блокируют функцию FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} Treg. Свежеотсортированные FOXP3⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{high} Т-клетки ($3,5 \times 10^4$) культивировали с меченными CFSE клетками CD4⁺CD25^{low} (7×10^4) в присутствии облученных моноцитов (7×10^4 , 6000 рад) и 0,3 мкг/мл анти-CD3 и различных концентраций моноклонального антитела к hOX40. После 3-4 дней культивирования пролиферацию клеток оценивали по разведению CFSE в клетках методом проточной цитометрии. Процент разделенных клеток указан. Репрезентативные анализы проточной цитометрии приведены на фиг. 17А. Данные для 6 моноклональных антител приведены на фиг. 17В.

В эксперименте на фиг. 18 свежеотсортированные FOXP3⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{high} Т-клетки ($3,5 \times 10^4$) культивировали с меченными CFSE клетками CD4⁺CD25^{low} (7×10^4) в присутствии облученных моноцитов (7×10^4 , 6000 рад) и 0,3 мкг/мл анти-CD3 и различных концентраций моноклонального антитела к OX40. После 3-4 дней культивирования пролиферацию клеток оценивали по разведению метки CFSE в клетках методом FACS. Данные репрезентативны для двух экспериментов. Авторы изобретения определили моноклональные антитела к hOX40, которые не ингибируют формирование Tr1, но блокируют функцию FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} Treg.

В эксперименте на фиг. 19А и 19В полученные из лимфомы CD4⁺CD25^{high} Т-клетки культивировали с меченными CFSE клетками CD4⁺CD25^{low} (7×10^4), изолированными от здорового донора, в присутствии облученных аллогенных моноцитов (7×10^4 , 6000 рад) и 0,3 микрограмм/мл анти-CD3 и 25 мкг/мл моноклонального антитела к hOX40. После 3-4 дней культивирования пролиферацию клеток оценивали по разведению CFSE FACS анализом. Репрезентативные FACS анализы показано на фиг. 19А и данные для всех экспериментов показано на фиг. 19В. Авторы изобретения обнаружили, что агонистические антитела к hOX40 блокируют функцию CD4⁺CD25^{high} Treg, полученных из лимфомы.

Фиг. 20 демонстрирует идентификацию агонистических антител к OX40, которые специфически связываются с OX40 человека и макаки резуса. Мононуклеарные клетки периферической крови макаки резуса были получены путем фиколл-центрифугирования. CD4⁺ Т-клетки были получены из микрографиулированных CD4. CD4⁺ Т-клетки стимулировали 10 мкг/мл лектина фасоли обыкновенной (PHA). Через два дня после стимуляции клетки окрашивали МАт к hOX40 с козьим антимышьяным IgG APC и CD69-PE. 106-317 служил в качестве отрицательного контроля. Показано, что шесть МАт к hOX40, которые сильно активируют Т-клеточную пролиферацию, могли связывать активированные CD4⁺ Т-клетки макаки-резуса. Эти результаты указывают на то, что токсичность этих шести моноклональных тел к hOX40 может быть проверена на обезьянах.

Только семь из 500 положительных клонов к OX40 человека, полученных с использованием принятых протоколов слияния, проявили свойство триггирования OX40, включая, но не ограничиваясь этим, способность блокировать формирование ИЛ-10-продуцирующих Tr1 и супрессивную функцию nTreg, как описано в табл. 1.

Таблица 1

Список специфичных моноклональных антител к OX40

	Клон моноклонального антитела	Блокирует ИЛ-10	Блокирует nTreg
1	106-108	-	-
2	106-317	-	-
3	106-107	-	-
4	106-148	-	-
5	119-204A	-	-
6	119-220C	-	+
7	119-33A	-	+
8	119-58	-	+
9	119-181A	-	+
10	119-157A	-	+
11	120-140A	-	+
12	119-8B	+	-
13	119-173B	+	-
14	106-132	+	+
15	106-222	+	+
16	119-43	+	+
17	119-122	+	+
18	119-69A	+	+
19	120-56	+	+
20	120-270	+	+

Клоны гибридомы 106-222 и 119-122 были выбраны, основываясь на трех критериях.

1. Они ингибируют формирование Tr1-клеток из Т-клеток CD4⁺ (индуцильные Treg).
2. Обращают супрессивную функцию FOXP3⁺nTreg-клеток.
3. Они подавляют дозозависимое ингибирование выключения Tr1-клеток и обращение функции FOXP3⁺nTreg-клеток.

Химерные и гуманизированные антитела.

Гуманизация (также называемая решейпинг или CDR-пересадка) является признанной техникой для снижения иммуногенности моноклональных антител из ксеногенных источников (включая, но не ограничиваясь этим, грызунов), а также для улучшения активации ими иммунной системы человека. Хотя механика получения инженерного моноклонального антитела с использованием способов молекулярной биологии известна, простая пересадка гипервариабельных участков грызунов (CDR) в человеческие каркасные участки не всегда воссоздает сродство и специфичность исходного моноклонального антитела.

Чтобы гуманизировать антитело, дизайн гуманизированного антитела становится важнейшим этапом в воспроизведении функции исходной молекулы. Этот дизайн включает различные варианты: длина CDR, используемые каркасные участки человека и замена остатков моноклонального антитела грызунов в каркасные участки человека (обратные мутации). Положения этих обратных мутаций были определены главным образом секвенированием/структурным анализом или анализом гомологичной модели 3D-структуры вариабельных областей.

В последнее время были использованы библиотеки фагов для варьирования аминокислотами в выбранных позициях. Аналогично были использованы многие подходы для выбора наиболее подходящих каркасных участков человека, в которые прививать CDR грызунов. В ранних экспериментах использовали ограниченный набор хорошо изученных моноклональных антител человека (часто, но не всегда там, где структура была доступна), независимо от идентичности последовательности моноклональному антителу грызуна (так называемый подход фиксированных каркасных участков). Некоторые группы используют вариабельные области с высокой идентичностью аминокислотной последовательности вариабельным областям грызунов (гомологичное соответствие или наилучшее совпадение), другие используют консенсусные последовательности или последовательности зародышевой линии, а третий выбирают фрагменты последовательностей каркасных участков в каждой вариабельной области легкой или тяжелой цепи из нескольких различных моноклональных антител человека. Есть также разработанные подходы к гуманизации, которые заменяют поверхностные остатки грызуна на наиболее похожие остатки, найдены в моноклональных антителах человека ("resurfacing" или "veneering"), и те, которые используют различные определения длины CDR. Гуманизированные антитела описаны ниже. Однако химерное антитело, содержащее вариабельные области тяжелых и легких областей SEQ ID NO: 4 и 10 или SEQ ID NO: 16 и 22, также описаны в настоящем документе.

Гуманизированные моноклональные антитела были получены из мышного антитела к OX40.

Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 13. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 14. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 15.

Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 19. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или 20. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 21.

Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 23, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90 процентов идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 или 23. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 17, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 процентов идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или 17.

Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь вариабельную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 12 или 24, или нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере, на 90 процентов идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или 24. Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 6 или 18, или нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 90 процентов идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 18.

Экспрессия гуманизированных антител к OX40.

Антитело или детерминанта антитела, в соответствии с изобретением, могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии генов легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина в клетке-хозяине. Чтобы экспрессировать антитело рекомбинантно, клетку-хозяин трансфицируют одним или более рекомбинантными векторами экспрессии, несущими фрагменты ДНК, которые кодируют легкую и тяжелую цепи антитела, таким образом, что легкие и тяжелые цепи экспрессируются в клетке-хозяине и, предпочтительно, секретируются в среду, в которой культивируют клетки-хозяева, из этой среды антитела могут быть восстановлены. Стандартные методики рекомбинантной ДНК используются для получения генов тяжелой и легкой цепи антител, включение этих генов в рекомбинантные векторы экспрессии и введение векторов в клетки-хозяева как описано в Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989) и в патенте США № 4816397 Boss et al.

Антитела или фрагменты антител и варианты могут быть получены из различных клеток животных, преимущественно из клеток млекопитающих, особенно предпочтительными являются клетки мыши и человека. Кроме того, системы для экспрессии рекомбинантных ДНК могут включать те, которые используют клетки-хозяева и экспрессионные конструкции, которые были разработаны для продуцирования высоких уровней того или иного белка. Такие клетки-хозяева и экспрессионные конструкции могут включать *Escherichia coli*; несущие экспрессионные конструкции, полученные из плазмид или вирусов (бактериофагов), дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, несущие эпизомные или хромосомные интегрированные экспрессионные конструкции; клетки насекомых и вирусов, такие как клетки Sf9 и бакуловирус; клетки млекопитающих, несущие интегрированные в эпизомы или хромосомы (включая, но не ограничиваясь этим, ретровирусные) экспрессионные конструкции (такие способы, например, показаны в рукописи Verma et al., J. Immunol. Methods 216:165-181, 1998). Антитела могут также продуцироваться в растениях (такие способы, например, показаны в патенте США № 6046037; Ma et al., Science 268:716-719, 1995) или по технологии фагового дисплея (такие способы, например, показаны в Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455, 1994).

Антитела к OX40 человека, показавшие уровень активности и специфичность связывания/аффинность, которые являются желательными, могут быть в дальнейшем манипулированы стандартными технологиями рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов вариабельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или ген ScFv. В этих манипуляциях VL- или VH-кодирующий фрагмент ДНК функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, таким как константная область антитела или гибкий линкер. Термин "функционально связанный", используемый в данном контексте, подразумевает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые этими двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки.

В другом аспекте изолированная ДНК, кодирующая область VH, может быть преобразована в ген

полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания VH-кодирующую ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов тяжелой цепи константной области человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константной областью тяжелой цепи может быть константная область IgG-1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD и любой их аллотипический вариант, как описано в Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), но наиболее предпочтительны константные области IgG1 и IgG4. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента, VH-кодирующая ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только тяжелую цепь CH1 константной области.

Кроме того, гуманизированное антитело, связанное с поверхностным антигеном, может взаимодействовать с FcR-несущими клетками. Такое взаимодействие может вызывать эффекторную функцию, такую как ADCC и/или повысить активацию из-за Fc-опосредованного перекрестного сшивания. Взаимодействие может быть полезно или вредно для терапии. Такие вредные побочные эффекты включают озноб, лихорадку, артериальную гипотензию, а в некоторых случаях, одышку (Thistlethwaite JR Jr., Cosimi AB, Delmonico FL, et al.).

Начало некоторых вредных эффектов может быть положено белковым комплексом, найденным на поверхности Т-клетки. После активации Т-клетки белковый комплекс принимает участие в трансдукции сигналов, генерируемых с помощью рецептора антигена. Вкратце, активация Т-клетки начинает каскад событий, которые включают усиленное перекрестное сшивание рецептора антигена. Перекрестное сшивание рецепторов может способствовать сильной митогенной активации, которая приводит к индуцированию некоторых цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкин-2 (ИЛ-2) и гамма-интерферон (ИФН- γ). Эти цитокины, как известно, токсичны, если продуцируются в больших количествах.

Например, моно克лональные анти-CD3-антитела используются в настоящее время для лечения аутоиммунных заболеваний, включая сахарный диабет I типа, в котором Т-клетки манипулировали нападение на панкреатические островки, производители инсулина (Kaufman A, and Herold K. Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes Diabetes Metab Res Rev 2009; 25: 302-306). Анти-CD3-антитела, как известно, ингибируют лизис мишени Т-клетками и усиливают перекрестное сшивание рецептора антигена CD3. Кроме того, вместе с его мощной митогенной активностью, анти-CD3-антитело, как известно, является мощным индуктором цитокинов, в частности, фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкина-2 (ИЛ-2) и гамма-интерферона (ИФН- γ). Массивное высвобождение цитокинов, в частности, ФНО- α , из Т-клеток в ответ на препарат (Chatenoud L.) создает токсические эффекты. Эти нежелательные побочные эффекты были отнесены к перекрестному сшиванию Т-клеток, несущих молекулы CD3 и FcR-несущих клеток, которые связываются с Fc-детерминантой антител. Перекрестное сшивание активирует как Т-клетки, так и FcR-несущие клетки, что ведет к массовому высвобождению цитокинов, как упоминалось ранее.

Аналогично, к потенциальным нежелательным побочным эффектам может привести использование антител к OX40. Например, антитела к OX40, которые связываются с OX40-экспрессирующими Т-клетками, могут также связываться с FcR-несущими клетками и провоцировать выработку цитокинов, что может быть полезным или вредным для пациентов с антителом. Чтобы преодолеть эту потенциальную проблему, авторы изобретения разработали и представили в настоящем документе способы мутирования FcR-детерминанты антитела кOX40 во избежание токсичных эффектов и обеспечения мутаций FcR-детерминанты, которые могут быть желательными.

Сайт IgG1 человека, который взаимодействует с FcR (CD16, CD32 и CD64) известен. Он расположен в верхнем домене CH2. Наиболее важными аминокислотами являются два остатка Leu в положениях 234 и 235. Путем мутации этих двух остатков на два остатка Ala, взаимодействие IgG1 со всеми FcRs прекращается. Гуманизированное анти-CD3, содержащее эти мутации (HuOKT3AA), является более безопасным препаратом и имеет механизм действия, который отличен от HuOKT3. См., например, патент США № 6491916, включенный в качестве ссылки во всей своей полноте в настоящем документе.

Позиции AA-мутанта показаны в следующем порядке:

234 235

---A---P---E---L---L---G---G---P---Дикий тип верхнего CH2 IgG1

---A---P---E---A---A---G---G---P--- AA Мутант верхнего CH2 IgG1

Hu222AA и Hu122AA, описанные в настоящем документе, могут содержать эти мутации. Если тест-система содержит FcR-несущие клетки, вы можете увидеть разницу между диким типом и AA-мутантом. В противном случае, два антитела должны вести себя одинаково.

Изолированная ДНК, кодирующая область VL, может быть конвертирована в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания VL-кодирующей ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей легкую цепь константной области, CL. Последовательности генов

константных областей легкой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, E. A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, имеющие эти области, могут быть получены при помощи стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может быть константной областью каппа или лямбда.

Для создания гена ScFv VH- и VL-кодирующие фрагменты ДНК функционально связываются с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий последовательность аминокислот (Gly._{sub.4-Ser})._{sub.3}, таким образом, что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988), Science 242:423-426; Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990), 348:552-554.

Рассматривается модификация(ции) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящем документе.

Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают путем внесения соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или синтезом пептида. Такие модификации включают, например, делеции из и/или инсерции в, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, инсерции и замены сделана для получения окончательной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Эти изменения аминокислот могут быть введены в конкретную аминокислотную последовательность антитела во время создания последовательности.

Полезный способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", как описано Cunningham and Wells (1989), Science, 244:1081-1085. Здесь определяют остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно, аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те локализации аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем изменяют путем введения дополнительных или других вариантов, или сайтов замещения. Таким образом, в то время как сайт для введения варианта аминокислотной последовательности предопределен, природу самой мутации не нужно предопределять. Например, для анализа проявления мутации в данном сайте проводятся сканирование аланином или случайный мутагенез в целевом кодоне или области и экспрессируемые иммуноглобулины скринируют на желаемую активность.

