

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201400565 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2014.12.30

(22) Дата подачи заявки
2012.11.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ, ИМЕЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОХ40 ЧЕЛОВЕКА

(31) 61/558,545

(32) 2011.11.11

(33) US

(86) PCT/EP2012/072325

(87) WO 2013/068563 2013.05.16

(88) 2013.06.27

(71) Заявитель:

ЮСБ ФАРМА С.А. (BE)

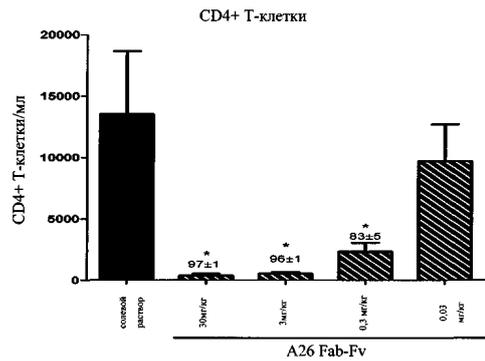
(72) Изобретатель:

Адамс Ралф, Бхатта Паллави, Хейвуд
Сэм Филлип, Хамфриз Дейвид Пол
(GB)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белюсов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам антител, имеющим специфичность в отношении антигенных детерминант ОХ40 человека, способам терапевтического применения молекул антител и способам получения указанных молекул антител.



201400565

A1

A1

201400565

5

10

15

Заявка № 201400565

Заявитель ЮСБ Фарма С.А., ВЕ

МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ, ИМЕЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ
ОХ40 ЧЕЛОВЕКА

20

Настоящее изобретение относится к молекулам антител, имеющим специфичность в отношении антигенных детерминант ОХ40 и к композициям, содержащим таковые. Настоящее изобретение также относится к терапевтическому применению молекул антител, композиций и способам получения указанных молекул антител.

25

ОХ40 (также известный как CD134, TNFRSF4, АСТ35 или TXGP1L) является членом суперсемейства рецепторов TNF, которое включает 4-1BB, CD27, CD30 и CD40. Внеклеточный лиганд-связывающий домен ОХ40, состоит из 3 полных богатых цистеином доменов (CRD) и неполного четвертого С-концевого CRD (Bodmer *et al.*, 2002, Trends Biochem. Sci., 27, 19-26).

30

Лигандом для ОХ40 является ОХ40L, и 3 копии ОХ40 связываются с трехмерным лигандом с образованием комплекса ОХ40-ОХ40L (Compaan and Hymowitz, 2006, Structure, 14, 1321-1330).

ОХ40 является мембраносвязанным рецептором; однако растворимая изоформа также была обнаружена (Taylor and Schwarz, 2001, *J. Immunol. Methods*, 255, 67-72). Функциональное значение растворимой формы в настоящее время неизвестно. ОХ40 не экспрессируется на неактивных Т-клетках, но временно экспрессируется на активированных Т-клетках после связывания Т-клеточного рецептора (TCR). Лиганд для ОХ40, ОХ40L, является членом семейства TNF и экспрессируется на активированных антиген-представляющих клетках (APC), в том числе на В-клетках, макрофагах, эндотелиальных клетках и дендритных клетках (DC).

ОХ40 является одним из основных костимулирующих рецепторов с последующим участием CD28 и ОХ40, необходимым для оптимальной пролиферации и выживания Т-клеток. Связывание ОХ40 на активированных Т-клетках приводит к повышенному производству цитокинов и пролиферации как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток (Gramaglia *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala *et al.*, 2004, *J. Immunol.*, 172, 4821-425), и может вносить вклад в оба происходящих Th1 и Th2 ответа (Gramaglia *et al.*, 1998, *J. Immunol.*, 161, 6510-6517, Arestides *et al.*, 2002, *Eur. J. Immunol.* 32, 2874-2880). Костимуляция ОХ40 увеличивает выживаемость Т-клеток на начальной эффекторной фазе иммунного ответа и увеличивает количество Т-клеток памяти посредством ингибирования гибели эффекторных Т-клеток.

Когда иммунная активация является чрезмерной или неконтролируемой, может возникнуть патологическая аллергия, астма, воспаление, аутоиммунные и другие родственные заболевания. Поскольку ОХ40 действует для повышения иммунного ответа, это может усугубить аутоиммунные и воспалительные заболевания.

Роль взаимодействий ОХ40/ОХ40L в моделях заболевания была продемонстрирована на ОХ40-нокаутных мышах. При экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЕАЕ), модели рассеянного склероза, были отмечены менее тяжелые клинические признаки заболевания и уменьшение воспалительного инфильтрата в ЦНС у ОХ40-нокаутных мышей (Carboni *et al.*, 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). Также ОХ40-нокаутные мыши, примированные и иммунизированные овалбумином, демонстрируют уменьшенное легочное воспаление (80-90% снижение эозинофилии), сниженную

выработку слизи и значительное уменьшение гиперреактивности дыхательных путей (Jember *и соавт.*, 2001, *J. Exp. Med.*, 193, 387-392). Моноклональные антитела к мышинному лиганду ОХ40 показали положительные эффекты при коллаген-индуцированном артрите - модели ревматоидного артрита (Yoshioka *et al.*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815-2823), ЕАЕ (Nohara *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 2108-2115), у не страдающих ожирением диабетических (NOD) мышей (Pakala *et al.*, 2004, *Eur. J. Immunol.*, 34, 3039-3046), при колите у мышей с восстановленными Т-клетками (Malmstrom *et al.*, 2001, *J. Immunol.*, 166, 6972-6981, Totsuka *et al.*, 2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284, G595-G603) и на моделях легочного воспаления (Salek-Ardakani *et al.*, 2003, *J. Exp. Med.*, 198, 315-324, Hoshino *et al.*, 2003, *Eur. J. Immunol.*, 33, 861-869). Антитело к ОХ40L человека было профилировано в модели легочного воспаления у макак-резусов и приводило к снижению уровней IL-5, IL-13 и эффекторных Т-клеток памяти в жидкости бронхоальвеолярного лаважа после иммунизации аллергеном (Seshasayee *et al.*, 2007, *J. Clin. Invest.*, 117, 3868-3878).

Повышение экспрессии ОХ40 было отмечено при некоторых аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Сюда входит увеличение экспрессии ОХ40 на Т-клетках, выделенных из синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом (Brugnoni D. *et al.*, 1998, *Br. J. Rheum.*, 37, 584-585; Yoshioka *et al.*, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815-2823; Giacomelli R. *et al.*, 2001, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 19, 317-320). Аналогично, увеличение экспрессии ОХ40 было отмечено в желудочно-кишечной ткани от пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона (Souza *et al.*, 1999, *Gut*, 45, 856-863; Stuber *et al.*, 2000, *Eur. J. Clin. Invest.*, 30, 594-599) и в местах активного поражения у пациентов с рассеянным склерозом (Carboni *et al.*, 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). ОХ40L также могут быть обнаружены на гладких мышцах дыхательных путей человека (ASM), и клетки ASM больных астмой демонстрируют более сильную воспалительную реакцию на связывание ОХ40L, чем таковые у здоровых доноров, что указывает на роль пути ОХ40/ОХ40L при астме (Burgess *et al.*, 2004, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 683-689; Burgess *et al.*, 2005, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 302-308). Кроме того, было сообщено, что CD4⁺ Т-клетки, выделенные из периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (SLE), экспрессируют повышенные уровни ОХ40, которые связаны с

активностью заболевания (Patschan *et al.*, 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242).

Учитывая роль OX40 в аллергии, астме и заболеваниях, связанных с аутоиммунитетом и воспалением, один из подходов к терапии при этих
5 заболеваниях состоит в блокировании OX40-OX40L сигналинга с применением антител к OX40L или антагонистических антител к OX40.

Антитела к OX40L были описаны, см., например, WO2006/029879.

Были описаны многочисленные агонистические антитела к OX40, но известны лишь немногие антагонистические антитела к OX40. Было получено
10 поликлональное антитело кролика к OX40 мыши, Stuber *et al.*, 1996, J. Exp. Med, 183, 979-989, оно блокирует взаимодействие между OX40 и OX40L. Были созданы моноклональные антитела 131 и 315 мыши, которые связывают OX40 человека, Imura *et al.*, 1996, J. Exp. Med, 2185-2195.

Полные антагонистические антитела человека были описаны в
15 WO2007/062245, самой высокой аффинностью этих антител была аффинность в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 (активированные Т-клетки), которая 11 нМ.

Гуманизированные антагонистические антитела были описаны в
20 WO2008/106116, и антитело с лучшей аффинностью в отношении OX40 имело аффинность 0,94 нМ.

Были описаны другие антитела к OX40, в том числе L106 мыши (патент США № 6277962) и АСТ35 мыши, коммерчески доступное от eBioscience.

Ранее были описаны высокоаффинные антагонистические антитела к OX40 в международной заявке на патент с номером WO2010/096418.

25 Также ранее в международной заявке на патент с номером WO2010/035012 была описана новая слитая молекула мультиспецифического антитела, упоминаемая в дальнейшем как Fab-dsFv и проиллюстрированная в данном документе на Фигуре 1. Эта же заявка обеспечивает полезные переменные области связывания альбумина, которые могут быть использованы для
30 продления периода полураспада молекулы.

В настоящем изобретении эти альбумин-связывающие переменные области были усовершенствованы и объединены в формате Fab-dsFv с антителами к OX40, описанными в WO2010/096418. Новая биспецифическая

молекула по настоящему изобретению имеет улучшенную эффективность в ряде анализов *in vitro* и *in vivo*, описанных в данном документе, по сравнению с молекулой Fab'-PEG, ранее описанной в WO2010/096418. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает слитый белок биспецифического антитела, который связывает одновременно OX40 человека и сывороточный альбумин человека, который пригоден для применения в лечении или профилактике патологических нарушений, опосредованных OX40 или связанных с повышенным уровнем OX40.

Краткое описание графических материалов

10 На Фигуре 1 показано слитое биспецифическое антитело по настоящему изобретению (формат Fab-dsFv).

На Фигурах 2-8 показаны определенные последовательности аминокислот или ДНК, относящиеся к антителу согласно настоящему раскрытию.

15 На Фигуре 9а показано связывание A26 Fab-dsFv, меченого AlexaFluor 488, с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека.

На Фигуре 9b показано связывание A26Fab', Fab-Fv A26 и A26 Fab'-PEG в присутствии 5% HSA на активированных CD4⁺, OX40⁺ Т-клетках человека.

20 На Фигуре 10а показан эффект A26 Fab-dsFv на выработку цитокинов в PBMC, подвергнутых действию аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*.

На Фигуре 10b показана способность A26 Fab-dsFv ингибировать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели мышей Hu-NSG.

На Фигуре 11а показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺ OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26 Fab-dsFv.

25 На Фигуре 11b показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺ OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26Fab', A26 Fab-dsFv, A26 Fab'-PEG и двух контролей.

На Фигуре 12а показано, что A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов (MLR) человека.

30 На Фигуре 12b показано, что A26 Fab-Fv ингибирует выработку IFN-гамма во время MLR человека.

На Фигуре 13 показано, что A26 Fab-Fv снижает процент активированных (CD25⁺) CD4⁺ Т-клеток после вторичной рестимуляции антигеном с помощью аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*.

5 На Фигуре 14 показано, что Fab-Fv и Fab-PEG, введенные до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибируют пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели Hu-NSG.

Гуманизированное антитело к OX40 CA044_00026 упоминается в данном документе как A26.

10 Слитая молекула антитела по настоящему изобретению, упомянутая в данном документе как Fab-dsFv, проиллюстрирована на Фигуре 1. В настоящем изобретении Fab-фрагмент (содержащий первые переменные области тяжелой и легкой цепей и константные домены) связывается с OX40 человека, а dsFv-фрагмент (содержащий вторые переменные области тяжелой и легкой цепей, соединенные дисульфидной связью) связывается с сывороточным альбумином человека. В частности, Fab-фрагмент содержит CDR, полученные из
15 антагонистического антитела к OX40, а Fv-фрагмент содержит переменные области тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела к альбумину, и эти альбумин-связывающие переменные области соединены дисульфидной связью.

20 Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает слитый белок биспецифического антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащий:

тяжелую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}), CH1-домен, и второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}),

25 легкую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_{L1}), CL-домен, и второй переменный домен легкой цепи (V_{L2}),

30 где указанная тяжелая и легкая цепи выровнены таким образом, что V_{H1} и V_{L1} образуют первый антиген-связывающий центр, а V_{H2} и V_{L2} образуют второй антиген-связывающий центр,

где антигеном, связываемым первым антиген-связывающим центром, является OX40 человека, а антигеном, связываемым вторым антиген-связывающим центром, является сывороточный альбумин человека, в частности

где первый переменный домен тяжелой цепи (V_H1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1, для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2, для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3, для CDR-H3, и первый
5 переменный домен легкой цепи (V_L1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4, для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, для CDR-L3,

где второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) имеет
10 последовательность, приведенную в SEQ ID NO:11, и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:12, и

второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) соединены дисульфидной связью.

15 Остатки в переменных доменах антитела условно пронумерованы согласно системе, разработанной Kabat *et al.* Эта система изложена в Kabat *et al.*, 1987, в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Kabat *et al.* (выше)"). Эта система нумерации используется в настоящем описании, если не указано иное.

20 Обозначения остатков по Kabat не всегда непосредственно соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, чем в строгой нумерации Kabat, соответствующие укорачиванию или вставке в структурный компонент, будь то
25 каркасный или гиперпеременный участок (CDR) основной структуры переменного домена. Правильная нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания остатков по гомологии в последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat.

30 CDR переменного домена тяжелой цепи расположены в положении остатков 31-35 (CDR-H1), остатков 50-65 (CDR-H2) и остатков 95-102 (CDR-H3) согласно системе нумерации Kabat. Тем не менее, согласно Chothia (Chothia C. and Lesk A.M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)) петля, эквивалентная CDR-H1,

простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, "CDR-H1", использованное в данном документе, предназначено для обозначения остатков с 26 по 35, как описано при сочетании системы нумерации Kabat и топологического определения петли по Chothia.

5 CDR переменного домена легкой цепи расположены в положении остатков 24-34 (CDR-L1), остатков 50-56 (CDR-L2) и остатков 89-97 (CDR-L3) согласно системе нумерации Kabat.

Биспецифический слитый белок по настоящему изобретению содержит Fab-фрагмент антагонистического антитела к OX40, ранее описанного в
10 WO2010/096418. Используемый в данном документе термин "антагонистический" описывает слитый белок антитела, который способен ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность OX40, например, блокируя связывание или существенно уменьшая связывание OX40 с лигандом OX40 и, таким образом, ингибируя активацию OX40.

15 Скрининг антител для выявления тех, которые связываются с OX40, можно выполнить с использованием анализов для измерения связывания с OX40 человека и/или анализов для измерения способности блокировать связывание OX40 с его лигандом, OX40L. Примером анализа на основе связывания является ELISA, в частности, с использованием слитого белка OX40 человека и Fc
20 человека, который иммобилизуют на планшетах, и использованием конъюгированного вторичного антитела для обнаружения антитела к OX40, связанного со слитым белком. Примером анализа на основе блокирования является анализ на основе проточной цитометрии с измерением блокирования связывания слитого белка OX40-лиганда с OX40 на CD4 клетках человека.
25 Флуоресцентно меченое вторичное антитело используют для обнаружения количества связывания слитого белка OX40-лиганда с клеткой. Этот анализ ищет снижение сигнала, поскольку антитело в супернатанте блокирует связывание слитого белка лиганда с OX40. Еще одним примером блокирующего анализа является анализ, где блокирование активации наивных Т-клеток человека, опосредованное слитым белком OX40-лиганда, нанесенного на планшет,
30 измеряют путем измерения включения меченого тритием тимидина.

В настоящем изобретении переменные области являются гуманизированными. Гуманизированные антитела (которые включают CDR-

привитые антитела) являются молекулами антител, имеющими один или несколько гипервариабельных участков (CDR) от видов за исключением человека и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, патент США № 5585089; WO91/09967). Следует иметь в виду, что может быть необходимым перенести только определяющие специфичность остатки CDR, а не весь CDR (см., например, Kashmiri *et al.*, 2005, *Methods*, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут факультативно дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков, полученных от видов за исключением человека, от которых были получены CDR.

10 В настоящем изобретении CDR из V_{H1} и V_{L1} получены из антитела, известного как A26, описанного в WO2010/096418. Соответственно, в слитом белке биспецифического антитела по настоящему изобретению первый вариабельный домен тяжелой цепи (V_{H1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1, для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:23, для CDR-H2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3, для CDR-H3 и первый вариабельный домен легкой цепи (V_{L1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:24, для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, для CDR-L2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, для CDR-L3.

20 Следует иметь в виду, что замены одной или нескольких аминокислот, добавления и/или делеции могут быть сделаны в CDR, обеспеченных настоящим изобретением, без значительного изменения способности антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных замен, добавлений и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с использованием способов, описанных в WO2010/096418, для определения связывания OX40 и ингибирования взаимодействия OX40/OX40L. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает биспецифическое антитело, имеющее специфичность в отношении OX40 человека, содержащее CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) и CDRL-3 (SEQ ID NO:6), как показано на Фигуре 2(с), например, в котором одна или несколько аминокислот, например 1 или 2 аминокислоты, в одном или

нескольких из CDR, была заменена другой аминокислотой, такой как сходная аминокислота, определенная в данном документе ниже.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где первый переменный домен тяжелой цепи содержит три CDR, где последовательность CDRH-1 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:1, CDRH-2 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:2, и/или CDRH-3 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:3. В другом варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит три CDR, где последовательность CDRH-1 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:1, CDRH-2 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:2, и/или CDRH-3 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:3.

