

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21)

201490053

(13)

A1

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

**(43)** Дата публикации заявки  
**2014.08.29**

**(51)** Int. Cl. *A61P 37/06* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2012.07.09**

---

**(54) АНТИЛЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С OX40, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 61/506,491

**(32)** 2011.07.11

**(33)** US

**(86)** PCT/IB2012/053502

**(87)** WO 2013/008171 2013.01.17

**(71)** Заявитель:

ГЛЕНМАРК ФАРМАСЬЮТИКАЛС  
С.А. (CH)

**(72)** Изобретатель:

Аттингер Антуан, Блейн Станислас,  
Бэк Джонатан Альберт, Лиссилаа  
Рами, Хоу Самюэль (CH)

**(74)** Представитель:

Нилова М.И. (RU)

**(57)** Изобретение относится к антагонистичным антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека. Более конкретно, изобретение относится к антагонистичному антителу или его фрагменту, которые связываются с OX40 человека и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 4, и/или CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 5 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID No: 6.

201490053

A1

A1

201490053

## **Антитела, которые связываются с OX40, и их применение**

### **Родственные заявки**

В настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на патент Соединенных Штатов Америки с № 61/506 491, поданную 11 июля 2011 г.; всё содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к антагонистическим антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антагонистическим антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека, и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, и/или, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.

### **Уровень техники**

OX40 является членом TNFR-суперсемейства рецепторов и впервые был идентифицирован в 1987 г. в форме гликопротеина с массой 50 кДа, экспрессируемого активированными CD4+ Т-лимфоцитами у крысы (Paterson DJ *et al.*, (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-90). Внеклеточный лиганд-связывающий домен OX40 состоит из 3 полных богатых цистeinом доменов (CRD) и неполного четвертого С-концевого CRD (Bodmer JL *et al.*, (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 19-26). Лигандом для OX40 служит OX40L (CD252), и три копии OX40 связываются с тримерным лигандом, образуя комплекс OX40-OX40L (Compaan DM & Hymowitz SG (2006) Structure, 14: 1321-1330). OX40 представляет собой мембрносвязанный receptor; однако также была выявлена растворимая изоформа (Taylor L & Schwarz H (2001) J. Immunol. Methods, 255: 67-72). В отличие от CD28 OX40 не демонстрирует конститтивную экспрессию в непримированных (*naïve*) Т-лимфоцитах, а их экспрессия индуцируется после вовлечения receptorа Т-лимфоцитов (TCR). OX40 является вторичной ко-стимулирующей молекулой, экспрессируемой через 24 -72 часа после активации; его лиганд – OX40L – также не экспрессируется в покоящихся антиген-

презентирующих клетках, а экспрессируется после их активации. OX40 экспрессируется главным образом активированными CD4+ Т-лимфоцитами и, в ограниченной степени, активированными CD8+ Т-лимфоцитами (Salek-Ardakani S *et al.*, (2006) Curr. Immunol. Rev. 2: 37-53).

### **Краткое описание изобретения**

Настоящее описание относится в целом к антагонистическим антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека, способам их получения и применения, включая способы лечения расстройств, опосредованных OX40. Антагонистические антитела или их фрагменты согласно настоящему изобретению, которые связываются с OX40 человека, являются антагонистическими антителами и не демонстрируют агонистических эффектов и/или не активируют OX40 человека при связывании.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистическое антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека, и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, и/или, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистическое антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека и содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистическое антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и содержат вариабельную каркасную область, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGHV2-70\*10 (SEQ ID №: 19), IGHV2-70\*01 (SEQ ID №: 20), IGHV2-70\*13 (SEQ ID №: 21), IGHV2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и IGHV2-70\*11 (SEQ ID №: 23).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 32, и при этом указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 8. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность каркасного участка вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №: 27) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, содержащие каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), и при этом указанный каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40

человека, и содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, и содержат:

- (a) последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 37 и 38; и
- (b) последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 47.

Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, и содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58, 59, 79 и 80. Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, и содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 60, 86, 87 и 89.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, и содержат:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 58 или 59; и
- (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 60.

Согласно ещё одному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, причем указанное антитело содержит область Fc IgG4 человека, и при этом указанное антитело не обладает Fc-обусловленной цитотоксичностью. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, причем указанное антитело содержит область Fc IGHG1 человека, и при этом указанное антитело функционально в отношении механизмов цитотоксичности, таких как

антителозависимая клеточно опосредованная цитотоксичность (ADCC). Согласно предпочтительному аспекту указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат нефукозилированную область Fc IGHG1 и проявляют усиленные Fc-обусловленные механизмы цитотоксичности, такие как ADCC.

Согласно ещё одному аспекту в описании настоящего изобретения также раскрыты антагонистичные гуманизированные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека с таким же сродством, как соответствующее химерное антитело, например, сохраняют по меньшей мере 75% сродства связывания с OX40 ( $K_D$ ) по сравнению со сродством соответствующего химерного антитела или обладают по меньшей мере таким же или более высоким сродством связывания с OX40 ( $K_D$ ) по сравнению со сродством соответствующего химерного антитела. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с эпитопом во втором домене внеклеточной области OX40 человека.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела и их фрагменты, связывающиеся с OX40 человека, векторы и клетки-хозяева, содержащие указанную нуклеиновую кислоту или вектор. Также предложены композиции, содержащие указанное антагонистичное антитело или его фрагмент и фармацевтически приемлемую основу, и иммуноконьюгаты, содержащие указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, в связи с терапевтическим агентом.

В описании настоящего изобретения также предложены способы лечения расстройств, опосредованных OX40. Согласно одному аспекту в модели активации и пролиферации аллореактивных Т-лимфоцитов *in vitro* (реакция смешанной культуры лимфоцитов; MLR) антагонистичное антитело или его фрагмент эффективно ингибируют MLR у двух разных индивидуумов (субъекты, у которых достигнут лечебный эффект) со значением ЭК<sub>50</sub> приблизительно 100 нг/мл. Кроме того, в модели реакции ксеногенного трансплантата против хозяина, в модели болезни «аллогенный трансплантат против хозяина» (GVHD), наблюдавшейся после пересадки костного мозга у пациентов, антагонистичное антитело или его фрагмент оказывали мощное угнетающее действие на реакцию GVHD.

Также в соответствии с настоящим изобретением предложены наборы и готовые изделия, содержащие указанное антитело или его фрагмент, композицию или иммуноконъюгат для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

### **Краткое описание фигур**

**Фигура 1: (А) ELISA-анализ с прямым связыванием иммобилизованного рекомбинантного OX40-his человека.** Связывание химерных антител 2F8 и 1D4 с OX40 человека измеряли при помощи прямого ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Разные концентрации (в диапазоне от 10 до 0,01 мг/мл) 1D4 (диаграмма с черными столбиками) и 2F8 (диаграмма с белыми столбиками) инкубировали с 2 мг/мл рекомбинантного OX40-his, меченного и в белковой оболочке, в течение ночи при 4°C в планшете на 96 лунок. Связывание каждого антитела с OX40 определяли при помощи конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела против иммуноглобулина человека. **(В) Конкурентный ELISA иммобилизованного рекомбинантного OX40-his человека.** Ингибиторные эффекты химерных антител 2F8 и 1D4 на взаимодействие OX40/OX40L оценивали при помощи блокирующего ELISA. Разные концентрации (в диапазоне от 10 до 0,01 мг/мл) 1D4 (диаграмма с черными столбиками) и 2F8 (диаграмма с белыми столбиками) инкубировали с 2 мг/мл рекомбинантного OX40-Fc, меченного и в белковой оболочке, в течение ночи при 4°C в планшете на 96 лунок. Через пять минут в каждую лунку добавляли биотинилированный рекомбинантный OX40L человека в фиксированной концентрации (0,04 мг/мл) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Связывание OX40L с OX40 определяли при помощи стрептавидина-HRP.

**Фигура 2: Односторонняя реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR), измеряемая по включению  $^{3}\text{H}$ -тимицина.** Столбцы диаграммы отражают среднее включение  $^{3}\text{H}$ -тимицина (количество импульсов) для по меньшей мере трех измерений  $\pm$  среднеквадратическую ошибку среднего. Показаны контроль изотипа (трастузумаб) и положительный контроль (эфализумаб). Эффектор действителен только для эфекторных клеток. «Эффектор + мишень» соответствует измерению, где антитела не добавляли.

### **Фигура 3: Проточная цитометрия в целях анализа химерного антитела 1D4**

**(А) Окрашивание активированных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и клеток HPB-ALL.** На графиках показана интенсивность флуоресценции (ось

X) и относительное количество клеток (% от максимума событий – ось Y). Указан тип окрашенных клеток. PBMC человека активировали при помощи фитогемагглютинина (PHA) и интерлейкмина-2 (IL-2) в течение 48 часов перед измерением.

**(В) Окрашивание активированных PBMC яванской макаки.** Связывание химерного антитела 1D4 с OX40 яванского макака оценивали посредством проточной цитометрии. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из цельной крови яванского макака, и культивировали  $3 \times 10^6$  клеток в течение 50 часов в присутствии 10 мг/кг PHA и 100 Е/мл rhuIL-2. Активированные PBMC инкубировали с 25 мг/мл контрольного антитела (верхний график (i)) либо биотинилированного овечьего антитела к OX40 человека (средний график (ii)), либо биотинилированного химерного антитела 1D4 (нижний график (iii)). Связывание каждого антитела с OX яванской макаки определяли при помощи стрептавидина-АРС.

**Фигура 4: Поверхностный плазмонный резонанс для измерения анти-OX40 антител.** Данные выражены как количество откликов (сокращенно RU; ось Y) от времени (ось X).

ФИГ. 4А – антитела VH1/VL1 по сравнению с химерой 1D4.

ФИГ. 4В – гуманизированные антитела на основе VH1, VH2 и VH3 (как указано) по сравнению с химерой 1D4.

ФИГ. 4С – примеры антител, которые связываются плохо: VH4/VL4, VH5/VL4, VH5/VL5 и VH5/VL6.

ФИГ. 4Д - примеры антител, которые связываются слабо (VH5/VL9 и VH4/VL9) и связываются хорошо (VH6/VL9 и VH7/VL9).

ФИГ. 4Е - гуманизированные антитела на основе VH7.

ФИГ. 4F - VH6/VL9 обладает наилучшими свойствами связывания по сравнению с химерой 1D4 и гуманизированным вариантом VH7/VL9.

**Фигура 5: Выравнивание последовательностей.** Выравнивание вариабельных областей тяжелой цепи (ФИГ. 5А) или легкой цепи (ФИГ. 5В) антитела 1D4 с выбранными каркасными областями антител эмбрионального типа (IGHV 2-70\*10 (SEQ ID №: 19) и IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24)) из Иммуногенетической базы данных и мутированными к первоначальному виду вариантами вариабельных областей (VH1 (SEQ ID №: 29), VH2 (SEQ ID №: 77), VH3 (SEQ ID №: 78), VH4 (SEQ ID №: 79), VH5 (SEQ ID №: 80), VH6 (SEQ ID №: 58), VH7 (SEQ ID №: 59), (VL1 (SEQ ID №: 30), VL2 (SEQ ID №: 81), VL3 (SEQ ID №: 82), VL4 (SEQ ID №: 83), VL5 (SEQ ID №: 84), VL6 (SEQ ID №: 85), VL7 (SEQ

ID №: 86), VL8 (SEQ ID №: 87), VL9 (SEQ ID №: 60) VL10 (SEQ ID №: 88), VL11 (SEQ ID №: 89).

**Фигура 6: Измерение термостабильности гуманизированного фрагмента FAB анти-OX40 антитела VH6/VL9 при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии.** Данные выражены как добавочная мольная теплоемкость (сокращенно Ср [ккал/моль/°C]; ось Y) в зависимости от температуры (ось X).

**Фигура 7: Описание свойств эпитопа.** На данной фигуре показан эпитоп гуманизированного анти-OX40 антитела VH6/VL9 по результатам ELISA, который описан в Примере 7.

**Фигура 8: Реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR), измеряемая по включению  $^{3}\text{H}$ -тимицина.** На ФИГ.8А и 8В показаны результаты оценки реакции смешанной культуры лимфоцитов от двух неродственных доноров. Пролиферацию измеряли по включению  $^{3}\text{H}$ -тимицина. На графиках показаны абсолютные значения импульсов для каждого состояния  $\pm$  СКО. Клетками субъектов, отвечающих на лечение, были необработанные PBMC, стимулирующими клетками были PBMC, обработанные митомицином. Все условия для тестируемых антител применяли в отношении клеток субъектов, отвечающих на лечение, в смеси с гетерологичными стимулирующими PBMC. Положительным контролем служил эфализумаб (анти-LFA-1 антитело).

**Фигура 9: Модель реакции ксеногенного трансплантата против хозяина.** На данной фигуре показан процент выживания в группах из восьми животных при каждом из упоминаемых условий. Носитель: только ФСБ (фосфатно-солевой буфер). Вертикальная пунктирная линия указывает последний день лечения. В группе из двух подвергнутых облучению животных, которые не получали PBMC, не было отмечено ни смертности, ни каких-либо симптомов (не показано).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к антагонистическим антителам или их фрагментам, которые связываются с OX40 человека.