Инсерции аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбокси-концевые слияния в длину от одного остатка с полипептидами, содержащим сто или более остатков, а также инсерции одного или нескольких аминокислотных остатков в последовательности. Примеры терминальных инсерций включают антитело с N-концевым остатком метионина или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает период полураспада антитела в сыворотке. Другой тип варианта аминокислот антитела изменяет изначальный паттерн гликозилирования антитела. Такое изменение включает удаление одного или нескольких углеводных остатков, найденных в антителе, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в антителе.

Другой тип варианта - это вариант замены аминокислоты. Эти варианты имеют, по крайней мере, один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но изменения FR также рассматриваются. Консервативные замены представлены в табл. 1 патента США № 7812133, кол. 43, ст. 55 до кол. 44 ст. 49, включены в настоящий документ путем ссылки и под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то более существенные изменения, названные "типичные замены" в табл. 1, или, как описано далее в отношении классов аминокислот, могут быть введены и продукты проскринированы.

Кроме того, существенные модификации биологических свойств антитела достигаются путем выбора замен, которые значительно отличаются по их влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, листа или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте, или (в) основной части боковой цепи. Натуральные остатки делятся на группы на основе общих свойств боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu, (4) основные: his, lys, arg; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe. Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

Для экспрессии антител или детерминант антител, описанных в настоящем документе, ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные, как описано выше, вводятся в векторы экспрессии таким образом, что гены функционально связаны с последовательностями,

управляющими транскрипцией и трансляцией. В этом контексте термин "функционально связанный" предназначен для обозначения того, что ген антитела лигируют в вектор таким образом, что последовательности, управляющие транскрипцией и трансляцией, в векторе служат своему целевому предназначению регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности, контролирующие экспрессию, выбираются таким образом, чтобы они были совместимы с используемой экспрессиющей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть вставлены в отдельный вектор или, что более типично, оба гена вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Гены антител вставляются в вектор экспрессии с помощью стандартных способов (например, лигирование комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигирование тупых концов, если нет сайтов рестрикции).

На фиг. 23 показана одна такая схематическая структура вектора экспрессии для антитела Hu106-222 IgG1/каппа. Двигаясь по часовой стрелке с сайта Sall наверху, плазмида содержит транскриptionный участок тяжелой цепи, начинающийся с главного предраннего промотора цитомегаловируса человека (CMV) и энхансера (CMV промотор) для инициации транскрипции гена тяжелой цепи антитела. За CMV промотором следует экзон VH, геномная последовательность, содержащая гамма-1 константную область тяжелой цепи человека, включающая экзоны CH1, шарнира, CH2 и CH3 с промежуточными инtronами и сайт полиденилирования за экзоном CH3. После последовательности гена тяжелой цепи с CMV промотора начинается участок транскрипции легкой цепи, за которым следует экзон VL и геномная последовательность, содержащая экзон цепи каппа константной области человека (CL) с предшествующим инtronом, и сайт полиденилирования после экзона CL. После гена легкой цепи следует предранний промотор SV40 (SV40 промотор), ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы E.coli (gpt) и сегмент, содержащий сайт полиденилирования SV40 (SV40 поли(A) сайт). В конце плазмида содержит часть плазмиды pUC19, содержащую бактериальную точку начала репликации (pUC ori) и ген бета-лактамазы (бета-лактамаза). Локализация соответствующих сайтов рестрикции ферментов показана на фигуре. Рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке с амино-концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (т.е. сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

Как отмечалось выше, в дополнение к генам цепей антитела, рекомбинантные векторы экспрессии, соответствующие изобретению, несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Термин "регуляторная последовательность" предназначен для охватывания промоторов, энхансеров и других элементов, контролирующих экспрессию (например, сигналы полиденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Следует понимать, что дизайн вектора экспрессии, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающих включают вирусные элементы, которые направляют экспрессию белка в клетках млекопитающих на высоком уровне, такие как промоторы и/или энхансеры, выделенные из цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), вирус Simian 40 (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40), аденоовирус (например, аденоовирсный главный поздний промотор (AdMLP)) и полиома. Для дальнейшего описания вирусных регуляторных элементов и их последовательностей см., например, патент США № 5168062 Stinski, патент США № 4510245 Bell et al. и патент США № 4968615 Schaffner et al., патент США № 5464758 Bujard et al. и патент США № 5654168 Bujard et al.

В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии, соответствующие изобретению, могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемых маркеров. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клетки хозяина, в которую был интродуцирован вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017 все Axel et al.). Например, в типичном случае ген селектируемого маркера обуславливает устойчивость к лекарственным веществам, таким как G418, гигромицин или метотрексат клетки-хозяина, в которую был интродуцирован вектор. Предпочтительные гены селектируемых маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr.sup.-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией, основанной на метотрексате) и генneo (для селекции, основанной на G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей, вектор(ы) экспрессии, кодирующий(щие) тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяин с помощью стандартных способов. Различные трактовки термина "трансфекция" предназначены для включения широкого ряда способов, обычно используемых при интродукции экзогенной ДНК в прокариотную или эукариотную клетку-хозяина, например, электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию с помощью DEAE-декстрина и т.п. Хотя теоретически является возможным экспрессировать антитела, соответствующие изобретению, либо в прока-

риотных, либо в эукариотных клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотных клетках, и, наиболее предпочтительно, в клетках-хозяевах млекопитающих, является наиболее предпочтительной, поскольку такие эукариотные клетки, и особенно клетки млекопитающих, более вероятно, чем прокариотные клетки собирают и секретируют правильно образованное и иммунологически активное антитело. Клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описанные в настоящем документе, включают яичник китайского хомячка (клетки CHO) (такие как клетки DHFR-CHO, описанные в Urlaub and Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, использованные с селективным маркером DHFR, например, как описано в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982), Mol. Biol. 159:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, интродуцируют в клетки-хозяева млекопитающих, антитела образуются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетке-хозяине, или секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белков.

Клетки-хозяева также могут быть использованы для получения детерминант интактных антител, таких как Fab-фрагменты или молекулы ScFv. Следует понимать, что варианты вышеописанной процедуры входят в объем настоящего изобретения. Например, может быть желательно трансфицировать клетку-хозяина ДНК, кодирующей либо легкую цепь, либо тяжелую цепь (но не обе) антитела, соответствующего изобретению. Технология рекомбинантной ДНК также может быть использована для удаления некоторых или всех ДНК, кодирующих отдельно или обе легкую и тяжелую цепи, которые не являются необходимыми для связывания OX40. Молекулы, экспрессируемые с таких усеченных молекул ДНК, также охватываются антителами, соответствующими изобретению. Также могут быть получены бифункциональные антитела, в которых одна тяжелая и одна легкая цепь являются антителом, соответствующим изобретению, а другая тяжелая и другая легкая цепь специфичны к антигену, отличному от OX40 путем перекрестного сшивания антитела, соответствующего изобретению, со вторым антителом с помощью стандартных химических способов перекрестного сшивания.

Фармацевтические композиции и фармацевтическое применение.

Антитела и детерминанты антител, соответствующие изобретению, могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъекту. Как правило, фармацевтическая композиция содержит антитело или детерминанту антитела, соответствующие изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько: воду, физиологический раствор, фосфатный буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включать в состав изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела, или детерминанты антитела. Антитела и детерминанты антител, соответствующие изобретению, могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения (например, внутривенного, подкожного, внутрибрюшинного, внутримышечного). Композиции, соответствующие изобретению, могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные композиции - в виде инъекционных и инфузионных растворов, таких как композиции, похожие те, которые используются для пассивной иммунизации людей другими антителами. Антитело можно вводить путем внутривенной инфузии или инъекции, или внутримышечной, или подкожной инъекции.

Путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления изобретения активное соединение может быть приготовлено с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, например, как формы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластиры и микроГИКапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например, этилвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких препаратов запатентованы или известны специалистам в данной области. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или детерминанта антитела, соответствующие изобретению, комбинируются и/или вводятся совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, которые являются полезными для лечения нарушений, в которых инактивация OX40

приносит вред. Например, антитело к ОХ40 или детерминанта антитела, соответствующие изобретению, могут комбинироваться и/или вводятся совместно с одним или несколькими дополнительными антителами, которые связываются с другими целями (например, антитела, которые связываются с другими цитокинами или которые связываются с молекулами клеточной поверхности). Кроме того, одно или несколько антител, соответствующих изобретению, могут быть использованы в сочетании с двумя или более из вышеупомянутых лекарственных средств. Такие комбинированные препараты могут с успехом использовать более низкие дозы вводимых терапевтических агентов, что позволяет избежать возможных токсических эффектов или осложнений, связанных с различными монопрепаратами. Опытному специалисту-практику понятно, что когда антитела, соответствующие изобретению, используются как часть комбинированной терапии, желательными могут быть более низкие дозы антител, чем когда субъекту вводится только антитело (например, синергический терапевтический эффект может быть достигнут за счет использования комбинированной терапии, что в свою очередь, позволяет использовать более низкую дозу антител для достижения желаемого терапевтического эффекта).

Антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие детерминанты могут быть использованы отдельно или в комбинации для лечения таких заболеваний. Следует понимать, что эти антитела или их антигенсвязывающие детерминанты можно использовать отдельно или в комбинации с дополнительным агентом, например, терапевтическим агентом, упомянутым дополнительным агентом, выбранным специалистом для употребления. Например, дополнительным агентом может быть терапевтическое средство, принятое в данной области, полезное для лечения заболевания или состояния, которое лечат антителом, изложенном в настоящем документе. Дополнительным агентом также может быть агент, который придает полезные свойства терапевтической композиции, например, агент, который влияет на вязкость композиции.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество", антитела или детерминанты антитела, соответствующих изобретению. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периода времени, необходимого для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела или детерминанты антитела могут варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес человека; и способности антитела или детерминанты антитела вызвать желаемый ответ индивида. Терапевтически эффективное количество является также количеством, при котором любые токсичные или вредные эффекты антитела или детерминанты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периода времени, необходимого для достижения желаемого профилактического результата.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, можно принимать один болюс, несколько разделенных доз могут быть приняты в течение времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, что диктуется конкретной терапевтической ситуацией. Наиболее выгодно создавать парентеральные композиции в стандартных лекарственных формах для простоты применения и однородности дозировки. Стандартная лекарственная форма, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве стандартных доз для млекопитающих, которых будут лечить; каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация на стандартную лекарственную форму диктуется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного лечебного или профилактического эффекта, который необходимо достичь, и (б) ограничений, присущих области создания рецептуры, например, активное соединение для лечения чувствительности у людей.

Пример I.

Химерные и гуманизированные моноклональные антитела 106-222 IgG1/каппа (Ch222 и Hu222, соответственно) очищали из супернатантов культуры соответствующих стабильных трансфектантов NS0, используя протеин-А-колонку, как описано в приложениях А и В. Hu222 элюировали с колонки двумя различными способами. Вкратце, Hu222 серия I элюировали буфером с низким pH и серия II буфером для элюирования Pierce's Gentle Ag/Ab. Выход Hu222 был лучше при использовании буфера с низким pH. Ch222 элюировали с колонки буфером для элюирования Gentle Ag/Ab.

Очищенные антитела Hu222 Серия I и II характеризовались SDS-PAGE наряду с мышиным 106-222 в соответствии со стандартными процедурами. 5 мкг каждого антитела были проанализированы в восстановительных условиях. Как показано на фиг. 21, каждое из антител Hu222 серия I и II состоит из тяжелой цепи с молекулярной массой около 50 кДа и легкой цепи с молекулярной массой около 25 кДа. Чистота Hu222 серия I и II антител оказалась более 95%.

Эндотоксиновая контаминация гуманизированных антител была проанализирована с использованием набора Lonza's Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000. Уровень эндотоксинов был менее 0,5 ЕЭ/мг белка для антител Hu222 серий I и II.

Исследование связывания Hu106-222 с клетками L/OX40.

Связывание мышиных антител 106-222, Ch106-222 и Hu106-222 с OX40 было изучено FACS анализом связывания с клетками L/hOX40 в соответствии с протоколом, предоставленным Dr. Laura Bover. Антитела, связанные с клетками L/hOX40, были обнаружены при помощи меченного фикоэритрином козьего антимышиного IgG антитела (для мышиного 106-222) или меченного фикоэритрином козьего IgG античеловеческого антитела (для Ch106 и Hu106).

Фиг. 22 демонстрирует анализ мышиных антител 106-222, Ch106 и Hu106-222 (серия II) на связывание с клетками L/OX40. Кривая титрования Hu106-222 (серия II) была почти идентична такой же кривой для Ch106-222, указывая на то, что аффинность связывания антигена мышним 106-222 сохраняется в Hu106-222. Кривая титрования мышного 106-222 была похожа на такие же кривые для Ch106 и Hu106, однако из-за разницы вторичных антител, данные только указывают на то, что аффинность мышного 106-222 схожа с аффинностью Hu106-222.

Фиг. 24 демонстрирует сравнение между антителами Hu106-222 Серия I и II на связывание с клетками L/hOX40. Хотя необходим дальнейший анализ, аффинность двух лотов Hu106-222 оказалась похожей, если не идентичной, друг к другу. Таким образом, кислотное элюирование Hu106-222 из протеин-А-колонки, похоже, не влияет на его аффинность.

Очистка Ch106-222.

NS0 стабильный трансфектант C8 выращивали в 500 мл среды Invitrogen's Hybridoma SFM в роллер-флаконе до истощения. Культуру центрифугировали в центрифужной пробирке Corning на 250 мл (кат. № 430776) в центрифуге Allegra Beckman Coulter X-12R (2000 RPM в течение 15 мин). Культуральный супернатант вносили в колонку 1 мл GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe (кат. № 11-034-95) с помощью насоса Pharmacia P1. Колонку промывали буферизированным физиологическим раствором TRIS (Pierce, кат. № 28379) и элюировали буфером для элюирования Pierce's Gentle Ag/Ab (кат. № 21027). Фракции (около 1 мл) собирали и снимали их ОП при 280 нм.

№ фракции	ОП при 280 нм
3	0,12
4	0,30
5	0,18
6	0,11

Фракции 3-6 объединяли (объем = 3,0 мл, ОП при 280 нм = 0,14). Объединенные фракции обессорили на средней колонке 10 мл Sephadex G25 против PBS. Фракции объемом 1 мл были собраны.

№ фракции	ОП при 280 нм
5	0,09
6	0,19
7	0,12
8	0,12
9	0,00

Фракции 6-9 объединяли (объем = 3,0 мл, ОП при 280 нм = 0,11). Объединенные фракции диялизовали в течение ночи против PBS. После диялиза объем составил 3,0 мл и ОП при 280 нм была 0,19. Этот препарат называется Ch106, серия 8/31/09 с концентрацией 0,13 мг/мл.

Очистка Hu106-222.