"Идентичность", использованная в данном документе, означает, что в любом конкретном положении в выравниваемых последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. "Сходство", использованное в данном документе, означает, что в любом конкретном положении в выравниваемых последовательностях аминокислотный остаток является остатком аналогичного типа между последовательностями. Например, лейцин может быть заменен на изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены друг на друга, включают, но без ограничения:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспаргат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);

- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи);

и

- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи). Степень идентичности и сходства могут быть легко рассчитаны

5 (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence
10 Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программное обеспечение BLAST™, доступное от NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang J. & Madden, T.L. 1997, Genome
15 Res. 7:649-656).

В другом варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит легкую цепь, где первый
вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, где последовательность
20 CDRL-1 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:4, CDRL-2 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5, и/или CDRL-3 имеет по меньшей мере 90% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:6. В другом
25 варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, где последовательность CDRL-1 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:4, CDRL-2 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:5,
30 и/или CDRL-3 имеет по меньшей мере 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:6.

В одном варианте осуществления Fab-фрагмент слитого белка биспецифического антитела, обеспеченный по настоящему изобретению,

является гуманизированной или CDR-привитой молекулой антитела, содержащей один или несколько из CDR, представленных в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и/или 6 (Фигура 2(с)) или их варианты. Используемый в данном документе термин “молекула CDR-привитого антитела” относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит один или несколько CDR (в том числе, если необходимо, один или несколько модифицированных CDR) из донорного антитела (например, моноклонального антитела мыши), привитые на каркас варибельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, антитела человека). В качестве обзора см. Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном варианте осуществления вместо переноса полного CDR только один или несколько из определяющих специфичность остатков из любого из CDR, описанных в данном документе выше, переносят на каркас антитела человека (см., например, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). В одном варианте осуществления только определяющие специфичность остатки из одного или нескольких CDR, описанных в данном документе выше, переносят на каркас антитела человека. В другом варианте осуществления только определяющие специфичность остатки из каждого из CDR, описанных в данном документе выше, переносят на каркас антитела человека.

Если CDR или определяющие специфичность остатки привиты, может быть использована любая приемлемая акцепторная последовательность каркаса варибельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены CDR, в том числе каркасные области мыши, примата и человека. Соответственно, CDR-привитое антитело согласно настоящему изобретению имеет варибельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также один или несколько CDR или определяющих специфичность остатков, описанных выше. Таким образом, в одном варианте осуществления представлено нейтрализующее CDR-привитое антитело, в котором варибельный домен содержит акцепторные каркасные области человека и донорские CDR, полученные не от человека.

Примерами каркасов человека, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat *et al.*, *выше*). Например, KOL и NEWM могут быть использованы для

тяжелой цепи, REI может быть использован для легкой цепи и EU, LAY и POM могут быть использованы как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи.

Альтернативно, могут быть использованы последовательности зародышевого типа человека; они доступны по адресу: <http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>

5 В CDR-привитом антителе по настоящему изобретению акцепторные тяжелые и легкие цепи не обязательно должны быть получены из того же антитела и могут, если необходимо, содержать составные цепи, имеющие каркасные области, полученные из разных цепей.

10 Подходящую каркасную область для первого переменного домена тяжелой цепи (VH1) настоящего изобретения получают из последовательности 1-3 3-07 подгруппы VH3 человека вместе с JH4. Подходящую каркасную область легкой цепи для первого переменного домена легкой цепи (VL1) получают из последовательности 2-1 1-02 подгруппы VK1 зародышевого типа человека вместе с JK4.

15 Кроме того, в переменной области CDR-привитого антитела по настоящему изобретению каркасные области не должны иметь точно ту же последовательность, что и у акцепторного антитела. Например, редкие остатки могут быть изменены на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа цепи акцептора. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных
20 каркасных областях могут быть изменены таким образом, чтобы они соответствовали остатку, обнаруженному в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения должны быть сведены к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных
25 каркасных областях, которые могут нуждаться в замене, изложен в WO 91/09967.

Соответственно, в первой переменной области тяжелой цепи (VH1) по настоящему изобретению, если акцепторная тяжелая цепь имеет последовательность 1-3 3-07 VH3 человека вместе с JH4, то акцепторные
30 каркасные области тяжелой цепи содержат в дополнение к одному или нескольким донорским CDR, донорский остаток в по меньшей мере одном из положений 37, 73, 78 или 94 (в соответствии с Kabat *et al.*, (выше)). Соответственно, обеспечивается слитый белок биспецифического антитела, где

по меньшей мере остатки в положениях 37, 73, 78 и 94 первого переменного домена тяжелой цепи являются донорскими остатками.

Соответственно, в первой переменной области легкой цепи (VL1) по настоящему изобретению, если акцепторная легкая цепь имеет последовательность 2-1 1-02 подгруппы VK1 человека вместе с JK4, то акцепторные каркасные области легкой цепи содержат в дополнение к одному или нескольким донорским CDR донорский остаток в по меньшей мере одном из положений 64 или 71. Соответственно, обеспечивается слитый белок биспецифического антитела, в котором по меньшей мере остатки в положениях 64 и 71 первого переменного домена легкой цепи являются донорскими остатками.

Донорские остатки являются остатками из донорного антитела, то есть антитела, из которого были первоначально получены CDR.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:8 Фигуры 2 (b).

Следует понимать, что по одной или более аминокислотам, например, 1 или 2 аминокислотам, замены, добавления и/или делеции могут быть сделаны в первых переменных доменах тяжелой и легкой цепей, обеспеченных настоящим изобретением, без значительного изменения способности слитого белка антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных замен, добавлений и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с применением способов, описанных в WO2010/096418, для определения связывания с OX40 и блокирования лиганда.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где первый переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:8 Фигуры 2(b). В одном варианте осуществления слитый белок антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь (V_{H1}), где первый переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по

меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи (VL1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7 Фигуры 2 (а).

В другом варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления слитый белок антитела по настоящему изобретению содержит легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:7.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:8 и легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи (VL1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения слитый белок антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где первый вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичность или сходство с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:8, и первый вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичность или сходство с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:7. Соответственно, слитый белок антитела содержит тяжелую цепь, где первый вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:8, и легкую цепь, где первый вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%,

80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:7.

5 В слитом белке биспецифического антитела по настоящему изобретению тяжелая цепь содержит CH1-домен и легкая цепь содержит CL-домен, каппа или лямбда.

В одном варианте осуществления слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:10, и легкую цепь, где легкая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:9.

10 Следует понимать, что по одной или более аминокислотам, например, 1 или 2 аминокислотам, замены, добавления и/или делеции могут быть сделаны в переменных и/или константных доменах антитела, обеспеченных настоящим изобретением, без значительного изменения способности антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных

15 замен, добавлений и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с применением способов, описанных в WO2010/096418, для определения связывания с OX40 и блокирования взаимодействия OX40/OX40L.

20 В одном варианте осуществления настоящего изобретения слитый белок антитела содержит тяжелую цепь, где VH1 и CH1 домены тяжелой цепи содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:10.

Соответственно, слитое антитело содержит тяжелую цепь, где VH1- и CH1- домены тяжелой цепи содержат последовательность, имеющую по меньшей мере

25 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:10.

В одном варианте осуществления слитая молекула биспецифического антитела согласно настоящему изобретению содержит легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO:9 Фигуры 2(d).

30 В одном варианте осуществления настоящего изобретения слитый белок антитела содержит легкую цепь, где VL1- и CH1- домены легкой цепи содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 9. Например,

слитый белок антитела содержит легкую цепь, где V_L1 - и CL-домены легкой цепи содержат последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:9.

5 Вторым антигеном, связываемым слитым белком биспецифического антитела по настоящему изобретению, является сывороточный альбумин человека. С ним связывается Fv-фрагмент из Fab-dsFv, который составлен из вторых переменных доменов тяжелой и легкой цепи, V_H2 и V_L2 . В настоящем изобретении V_H2 и V_L2 получены из одного из антител, описанных в
10 WO2010/035012, и представляют собой улучшенный, более гуманизированный трансплантат этого антитела.

В одном варианте осуществления второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:11 Фигуры 3(a).

15 В одном варианте осуществления второй переменный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:12 Фигуры 3(b).

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает слитый белок биспецифического антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащий:

20 тяжелую цепь, содержащую в последовательности с N- конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_H1), CH1-домен, и второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2),

легкую цепь, содержащую в последовательности с N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_L1), CL-домен, и второй переменный
25 домен легкой цепи (V_L2),

где указанные тяжелая и легкая цепи выровнены таким образом, что V_H1 и V_L1 образуют первый антиген-связывающий центр и V_H2 и V_L2 образуют второй антиген-связывающий центр,

30 где антигеном, связываемым первым антиген-связывающим центром, является OX40 человека, а антигеном, связываемым вторым антиген-связывающим центром, является сывороточный альбумин человека,

где первый переменный домен тяжелой цепи (V_H1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1, для CDR-H1,

последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2, для CDR-H2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3, для CDR- H3, и первый переменный домен легкой цепи (V_L1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4, для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5, для CDR-L2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, для CDR-L3,

где второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:11, и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:12, и

второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) связаны дисульфидной связью.

Предпочтительно, CH1-домен и второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) соединены посредством линкера, и CL-домен и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) соединены посредством линкера. Любая подходящая последовательность пептидного линкера может быть использована, и они могут быть одинаковыми в каждой цепи или различными. Подходящие линкеры ранее были описаны в WO2010/035012 и включены в данный документ с помощью ссылки. Примеры подходящих линкеров показаны в Фигуре 3(c) и (d). В одном варианте осуществления линкер между CH1-доменом и вторым переменным доменом тяжелой цепи (V_H2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:13 Фигуры 3 (c), или состоит из таковой. В одном варианте осуществления линкер между CH1-доменом и вторым переменным доменом тяжелой цепи (V_H2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:14 Фигуры 3(c), или состоит из таковой. В одном варианте осуществления линкер между CL-доменом и вторым переменным доменом легкой цепи (V_L2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:14 Фигуры 3(d), или состоит из таковой.

В одном варианте осуществления линкером в легкой цепи является последовательность из 15 аминокислот, в частности, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:29).

В одном варианте осуществления линкером в тяжелой цепи является последовательность из 16 аминокислот, в частности, SGGGSGGGGTGGGGS (SEQ ID NO:30).

5 В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает слитый белок биспецифического антитела, в котором тяжелая цепь содержит последовательность, приведенную на Фигуре 3(e) (SEQ ID NO:15), или состоит из таковой, а легкая цепь содержит последовательность, приведенную на Фигуре 3(f) (SEQ ID NO:16), или состоит из таковой.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения слитый белок биспецифического антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:15, и легкая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 16. Как правило, слитое антитело содержит тяжелую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:15, и легкую цепь, где легкая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 98% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO:16.

25 Слитые молекулы антитела по настоящему изобретению соответственно имеют высокую аффинность связывания, в частности, пикомолярную аффинность в отношении OX40 человека и наномолярную аффинность в отношении сывороточного альбумина человека. Аффинность может быть измерена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники, включая поверхностный плазмонный резонанс, например, BIAcore™, как описано для OX40 в WO2010096418 и сывороточного альбумина в WO2010/035012, с применением выделенного природного или рекомбинантного OX40 или сывороточного альбумина или подходящего слитого белка/полипептида.

30 В одном примере аффинность измеряют с использованием внеклеточного домена рекомбинантного OX40 человека как описано в WO2010/096418. В одном примере использованный внеклеточный домен рекомбинантного OX40 человека

представляет собой димер, например, слитый димер Fc. Соответственно, слитые молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания выделенного OX40 человека около 200 пМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 100 пМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 50 пМ или менее. В одном варианте осуществления слитая молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 40 пМ или менее.

10 Слитые молекулы антитела по настоящему изобретению соответственно имеют высокую аффинность связывания в отношении OX40 человека, экспрессированного на поверхности активированных Т-клеток, например, наномолярную или пикомолярную аффинность. Аффинность может быть измерена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники, в том числе способом, описанным в WO2010096418, с применением активированных CD4⁺ OX40⁺ Т-клеток человека. В частности, слитые молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 человека около 2 нМ или более. В одном примере молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 человека около 1 нМ или более. В другом примере молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 человека около 0,5 нМ или более. В другом примере молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания для экспрессированного на клеточной поверхности OX40 человека около 0,2 нМ или более.

Соответственно, слитые молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении выделенного сывороточного альбумина человека около 50 нМ или менее. Соответственно, слитые молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении выделенного сывороточного альбумина человека около 20 нМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему

изобретению имеет аффинность связывания около 10 нМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 5 нМ или менее. В одном варианте осуществления слитая молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания около 2 нМ или менее.

Слитые молекулы антитела по настоящему изобретению могут связываться с сывороточным альбумином человека и сывороточным альбумином яванского макака, мыши и крысы. В одном варианте осуществления слитый белок антитела по настоящему изобретению связывается с сывороточным альбумином яванского макака с аффинностью 5 нМ или менее. В одном варианте осуществления слитый белок антитела по настоящему изобретению связывается с сывороточный альбумин мыши с аффинностью 5 нМ или менее.

Слитые молекулы антитела по настоящему изобретению способны связываться с ОХ40 человека и сывороточным альбумином человека одновременно.

Преимущественно, слитые молекулы по настоящему изобретению имеют высокую аффинность в отношении ОХ40 и также имеют достаточный период полураспада *in vivo* для того, чтобы быть терапевтически пригодным, например, период полураспада варьирует в диапазоне 5-15 дней, например, 7-11 дней.

Следует иметь в виду, что аффинность слитого белка антитела, обеспеченного настоящим изобретением, к ОХ40 человека и/или сывороточному альбумину человека может быть изменена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники. Поэтому настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антитела по настоящему изобретению, которые имеют улучшенную аффинность в отношении ОХ40 или сывороточного альбумина человека. Такие варианты могут быть получены с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутирование CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), применение штаммов-мутаторов *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), ДНК-перетасовку (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и “половую” ПЦР (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). В Vaughan *et al.* (*выше*) рассматриваются эти способы созревания аффинности.

В одном варианте осуществления слитые молекулы биспецифического антитела по настоящему изобретению блокируют взаимодействие между OX40 и OX40L. Многочисленные анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать это взаимодействие, описаны в WO2010/096418. В одном
5 варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает слитый белок антитела, имеющий специфичность в отношении OX40 человека, который способен на 50% ингибировать связывание OX40L человека (исследуют при конечной концентрации 2 мкг/мл) с активированными CD4+ OX40+ Т-клетками человека при концентрации менее 0,5 нМ. В одном варианте осуществления
10 OX40L человека, использованный в анализе, является природным OX40 человека. В одном варианте осуществления OX40 человека, использованный в анализе, является рекомбинантным OX40 человека.

При необходимости, антитело для применения в настоящем изобретении может быть конъюгировано с одной или несколькими эффекторными
15 молекулами. Следует иметь в виду, что эффекторная молекула может включать одну эффекторную молекулу, либо две или более таких молекул, связанных так, чтобы образовать единый фрагмент, который может быть присоединен к антителам по настоящему изобретению. Если необходимо получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, это может быть получено с
20 помощью стандартных химических процедур или процедур рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела соединяют непосредственно или через фактор сопряжения с эффекторной молекулой. Методы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области техники (см., Hellstrom *et al.*, *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987,
25 pp. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 and Dubowchik *et al.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, если
30 эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, соединение может быть достигнуто с применением процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745.

Термин эффекторная молекула, использованный в данном документе, включает, например, противоопухолевые средства, лекарственные средства,

токсины, биологически активные белки, например, ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например, ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоактивный йод, радиоизотопы, хелатные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть обнаружены с помощью ЯМР или ESR-спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические средства, в том числе любое средство, которое наносит ущерб клеткам (например, убивает). Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но без ограничения, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиоэпахлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнитол, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлородиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут-213, калифорний-252, иридий-192 и вольфрам-188/рений-188; или лекарственные средства, такие как, но без ограничения, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты, включают, но без ограничения,

протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают, но без ограничения, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботическое средство или анти-ангиогенное средство, например, ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, полезные, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, позитронно-активные металлы (для применения в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. См. в целом патент США № 4741900 для ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в качестве диагностических. Пригодные ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; пригодные простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; пригодные флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; пригодные люминесцентные материалы включают люминол; пригодные биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

Если эффекторная молекула является полимером, она, как правило, может быть синтетическим или природным полимером, например, факультативно замещенным полиалкиленом с прямой или разветвленной цепью, полиалкенильным или полиоксиалкиленовым полимером или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные факультативные заместители, которые могут быть представлены на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или несколько гидрокси-, метиловых или метоксигрупп.

5 Конкретные примеры синтетических полимеров включают факультативно замещенный с прямой или разветвленной цепью поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или их производные, особенно факультативно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль), или их производные.

10 Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

15 Термин "производные", использованный в данном документе, предназначен для включения реакционно-способных производных, например тиол-селективных реакционно-способных групп, такие как малеимиды и тому подобное. Реакционно-способная группа может быть соединена непосредственно или посредством линкерного сегмента с полимером. Следует иметь в виду, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связующей группы между фрагментом антитела и полимером.

