

(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)**

(72) Изобретатель:
**Лю Юн-Цзюнь, Ву Куи Синь, Бовер
Лаура, Цурусита Наоя, Тсо Дж. Юнь,
Кумар Шанкар (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(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

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

Вариантом настоящего изобретения является выделенное антитело, содержащее варибельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и варибельную 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 ОХ40 и проявлять активность агониста.

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

Настоящее изобретение относится к выделенной клетке-хозяина, 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⁻TCRγδ⁻ 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-нейтрализующими 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 [^3H]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 наивными CD4^+ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 7В демонстрирует продукцию ИЛ-10 наивными 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 наивными CD4^+ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8В демонстрирует продукцию ИЛ-10 наивными 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. 8D 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 наивными CD4^+ Т-клетками, что установлено при помощи проточной цитометрии в соответствии с вариантом осуществления способа настоящего изобретения.

Фиг. 8F демонстрирует продукцию ИЛ-10 наивными 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 ингибировать формирование ИЛ-10-продуцирующих клеток (Tr1) из CD4^+ Т-клеток, стимулированное витамином D_3 (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 $\text{ICOS}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$ Treg и иммуносупрессивную функцию. Свежеотсортированные

$\text{ICOS}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$ Tregs ($\text{ICOS}^+\text{Tregs}$) 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 ингибиру-

ют формирование Tg1-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 Tg1-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 лимфоопосредованную 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 ОХ40 макаки-резуса и активировать стимуляцию ОХ40.

Фиг. 21 показывает, что каждое из антител Nu106-222 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 Nu106-222 серия I и II составляет более 95%.

Фиг. 22 демонстрирует анализ связывания мышиных антител 106-122, Ch106 и Nu106-222 (серия II) с клетками L/OX40 (пример I).

Фиг. 23 изображает схематическую структуру вектора экспрессии антитела Nu106 IgG1/каппа (вектор экспрессии). Двигаясь по часовой стрелке с сайта SalI наверху, плазида 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 интронами и сайт полиденитирования 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 интроном и сайт полиаденилирования 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 полиаденилирования SV40 (SV40 поли(А) сайт). В конце плазмиды содержится 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 Nu 106-222 серия I и II с клетками L/OX40 (пример I ниже).

Фиг. 25 демонстрирует Nu119-122, содержащее тяжелую цепь с молекулярным весом около 50 кДа и легкую цепь с молекулярным весом около 25 кДа. Чистота Nu119 составляет более 95% (пример II ниже).

Фиг. 26 демонстрирует результат FACS анализа антител Ch119-122 и Nu119-122, описанных в настоящем документе (пример II ниже).

Фиг. 27 демонстрирует, что клон 119-122 (Nu119) гуманизированного моноклонального антитела к ОХ40 человека и его мутировавшее антитело (Nu119-AA), связывающееся Fc-рецептором, усилили пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Nu119-122 вызывал лучшую стимуляцию Т-клеток по сравнению с родительским мышиным моноклональным антителом к ОХ40 человека (Mouse119-122). Однако химерное МАт к ОХ40 человека (Ch119, мышиные VH и VL, но константные области гамма-1 и каппа человека) не усиливало пролиферацию Т-клеток.

Фиг. 28 демонстрирует, что мутировавший клон 106-222 (Nu222AA) МАт к ОХ40 человека и клон 106-222 (Ch222) химерного МАт к ОХ40 человека усилил стимулированную анти-CD3 пролиферацию наивных CD4⁺ Т-клеток. Эти антитела имеют схожую стимулирующую активность в сравнении с мышиным МАт к ОХ40 человека (Mouse222). Однако полностью гуманизированное Ат к ОХ40 человека Nu222 не усиливало Т-клеточную пролиферацию в сравнении с IgG1 человека.

Фиг. 29А и В описывают блокирование супрессивной функции CD4⁺ Treg-клеток гуманизированным и мышиным клоном 119-122 МАт к ОХ40 человека.

Фиг. 30 предоставляет данные, показывающие усиление CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточной пролиферации антителами к ОХ40 человека, используя антитела, связанные с пластиной.

Фиг. 31 демонстрирует, что гуманизированные и мышиные антитела к ОХ40 человека требуют перекрестного связывания для усиления Т-клеточной пролиферации.

Фиг. 32 демонстрирует блокирование активности CD4⁺FOXP3⁺nTregs антителами к ОХ40 человека, используя антитела, связанные с пластиной.

Фиг. 33 показывает, что высокая концентрация мышиных антител к ОХ40 человека, предпочтительно, убивает FOXP3⁺ Tregs.

Фиг. 34 показывает, что мышинные моноклональные антитела к OX40 человека действуют либо прямо на эффекторные Т-клетки, либо на pTregs для блокирования супрессивной функции Tregs.

Фиг. 35A, 35B и 35C описывают результаты лечения опухоли у мышей при помощи МАТ к hOX40, которым были пересажены hOX40⁺CD8⁺ Т-клетки. МАТ к OX40 человека улучшает Т-клеточную экспансию и выживаемость *in vivo*. На фиг. 35A приведен терапевтический режим вакцинирования. Репрезентативные *in vivo* биолуминесцентные изображения приведены на фиг. 35B. Результаты лечения опухоли антителом приведены на фиг. 35C.

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 переменных 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. Интронная 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. Интронная 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 переменных 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.

Интронная 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. Интронная 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 переменную 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 переменную 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 гиперпеременности, называемые гиперпеременные 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 amino-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 гиперпеременная 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 взаимозаменяемо. 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, мышинные), 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 содержат других антител, имеющих различные антигенные особенности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с hOX40 практически не содержит антитела, которые специфически связываются с антигенами, отличными 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 ОХ40 человека, которое связывается с антигеном ОХ40 и/или активационная сила антитела, например, антитело к ОХ40, чье связывание с рецептором hОХ40 активирует биологическую активность hОХ40 или активация рецепторного связывания в L/ОХ40-клеточном анализе человека.

Термин " K_{off} ", используемый в настоящем документе, предназначен для определения константы скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген. 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 ВІАcore (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 Johnsson, B., et al. (1991), *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Термин "вектор" включает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую 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 эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные 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 взаимозаменяемо, 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, аденовирусы и аденоассоциированные 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 гиперварибельной 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, гуманизованное 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 гуманизованное 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 незрелыми 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 клетки лимфомы (фиг. 4). Супрессивная активность ICOS⁺ Tregs может быть частично заблокирована 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 примированными 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 D_3) были энергичны и имели способность подавлять пролиферацию наивных $CD4^+$ Т-клеток в ответ на моноклональные анти-CD3 плюс анти-CD28 антитела (фиг. 5C). В экспериментах на фиг. 5C 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 D_3 .

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 D_3). В экспериментах фиг. 6A 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 D_3 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 D_3 . Фиг. 6A показывает, что большое количество Tr1-клеток ($>20\%$) сформировалось из $CD4^+$ Т-клеток памяти в культуре с дексаметазоном плюс витамин D_3 . Добавление OX40L полностью блокировало формирование Tr1-клеток и способствовало формированию ФНО- α -продуцирующих клеток из $CD4^+$ Т-клеток памяти.

Способность дексаметазона плюс витамин D_3 активировать продукцию ИЛ-10 $CD4^+$ Т-клетками памяти и что эта способность может быть ингибирована OX40L, было подтверждено анализами ИЛ-10 ELISA (фиг. 6B). В экспериментах на фиг. 6B 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 D_3 .

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 D_3 , 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. 7A и 7B).

В экспериментах на фиг. 7A 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 D_3 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. 7B 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. 7C). В экспериментах на фиг. 7C подсчитывали количество жизнеспособных Т-клеток. Данные представлены как среднее \pm SEM четырех независимых экспериментов.

Как понятно специалистам в данной области, результаты на фиг. 7А, 7В и 7С показывают, что ОХ40L, 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, ОХ40L имеет новую и уникальную функцию ингибирования образования Tr1-клеток.

Кроме того, было обнаружено, что ОХ40L 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 ОХ40L 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 ОХ40L течение 7 дней.

В экспериментах на фиг. 8А 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 ОХ40L-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 ОХ40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ICOSL.

В экспериментах на фиг. 8В 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 ОХ40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Данные представлены как среднее \pm SEM трех независимых экспериментов. Результаты показывают, что ОХ40L ингибирует формирование Tr1-клеток из наивных CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ICOSL.

В экспериментах на фиг. 8С 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 ОХ40L-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 ОХ40L 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 ОХ40L-L-клеток, которые были предварительно покрыты моноклональным анти-CD3 антителом. Данные представлены как среднее \pm SEM трех независимых экспериментов. Результаты показывают, что ОХ40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток памяти, индуцированных ICOSL.

Результаты экспериментов на фиг. 8А, 8В, 8С и 8D показывают, что ICOSL значительно способствовал образованию Tr1-клеток как из наивных, так и из CD4⁺ Т-клеток памяти. Добавление ОХ40L 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 ОХ40L ингибировать формирование Tr1-клеток, индуцированное ДК. Как показано на фиг. 8Е, 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 CD4⁺ 0L, индуцируют сильный TH1-ответ, сопровождавшийся формированием около 3% Tr1-клеток. Добавление рекомбинантного ОХ40L в ДК-Т-клеточные культуры полностью ингибировало формирование Tr1-клеток, индуцированное незрелыми ДК и ДК, обработанными ИЛ-10 и ИФН- α . Кроме того, ОХ40L также ингибировало формирование остаточного количества Tr1-клеток, индуцированное CD40L-активированными зрелыми ДК. В экспериментах на фиг. 8Е 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 ОХ40L 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 ОХ40L ингибирует формирование Tr1-клеток из CD4⁺ Т-клеток, индуцированных ДК.