NS0 стабильный трансфектант 1-C6 выращивали в 500 мл среды Invitrogen's Hybridoma SFM в роллер-флаконе до истощения. Культуру центрифугировали в центрифужной пробирке Corning на 250 мл (кат. № 430776) в центрифуге Allegra Beckman Coulter X-12R (2000 RPM в течение 15 мин).

Серия 1: 150 мл супернатанта культуры были загружены в колонку 1 мл GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe (кат. № 11-034-95) с помощью насоса Pharmacia P1. Колонку промывали PBS и связанное антитело элюировали 0,1 М глицин-HCl, 0,1 М NaCl (рН 3,0). Элюированные фракции (1 мл каждая) собирали в пробирки, содержащие 50 мкл 1 М Tris-HCl (рН 8,0).

№ фракции	ОП при 280 нм
2	0,88
3	2,84
4	1,29
5	0,63
6	0,18

Фракции 2-5 объединяли (объем = 4,2 мл, ОП при 280 нм = 1,59). Объединенные фракции диялизовали в течение ночи против PBS. После диялиза объем составил 4,2 мл и ОП при 280 нм была 1,54. Раствор антитела (серия 9/18/09 I; 1,1 мг/мл) был простерилизован посредством фильтрации.

Серия 2: оставшийся супернатант культуры (350 мл) вносили в колонку 1 мл GE Healthcare HiTrap MabSelect SuRe с помощью насоса Pharmacia P1. Колонку промывали буферизированным физиологиче-

ским раствором TRIS и элюировали буфером для элюирования Pierce's Gentle Ag/Ab. Фракции (около 1 мл) собирали и снимали их ОП при 280 нм.

№ фракции	ОП при 280 нм
2	0,12
3	0,85
4	2,17
5	1,47
6	1,02
7	0,81
8	0,66
9	0,54
10	0,44
11	0,46

Фракции 3-7 объединяли (объем = 4,2 мл, ОП при 280 нм = 1,22). Колонку промывали буферизированным физиологическим раствором TRIS и антитела элюировали 0,1 М глицин-HCl, 0,1 М NaCl (рН 3,0), чтобы определить, было ли элюирование элюирующим буфером GentleAg/Ab достаточным.

№ фракции	ОП при 280 нм
1	0,05
2	0,05
3	1,23
4	0,49
5	0,10

Фракции 3-7, элюированные элюирующим буфером GentleAg/Ab, объединяли и обессоливали на средней колонке 10 мл Sephadex G25 в PBS. Фракции объемом 1 мл были собраны.

№ фракции	ОП при 280 нм
4	0,38
5	0,96
6	1,38
7	1,33
8	1,10
9	0,12

Фракции 5-8 объединяли (объем = 4,0 мл, ОП при 280 нм = 1,12). Объединенные фракции диялизовали в течение ночи против PBS. После диялиза объем составил 4,0 мл и ОП при 280 нм была 1,12. Раствор антител (серия 9/18/09 II; 0,8 мг/мл) был простерилизован посредством фильтрации.

Способ высокосолевого элюирования буфером для элюирования Pierce's Gentle Ag/Ab был не так эффективен, как способ низкого рН для элюирования связанного антитела IgG1 человека из протеин-А-белковой колонки. Так как антитела не элюировались в острый пик буфером для элюирования Gentle Ag/Ab, необходимо было объединить многие фракции для сбора элюированного IgG и опреснить объединенные фракции перед диялизом. Слабый профиль элюирования буфером для элюирования Gentle Ag/Ab и дополнительные стадии очистки повлияли на выход антитела. Рекомендуется использовать способ высокосолевого элюирования только тогда, когда IgG, который необходимо очистить, является кислотолабильным.

Пример II.

Очистка антител Ch119-122 и Hu119-122.

Химерное моноклональное антитело 119-122 IgG1/каппа (Ch119) было очищено из супернатанта культуры соответствующего стабильного трансфектанта NS0 (клон G11), выращенного в среде Hybridoma-SFM (Invitrogen), используя протеин-А-колонку. После элюирования буфером для элюирования Pierce's Gentle Ag/Ab, буфер Ch119 был изменен на PBS гель-фильтрацией, а затем диялизом. Концентрация Ch119 составила 0,21 мг/мл.

Гуманизированное моноклональное антитело 119-122 IgG1/каппа (Hu122) было очищено из супернатанта культуры соответствующего стабильного трансфектанта NS0 (клон 2F5), выращенного в среде Hybridoma-SFM, используя протеин-А-колонку. Hu106-222 элюировали с колонки буфером с низким рН, нейтрализовали 1 М Tris-HCl (рН 8,0) и диялизовали против PBS. Концентрация Hu122 составила 1,6 мг/мл.

Очищенное Hu106-222 характеризовалось SDS-PAGE наряду с мышевым 119-122 в соответствии со стандартными процедурами. 5 мкг каждого антитела были проанализированы в восстановительных усло-

виях. Как показано на фиг. 25, Hu119-122 состоит из тяжелой цепи с молекулярной массой около 50 кДа и легкой цепи с молекулярной массой около 25 кДа. Чистота Hu119 оказалась более 95%.

Исследование связывания Hu119-122 с клетками L/hOX40.

Связывание мышьиных антител Ch119-122 и Hu119-122 с OX40 было изучено FACS анализом связывания с клетками L/OX40 в соответствии с протоколом, предоставленным Dr. Laura Bover. Антитела, связанные с клетками L/OX40, были обнаружены при помощи меченного фикоэритрином козьего антимышиного антитела IgG (для мышьиного Ch119-122) или меченного фикоэритрином козьего IgG антитела античеловеческого (для Ch119-122 и Hu119-122).

Фиг. 26 демонстрирует результат FACS анализа. Кривая титрования Hu119-122 была схожа на такую же для Ch119-122, это позволяет предположить, что аффинность связывания антигена мышьиным 119-122 сохраняется в Hu119-122. Тем не менее, значения MCF при более высокой концентрации антител Ch119-122 и Hu119-122 не ложатся прямо на соответствующие кривые. После изменения условий эксперимента следует повторить FACS анализ.

Пример III.

Для оценки способности представленных гуманизированных антител к OX40 человека усиливать Т-клеточную пролиферацию, авторы изобретения провели анализы пролиферации с использованием покрытых анти-CD3 клеток CD32-L и свежеотсортированных наивных CD4⁺ Т-клеток. Фиг. 27 показывает, что клон 119-122 (Hu122) гуманизированного МАт к OX40 человека и его мутированное FcR-связывающее антитело (Hu122-AA) усиливали пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Hu122 оказывал лучшую стимулирующую активность на Т-клетки по сравнению с родительскими мышьиними МАт к OX40 человека (Mouse122) (фиг. 27).

Клон 106-222 (Hu222-AA) FcR-связывающего мутированного гуманизированного МАт к OX40 человека и химерный клон 106-222 (Ch222) МАт к OX40 человека усиливали анти-CD3-стимулированную пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Эти антитела имеют схожую стимулирующую активность по сравнению с родительскими мышьиними МАт к OX40 человека (Mouse106-222). Тем не менее, полностью гуманизированное Ат к OX40 человека, Hu106, не усиливало пролиферации Т-клеток (фиг. 28).

Для оценки способности гуманизированных антител к OX40 человека блокировать суппрессивную функцию CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Tregs), авторы изобретения провели анализ пролиферации с использованием свежеотсортированных наивных CD4⁺ Т-клеток и CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs. Авторы изобретения обнаружили, что химерное антитело Ch122 и мутированное Fc-связывающее гуманизированное антитело (Hu122-AA) проявляли большую силу, чем родительские мышьиные МАт к OX40 человека (Mouse122) в блокировании суппрессивной функции CD4⁺ Treg (фиг. 29 А-В).

В эксперименте на фиг. 27, свежеотсортированные наивные CD4⁺CD25^{low}CD127^{low}CD45RO⁺CD45RA⁺ Т-клетки стимулировали L-клетками, экспрессирующими CD32 (CD32-L), покрытыми 4-мя концентрациями анти-CD3-антитела плюс 2 мкг/мл антител клона 119 AT к OX40 человека или контрольными антителами. Через три дня после стимуляции был добавлен радиоизотоп тритий и культивирование продолжилось в течение дополнительных 16-18 ч до сбора клеток. Данные представляют эксперименты от двух доноров. CD32-L клетки, экспрессирующие лиганд hOX40 (CD32-L/hOX40L) выступают в качестве положительного контроля, в то время как антитела изотипа IgG1 мыши и человека служат в качестве отрицательных контролей.

В эксперименте на фиг. 28, свежеотсортированные наивные CD4⁺ Т-клетки стимулировали клетками CD32-L, покрытыми 4 концентрациями анти-CD3 антитела плюс 2 мкг/мл антител клона 106-222 (Hu222) МАт к OX40 человека или контрольными антителами. Через три дня после стимуляции был добавлен радиоизотоп тритий и культивирование продолжилось в течение дополнительных 16-18 ч до сбора клеток. Данные представляют эксперименты от двух доноров. CD32-L/hOX40L выступают в качестве положительного контроля, в то время как антитела изотипа IgG1 мыши и человека служат в качестве отрицательного контроля.

В эксперименте на фиг. 29 свежеотсортированные наивные CD4⁺ Т-клетки культивировали в присутствии CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Tregs при трех значениях Tregs: Т-эффектор и стимулировали клетками CD32-L, покрытыми 0,2 мкг/мл анти-CD3-антител плюс 10 мкг/мл антител клона 119-122 МАт к OX40 человека или контрольными антителами. Через три дня после стимуляции был добавлен радиоизотоп тритий и культивирование продолжилось в течение дополнительных 16-18 ч до сбора клеток. Данные представлены для трех экспериментов. CD32-L/hOX40L выступает в качестве положительного контроля, в то время как антитела изотипа IgG1 мыши и человека служат в качестве отрицательных контролей.

Пример IV.

Поскольку антитела будут встречаться с мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), когда они вводятся пациентам при помощи внутривенной инъекции, авторы изобретения проверили способность представленных антител к OX40 человека стимулировать пролиферацию Т-клеток с использованием МКПК в качестве антиген-репрезентирующих клеток (APK) в проводимых анализах пролиферации. Однако авторы изобретения получили очень переменные данные с исследуемыми мышьиними МАт к OX40 человека при использовании МКПК в качестве APK, что не наблюдается при использовании моноцитов в качестве APK и позволяет предположить, что исследуемые антитела требуют не-

коего перекрестного сшивания для активности. Чтобы проверить эту возможность, пластины были покрыты МАт к ОХ40 человека и анти-CD3, промыты и использованы для стимуляции пролиферации CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в отсутствие вспомогательных клеток. Фиг. 30 демонстрирует результаты, которые показывают, что антитела к ОХ40 человека усиливают пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Свежеотсортированные 1×10^5 CD4⁺CD25^{low}CD45RO⁺CD45RA⁺ наивные Т-клетки (фиг. 30A) или CD3⁺CD8⁺ Т-клетки (фиг. 30B) стимулировали анти-CD3 (3 мкг/мл), нанесенными на пластины, и мышным МАт к ОХ40 человека (2 мкг/мл). Меченный тритием тимидин был добавлен на третий день культивирования и клетки собирали после следующих 15 ч инкубации. Пролиферацию Т-клеток оценивали по захвату тимидина. МАт к ОХ40 человека были получены от трех гибридомных слияний. Номера после номера слияния обозначают специфическое антитело. Антитела мыши изотипа IgG1 и 119-42 служили в качестве отрицательных контролей. Каждая процедура была выполнена трижды. Репрезентативные данные от 4 доноров Т-клеток представлены на фигуре (фиг. 30C). Все три версии гуманизированных МАт к ОХ40 человека [Hu106-222 и Hu119-122; Hu106-222AA и Hu119-122AA (AA обозначает, что двое из Fc-связывающих остатков мутированы в аминокислоту аланин) и Ch119-122 (похож на гуманизированное 119-122 за исключением того, что "паратоп" мышной вариабельной области был сохранен)] стимулировали пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Анти-CD28 служил в качестве положительного контроля.

Как изображено на фиг. 30, панели А и В показывают, что связанные с пластиночной мышью МАт к ОХ40 человека мощно стимулировали пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток в диапазоне от 10 до 40 раз. Авторы изобретения расширили исследования рассматриваемых гуманизированных МАт к ОХ40 человека и обнаружили, что три версии представленных гуманизированных антител, если они полностью гуманизированы, химерных или имеющих мутантов AA, в которых остатки, отвечающие за связывание с рецептором Fc, были изменены на аланин, были мощными стимуляторами пролиферации наивных CD4⁺ Т-клеток (фиг. 30C).

Фиг. 31 демонстрирует, что мышные и гуманизированные антитела к ОХ40 человека требуют перекрестного сшивания для усиления Т-клеточной пролиферации. Свежеотсортированные наивные CD4⁺ Т-клетки стимулировали анти-CD3 (3 мкг/мл), связанными с пластиночной, плюс со связанными с пластиночной или растворимыми гуманизированными МАт к ОХ4 человека (2 мкг/мл) в отсутствие вспомогательных клеток. Меченный тритием тимидин был добавлен на третий день культивирования и клетки собирали после следующих 15 ч инкубации. Пролиферацию Т-клеток оценивали по захвату тимидина. Антитела мыши изотипа IgG1 и анти-CD28 служили отрицательным и положительным контролем, соответственно. Репрезентативные данные от двух доноров показаны на фигуре. Наивные CD4⁺ Т-клетки были стимулированы анти-CD3, связанными с пластиночной, в отсутствии вспомогательных клеток. На следующий день было добавлено МАт к ОХ40 человека 119-122 (2 мкг/мл) отдельно или в комбинации с равным количеством вторичных антител против Fc. Пролиферацию клеток оценивали, как описано в панели А.

Сила представленных гуманизированных МАт к ОХ40 человека Hu106-222 и Hu119-122 была соизмерима с анти-CD28. Напротив, когда растворимое антитело к ОХ40 человека было добавлено в культуру Т-клеток, стимулирующий эффект был упразднен (фиг. 31A). Однако, когда растворимое МАт к ОХ40 человека 119-122 было добавлено вместе с F(ab')₂-фрагментом козьего антимышиного IgG, Fc-фрагмент специфическим вторичным антителом, стимулирующий эффект был восстановлен (фиг. 31B). Эти результаты показывают, что МАт к ОХ40 человека требуют перекрестного сшивания для их биологических активностей.

Для оценки способности представленных агонистических МАт к ОХ40 человека блокировать супрессивную функцию CD4⁺CD25^{high}CD127⁻nTregs, авторы изобретения провели анализы пролиферации в присутствии CD4⁺CD25^{low}CD127⁺CD45RO⁺ эффекторных Т-клеток (Teff) и CD4⁺ nTregs. Используя предложенную авторами систему, связанную с пластиночной, в которой МАт к ОХ40 человека вместе с анти-CD3 наносили на пластиночную и в отсутствии вспомогательных клеток, двенадцать (222, 132, 8B, 33A, 43, 58B, 122, 157A, 173B, 220C, 140A, 270) представленных мышных МАт к ОХ40 человека сильно ингибировали супрессию nTreg (фиг. 32A и 32B). Хотя соотношение nTregs к эффекторным Т-клеткам, используемое в этих анализах, было 1:1, эти антитела способны стимулировать пролиферацию эффекторных Т-клеток от 10 до 35 процентов выше процента, достигаемого эффекторными Т-клетками в отсутствии nTregs. Предложенные гуманизированные МАт к ОХ40 человека также обращали супрессивную функцию nTreg на схожих уровнях (фиг. 32C). Эти результаты, рассматриваемые вместе, позволяют предположить, что исследуемые мышные МАт к ОХ40 человека являются мощными стимуляторами ОХ40, которые значительно усиливают пролиферацию Т-клеток и ингибируют супрессивную функцию nTreg. Кроме того, предложенные гуманизированные МАт к ОХ40 человека сохраняли сильную биологическую активность родительских мышных антител.