20 Размер полимера можно варьировать по желанию, но обычно он находится в диапазоне среднего молекулярного веса от 500 Да до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, такой как от 20000 до 40000 Да.

25 В одном примере пригодные эффекторные молекулы могут быть присоединены через любую доступную аминокислотную боковую цепь или концевую аминокислотную функциональную группу, расположенную в слитом белке антитела, например, любую свободную амино-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут быть природного происхождения в фрагменте антитела или могут быть сконструированы во фрагмент с применением способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 5219996; патент США № 5667425, WO98/25971).

30 Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь (цепи) молекулы антитела по настоящему изобретению. Соответственно, последовательность ДНК кодирует тяжелую и легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению. Последовательность ДНК по настоящему

изобретению может содержать синтетическую ДНК, например, полученную в результате химической обработки, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию. Последовательности ДНК, которые кодируют молекулу антитела по настоящему изобретению, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все из тяжелой и легкой цепей антитела, могут быть синтезированы в соответствии с пожеланиями из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

5

10

ДНК, кодирующая акцепторные каркасные последовательности, широко доступна специалистам в данной области техники и может быть легко синтезирована на основе их известных аминокислотных последовательностей.

15

Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для подготовки последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Желаемые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. Сайт-направленный мутагенез и методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть использованы при необходимости.

20

Примеры подходящих последовательностей приведены в SEQ ID NO:21 Фигуры 5 (a); SEQ ID NO:22 Фигуры 5 (b); SEQ ID NO:23 Фигуры 6 (a); SEQ ID NO:24 Фигуры 6 (b). Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO:21 и 1-63 в SEQ ID NO:23 кодируют последовательность сигнального пептида OmpA, который расщепляется с получением слитой молекулы антагонистического антитела по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь слитого белка антитела по настоящему изобретению, которая содержит SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:22. Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь слитого белка антитела по настоящему изобретению, которая содержит SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:24.

25

30

Другие примеры подходящих последовательностей приведены в SEQ ID NO:25 Фигуры 7 (a); SEQ ID NO:26 Фигуры 7 (b); SEQ ID NO:27 Фигуры 8 (a); SEQ ID NO:28 Фигуры 6 (b). Нуклеотиды 1-57 в SEQ ID NO:25 и 1-60 в SEQ ID NO:27 кодируют последовательность сигнального пептида из мышинового

антитела B72.3 (Whittle *et al.*, 1987, Protein Eng. 1 (6) 499-505.), который расщепляется с получением слитой молекулы антагонистического антитела по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь слитого белка антитела по настоящему изобретению, которая содержит SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26. Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь слитой молекулы антитела по настоящему изобретению, которая содержит SEQ ID NO:27 или SEQ ID NO:28.

Настоящее изобретение также относится к векторам клонирования или экспрессии, содержащим одну или несколько последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Таким образом, обеспеченным является вектор клонирования или экспрессии, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих слитый белок антитела по настоящему изобретению. Соответственно, вектор клонирования или экспрессии содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению, соответственно. Таким образом, вектор согласно настоящему изобретению содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:23.

Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO:21 и 1-63 в SEQ ID NO:23 кодируют последовательность сигнального пептида из OmpA.

Общие способы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, способы трансфекции и способы культивирования хорошо известны специалистам в данной области техники. В этом отношении делается ссылка на "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, New York, и Maniatis Manual, produced by Cold Spring Harbor Publishing.

Также обеспечена клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов клонирования или экспрессии, содержащих одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих слитый белок антитела по настоящему изобретению. Любая подходящая клетка-хозяин/векторная система могут быть использованы для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Могут быть использованы

бактериальные, например *E. coli*, и другие микробные системы, или эукариотические, например системы млекопитающих, а также системы экспрессии клетки-хозяина. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают СНО, клетки миеломы или гибридомы.

5 Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения слитой молекулы антитела согласно настоящему изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для обеспечения экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение
10 молекулы антитела.

Для получения продуктов, содержащих одновременно тяжелые и легкие цепи, клеточная линия может быть трансфицирована двумя векторами, первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, можно использовать
15 один вектор, при этом вектор содержит последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Поскольку слитые белки антитела по настоящему изобретению являются полезными для лечения и/или профилактики патологического состояния, настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую или
20 диагностическую композицию, содержащую молекулу антитела по настоящему изобретению в комбинации с одним или более из фармацевтически приемлемого наполнителя, разбавителя или носителя. Соответственно, обеспеченным является применение слитого белка антитела по настоящему изобретению для
25 изготовления лекарственного средства. Композиция обычно будет поставляться как часть стерильной фармацевтической композиции, которая, как правило, будет содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ подготовки
30 фармацевтической или диагностической композиции, включающий добавление и смешивание слитой молекулы антитела по настоящему изобретению вместе с одним или более из фармацевтически приемлемого наполнителя, разбавителя или носителя.

Слитая молекула антитела может быть единственным активным ингредиентом в фармацевтической или диагностической композиции, или может сопровождаться другими активными ингредиентами, в том числе, другими ингредиентами-антителами, например, антителом к TNF, антителом к IL-1 β , антителом к Т-клеток, антителом к IFN γ или антителом к LPS, или
5 ингредиентами, не являющимися антителами, такими как ксантины. Другие подходящие активные ингредиенты включают в себя антитела, способные индуцировать толерантность, например, антитела к CD3 или антитела к CD4.

В дополнительном варианте осуществления согласно настоящему раскрытию используют слитый белок антитела или композицию в комбинации с
10 дополнительным фармацевтически активным средством, например, кортикостероидом (таким как флутиказона пропионат) и/или бета-2-агонистом (таким как сальбутамол, сальметерол или формотерол), или ингибиторами роста и пролиферации клеток (такими как рапамицин, циклофосфамид, метотрексат),
15 или альтернативным ингибитором CD28 и/или CD40. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой малую молекулу. В другом варианте осуществления ингибитор является антителом, специфичным к мишени.

Фармацевтические композиции соответственно содержат терапевтически
20 эффективное количество слитого белка антитела по настоящему изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество", использованный в данном документе, относится к количеству терапевтического средства, необходимому для лечения, облегчения или профилактики целевого заболевания или состояния, или для достижения обнаруживаемого терапевтического или профилактического
25 эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может быть оценено первоначально либо в анализах на клеточных культурах, или на животных моделях, как правило, у грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Модель на животных может также быть использована для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая
30 информация затем может быть использована для определения подходящих доз и путей введения человеку.

Точное терапевтически эффективное количество для субъекта-человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояние здоровья

субъекта, возраста, веса и пола субъекта, от диеты, времени и частоты введения, комбинации (комбинаций) лекарственного средства, чувствительности реакции и толерантности/ответа на терапию. Это количество может быть определено путем рутинного экспериментирования и находится в компетенции врача-клинициста.

5 Как правило, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 мг/кг до 50 мг/кг, например, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг. Фармацевтические композиции могут быть удобно представлены в форме стандартных доз, содержащих заранее определенное количество активного средства по настоящему изобретению на дозу.

10 Композиции можно вводить пациенту отдельно, или можно вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими средствами, лекарственными средствами или гормонами.

Доза, в которой вводят слитую молекулу антитела по настоящему изобретению, зависит от природы состояния, подлежащего лечению, от
15 имеющейся степени воспаления и от того, используется ли молекула антитела профилактически, или для лечения существующего состояния.

Частота дозирования будет зависеть от периода полураспада слитой молекулы антитела и продолжительности ее эффекта. Если молекула антитела имеет короткий период полураспада (например, от 2 до 10 часов), может быть
20 необходимым вводить одну или несколько доз в день. Альтернативно, если молекула антитела имеет длительный период полураспада (например, от 2 до 15 дней), может быть необходимым вводить дозу только раз в день, раз в неделю или даже раз в 1 или 2 месяца.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен сам по себе вызывать
25 выработку антител, вредных для субъекта, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящие носители могут быть большими, медленно метаболизируемыми макромолекулами, такими как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимеры молочной кислоты, полимеры гликолевой кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные
30 вирусные частицы.

Могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и

сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как воду, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, или рН-буферные вещества могут присутствовать в таких композициях. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема внутрь пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, пригодные для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Там, где продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, консервирующие стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, молекула антигена может быть в сухом виде для восстановления перед применением с соответствующей стерильной жидкостью.

После составления композиции по настоящему изобретению можно вводить непосредственно субъекту. Субъектами, подлежащими лечению, могут быть животные. Однако в одном или нескольких вариантах осуществления композиции адаптированы для введения людям.

Соответственно, в составах согласно настоящему раскрытию рН конечного состава не аналогичен значению изоэлектрической точки антигена или фрагмента, например, если рН состава 7, тогда может быть целесообразным рI от 8-9 или выше. Не желая быть связанными теорией, считается, что это может в конечном итоге обеспечить конечный состав с улучшенной стабильностью, например, антиген или фрагмент остается в растворе.

В одном аспекте предпочтительно, чтобы слитая молекула по настоящему раскрытию не имела рI, которая соответствует общей нейтральной молекуле. Это делает молекулу менее чувствительной к агрегации.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно ввести любым количеством путей, включая, но без ограничения, пероральный,

внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, чрескожный (см., например, WO98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, вагинальный или ректальный путь.

5 Безыгольный инжектор также может быть использован для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Как правило, терапевтические композиции могут быть подготовлены как инъеклируемые в виде либо жидких растворов, либо суспензий. Твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией, также
10 могут быть подготовлены.

Непосредственная доставка композиций обычно будет выполнена путем инъекции, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно или внутримышечно, или доставлена в интерстициальное пространство ткани. Композиции могут также быть введены в место поражения. Дозирование лечения может представлять
15 собой схему с однократным введением дозы или с многократным введением дозы.

Следует иметь в виду, что активным ингредиентом в композиции будет молекула антитела. Как таковая, она будет подвержена разрушению в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композиция предназначена
20 для пути введения с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция должна будет содержать средства, которые защищают антитело от разрушения, но которые высвобождают антитело после его всасывания из желудочно-кишечного тракта.

25 Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, New Jersey, 1991).

В одном варианте осуществления состав обеспечен в виде состава для местных введений, включая ингаляцию.

30 Подходящие ингаляционные препараты включают ингаляционные порошки, дозирующие аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или ингаляционные растворы, свободные от газов-пропеллентов. Ингаляционные порошки согласно настоящему раскрытию, содержащие активное вещество, могут состоять только

из указанных выше активных веществ или из смеси указанных выше активных веществ с физиологически приемлемым наполнителем.

Эти ингаляционные порошки могут содержать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбитол, маннитол, ксилитол), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Моно- или дисахариды являются удобными в применении, особенно при применении лактозы или глюкозы, в частности, но не исключительно, в форме их гидратов.

Частицы для осаждения в легких требуют размер частиц менее 10 микрон, например, 1-9 микрон, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частиц активного ингредиента (такого как антитело или фрагмент) имеет первостепенное значение.

Газы-пропелленты, которые могут быть использованы для подготовки ингаляционных аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенированных углеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Указанные выше газы-пропелленты могут быть использованы сами по себе или в их смеси.

Особенно подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из указанных выше галогенированных углеводородов TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси являются особенно подходящими.

Содержащие газ-пропеллент ингаляционные аэрозоли могут также содержать другие ингредиенты, такие как соразтворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (суфрактанты), антиоксиданты, смазочные материалы и средства для регулирования pH. Все эти ингредиенты известны в данной области техники.

Содержащие газ-пропеллент ингаляционные аэрозоли согласно настоящему изобретению могут содержать до 5% по весу активного вещества. Аэрозоли согласно настоящему изобретению содержат, например, от 0,002 до 5 % по весу,

от 0,01 до 3 % по весу, от 0,015 до 2 % по весу, от 0,1 до 2 % по весу, от 0,5 до 2 % по весу или от 0,5 до 1 % по весу активного ингредиента.

Альтернативно, местным введением в легкие может также быть введение жидкого раствора или суспензионного состава, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например, небулайзер, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus (R), соединенный с компрессором производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Слитый белок антитела по настоящему изобретению может быть доставлен диспергированным в растворителе, например, в виде раствора или суспензии. Он может быть суспендирован в подходящем физиологическом растворе, например, солевом растворе или другом фармацевтически приемлемом растворителе или буферном растворе. Буферные растворы, известные в данной области техники, могут содержать от 0,05 мг до 0,15 мг динатрий эдетата, от 8,0 мг до 9,0 мг NaCl, от 0,15 мг до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 мг до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 мг до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды так, чтобы достичь pH от около 4,0 до 5,0. В суспензии можно использовать, например, лиофилизированное антитело.

Терапевтические составы в виде суспензий или раствора могут также содержать один или несколько наполнителей. Наполнители хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав, как правило, будет предоставлен по существу в стерильной форме с использованием стерильных процессов производства.

Это может включать производство и стерилизацию фильтрованием буферного растворителя/раствора, используемого для состава, асептическое суспендирование антитела в стерильном буферном растворителе/растворе и распределение состава в стерильные сосуды с помощью методов, известных специалистам в данной области техники.

Распыляемый состав согласно настоящему раскрытию может быть предоставлен, например, в виде комплектов с разовой дозой (например, запечатанных пластиковых контейнеров или флаконов), упакованных в конверты из фольги. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объеме, например, 2 мл
5 буферного растворителя/раствора.

Слитые белки антитела, раскрытые в данном документе, могут быть пригодны для доставки путем распыления.

Предполагается также, что антитела по настоящему изобретению можно вводить с применением генной терапии. Для того чтобы достичь этого,
10 последовательности ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи молекулы антитела под контролем соответствующих компонентов ДНК, вводят в пациенту таким образом, что цепи антитела экспрессируются из последовательностей ДНК и собираются *in situ*.

Настоящее изобретение также обеспечивает слитую молекулу антитела
15 (или композиции, содержащие то же самое) для применения при контроле воспалительных заболеваний, например, острого или хронического воспалительного заболевания. Соответственно, молекула антитела (или композиции, содержащие то же самое) может быть использована для уменьшения воспалительного процесса или для предотвращения
20 воспалительного процесса. В одном варианте осуществления обеспечено снижение *in vivo* активированных Т-клеток, в частности тех, которые участвуют в несоответствующих воспалительных иммунных ответах, например, привлеченных в район/местоположение такого ответа.

Снижение количества активированных Т-клеток, как используется в данном документе, может быть снижением на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более
25 процентов по сравнению с их количеством до лечения или без лечения.

Предпочтительно, лечение с использованием антитела, фрагмента или композиции согласно настоящему изобретению может обеспечить снижение уровня активированных Т-клеток без снижения общего уровня Т-клеток
30 (неактивированных Т-клеток) пациента. Это может привести к уменьшению побочных эффектов и, возможно, предотвращению истощения Т-клеток у пациента.

Настоящее изобретение также обеспечивает слитую молекулу антитела по настоящему изобретению для применения в лечении или профилактике патологического нарушения, которое опосредовано ОХ40 или связано с повышенным уровнем ОХ40. Патологическое состояние может, например, быть
5 выбрано из группы, состоящей из инфекций (вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных), эндотоксического шока, связанного с инфекцией, артрита, ревматоидного артрита, астмы, COPD, воспаления органов таза, болезни Альцгеймера, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, болезни Peyroni, целиакии, заболевания желчного пузыря, пилонидальной болезни, перитонита, псориаза, васкулита, хирургических спаек,
10 инсульта, сахарного диабета I типа, болезни Лайма, артрита, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуно-опосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, таких как рассеянный склероз, волчанки (например, системной красной волчанки и волчаночного нефрита) и синдрома Гийена-Барра, atopического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, болезни Грейвса, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, болезни Меньера, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, гранулематоза Вегенера, других аутоиммунных заболеваний,
15 панкреатита, травмы (хирургической операции), реакции “трансплантат против хозяина”, отторжения трансплантата, болезни сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистого свертывания, резорбции кости, остеопороза, остеоартрита, пародонтита и гипохлоргидрии.

25 В одном варианте осуществления слитый белок антитела согласно настоящему изобретению используют при лечении аллергии, COPD, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции “трансплантат против хозяина”, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета I типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки,
30 волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, системной склеродермии или вирусного воспаления легких.

В одном варианте осуществления слитый белок антитела согласно настоящему изобретению используют при лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из аллергии, COPD, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции “трансплантат против хозяина”, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна–Геноха, системной склеродермии или вирусного воспаления легких.

Настоящее изобретение также обеспечивает слитую молекулу антитела согласно настоящему изобретению для применения в лечении или профилактике боли, особенно боли, связанной с воспалением.

В одном варианте осуществления механизм, посредством которого работают слитые молекулы по настоящему раскрытию, включает один или несколько из ингибирования пролиферации или выживания Т-клеток, повышения выработки Treg, снижения дифференцировки В-клеток и/или снижения производства цитокинов.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение слитой молекулы антитела или композиции согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патологического нарушения, которое опосредовано OX40 или связано с повышенным уровнем OX40, в частности, патологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит, астму или COPD.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение молекулы антитела, фрагмента или композиции согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного препарата для лечения или профилактики одного или нескольких медицинских показаний, описанных в данном документе.

Слитая молекула антитела или композиция по настоящему изобретению может быть использована в любой терапии, когда желательно уменьшить эффекты OX40 в организме человека или животного. OX40 может циркулировать в организме или может быть представлен на нежелательно высоком уровне локализованным в определенном месте в организме, например, в месте воспаления.