Способность ОХ40L ингибировать формирование Tr1-клеток, индуцированное ДК, была подтверждена данными ELISA (фиг. 8F). В экспериментах на фиг. 8F продукция ИЛ-10 наивными CD4⁺ клетками

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 ингибирует 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 талангэктазию, 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 иденти-

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 лентигио, акральные лентигинозные меланомы, узловые меланомы, а также В-клеточная лимфома (в том числе низкодифференцированная/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ); мелколлимфоцитарная (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 факотомозом, отек (например, ассоциированный с опухолью 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, включающих стадию введения терапевтически эффективного количества антитела субъекту, нуждающемуся в этом, где аутоиммунным заболеванием или воспалительным заболеванием является одно или более из следующих заболеваний: инсулинозависимый 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 микседема, тиреотоксикоз, пернициозная анемия, аутоиммунный атрофический гастрит, болезнь Аддисона, преждевременная менопауза, мужское бесплодие, ювенильный диабет, синдром Гудпасчера, вульгарный пемфигус, пемфигонд, симпатическая офтальмия, фагогенный увеит, аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая лейкопения, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит Н_В_{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 пурпура, опосклонус-миоклонус синдром (ОМС), неврит зрительного нерва, тиреоидит Орда, пемфигус, полиартрит, первичный билиарный цирроз, синдром Рейтера, Такаясу, темпоральный артериит, тепловая аутоиммунная гемолитическая анемия, гранулематоз Вегенера, алоpecia универсальная, болезнь Бехчета, болезнь Чагаса, синдром хронической усталости, дизавтомия, эндометриоз, гнойный гидраденит, интерстициальный цистит, нейромиотония, саркоидоз, склеродермия, язвенный колит, витилиго, 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 аутоантигена (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, псориатический артрит, болезнь Стилла, позвоночный артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, анкилозирующий спондилоартрит), 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 Жоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетиформный 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 склеродермию), склероз, такой как системный склероз, рассеянный склероз (РС), такой как спинооптический РС, первичный прогрессирующий РС (ППРС) и ремиттирующе-рецидивирующий РС (PPPC), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, болезнь Шарко-Вюльпиана, атаксический склероз, оптиконейромиелит (NMO), воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона, аутоиммуноопосредованные 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 ангионевротический 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, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантгенный увеит, задний увеит, или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (ГН) с нефротическим синдромом и без него, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный ГН, иммуноопосредованный ГН, мембранозный ГН (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный ГН или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембрано- или мембранозно-пролиферативный ГН (МПГН), в том числе тип I и тип II, и быстро прогрессирующий ГН, пролиферативный нефрит, аутоиммунная полигландулярная эндокринная недостаточность, баланит, включая ограниченный плазмноклеточный 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, астеатозную 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, непечечную волчанку, экстраренальную волчанку, дискоидную волчанку и дискоидную красную волчанку, волчаночную алопецию, системную красную волчанку (СКВ), такую как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, неонатальный волчаночный синдром (NLE), 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 лимфоматозидный 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-Стросса 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 Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (ИЭА), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, панцитопению, лейкопению, заболевания, включающие диapedез лейкоцитов, воспалительные нарушения ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром полиорганного повреждения, такой как вторичные синдромы септицемии, травмы или кровоизлияния, опосредованные комплексами антиген-антител заболевания, болезнь антител к базальной мембране 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 пузырьчатка, пемфигусный пемфигоид слизистой оболочки и пемфигусный эритематоз), аутоиммунные полиэндокринопатии, 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 пурпуру (ТТП), посттрансфузионную пурпуру (РТП), гепарининдуцированную тромбоцитопению и аутоиммунную или иммуноопосредованную тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (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, полиглангулярные синдромы, такие как аутоиммунные полиглангулярные синдромы (или полиглангулярные 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 ассоциированную с тимомой миастению гравис, дегенерацию мозжечка, нейромиотонию, опосклонус или опосклонус-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 бронхолит (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 билиарный цирроз и пневмоцирроз, аутоиммунный синдром энтеропатии, целиакию, целиакию-спру (глутеновая 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, незлокачественный 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 гломерулосклероз (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 Дресслера, очаговую алопецию, тотальную алопецию, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, эзофагальная дискинезия, склеродактилия и телеангиэкта-

зия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие антител к сперматозоидам, смешанное поражение соединительной ткани, болезнь Чагаса, ревматическую лихорадку, привычный выкидыш, легкое фермера, мультиформную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, легкое птицевода, аллергический гранулематозный ангиит, доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, трансфузионную реакцию, лепру, малярию, паразитарные заболевания, такие как лейшманиоз, кипаносомноз, шистозомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Сэмптера, синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, муковисцидоз, эндофтальмит, стойкую возвышающуюся эритему, эритробластоз плода, эозинофильный фасцит, синдром Шулмана, синдром Фелти, флариаз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронный циклит, иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фукса, пурпура Шенлейн-Геноха, инфекцию вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), ТКИН, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), экзотическую 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 тромбангиит, тиреотоксикоз, сухотку спинного мозга, хориоидит, 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, асперниогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемию, контрактуру Дюпюитрена, факоанафилактическую эндофтальмию, аллергический энтерит, лепрозную узелковую 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 микседему, нефроз, симпатическую офтальмию, гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангренозную 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 диapedез, синдром полиорганной недостаточности, заболевания, опосредованные комплексами антиген-антитело, заболевание, обусловленное антителами к базальной мембране клубочков, аллергический неврит, аутоиммунные полиэндокринопатии, оофорит, первичную микседему, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическую офтальмию, ревматические заболевания, смешанное поражение соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит, полиэндокринная недостаточность, аутоиммунный полигландулярный синдром типа I, идиопатический гипопаратиреоз взрослых (АОИ), кардиомиопатию, такую как дилатационная кардиомиопатия, приобретенный буллезный эпидермолит (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 Леффлера, хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия, бронхопневмонический аспергиллез, аспергиллема или гранулемы, содержащие эозинофилы, анафилаксию, серонегативные спондилоартриты, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склерозный, эписклерозный, 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, гипертония, 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, полиорганную 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 мембраны 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); обезжиривающий 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) обезжиривающий реагент; (б) буферы (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 мышинных фибробластов (L-клеток), либо с 100000 мышинных 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 присутствии лиганда OX40, секретируют до 6000 пг/мл ИЛ-10. В присутствии лиганда OX40 100000 клеток SUOX40 секретируют 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-ПЦП 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-gr (gag/pol) и pHCMV-VSVg (VSV-гликопротеиновый внешний слой) в клетках HEK293T. Два дня спустя собирали супернатанты вирусосодержащих культур и использовали для инфицирования CD32 L-клеток при ПУМ 100. При этом условии >95% клеток были продуктивно трансдуцированы.

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 МПКП 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-культивированы с незрелыми или культивированными ДК (соотношение ДК к Т 1:10) в присутствии или в отсутствии рекомбинантного ОХ40L 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 Иальфа, 25-дигидроксивитамина D₃ (10^{-7} М) в течение 7 дней в присутствии растворимого моноклонального анти-CD28 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 (ОКТ3, 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 меченных фикоэритрином моноклональных антител к ИЛ-4 или ФНО- α с FITC-мечеными моноклональными антителами к ИФН- α и мечеными аллофикоцианином 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 супрессивной функции наивные CD4⁺ Т-клетки (А) 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 (В) или ОХ40L-L-клеток (С), 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 специфических моноклональных антител к ОХ40 человека.

Авторы получили множественные агонистические мышинные моноклональные антитела к ОХ40 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 ОХ40 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 ОХ40 ингибируют функцию CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg.

Некоторые из моноклональных антител к ОХ40 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 линией мышиных клеток, трансфицированных OX40 человека в соответствии с установленными протоколами. Клоны гибридомы, секретирующие 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 ингибирования 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 адъювантами. 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, секретирующие 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 точным 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 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, фикоэритринконъюгированным 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 наноM), 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 подвержены внутриклеточному окрашиванию ИЛ-10 с последующим анализом методом проточной цитометрии. Данные репре-

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 девятью 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 свежесортированные 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.

Свежесортированные ICOS⁺ ICOS⁻CD4⁺CD127⁺CD25^{high} Tregs культивировали с мечеными 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. Свежесортированные FOXP3⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{high} Т-клетки ($3,5 \times 10^4$) культивировали с мечеными 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 цетометрии. 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 свежесортированные FOXP3⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{high} Т-клетки ($3,5 \times 10^4$) культивировали с мечеными 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 ОХ40. 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 мечеными 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 ОХ40, которые специфически связываются с ОХ40 человека и макаки резуса. Мононуклеарные клетки периферической крови макаки резуса были получены путем фиколл-центрифугирования. CD4⁺ Т-клетки были получены из микрогранулированных CD4⁺ Т-клетки стимулировали 10 мкг/мл лектина фасоли обыкновенной (PHA). Через два дня после стимуляции клетки окрашивали МАт к hOX40 с козым антимышиным 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 ОХ40 человека, полученных с использованием принятых протоколов слияния, проявили свойство триггирования ОХ40, 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 ОХ40

	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⁺ (индуцибельные 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 третьи 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 мышиного антитела к ОХ40.

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

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

Выделенное гуманизированное антитело к OX40 может иметь варибельную 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 варибельную 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 варибельную 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 варибельную 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 эписомные или хромосомные интегрированные экспрессионные конструкции; клетки насекомых и вирусов, такие как клетки Sf9 и бакуловирус; клетки млекопитающих, несущие интегрированные в эписомы 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 варибельной 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-кодирующей 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, моноклональные анти-CD3-антитела используются в настоящее время для лечения аутоиммунных заболеваний, включая сахарный диабет I типа, в котором Т-клетки медируют нападение на панкреатические островки, продуценты 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 мишеней 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 массивному 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 к OX40 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, вводят 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 экспрессирующей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть вставлены в отдельный вектор или, что более типично, оба гены 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 SalI наверху, плаزمида 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, включающая экзоны CH1, шарнира, CH2 и CH3 с промежуточными интронами и сайт полиаденилирования 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 интроном, и сайт полиаденилирования после экзона CL. После гена легкой цепи следует предранний промотор SV40 (SV40 промотор), ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *E.coli* (*gpt*) и сегмент, содержащий сайт полиаденилирования SV40 (SV40 поли(A) сайт). В конце плазмиды 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 аминоконцом 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 полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, 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), аденовирус (например, аденовирусный 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 селективируемых маркеров. Ген селективируемого 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 селективируемого маркера обуславливает устойчивость к лекарственным веществам, таким как G418, гигромицин или метотрексат клетки-хозяина, в которую был интродуцирован вектор. Предпочтительные гены селективируемых маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr^{sup}-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией, основанной на метотрексате) и ген нео (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-декстрана 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 секретируют антитело 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 ОХ40. 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 ОХ40 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, внутривнутрибрюшинного, 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 пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например, этилвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир 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 детерминанту антитела, соответствующие изобретению, комбинируются и/или вводятся совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, которые являются полезными для лечения нарушений, в которых инактивация ОХ40

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 дозирования. 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 мышинным 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%.

Эндотоксинная 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 серия I и II.

Исследование связывания Hu106-222 с клетками L/OX40.

Связывание мышинных 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 мышинового 106-222) или меченного фикоэритрином козьего IgG античеловеческого антитела (для Ch106 и Hu106).

Фиг. 22 демонстрирует анализ мышинных 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 мышинным 106-222 сохраняется в Hu106-222. Кривая титрования мышинового 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 мышинового 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-колонок, похоже, не влияет на его аффинность.

Очистка Ch106-222.

NS0 стабильный трансфектант C8 выращивали в 500 мл среды Invitrogen's Hybridoma SFM в поллер-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 обессоливали 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 диализовали в течение ночи против PBS. После диализа 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 поллер-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 (pH 3,0). Элюированные фракции (1 мл каждая) собирали в пробирки, содержащие 50 мкл 1 М Tris-HCl (pH 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 диализовали в течение ночи против PBS. После диализа 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 (pH 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 диализовали в течение ночи против PBS. После диализа 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 pH 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 диализом. 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 кислотолabileм.

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 диализом. 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 pH, нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 8,0) и диализовали против PBS. Концентрация Hu122 составила 1,6 мг/мл.

Очищенное Hu106-222 характеризовалось SDS-PAGE наряду с мышинным 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 мышиных антител 119-122, 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 мышиного 119-122) 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 мышиным 119-122 сохраняется в Hu119-122. Тем не менее, значения MCF при более высокой концентрации антител Ch109-122 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 свежееотсортированных наивных $CD4^+$ Т-клеток. Фиг. 27 показывает, что клон 119-122 (Hu122) гуманизированного МАт к OX40 человека и его мутировавшее FcR-связывающее антитело (Hu122-AA) усиливали пролиферацию наивных $CD4^+$ Т-клеток. Hu122 оказывал лучшую стимулирующую активность на Т-клетки по сравнению с родительскими мышиными МАт к OX40 человека (Mouse122) (фиг. 27).