Фиг. 32 демонстрирует, что МАт к ОХ20 человека блокирует активность CD4⁺FOXP3⁺nTregs. Меченные CFSE CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ эффекторные Т-клетки и CD4⁺FOXP3⁺ Tregs были получены от одного и того же здорового донора. Т-клетки стимулировали растворимым анти-CD28 (0,5 мкг/мл) и анти-CD3 (3 мкг/мл), связанным с пластиночной, и МАт к ОХ40 человека (2 мкг/мл). Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения. Соотношение nTregs к

эффекторным Т-клетками было 1:1. Антитела мыши изотипа IgG1 служили в качестве отрицательного контроля. Наивные CD4⁺ Т-клетки служили как контрольные Т-клетки, чтобы продемонстрировать специфическое ингибирование пролиферации эффекторных Т-клеток nTregs. Фиг. 32А является репрезентативными данными FACS, показывающими пролиферацию эффекторных Т-клеток в присутствии наивных CD4⁺ Т-клеток, nTregs или nTregs плюс МАт к OX40 человека 119-33А. Фиг. 32В показывает процент пролиферации эффекторных Т-клеток в присутствии nTregs после обработки мышьяным МАт к OX40 человека (20 проверенных). Фиг. 32С показывает все три версии гуманизированных МАт к OX40 человека, восстановивших пролиферацию эффекторных Т-клеток.

Недавний отчет говорит о том, что триггирование OX40 может индуцировать апоптоз линии Т-клеток человека, экспрессирующих OX40 (Yoshiaki Takahashi et al., 200B, Aids Research and human Retroviruses, 24). Поэтому авторы изобретения протестировали эффект увеличения концентраций МАт к OX40 человека 106-222 в сочетании с фиксированной, низкой дозой анти-CD3 на выживаемость трех субпопуляций Т-клеток в присутствии моноцитов. Фиг. 33А показывает, что высокие концентрации МАт к OX40 человека 106-222 (20-30 мкг/мл) преимущественно убивали активированные FOXP3⁺ nTregs, в то время как активированные наивные и CD4⁺ Т-клетки памяти были либо устойчивы, либо менее восприимчивы к этому. Чтобы проверить, непосредственно ли МАт к OX40 человека действует на Tregs и вызывает гибель клеток, авторы изобретения провели новые эксперименты в отсутствии вспомогательных клеток. Фиг. 33В показывает, что сильная активация OX40 в сочетании с анти-CD3 специфично убивает nTregs в отсутствии вспомогательных клеток. Чтобы подтвердить, что поражающие эффекты, опосредованные МАт к OX40 человека имитировали триггирование OX40 натуральным лигандом OX40, авторы изобретения использовали клетки мышьяные фибробlastы линии L, которые сверхэкспрессируют hOX40L и использовали их для стимулирования nTregs в присутствии низкой дозы анти-CD3 и получили аналогичные поражающие эффекты на nTregs (фиг. 33С). Эти результаты позволяют предположить, что сильное триггирование OX40 убивает OX40-экспрессирующие Tregs-клетки.

В частности, фиг. 33 демонстрирует, что высокие концентрации МАт к OX40 человека преимущественно убивают FOXP3⁺ Tregs. На фиг. 33А каждая субпопуляция Т-клеток (наивные, CD4⁺CD25^{low}CD127⁺CD45RO⁺CD45RA⁺; клетки памяти, CD4⁺CD25^{low}CD127⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ и nTregs, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) были культивированы с равным соотношением CD14⁺ моноцитов в присутствии растворимого анти-CD3 (0,3 мкг/мл) и повышающимися концентрациями мышьяного МАт к OX40 человека 106-222. Жизнеспособность клеток определяли после 3 дней культивирования с помощью проточного цитометрического анализа, проведенного на жизнеспособных лимфоцитах. Данные от двух доноров Т-клеток показаны на фигуре. Фиг. 33В и 33С описывают, что сильное триггирование OX40 убивает CD4⁺FOXP3⁺ Tregs. Фиг. 33В демонстрирует, что CD4⁺FOXP3⁺ Tregs были стимулированы анти-CD3 (2 мкг/мл), связанного с пластиной, а также растворимым МАт 119-122 (30 мкг на миллион клеток) или контролльным мышьяным антителом изотипа IgG1. Через один день культивирования на гемацитометре были подсчитаны живые трипан-отрицательные клетки. Фиг. 33С показывает, что CD4⁺FOXP3⁺ Tregs стимулировали растворимым анти-CD3 (0,2 мкг/мл) плюс L-клетками или L-клетками, экспрессирующими лиганд hOX40 (L/hOX40L). Живые клетки подсчитывали после одного дня стимуляции.

Далее авторы изобретения стремились определить, воздействует ли МАт к OX40 человека непосредственно на Т-клетки, чтобы блокировать супрессорную функцию nTreg. Свежеотсортированные CD4⁺ эффекторные Т-клетки или nTregs были предварительно активированы в течение ночи с анти-CD3 и активированы МАт к OX40 человека в течение 4 ч. Эффекторные Т-клетки затем промывали, метили CFSE и со-культивировали с nTregs в присутствии равного количества CD14⁺ моноцитов и анти-CD3. Аналогично предварительно простимулированные nTregs промывали и культивировали с необработанными меченными CFSE эффекторными Т-клетками.

Фиг. 34 показывает, что МАт к OX40 человека непосредственно воздействуют на Т-клетки для блокирования супрессорной функции Tregs. Фиг. 34А показывает, что МАт к OX40 человека воздействует непосредственно на эффекторные Т-клетки памяти, чтобы придать им устойчивость к супрессии nTregs. CD4⁺CD25^{low}CD127⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ Т-клетки памяти стимулировали анти-CD3 (0,8 мкг/мл), связанным с пластиной, в культуральной среде (RPMI/10% FCS/P/S плюс ИЛ-2 при 30 МЕ/мл) в течение 12 ч, затем были активированы МАт к OX40 человека (119-122, 22 мкг на 0,5 млн. клеток) в культуральной среде в течение 4 ч, промывали 3 раза и 8×10⁴ меченых CFSE эффекторных Т-клеток культивировали с уменьшающимися значениями nTregs. Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения. МАт к OX40 человека воздействует на Tregs, что делает их неспособными супрессировать пролиферацию эффекторных Т-клеток (фиг. 34В). CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} nTregs предварительно стимулировали анти-CD3 (2 мкг/мл), связанным с пластиной, в культуральной среде в течение 12 ч, затем активированы МАт к OX40 человека 119-122 или 106-222, или контролльным антителом, анти-ICOS или мышьяным антителом изотипа IgG1, как описано в панели А, промывали и культивировали с меченными CFSE эффекторными Т-клетками памяти. Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения.

Эффекторные Т-клетки, обработанные МАт к OX40 человека, стали устойчивыми к супрессии nTreg клетками (фиг. 34А). Напротив, пролиферация эффекторных Т-клеток, обработанных контролльным

мышиным антителом изотипа IgG1, оставалась восприимчивой к супрессии nTregs. Фиг. 34В показывает, что nTregs, обработанные МАт к ОХ40 человека, были не способны супрессировать пролиферацию эффекторных Т-клеток. Напротив, nTregs, обработанные контрольными антителами, такими как анти-I COS или мышиным антителом изотипа IgG1, оставались супрессивными. Эти результаты позволяют предположить, что предложенные МАт к ОХ40 человека воздействуют непосредственно как на эффекторные Т-клетки, так и на nTregs для восстановления пролиферации эффекторных Т-клеток.

Пример V.

Дополнительные предварительные данные *in vivo* показали, что антитела к ОХ40 человека у мышей увеличивает экспансию Т-клетками и отторжение опухоли у мышей. Ранее было показано, что МАт к ОХ40 человека может специфично активировать каскад NF-кБ в CD8⁺ Т-клетках мышей, трансдуцированных ОХ40 человека. Чтобы определить, может ли МАт к hOX40 способствовать отторжению опухоли путем содействия выживаемости эффекторных CD8⁺ Т-клеток и клональной экспансии *in vivo*, трансгенным Pmel CD8⁺ Т-клеткам трансдуцировали ген люциферазы и hOX40 были адаптивно перенесены в мышей-альбиносов линии C57BL/6, несущих непигментированные MC38 опухоли. После адаптивного переноса трансдуцированных Т-клеток мышам вводили антитела. Было обнаружено, что значительно больше ОХ40⁺ luciferase⁺ Pmel Т-клеток человека мигрировали в легкое на 4-й день у мышей, получавших МАт к hOX40 по сравнению с мышами, получавшими контрольное антитело изотипа IgG1 (фиг. 35В), указывая на то, что триггирование hOX40 у мышей способствовало экспансии CD8⁺ Т-клеток. На 8-й (данные не представлены) и 12-й день после лечения было установлено, что одна группа мышей, получавшая МАт к hOX40 сохранила значительно больше luciferase⁺ Pmel Т-клеток в опухоли по сравнению с контрольной группой мышей, получавших антитело изотипа IgG1 (фиг. 35В), это снова указывало на то, что триггирование hOX40 у мышей способствовало выживаемости CD8⁺ Т-клеток. Наконец, размеры опухолей у мышей, которые получали hOX40⁺ Pmel CD8⁺ Т-клетки и затем получали МАт к hOX40, были значительно меньше по сравнению с теми мышами, которые получали нетрансдуцированные Pmel Т-клетки и МАт к hOX40 или hOX40⁺ Pmel Т-клетки, а затем получали контрольное мышесное антитело изотипа IgG1. Эти результаты показывают, что триггирование ОХ40 человека у мышей приводит к биологическим эффектам, аналогичными ОХ40 мыши (Gough M.J. et al., 2008). Таким образом, данные демонстрируют способность МАт к ОХ40 человека стимулировать экспансию CD⁺ Т-клеток и выживаемость *in vivo* и способствовать отторжению опухоли.

МАт к ОХ40 человека усиливает Т-клеточную экспансию и выживаемость *in vivo*.

Наш режим терапевтической вакцинации показан на фиг. 35А. Белым мышами линии C57BL/6 в группах по 5 особей подкожно (SC) имплантировали 5×10^5 клеток непигментированной опухоли MC38/gp100 (день 0). На 6-й день лимфопения была вызвана дозой радиации 350 сГр. На 7-й день, 1×10^6 luciferase transduced Pmel-1 Т-клеток с или без экспрессии ОХ40 человека были адаптивно перенесены мышам с опухолями ($n=5$ в группе) с последующим внутривенным введением 5×10^5 Gp100 peptide-pulsed ДК. Рекомбинантный ИЛ-2 человека вводили внутрибрюшинно в течение 3 дней после переноса Т-клеток. Антитела вводились на 7, 9 и 11 дни в дозе 100, 50 и 50 мкг, соответственно, в инъекции на мышь (фиг. 35В). *In vivo* биолюминесцентные изображения показали накопление люциферазы-экспрессирующих CD8⁺ pmel-1 Т-клеток в легком и опухоли в дни 4 и 12. Две из пяти мышей из группы на 4-й день и 12 день показаны (фиг. 35С). Опухоли ответили на лечение с использованием МАт к hOX40. Размер опухоли измеряли каждые 3 дня. Pmel-1 и Pmel-1 плюс мышесное антитело изотипа IgG1 служили контролем.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> АНТИТЕЛА К ОХ40 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> UTFC.P1193WO

<140>

<141>

<150> 61/380, 827

<151> 2010-09-08

<150> 61/375, 999

<151> 2010-08-23

<160> 24

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 1

Asp Tyr Ser Met His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 3

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 4

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

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

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 5

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 458

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид

<400> 6

actagtacca	ccatggcttg	ggtgtggacc	ttgcttattcc	tgtatggcagc	tgcccaaagt	60
atccaaagcac	aggttcagtt	ggtgcagtc	ggatctgagc	tgaagaagcc	tggagcctca	120
gtcaaggttt	cctgcaaggc	ttctggttat	accttcacag	actattcaat	gcactgggtg	180
cgacaggctc	caggacaagg	tttaaagtgg	atgggctgga	taaacactga	gactggtag	240
ccaacatatg	cagatgactt	caagggacgg	tttgtttct	ctttggacac	cttgtcagc	300
actgcctatt	tgcagatcag	cagcctaaa	gctgaggaca	cggctgtgta	ttactgtgct	360
aatccctact	atgattacgt	ctcttactat	gctatggact	actgggtca	ggaaaccacg	420
gtcaccgtct	cctcaggtaa	gaatggcctc	tcaagctt			458

<210> 7

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 7

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1					5				10	

<210> 8

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 8

Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Thr
1				5		

<210> 9

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 9

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 10
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Mus sp.

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 12

<211> 416

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 12

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct 60

ggtgttgacg gagacattca gatgacccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtggga 120

gacagggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgtgt agcctggat 180

caacagaaaac cagaaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact 240

ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc 300

agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatata tactgtcagc aacattatag tactcctcgg 360

acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 13

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 13

Ser His Asp Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 14

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 15

<211> 11

<212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.

<400> 15
 His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 120
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.

<400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 17
 <211> 120
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 451

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<400> 18

actagtagcca ccatggactt cgggctcagc ttgggtttcc ttgtccttat tttaaaaaagt 60

gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagct gggggaggct tagtgcagcc tggagggtcc 120

ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc 180

cgccaggctc cgggaaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tggtggtagc 240

acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300

tcactgtacc tgcaaattgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360

agacactatg atgattacta cgcctggttt gcttaactggg gccaaggac tatggtcact 420

gtctttcag gtgagtccta acttcaagct t 451

<210> 19

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 19

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.

<400> 20
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.

<400> 21
 Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 111
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus sp.