В одном варианте осуществления слитую молекулу антитела по настоящему изобретению или композицию, содержащую таковые, используют для контроля воспалительного заболевания, например, описанного в данном документе.

5 Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения человека или животных субъектов, страдающих от или подверженных риску нарушения, опосредованного ОХ40, причем способ включает введение субъекту эффективного количества слитой молекулы антитела по настоящему изобретению или композиции, содержащей таковую.

10 В одном варианте осуществления обеспечен очищенный слитый белок биспецифического антитела, который связывается с ОХ40 человека и сывороточным альбумином человека, по существу очищенный от, в частности, не содержащий или по существу не содержащий эндотоксин и/или белок или ДНК клетки-хозяина.

15 Термин “очищенная форма”, как использовано выше, предназначен для обозначения по меньшей мере 90% чистоты, например, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% вес/вес или большей чистоты.

“По существу не содержащий эндотоксин” в целом предназначено для обозначения содержания эндотоксина 1 EU на мг продукта антитела или менее, например, 0,5 или 0,1 EU на мг продукта.

20 “По существу не содержащий белок или ДНК клетки-хозяина” в целом предназначено для обозначения содержания белка и/или ДНК клетки-хозяина 400 мкг на мг продукта антитела или менее, например, 100 мкг на мг или менее, в частности, 20 мкг на мг, в случае необходимости.

25 Слитая молекула антитела по настоящему изобретению также может быть использована в диагностике, например, в диагностике *in vivo* и в визуализации болезненных состояний с участием ОХ40.

Преимущественно, настоящие слитые молекулы считаются безопасными для введения людям в надлежащей терапевтической дозе, в частности, потому что они не являются супер-агонистами и вряд ли могут вызвать цитокиновый шторм.

30 Термин “супер-агонист”, использованный в данном документе, относится к антителу, которое приводит к размножению Т-клеток без участия TCR.

В одном варианте осуществления A26 Fab-Fv снижает индекс деления, указывая, что меньшее количество клеток в популяции подвержено делению; этот эффект предположительно опосредован NK-клетками, которые экспрессируют OX40. Индекс деления представляет собой среднее количество клеточных делений, которое претерпела клетка в исходной популяции, и включает не разделившиеся клетки.

Индекс пролиферации отражает только пролиферацию отвечающей популяции, и в одном варианте осуществления ингибиторный эффект A26 Fab-Fv при использовании этого измерения относительно снижен.

“Содержащий” в контексте настоящего описания предполагает значение “включающий”.

Технически соответствующие варианты осуществления настоящего изобретения могут быть объединены.

Варианты осуществления описаны в данном документе как содержащие определенные признаки/элементы. Настоящее раскрытие также распространяется на отдельные варианты осуществления, состоящие или состоящие по существу из указанных признаков/элементов.

Настоящее изобретение дополнительно описано посредством иллюстрации только в следующих примерах, которые относятся к сопровождающим Фигурам, в которых продемонстрировано следующее.

ПРИМЕРЫ

Подробное описание Фигур

Фигура 1: слитый белок биспецифического антитела по настоящему изобретению, названный Fab-dsFv.

Фигура 2:

a) V-область легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:7),

b) V-область тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:8),

c) CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) и CDRL3 (SEQ ID NO:6) антитела A26,

d) легкая цепь Fab-компонента антитела A26 (SEQ ID NO:9),

e) тяжелая цепь Fab-компонента антитела A26 (SEQ ID NO:10).

Фигура 3:

- а) тяжелая цепь Fv-компонента 645gH5 к альбумину (SEQ ID NO:11),
- б) легкая цепь Fv-компонента 645gL4 к альбумину (SEQ ID NO:12),
- в) линкер 1 (SEQ ID NO:13),
- 5 д) линкер 2 (SEQ ID NO:14),
- е) тяжелая цепь Fab-dsFv (SEQ ID NO:15),
- ф) легкая цепь Fab-dsFv (SEQ ID NO:16).

Фигура 4:

- вариабельный домен тяжелой цепи 645g1 (SEQ ID NO:17),
- 10 вариабельный домен легкой цепи 645g1 (SEQ ID NO:18),
- 645gH1 A26 Fab-dsFv (SEQ ID NO:19),
- 645gL1 A26 Fab-dsFv (SEQ ID NO:20).

Фигура 5:

- а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv, включая лидерную
- 15 последовательность OmpA (SEQ ID NO:21),
- б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv, без лидерной
- последовательности OmpA (SEQ ID NO:22).

Фигура 6:

- а) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, включая лидерную
- 20 последовательность OmpA (SEQ ID NO:23),
- б) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, без лидерной
- последовательности OmpA (SEQ ID NO:24).

Фигура 7:

- а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv, включая лидерную
- 25 последовательность B72.3 (SEQ ID NO:25),
- б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv, без лидерной
- последовательности B72.3 (SEQ ID NO:26).

Фигура 8:

- а) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, включая лидерную
- 30 последовательность B72.3 (SEQ ID NO:27),
- б) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, без лидерной
- последовательности B72.3 (SEQ ID NO:28).

На Фигуре 9a показано связывание A26 Fab-dsFv, меченого AlexaFluor 488, с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека.

На Фигуре 9b показано связывание A26Fab', A26 Fab-Fv и A26 Fab'-PEG в присутствии 5% HSA на активированных CD4⁺, OX40⁺ Т-клетках человека.

5 На Фигуре 10a показан эффект A26 Fab-dsFv на производство цитокинов в РВМС, подвергнутых действию аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*.

На Фигуре 10b показана способность A26 Fab-dsFv ингибировать пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели мышей Nu-NSG.

10 На Фигуре 11a показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺ OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26 Fab-dsFv.

На Фигуре 11b показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺ OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26Fab', A26 Fab-dsFv, A26 Fab'-PEG и двух контролей.

15 На Фигуре 12a показано, что A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов (MLR) человека.

На Фигуре 12b показано, что A26 Fab-Fv ингибирует производство IFN-гамма в ходе MLR человека.

20 На Фигуре 13 показано, что A26 Fab-Fv снижает процент активированных (CD25⁺) CD4⁺ Т-клеток после вторичной рестимуляции антигеном с помощью аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*.

На Фигуре 14 показано, что Fab-Fv и Fab-PEG, введенные до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибируют пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели Nu-NSG.

25 *Обработка ДНК и общие способы*

Компетентные штаммы *E. coli* использовали для трансформаций и рутинного культивирования. Ферменты для рестрикции и модификации ДНК получили от Roche Diagnostics Ltd. and New England Biolabs. Плазмидные препараты выполнили с использованием наборов Maxi Plasmid purification (QIAGEN, номер по каталогу 12165). Реакции секвенирования ДНК выполнили с использованием набора ABI Prism Big Dye terminator sequencing (номер по каталогу 4304149) и провели на автоматическом секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems). Данные проанализировали с помощью программы Sequencher

(Genecodes). Олигонуклеотиды получили от Simga или Invitrogen. Гены, кодирующие начальные последовательности V-области, сконструировали методом автоматизированного синтеза с помощью DNA2.0 и модифицировали для создания привитых версий путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Концентрацию Fab-Fv определили методом ВЭЖХ на основе белка G.

ПРИМЕР 1

Создание и анализ различных гуманизированных трансплантатов 645 в A26Fab-645dsFv

10 Ранее нами описан формат антитела Fab-dsFv (Фигура 1) (иногда называемый в данном документе просто как Fab-Fv) и гуманизированное антитело к альбумина, известное как '645gH1gL1', в WO2010/035012. Нами также ранее описано создание гуманизированного антагонистического антитела к OX40, известного как 'A26', и его пэгилированного Fab'-фрагмента в 15 WO2010/096418. Здесь мы описываем создание нового улучшенного гуманизированного трансплантата антитела '645', известного как 645dsgH5gL4, и создание молекулы антитела Fab-dsFv, включающей этот трансплантат в Fv-компоненте и переменные области 'A26' в Fab-компоненте. Переменные области A26 приведены на Фигуре 2a и b (SEQ ID NO: 7 и 8).

20 Последовательности переменной и константной области A26 совместно приведены на Фигуре 2d и e (SEQ ID 9 и 10).

Последовательности 645gH1 и gL1 приведены на Фигуре 4 (a) и (b), SEQ ID NO 17 и 18. Если использован термин Fab'-PEG или A26 Fab'-PEG, это относится к A26 Fab-40K PEG', описанному в WO2010/096418.

25 1.1 Конструирование линкерных плазмид A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4)G4S

Общую кодирующую область легкой цепи A26Fab-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:20) клонировали в вектор экспрессии млекопитающих UCB под контролем промотора HCMV-MIE и последовательности полиаденилирования SV40E. 30 Варибельную область легкой цепи из 645dsFv (gL1) (SEQ ID NO:18) мутировали в 645dsFv (gL4) (SEQ ID NO:12) способом перекрывающейся ПЦР. Всю область кодирования тяжелой цепи A26Fab-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:19) клонировали в вектор экспрессии млекопитающих UCB под контролем

промотора HCMV-MIE и последовательности полиаденилирования SV40E. Варибельную область тяжелой цепи 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:17) мутировали в 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO:11) способом перекрывающейся ПЦР. Конструкции подтвердили секвенированием. Обе конструкции содержали линкер 3xG4S, приведенный в SEQ ID NO:14, Фигура 3(d).

1.2 Экспрессия A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4) у млекопитающих

Клетки HEK293 трансфицировали плазмидами с тяжелой и легкой цепями с использованием реагента для трансфекции 293fectin от Invitrogen в соответствии с инструкциями изготовителя. Коротко, 25 мкг плазмиды с тяжелой цепью и 25 мкг плазмиды с легкой цепью инкубировали с 100 мкл 293fectin и 1700 мкл среды Optipro в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем смесь добавили к 50×10^6 клеток HEK293 в 50 мл суспензии и инкубировали в течение 6 дней со встряхиванием при 37°C. Через 6 дней супернатант собрали центрифугированием при 1500 xg в течение 10 минут для удаления клеток и затем простерилизовали фильтрованием через 0,22 мкм.

1.3 Очистка A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4) белком G ~ 50 мл отфильтрованных через 0,22 мкм супернатантов сконцентрировали до ~ 2 мл с помощью концентраторов Amicon Ultra-15 с мембраной отсечки молекулярного веса 10 кДа и центрифугированием при 4000 xg в поворотном роторе. 1,8 мл концентрированного супернатанта применили при 1 мл/мин в колонке 1 мл Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare), уравновешенной 20 mM фосфата, 40 mM NaCl, pH 7,4. Колонку промыли с 20 mM фосфата, 40 mM NaCl, pH 7,4, и связанный материал элюировали 0,1 M глицин/HCl pH 2,7. Пик элюирования собрали и pH довели до ~ pH 7 с помощью 2 M Tris/HCl pH 8,5. Элюат с доведенным pH сконцентрировали и подвергли диафильтрации в 20 mM фосфата, 150 mM NaCl, pH 7,4 с помощью концентраторов Amicon Ultra-15 с мембраной отсечки молекулярного веса 10 кДа и центрифугированием при 4000 xg в поворотном роторе до конечного объема ~ 0,3 мл.

1.4 Анализ A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4) с помощью эксклюзионной хроматографии

Очищенные белком G образцы проанализировали с помощью эксклюзионной HPLC. Образцы разделили на колонке 10/300 GL Tricorn

Superdex 200 Superdex 200 10/300 GL Tricorn column (GE Healthcare), спроектированной с изократическим градиентом PBS pH 7,4, при скорости 1 мл/мин. Обнаружение пиков провели при 280 нм и кажущийся молекулярный вес рассчитали путем сравнения со стандартной кривой белков с известным молекулярным весом против объема элюирования. Изменение гуманизированного трансплантата 645dsFv с gH1gL1 на gH5gL4 привело к увеличению процентного содержания мономера экспрессированного A26Fab-645dsFv с 59% до 71% на 12% без каких-либо изменений в термической стабильности dsFv (данные не показаны) или в аффинности связывания dsFv с HSA (данные не показаны).

Пример 2

2.1 Кинетика связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с OX40 по BIAcore

В этом и всех последующих примерах A26 Fab-dsFv 645gH5gL4 имело последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO:15 (Фигура 3(e)), и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO:16 (Фигура 3(f)), т.е., тяжелая цепь содержала линкер G4S, G4T, G4S, приведенный в SEQ ID NO:13, Фигура 3(c).

BIA (анализ биомолекулярного взаимодействия) выполнили с использованием BIAcore T200 (GE Healthcare). F(ab')₂-фрагмент от Affinipure антитела козы к IgG человека, специфичного в отношении F(ab')₂-фрагмента (Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорный чип CM5 с помощью химии связывания аминов до уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% суфрактант P20, GE Healthcare) использовали в качестве подвижного буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Инъекцию 10 мкл A26 Fab' при 0,5 мкг/мл или A26Fab-dsFv при 1 мкг/мл использовали для захвата иммобилизованным F(ab')₂ к IgG человека. OX40 человека протитровали захваченное A26 в различных концентрациях (25 нМ до 1,5625 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали посредством инъекции 2 x 10 мкл 50 mM HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5 mM NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычитанием фона проанализировали с помощью программного обеспечения T200 evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам. Кинетические параметры определили исходя из алгоритма подгонки.

Образец	ka(1/Мс)	kd(1/с)	KD(М)	KD(пМ)
Fab'	2,18 ± 0,38 E+05	1,00 E-05	4,68E-11	46,8
Fab-Fv	2,55 ± 0,35 E+05	1,04 E-05	4,12E-11	41,2
Fab' PEG	2,33 ± 0,46 E+05	1,12 E-05	4,84E-11	48,4

Среднее по 4 определениям

Таблица 1

2.2. Кинетика связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с альбумином по

5 BIAcore

BIA (анализ биомолекулярного взаимодействия) выполнили с использованием BIAcore T200 (GE Healthcare). Аффинно очищенный F(ab')₂-фрагмент антитела козы к IgG человека, специфичного в отношении F(ab')₂-фрагмента (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорный чип CM5 с помощью химии связывания аминов до уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% суфрактант P20, GE Healthcare) использовали в качестве подвижного буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Инъекцию 10 мкл Fab-Fv при 0,75 мкг/мл использовали для захвата иммобилизованным F(ab')₂ к IgG человека.

15 Сывороточным альбумином человека (HSA), сывороточным альбумином мыши (MSA) и сывороточным альбумином яванского макака (CSA) протитровали захваченное Fab-Fv при различных концентрациях (от 50 нМ до 6,25 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали инъекцией 2 x 10 мкл 50 mM HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5 mM NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычитанием фона проанализировали с помощью программного обеспечения T200 evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам. Кинетические параметры определили исходя из алгоритма подгонки.

Таблица 2

Образец	ka(1/Мс)	kd(1/с)	KD(М)	KD(нМ)
HSA	5,84 E+04	1,63 E-04	2,93E-09	2,93
MSA	8,86 E+04	3,68 E-04	4,16E-09	4,16
CSA	7,1 E+04	1,89 E-04	2,66E-09	2,66

Среднее по 3 определениям

2.3. Демонстрация одновременного связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с OX40 и альбумином

Оценили одновременное связывание OX40 человека и сывороточного альбумина человека с A26 Fab-dsFv. Конструкцию A26 Fab-dsFv захватили на поверхности сенсорного чипа, как указано в способе для кинетики связывания A26 Fab-dsFv с альбумином по Biacore. 50 нМ HSA, 25 нМ OX40 или смешанным раствором с конечной концентрацией 50 нМ HSA и 25 нМ OX40 отдельно протитровали захваченное A26 Fab-dsFv. Ответ связывания для комбинированного раствора HSA/OX40 был эквивалентен сумме ответов независимых инъекций. Это подтверждает, что Fab-dsFv способен к одновременному связыванию как OX40 человека, так и HSA.

Таблица 3

Образец	Аналит	Связывание(RU)
A26 Fab-Fv	hOX40	25
	HSA	9
	hOX40 + HSA	35 (34)

2.4 Анализ аффинности A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с помощью клеток Способы

Связывание A26 Fab-Fv с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека

PBMC выделяли путем разделения в градиенте Ficoll и активировали 4 мкг/мл PNA-L в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂, 100 % влажности. CD4⁺ Т-клетки выделяли путем негативной селекции с помощью магнитных гранул (CD4⁺ T cell Isolation Kit II for Human; Miltenyi Biotec). Приблизительно 1 x 10⁵ клеток инкубировали в присутствии антитела либо в буфере Facs (PBS/0,2 % BSA/0,09 % NaN₃) или в буфере Facs с добавлением 5% HSA при 4°C. Конечная концентрация антитела колебалась в пределах от 48 нМ до 0,0005 нМ. Клетки промыли в PBS перед анализом методом проточной цитометрии с использованием FACScalibur (Becton Dickinson). Два набора данных титрования получили в обоих буферных условиях, один с A26 Fab-dsFv и второй с нерелевантным контрольным Fab-Fv, чтобы определить неспецифическое связывание. Число молей связанного антитела рассчитали с использованием интерполированных значений из стандартной кривой, созданной с

использованием гранул, состоящих из различных, но известных количеств флуоресцентного красителя. Геометрические средние значения флуоресценции определили в анализе проточной цитометрии клеток и гранул. Неспецифическое связывание вычли из значений для A26 Fab-dsFv и созданные таким образом кривые специфического связывания проанализировали с помощью нелинейной регрессии, используя уравнение связывания с одним сайтом (GraphPad Prism®) для определения K_D .