Клон 106-222 (Hu222-AA) FcR-связывающего мутировавшего 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 мышиными 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 супрессивную функцию $CD4^+$ регуляторных Т-клеток (Tregs), авторы изобретения провели анализ пролиферации с использованием свежееотсортированных наивных $CD4^+$ Т-клеток и $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Tregs. Авторы изобретения обнаружили, что химерное антитело Ch122 и мутировавшее Fc-связывающее гуманизированное антитело (Hu122-AA) проявляли большую силу, чем родительские мышиные МАт к OX40 человека (Mouse122) в блокировании супрессивной функции $CD4^+$ Treg (фиг. 29 A-B).

В эксперименте на фиг. 27, свежееотсортированные наивные $CD4^+CD25^{low}CD127^+CD45RO^-CD45RA^+$ Т-клетки стимулировали L-клетками, экспрессирующими CD32 (CD32-L), покрытыми 4-мя концентрациями анти-CD3-антитела плюс 2 мкг/мл антител клона 119 АТ к OX40 человека или контрольными антителами. Через три дня после стимуляции был добавлен радиоизотоп тритий и культивирование продлилось 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, свежееотсортированные 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 продлилось 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 свежееотсортированные 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 продлилось 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 моноклеарными 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 (АРК) в проводимых анализах пролиферации. Однако авторы изобретения получили очень переменные данные с исследуемыми мышиными МАт к OX40 человека при использовании МКПК в качестве АРК, что не наблюдается при использовании моноцитов в качестве АРК и позволяет предположить, что исследуемые антитела требуют не-

кого 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. 30А) или CD3⁺CD8⁺ Т-клетки (фиг. 30В) стимулировали анти-CD3 (3 мкг/мл), нанесенными на пластины, и мышиным 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 гибридных 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. 30С). 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 мутировали в аминокислоту аланин) и Ch119-122 (похож на гуманизированное 119-122 за исключением того, что "паратоп" мышинной 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 пластиной мышинные 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. 30С).

Фиг. 31 демонстрирует, что мышинные 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 пластиной, плюс со связанными с пластиной 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 пластиной, в отсутствие 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 сопоставима с анти-CD28. Напротив, когда растворимое антитело к ОХ40 человека было добавлено в культуру Т-клеток, стимулирующий эффект был упразднен (фиг. 31А). 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. 31В). 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⁺pTregs, авторы изобретения провели анализы пролиферации в присутствии CD4⁺CD25^{low}CD127⁺CD45RO⁺ эффекторных Т-клеток (Teff) и CD4⁺ pTregs. Используя предложенную авторами систему, связанную с пластиной, в которой МАт к ОХ40 человека вместе с анти-CD3 наносили на пластину и в отсутствие вспомогательных клеток, двенадцать (222, 132, 8В, 33А, 43, 58В, 122, 157А, 173В, 220С, 140А, 270) представленных мышинных МАт к ОХ40 человека сильно ингибировали супрессию pTreg (фиг. 32А и 32В). Хотя соотношение pTregs 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 отсутствие pTregs. Предложенные гуманизированные МАт к ОХ40 человека также обращали супрессивную функцию pTregs на схожих уровнях (фиг. 32С). Эти результаты, рассматриваемые вместе, позволяют предположить, что исследуемые мышинные МАт к ОХ40 человека являются мощными стимуляторами ОХ40, которые значительно усиливают пролиферацию Т-клеток и ингибируют супрессивную функцию pTreg. Кроме того, предложенные гуманизированные МАт к ОХ40 человека сохраняли сильную биологическую активность родительских мышинных антител.

Фиг. 32 демонстрирует, что МАт к ОХ20 человека блокирует активность CD4⁺FOXP3⁺pTregs. 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 пластиной, и МАт к ОХ40 человека (2 мкг/мл). Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения. Соотношение pTregs 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 пТregs. Фиг. 32А является репрезентативными данными FACS, показывающими пролиферацию эффекторных Т-клеток в присутствии наивных $CD4^+$ Т-клеток, пТregs или пТregs плюс МАт к ОХ40 человека 119-33А. Фиг. 32В показывает процент пролиферации эффекторных Т-клеток в присутствии пТregs после обработки мышинным МАт к ОХ40 человека (20 проверенных). Фиг. 32С показывает все три версии гуманизированных МАт к ОХ40 человека, восстановивших пролиферацию эффекторных Т-клеток.

Недавний отчет говорит о том, что триггирование ОХ40 может индуцировать апоптоз линии Т-клеток человека, экспрессирующих ОХ40 (Yoshiaki Takahashi et al., 200B, Aids Research and human Retroviruses, 24). Поэтому авторы изобретения протестировали эффект увеличения концентраций МАт к ОХ40 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 ОХ40 человека 106-222 (20-30 мкг/мл) преимущественно убивали активированные FOXP3⁺ пТregs, 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 ОХ40 человека действует на Тregs и вызовет гибель клеток, авторы изобретения провели новые эксперименты в отсутствии вспомогательных клеток. Фиг. 33В показывает, что сильная активация ОХ40 в сочетании с анти-CD3 специфично убивает пТregs в отсутствии вспомогательных клеток. Чтобы подтвердить, что поражающие эффекты, опосредованные МАт к ОХ40 человека имитировали триггирование ОХ40 натуральным лигандом ОХ40, авторы изобретения использовали клеток мышинные фибробласты линии L, которые сверхэкспрессируют hOX40L и использовали их для стимулирования пТregs в присутствии низкой дозы анти-CD3 и получили аналогичные поражающие эффекты на пТregs (фиг. 33С). Эти результаты позволяют предположить, что сильное триггирование ОХ40 убивает ОХ40-экспрессирующие Тregs-клетки.

В частности, фиг. 33 демонстрирует, что высокие концентрации МАт к ОХ40 человека преимущественно убивают FOXP3⁺ Тregs. На фиг. 33А каждая субпопуляция Т-клеток (наивные, $CD4^+CD25^{low}CD127^+CD45RO^-CD45RA^+$; клетки памяти, $CD4^+CD25^{low}CD127^+CD45RA^-CD45RO^+$ и пТregs, $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) были культивированы с равным соотношением $CD14^+$ моноцитов в присутствии растворимого анти-CD3 (0,3 мкг/мл) и повышающимися концентрациями мышинного МАт к ОХ40 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 ОХ40 убивает $CD4^+FOXP3^+$ Тregs. Фиг. 33В демонстрирует, что $CD4^+FOXP3^+$ Тregs были стимулированы анти-CD3 (2 мкг/мл), связанного с пластиной, а также растворимым МАт 119-122 (30 мкг на миллион клеток) или контрольным мышинным антителом изотипа IgG1. Через один день культивирования на гемацитометре были подсчитаны живые трипан-отрицательные клетки. Фиг. 33С показывает, что $CD4^+FOXP3^+$ Тregs 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 ОХ40 человека непосредственно на Т-клетки, чтобы блокировать супрессорную функцию пТreg. Свежеотсортированные $CD4^+$ эффекторные Т-клетки или пТregs были предварительно активированы в течение ночи с анти-CD3 и активированы МАт к ОХ40 человека в течение 4 ч. Эффекторные Т-клетки затем промывали, метили CFSE и со-культивировали с пТregs в присутствии равного количества $CD14^+$ моноцитов и анти-CD3. Аналогично предварительно простимулированные пТregs промывали и культивировали с необработанными мечеными CFSE эффекторными Т-клетками.

Фиг. 34 показывает, что МАт к ОХ40 человека непосредственно воздействуют на Т-клетки для блокирования супрессорной функции Тregs. Фиг. 34А показывает, что МАт к ОХ40 человека воздействует непосредственно на эффекторные Т-клетки памяти, чтобы придать им устойчивость к супрессии пТregs. $CD4^+CD25^{low}CD127^+CD45RA^-CD45RO^+$ 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 ОХ40 человека (119-122, 22 мкг на 0,5 млн. клеток) в культуральной среде в течение 4 ч, промывали 3 раза и 8×10^4 меченных CFSE эффекторных Т-клеток культивировали с уменьшающимися значениями пТregs. Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения. МАт к ОХ40 человека воздействует на Тregs, что делает их неспособными супрессировать пролиферацию эффекторных Т-клеток (фиг. 34В). $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ пТregs предварительно стимулировали анти-CD3 (2 мкг/мл), связанным с пластиной, в культуральной среде в течение 12 ч, затем активированы МАт к ОХ40 человека 119-122 или 106-222, или контрольным антителом, анти-ICOS или мышинным антителом изотипа IgG1, как описано в панели А, промывали и культивировали с мечеными CFSE эффекторными Т-клетками памяти. Пролиферацию эффекторных Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии CFSE разведения.

Эффекторные Т-клетки, обработанные МАт к ОХ40 человека, стали устойчивыми к супрессии пТreg клетками (фиг. 34А). Напротив, пролиферация эффекторных Т-клеток, обработанных контрольным

мышиним антителом изотипа IgG1, оставалась восприимчивой к супрессии pTregs. Фиг. 34В показывает, что pTregs, обработанные МАт к ОХ40 человека, были не способны супрессировать пролиферацию эффекторных Т-клеток. Напротив, pTregs, обработанные контрольными антителами, такими как анти-I COS или мышиним 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 pTregs 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- κ B 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 мышинное 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 внутривенно 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* биоллюминесцентные изображения показали накопление люцифераза-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 мышинное 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> UTF8.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

actagtagcca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt 60
 atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca 120
 gtcaagggttt cctgcaaggc ttctgggttat accttcacag actattcaat gcaactgggtg 180
 cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taaacactga gactggtgag 240
 ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc 300
 actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct 360
 aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actgggggtca gggaaccacg 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 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 gatgaccag tctccatcct cctgtccgc atcagtggga	120
gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctgggtat	180
caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact	240
ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc	300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat 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 ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt	60
gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggaggggtcc	120
ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggtc	180
cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tgggtggtagc	240
acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac	300
tcactgtacc tgcaaataa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca	360
agacactatg atgattacta cgcttggttt gcttactggg gccaaaggac tatgggtcact	420
gtctcttcag 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 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

031849

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 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24

<211> 428

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

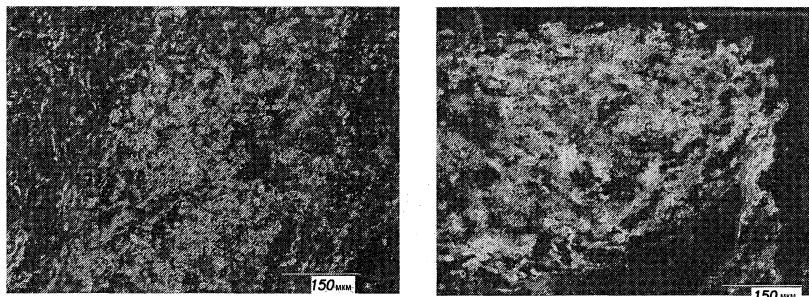
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид

<400> 24

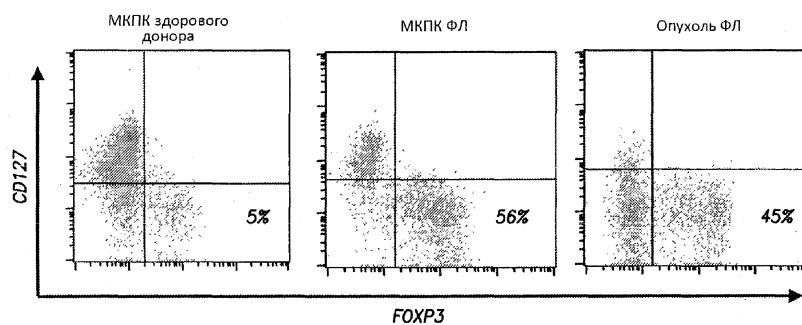
gctagcacca ccatggagac agacacactc ctgttatggg tactgctgct ctggggtcca	60
ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta cttatcttt gtctccaggg	120
gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat	180
atgcactggg accaacagaa accaggacag gctcccagac tctcatcta tcttgcaccc	240
aacctagaat ctgggggtccc tgccagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc	300
ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg	360
gagcttccgc tcacgttcgg cggaggggacc aaggctcgaga tcaaacgtaa gtacactttt	420
ctgaattc	428

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

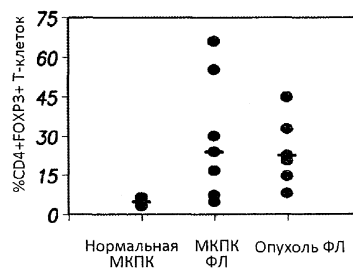
1. Выделенное антитело, которое связывается с OX40, содержащее:
 - (a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
 - (b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
 - (c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
 - (d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;
 - (e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и
 - (f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
2. Выделенное антитело по п.1, где выделенное антитело содержит варибельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и варибельную 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 варибельную область легкой цепи с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и варибельную 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.