В настоящей заявке термин «OX40 человека» охватывает варианты, изоформы и видовые гомологи OX40 человека. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению могут в определенных случаях обладать перекрестной реактивностью с OX40 из организма видов, отличных от человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела могут быть полностью специфичными в отношении одного или более белков OX40 человека, и могут не проявлять видовой или другой перекрестной реактивности по отношению к видам, отличным от человека. Полная аминокислотная последовательность примера OX40 человека имеет номер доступа в системе Swiss-Prot P43489 (TNR4\_HUMAN; SEQ ID №: 12). OX40 называют CD134, TNFRSF4, ACT35 или TXGP1 L. OX40 человека обозначается идентификационным номером гена: 7293 в системе Entrez Gene и HGNC: 11918 в системе HGNC (Комитет по номенклатуре генов Международной организации по изучению генома человека). OX40 может кодироваться геном, обозначаемым TNFRSF4 /OX40.

Применяемый в настоящей заявке термин «OX40 человека» охватывает все известные или еще не открытые аллели и полиморфные формы OX40 человека. В настоящей заявке термины «OX40 человека», «OX40» или «рецептор OX40» применяются эквивалентно и обозначают «OX40 человека», если другое особо не указано.

В настоящей заявке термин «лиганд OX40» или «OX40L» применяется эквивалентно и включает лиганд OX40, особенно лиганд OX40 человека. OX40L является членом TNF-суперсемейства и также называется gp34 или CD252. Также для OX40L было введено обозначение CD252 (клuster дифференцировки 252), и он имеет номер доступа в базе данных P23510 (Swiss-Prot) или Q6FGS4 (Uniprot). OX40L экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, дендритных клеток или клеток эндотелия.

В настоящей заявке термин «антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека» включает антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека, например, с OX40 человека в изолированной форме, со сродством ( $K_D$ ) 500 нМ или менее, предпочтительно 200 нМ или менее, более предпочтительно 150 нМ или менее, более предпочтительно 120 нМ или менее, и даже более предпочтительно 110 нМ или менее. Термин «антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека» включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящей заявке термины «антагонистичное антитело» или «антитело-антагонист» применяются эквивалентно и охватывают антитело, которое способно ингибировать и/или нейтрализовывать биологическую сигнальную активность OX40, например, путем блокирования связывания или существенного уменьшения связывания OX40 с лигандом OX40 и, за счет этого, ингибировать или уменьшать действие сигнального пути, запускаемого OX40, и/или ингибировать или уменьшать OX40-опосредуемый ответ клетки, такой как пролиферация лимфоцитов, экспрессия цитокинов или выживание лимфоцитов.

В настоящей заявке термин «антитело» включает целые антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты или одиночные цепи. Термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), соединенные между собой дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающему фрагменту. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (в настоящей заявке сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (в настоящей заявке сокращенно VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Области VH и VL также можно подразделить на области гипервариабельности, именуемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые гипервариабельны по своей последовательности и/или участвуют в распознавании антигена и/или образуют структурно обусловленные петли, между которыми расположены более консервативные области, именуемые каркасными участками (FR или FW). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Последовательности аминокислот FW1, FW2, FW3 и FW4 составляют «отличную от CDR область» или «неполную область CDR», как изложено в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин «каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи» может включать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательности участков каркаса тяжелой цепи (например, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) и/или каркас 4 (FW4)). Предпочтительно каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи включает FW1, FW2 и/или FW3, более

предпочтительно FW1, FW2 и FW3. В настоящей заявке термин «каркасный участок вариабельной области легкой цепи» может включать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательности участков каркаса легкой цепи (например, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) и/или каркас 4 (FW4)). Предпочтительно каркасный участок вариабельной области легкой цепи включает FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3.

Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки), и первым компонентом классического пути активации комплемента (C1q).

Антитела группируют по классам, которые также называют изотипами, определяемыми генетически по константной области. Константные области легких цепей человека подразделяют на каппа (СК) и лямбда (С $\lambda$ )-легкие цепи. Тяжелые цепи подразделяют на мю ( $\mu$ ), дельта ( $\delta$ ), гамма ( $\gamma$ ), альфа ( $\alpha$ ) или эпсилон ( $\varepsilon$ ), и они определяют изотип антитела - IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Таким образом, термин «изотип» в настоящей заявке относится к любым классам и/или подклассам иммуноглобулина, определяемым по химическим и антигенным характеристикам их константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека включают IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) и IgE (IGHE). Так называемый ген псевдо-гамма иммуноглобулина человека IGHGP представляет собой ген дополнительной константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, который был секвенирован, но который не кодирует белок в связи с измененным сайтом переключения (Bensman M *et al.*, (1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108). Несмотря на то, что ген псевдо-гамма иммуноглобулина человека IGHGP содержит измененный сайт переключения, он обладает открытой рамкой считывания для всех константных доменов тяжелой цепи (CH1-CH3) и шарнирной области. Все открытые рамки считывания для константных доменов его тяжелой цепи кодируют белки-домены, которые обладают хорошим соответствием со всеми константными доменами иммуноглобулинов человека с прогнозируемыми структурными особенностями. Данный дополнительный псевдо-гамма изотип в настоящей заявке обозначается IgGP или IGHGP. Были описаны другие гены псевдо-иммуноглобулинов, такие как псевдогены

константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина эпсилон человека Р1 и Р2 (IGHEP1 и IGHEP2). Чаще всего для терапевтических целей применяют класс IgG. У человека данный класс включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей данный класс включает IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c и IgG3.

В настоящей заявке термин «химерное антитело» включает антитела, в которых последовательности вариабельной области из одного вида, а последовательности константной области получены из другого вида, такие как антитела, в которых последовательности вариабельной области получены из антитела мыши, а последовательности константной области получены из антитела человека.

В настоящей заявке термин «гуманизированное антитело» или «гуманизированное антитело против ОХ40» включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из антител эмбрионального типа другого вида млекопитающих, например мыши, были объединены с каркасными последовательностями антитела человека. Каркасные последовательности и антитела человека, а также в последовательности CDR, полученные из антител эмбрионального типа другого вида млекопитающих могут содержать дополнительные модификации.

В настоящей заявке термин «Fab» или «область Fab» включает полипептиды, которые содержат домены иммуноглобулинов VH, CH1, VL и CL. Термин «Fab» может относиться к данной области, когда она изолирована, или к данной области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

В настоящей заявке термин «Fc» или «область Fc» включает полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина. Таким образом, термин «Fc» относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG, и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, и к гибкому шарнирному участку на N-конце к данным доменам. В случае IgA и IgM Fc может включать J-цепь. В случае IgG Fc включает домены иммуноглобулина С гамма 2 и С гамма 3 ( $C\gamma 2$  и  $C\gamma 3$ ), а также шарнирный участок между С гамма 1 ( $C\gamma 1$ ) и С гамма 2 ( $C\gamma 2$ ). Хотя границы области Fc могут варьировать, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно по определению содержит остатки C226 или P230 на своем С-конце, причем нумерация проводится в

соответствии с системой нумерации EC. В случае IgG1 человека область Fc по определению согласно настоящей заявке содержит остаток P232 на своем C-конце, причем нумерация проводится в соответствии с системой нумерации EC (Edelman GM *et al.*, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Термин «Fc» может относиться к данной области, когда она изолирована, или к данной области в контексте полипептида Fc, например, антитела.

В настоящей заявке термин «шарнир» или «шарнирная область», или «шарнирная область антитела» включает гибкий полипептид, содержащий аминокислоты, находящиеся между первым и вторым константным доменом антитела. В настоящей заявке термин «шарнирная область» относится к области длиной 6-62 аминокислот, которая присутствует только в IgA, IgD и IgG, которая охватывает остатки цистеина, образующие мостики с двумя тяжелыми цепями. Структурно домен CH1 IgG заканчивается в положении EC 220, а домен CH2 IgG начинается на остатке в положении EC 237. Таким образом, в случае IgG шарнирная область антитела согласно определению, данному в настоящей заявке, включает положения (D221 в IgG1) - 231 (A231 в IgG1), причем нумерация проводится в соответствии с системой нумерации EC (Edelman GM *et al.*, *выше*).

В настоящей заявке термин «исходное антитело» или «исходный иммуноглобулин» включает немодифицированное антитело, которое впоследствии модифицируют с получением его варианта. Указанное исходное антитело может быть природным антителом или вариантом, или сконструированной версией существующего в природе антитела. Термин «исходное антитело» может относиться к самому антителу, композициям, которые содержат исходное антитело, последовательности, которая его кодирует. В настоящей заявке под термином «исходное антитело против OX40 » понимают антитело или иммуноглобулин, который связывается с OX40, которое модифицировано, и из которого получен вариант. В настоящей заявке под термином «соответствующее антитело мыши» понимают антитело или иммуноглобулин мыши, которые связываются с OX40 человека, которое можно модифицировать и из которого можно получить вариант, в частности антитело мыши 1D4, которое раскрыто в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин «альтернативное антитело» или «вариант антитела» включает последовательность антитела, которая отличается от последовательности исходного антитела по меньшей мере в результате одной модификации по сравнению с исходным антителом. В настоящей заявке подразумевается, что последовательность альтернативного антитела желательно обладает по меньшей мере 80%, более желательно по меньшей мере 90%, более желательно по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью исходного антитела по последовательности аминокислот. Термин «вариант антитела» может относиться к самому антителу, композициям, которые содержат вариант антитела, последовательности, которая его кодирует.

В настоящей заявке термин «модификация аминокислот» включает замену, вставку и/или делецию аминокислоты в последовательности полипептида. В настоящей заявке под термином «замена аминокислоты» или «замена» понимают замещение аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Например, термин «замена R94K» относится к альтернативному полипептиду, в данном случае варианту каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи, в котором аргинин в положении 94 заменен на лизин. В предыдущем примере «94K» означает замену в положении 94 на лизин. В целях настоящей заявки множественные замены обычно разделяют косой чертой. Например, «R94K/L78V» относится к двойному варианту, содержащему замены R94K и L78V. В настоящей заявке под «вставкой аминокислоты» или «вставкой» понимают добавление аминокислоты в конкретном положении в последовательность исходного полипептида. Например, «-94» обозначает вставку в положении 94. В настоящей заявке под «делецией аминокислоты» или «делецией» понимают удаление аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида. Например, «R94-» обозначает делецию аргинина в положении 94.

Подразумевается, что в настоящей заявке термин «консервативные модификации» или «консервативные модификации последовательности» относятся к модификациям аминокислот, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристик связывания антитела, содержащего указанную последовательность аминокислот. Такие консервативные модификации включают замены, вставки и делеции аминокислот. Модификации можно ввести в антитело согласно настоящему изобретению при помощи стандартных технологий, известных в технике, таких как сайт-направленный

мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез. Консервативными заменами аминокислот являются замены, при которых остаток аминокислоты замещается остатком аминокислоты со сходной боковой цепью. Семейства остатков аминокислот со сходными боковыми цепями были определены в технике. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), с боковыми цепями с бета-ветвями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более остатков аминокислот в участках CDR или в каркасных областях антитела согласно настоящему изобретению могут быть заменены другими остатками аминокислот из того же семейства боковых цепей, и можно провести оценку, сохранило ли функцию измененное антитело (альтернативное антитело).

Для всех константных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов человека нумерация производится в соответствии с «системой нумерации ЕС» (Edelman GM *et al.*, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Для константного домена легких цепей иммуноглобулина каппа человека (IGKC), нумерация производится в соответствии с «системой нумерации ЕС» (Edelman GM *et al.*, выше).

Для константных доменов легких цепей иммуноглобулинов лямбда человека (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7) нумерация производится в соответствии с «системой нумерации Кабата» (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication № 91-3242), которая описана у Dariavach P *et al.*, (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 и Frangione B *et al.*, (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82(10): 3415-9.

В настоящей заявке термин «вариабельный домен» относится к доменам, которые обусловливают связывание с антигеном и определяют специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. В природных антителах антигенсвязывающий сайт состоит из двух вариабельных доменов (областей), которые определяют специфичность: один расположен в тяжелой цепи (VH), а другой расположен в легкой цепи (VL). В

некоторых случаях специфичность может быть присуща только одному из двух доменов, как у однодоменных антител на основе тяжелых цепей, обнаруженных у животных семейства верблюдов. Длина V областей обычно составляет примерно 110 аминокислот, и они состоят из относительно инвариантных фрагментов последовательности аминокислот, именуемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с крайне высокой вариабельностью, именуемых «гипервариабельными участками», длина которых 9-12 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат FR, которые принимают главным образом конфигурацию «бета-слоёв», соединенные тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости друг от друга при помощи FR, и совместно с гипервариабельными участками из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антитела (см. Kabat EA *et al.*, выше). В настоящей заявке термин «гипервариабельный участок» относится к остаткам аминокислот антитела, которые отвечают за связывание с антигеном. Как правило, гипервариабельный участок включает остатки аминокислот из «участка, определяющего комплементарность» или «CDR», причем последний обладает наивысшей вариабельностью последовательностей и/или участвует в распознавании антигена. Для всех вариабельных доменов нумерация производится в соответствии с «системой нумерации Кабата» (Kabat EA *et al.*, выше).