Для определения аффинности Fab-A26 dsFv к антигену, экспрессированному на клеточной поверхности, провели эксперименты по насыщению связывания с использованием активированных $CD4^+$ $OX40^+$ Т-клеток и A26 Fab-dsFv, меченого AlexaFluor488. Специфическое связывание антитела с рецептором при равновесии в диапазоне концентраций антитела использовали для определения K_D при условии, что только очень небольшая фракция антитела связана с рецептором в любой точке на кривой связывания.

Равновесное связывание описывается с помощью следующего уравнения:



Скорость ассоциации антитела с рецептором = $k_{\text{on}} \times [\text{Рецептор}_{\text{свободный}}] \times [\text{Антитело}_{\text{свободное}}]$

Скорость диссоциации комплекса рецептор-антитело = $k_{\text{off}} \times [\text{Рецептор-Антитело}]$

При равновесии скорости ассоциации и диссоциации равны, и можно получить уравнение, которое описывает изотерму связывания; на полулогарифмическом участке связывание является сигмоидальным. K_D определяется как $k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ и может быть рассчитана из кривой связывания как концентрация, при которой происходит половина от максимального связывания.

Связывание A26 Fab-Fv, меченого AlexaFluor488, с активированными $CD4^+$ $OX40^+$ Т-клетками человека измерили с помощью проточной цитометрии в 5-log диапазоне концентраций.

Репрезентативная кривая связывания для A26 Fab-Fv показана на Фигуре 9А.

Среднее значение K_D , полученное на активированных клетках от 5 различных доноров, составляет 145 пМ.

Компаратор кривой связывания для A26 Fab, A26 Fab-Fv и A26 Fab-PEG показан на Фигуре 9В.

5 Графики представляют собой среднее из 4 или 5 экспериментов, где другой донор использован в каждом эксперименте.

10 PBMC выделили путем разделения в градиенте Ficoll и активировали с 4 мкг/мл РНА-L в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂, 100 % влажности. Затем эти CD4⁺ Т-клетки выделили путем негативной селекции с помощью магнитных гранул (CD4⁺ T cell Isolation Kit II for Human; Miltenyi Biotec). Приблизительно 1 x 10⁵ клеток инкубировали в присутствии антитела либо в буфере Facs (PBS/0,2 % BSA/0,09 % NaN₃) или в буфере Facs с добавлением 5% HSA при 4°C.

15 Конечная концентрация антитела колебалась в пределах от 48 нМ до 0,0005 нМ. Клетки промыли в PBS перед анализом проточной цитометрии с использованием FACScalibur (Becton Dickinson). Наборы данных титрования также были получены для изотипических контрольных антител к каждому формату A26, чтобы определить неспецифическое связывание. Число молей связанного антитела рассчитали с использованием интерполированных значений из стандартной кривой, созданной с использованием гранул, состоящих из различных, но известных количеств флуоресцентного красителя.

20 Геометрические средние значения флуоресценции определили в анализе проточной цитометрии клеток и гранул. Неспецифическое связывание вычли из значений для A26 Fab-dsFv, и созданные таким образом кривые специфического связывания проанализировали с помощью нелинейной регрессии, используя уравнение связывания с одним сайтом (GraphPad Prism®) для определения K_D .

25 Таблица 4: средние значения K_D для антител A26 в анализах аффинности на клетках человека

Формат антитела	Клеточная аффинность HSA	Клеточная аффинность NO HSA
	K_D (нМ) ± S.E.M	K_D (нМ) ± S.E.M
A26 Fab-Fv (<i>n</i> =5)	0,145 ± 0,019	0,096 ± 0,017
A26 Fab'PEG (<i>n</i> =4)	0,230 ± 0,057	0,322 ± 0,089
A26 Fab' (<i>n</i> =4)	0,068 ± 0,011	0,085 ± 0,031

Пример 3: A26 Fab-Fv модулирует производство цитокинов в PBMC, подвергнутых воздействию аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*

5 PBMC выделили у добровольцев с аллергией разделением в градиенте Ficoll. Очищенные PBMC подвергли воздействию 25 мкг/мл аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus* в присутствии испытываемого антитела (диапазон концентраций от 50 мкг до 0,0005 мкг/мл) в конечном объеме 200 мкл на лунку в 96-луночном круглодонном планшете. Через 6 дней инкубации при 37°C, 5% CO₂, 100% влажности, супернатанты собрали и проанализировали на содержание IL-13 с помощью MSD. График на Фигуре 10(a) показывает репрезентативные данные 1-го репрезентативного донора из 4, где средняя EC₅₀ для ингибирования производства IL-13 составила 0,87 нМ (диапазон от 0,6 нМ до 1,07 нМ).

15 Таблица 5: Средние значения EC₅₀ для антител A26 в анализах in vitro на HDM человека

Значения EC₅₀ рассчитали из кривых ингибирования от отдельных доноров с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®

Формат антитела	Ингибирование производства IL-13 EC ₅₀ (нМ) ± S.E.M	Ингибирование производства IL-5 EC ₅₀ (нМ) ± S.E.M
A26 Fab-Fv (n=4)	0,865 ± 0,112	0,785 ± 0,216
A26 Fab'PEG (n=4)	0,928 ± 0,282	1,310 ± 0,425
A26 Fab' (n=4)	0,335 ± 0,040	0,680 ± 0,223

20 A26 Fab-Fv снижает процент активированных (CD25⁺) CD4⁺ Т-клеток после вторичной антигенной рестимуляции аллергенным экстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*

25 CD4⁺ Т-клетки от доноров с аллергией простимулировали in vitro в течение 7 дней с 25 мкг/мл аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) и аутологичными APC без антитела или в присутствии 10 мкг/мл A26 Fab'PEG, A26 Fab-Fv или контрольного Fab '(A33 Fab'). Клетки промыли и оставили на 3 суток, а затем рестимулировали экстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus* как ранее (Фигура 13). Через 3 дня клетки промыли и флуоресцентно окрасили на поверхностные CD3, CD4 и CD25. Затем клетки

проанализировали проточной цитометрией на проточном цитометре FACS Canto (BD). Клетки запустили на выявление живых лимфоцитов и экспрессии CD3⁺CD4⁺ до анализа. Данные представляют n = 3 донора, включая среднее. n.s, A26 Fab-Fv по сравнению с контрольным Fab' (значимость измерена с использованием парного двустороннего T-критерия).

Пример 4: A26 Fab-Fv ингибирует пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток в модели мышей Nu-NSG

Мышам вводили подкожно 0,03, 0,3, 3 или 30 мг/кг A26 Fab-Fv за один день до переноса 1×10^7 PBMC человека в брюшную полость. Через 14 дней у мышей брали кровь путем сердечной пункции под терминальной анестезией, а затем умертвили смещением шейных позвонков. Затем определили число CD4⁺ и CD8⁺ клеток человека в крови посредством анализа FACS (Фигура 10 (b)). Данные (n=10) выражены как среднее \pm SEM и статистический анализ выполнен односторонним ANOVA с последующим тестом Бонферрони. Значения представляют % ингибирования \pm SEM. Результаты показаны на Фигуре 14.

Модель Nu-NSG демонстрирует, что A26 Fab-Fv полностью ингибирует пролиферацию T-клеток человека *in vivo* и подтверждает A26 Fab-Fv в качестве жизнеспособного терапевтического кандидата на ингибирование опосредованных T-клетками патологий. Кроме того, формат Fab-Fv предоставляет большую эффективность при более низких дозах, чем формат Fab'-PEG. Уменьшение данного ксено-пролиферативного ответа донорских T-клеток может предоставить доказательства, подтверждающие, что A26 Fab-Fv может быть жизнеспособным терапевтическим средством при GVHD.

Пример 5: лиганд-блокирующая способность

Способность A26 Fab-dsFv к блокированию взаимодействия между экспрессированным на клеточной поверхности OX40 и рекомбинантным OX40L измерили с использованием анализа блокирования лиганда на основе проточной цитометрии. Коротко, активированные CD4⁺ OX40⁺ T-клетки человека предварительно проинкубировали с титрованием A26 Fab-Fv. Затем рекомбинантный OX40L добавили к клеткам и оставили для связывания в присутствии A26 Fab-dsFv. Затем определили долю связанного OX40L с помощью проточной цитометрии с использованием меченого вторичного реагента. На Фигуре 11 показана кривая ингибирования, представляющая

объединенные данные от 3 независимых доноров, и продемонстрировано, что A26 Fab-dsFv способно полностью блокировать связывание OX40L. Средняя IC₅₀ для ингибирования связывания рекомбинантного OX40L составила 0,44 нМ (n = 3 донора).

5 Способы: Ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26 Fab-Fv

PBMC выделили путем разделения в градиенте Ficoll и активировали с 4 мкг/мл РНА-L (Sigma) в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂, 100 % влажности. Затем CD4⁺ Т-клетки очистили от культуры путем негативной селекции с
10 использованием колонки MACS (Miltenyi Biotech, CD4⁺ T cell isolation kit II). 2 x 10⁵ CD4⁺ Т-клеток инкубировали в присутствии A26 Fab-dsFv (диапазон конечной концентрации 10 мкг/мл — 0,000056 мкг/мл (136,6 нМ - 0,000765 нМ)) в течение 30 минут при 4°C. OX40L (биотинилированный CD252-muCD8, Ancell) добавили в конечной концентрации 2 мкг/мл и инкубировали еще в течение 30
15 минут при 4°C. Клетки промыли и связывание OX40L обнаружили с помощью инкубации с PE-меченым стрептавидином (Jackson ImmunoResearch) до анализа путем проточной цитометрии с использованием FACS Canto (Becton Dickinson). Соответствующее Fab-dsFv, не связывающее OX40, использовали в качестве
20 контроля. Кривую ингибирования проанализировали с помощью нелинейной регрессии (GraphPad Prism®), чтобы определить IC₅₀. Кривая ингибирования, представляющая объединенные данные от 3 независимых доноров, показана на Фигуре 11, где точки данных представляют среднее, а планки погрешностей представляют SEM.

Средняя EC₅₀ для ингибирования связывания рекомбинантного OX40L с
25 OX40 с помощью A26 Fab-Fv составила 0,445 нМ. Для сравнения, A26 Fab'PEG было немного менее активным при блокировании лиганда (EC₅₀ = 0,739 нМ), тогда как A26 Fab' было незначительно более активным (EC₅₀ = 0,242 нМ), чем Fab-Fv, как показано ниже.

30 Таблица 6: Значения EC₅₀ для ингибирования связывания OX40L с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека с помощью антител A26

Формат антитела	EC ₅₀ блокирования лиганда (нМ) среднее ± S.E.M.
A26 Fab-Fv (n = 3)	0,445 ± 0,110
A26 Fab'PEG (n = 3)	0,739 ± 0,166
A26 Fab' (n = 3)	0,242 ± 0,069

Значения EC_{50} были рассчитаны из кривых ингибирования отдельных доноров с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®.

5 Пример 6. Эффект A26 Fab-Fv в функциональных анализах *in vitro* на клетках человека

Эффект A26 Fab-Fv на зависимые от OX40-OX40L клеточные взаимодействия оценили в целом ряде анализов на стимулированных антигеном лимфоцитах человека. Эти анализы выполнили в присутствии 5% сыворотки человека, чтобы обеспечить насыщение альбумин-связывающего сайта Fv-области, которое, как можно было бы предсказать, происходит *in vivo*.

A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов

Однонаправленная реакция аллогенных смешанных лимфоцитов (MLR) является моделью *in vitro* активации и пролиферации аллореактивных Т-клеток (Bach *et al.*, 1964, O'Flaherty *et al.*, 2000). Донорские Т-клетки активируют посредством распознавания аллогенных антигенов МНС на неродственных донорских стимулирующих РВМС, приводя к клеточной пролиферации и производству цитокинов (Lukacs *et al.*, 1993). Аллореакция Т-лимфоцитов, как было показано, вызвана одновременно аллогенным антигеном МНС и связанным пептидом (Sherman *et al.*, 1993). Величина ответа MLR коррелирует со степенью неправильного подбора МНС между парой респондер-стимулятор (Forrester *et al.*, 2004). Ответ MLR приводит к пролиферации клеток отвечающего донора и производству как Th1 (IL-2, IFN- γ и TNF- α), так и Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) Т-клеточных цитокинов. Точный цитокиновый профиль в MLR считают специфичным при образовании пары респондер-стимулятор (Jordan *et al.*, 2002).
25 Анализы MLR широко используют в исследованиях по изучению путей активации Т-клеток, в скрининге иммунодепрессантных лекарственных средств и для прогноза возможного отторжения донорского органа у реципиентов с трансплантацией (Bromelow *et al.*, 2001).

30 Эффект A26 Fab-Fv на активацию и пролиферацию аллореактивных Т-клеток человека *in vitro* исследовали с использованием анализа MLR, по существу, как описано O'Flaherty *et al.*, 2000. РВМС от двух неродственных доноров совместно культивировали в присутствии или в отсутствие A26 Fab-Fv, A26 Fab' или A26 Fab'PEG и измерили клеточную пролиферацию по включению

³H-тимидина. Как показано на Фигуре 12, A26 Fab-Fv ингибировало клеточную пролиферацию зависимым от концентрации образом со значением EC₅₀ 0,56 нМ (40,9 нг/мл) и максимальным ингибированием на 55% (*n* = 3 донорских пар). A26 Fab-Fv было немного более активным, чем A26 Fab'PEG, которое имело значение EC₅₀ 0,88 нМ, в то время как A26 Fab' имело значение EC₅₀ 0,25 нМ, как показано в Таблице 7.

PBMC человека от двух неродственных доноров выделили из цельной крови. Клетки от одного донора инактивировали γ -облучением для создания популяции-стимулятора. Клетки от оставшегося донора образовали популяцию-респондер. Популяции стимулятора и респондера смешали в соотношении 1:1 (1x10⁵ клеток/донор) и культивировали в присутствии A26 Fab', A26 Fab-Fv или A26 Fab'PEG (0,4 нг-25 мкг/мл) в течение 6 дней. Реагент собственного производства CA162-01297.1 Fab-Fv использовали в качестве подобранного по изотипу контроля. Клеточную пролиферацию измерили в день 6 по включению ³H-тимидина (0,5 мКи/лунку). Данные показаны как процент ингибирования по отношению к ответу респондер плюс стимулятор в отсутствие биологического реагента, и являются объединенными данными из трех донорских пар. Значения EC₅₀ рассчитали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism ®.

Таблица 7. Значения EC₅₀ для ингибирования пролиферативного ответа MLR человека с помощью антител A26

Формат антитела	EC ₅₀ (нМ) среднее \pm S.E.M.
A26 Fab-Fv (<i>n</i> = 3)	0,56 \pm 0,12
A26 Fab'PEG (<i>n</i> = 3)	0,88 \pm 0,44
A26 Fab' (<i>n</i> = 3)	0,25 \pm 0,06

Супернатанты от MLR человека также проанализировали для исследования эффекта A26 Fab-Fv на производство цитокинов. Как показано на Фигуре 5.4, A26 Fab-Fv значительно ингибировало выработку IFN- γ при MLR в среднем на 81% (*n* = 3 донорских пар).

PBMC человека от двух неродственных доноров выделили из цельной крови. Клетки от одного донора инактивировали γ -облучением для создания популяции-стимулятора. Клетки от оставшегося донора образовали популяцию-респондер. Популяции стимулятора и респондера смешали в соотношении 1:1 (1x10⁵ клеток/донор) и культивировали в присутствии 25 мкг/мл A26 Fab', A26

Fab-Fv, A26 Fab'PEG или контроля (A33 Fab' или CA162.01297.1) в течение 6 дней. Супернатанты собрали и проанализировали на содержание IFN- γ с использованием анализа MSD. Процент ингибирования рассчитали относительно клеток, культивированных без каких-либо антител. Графики представляют объединенные данные от трех доноров (среднее \pm SEM). ** = P < 0,01 ; A26 Fab-Fv по сравнению с контрольным Fab-Fv (значимость измерена с помощью парного двустороннего Т-критерия).

Пример 7. Связывание A26 Fab-Fv с NK-клетками в MLR человека

Исследовали эффект A26 Fab-Fv на деление NK-клеток в MLR.

Аллореакция Т-лимфоцитов стимулирует ответ смешанных лимфоцитов и A26 Fab-Fv полностью ингибирует деление Т-клеток и производство IFN γ в этой системе. Ингибирование деления NK-клеток также может способствовать снижению производства IFN γ . С использованием клеток-респондеров, меченых CFSE, продемонстрировано ингибирование деления NK-клеток с помощью анализа FACS в делящейся популяции (данные не показаны). Показаны два различных измерения деления клеток. Индекс деления представляет собой среднее количество клеточных делений, которое претерпела клетка в исходной популяции, и включает не разделившиеся клетки; A26 Fab-Fv снижает индекс деления, указывая, что меньшее количество клеток в популяции подвержено делению; этот эффект предположительно опосредован NK-клетками, которые экспрессируют OX4. Индекс пролиферации отражает только пролиферацию отвечающей популяции, и ингибиторный эффект A26 Fab-Fv при использовании этого измерения относительно снижен.