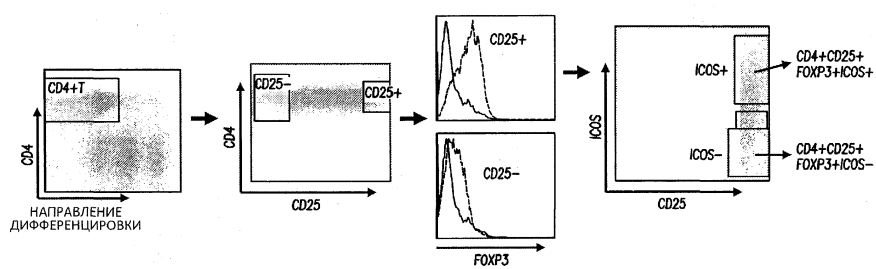
Фиг. 1



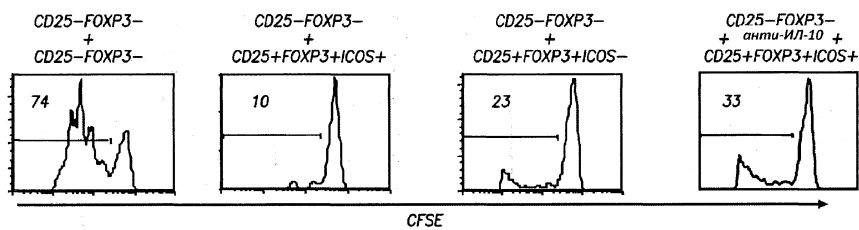
Фиг. 2А



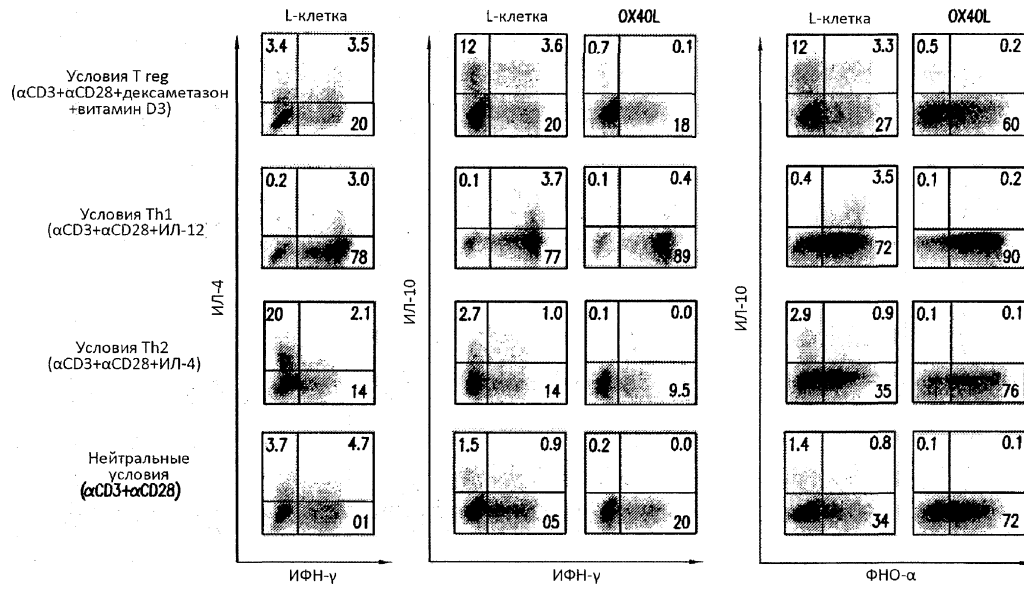
Фиг. 2В



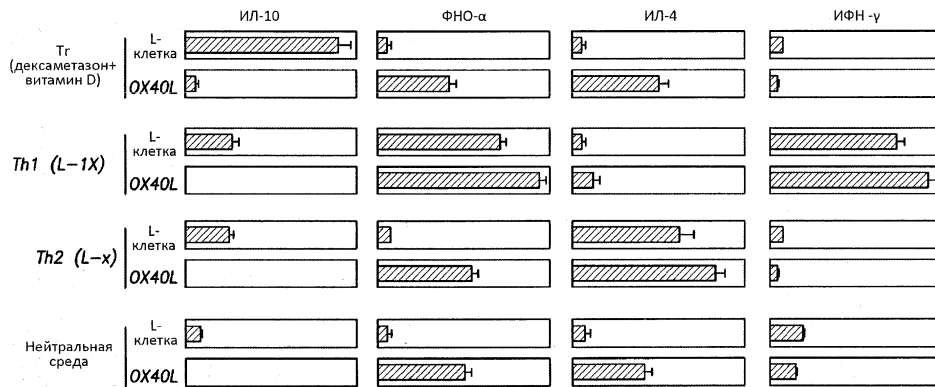
Фиг. 3



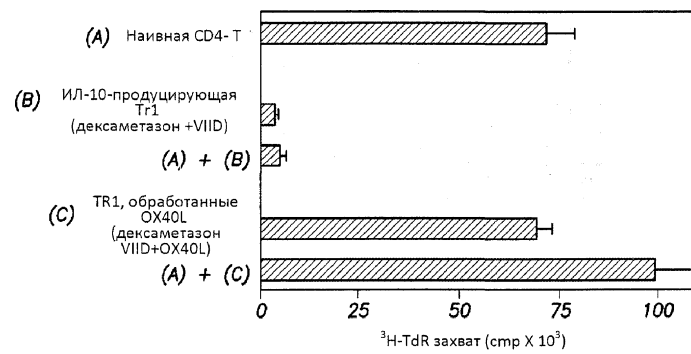
Фиг. 4



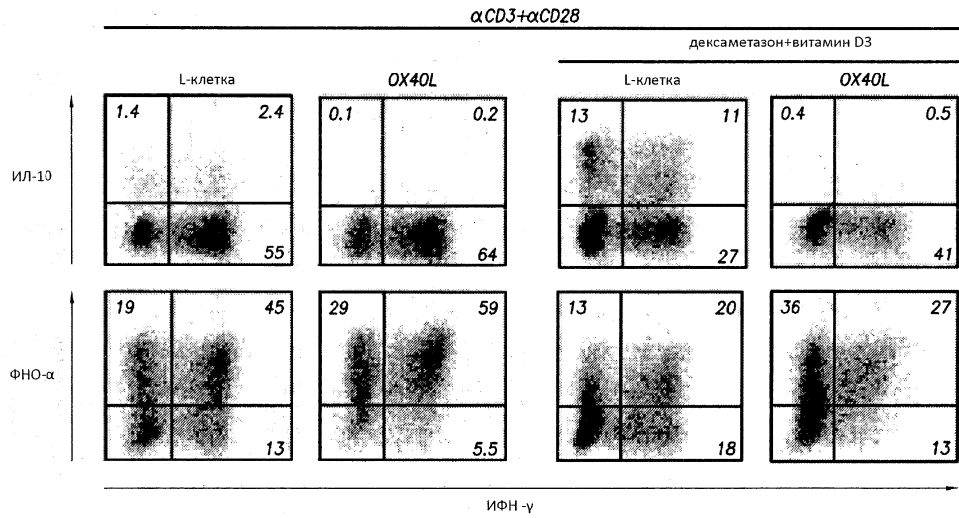
Фиг. 5А



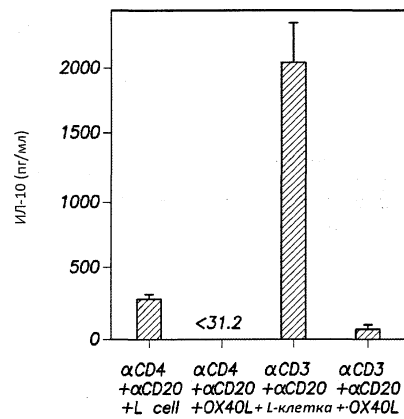
Фиг. 5В



Фиг. 5С

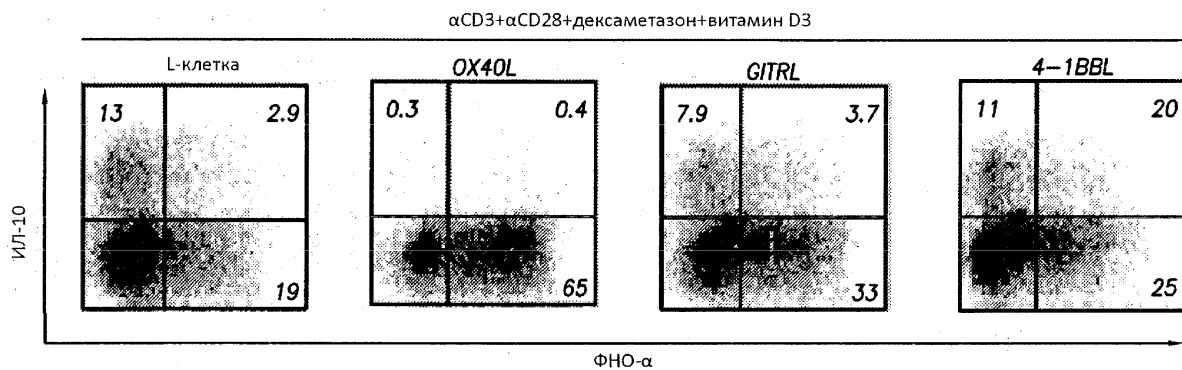


Фиг. 6А

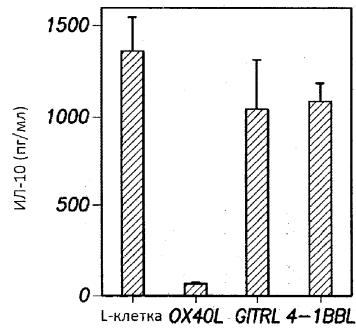


дексаметазон+витамин D3

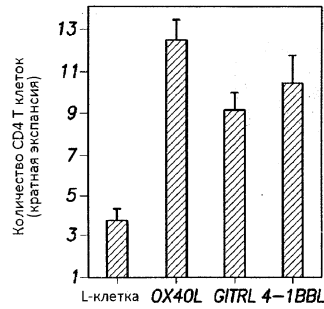
Фиг. 6В