<400> 22
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

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

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 111
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 23

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24

<211> 428

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<400> 24

gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctgggttcca 60

ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta ctttatctt gtctccaggg 120

gaaaggccca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat 180

atgcactggc accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcattcc 240

aacctagaat ctgggtccc tgccaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300

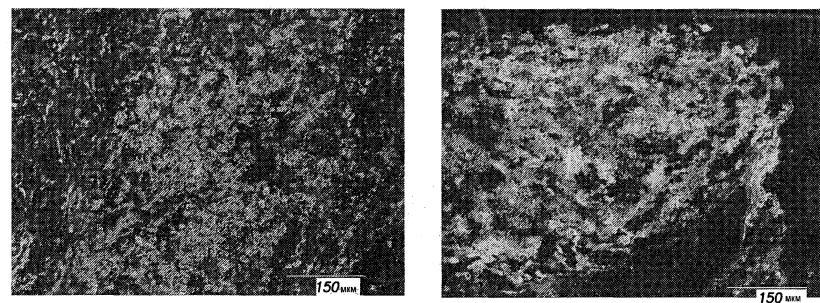
ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg 360

gagcttccgc tcacggtcgg cggagggacc aagggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt 420

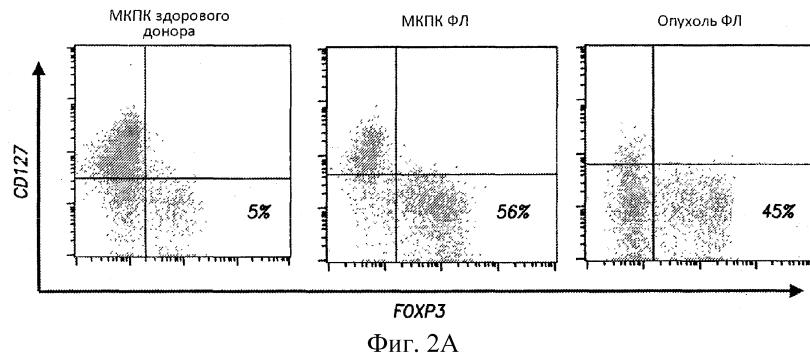
ctgaattc 428

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

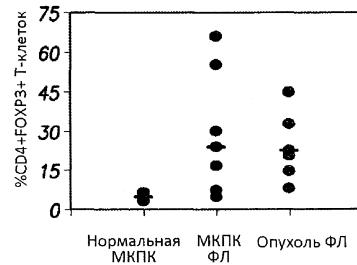
1. Выделенное антитело, которое связывается с OX40, содержащее:
 - (a) CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
 - (b) CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
 - (c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
 - (d) CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;
 - (e) CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 - (f) CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
2. Выделенное антитело по п.1, где выделенное антитело содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, которая на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.
3. Выделенное антитело по п.1 или 2, где выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело.
4. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где выделенное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
5. Выделенное антитело по п.4, которое содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью, которая на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.
6. Антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-5, где антигенсвязывающий фрагмент сохраняет способность специфически связываться с OX40 и проявлять активность агониста.
7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-5 или антигенсвязывающий фрагмент по п.6.
8. Выделенная клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело по любому из пп.1-5 или антигенсвязывающий фрагмент по п.6.
9. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включающий стадию культивирования клетки-хозяина *ex vivo* по п.8.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что дополнительно включает выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки-хозяина.
11. Применение выделенного антитела по любому из пп.1-5 или антигенсвязывающего фрагмента по п.6 в качестве лекарственного средства.
12. Применение антитела по любому из пп.1-5 или антигенсвязывающего фрагмента по п.6 для лечения рака.
13. Применение антитела по любому из пп.1-5 или антигенсвязывающего фрагмента по п.6 для получения лекарственного средства, где лекарственное средство предназначено для лечения рака.