Пример 8. Средние значения K_D / EC_{50} для A26 Fab-Fv в анализах *in vitro* на клетках человека

Связывание/Функциональный анализ	Среднее K_D / EC_{50} (нМ) \pm S.E.M.	Среднее K_D / EC_{50} (мкг/мл)
Аффинность ($n = 5$)	0,145 \pm 0,019	0,011
Блокирование OX40L ($n = 3$)	0,445 \pm 0,110	0,033
Реакция смешанных лимфоцитов - Ингибирование пролиферации ($n = 3$)	0,558 \pm 0,121	0,041
Клещ домашней пыли - Ингибирование продукции IL-13 ($n = 4$)	0,865 \pm 0,112	0,063

Будет, конечно, понятно, что настоящее изобретение было только описано с помощью примера, что никоим образом не должно означать ограничение, и что

модификации деталей могут быть сделаны в пределах объема формулы изобретения, приведенной далее. Предпочтительные особенности каждого из вариантов осуществления настоящего изобретения являются для каждого из других вариантов осуществления *mutatis mutandis*. Все публикации, включая, но без ограничения, патенты и патентные заявки, цитируемые в данной спецификации, включены в данный документ с помощью ссылки, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и отдельно указана для включения в данный документ с помощью ссылки, как если бы полностью изложена.

5

10

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> ЮСБ Фарма С.А.
- 5 <120> Молекулы антител, имеющие специфичность в отношении ОХ40 человека
- <130> G0160 W001
- 10 <150> US 61/558,545
- <151> 2011-11-11
- <160> 28
- 15 <170> PatentIn версия 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> Белок
- 20 <213> Искусственный
- <220>
- <223> CDRH1
- 25 <400> 1
- Asn Tyr Gly Ile His
- 1 5
- 30 <210> 2
- <211> 17
- <212> Белок
- <213> Искусственный
- 35 <220>
- <223> CDRH2
- <400> 2
- 40 Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
- 1 5 10 15
- 45 Gly
- 50 <210> 3
- <211> 8
- <212> Белок
- <213> Искусственный
- <220>
- 55 <223> CDRH3
- <400> 3
- Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr
- 1 5
- 60 <210> 4
- <211> 11
- <212> Белок
- 65 <213> Искусственный
- <220>
- <223> CDRL1
- 70 <400> 4
- Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
- 1 5 10
- 75 <210> 5
- <211> 7

<212> Белок
<213> Искусственный

5 <220>
<223> CDRL2
<400> 5
Asn Ala Asn Thr Leu His Thr
1 5

15 <210> 6
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственный

20 <220>
<223> CDRL3
<400> 6
Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 7
<211> 108
<212> Белок
<213> Искусственный

30 <220>
<223> Вариабельная область легкой цепи антитела A26
<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

40 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

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

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

60 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

60 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

65 <210> 8
<211> 117
<212> Белок
<213> Искусственный

70 <220>
<223> Вариабельная область тяжелой цепи антитела A26
<400> 8

75 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 Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

5
Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

10
Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

15
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

20
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

25
Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

30
Val Thr Val Ser Ser
115

35
<210> 9
<211> 214
<212> Белок
<213> Искусственный

40
<220>
<223> Легкая цепь Fab-компонента антитела к OX40
<400> 9

45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

50
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

55
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

70
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

75
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

80
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

85
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

90
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

5 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

10 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

15 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

20 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 220
<212> Белок
<213> Искусственный

25 <220>
<223> Тяжелая цепь Fab-компонента антитела к OX40
<400> 10

30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

40 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

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

60 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

65 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

70 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

75 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

80 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

85 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

90 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

5 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

10 <210> 11
<211> 121
<212> Белок
<213> Искусственный

15 <220>
<223> Тяжелая цепь Fv-компонента антитела к альбумину
<400> 11

20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

30 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

35 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

40 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

50 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

55 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

60 <210> 12
<211> 112
<212> Белок
<213> Искусственный

65 <220>
<223> Легкая цепь Fv-компонента антитела к альбумину
<400> 12

70 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

75 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

80 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

85 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

5

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

10

<210> 13
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственный

15

<220>
<223> Линкер 1
<400> 13

20

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

25

<210> 14
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственный

30

<220>
<223> Линкер 2
<400> 14

35

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

40

<210> 15
<211> 357
<212> Белок
<213> Искусственный

45

<220>
<223> Тяжелая цепь Fab A26-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv (gH5)
<400> 15

50

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

55

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

60

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

65

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

70

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

75

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

5 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

10 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

15 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

20 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

25 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

30 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

35 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

40 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

45 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

50 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

55 Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

60 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

65 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

70 Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

75 Val Thr Val Ser Ser
355

<210> 16
<211> 341
<212> Белок
<213> Искусственный

<220>
<223> Легкая цепь Fab A26-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 16

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 Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala

20 25 30

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

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

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

20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

25 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

30 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

35 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

40 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

45 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

50 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

55 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

60 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
210 215 220

65 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
225 230 235 240

70 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
245 250 255

75 Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
260 265 270

80 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
275 280 285

85 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
290 295 300

90 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
305 310 315 320

95 Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val
325 330 335

5 Glu Ile Lys Arg Thr
 340

10 <210> 17
 <211> 119
 <212> Белок
 <213> Искусственный

15 <220>
 <223> Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1
 <400> 17

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

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

25 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

30 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

35 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80

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

45 Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

55 <210> 18
 <211> 110
 <212> Белок
 <213> Искусственный

60 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи 645gL1
 <400> 18

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

65 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30

70 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

75 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
 50 55 60

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

 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Ser Ser Ile

85 90 95

5 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 19
<211> 355
<212> Белок
<213> Искусственный

15 <220>
<223> Тяжелая цепь Fab A26- (3xG4S) -645dsFv (gH1)
<400> 19

20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

30 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

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

50 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

55 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

60 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

65 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

70 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

75 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

80 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

85 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

90 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

5 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

10 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

15 Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

20 Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr
325 330 335

25 Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

30 Val Ser Ser
355

35 <210> 20
<211> 340
<212> Белок
<213> Искусственный

40 <220>
<223> Легкая цепь Fab A26-(3xG4S)-645dsFv(gL1)
<400> 20

45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

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

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

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

65 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

70 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

75 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

5 ggtgaaggta tcttcgacta ctggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgettct 420
acaaagggcc caagcgtttt cccactggct ccgctctcta aatccacctc tgggtgtacg 480
gctgcactgg gttgcctggg gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac 540
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc tttccagcag ttctccagtc ttctggtctg 600
10 tactccctgt ctagcgtggg taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc 660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacc aaggtcgaca aaaaagtcga gccgaaatcc 720
15 tgtagtggag gtgggggctc aggtggaggc gggaccggtg gaggtggcag cgaggttcaa 780
ctgcttgagt ctggaggagg cctagtcag cctggaggga gcctgcgtct ctcttgtgca 840
gtaagcggca tcgacctgag caattacgcc atcaactggg tgagacaagc tccggggaag 900
20 tgtttagaat ggatcgggat aatatgggcc agtgggacga ccttttatgc tacatggggc 960
aaaggaaggt ttacaattag cggggacaat agcaaaaaca ccgtgtatct ccaaatgaac 1020
25 tccttgcgag cagaggacac ggcggtgtac tattgtgctc gactgtccc aggttatagc 1080
actgcacctt acttcgatct gtggggacaa gggaccctgg tgactgtttc aagttaa 1137

30 <210> 22
<211> 1074
<212> ДНК
<213> Искусственная

35 <220>
<223> Тяжелая цепь A26-645 (gH5)

<400> 22
gaagttcagc tggtcgagtc tggaggcggg ctgttcagc ctggaggggag cctgcgtctc 60
40 tcttgtgca saagcggttt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca 120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtgggtct gacgtactac 180
45 cgtgactctg tcaaaggctc tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240
ctgcaaatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggg 300
gaaggatctt tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctaca 360
50 aagggcccaa gcgttttccc actggctccg tctctaaat ccacctctgg tggtagggct 420
gcaactgggt gcctgggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480
55 ggtgcactga cctctgggtg tcacaccttt ccagcagttc tccagtcttc tggctctgtac 540
tccctgtcta gcgtggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600
aacgtcaacc acaaacctgc caacaccaag gtcgacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660
60 agtggagggt ggggctcagg tggaggcggg accggtggag gtggcagcga ggttcaactg 720
cttgagtctg gaggaggcct agtccagcct ggaggagacc tgcgtctctc ttgtgcagta 780
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt 840
65 ttagaatgga tcggtataat atgggccagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaaa 900
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacaccg tgtatctcca aatgaactcc 960
70 ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact 1020
gcaccctact tcgatctgtg gggacaaggg accctgggtg ctgtttcaag ttaa 1074

75 <210> 23
<211> 1089
<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Легкая цепь A26-645 (gL4), включающая лидерную последовательность ОмрА E.coli

5

<400> 23

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gcggttgctg gtttcgcgac cgttgcgcaa 60

10

gctgatatcc agatgaccsa gagccsaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120

actattacct gtcgtgcaac ccagagcacc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180

ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac tgggtgtccg 240

15

tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gactctactc tgaccatctc ctctctccag 300

ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attacccact gacgtttggt 360

20

ggtggtacca aagttgagat caaacgtagc gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420

ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagc gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc 480

tatccgcgtg aagcgaaggt ccagtggaag gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540

25

caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccaact actctctgtc tagcaccctg 600

actctgtcca aagcagactc cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag 660

30

ggtctgagct ctccggttac caaatccttt aatagagggg agtgtggtgg cggtggcagt 720

ggtggtggag gttccggagg tggcggttca gacatacaaa tgaccagag tccttcatcg 780

gtatccgcgt ccgttggcga tagggtgact attacatgtc aaagctctcc tagcgtctgg 840

35

agcaattttc tatcctggta tcaacagaaa ccggggaagg ctccaaaact tctgatttat 900

gaagcctcga aactcaccag tggagttccg tcaagattca gtggctctgg atcagggaca 960

40

gacttcacgt tgacaatcag ttcgctgcaa ccagaggact ttgcgacctc ctattgtggt 1020

ggaggttaca gtagcataag tgatacgaca tttgggtgcg gtactaaggt ggaatcaaaa 1080

cgtaacctaa 1089

45

<210> 24

<211> 1026

<212> ДНК

<213> Искусственная

50

<220>

<223> Легкая цепь A26-645 (gL4)

<400> 24

55

gatatccaga tgaccagag cccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60

attacctgtc gtgcaaccsa gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120

ggtaaagcgc saaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcatactgg tgttccgtct 180

60

cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctccagccg 240

gaagatttcc cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 300

65

ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360

tctgacgaac agctcaaact tggtagctgt tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat 420

ccgcgtgaag cgaaggtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag 480

70

gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540

ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600

75

ctgagctctc cggttaccaa atcctttaat agaggggagt gtgggtggcg tggcagtggt 660

ggtggagggt ccggaggtgg cggttcagac atacaaatga cccagagtcc ttcacgtgta 720

	tccgcgtccg ttggcgatag ggtgactatt acatgtcaaa gctctcctag cgtctggagc	780
	aattttctat cctgggatca acagaaaccg ggggaaggctc caaaacttct gatttatgaa	840
5	gcctcgaaac tcaccagtgg agttccgtca agattcagtg gctctggatc agggacagac	900
	ttcacgttga caatcagttc gctgcaacca gaggactttg cgacctacta ttgtggtgga	960
10	ggttacagta gcataagtga tacgacatth ggggtcggta ctaagggtgga aatcaaactg	1020
	acctaa	1026
15	<210> 25 <211> 1131 <212> ДНК <213> Искусственная	
20	<220> <223> Тяжелая цепь A26-645 (гН5), включающая лидерную последовательность В72.3	
	<400> 25 atggaatggt cctgggtctt cctgtttttc ctttctgtca caaccggggt gcacagcgag	60
25	gtgcagctcg tcgagtctgg aggcgggctt gtccagcctg gaggagcct gcgtctctct	120
	tgtgcagcaa gcggtttcac gttcaccaac tacggtatcc actggattcg tcaggacca	180
30	ggtaaaggtc tggaaatgggt agcctctatc tctccgtctg gtggtctgac gtactaccgt	240
	gactctgtca aaggctgtht caccatctct cgtgatgacg cgaaaaactc tccgtacctg	300
	cagatgaact ctctgcgtgc agaagatacc gcagtgtact actgcgctac tgggtggtgaa	360
35	ggtatcttcg actactgggg tcagggtacc ctggtaactg tctcaagcgc ttctacaaag	420
	ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	480
40	ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc	540
	gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcttac agtcctctgg actctactcc	600
	ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	660
45	gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagccca atcttgthtcc	720
	ggagggtggcg gttccggagg tggcgggtacc ggtggcgggt gatccgaagt ccagctgctt	780
50	gaatccggag gcggactcgt gcagcccgga ggcagctctc gcttgtctg cgtgtatct	840
	ggaatcgacc tgagcaatta cgccatcaac tgggtgagac aggcacctgg gaaatgcctc	900
	gaatggatcg gcattatatg ggctagtggg acgaccttht atgctacatg ggcgaagggt	960
55	agattcaca tctcacggga taatagtaag aacacagtgt acctgcagat gaactccctg	1020
	cgagcagagg ataccgccgt ttactattgt gctcgcactg tcccaggtha tagcactgca	1080
60	ccctacttht atctgtgggg gcagggcact ctggtcaccg tctcgagttg a	1131
65	<210> 26 <211> 1074 <212> ДНК <213> Искусственная	
	<220> <223> Тяжелая цепь A26-645 (гН5)	
70	<400> 26 gagggtgcagc tcgtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
	tcttgtgcag caagcggtht cacgthcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca	120
75	ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctgggtggtct gacgtactac	180
	cgtgactctg tcaaaggctc thtccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac	240

ctgcagatga actctctcgc tgcagaagat accgcagtggt actactgcgc tactggtggt 300
5 gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcaag cgcttctaca 360
aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
10 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cgggctgtcc tacagtcctc tggactctac 540
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
15 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
tccggagggtg gcggttccgg aggtggcgggt accggtggcg gtggatccga agtccagctg 720
cttgaatccg gaggcggact cgtgcagccc ggaggcagtc ttcgcttgtc ctgcgctgta 780
20 tctggaatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaggcacc tgggaaatgc 840
ctcgaatgga tcggcattat atgggctagt gggacgacct tttatgctac atgggcgaag 900
25 ggtagattca caatctcacg ggataatagt aagaacacag tgtacctgca gatgaactcc 960
ctgcgagcag aggataccgc cgtttactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact 1020
gcaccctact ttgatctgtg ggggcagggc actctggtca cgtctcagag ttga 1074
30
<210> 27
<211> 1086
<212> ДНК
35 <213> Искусственная
<220>
<223> Легкая цепь A26-645 (gI4), включающая лидерную последовательность В72.3
40 <400> 27
atgtcagttc ccacacaggt gctgggcctg cttctgttgt ggctcaccga tgctaggtgt 60
gatatccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 120
45 attacctgtc gtgcaaccsa gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 180
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 240
cgtttctctg cgtctggttc tggtagcggac tctactctga ccactctctc tctgcagccc 300
50 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtggt 360
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttccccca 420
55 tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctac 480
cctagagagg ccaaagtcca gtggaagggt gataacgcc ttcaatccgg aaactcccag 540
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 600
60 ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc 660
ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaa aggggagagt gtggtggagg tggctctggc 720
65 ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgc atccagatga ccagagccc ttctctgta 780
agcgcagtg tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggtcc 840
aattttctat cctggtacca gaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa 900
70 gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaaactgac 960
tttaccctga caatctctc actccagccc gaggactctg ccacctatta ctgcggtgga 1020
75 ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt 1080
acctga 1086

<210> 28
<211> 1026
<212> ДНК
5 <213> Искусственная

<220>
<223> Легкая цепь A26-645 (gI4)

10 <400> 28
gatatccaga tgaccsagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
attacctgtc gtgcaaccsa gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
15 ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 180
cgtttctctg cgtctggttc tggtagcgac tctactctga ccactctctc tctgcagccg 240
20 gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 300
ggtaccsaaag ttgagatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttccccca 360
tctgatgagc agttgaagtc tggcactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctac 420
25 cctagagagg csaagtcctc gtggaagggtg gataacgccc ttcaatccgg aaactcccag 480
gagagtgtca ctgagcagga ctcaaaggac tccacctata gccttagcag cacactgaca 540
ctgagcaagg ctgactacga gaaacacaag gtctacgcct gcgaagtgac acatcaaggc 600
30 ctgagctcac ccgtgacaaa gagctttaac aggggagagt gtggtggagg tggctctggc 660
ggtggtggct ccggaggcgg aggaagcgcac atccagatga cccagagccc ttcctctgta 720
35 agcgcacagt tcggagacag agtgactatt acctgccaaa gctccccttc agtctggctc 780
aatcttctat cctggtacca gcaaaagccc ggaaaggctc ctaaattgct gatctacgaa 840
40 gcaagcaaac tcaccagcgg cgtgccccagc aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac 900
tttaccctga caatctctc actccagccc gaggacttct ccacctatta ctgcggtgga 960
ggttacagta gcataagtga tacgacattt ggatgcggca ctaaagtgga aatcaagcgt 1020
45 acctga 1026

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок биспецифического антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащий:

5 тяжелую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}), CH1-домен, и второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}),

10 легкую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_{L1}), CL-домен, и второй переменный домен легкой цепи (V_{L2}),

 где указанная тяжелая и легкая цепи выровнены таким образом, что V_{H1} и V_{L1} образуют первый антиген-связывающий центр, а V_{H2} и V_{L2} образуют второй антиген-связывающий центр,

15 где антигеном, связываемым первым антиген-связывающим центром, является OX40 человека, а антигеном, связываемым вторым антиген-связывающим центром, является сывороточный альбумин человека,

 где первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:2 для CDR-H2, и
20 последовательность, приведенную в SEQ ID NO:3 для CDR-H3, и первый переменный домен легкой цепи (V_{L1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:4 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6 для CDR-L3,

25 где второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:11, и второй переменный домен легкой цепи (V_{L2}) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO:12, и

30 второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}) и второй переменный домен легкой цепи (V_{L2}) соединены дисульфидной связью.