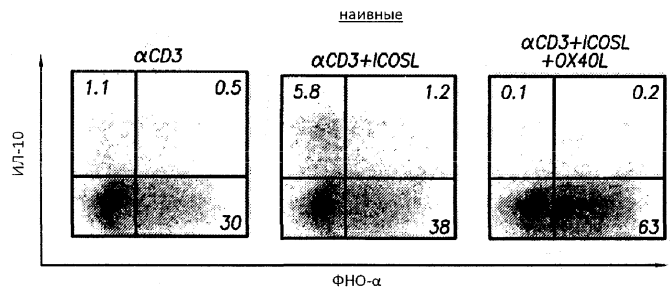
Фиг. 7А



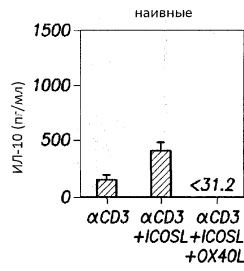
Фиг. 7B



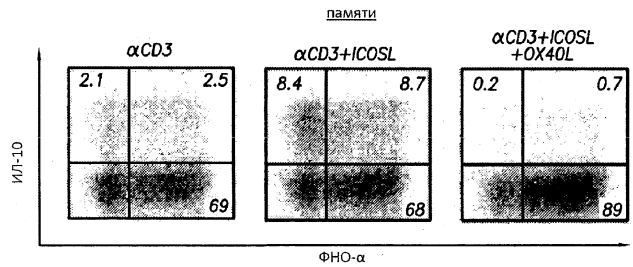
Фиг. 7C



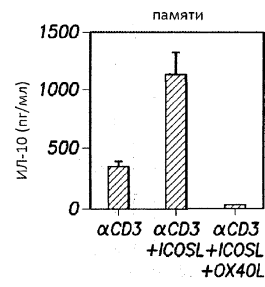
Фиг. 8A



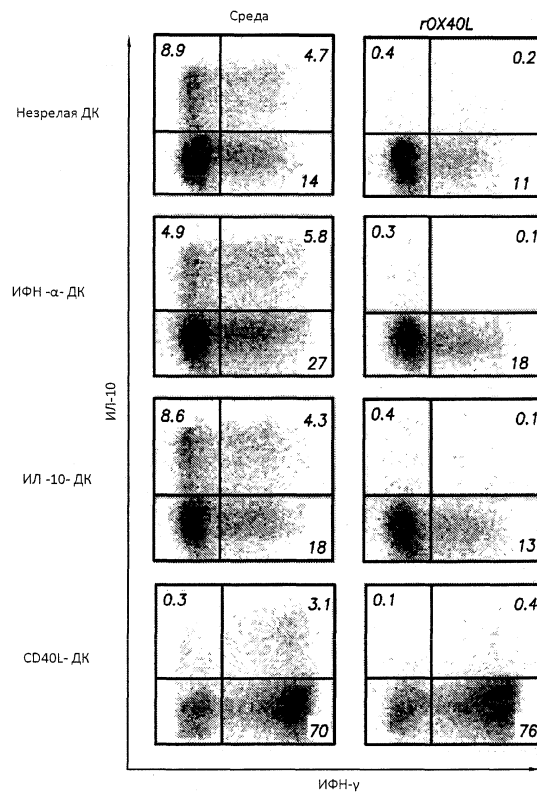
Фиг. 8B



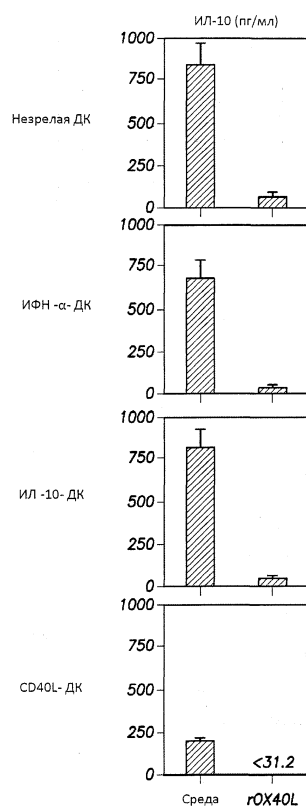
Фиг. 8C



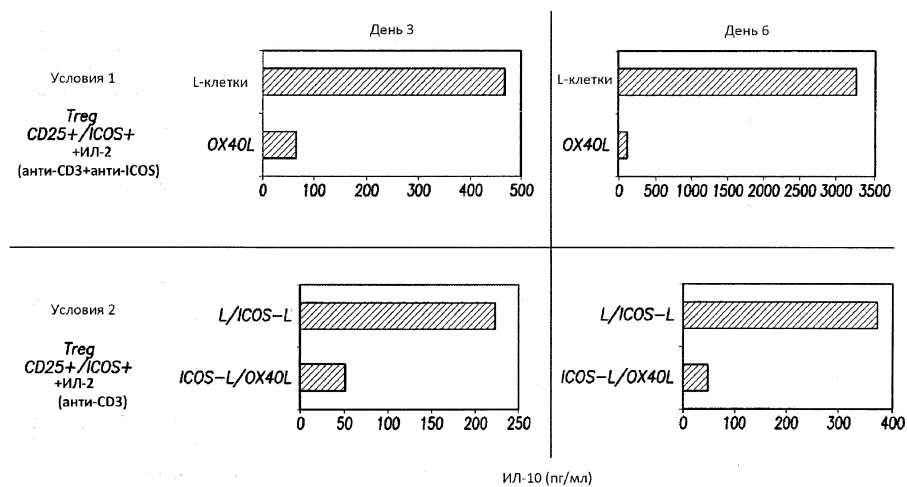
Фиг. 8D



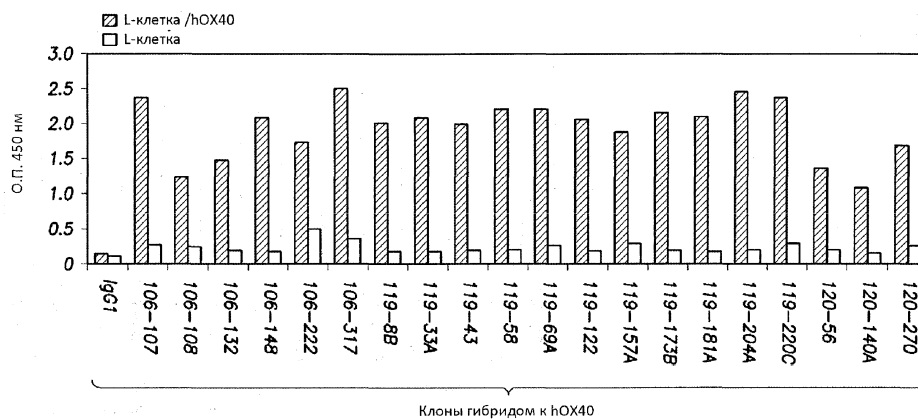
Фиг. 8E



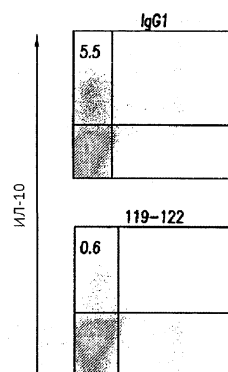
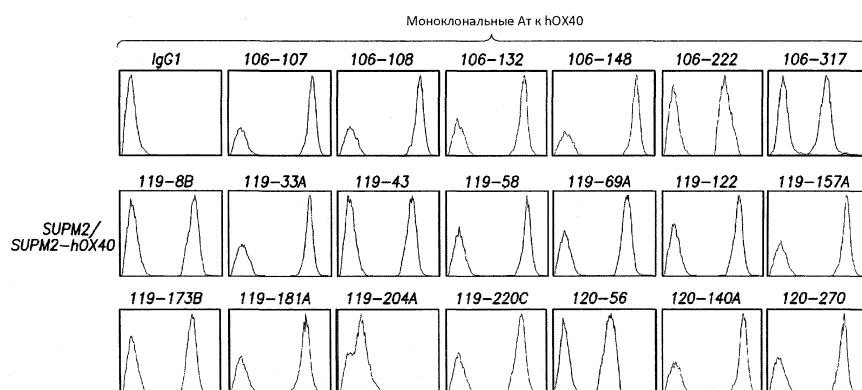
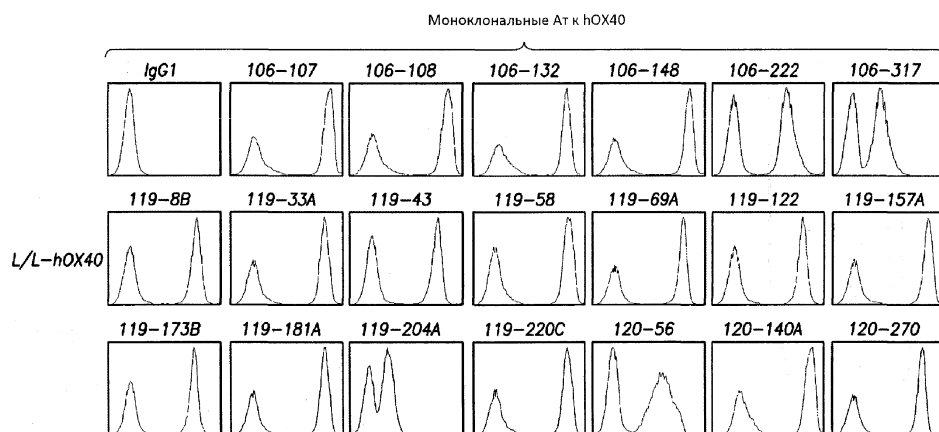
Фиг. 8F