Применяется несколько определений CDR, и они все они включены в настоящую заявку. Определение по Кабату основано на вариабельности последовательностей и применяется чаще всего (Kabat EA *et al.*, выше). Определение по Хотия основано на локализации структурных петель (Chothia C & Lesk AM (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917).

Определение программы AbM представляет собой компромисс между определениями Кабата и Чотия и применяется в программах для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (Martin ACR *et al.*, (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86: 9268-72; Martin ACR *et al.*, (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen JT *et al.*, (1992) Immunomethods, 1: 126-136; Rees AR *et al.*, (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Недавно было введено контактное определение (MacCallum RM *et al.*, (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745), которое основано на анализе структур комплексов, имеющихся в базе данных «Protein Databank». Определение CDR в соответствии с IMGT® - иммуногенетической информационной системой®

(<http://www.imgt.org>) основано на нумерации IMGT для V-ОБЛАСТЕЙ всех иммуноглобулинов и рецепторов Т-лимфоцитов всех видов (IMGT®, международная иммуногенетическая информационная система®; Lefranc MP *et al.*, (1991) Nucleic Acids Res. 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) Nucleic Acids Res. 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res. 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res. 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) Dev. Comp. Immunol. 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64). Все гипервариабельные участки (CDR), обсуждаемые в настоящем изобретении, предпочтительно отвечают определению согласно IMGT®. Остатки вариабельных доменов для каждого из указанных CDR следующие (нумерация в соответствии с Kabat EA, *et al.*, выше): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 и HCDR3: 93-102. Термин «отличная от CDR область» области VL в настоящей заявке включает последовательности аминокислот: 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3) и 98- приблизительно 107 (FR4). Термин «отличная от CDR область» области VH в настоящей заявке включает последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3) и 103 - приблизительно 113 (FR4).

CDR согласно настоящему изобретению могут включать «полные CDR», которые основаны на упоминаемых выше определениях и содержат следующие остатки вариабельных доменов: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Указанные полные CDR нумеруются также в соответствии с Kabat *et al.*, выше. Термин «неполная область CDR» области VL в настоящей заявке включает последовательности аминокислот: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) и 98 - приблизительно 107 (FR4). Термин «неполная область CDR» области VH в настоящей заявке включает последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3) и 103 - приблизительно 113 (FR4).

В настоящей заявке термин «полноразмерное антитело» включает структуру, которая образует природную биологическую форму антитела, включая вариабельные и константные области. Например, у большинства млекопитающих, включая человека и мышь, полноразмерное антитело класса IgG представляет собой тетramer, и состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулинов, в каждой паре есть одна легкая и одна тяжелая цепь, причем каждая легкая цепь содержит домены иммуноглобулина VL и CL, а каждая тяжелая цепь содержит домены иммуноглобулина VH, CH1 ( $C\gamma 1$ ), CH2 ( $C\gamma 2$ )

и СН3 ( $C\gamma 3$ ). У некоторых млекопитающих, например, у верблюдов и лам, антитела класса IgG могут состоять только из двух тяжелых цепей, причем каждая тяжелая цепь содержит вариабельный домен, присоединенный к области Fc.

Фрагменты антител включают без ограничений: (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одиночного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward ES *et al.*, (1989) *Nature*, 341: 544-546), который состоит из одного вариабельного домена, (v) фрагменты F(ab')2, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab; (vi) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет соединяться двум доменам и образовывать антигенсвязывающий сайт (Bird RE *et al.*, (1988) *Science* 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83), (vii) биспецифические одноцепочечные димеры Fv (PCT/US92/09965), (viii) «диатела» или «триотела», поливалентные или мультиспецифичные фрагменты, образованные посредством слияния генов (Tomlinson I & Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; WO94/13804; Holliger P *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48) и (ix) scFv, генетические присоединенные к такому же или другому антителу (Coloma MJ & Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

В настоящей заявке термин «эффекторная функция» включает биохимическое событие, которое возникает вследствие взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают Fc $\gamma$ R-опосредуемые эффекторные функции, такие как ADCC (антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность) и ADPC (антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз), а также комплемент-опосредуемые эффекторные функции, такие как CDC (комплементзависимая цитотоксичность). Эффекторную функцию антитела можно изменять путем изменения, т.е. усиления или снижения, предпочтительно усиления, сродства антитела к молекуле-эффектору, такой как Fc-рецептор или компонент комплемента. Сродство связывания, как правило, можно варьировать за счет модификации связывающего сайта молекулы, и в данном случае целесообразно определять локализацию рассматриваемого сайта и модифицировать по меньшей мере часть указанного сайта подходящим способом. Также представляется, что изменение в сайте связывания антитела для молекулы-эффектора не обязательно значительно изменяет общее сродство связывания, но может изменять

геометрию взаимодействия, приводя к неэффективности эфекторного механизма, как при непродуктивном связывании. Кроме того, представляется, что эфекторную функцию можно изменить путем модификации сайта, непосредственно не участвующего в связывании молекулы-эфектора, но участвующего другим образом в реализации эфекторной функции. Путем изменения эфекторной функции возможно контролировать разные аспекты иммунного ответа, например, усиливать или угнетать разные реакции иммунной системы, с возможными полезными эффектами при диагностике или терапии.

В настоящей заявке термин «расстройство, опосредованное OX40» включает патологические состояния, такие как аллергия, астма, ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких), ревматоидный артрит, псориаз и заболевания, ассоциированные с аутоиммунитетом и воспалением.

В настоящей заявке термин «субъект» включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не-млекопитающих, таких как нечеловекообразные обезьяны, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и др. Предпочтительно субъектом является человек.

### **Антитела против OX40**

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, которые содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, и/или, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат полный CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 13, протяженную CDR2 тяжелой

цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 14; и/или протяженную CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 15; и/или содержат полный CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 16, и/или полный CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 17, и/или полный CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 18.

Предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5 и а CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6. Более предпочтительно, антагонистичное антитело или его фрагмент, связывающиеся с OX40 человека, содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3, и CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.

В технике хорошо известно, что домен CDR3, независимо от доменов CDR1 и/или CDR2, один может определять специфичность связывания антитела в отношении родственного антигена, и что можно предсказуемо генерировать множество антител, обладающих одинаковой специфичностью связывания на основе общей последовательности CDR3. См., например, Klimka A *et al.*, (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (описано получение гуманизированного анти-CD30 антитела с применением только вариабельного домена тяжелой цепи CDR3 из мышного анти-CD30 антитела Ki-4); Beiboer SH *et al.*, (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (описаны рекомбинантные антитела к эпителиальному гликопротеину-2 (EGP-2), полученные с применением только последовательности CDR3

тяжелой цепи из исходного мышиного анти-EGP-2 антитела MOC-31); Rader C *et al.*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (описана панель гуманизированных антител к интегрину  $\alpha\beta 3$ , полученных с применением вариабельного домена CDR3 тяжелой и легкой цепи мышиного антитела к интегрину  $\alpha\beta 3$  LM609, причем каждый член панели антител содержит отличную последовательность вне домена CDR3 и способен связываться с тем же эпитопом, что и исходное мышиное антитело со сродством, таким же или выше, чем сродство у исходного мышиного антитела); Barbas C *et al.*, (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (описано, что домен CDR3 вносит наиболее значимый вклад в связывание антигена).

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены антитела и их фрагменты, которые связываются с OX40 человека, и содержат один или более доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи, в частности, содержат CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6, причем указанное антитело способно связываться с OX40 человека. В рамках некоторых вариантов реализации предложенные в соответствии с настоящим изобретением антитела, содержащие один или более доменов CDR3 тяжелой и/или легкой цепи из антитела не происходящего от человека, (a) способны конкурировать за связывание; (b) сохраняют функциональные характеристики; (c) способны связываться с тем же эпитопом; и/или (d) обладают таким же сродством связывания, как и исходное не происходящее от человека, например, мышью антитело.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 7. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело и его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 8. Согласно некоторым вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID

№: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 8.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены варианты антагонистичного антитела или его фрагмента, которые связываются с OX40 человека. Так, согласно настоящему изобретению предложены антитела или их фрагменты, которые обладают последовательностью аминокислот областей, отличных от CDR, вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична (обладает идентичностью по последовательности аминокислот по меньшей мере на 80%) последовательности аминокислот областей, отличных от CDR, вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи исходного антагонистичного антитела для любой последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепи, например, любой из последовательностей вариабельной области тяжелой или легкой цепи, таких как в SEQ ID №: 7 или SEQ ID №: 8, соответственно. Также согласно настоящему изобретению предложены антитела или их фрагменты, которые обладают последовательностью аминокислот неполных областей CDR вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности аминокислот неполных CDR областей вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи исходного антагонистичного антитела для тяжелой или легкой цепи. Предпочтительно, идентичность последовательностей аминокислот для областей, отличных от CDR, или неполных CDR вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи составляет по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, в особенности 96%, более конкретно 97%, и даже более конкретно 98%, наиболее конкретно 99%, включая, например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. В настоящей заявке под идентичностью или гомологией применительно к последовательности аминокислот понимают процент остатков аминокислот в представляющей интерес последовательности, которые идентичны остаткам в антагонистичном антителе или его фрагменте, связывающемся с OX40 человека, после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения пропусков для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Таким образом, идентичность последовательностей можно определять стандартными способами, которые обычно применяют для сравнения сходства в положениях аминокислот в двух полипептидах. При помощи компьютерной программы, такой как BLAST или FASTA, два полипептида выравнивают для

оптимального соответствия их соответствующих аминокислот (либо по полной длине одной, либо по обеим последовательностям, либо по заранее определенной части одной или обеих последовательностей). Программы выдают штраф за раскрытие по умолчанию и штраф за пропуск в последовательности по умолчанию, и в сочетании с указанной компьютерной программой можно применять матрицу замен, такую как PAM250 (стандартная матрица замен; см. Dayhoff MO *et al.*, (1978) в *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol 5, supp. 3). Например, процент идентичности можно рассчитать так: общее количество идентичных пар, умноженное на 100, а затем разделенное на сумму длины более длинной последовательности в совпавших промежутках и количества пропусков, введенных в более длинные последовательности с целью выравнивания двух последовательностей.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержат последовательность каркасной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 70% идентична последовательности каркасной области SEQ ID №: 19, 20, 21, 22 или 23, последовательность каркасной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 60% идентична последовательности каркасной области SEQ ID №: 24, 25, 26, 27 и 28. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанное антитело или его фрагмент содержат последовательность каркасной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 74% идентична последовательности каркасной области SEQ ID №: 19, и/или последовательность каркасной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 65% идентична последовательности каркасной области SEQ ID №: 24.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат CDR тяжелой или легкой цепи, которые описаны выше, а также содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGHV2-70\*10 (SEQ ID №: 19), IGHV2-70\*01 (SEQ ID №: 20), IGHV2-70\*13 (SEQ ID №: 21), IGHV2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и IGHV2-70\*11 (SEQ ID №: 23), предпочтительно каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, IGHV2-70\*10

(SEQ ID №: 19). Указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи может содержать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательностей каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи (например, каркасный участок 1 (FW1), каркасный участок 2 (FW2), каркасный участок 3 (FW3) и/или каркасный участок 4 (FW4)), присутствующие в продукте или полученные из указанных генов человека. Предпочтительно указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3, присутствующие в продукте или полученные из генов человека, выбранного из группы, состоящей из: IGHV2-70\*10 (SEQ ID №: 19), IGHV2-70\*01 (SEQ ID №: 20), IGHV2-70\*13 (SEQ ID №: 21), IGHV2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и IGHV2-70\*11 (SEQ ID №: 23). В настоящей заявке последовательности каркасных участков вариабельных областей включают FW1 (положения с 1 по 25), FW2 (положения с 36 по 49), FW3 (положения с 66 по 94) и FW4 (положения с 103 по 113), причем положение аминокислоты указывается в соответствии с системой нумерации, установленной Кабатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, причем указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGHV2-70\*10 (SEQ ID №: 19), и причем указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышного антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, содержащие последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 32, причем указанный каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышного антитела.

Предпочтительно модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, более предпочтительно замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 50, 60 и 62, более предпочтительно замену аминокислоты в положении 35b,

причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Конкретно, указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N и 62A, предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из T23S, S35bG, I48L, R50H, S60N и S62A, и наиболее предпочтительной заменой является S35bG, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОХ40 человека, и содержат каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №: 27) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28), предпочтительно каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24). Указанный каркасный участок вариабельной области легкой цепи может содержать одну или более (например, одну, две, три и/или четыре) последовательностей каркасных участков вариабельной области легкой цепи (например, каркасный участок 1 (FW1), каркасный участок 2 (FW2), каркасный участок 3 (FW3) и/или каркасный участок 4 (FW4)), присутствующие в продукте или полученные из указанных генов человека. Предпочтительно указанный каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит FW1, FW2 и/или FW3, более предпочтительно FW1, FW2 и FW3, присутствующие в продукте или полученные из генов человека, выбранных из группы, состоящей из V3-11\*01 (SEQ ID №: 24), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №: 27) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28). В настоящей заявке последовательности каркасных участков вариабельных областей легкой цепи включают FW1 (положения с 1 по 23), FW2 (положения с 35 по 49), FW3 (положения с 57 по 88) и FW4 (положения с 98 по 108), причем положение аминокислоты указывается в соответствии с системой нумерации, установленной Кабатом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, содержащие каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), и причем указанный каркасный участок вариабельной области легкой цепи

содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего мышного антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, содержащие последовательность аминокислот легкой цепи согласно SEQ ID №: 32, причем каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего мышного антитела.