2. Слитый белок биспецифического антитела по п. 1, который препятствует связыванию OX40 с OX40L.

3. Слитый белок биспецифического антитела по п. 1 или п. 2, в котором имеется пептидный линкер между CH1-доменом и вторым переменным доменом тяжелой цепи (V_{H2}).

5

4. Слитый белок биспецифического антитела по любому из пп. 1-3, в котором имеется пептидный линкер между CL-доменом и вторым переменным доменом легкой цепи (V_{L1}).

10

5. Слитый белок антитела по любому из пп. 1-4, где первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:8.

15

6. Слитый белок антитела по любому из пп. 1-5, где первый переменный домен легкой цепи (V_{L1}) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7.

20

7. Слитый белок антитела по любому из пп. 1-6, где тяжелая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:15, или состоит из таковой.

8. Слитый белок антитела по любому из пп. 1-7, где легкая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, или состоит из таковой.

25

9. Слитый белок биспецифического антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, имеющий тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO:15, и легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16.

30

10. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и/или легкую цепь(цепи) слитого белка антитела по любому из пп. 1-9.

11. Вектор клонирования или экспрессии, содержащий одну или несколько последовательностей ДНК по п. 10.

12. Вектор по п. 11, где вектор содержит последовательности, приведенные в SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:24.

5 13. Клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов клонирования или экспрессии по п. 11 или п. 12.

10 14. Способ получения слитого белка антитела по любому из пп. 1-9, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 13 и выделение слитого белка антитела.

15 15. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый белок биспецифического антитела по любому из пп. 1-9 в комбинации с одним или несколькими из фармацевтически приемлемого наполнителя, разбавителя или носителя.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, дополнительно содержащая другие активные ингредиенты.

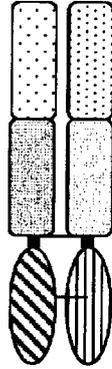
20 17. Слитый белок биспецифического антитела по любому из пп. 1-9 или фармацевтическая композиция по п. 15 или п. 16 для применения в терапии.

25 18. Слитый белок биспецифического антитела по любому из пп. 1-9 или фармацевтическая композиция по п. 15 или п. 16 для применения в лечении или профилактике патологического нарушения, которое опосредовано ОХ40 или которое связано с повышенным уровнем ОХ40.

30 19. Применение слитого белка биспецифического антитела по любому из пп. 1-9 в изготовлении лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического нарушения, которое опосредовано ОХ40 или которое связано с повышенным уровнем ОХ40.

20. Применение по п. 18 или п. 19, отличающееся тем, что патологическим нарушением является заболевание, выбранное из группы, состоящей из аллергии, COPD, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции “трансплантат против хозяина”, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна–Геноха, системной склеродермии и вирусного воспаления легких.

Фигура 1



- Первая переменная область легкой цепи VL1 
- Первая переменная область тяжелой цепи VH1 
- Константные области сКарра  и CH1 
- Вторая переменная область легкой цепи VL2 
- Вторая переменная область тяжелой цепи VH2 
- Дисульфидная связь 

Фигура 2

(a) Варибельная область легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Варибельная область тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYYRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSS

(c)

CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2: SISPSGGLTYYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
CDRH3: GGEGIFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Легкая цепь Fab-компонента антитела к OX40 (SEQ ID NO:9)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Тяжелая цепь Fab-компонента антитела к OX40 (SEQ ID NO:10)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYYRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Фигура 3

(a) Тяжелая цепь Fv-компонента антитела к альбумину (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNK
NTVYIQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(b) Легкая цепь Fv-компонента антитела к альбумину (SEQ ID NO:12)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSIQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKRT

(c) Линкер 1 (SEQ ID NO:13)

SGGGSGGGGTGGGGS

(d) Линкер 2 (SEQ ID NO:14)

GGGSGGGSGGGGS

(e) Тяжелая цепь A26 Fab-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCSGGGG
SGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK
GRFTISRDNKNTVYIQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(f) Легкая цепь A26 Fab-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTI
SSIQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSIQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKRT

Фигура 4**(A) Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1 (SEQ ID NO:17)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFFYATWAKGRFTISRSTT
 VYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(B) Вариабельный домен легкой цепи 645gL1 (SEQ ID NO:18)

DIVMTQSPSSVSASVGRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKSGSGTDFTLT
 ISSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK

(c) Тяжелая цепь A26 Fab-(3xG4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA
 KNSPYLQMNLSRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
 KSCSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIW
 ASGTTFFYATWAKGRFTISRSTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(d) Легкая цепь A26 Fab-(3xG4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:20)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPKGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTI
 SSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSSG
 GGGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSG
 VPSRFKSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK

Фигура 5

а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645(gH5), включающая лидерную последовательность OmpA E.coli (SEQ ID NO:21)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAAGTTCAGCTG
 GTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTT
 ACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCT
 GGTGGTCTGACGTA CTACCGTGA CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACCGCAAAA CTCTCCG
 TACCTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTC
 GACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCT
 CCGTCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCAGAACCAGTT
 ACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCAGCAGTTCTCCAGTCTTCTGGTCTG
 TACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCTGTTCTTCTCTGGGTA CTGACCTACATCTGCAACGTCAACCAC
 AAACCGTCCAACACCAAGGTCGACAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGGCTCAGGTGGAGGC
 GGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTG
 CGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAAG
 TGTTTAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGAAGGTTTACA
 ATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCAAATGAACTCCTTGCGAGCAGAGGACACGGCGGTGTAC
 TATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCCCTGGTGA CT
 GTTTCAAGTTAA

б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645(gH5) (SEQ ID NO:22)

GAAGTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC
 GGTTCACGTTCAACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT
 ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTA CTACCGTGA CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACCG
 AAAAACTCTCCGTACTGCAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT
 GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCCAAGCGTT
 TTCCCACTGGCTCCGTCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTGCCTGGTGAAGACTACTTC
 CCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCAGCAGTTCTCCAG
 TCTTCTGGTCTGTA CTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCTGTTCTTCTCTGGGTA CTGACCTACATCTGC
 AACGTCAACCACAAAACCGTCCAACACCAAGGTCGACAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGG
 TCAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCT
 GGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAA
 GCTCCGGGGAAGTGTTTAGAATGGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAA
 GGAAGGTTTACAATAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCAAATGAACTCCTTGCGAGCAGAGGAC
 ACGGCGGTGTA CTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTCGATCTGTGGGGACAAGGG
 ACCCTGGTGA CTGTTCAGTTAA

Фигура 6

а) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645(gL4), включающая лидерную последовательность OmpA E.coli (SEQ ID NO:23)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTTCGCGACCGTTGCGCAAGCTGATATCCAGATG
 ACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATC
 TACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACGCAACACTCTG
 CATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTCCAG
 CCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTT
 GAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACT
 GCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAGTCGACAACGCACTC
 CAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTG
 ACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCG
 GTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCA
 GACATACAAATGACCCAGAGTCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATTACATGTCAAAGC
 TCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTTAT
 GAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTGACA
 ATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACA
 TTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

б) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645(gL4) (SEQ ID NO:24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAAC
 GCGAACACTCTGCATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
 TCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTC
 AAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACCTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAGTC
 GACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTG
 TCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGT
 CTGAGCTCTCCGGTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGA
 GGTGGCGGTTACAGACATACAAATGACCCAGAGTCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTTGGCGATAGGGTGACTATT
 ACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAA
 CTTCTGATTTATGAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGAC
 TTCACGTTGACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATA
 AGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

Фигура 7

а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645(gH5), включающая лидерную последовательность B72.3 (SEQ ID NO:25)

ATGGAATGGTCTGGGTCTTCCTGTTTTCTTTCTGTACAACCGGGGTGCACAGCGAGGTGCAGCTCGTCGAG
TCTGGAGGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAAC
TACGGTATCCACTGGATTTCGTCAAGGCTGAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGT
CTGACGTAACCGTGAAGTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTG
CAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTAC
TGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGTACC
GGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTG
TCCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTC
GAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGATTACAAATCTCA
CGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGT
GCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCG
AGTTGA

б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645(gH5) (SEQ ID NO:26)

GAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGC
GGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAAGGCTGAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT
ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAACCGTGAAGTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCG
AAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT
GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTC
TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCTGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGT
TCCGGAGGTGGCGGTACCGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCC
GGAGGCAGTCTTCGCTTGCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAG
GCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAG
GGTAGATTACAAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGAGCAGAGGAT
ACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGC
ACTCTGGTCACCGTCTCGAGTTGA

Фигура 8

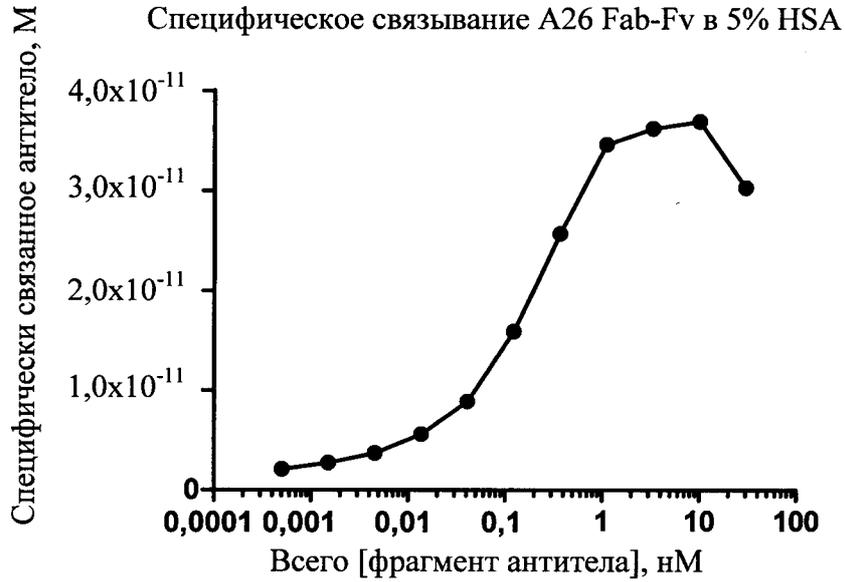
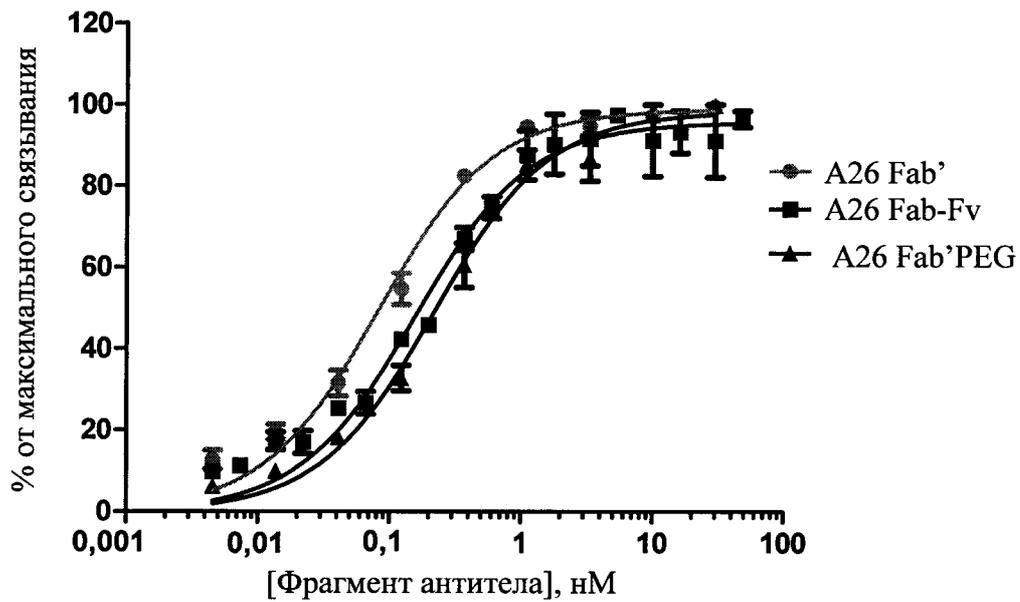
а) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645(gL4), включающая лидерную последовательность B72.3 (SEQ ID NO:27)

ATGTCAGTTCCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGGTGTGATATCCAGATGACC
 CAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTAC
 AACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAACCGGAACACTCTGCAT
 ACCGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCG
 GAAGATTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAG
 ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCC
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTTCAA
 TCCGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACA
 CTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGCCTGAGCTCACCCGTG
 ACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGCGAC
 ATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTCTGTAAGCGCCAGTGTTCGGAGACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCC
 CCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATTGCTGATCTACGAA
 GCAAGCAAACCTACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTACTTTACCCTGACAATC
 TCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTT
 GGATGCGGCACTAAAGTGGAATCAAGCGTACCTGA

б) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645(gL4) (SEQ ID NO:28)

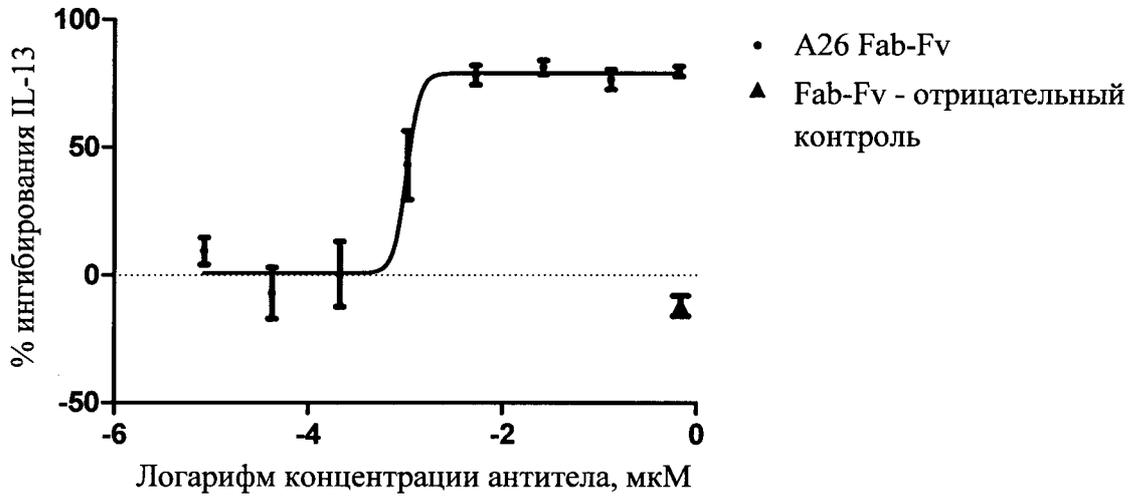
GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCTGATCTACAAC
 GCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTG
 GATAACGCCCTTCAATCCGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTT
 AGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACACATCAAGGC
 CTGAGCTCACCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGA
 GGCGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTCTGTAAGCGCCAGTGTTCGGAGACAGAGTGACTATT
 ACCTGCCAAAGCTCCCCTTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAA
 TTGCTGATCTACGAAGCAAGCAAACCTACCAGCGGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGAAGTACTGAC
 TTTACCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATA
 AGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGGAATCAAGCGTACCTGA

Фигура 9

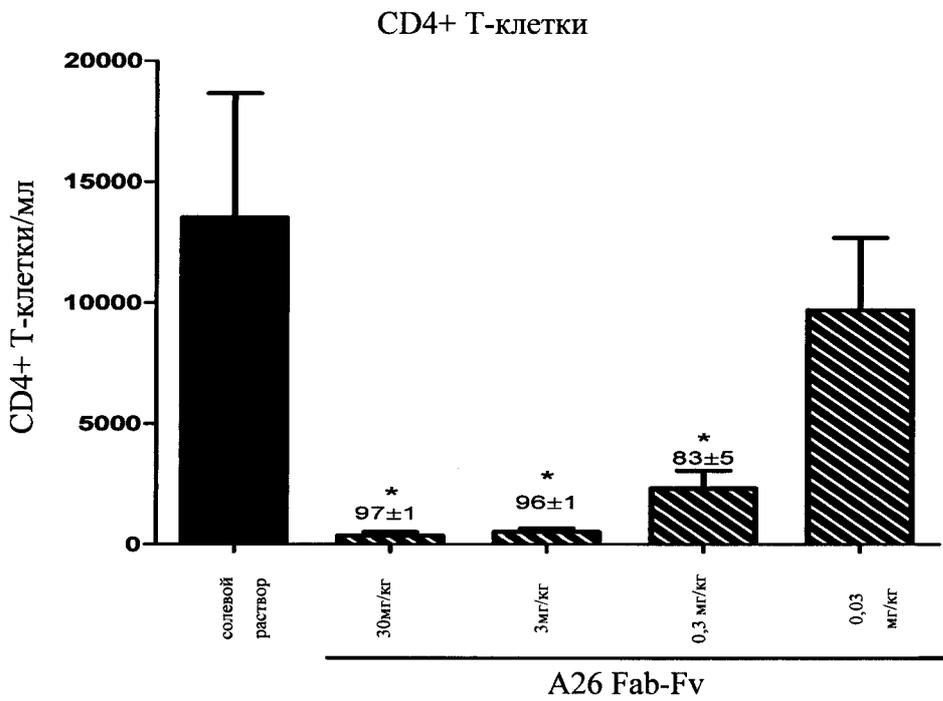
А**В**

Фигура 10

(a)