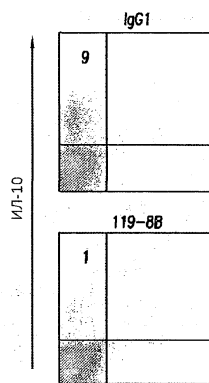
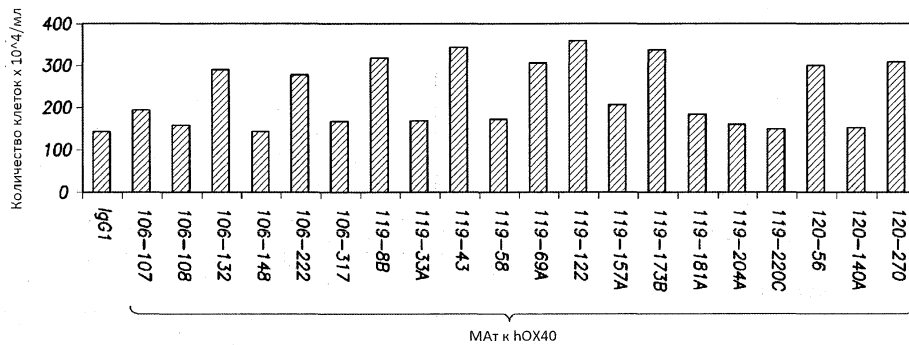
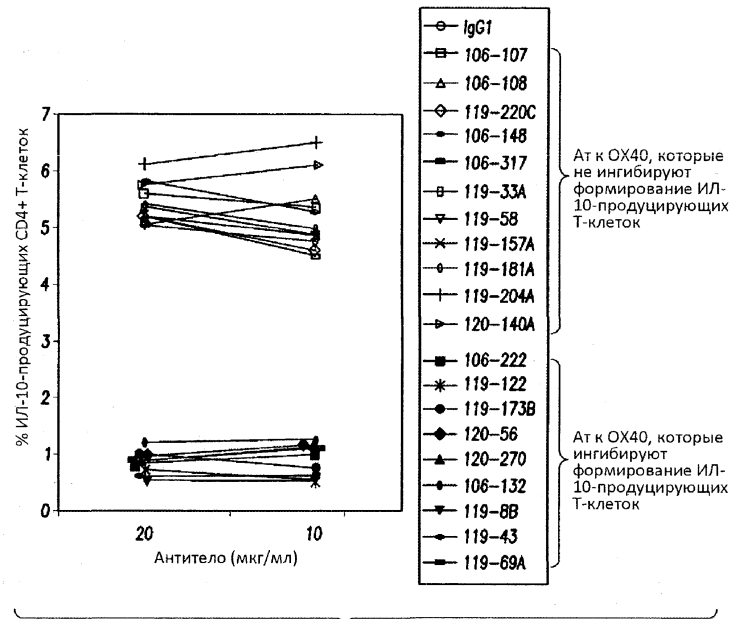


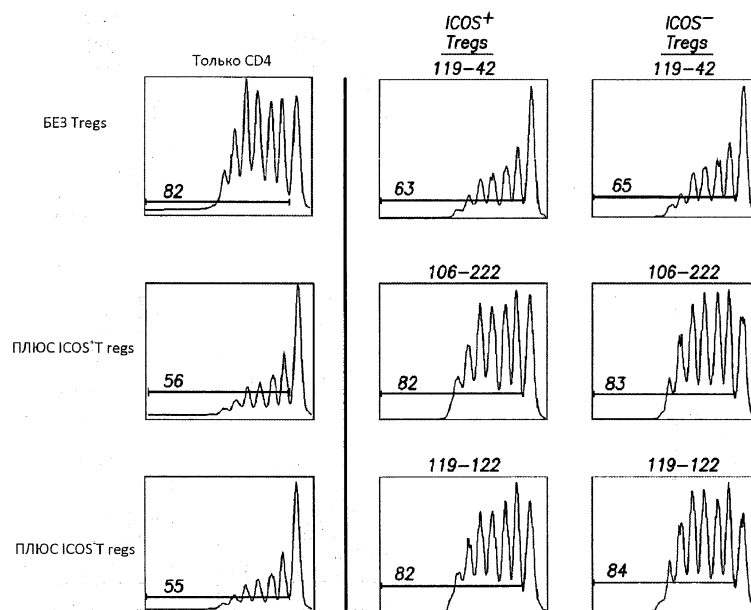
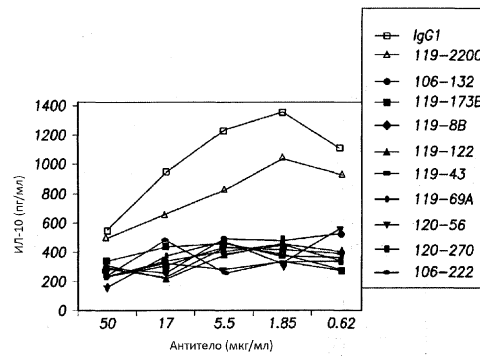
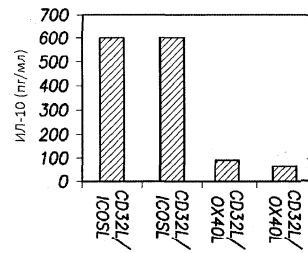
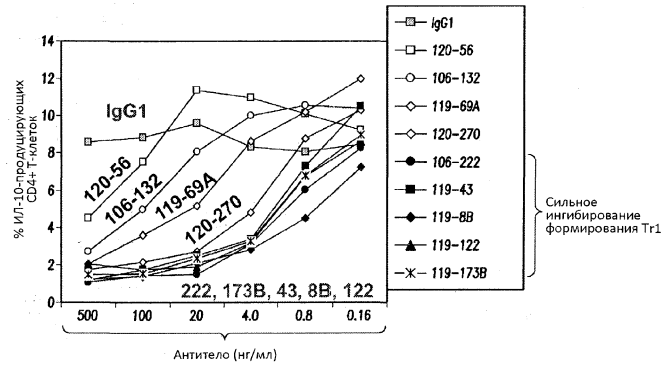
Фиг. 9