Предпочтительно модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 и/или делеции аминокислоты в положении 31, более предпочтительно замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 и/или делеции аминокислоты в положении 31, наиболее предпочтительно - замену аминокислоты в положении 46 и/или 47, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Конкретно, указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, и/или а делеции в T31, предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, более предпочтительно замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 33M, 34H, 46P, 47W и 71Y, и наиболее предпочтительной заменой является 46P, 47W, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

Согласно некоторым вариантам реализации предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с ОX40 человека, и содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: V2-70\*10 (SEQ ID №: 19), V2-70\*01 (SEQ ID №: 20), V2-70\*13 (SEQ ID №: 21), V2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и V2-70\*11 (SEQ ID №: 23), и каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: V3-11\*01 (SEQ ID №: 24), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №:

№: 27) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28), предпочтительно каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека V2-70\*10 (SEQ ID №: 19), и каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека V3-11\*01 (SEQ ID №: 24). Также настоящее изобретение включает комбинации каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи, которые присутствуют в продукте или получены из генов человека, упоминаемых выше, и/или каркасных участков вариабельной области легкой цепи, которые присутствуют в продукте или получены из генов человека, упоминаемых выше.

Последовательности ДНК эмбрионального типа для генов тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных последовательностей человека эмбрионального типа "VBase" (доступна в интернете на сайте [www.mrcspe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrcspe.cam.ac.uk/vbase)), а также в Kabat EA *et al.*,  *выше; Tomlinson IM et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 and Cox JPL *et al.*, (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. В качестве другого примера, последовательности ДНК эмбрионального типа для генов вариабельных областей тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных Genbank.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, в котором по меньшей мере один из CDR тяжелой цепи и/или один из CDR легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты. Модификации можно ввести при помощи сайт-направленного мутагенеза и ПЦР-опосредуемого мутагенеза, а действие на связывание антитела или другие рассматриваемые функциональные свойства можно оценивать при помощи проб *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Модификация(и) может включать замены, добавления или делеции аминокислот, но предпочтительны замены. Обычно в одном участке CDR проводят не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты.

Согласно определенным вариантам реализации для получения альтернативного антитела при конструировании вариабельных областей можно применять последовательности каркасных областей. Альтернативные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела, в которых в остатках каркасной области в VH и/или VK были

сделаны модификации, например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие модификации в каркасные области вносят, чтобы уменьшить иммуногенность антитела. Например, один подход состоит в «мутировании к первоначальному виду» одного или более остатков в каркасной области с возвратом к соответствующей последовательности мыши или в «мутировании к первоначальному виду» одного или более остатков в каркасной области с возвратом к соответствующей последовательности эмбрионального типа.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения также предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, в которых по меньшей мере одна из последовательностей каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела или его фрагмента содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышного антитела. Предпочтительно указанной модификацией аминокислоты является замена аминокислоты. Обычно в каркасной области проводят не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем указанная модификация аминокислоты в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Предпочтительно замена аминокислоты в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи охватывают положения аминокислот, выбранные из группы, состоящей из 23, 35b, 50, 60 и 62. Более предпочтительно замены аминокислот в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N и 62A, и наиболее предпочтительной заменой в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи является 35bG.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, причем по меньшей мере одна из последовательностей каркасных участков вариабельной области легкой цепи

гуманизированного антитела или его фрагмента содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего мышного антитела. Предпочтительно указанной модификацией аминокислоты является замена и/или делеция аминокислоты. Обычно в каркасном участке проводят не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной модификации аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены гуманизированное антитело или его фрагмент, причем указанная модификация аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 и/или делецию аминокислоты в положении 31. Более предпочтительные модификации аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи включают делецию в Y31 и/или замену, выбранную из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S и 71Y, причем положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату. Наиболее предпочтительные модификации аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи включают делецию в Y31 и/или замену, выбранную из группы, состоящей из 33M, 34H, 46P, 47W и 71Y, и особенно предпочтительны замены 46P и/или L47W. Согласно некоторым вариантам реализации указанное гуманизированное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению могут содержать модификации аминокислот в каркасных участках вариабельной области легкой цепи, которые указаны выше, и модификации аминокислот в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи, которые указаны выше.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58, 59, 79 и 80, и более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58 и 59. Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и которые содержат вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, и 89, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 60,

86, 87 и 89, более предпочтительно SEQ ID №: 60. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, и 89. При условии, что каждая из указанных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи могут связываться с OX40 человека, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи можно «объединять и комбинировать» для получения анти-OX40 связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Связывание с OX40 таких «объединённых и комбинированных» антител можно оценивать при помощи анализа связывания, например, описанного в примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58 и 59, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 60 и 89. Согласно более предпочтительным вариантам реализации антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 60, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 89, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 58, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 89, вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 59, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 60, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 59, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 89. Наиболее предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58 и 59, и вариабельную область легкой цепи,

содержащую последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 60.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 35, 36, 37 и 38, и более предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID №: 37 и 38.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 45, 46, 47 и 49, более предпочтительно SEQ ID №: 47. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38, и последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49. При условии, что каждая из указанных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи может связываться с OX40 человека, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи можно «объединять и комбинировать» для получения анти-OX40 связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Связывание с OX40 таких «объединенных и комбинированных» антител можно оценивать при помощи анализа связывания, например, описанного в примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 37 и 38, и содержат последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 47 и 49. Согласно более предпочтительным вариантам реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 37, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 47, последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №:

37, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 49, последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 47, или последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 49. Наиболее предпочтительно антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 37 и 38, и последовательность легкой цепи, содержащей последовательность аминокислот в соответствии с SEQ ID №: 47.

Согласно одному варианту настоящего изобретения указанное антагонистичное антитело или его фрагмент является мышным антителом, химерным антителом или гуманизированным антителом, предпочтительно гуманизированным антителом, более предпочтительно моноклональным антителом, моноклональным химерным антителом или моноклональным гуманизированным антителом.

Также согласно настоящему изобретению предложены одновалентное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, т.е. антитело, которое содержит один антигенсвязывающий фрагмент. Также согласно настоящему изобретению предложен фрагмент антитела, который связывается с OX40 человека, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')2, scFv, биспецифических одноцепочечных димеров Fv, диател, триател и фрагментов scFv, образованных посредством слияния генов одинаковых или разных антител. Предпочтительными фрагментами являются scFv, биспецифические одноцепочечные димеры Fv и диатела. Также согласно настоящему изобретению предложено полноразмерное антитело, которое связывается с OX40 человека.

Также согласно настоящему изобретению предложены антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые дополнительно содержат константную область тяжелой и/или легкой цепи, в частности константную область тяжелой и/или легкой цепи человека. Константные области тяжелой цепи человека можно выбирать из группы областей иммуноглобулинов человека, включая IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2),

IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD), or IgE (IGHE), и предпочтительна константная область IgG, в частности, IgG1 (IGHG1). Константные области легкой цепи человека можно выбирать из группы областей иммуноглобулинов человека, включая константные областиkapпа или лямбда, и предпочтительна константная область каппа. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 (IGHG1) человека и константный домен легкой цепи каппа человека.

В дополнение к, или в качестве альтернативы, модификациям, вносимым в каркасные области или участки CDR, можно сконструировать антитела согласно настоящему изобретению, которые будут включать модификации в области Fc, обычно, с целью изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полураспада в сыворотке, связывание комплемента, связывание с рецептором Fc и/или антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению можно модифицировать химическим путем (например, к антителу можно присоединить одну или более химических групп) или модифицировать так, чтобы изменилось его гликозилирование. Каждый из указанных вариантов реализации описан более подробно ниже. Модификации в области Fc, которые описаны ниже, соответствуют нумерации остатков ЕС в области Fc. Согласно одному варианту реализации шарнирную область CH1 модифицируют так, чтобы изменилось количество остатков цистеина в шарнирной области, например, чтобы оно уменьшилось или увеличилось. Данный подход описан дополнительно в Патенте США № 5 677 425, выданном Bodmer *et al.* Количество остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяют, например, чтобы облегчить сборку легких и тяжелых цепей или чтобы повысить или понизить стабильность антитела. Согласно другому варианту реализации шарнирную область Fc антитела подвергают мутации, чтобы снизить биологический период полураспада указанного антитела. Более конкретно вводят одну или более мутаций аминокислот в поверхностную область домена CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнира, чтобы антитело обладало сниженным связыванием белка А стафилококка (SpA) по сравнению со связыванием с SpA нативного домена Fc-шарнира. Данный подход описан более подробно в Патенте США № 6 165 745, выданном Ward *et al.* Согласно другому варианту реализации антитело модифицируют так, чтобы увеличить биологический период полураспада. Возможны разные подходы. Например, можно ввести одну или более

из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в Патенте США № 6 277 375, выданном Ward *et al.* В качестве альтернативы для увеличения биологического периода полураспада антитело можно изменить в пределах области CH1 или CL, чтобы они содержали эпитоп для связывания с рецептором «реутилизации», взятым из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в Патентах США № 5 869 046 и 6 121 022, выданных Presta *et al.* Согласно дополнительному варианту реализации область Fc изменяют путем замены по меньшей мере одного остатка аминокислоты другим остатком аминокислоты, чтобы изменить эффекторную функцию(и) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из остатков аминокислот 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322 можно заменить остатками других аминокислот так, чтобы антитело приобрело измененное средство в отношении лиганда-эффектора, но сохранило способность к связыванию антигена, характерную для исходного антитела. Лиганд-эффектор, в отношении которого изменяется средство, может быть, например, рецептором Fc или C1-компонентом комплемента. Данный подход описан более подробно в Патентах США № 5 624 821 и 5 648 260, оба из которых выданы Winter *et al.* Согласно другому примеру, одну или более аминокислот выбранных из остатков аминокислот в положениях 329, 331 и 322, можно заменить остатком другой аминокислоты, так, чтобы антитело обладало измененным связыванием C1q и/или сниженной или упраздненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Данный подход описан более подробно в Патенте США № 6 194 551, выданном Idusogie *et al.* Согласно другому примеру, одну или более аминокислот выбранных из остатков аминокислот в положениях 231 – 238 на N-конце домена CH2 изменяют, тем самым изменения способность указанного антитела к фиксации комплемента. Данный подход описан более подробно в Публикации PCT WO94/29351 авторов Bodmer *et al.* Согласно еще одному примеру область Fc модифицируют, повышая способность антитела к опосредованию антителзависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или повышая средство антитела к рецептору Fc $\gamma$  путем модификации одной или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Данный подход описан более подробно в Публикации PCT WO00/42072 автора Presta.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, и содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи человека, причем указанная константная область тяжелой цепи человека содержит изотипический вариант, содержащий область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3 из IgG4 (IGHG4) человека, и при этом указанная шарнирная область содержит замену серина в положении 228 на пролин. Предпочтительно указанное гуманизированное антитело, содержащее изотипический вариант, является полноразмерным антителом. Особо предпочтительные гуманизированное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, включают изотипический вариант, содержащий CH1 из IgG4 (IGHG4) человека, шарнирную область IgG4 (IGHG4) человека, содержащее замену S228P, а также CH2 и CH3 из IgG4 (IGHG4) человека, содержат последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 57, и последовательность легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 47. Было показано, что указанный изотипический вариант не проявляет механизмов Fc-опосредованной цитотоксичности, таких как ADCC, по сравнению с антагонистичным антителом или его фрагментом, которое связывается с OX40 человека, и которое содержит константную область тяжелой цепи из IgG1 (IGHG1) человека (которое обычно является нативным IgG1 человека), т.е. по сравнению с антагонистичным антителом или его фрагментом, которое связывается с OX40 человека, и которое отличается от изотипического варианта только модифицированной константной областью тяжелой цепи.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, которые содержат Fc область IgG человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG человека не содержит фукозы (альтернативно обозначается в настоящей заявке «не фукозилированная»). Предпочтительно указанное антитело содержит Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы. Более предпочтительно полноразмерное антитело, содержащее Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы. Из заявки WO03/035835 известно, что отсутствие фукозы в зрелой углеродной структуре, присоединенной к Fc области IgG человека, может приводить к повышению ADCC. Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации указанные антагонистичное

антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению содержат Fc область IgG1 (IGHG1) человека, причем зрелая углеводная структура, присоединенная к Fc области IgG1 (IGHG1) человека, не содержит фукозы, тогда как антитело, лишенное фукозы, проявляет повышенную ADCC по сравнению с исходным гуманизированным антителом или его фрагментом, которые не лишены фукозы. Способы получения антител, лишенных фукозы, включают, например (а) применение сконструированных мутантных клеток-хозяев, которые дефицитны по метаболизму фукозы, такие, которые обладают сниженной способностью (или отсутствием способности) к фукозилированию белков, экспрессируемых ими; (б) культивирование клеток в условиях, которые препятствуют фукозилированию или уменьшают его; (с) посттрансляционное удаление фукозы (например, при помощи фермента фукозидазы); (д) посттрансляционное добавление желаемого углевода, например, после рекомбинантной экспрессии негликозилированного гликопroteина; или (е) очищение гликопroteина таким образом, чтобы отобрать продукт, который не гликозилирован. Предпочтительно применяют способы, описанные в Примере 14 WO10/095031 например, способы, описанные у Longmore *et al.*, (1982) Carbohydr. Res. 365-92 или у Imai-Nishiya *et al.*, (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека и которые связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 8. Также согласно настоящему изобретению предложена специфическая область или эпитоп OX40 человека, в частности внеклеточный домен рецептора OX40 человека, который связывается антителом, предложенным в настоящем изобретении, в частности антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7 и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 8. Указанная специфическая область или эпитоп полипептида OX40 человека можно идентифицировать при помощи любого подходящего способа картирования эпитопов, известного в технике, в сочетании с любым одним из антител, предложенных согласно настоящему изобретению. Примеры таких способов включают скрининг пептидов разной длины, полученных из OX40, на связывание с антителом согласно настоящему изобретению, причем наименьший фрагмент, который может специфически связываться с антителом, содержит последовательность эпитопа,

распознаваемого указанным антителом. Пептиды ОХ40 можно получать путем синтеза или протеолитического расщепления полипептида ОХ40. Пептиды, которые связываются с указанным антителом, можно идентифицировать, например, посредством масс-спектрометрического анализа. Согласно другому примеру для идентификации эпитопа, связываемого антителом согласно настоящему изобретению, можно применять ЯМР-спектроскопию или рентгеновскую кристаллографию. После идентификации фрагмент-эпитоп, который связывается с антителом согласно настоящему изобретению, можно применять, например, в качестве иммуногена для получения дополнительных антагонистических антител, которые связываются с тем же эпитопом.

### **Свойства анти-ОХ40 антител**

В технике известны стандартные пробы для оценки связывающей способности, например, в отношении ОХ40 человека, включая ELISA, BIACore<sup>®</sup>, Вестерн-блот, РИА (радиоиммунный анализ) и проточную цитометрию. Подходящие пробы описаны более подробно в разделе «Примеры». Кинетику связывания (например, сродство связывания, например  $K_D$ ) антител также можно оценить при помощи стандартных проб, известных в технике, таких как системы анализа Scatchard или BIACore<sup>®</sup>. Относительно сродство связывания  $K_i$  можно оценить при помощи стандартного конкурентного анализа, известного в технике.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистические антитела или его фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека и которые блокируют реакцию смешанной культуры лимфоцитов (MLR) в зависимости от дозы, в большей степени, чем рекомбинантное гуманизированное антитело эфализумаб. Рекомбинантное гуманизированное антитело эфализумаб связывается с субединицей CD11a антигена 1, ассоциированного с функцией лимфоцитов. MLR можно проводить и измерять в соответствии с Примером 3.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистические антитела или его фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека, и которые также способны распознавать ОХ40 яванского макака. Связывание антагонистического анти-ОХ40 антитела с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) и человека, и яванского макака можно проводить и измерять в соответствии с Примером 4, и как показано на Фиг.3. Было показано, что указанное

антитело распознает OX40, экспрессируемый на поверхности активированных лимфоцитов человека и яванского макака, что указывает на то, что указанное антитело обладает свойством перекрестной реактивности.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека, в частности с OX40 человека в изолированной форме, со сродством ( $K_D$ ) 500 нМ или менее, предпочтительно 200 нМ или менее, более предпочтительно 150 нМ или менее, более предпочтительно 120 нМ или менее, и даже более предпочтительно 110 нМ или менее, измеренным, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIACore® («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария), за счет захвата антитела белком-А, соединенным с сенсорным чипом исследовательского класса CM5 («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария; BR-1000-14) с внеклеточным доменом рекомбинантного одновалентного рецептора OX40 человека (SEQ ID №: 11), применяемым в качестве определяемого вещества, как подробно описано в Примерах 5 и 6 и проиллюстрировано на Фиг.4. В настоящей заявке термин «моновалентный» применительно к измерению сродства с применением рецептора OX40 относится к домену рецептора OX40 человека, такому как внеклеточный домен, не димеризованному или мультимеризованному искусственно, как это могло бы быть, например, если указанный домен на N-конце был соединен с Fc-участком иммуноглобулина. Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения предложено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое сохраняет по меньшей мере 75% от сродства связывания ( $K_D$ ) с OX40, присущего соответствующему химерному антителу. Предпочтительно, указанное гуманизированное антитело или его фрагмент связывается с OX40 человека со сродством, равным сродству соответствующего химерного антитела. Под «равным сродством» понимают значение сродства, которое попадает в диапазон  $\pm 10\%$  от сродства связывания с OX40 соответствующего химерного антитела. Более предпочтительно согласно настоящему изобретению предложены гуманизированное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека с более высоким сродством, чем соответствующее химерное антитело. Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека и обладают сродством связывания ( $K_D$ ) 110 нМ или менее, предпочтительно 100 нМ или менее, более предпочтительно 90 нМ или менее, более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более

предпочтительно 70 нМ или менее, измеренным, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIACore® («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария), за счет захвата антитела белком-А, соединенным с сенсорным чипом исследовательского класса CM5 («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария; BR-1000-14) с внеклеточным доменом рекомбинантного одновалентного рецептора OX40 человека (SEQ ID №: 11), применяемым в качестве определяемого вещества, как подробно описано в Примерах 5 и 6 и проиллюстрировано на Фиг.4.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с OX40 человека, и которые обладают высокой термостабильностью. Согласно предпочтительному варианту реализации антагонистичное гуманизированное антитело или его фрагмент, которые связываются с OX40 человека, обладают термостабильностью фрагмента FAB выше 70°C, предпочтительно выше чем 75°C, более предпочтительно выше чем 80°C и даже более предпочтительно выше чем 85°C. Для анализа термостабильности фрагмента FAB применяют дифференциальную сканирующую калориметрию, поскольку определяют среднюю температуру плавления фрагмента FAB в контексте полноразмерного IgG. Данный вид калориметрических измерений известен специалистам в данной области техники и может проводиться, например, в соответствии с Garber & Demarest (2007), BBRC, 355: 751-7, как более подробно описано в Примере 6 и показано на Фиг.6.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения описаны антагонистичные антитела или их фрагменты, которые связываются с эпитопом внеклеточной области OX40 человека. Как описано в Примере 7, был осуществлен обмен одного или более доменов внеклеточной области OX40 между последовательностями человека и крысы, и были сгенерированы гибридные белки Fc. Затем проводили ELISA по оценке связывания с целью определения активности антагонистичного гуманизированного антитела в отношении внеклеточной области OX40 человека, внеклеточной области OX40 крысы и четырех химерных белков из последовательностей человека и крысы. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены антагонистичное антитело или его фрагмент, которые согласно данным картирования соответствуют второму домену внеклеточной области OX40 человека. Также согласно настоящему изобретению предложены антагонистичные антитела или их фрагменты, которые можно применять для подавления иммунных реакций. Действие антагонистичных гуманизированных анти-

OX40 антител оценивали в MLR (см. Пример 8), применяемой в качестве модели аллореактивной активации и пролиферации Т-лимфоцитов *in vitro* (O'Flaherty E *et al.*, (2000) Immunology, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) Adv. Immunol. 23: 107-202). PBMC от двух неродственных доноров смешивали, что приводило к активации и пролиферации Т-лимфоцитов. Кроме того, в данной пробе оценивали три разных формы антагонистичных гуманизированных анти-OX40 антител: форма IgG1 (IGHG1), не фукозилированная форма IgG1 (IGHG1) и форма IgG4 (IGHG4), чтобы дополнительно определить вклад механизмов цитотоксичности, таких как ADCC, в MLR. Указанные антагонистичные гуманизированные анти-OX40 антитела эффективно подавляли MLR у двух разных индивидуумов (субъектов, отвечающих на лечение) с ЭК<sub>50</sub> приблизительно 100 нг/мл. Однако результаты показали различие, зависящее от формы применяемого антитела. У первого индивидуума (субъект 1, отвечающий на лечение) реактивность Т-лимфоцитов эффективно подавлялась антителами в форме IgG1 (IGHG1) и IgG4 (IGHG4), что указывает на то, что механизмы цитотоксичности не важны для данного индивидуума. У второго индивидуума (субъект 2, отвечающий на лечение) форма IgG1 (IGHG1) продемонстрировала более 60% подавления, а форма IgG4 (IGHG4) лишь слабо блокировала MLR. У обоих индивидуумов не фукозилированная форма IgG1 (IGHG1) обладала высокой эффективностью в подавлении MLR. Данные результаты показывают, что активация блокирования OX40 может быть достаточной у некоторых индивидуумов для того, чтобы подавлять MLR, но данное действие можно существенно усилить посредством дополнительных механизмов цитотоксичности. Следовательно, для лечения пациентов, страдающих расстройствами, обусловленными OX40, когда указанное расстройство, по-видимому, не зависит от ко-стимулирующего статуса OX40 пациента, например, у пациентов с низким уровнем экспрессии OX40, введение антагонистического антитела или его фрагмента, которое связывается с OX40 человека и которое усиливает механизмы цитотоксичности, может быть особенно эффективным. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предложено антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с OX40 человека, для лечения пациента, страдающего расстройством, обусловленным OX40. Кроме того, у пациента может быть низкий уровень экспрессии OX40. Предпочтительно указанное антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с OX40 человека, содержит область IgG1 (IGHG1). Более предпочтительно указанное антагонистичное

гуманизированное антитело, которое связывается с OX40 человека, содержит не фукозилированную область IgG1.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения действие антагонистичного антитела или его фрагмента было продемонстрировано в реакции «аллогенный трансплантат против хозяина», при которой создавали мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) при помощи РВМС человека. Данная реакция представляет собой модель реакции «аллогенный трансплантат против хозяина» (GVHD), наблюдаемой после пересадки костного мозга у людей. В данной модели РВМС человека, и Т-лимфоциты в частности, запускают сильную реакцию против клеток-хозяев мыши, что приводит к тяжелым симптомам воспаления. Как описано в Примере 9 и показано на Фиг.9 и в Таблице 10, антагонистичное гуманизированное антитело, которое связывается с OX40 человека, сильно подавляет реакцию GVHD в дозе 1 мг/кг. Неожиданно, что данное антитело продемонстрировало более высокую эффективность, чем Энбрел® - признанное средство от GVHD (Xhaard A *et al.*, (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Следовательно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека и которое эффективно при лечении GVHD. Предпочтительно, введение указанного антитела субъекту приводит к четырехкратному повышению средней выживаемости (в днях) по сравнению с введением основы. Более предпочтительно, введение указанного антитела субъекту приводит к двукратному повышению средней выживаемости (в днях) по сравнению с введением Энбрел®. Следовательно, согласно настоящему изобретению предложено антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, которое более эффективно, чем Энбрел®, при лечении пациента с GVHD и/или при подавлении GVHD. Кроме того, сообщалось, что агонистичные анти-OX40-связывающие антитела усугубляют GVHD в моделях аллогенной GVHD у мышей (Valzasina B *et al.*, (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR *et al.*, (2003) Blood, 101(9): 3741-8), следовательно, из Примера 9 можно заключить, что антагонистичные антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению не демонстрируют агонистичных эффектов в отношении связывания OX40 человека, поскольку в данной модели не наблюдалось усугубления GVHD. Следовательно, согласно настоящему изобретению

предложено гуманизированное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека и которое не демонстрирует агонистичной активности в отношении связывания.

### **Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева**

Также согласно настоящему изобретению предложены изолированные /выделенный нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные антитела и их фрагменты, которые связываются с ОХ40 человека, векторы и клетки-хозяева, содержащие указанную нуклеиновую кислоту или вектор. Указанные нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в лизате клеток, в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является «изолированной/выделенной» или «рассматривается по существу чистой», когда она очищена от других клеточных компонентов или других примесей, например, других нуклеиновых кислот или белков клетки, при помощи стандартных технологий, включая обработку щелочью/SDS (додецилсульфат натрия), бэндинг CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез на агарозном геле и другие хорошо известные в технике способы, например, см. F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновыми кислотами согласно настоящему изобретению могут быть, например, ДНК или РНК, и они могут содержать или не содержать инtronных последовательностей. Согласно предпочтительному варианту реализации нуклеиновой кислотой является молекула  $\kappa$ ДНК.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно получать при помощи стандартных молекулярно-биологических технологий, например,  $\kappa$ ДНК, кодирующую легкие и тяжелые цепи указанного антитела или кодирующую сегменты VH и VL, можно получить посредством стандартной ПЦР-амплификации или клонирования  $\kappa$ ДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с применением технологий фагового отображения), одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, можно извлечь из указанной библиотеки. Способы введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева хорошо известны в технике, и могут варьировать в зависимости от применяемой клетки-хозяина. Технологии включают без ограничений опосредуемую декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, обработку хлоридом кальция, опосредуемую полиэтиленимином трансфекцию, опосредуемую полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инфицирование вирусом или фагом, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую

микроинъекцию ДНК в ядра клеток. В случае клеток млекопитающих трансфекция может быть временной или стабильной.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению – это молекулы, кодирующие последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 32, 33, 34, 35, 36, 37 и 38 и/или последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49. Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению – это молекулы, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 29, 58, 59, 77, 78, 79 и 80, и/или вариабельную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 30, 60, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 и 89.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению – это молекулы, кодирующие вариабельную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID №: 8 и/или вариабельную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID №: 7, например, ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID №: 9, и/или ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID №: 10. Более предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению являются молекулы, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID №: 58 или 59, и/или вариабельную область легкой цепи в соответствии с SEQ ID №: 60, например, ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID №: 61 или 62, и/или ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID № 63, которые являются наиболее предпочтительными.