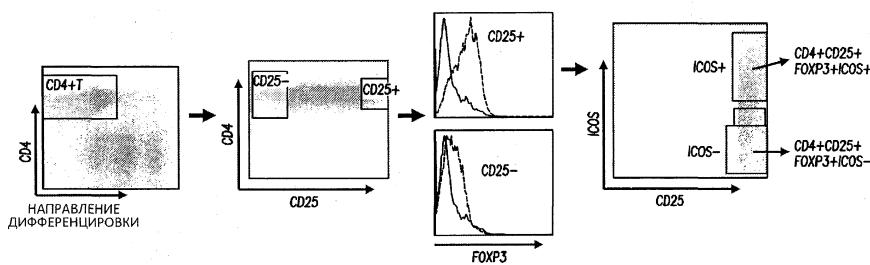
Фиг. 1



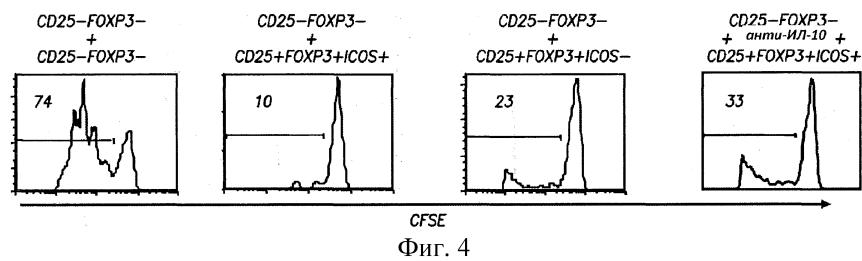
Фиг. 2А



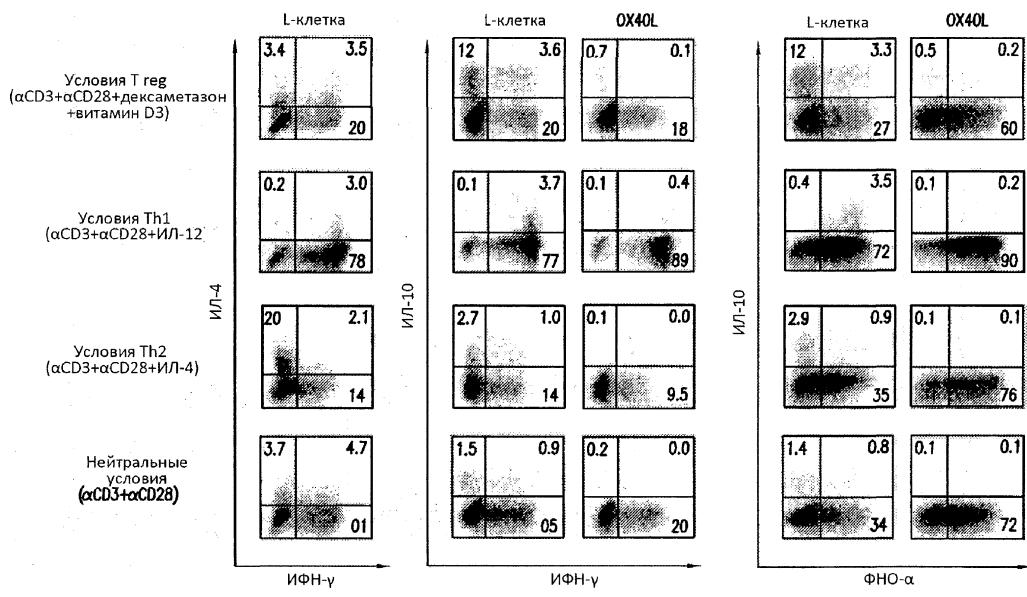
Фиг. 2В



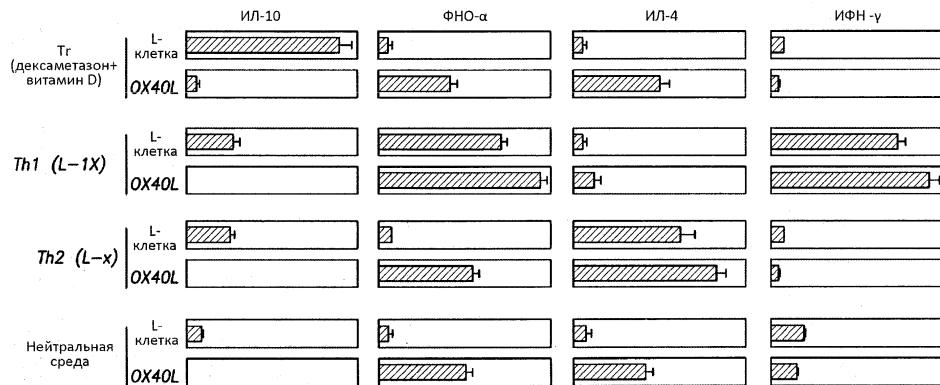
Фиг. 3



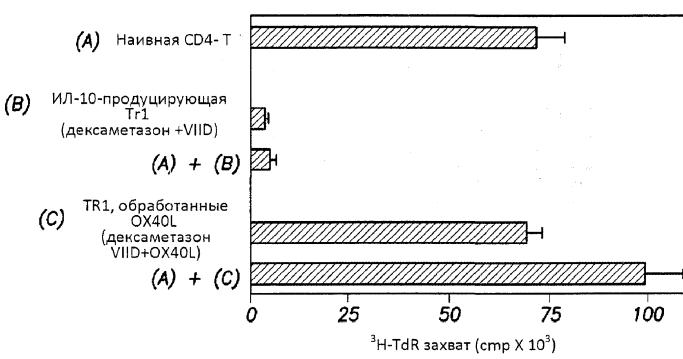
Фиг. 4



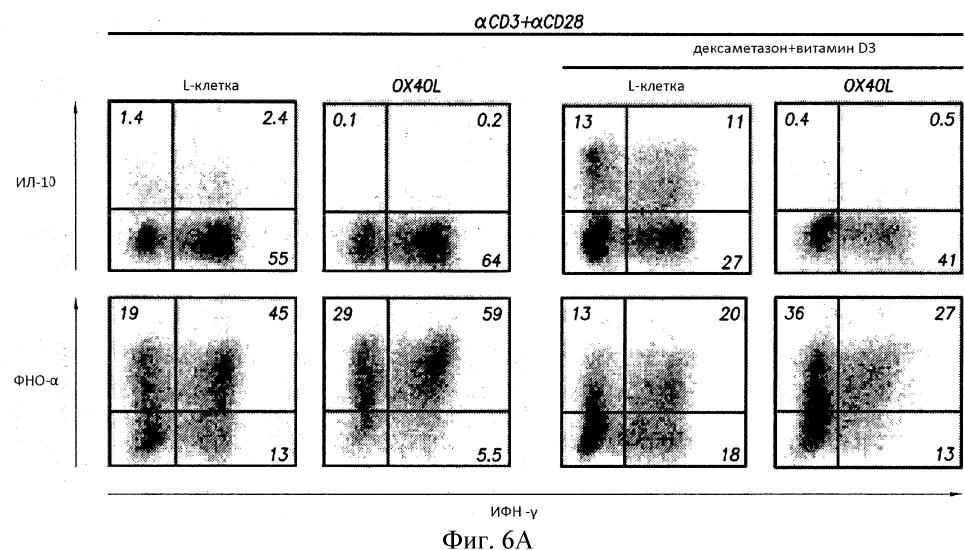
Фиг. 5А



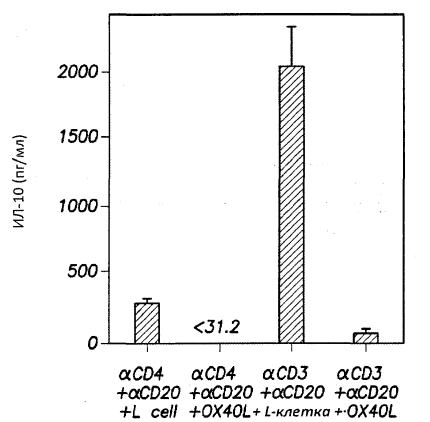
Фиг. 5В



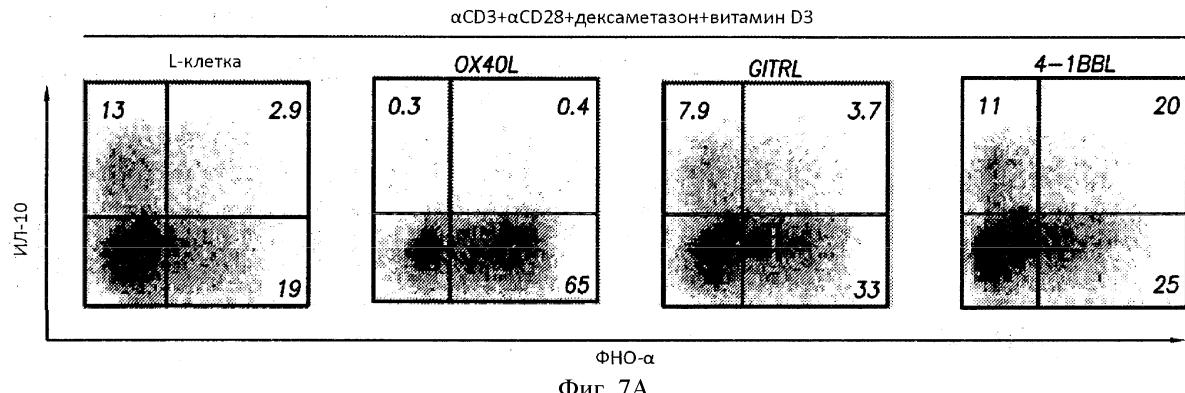
Фиг. 5С



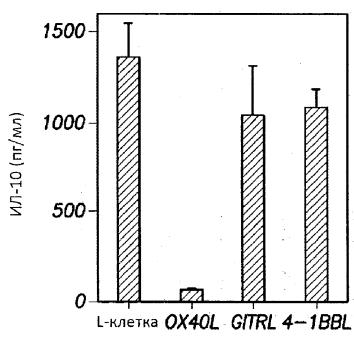
Фиг. 6А



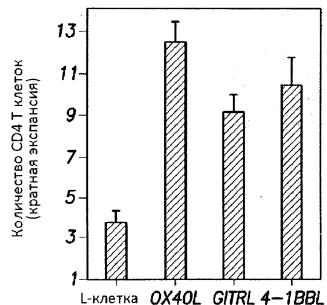
Фиг. 6В



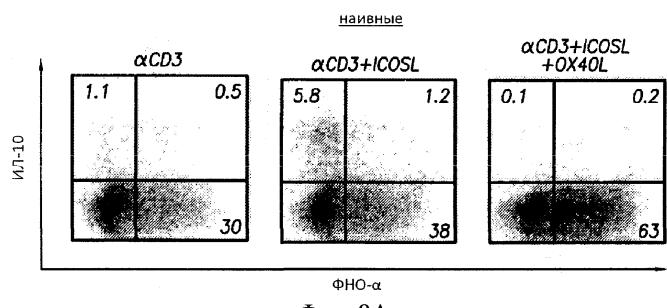
Фиг. 7А



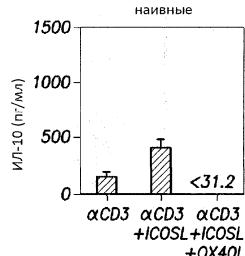
Фиг. 7В



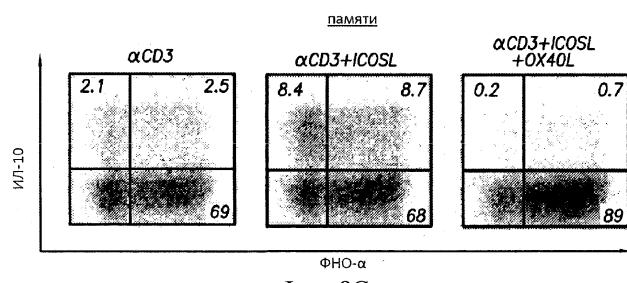
Фиг. 7С



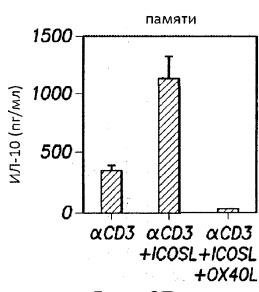
Фиг. 8А



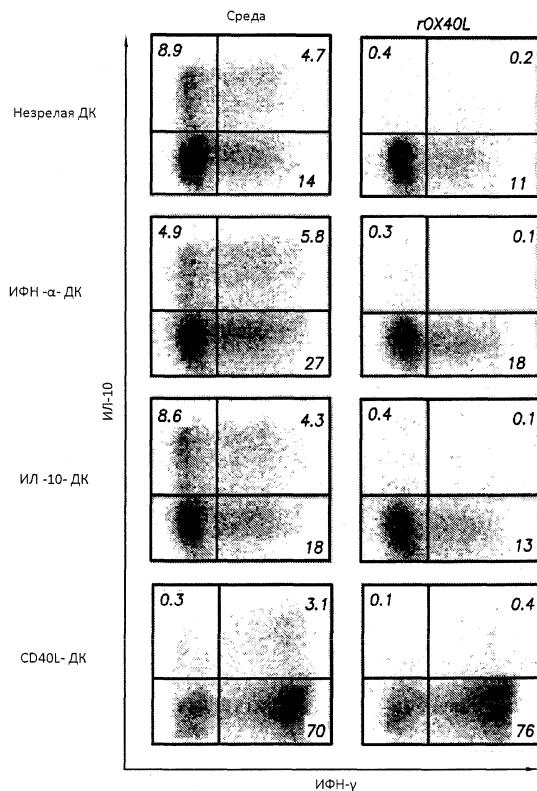
Фиг. 8В



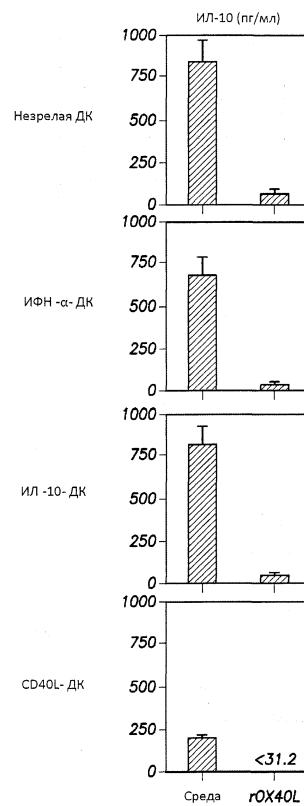
Фиг. 8С



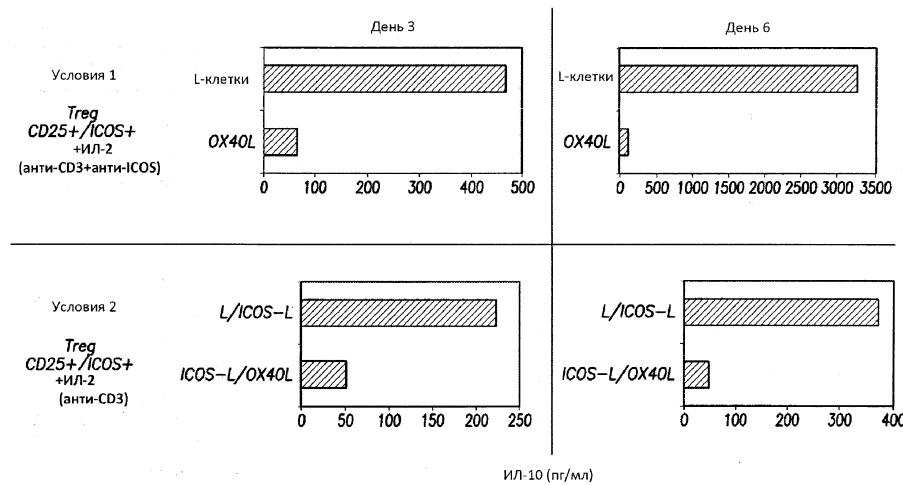
Фиг. 8Д



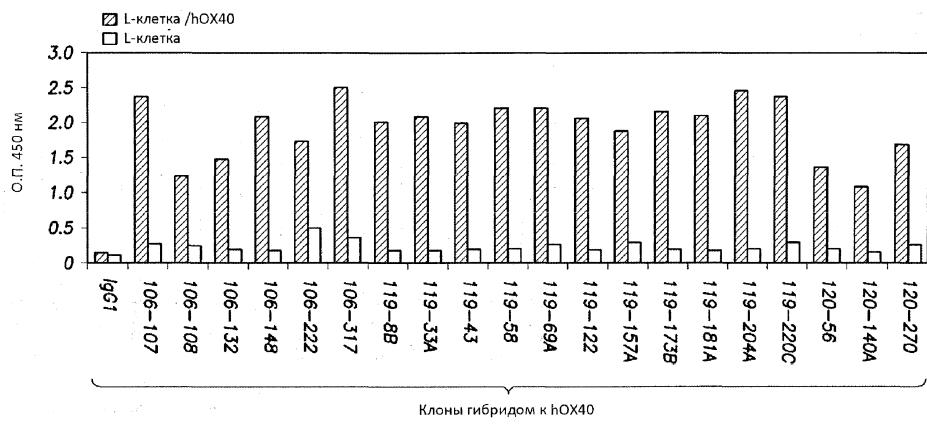
Фиг. 8Е



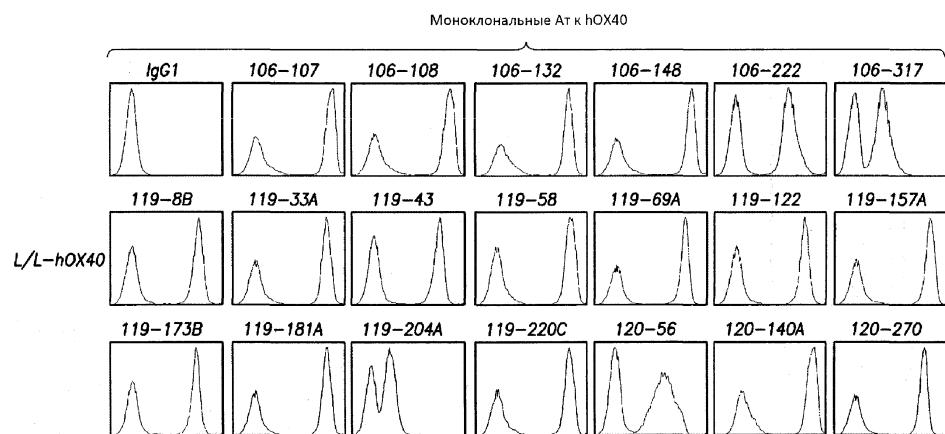
Фиг. 8F



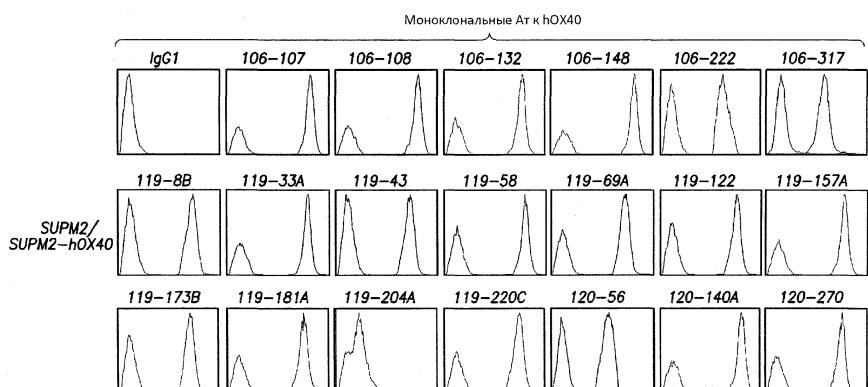
Фиг. 9



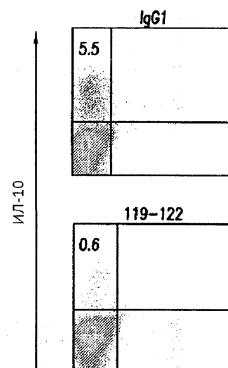
Фиг. 10



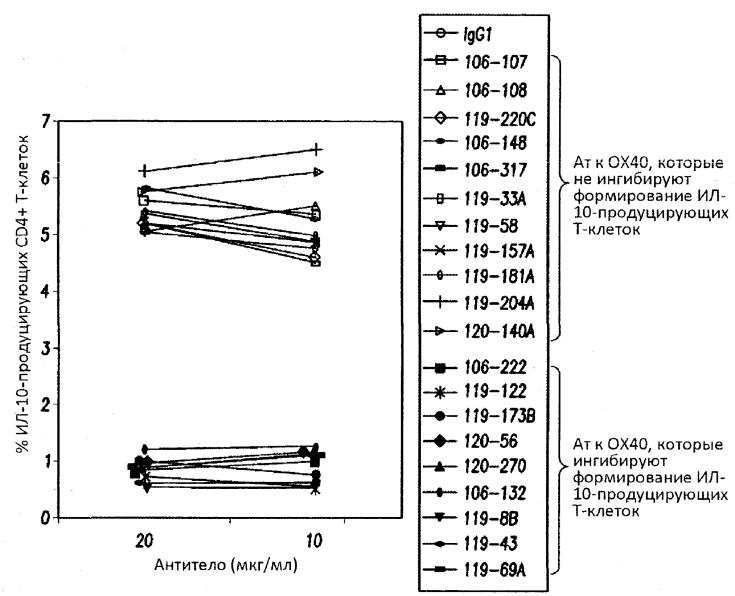
Фиг. 11



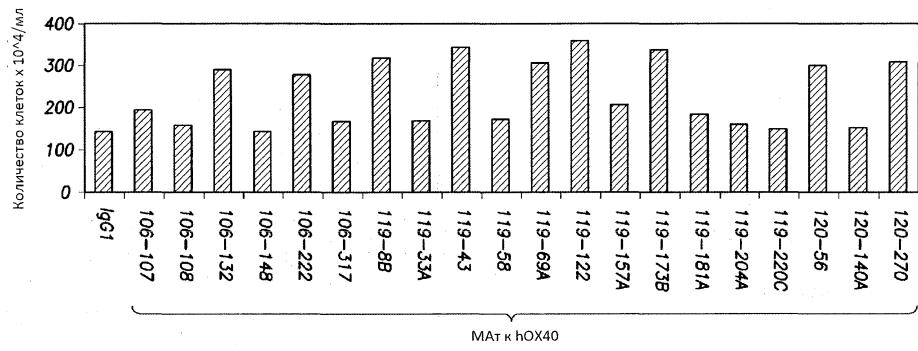
Фиг. 12



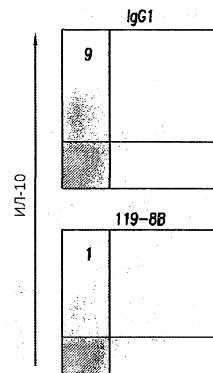
Фиг. 13А



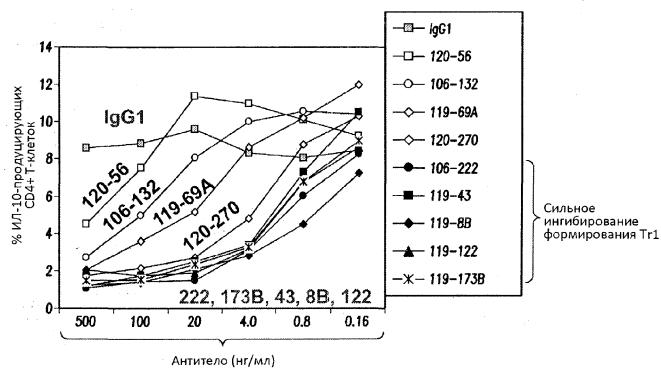
Фиг. 13В



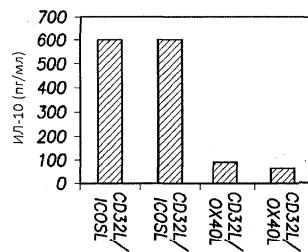
Фиг. 14



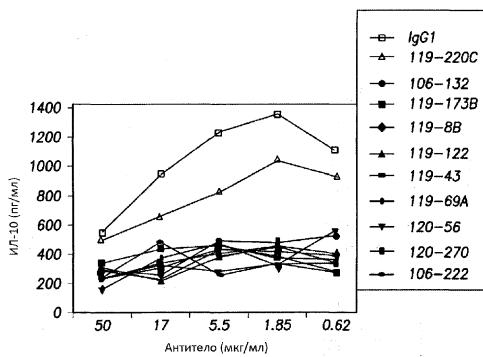
Фиг. 15А



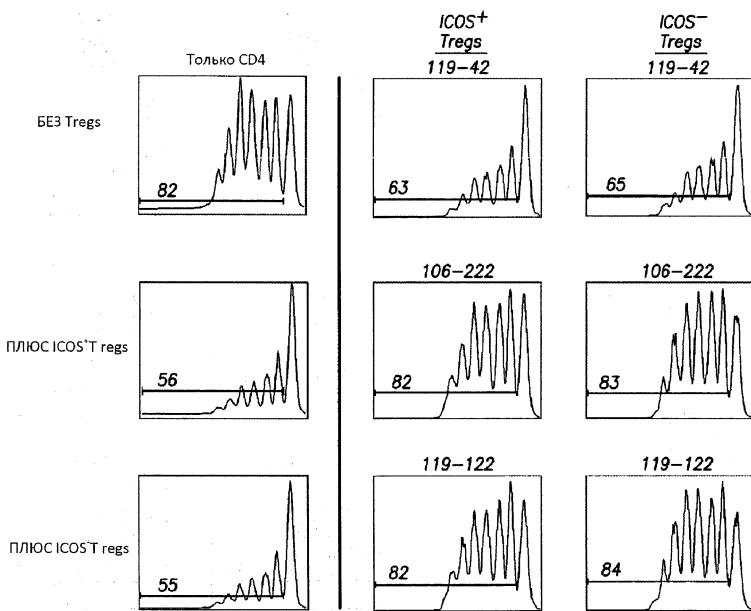
Фиг. 15В



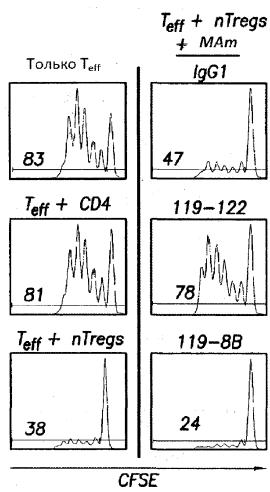
Фиг. 16А



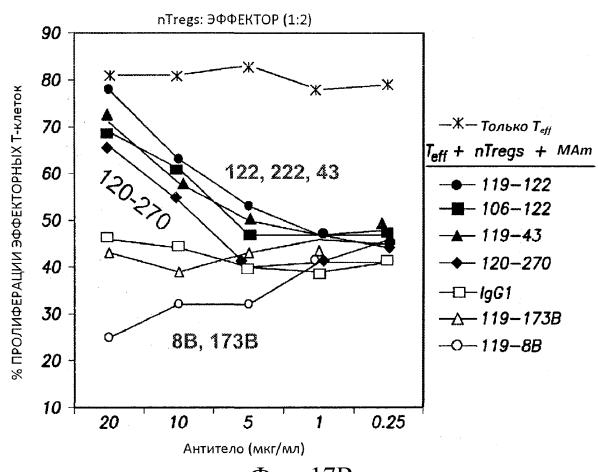
Фиг. 16В



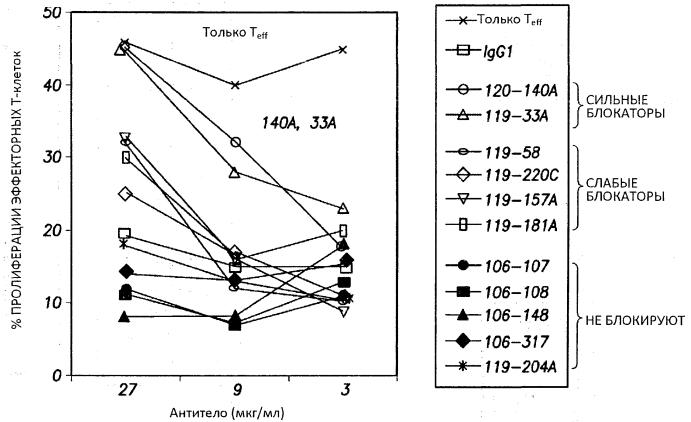
Фиг. 16С



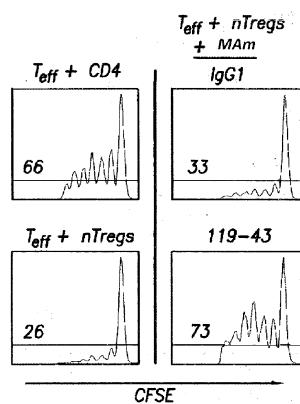
Фиг. 17А



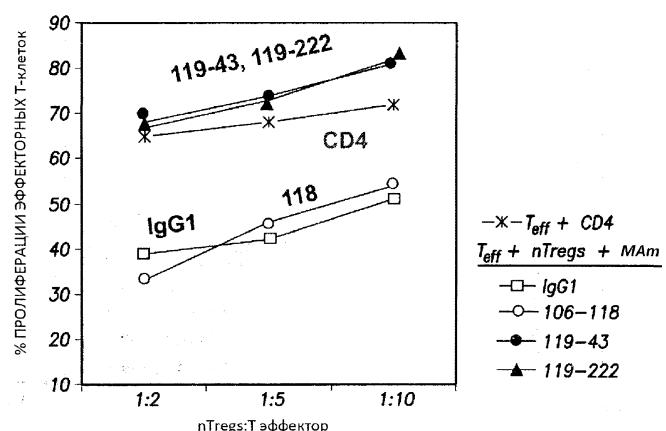
Фиг. 17В



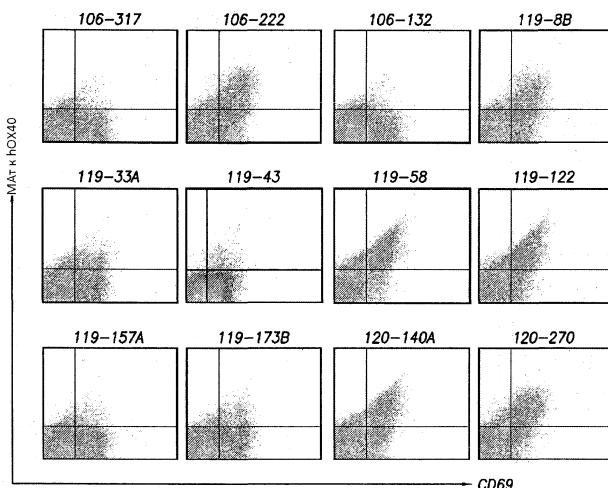
Фиг. 18



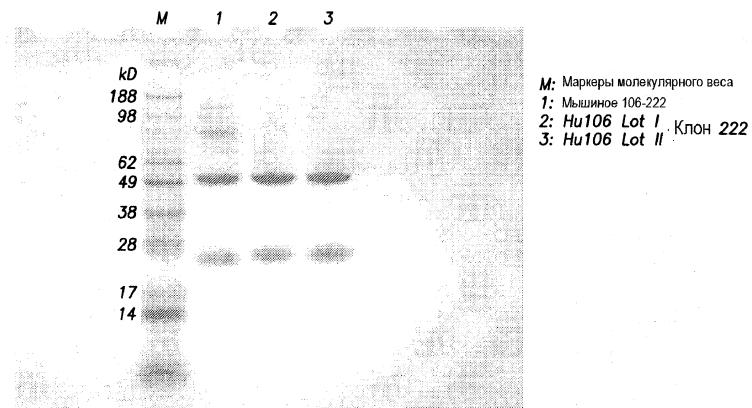
Фиг. 19А



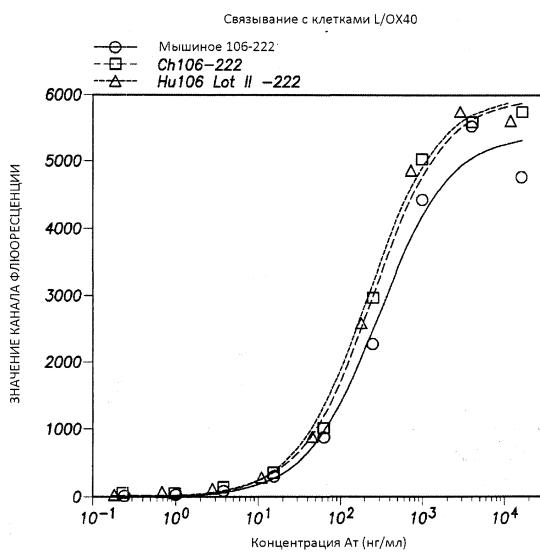
Фиг. 19В



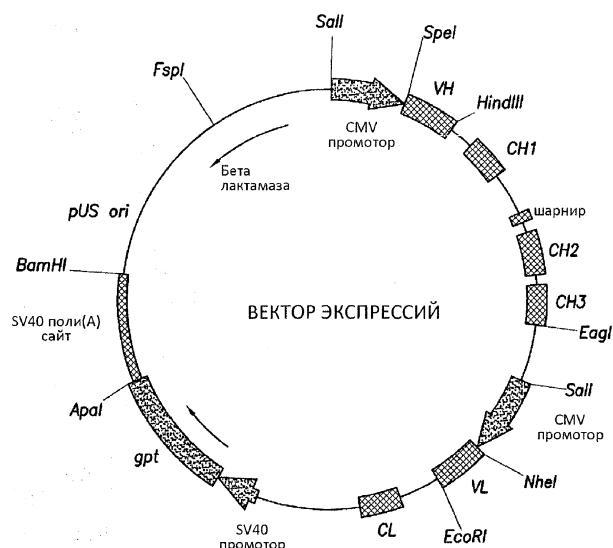
Фиг. 20



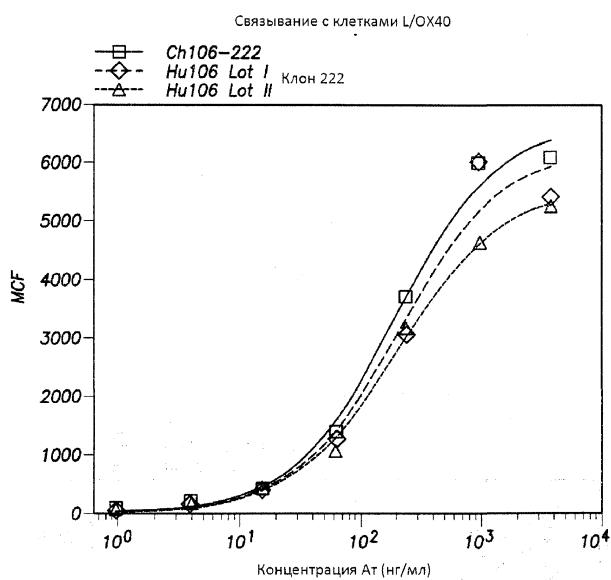
Фиг. 21



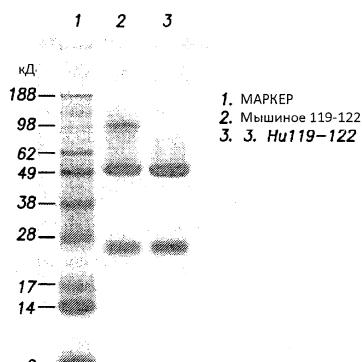
Фиг. 22



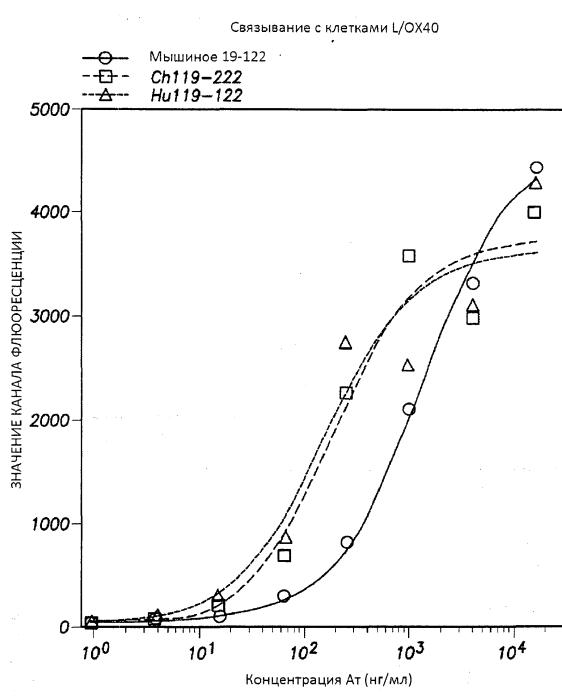
Фиг. 23



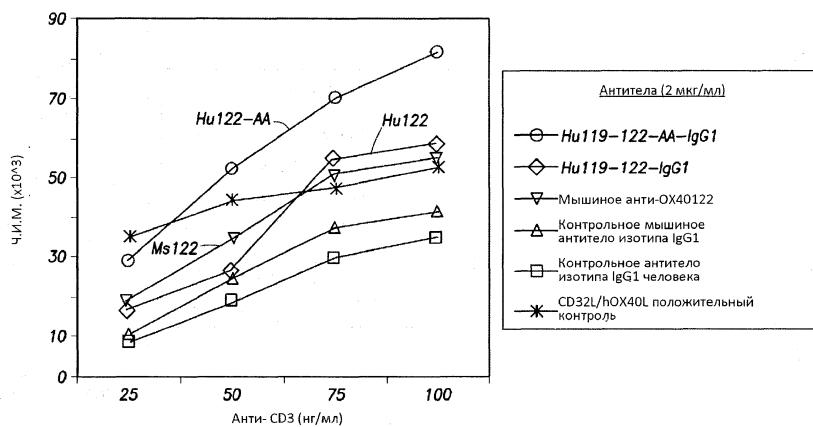
Фиг. 24



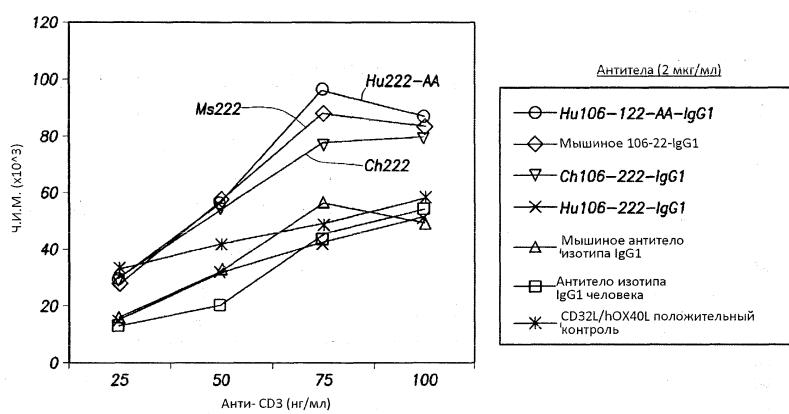
Фиг. 25



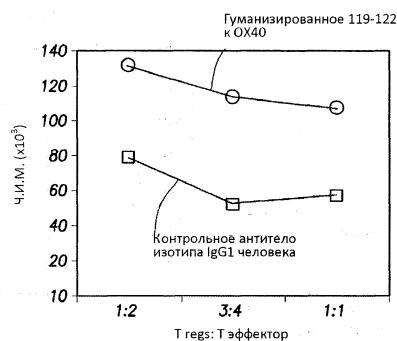
Фиг. 26



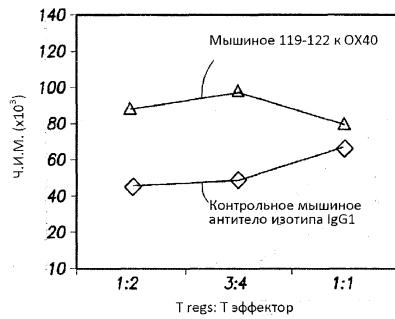
Фиг. 27



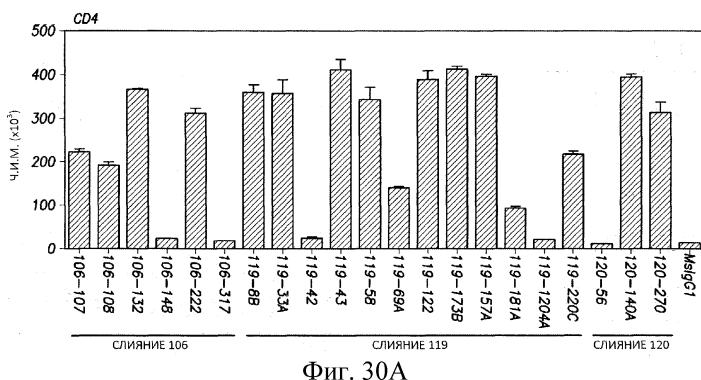
Фиг. 28



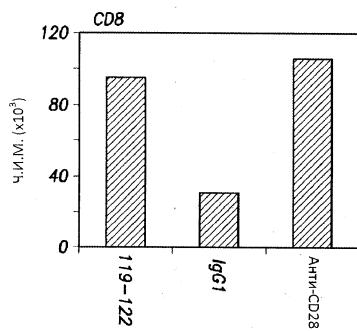
Фиг. 29А



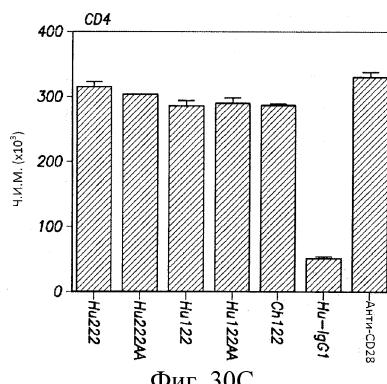
Фиг. 29В



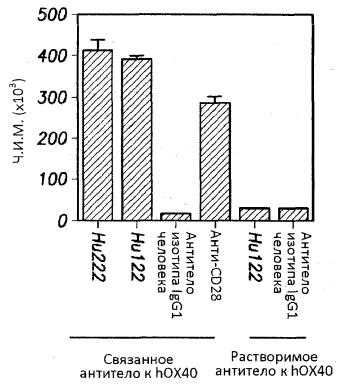
Фиг. 30А



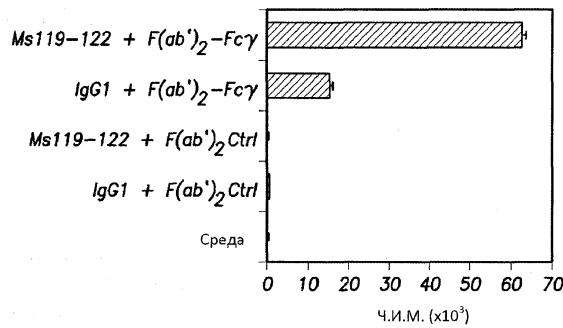
Фиг. 30В



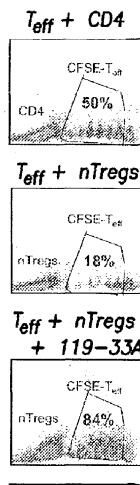
Фиг. 30С



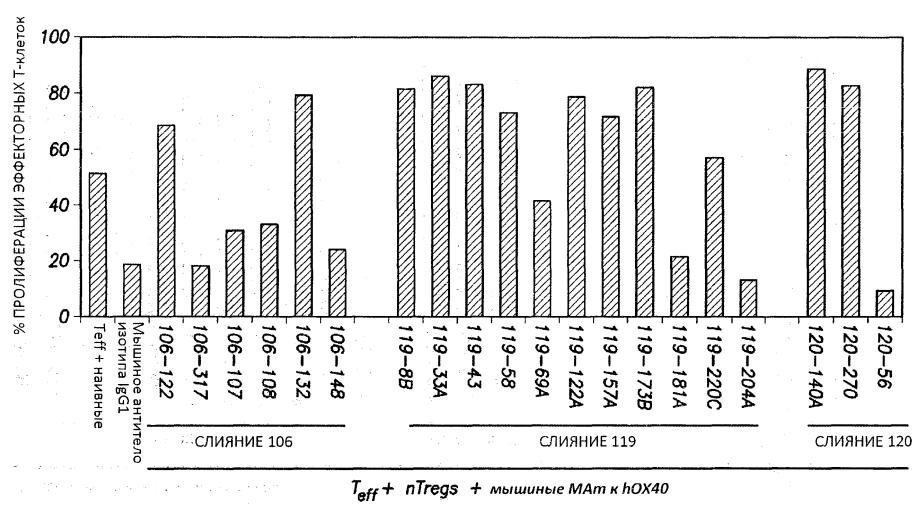
Фиг. 31А



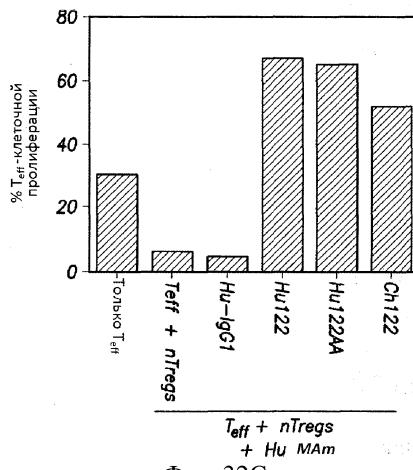
Фиг. 31В



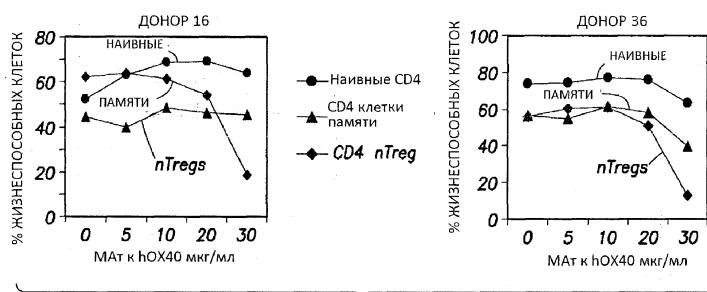
Фиг. 32А



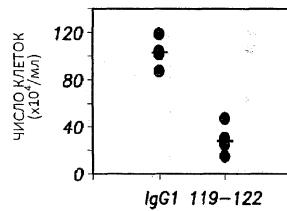
Фиг. 32В



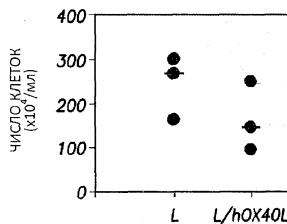
Фиг. 32С



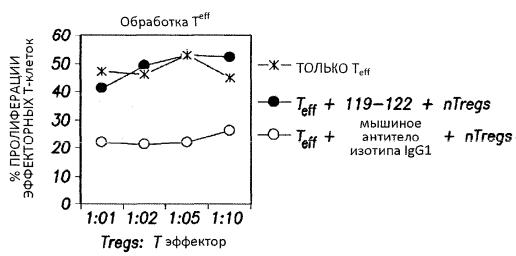
Фиг. 33А



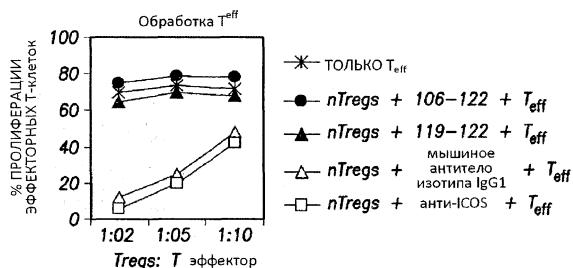
Фиг. 33В



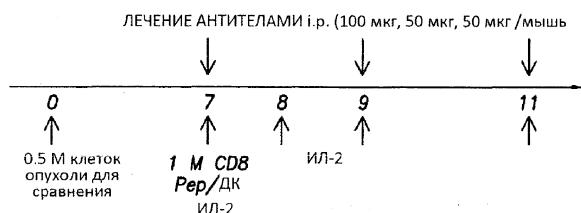
Фиг. 33С



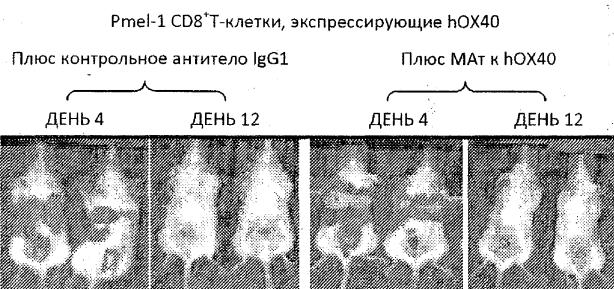
Фиг. 34А



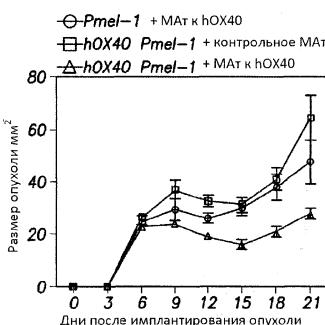
Фиг. 34В



Фиг. 35А



Фиг. 35В



Фиг. 35С

106-222 VH

SEQ ID No.4	106-222 VH	1	2	3
SEQ ID No.5	Hu106 VH	123456789	0123456789	0123456789
X61012		QIQLVQSGP	ELKKPGETVK	ISCKASGYTF
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF

CDR1 SEQ ID No.1

TDYSMHWVQK

TDYSMHWVRQ

WVRQ

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
a	CDR2 SEQ ID No.2		
APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY
APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY
APGQGLEWMG	-----	-----	RFVF

CDR2 SEQ ID No.2

8	9	1	1
012223456789	0123456789	000000123456789	0123
abc	abcde	CDR3 SEQ ID No.3	
LOINNLKNEDTAT	YFCANPYDY	VSYYAMDYWGHTSV	TVSS
LOISSLKAEDTAV	YFCANPYDY	VSYYAMDYWGQGTTV	TVSS
LOISSLKAEDTAV	YYCAR-----	-----WGKGTTV	TVSS

CDR3 SEQ ID No.3

LOISSLKAEDTAV

YYCAR-----

-----WGKGTTV

TVSS

Фиг. 36

031849

106-222 VL

CDR1 SEQ ID No.7		
1	2	3
SEQ ID No.10 106-222 VL	123456789 0123456789 0123456789	0123456789
SEQ ID No.11 Hu106 VL	DIVMTQSHK FMSTSVDRV SITCKASQDV	STAVAWYQQK
AJ388641	DIQMTQSPS SLSASVGDRV	TITCKASQDV
	DIQMTQSPS SLSASVGDRV	STAVAWYQQK
		WYQQK
CDR2 SEQ ID No.8		
4	5	6
106-222 VL	0123456789 0123456789 0123456789	0123456789
Hu106 VL	PGQSPKLLIY SASLYTGVP	DRFTGSGSGT DFTFTISSLQ
AJ388641	PGKAPKLLIY SASLYTGVP	SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
	PGKAPKLLIY -----GVP	SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
CDR3 SEQ ID No.9		
8	9	10
106-222 VL	0123456789 0123456789 01234567	01234567
Hu106 VL	AEDLAVYYCQ	QHYSTPRTFG GGTKLEIK
AJ388641	PEDIAVYYCQ	QHYSTPRTFG QGTKLEIK
	PEDIAVYYC-----FG	QGTKLEIK

Фиг. 37

Hu106-222 VH

SpeI

SEQ ID No.6	ACTAGTACCAACATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCAAAGT
	M A W V W T L L F L M A A A Q S
	ATCCAAGCACAGGTTCAAGTTGGCTTGAGCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
	I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S
	GTCAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG
	V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V
	CGACAGGCTCAGGACAAGGTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAACACTGAGACTGGTGAG
	R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E
	CCAACATATGCAAGATGACTTCAAGGGACGGTTGCTTCCTTTGGACACCTCTGTCAGC
	P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S
	ACTGCTTATTCAGATCAGCAGCCTAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTTACTGTGCT
	T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A
	AATCCCTACTATGATTACGTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACACG
	N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T
	GTCACCGTCTCTCAGGAAGAATGGCTCT <u>CAGCTT</u>
	HindIII
	V T V S S

Фиг. 38

Hu106-222 VL

NheI

SEQ ID No.12	GCTACCAACATGGAGTCACAGATTCAAGGTCTTTGATTCTGTTCTGGTTCT
	M E S Q I Q V F V F V F L W L S
	GGTGTGACGGAGACATTCAAGTACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCGGCATCAGTGGGA
	G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
	GACAGGGTACCATCACCTGCAAGGGCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGAGCTGGTAT
	D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y
	CAACAGAAACCGAAAAGCCCTAAACTACTGATTACTCGGATCCTACCTCTACACT
	Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T
	GGAGTCCTTCACGGCTCAGTGGCAGTGGATCTGGACGGATTCACTTCACCATCAGC
	G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S
	AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATTAATCTGTCAGCAACATTAGTACTCCTCG
	S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R
	EcoRI
	ACGTTCCGTCAAGGGCACCACAAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTGAATCCAAAGAATT
	T F G Q G T K L E I K

Фиг. 39

031849

119-122 VH

	1	2	3	
SEQ ID No.16	119-122 VH	123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No.17	Hu119 VH	EVQLVESGG	GLVQPGESLK	LSCESNEYEF