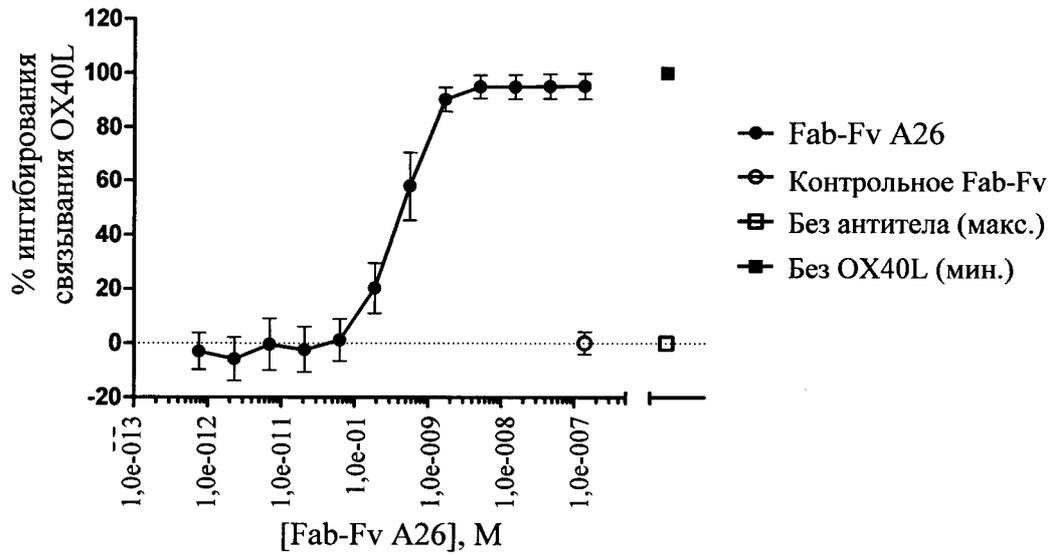
(b)



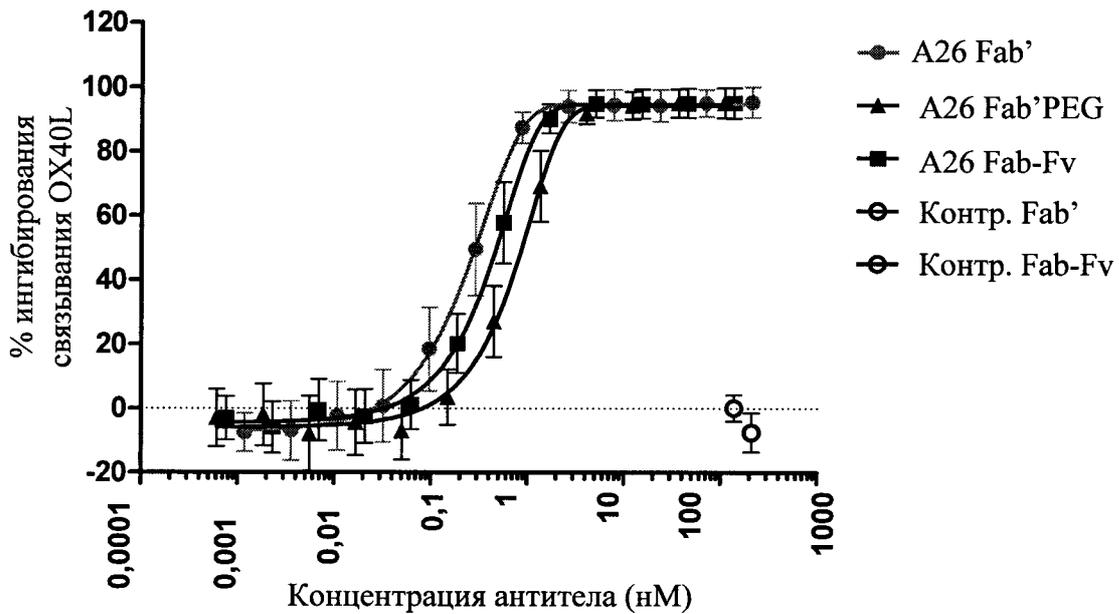
Фигура 11

А

Ингибирование связывания OX40L с активированными CD4⁺OX40⁺ Т-клетками человека с помощью A26 Fab-Fv

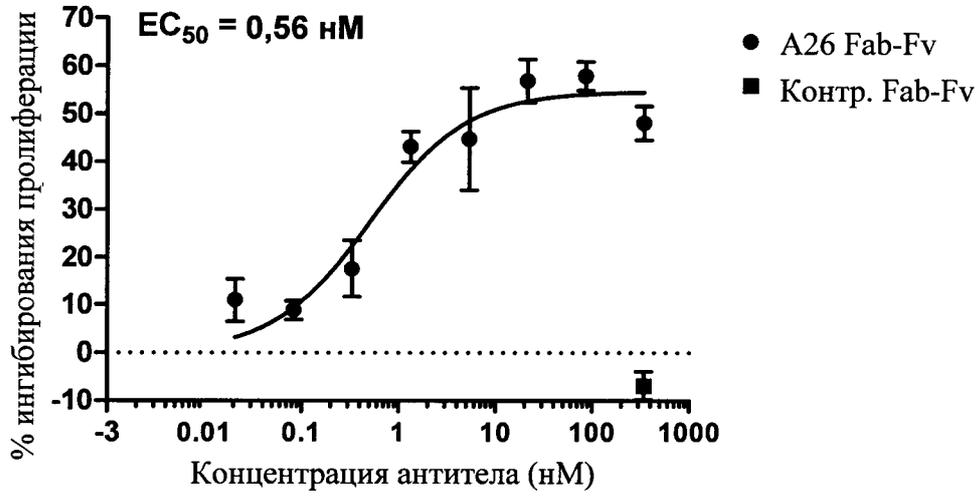


В

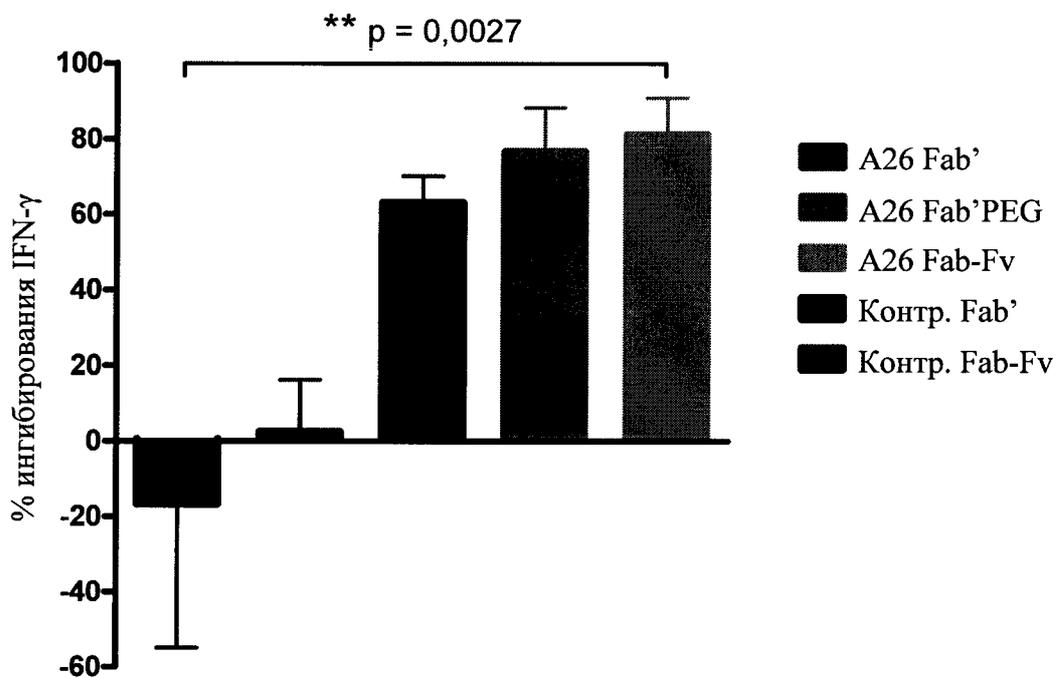


Фигура 12

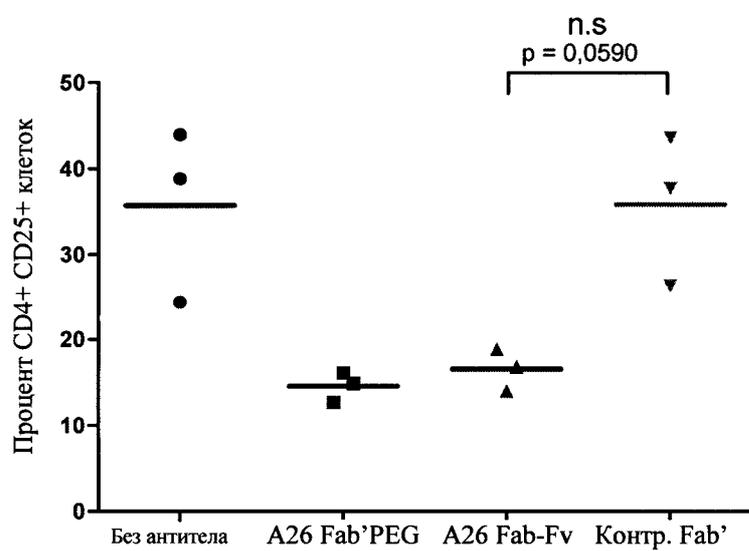
А A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов человека



В A26 Fab-Fv ингибирует выработку IFN- γ во время MLR человека

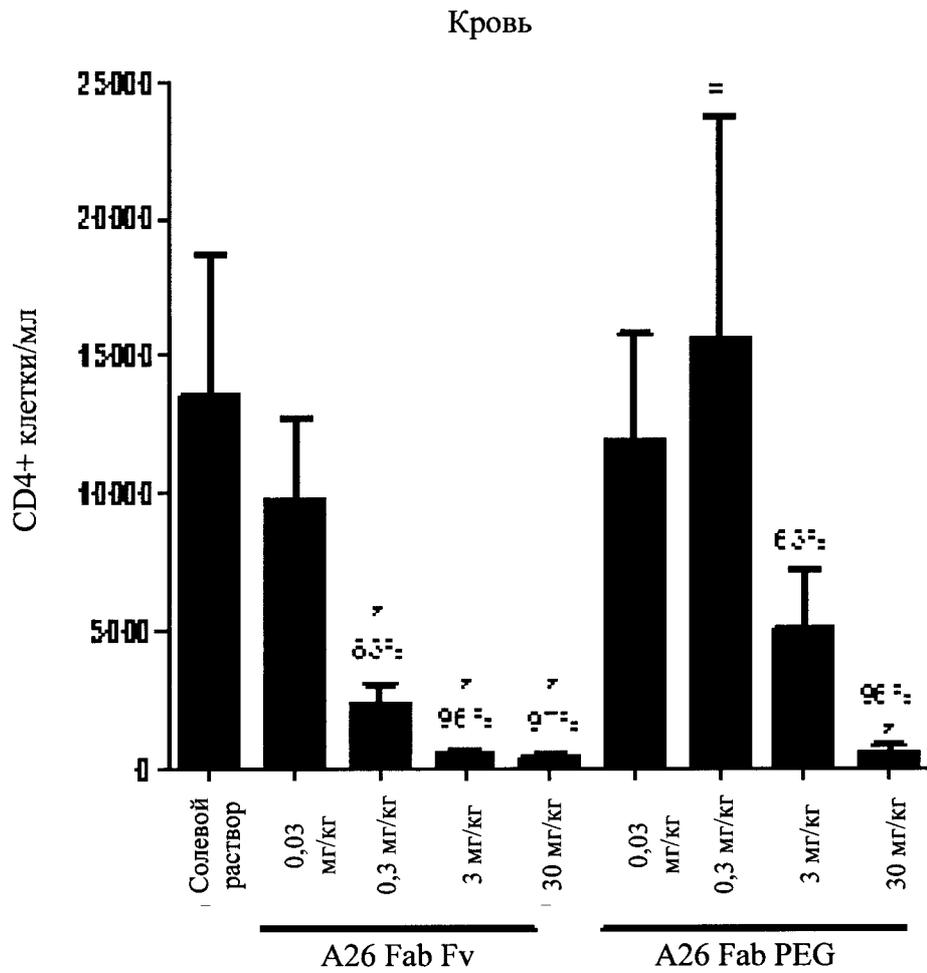


Фигура 13



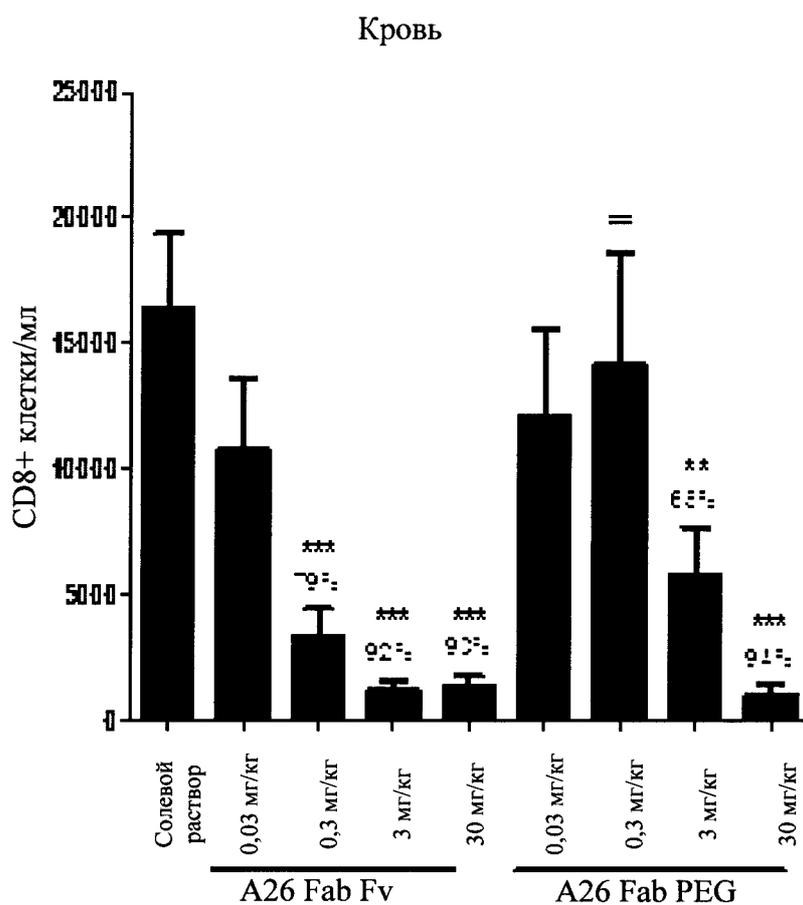
Фигура 14А

A26 Fab-Fv, введенное до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в модели Nu-NSG



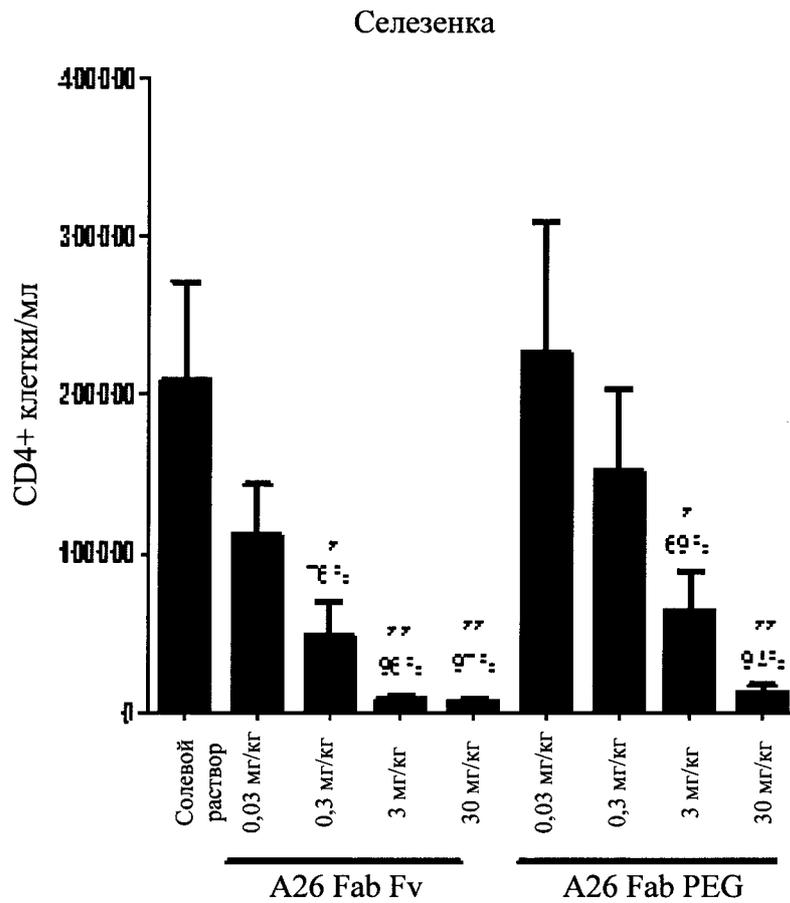
Фигура 14В

A26 Fab-Fv, введенное до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибирует пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в модели Nu-NSG



Фигура 14С

A26 Fab-Fv, введенное до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибирует пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в модели Nu-NSG



Фигура 14D

A26 Fab-Fv, введенное до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибирует пролиферацию CD8⁺ Т-клеток на модели Nu-NSG