После того, как получены фрагменты ДНК, кодирующие сегменты VH и VL, с указанными фрагментами ДНК можно проводить дальнейшие манипуляции при помощи стандартных технологий рекомбинантных ДНК, например, превращать гены вариабельных областей в гены цепей полноразмерного антитела, или в гены фрагментов, соответствующие фрагментам, описанным выше, таким как гены фрагментов Fab или ген scFv. В ходе указанных манипуляций фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связывают с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой

как константная область антитела или гибкий линкер. Подразумевается, что в данном контексте термин «функционально связанный» должен означать, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что последовательности аминокислот, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются внутри рамки. Изолированную ДНК, кодирующую область VH, можно превратить в ген полноразмерной тяжелой цепи, функционально связав ДНК, кодирующую VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константных областей тяжелых цепей человека известны в технике (например, см. Kabat EA *et al.*, *выше*), и фрагменты ДНК, охватывающие данные области, можно получить при помощи стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может быть константной областью IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) или IgE (IGHE), но наиболее предпочтительная константная область IgG1 (IGHG1). Для гена фрагмента Fab тяжелой цепи ДНК, кодирующую VH, можно функционально связать с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область тяжелой цепи CH1. Изолированную ДНК, кодирующую область VL, можно превратить в ген полноразмерной легкой цепи (а также в ген Fab легкой цепи), функционально связав ДНК, кодирующую VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области легкой цепи - CL. Последовательности генов константных областей легких цепей человека известны в технике (например, см. Kabat EA *et al.*, *выше*), и фрагменты ДНК, охватывающие данные области, можно получить при помощи стандартной ПЦР-амплификации. Согласно предпочтительным вариантам реализации константной области легкой цепи может быть константная область каппа или лямбда, предпочтительно константная область каппа. Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий последовательность аминокислот (Gly4 -Ser)3, так, чтобы последовательности VH и VL можно было экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями VH и VL, соединенными указанным гибким линкером (например, см., Bird RE *et al.*, (1988) Science, 242: 423-426; Huston JS *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83; McCafferty J *et al.*, (1990) Nature, 348: 552-554). Для получения фрагментов антител были разработаны разные технологии. Традиционно данные фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (например, см., Morimoto K *et al.*, (1992) J. Biochem. & Biophysical Methods, 24: 107-117 and Brennan M *et al.*, (1985) Science, 229: 81-3). Однако указанные фрагменты теперь можно получать напрямую в клетках-хозяевах. Например, указанные

фрагменты антител можно выделить из библиотек антител фагов, обсуждаемых выше. В качестве альтернативы фрагменты Fab'-SH можно напрямую восстановить из *E.coli* и химическим путем соединить так, чтобы образовались фрагменты F(ab')<sub>2</sub> (Carter P *et al.*, (1992) Bio/Technology, 10: 163-167). Согласно другому подходу фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно выделить напрямую из культуры клеток-хозяев. Специалистам в данной области техники будут очевидны другие технологии для получения фрагментов антител. Согласно другим вариантам реализации антителом выбора является одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), например, см., WO 1993/16185; Патент США № 5 571 894 и Патент США № 5 587 458. Указанным фрагментом антитела может быть также «линейное антитело», например, как описано в Патенте США № 5 641 870.

Нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитела согласно настоящему изобретению, можно включать в вектор, предпочтительно вектор экспрессии, чтобы экспрессировать указанный белок. Для экспрессии белков можно применять разные вектора экспрессии. Вектора экспрессии могут включать самореплицирующиеся внекромосомные векторы или векторы, которые интегрируются в геном хозяина. Вектора экспрессии конструируют так, чтобы они были совместимы с типом клетки-хозяина. Таким образом, векторы, предпочтительно векторы экспрессии, которые находят применение при реализации настоящего изобретения, включают без ограничений векторы, которые способны к экспрессии белков в клетках млекопитающих, бактерий, клетках насекомых, дрожжей и в системах *in vitro*. Как известно в технике, доступны разные векторы экспрессии, в продаже или получаемые другим путем, которые могут находить применение при реализации настоящего изобретения для экспрессии антител. Обычно векторы экспрессии содержат белок, функционально связанный с контролирующими или регуляторными последовательностями, селектируемыми маркерами, любыми партнерами слияния и/или дополнительными элементами. В настоящей заявке термин «функционально связанный» означает, что нуклеиновая кислота находится в функциональной взаимосвязи с последовательностью другой нуклеиновой кислоты. Подразумевается, что термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигнал полигиденирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Как правило, указанные

векторы экспрессии включают нуклеиновую кислоту для регуляции транскрипции или трансляции, функционально связанную с нуклеиновой кислотой, кодирующей указанное антитело, и они обычно соответствуют клетке-хозяину, применяемой для экспрессии белка. Как правило, последовательности для регуляции транскрипции или трансляции могут включать последовательности промоторов, сайты связывания рибосом, последовательности инициации и остановки транскрипции, последовательности инициации и остановки трансляции, а также последовательности энхансеров и активаторов. Как также известно в технике, векторы экспрессии обычно содержат ген селекции или маркер, который позволяет проводить отбор трансформированных клеток-хозяев, содержащих указанный вектор экспрессии. Гены селекции хорошо известны в технике и могут варьировать в зависимости от применяемых клеток-хозяев. Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарственным препаратам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клеткам-хозяевам, в которые он был введен. Предпочтительные гены селектируемых маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР) (для применения в dhfr- клетка-хозяевах с селекцией/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген neo (для селекции в присутствии G418).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в настоящей заявке, являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Подходящие прокариоты для данной цели включают эубактерии, включая грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescens* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa* и *Streptomyces*. Подходящие хозяева для клонирования на основе *E. coli* включают *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Помимо прокариот подходящими микроорганизмами-хозяевами для клонирования или экспрессии являются эукариотические микроорганизмы, такие как гифомицеты или дрожжи. Наиболее часто среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев применяются *Saccharomyces cerevisiae*, или простые пекарские дрожжи. Однако доступен и широко применяется целый ряд других родов, видов и штаммов, такие как хозяева *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, включая *K. lactis*,

*K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. WalIH* (AJCC 56,500), *K. drosopimarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, or *K. marxianusyarrowia* (EP402226); *Pichia pastoris* (EP183070); *Candida*; *Trichoderma reesiae* (EP244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и гифомицеты, включая *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, или хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* или *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител согласно настоящему изобретению получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки плавиль и насекомых. Был идентифицирован целый ряд штаммов и вариантов бакуловируса и соответствующих допускающих их введение клеток-хозяев насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (фруктовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступны разные штаммы вирусов для трансфекции, например, L-1 вариант NPV *Autographa californica* и штамм Bm-5 NPV *Bombyx mori*, и такие вирусы можно применять, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять культуры клеток растений – хлопка, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, томата и табака.

Клетками-хозяевами для экспрессии рекомбинантных антител согласно настоящему изобретению предпочтительно являются клетки-хозяева млекопитающих, которые включают клетки яичника китайского хомячка (клетки СНО) (включая dhfr<sup>-</sup> клетки СНО, описанные у Urlaub G & Chasin LA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220, применяемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано у Kaufman RJ & Sharp PA (1982) J. Mol. Biol., 159: 601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности для применения с клетками миеломы NSO предпочтительна другая система экспрессии – система экспрессии генов GS, раскрываемая в патентах WO 87/04462 (выданном Wilson), WO 89/01036 (выданном Bebbington) и EP338841 (выданном Bebbington). Когда в клетки-хозяева млекопитающих вводят гены рекомбинантных антител, указанные антитела вырабатываются культивируемыми клетками-хозяевами в течение периода времени, достаточного для экспрессии указанного антитела в указанной клетке-хозяине, или, более предпочтительно, для секреции указанного антитела в питательную среду, в которой растут клетки-хозяева. Клетки-хозяева, применимые при

получении антител, которые связываются ОХ40 человека, можно культивировать в разных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят имеющиеся в продаже среды, такие как Ham's F10 («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария), минимальная питательная среда (MEM; «Sigma-Aldrich Chemie GmbH»), RPMI-1640 («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Базель, Швейцария) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM; «Sigma-Aldrich Chemie GmbH»). Антитела можно выделять из питательной среды при помощи стандартных способов очистки белков.

Антитела можно функционально связывать с партнерами по слиянию, чтобы было возможно направленное движение экспрессируемого белка, его очистка, скрининг, отображение и т.п. Партнеров по слиянию можно присоединять к последовательности антитела линкерными последовательностями. Линкерные последовательности, как правило, содержат небольшое число аминокислот, обычно менее десяти, хотя можно также применять и более длинные линкеры. Обычно линкерные последовательности выбирают так, чтобы они были гибкими и устойчивыми к разрушению. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, в качестве линкеров можно применять любую из широкого спектра последовательностей. Например, обычная линкерная последовательность содержит последовательность аминокислот GGGGS. Партнер по слиянию может быть направляющей или сигнальной последовательностью, которая направляет антитело и любые ассоциированные партнеры по слиянию в желательную локализацию клетки или во внеклеточную среду. Как известно в технике определенные сигнальные последовательности могут направлять белок, чтобы он либо секретировался в питательную среду, либо в периплазматическое пространство, расположенное между внутренним и наружным слоем мембранны клетки. Также партнером по слиянию может быть последовательность, которая кодирует пептид или белок, которые создают возможность для очистки или скрининга. Такие партнеры по слиянию включают без ограничений полигистидиновую метку (His-метки) (например, R6 или R10, или другие метки для применения в системах аффинной хроматографии с иммобилизованными металлами (IMAC) (например колонки для аффинной хроматографии с  $Ni^{+2}$ ), слияния GST, слияния MBP, шаговая метка, направляющая последовательность для биотинилирования BSP бактериального фермента BirA, и метки эпитопов, на которые направлены антитела (например, метки с-тус, метки-флажки и подобные). Как должно

быть понятно специалистам в данной области техники, такие метки могут быть полезны при очистке, скрининге или и при том, и при другом.

### **Конструирование и получение антител**

Антитела, направленные против полипептида ОХ40, можно получать путем иммунизации животного, т.е., путем введения указанных полипептидов животному, желательно не человеку, с применением хорошо известных и стандартных протоколов, см., например, *Handbook of Experimental Immunology* (Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Можно иммунизировать многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако, как правило, наиболее подходящим объектом являются мыши, кролики, свиньи и крысы, особенно мыши. Антитела можно получать также при помощи технологий рекомбинантных ДНК, известных специалистам в данной области техники. Кроме того, антитела можно получать путем ферментативного или химического расщепления существующих в природе антител. Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать путем переноса одного или более CDR или их частей из областей VH и/или VL животного, отличного от человека (например, мыши), в одну или более каркасные области VH и/или VL человека. Необязательно, остатки каркасных областей антитела человека, таким образом присутствующих в областях VH и/или VL, можно заменять соответствующими остатками из нечеловеческого антитела, когда требуется или желательно снизить иммуногенность антитела и/или сохранить сродство связывания. Необязательно, остатки аминокислот из нечеловеческого антитела, присутствующие в CDR, можно заменить остатками аминокислот из антитела человека. Химерные или гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно получить на основе последовательности нечеловеческого моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получить из нечеловеческой гибридомы и сконструировать так, чтобы она содержала последовательности не мышиных (например, человеческих) иммуноглобулинов, при помощи стандартных способов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области антитела мыши можно соединить с константными областями антитела человека с применением способов, известных в технике (например, см. Патент США № 4 816 567, выданный Cabilly *et al*). Для создания гуманизированного антитела области CDR антитела мыши можно встроить в каркас антитела человека с применением способов, известных в технике (например, см. Патент

США № 5 225 539, выданный Winter, и Патенты США № 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 и 6 180 370, выданные Queen *et al*).