	Z14189	EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAAseyEF
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAAASGFTF
				S-----WVRQ
	4	5	6	7
	0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
				CDR2 SEQ ID No.14
119-122 VH	TPEKRLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFII	SRDNTKKLY
Hu119 VH	APGKGLELVA	ATNSDGGSTYY	PDTMERRFTI	SRDNAKNSLY
Z14189	APGKGLEWVA	-----	-----	RFTI SRDNAKNSLY
	8	9	0	1
	0122223456789	0123456789	0000123456789	0123
	abc	abc		CDR3 SEQ ID No.15
119-122 VH	LQMSSLRSEDTAL	YCARHYDDY	YAWFAYWGQGTIV	TVSA
Hu119 VH	LQMNSLRAEDTAV	YCARHYDDY	YAWFAYWGQGTIV	TVSS
Z14189	LQMNSLRAEDTAV	YCAR-----	-----	WGQGTIV

Фиг. 40

119-122 VL

	1	2	3	
	123456789	0123456789	01234567777789	0123456789
			abcd	CDR1 SEQ ID No.19
SEQ ID No.22	119-122 VL	DIVLTQSPA	SLAVSLGQRA	TISCRASKSVSTSG
SEQ ID No.23	Hu119 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	YSYMHWYQQK
	M29469	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----
				-----WYQQK
				CDR2 SEQ ID No.20
	4	5	6	7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
119-122 VL	PGQPPKLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLNIHPVE
Hu119 VL	PGQAPRLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
M29469	PGQAPRLLIY	-----GVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISSLE
				CDR3 SEQ ID No.21
	8	9	0	1
	0123456789	0123456789	01234567	
119-122 VL	EEDAATYYCQ	HSRELPLTFG	AGTKLELK	
Hu119 VL	PEDFAVYYCQ	HSRELPLTFG	GGTKVEIK	
M29469	PEDFAVYYC-----FG	-----FG	GGTKVEIK	

Фиг. 41

Hu119-122 VH
SpeI
SEQ ID No.18

ACTAGTACCAACATGGACTTCGGGCTCAGCTGGTTCTGGCTTCTGCTCTTAAAGT	M D F G L S L V F L V L I L K S
GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGAGCTGGAGCTGGGGGAGGCTTAGTGCGAGCCTGGAGGGTC	V Q C E V Q L V E S G G G L V O P G G S
CTGAGACTCTCTGTGAGCCTGAAATACGAGTCCCTTCCCATGACATGTCCTGGTC	L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V
CGCCAGGCTGGGGGAAGGGCTGGAGTTGGTCGAGCCATTAAATAGTATGGTAGC	R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S
ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC	T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N
TCACTGTACCTGCAAATGAAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTTACTGTGCA	S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACACTATGATGATTACTACCCCTGGTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTATGGTCACT	R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V T
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACCTCAAGCTT	HindIII
V S S	

Фиг. 42

119-122 VL
 NheI
 SEQ ID No.24

GCTAGCACCATGGAGACAGACACACTCTGTATGGTACTGCTGCTGGGTTCCA
M E T D T L L W V L L W V P

GGTTCCACTGGTGAATTGTGCTGACACAGTCTCTGCTACCTTATCTTGCTCCAGGG
G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G

GAAAGGGCCACCCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTATCTGGCTATAGTTAT
E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y

ATGCACTGGTACCAACAGAAACCCAGGACAGGCTCCAGACTCCTCATCTATCTGCATCC
M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S

AACTAGAATCTGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T

CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTCAGTTTACAGCTGTCAGCACAGTAGG
L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R

GAGCTCCGCTCACGTTGGGGAGGGACCAAGGTGAGATCAAACGTAAGTACACTTTT
E L P L T F G G G T K V E I K

EcoRI
CTGAATTC

Фиг. 43



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