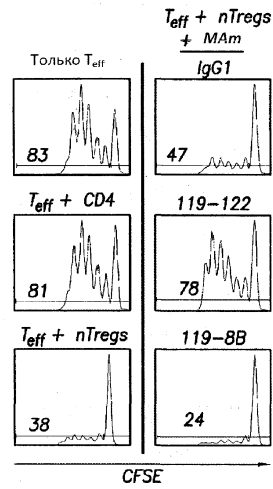


Фиг. 10

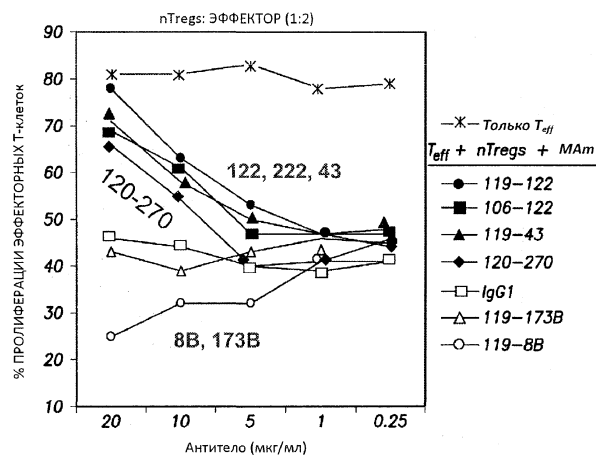




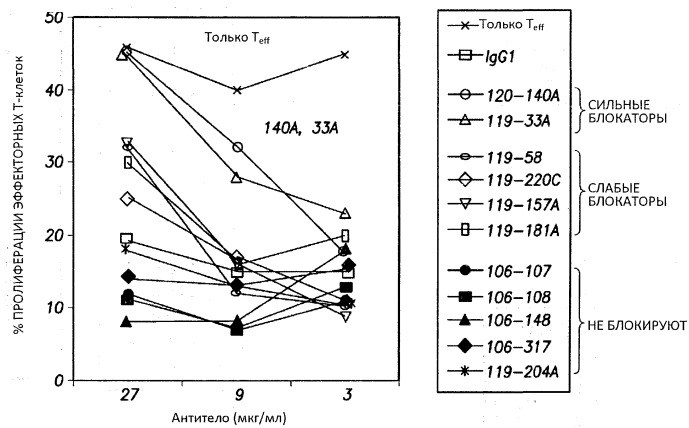




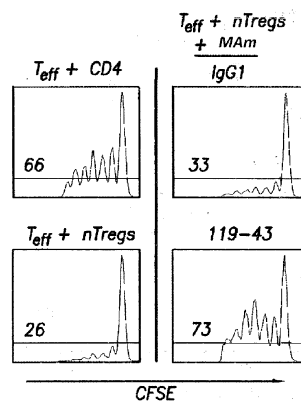
Фиг. 17А



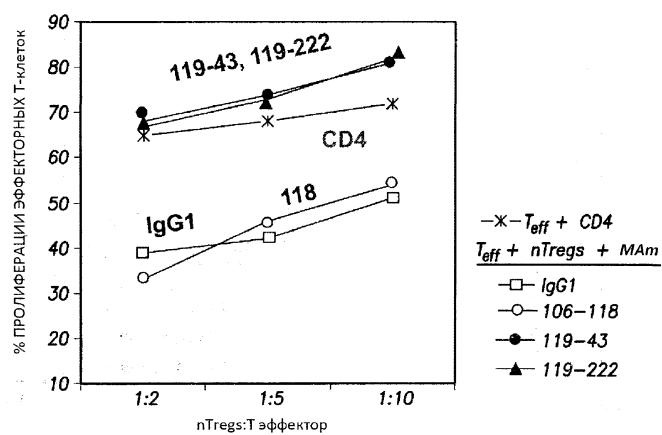
Фиг. 17В



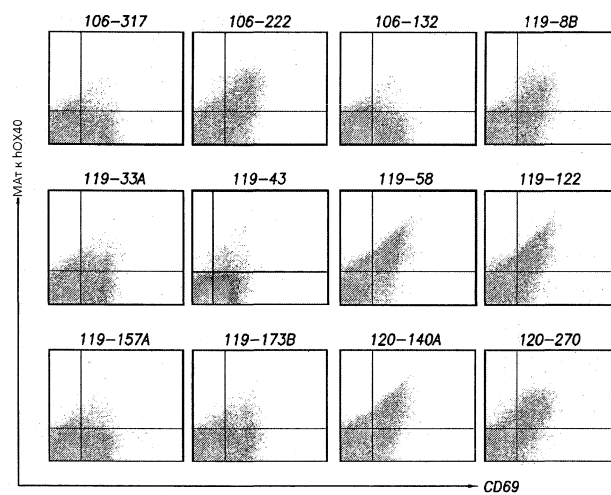
Фиг. 18



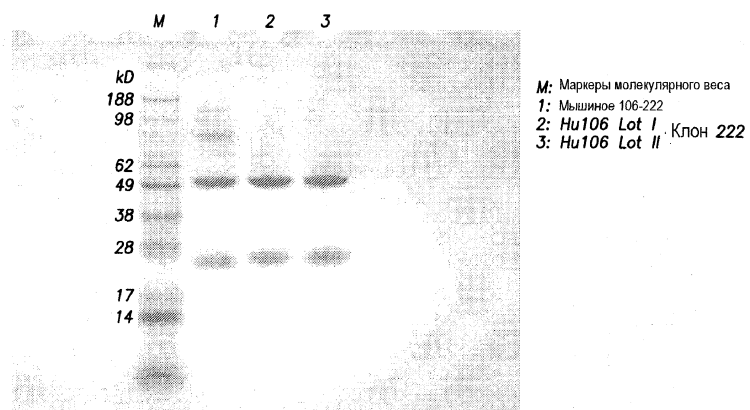
Фиг. 19А



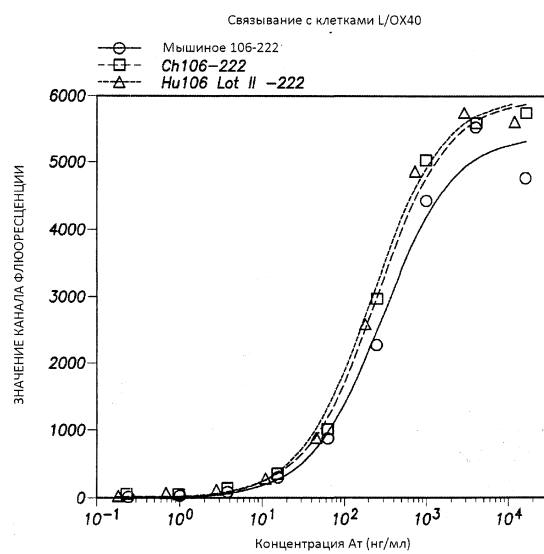
Фиг. 19В



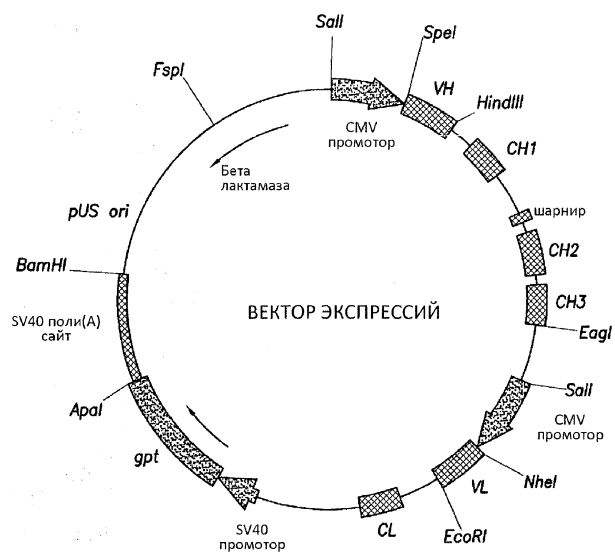
Фиг. 20



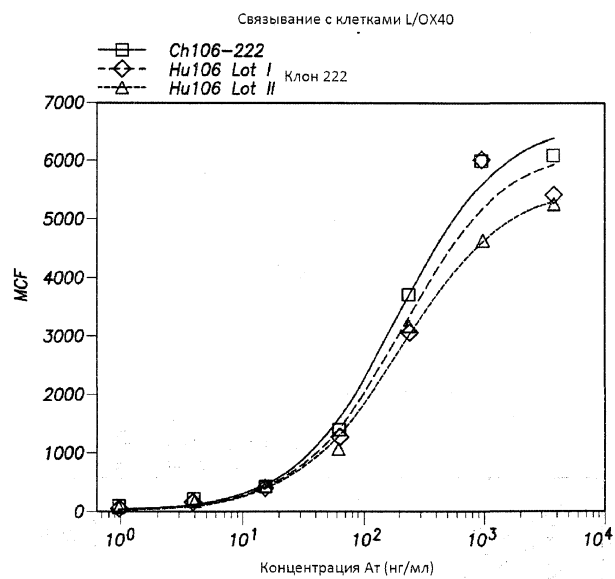
Фиг. 21



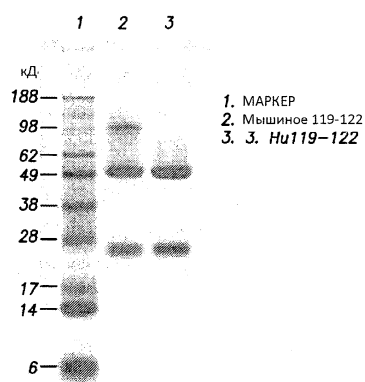
Фиг. 22



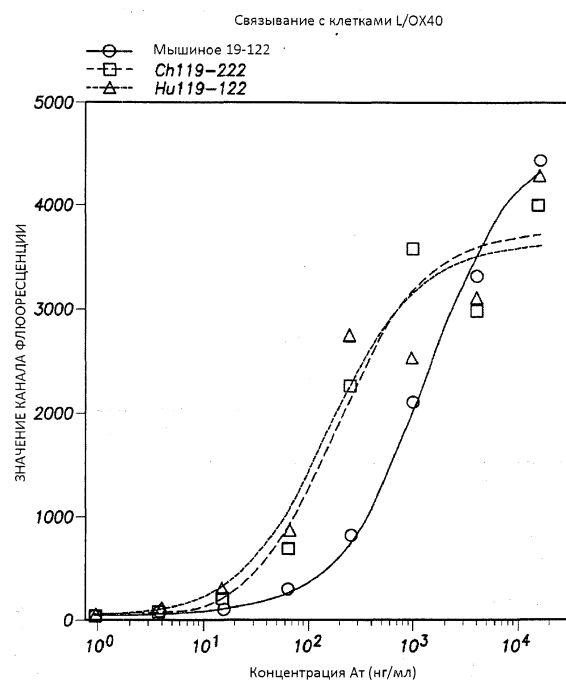
Фиг. 23



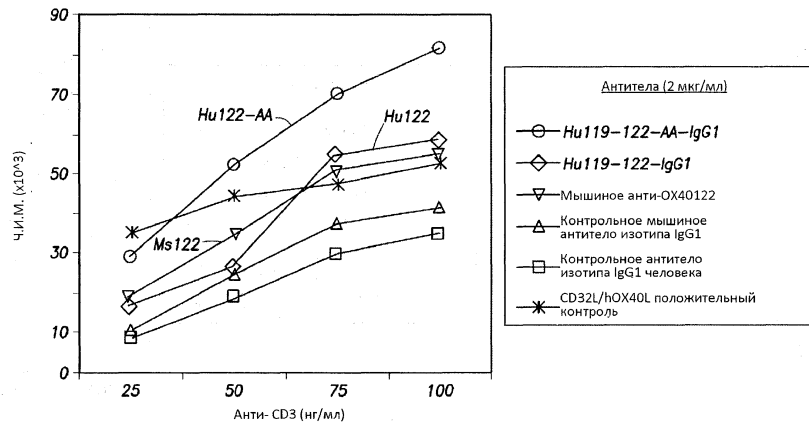
Фиг. 24



Фиг. 25

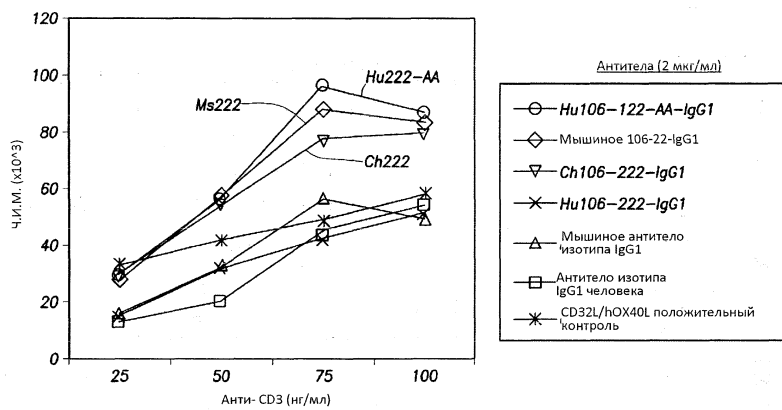


Фиг. 26



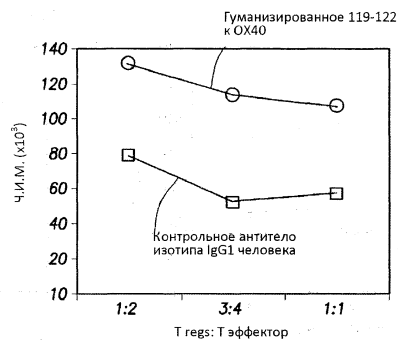
Фиг. 27

L-клеточная система

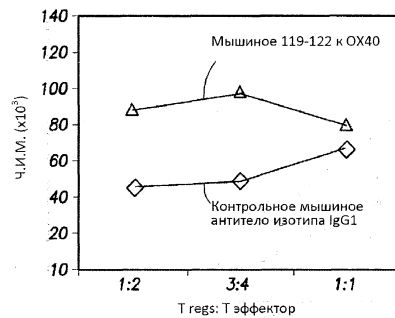


Фиг. 28

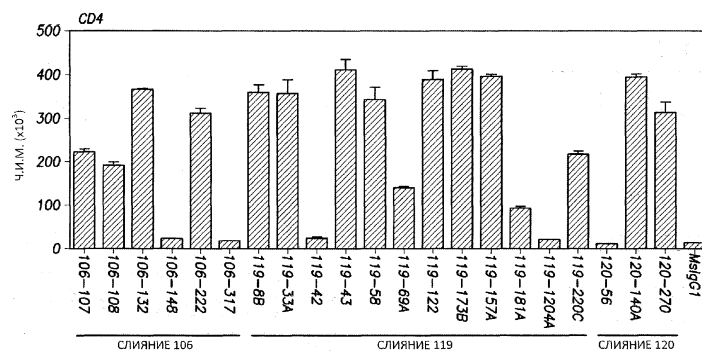
L-клеточная система



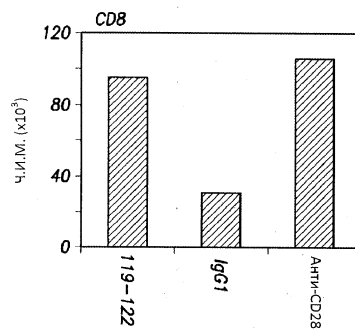
Фиг. 29А



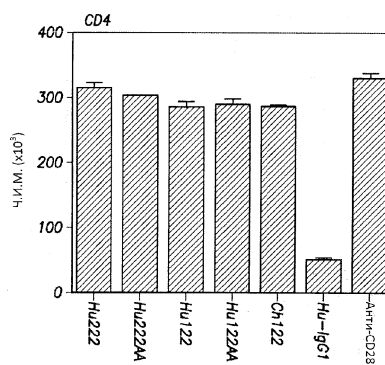
Фиг. 29В



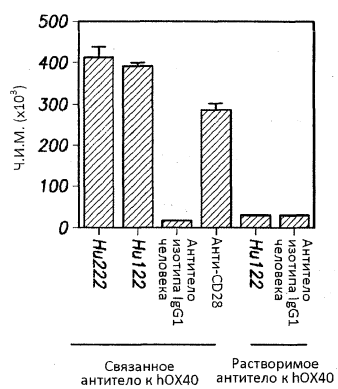
Фиг. 30А



Фиг. 30В

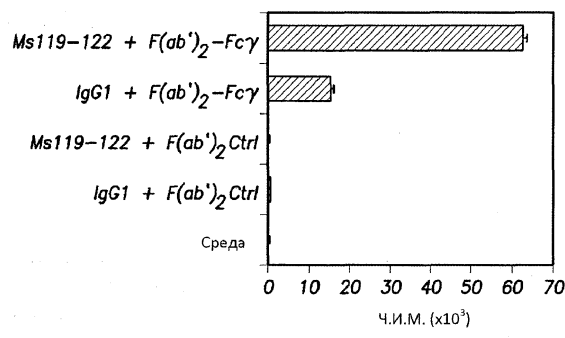


Фиг. 30С

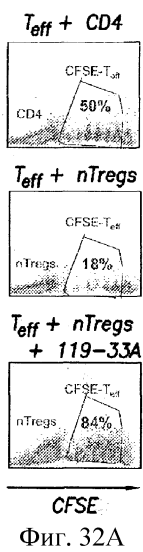


Связанное антитело к hOX40 Растворимое антитело к hOX40

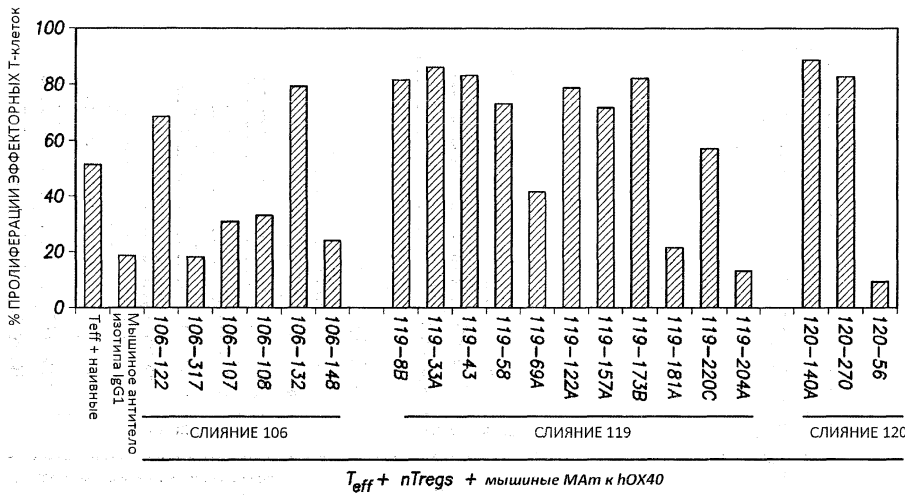
Фиг. 31А



Фиг. 31В

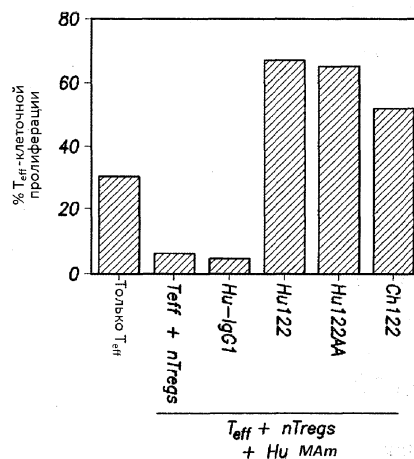


Фиг. 32А

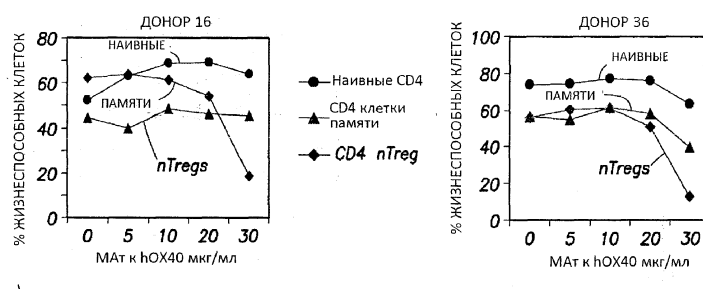


$T_{eff} + nTregs +$ мышные МАп к hOX40

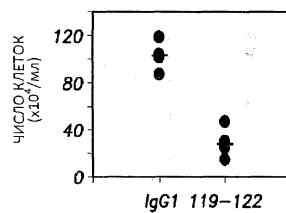
Фиг. 32В



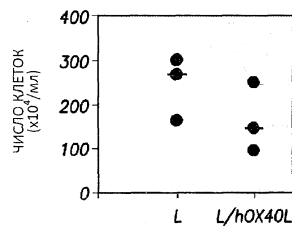
Фиг. 32С



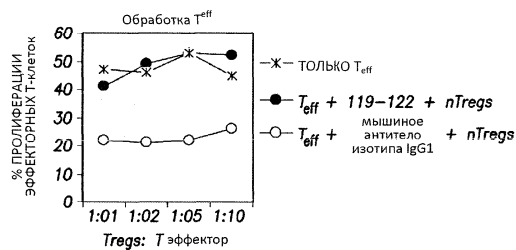
Фиг. 33А



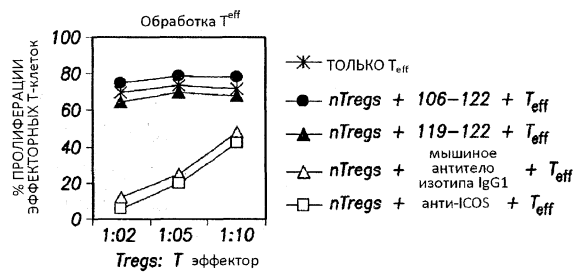
Фиг. 33В



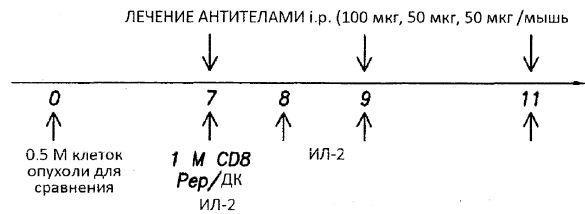
Фиг. 33С



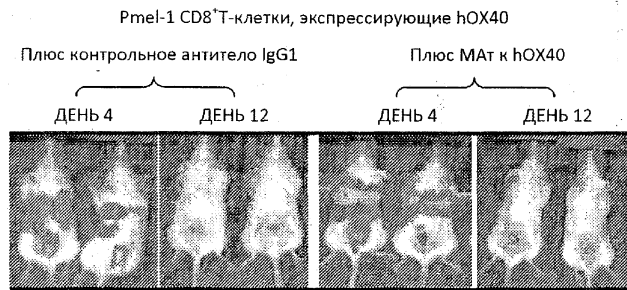
Фиг. 34А



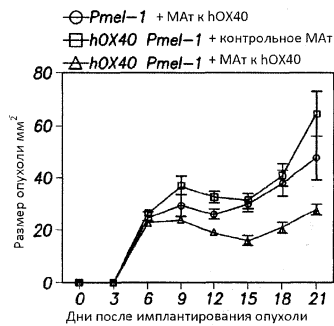
Фиг. 34В



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	0123456789
X61012		QIQLVQSGP	ELKKPGETVK	ISCKASGYTF	TDYSMHVWVK
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYSMHVWRQ
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ

106-222 VH

	4	5	6	7	
Hu106 VH	0123456789	01223456789	0123456789	0123456789	
X61012		APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY
		APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY
		APGQGLEWMG	-----	RFVF	SLDTSVSTAY

106-222 VH

	8	9	1	1	
Hu106 VH	0122223456789	0123456789	000000123456789	0123	
X61012		LQINNLKNETAT	YFCANPYDY	VSYYAMDYWGHTSV	TVSS
		LQISSLKAEDTAV	YFCANPYDY	VSYYAMDYWGHTTV	TVSS
		LQISSLKAEDTAV	YFCAR-----	WGKGTTV	TVSS

CDR1 SEQ ID No.1

CDR2 SEQ ID No.2

CDR3 SEQ ID No.3

Фиг. 36

106-222 VL

CDR1 SEQ ID No.7

1 2 3

123456789 0123456789 0123456789 0123456789

SEQ ID No.10 106-222 VL DIVMTQSHK FMSTSVRDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK

SEQ ID No.11 Hu106 VL DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCKASQDV STAVAWYQQK

AJ388641 DIQMTQSPS SLSASVGDV TITC-----WYQQK

CDR2 SEQ ID No.8

4 5 6 7

0123456789 0123456789 0123456789 0123456789

106-222 VL PGQSPKLLIY SASLYTGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ

Hu106 VL PGKAPKLLIY SASLYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ

AJ388641 PGKAPKLLIY -----GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ

CDR3 SEQ ID No.9

8 9 10

0123456789 0123456789 01234567

106-222 VL AEDLAVYYCQ QHYSTPRTFG GGTGLEIK

Hu106 VL PEDIATYYCQ QHYSTPRTFG QGTGLEIK

AJ388641 PEDIATYYC- -----FG QGTGLEIK

Фиг. 37

Hu106-222 VH

SpeI

SEQ ID No.6 ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT

M A W V W T L L F L M A A A Q S

ATCCAAGCACAGGTTCAAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA

I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S

GTC AAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTG

V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V

CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG

R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E

CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCTTCTCTTTGGACACCTCTGTGAGC

P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S

ACTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT

T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A

AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACACG

N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T

HindIII

GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT

V T V S S

Фиг. 38

Hu106-222 VL

NheI

SEQ ID No.12 GCTAGCACCATGGAGTCACAGATTCAAGTCTTTGTATTCTGTTTCTCTGGTTGTCT

M E S Q I Q V F V F V F L W L S

GGTGTGACGGAGACATTGAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTGGGA

G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT

D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y

CAACAGAAACAGGAAAGCCCTAAACTACTGATTACTCGGCATCCTACCTCTACACT

Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T

GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTTCACCATCAGC

G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S

AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTACTGTGAGCAACATTATAGTACTCCTCGG

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

EcoRI

ACGTTCCGTCAGGGCACCAGCTGGAAATCAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

T F G Q G T K L E I K

Фиг. 39

119-122 VH

		1	2	3	
SEQ ID No.16	119-122 VH	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No.17	Hu119 VH	EVQLVESGG	GLVQPGESLK	LSCESNEYEF	PSHDMSWVRK
	Z14189	EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASEYEF	PSHDMSWVRQ
		EVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF	S-----WVRQ

		4	5	6	7	
		0123456789	01223456789	0123456789	0123456789	
			a			CDR2 SEQ ID No.14
119-122 VH		TPEKRLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFII	SRDNTKKTLY	
Hu119 VH		APGKGLELVA	AINSDGGSTYY	PDTMERRFTI	SRDNAKNSLY	
Z14189		APGKGLEWVA	-----	-----RFTI	SRDNAKNSLY	

		8	9	10	11	
		0122223456789	0123456789	0000123456789	0123	
		abc	abc			CDR3 SEQ ID No.15
119-122 VH		LQMSSLRSEDAL	YYCARHYDDY	YAWFAYWGQGTIV	TVSA	
Hu119 VH		LQMNSLRAEDTAV	YYCARHYDDY	YAWFAYWGQGTIV	TVSS	
Z14189		LQMNSLRAEDTAV	YYCAR-----	-----WGQGTIV	TVSS	

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	YSYMHYQQK
SEQ ID No.23	Hu119 VL	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASKSVSTSG	YSYMHYQQK
	M29469	EIVLTQSPA	TLSLSPGERA	TLSC-----	-----WYQQK

		4	5	6	7	
		0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	
119-122 VL		PGQPPKLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLNHPVE	
Hu119 VL		PGQAPRLLIY	LASNLESGVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISLLE	
M29469		PGQAPRLLIY	-----GVP	ARFSGSGSGT	DFTLTISLLE	

		8	9	10	11	
		0123456789	0123456789	01234567		
119-122 VL		EEDAATYYCQ	HSRELPLTFG	AGTKLELK		
Hu119 VL		PEDFAVYYCQ	HSRELPLTFG	GGTKVEIK		
M29469		PEDFAVYYC-	-----FG	GGTKVEIK		

Фиг. 41

Hu119-122 VH

SpeI

SEQ ID No.18

ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGCTCAGCTTGGTTTTCCTTGCTCTTATTTTAAAAAGT

M D F G L S L V F L V L I L K S

GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC

V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTC

L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V

CGCCAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGC

R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S

ACCTACTATCCAGACACCATGGAGAGACGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC

T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N

TCACTGTACTGCAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGATTACTGTGCA

S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A

AGACACTATGATGATTACTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTATGGTCACT

R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V T

HindIII

GTCTCTCAGGTGAGTCTCAACTTCAAGCTT

V S S

Фиг. 42

119-122 VL
NheI
SEQ ID No.24 GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTC
M E T D T L L L W V L L L W V P

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

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

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

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

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

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

EcoRI
CTGAATTC

Фиг. 43