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать, причем молекулу-акцептор человека для введения вариабельной области тяжелой цепи выбирают на основании рассмотрения гомологии между вариабельными областями потенциальной молекулы-акцептора и вариабельной областью тяжелой цепи антитела мыши. Предпочтительны кандидаты из числа молекул-акцепторов человека эмбрионального типа, чтобы снизить потенциальную иммуногенность. Создают базы данных последовательностей антител эмбрионального типа, которые просматриваются до конца области FW3 тяжелой цепи и частично в последовательности CDR3. Для выбора области FW4 в базах данных последовательностей зрелых антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа, можно проводить поиск последовательностей антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа из молекул-доноров человека. Молекулы-доноры человека предпочтительно выбирают из тяжелых цепей того же класса, что молекула-донор мыши, и из того же канонического структурного класса, что и молекула-донор мыши. Дополнительные соображения для выбора молекулы-донора человека для получения вариабельной области тяжелой цепи включают гомологию по всей длине CDR между молекулой-донором мыши и молекулой-акцептором человека. Молекулы-акцепторы человека предпочтительно выбирают посредством поиска гомологии в базе данных V-BASE, хотя также можно применять другие базы данных, такие как Кабат и общедоступная база NCBI.

Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению можно сконструировать, причем молекулу-акцептор человека для получения вариабельной области легкой цепи выбирают на основании соображений гомологии между вариабельными областями потенциальной молекулы-акцептора и вариабельной областью легкой цепи антитела мыши. Предпочтительны кандидаты из числа молекул-акцепторов человека эмбрионального типа, чтобы снизить потенциальную иммуногенность. Создают базы данных последовательностей антител эмбрионального типа, которые просматриваются до конца области FW3 тяжелой цепи и частично в последовательности CDR3. Для выбора области FW4 в базах данных последовательностей зрелых антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа, можно проводить поиск

последовательностей антител, которые были получены из отобранных молекул эмбрионального типа из молекул-доноров человека. Молекулы-доноры человека предпочтительно выбирают из легких цепей того же класса, что молекула-донор мыши, и из того же канонического структурного класса, что и молекула-донор мыши. Дополнительные соображения для выбора молекулы-донора человека для получения вариабельной области легкой цепи включают гомологию по всей длине CDR между молекулой-донором мыши и молекулой-акцептором человека. Молекулы-акцепторы человека предпочтительно выбирают посредством поиска гомологии в базе данных V-BASE, хотя также можно применять другие базы данных, такие как Кабат и общедоступная база NCBI. Способы гуманизации нечеловеческих антител описаны в настоящей заявке, включая Пример 6, ниже.

Согласно настоящему изобретению предложен способ получения антагонистичного антитела или его фрагмента, которое связывается с ОХ40 человека, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека, или вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека, так что нуклеиновая кислота экспрессируется, и образуется указанное антитело. Предпочтительно указанное антитело является изолированным. В том, что касается клеток-хозяев, нуклеиновых кислот и векторов, можно применять те клетки, нуклеиновые кислоты и векторы, которые были описаны выше. Экспрессии указанных нуклеиновых кислот можно добиться, например, путем сочетания технологий рекомбинантных ДНК и способов трансфекции генов, которые хорошо известны в технике (например, Morrison S (1985) Science 229: 1202) и также охарактеризованы выше. Например, для экспрессии антител или фрагментов антител можно получить ДНК, кодирующую часть или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, при помощи стандартных молекулярно-биологических технологий (например, ПЦР-амплификация или клонирование кДНК при помощи гибридомы, которая экспрессирует рассматриваемое антитело), и указанную ДНК можно встроить в векторы, такие как векторы экспрессии. Векторы экспрессии и последовательности для контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, применяемой при экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в отдельный вектор, или, что бывает чаще, оба гена встраивают в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела

встраивают в вектор экспрессии при помощи стандартных способов (например, лигирование комплементарных сайтов рестрикции во фрагмент гена антитела и вектор, или лигирование тупых концов, если отсутствуют сайты рестрикции). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, описанных в настоящей заявке, можно применять для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа путем встраивания их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжелых цепей и константные области легких цепей желаемого изотипа, такие как сегмент VH, функционально связанный с сегментом(ами) CH1 в указанном векторе, и сегмент VK, функционально связанный с сегментом CK в указанном векторе.

### **Описание свойств и очистка анти-OX40 человека**

Скрининг антител можно проводить при помощи проб, основанных на измерении связывания с OX40 человека, и/или проб, основанных на измерении способности к блокированию связывания OX40 с его лигандом, OX40L. Примером анализа связывания является ELISA, в частности, с применением гибридного белка OX40 человека и Fc человека, который иммобилизован на планшетах, и с применением конъюгированного вторичного антитела для определения анти-OX40 антитела, связанного с указанным гибридным белком. Примером анализа блокирования является проточная цитометрия, основанная на пробе, в которой измеряют блокирование связывания гибридного белка-лиганда OX40 с OX40 на поверхности клеток CD4. Для определения количества связанного с клетками гибридного белка-лиганда OX40 применяют вторичное антитело с флуоресцентной меткой. В данной пробе ожидается снижение сигнала, если указанное антитело в надосадочной жидкости блокирует связывание гибридного белка-лиганда с OX40. Еще одним примером анализа блокирования является проба, в которой блокирование совместного стимулирования интактных Т-лимфоцитов человека гибридным белком-лигандом OX40, нанесенным на планшет, измеряют путем оценки включения тимицина. В качестве пробы для оценки функциональной активности анти-OX40 антител, можно применять, например, снижение активации Т-лимфоцитами реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR), как описано в Примерах 3 и 8. Антитела согласно настоящему изобретению можно изолировать или очищать разными путями, известными специалистам в данной области техники. Стандартные способы очистки включают хроматографические способы, включая обменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, аффинную хроматографию, разделение по размеру или гель-фильтрацию, а также хроматографию с обращенной фазой, проводимые

при атмосферном давлении или при высоком давлении с применением таких систем, как жидкостная хроматография быстрого разрешения (ЖХБР) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Способы очистки также включают электрофорез, иммунологические способы, осаждение, диализ и способы хроматофокусирования. Также применимы способы ультрафильтрации и диафильтрации. Для очистки антител к ОХ40 выбранные клетки-хозяева можно выращивать, например, в роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Надосадочную жидкость можно фильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с применением сепарозы-белка А («Pharmacia», г. Пискатауэй Нью-Джерси). Десорбированные антитела можно проверять посредством гель-фильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы обеспечить чистоту. Таким образом, предпочтительное антитело согласно настоящему изобретению является изолированным и/или очищенным антителом, которое связывается с ОХ40 человека.

### **Иммуноконъюгаты**

Согласно другому аспекту настоящему изобретению предложено антагонистичное антитело к ОХ40 или его фрагмент, которое связывается с ОХ40 человека, соединенное с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Такие конъюгаты в настоящей заявке называют «иммуноконъюгатами». Иммуноконъюгаты, которые включают в себя один или более цитотоксинов, называют «иммунотоксинами». Термин «цитотоксин» или «цитотоксический агент» включает любой агент, который вреден для клеток (например, убивает их). Примеры цитотоксинов включают таксол, цитохалазин В, грамидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винblastин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксантрацен дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюокртикоиды, прокайн, тетракаин, лидокаин, пропанолол и пуромицин, а также их аналоги и гомологи. Терапевтические агенты также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэатмин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, карmustин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклоfosфамид, бусульфан, дигидрофолатредуктазин, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) ((DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее – дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее – актиномицин), блеомицин, митрамицин и

антрамицин (AMC)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин). Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно соединять с антителом согласно настоящему изобретению включают дуокармицины, калихемицины, майтансины и ауристатины, и их производные. Примером конъюгата калихемицина и антитела является имеющийся в продаже препарат Милотарг(R) («American Home Products»). Цитотоксины можно соединять с антителами согласно настоящему изобретению при помощи технологии линкеров, применимой в технике. Примеры типов линкеров, которые применялись для конъюгирования цитотоксина с антителом включают без ограничений гидразоны, тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептид-содержащие линкеры. Линкер можно выбрать таким образом, чтобы, например, он поддавался расщеплению под действием низкого pH в лизосомальном компартменте или поддавался расщеплению протеазами, такими как протеазы, преимущественно экспрессируемые в ткани опухоли, такие как катепсины (например, катепсины B, C, D). Более подробное обсуждение типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических агентов с антителами можно также найти в Saito G *et al.*, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail PA *et al.*, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne G (2003) *Cancer Cell*, 3: 207-212; Allen TM (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2: 750-763; Pastan I & Kreitman RJ (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3: 1089-1091; Senter PD & Springer CJ, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264. Антитела согласно настоящему изобретению также можно соединять с радиоактивным изотопом с целью генерирования цитотоксичных радиофармацевтических препаратов, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностике или терапии, включают без ограничений йод<sup>131</sup>, индий<sup>111</sup>, иттрий<sup>90</sup> и лютейций<sup>177</sup>. Способы получения иммуноконъюгатов установлены в технике. Примеры радиоиммуноконъюгатов есть в продаже, включая Зевалин® («EDEC Pharmaceuticals») и Бексар® («Corixa Pharmaceuticals»), и аналогичные способы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов с применением антител согласно настоящему изобретению. Иммуноконъюгаты с антителами согласно настоящему изобретению можно применять для модификации конкретной биологической реакции, и функциональную группу препарата не обязательно конструировать, ограничиваясь классическими химическими лекарственными препаратами. Например, функциональной группой лекарственного препарата может быть белок или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин с ферментативной активностью, или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин

синегнойной палочки или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон- $\gamma$ ; или модификаторы биологической реакции, например, такие как лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы.

Технологии соединения таких терапевтических агентов с антителами хорошо известны, см, например, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.*, (eds.), pp. 243- 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.*, (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.*, (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe PE & Ross WC (1982) Immunol. Rev. 62: 119-58.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антагонистичное антитело к OX40 или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, вводимое вместе с терапевтическим агентом, таким как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксин.

### **Фармацевтические композиции**

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая антагонистичное антитело или его фрагмент, согласно настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемую основу. Такие композиции могут включать одно или сочетание (например, два или более разных) антител, и/или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению и/или терапевтический агент, такой как цитотоксин, лекарственный препарат (например, иммуносупрессор) или радиотоксины, описанные выше. Например, фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать сочетание антител (или иммуноконъюгатов), которые связываются с разными эпитопами на целевом антигене, или которые обладают взаимодополняющим действием. Фармацевтические композиции

согласно настоящему изобретению также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е., в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антагонистичное антитело к OX40 согласно настоящему изобретению в сочетании по меньшей мере с одним другим противовоспалительным агентом или иммуносупрессором.

В настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемая основа/носитель» включает любые и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, противомикробные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание объекты, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, указанная основа подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального введения, введения в спинной мозг или внутрикожного введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело или иммуноконъюгат, можно покрывать определенным материалом, чтобы защитить указанное соединение от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать указанное соединение. Фармацевтически приемлемые основы включают стерильные водные растворы или дисперсионные среды, а также стерильные порошки для приготовления растворов для инъекций или дисперсий непосредственно перед применением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в технике. За исключением тех случаев, когда традиционная среда или агент несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению включено в заявку. Также можно включать в указанные композиции дополнительные активные соединения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая иммуноконъюгат, содержащий антагонистичное антитело или его фрагмент, которое связывается с OX40 человека, присоединенное к терапевтическому агенту, и фармацевтически приемлемую основу. Иммуноконъюгаты и терапевтические агенты, которые можно применять, описаны выше.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая антагонистичное антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению, которая также содержит другой фармацевтически активный агент. Предпочтительно, таким другим фармацевтически активным агентом

является один или более из: а) другой антагонист ОХ40 человека, б) анальгезирующий агент и с) иммуносупрессор, например, глюкокортикоид, такой как преднизон.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может также включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия и подобные; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбильпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и подобные; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиамин-тетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и т.п. Примеры подходящих водных и неводных основ, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытий, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, и путем применения поверхностно-активных веществ. Также указанные композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Для обеспечения отсутствия микроорганизмов можно применять как процедуры стерилизации, как указано выше, так и включать разные противомикробные и противогрибковые агенты, например, парабен, хлорбутанол, фенолсорбиновую кислоту и т.п. Также может быть желательно включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. в композиции. Кроме того, можно создать лекарственную форму для инъекций с замедленным всасыванием путем включения агентов, которые замедляют всасывание, такие как моностеарат алюминия и желатин.

### **Применение в терапии и другие способы применения**

Антагонистические антитела согласно настоящему применению можно применять в целом ряде областей для диагностики и терапии *in vitro* и *in vivo*, включая диагностику и лечение ОХ40-, опосредованных расстройств. Например, указанные молекулы можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или людям, например, *in vivo*, для лечения,

профилактики и диагностики разных ОХ40-, опосредованных расстройств. Предпочтительно субъектами являются люди, и они включают пациентов, страдающих расстройствами, , опосредованными активностью ОХ40 (ОХ4- опосредованные расстройства). Антагонистичные антитела согласно настоящему изобретению могут быть эффективны при лечении пациентов, независимо от их ко-стимулирующего статуса в отношении ОХ40. Более предпочтительными субъектами являются люди, и они включают пациентов, экспрессирующих низкий уровень ОХ40.

Термин «пациент» в целях настоящего изобретения включает как людей, так и животных, предпочтительно млекопитающих, и наиболее предпочтительно – людей. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению имеют применение как при лечении людей, так и в ветеринарии. Подразумевается, что термин «лечение» в контексте настоящего изобретения должен включать терапевтическое воздействие, а также профилактические или сдерживающие меры в отношении заболевания или расстройства. Таким образом, например, успешное введение антитела до начала заболевания приводит к лечению указанного заболевания. Согласно другому примеру успешное введение антитела после начала клинических проявлений заболевания с целью борьбы с симптомами указанного заболевания включает лечение заболевания. Также термин «лечение» включает введение антитела после проявления заболевания с целью устранения заболевания. Успешное введение антитела после начала заболевания, и после того, как развились симптомы, с возможным смягчением клинических симптомов, и вероятно, ослаблением заболевания, включает лечение заболевания. Субъекты «нуждающиеся в лечении» включают млекопитающих, у которых уже есть заболевание или расстройство, а также субъектов, склонных к развитию указанного заболевания или расстройства, включая тех субъектов, у которых указанное заболевание или расстройство требуется предотвратить.

Согласно конкретным вариантам реализации антагонистичные антитела применяют *in vivo* для лечения, профилактики или диагностики разных ОХ40-, опосредованных расстройств. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения ОХ40-опосредованного расстройства у субъекта, способ, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества указанного антагонистического антитела или его фрагмента. Примеры ОХ40-опосредованных расстройств включают инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую

обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псoriasis, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунныйuveit, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпурну, синдром Меньера, пузырчатку, первичный биллиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, панкреатит, травму (операцию), реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелит зрительного нерва.

Другие примеры ОХ40-опосредованных расстройств включают инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, бронхит, грипп, респираторно-синцитиальный вирус, пневмонию, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), идиопатический фиброз легких (ИФЛ), криптогенный фиброзирующий альвеолит (КФА), идиопатическую фиброзирующую интерстициальную пневмонию, эмфизему, воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псoriasis, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунныйuveit, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпурну, синдром Меньера, пузырчатку, первичный биллиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, панкреатит, травму (операцию), реакцию «трансплантат против

хозяина» (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелит зрительного нерва.

Предпочтительные OX40-опосредованные расстройства, которые требуется лечить при помощи антитела согласно настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из множественного склероза, ревматоидного артрита, колита, псориаза, астмы, ХОБЛ, ИФЛ, реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD), атеросклероза и диабета. Особенно предпочтительными OX40-опосредованными расстройствами, которые требуется лечить при помощи антитела согласно настоящему изобретению, являются реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD).

Также согласно настоящему изобретению предложены антитела для применения при лечении боли, в особенности боли, ассоциированной с воспалением.

Согласно одному варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению можно применять для определения уровня OX40 или уровня клеток, которые содержат OX40 на своей мемbrane, причем указанный уровень можно затем связать с определенными симптомами заболевания. В качестве альтернативы, указанные антитела можно применять для подавления или блокирования функции OX40, которое, в свою очередь можно связать профилактикой или облегчением определенных симптомов заболевания, привлекая OX40 в качестве медиатора указанного заболевания. Этого можно достичь путем контакта пробы и контрольной пробы с антителами к OX40 при условиях, при которых возможно образование комплекса между антителом и OX40. Любые комплексы, образовавшиеся между указанным антителом и OX40, определяют и сравнивают в пробе и контроле. В свете специфического связывания антител согласно настоящему изобретению с OX40, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для специфического определения экспрессии OX40 на поверхности клеток, например, можно применять для определения пациента с низким уровнем экспрессии OX40. Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для очистки OX40 посредством иммуноаффинной очистки.

Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложен способ скрининга *in vitro* для определения пациента с низким уровнем экспрессии OX40, включающий этапы:

- (a) очистки мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от других компонентов пробы крови пациента;
- (b) подвергание PBMC проточной цитометрии; и
- (c) определение количества OX40-позитивных клеток среди CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и сравнение указанного количества с контрольными уровнями.

Согласно предпочтительному варианту реализации на низкий уровень экспрессии OX40 указывает увеличение уровня экспрессии в OX40-позитивных клетках по сравнению с контролльным уровнем до 10%, более предпочтительно до 20% и еще более предпочтительно до 30%. Способ определения экспрессии OX40 также описан подробно у Kotani A *et al.*, (2001) Blood, 98: 3162-4 and Xiaoyan Z *et al.*, (2005) Clin. Exp. Immunol. 143: 110-6.

Согласно другому варианту реализации антитела согласно настоящему изобретению можно сначала оценивать в отношении их активности связывания, ассоциированной с терапевтическим или диагностическим применением *in vitro*. Например, композиции согласно настоящему изобретению можно оценивать при помощи проточной цитометрии.

Также согласно настоящему изобретению предложено применение антагонистического антитела или его фрагмента в качестве лекарственного препарата и применение антагонистического антитела или его фрагмента при получении лекарственного препарата для лечения OX40-опосредованного расстройства. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения предложено антагонистическое антитело или его фрагмент для применения в качестве лекарственного препарата. Также согласно настоящему изобретению предложено антагонистическое антитело или его фрагмент для применения при реализации способа лечения OX40-опосредованного расстройства. OX40-опосредованные расстройства – это расстройства, описанные выше. Антагонистическое антитело согласно настоящему изобретению может быть особенно полезно при лечении OX40-опосредованных расстройств, независимых от ко-стимулирующего статуса OX40 пациента. Согласно предпочтительному варианту реализации антагонистическое антитело или его фрагмент можно применять при лечении OX40-опосредованного расстройства, причем пациент экспрессирует низкий уровень OX40.

Как описывалось ранее, антагонистичные антитела к OX40 согласно настоящему изобретению можно вводить совместно с одним или более терапевтическими агентами, например, цитотоксическим агентом, радиотоксическим агентом или иммуносупрессором. Указанные антитела можно соединять с указанным агентом (в форме иммуноконъюгата, как описано выше) или можно вводить раздельно с указанным агентом. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить перед введением, после введения или одновременно с введением агента, или можно вводить совместно с проведением других типов лечения, например, противоопухолевого лечения, например, облучения.

При введении указанного антитела доза варьирует в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, и чаще от 0,01 до 10 мг/кг массы тела хозяина. Пример режима лечения подразумевает введение антитела один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три месяца или раз в три или шесть месяцев. Обычно указанное антитело вводят несколько раз. Интервалы между введением однократных доз могут, например, составлять неделю, месяц, три месяца или год. Также интервалы могут быть нерегулярными, в зависимости от показаний измерения уровня антитела на целевой антиген в крови у пациента. Согласно некоторым способам дозу корректируют так, чтобы достичь концентрации антител в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а согласно некоторым способам – приблизительно 25-300 мкг/мл. В качестве альтернативы указанное антитело можно вводить в составе лекарственной формы с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется более редкое введение. Дозировка и частота введения варьируют в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли воздействие профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводят относительно низкую дозу с относительно большими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают подвергаться лечению до конца жизни. При терапевтическом применении иногда требуется вводить относительно высокие дозы с относительно малыми интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не снизится или не прекратится.

Реальная доза активного ингредиента, т.е., указанного антитела в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может варьировать таким образом, чтобы

получать количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого ответа на лечение у конкретного пациента, при применении конкретной композиции и режима введения, без токсичности для пациента. Избранный уровень дозы будет зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций согласно настоящему изобретению, путь введения, время введения и скорость выведения конкретного антитела, которое применяется, длительность лечения, другие применяемые препараты, соединения и/или вещества в конкретных применяемых композициях, а также возраст, пол, массу, общее состояние здоровья и предшествующий анамнез пациента, которого лечат, и подобных факторов, хорошо известных в медицине.

«Терапевтически эффективное количество» антитела к ОХ40 согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и длительности периодов без симптомов, и/или предотвращению нарушения или нетрудоспособности в связи с заболеванием. Способность соединения оказывать лечебное воздействие на ОХ40-опосредованное расстройство можно оценивать в модельной системе на животных, которая позволяет предсказать эффективность у человека. В качестве альтернативы, данное свойство композиции можно оценивать путем определения способности соединения к подавлению роста клеток, причем такое подавление можно измерить *in vitro* посредством проб, известных специалистам в данной области техники. Специалист в данной области техники способен определить такие количества на основании таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта, а также конкретная композиция или выбранный путь введения.

Антитело или композицию согласно настоящему изобретению можно вводить посредством одного или более путей введения с применением одного или более разных способов, известных в технике. Как должно быть понятно опытным специалистам, путь и/или способ введения варьирует в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный путь введения, введение в спинной мозг или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Более предпочтительными путями введения является внутривенный или подкожный. Фраза «парентеральное введение» в настоящей заявке обозначает путь введения, отличный от энтерального или местного, обычно путем инъекции, и включает без ограничений внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, подболочечное,

внутрисуставное,      внутриглазничное,      внутрибрюшинное,      внутрисердечное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, введение в полость капсулы, субарахноидальное, внутриспинальное, эпидуральное и внутригрудинное введение посредством инъекций и инфузий. В качестве альтернативы антитело согласно настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, кожный путь введения или введение через слизистые оболочки, например, внутриназальным, оральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным или местным путем.

### **Готовые изделия и наборы**

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено готовое изделие, содержащее антагонистичное антитело или его фрагмент, композицию или иммуноконьюгат согласно настоящему изобретению, для лечения ОХ40-опосредованного расстройства. Готовое изделие может включать контейнер и этикетку или листок-вкладыш, прилагаемый к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутыли, флаконы или шприцы. Контейнеры могут быть выполнены из разных материалов, таких как стекло или пластик. В контейнере содержится композиция, которая может быть эффективна при лечении указанного патологического состояния, и в нем может быть стерильный порт доступа (например, указанным контейнером может быть пакет для растворов для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в указанный композиции может быть антагонистичным антителом, раскрываемым в настоящей заявке. На этикетке или в листке-вкладыше может быть указано, что композицию можно применять для лечения выбранного патологического состояния, такого как рак. Согласно одному варианту реализации на этикетке или листке-вкладыше может быть указано, что композицию, содержащую антагонистичное антитело, можно применять для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

Кроме того, готовое изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит антагонистичное антитело, раскрываемое в настоящей заявке, и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, причем указанная композиция содержит терапевтический агент, отличный от антагонистичного антитела. Готовое изделие согласно данному варианту реализации настоящего изобретения может также содержать листок-вкладыш, в котором указано, что первую и вторую композицию можно применять в сочетании для лечения ОХ40-

опосредованного заболевания или расстройства. Таким терапевтическим агентом может быть любое дополнительное средство из описанных в предыдущем разделе (например, тромболитическое средство, антитромбоцитарное средство, химиотерапевтическое средство, антигормональное соединение, кардиопротектор и/или регулятор иммунной функции у млекопитающих, включая цитокин). В качестве альтернативы или дополнительно готовое изделие может также содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Также оно может содержать другие вещества, желаемые с коммерческой позиции или с позиции пользователя, включая другие буфера, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

Также в область настоящего изобретения входят наборы, включающие антитело, композиции или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению и инструкцию по применению. Указанный набор также включает другие дополнительные реагенты, такие как иммуносупрессор, цитотоксический агент, радиотоксический агент, или одно или более дополнительных антагонистических антител согласно настоящему изобретению (например, антагонистичное антитело, обладающее дополняющей активностью, которое связывается с эпитопом антигена OX40, отличным от эпитопа для первого антагонистического антитела).

Без дополнительного описания предполагается, что специалист в данной области техники может при помощи предыдущего описания и следующих иллюстрирующих примеров создать и применить агенты согласно настоящему изобретению и реализовать заявленные способы. Следующие демонстрационные примеры приведены для облегчения реализации на практике настоящего изобретения, и не предназначены для того, чтобы каким бы то ни было образом ограничить остальную часть изобретения.

## **Примеры**

### **Пример 1:**

#### **Получение и скрининг антитела мыши к OX40 человека**

Для получения рекомбинантного белка Fc-OX40 человека кДНК для TNFRSF4 человека приобретали у компании «iماGenes» (номер клона: RZPDB737H0329D; Берлин, Германия). Указанную кДНК применяли в качестве матрицы для ПЦР-амплификации ДНК, кодирующей внеклеточный домен области TNFRSF4 человека (SEQ ID №: 11). В

отдельной реакции ПЦР амплифицировали область Fc IgG1 человека (положения согласно нумерации ЕС 223-451), добавляя линкер 5' GSGGG и линкер 3' SA-6xHis и сайты рестрикции для клонирования. Затем два полученных продукта соединяли при помощи перекрывающейся расширенной ПЦР с фланкирующими праймерами, добавляя сайты рестрикции для последующего клонирования в модифицированный вектор экспрессии млекопитающих на основе плазмида pcDNA3.1(-) от компании «Invitrogen» («Invitrogen AG», Базель, Швейцария, Кат. № V795-20), содержащей промотор CMV человека с донорно-акцепторным фрагментом Ig (первый инtron), описанным в Патенте США 5924939, последовательность OriP (Koops MD *et al.*, (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), энхансер SV40 и сигнал полиаденилирования SV40, соединенные с терминатором гена гастрина, описанным у Kim D, *et al.*, (2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620-2. Указанная рекомбинантная плазмида обеспечивала возможность экспрессии гибридного белка внеклеточный домен TNFRSF4 человека-Fc в клетках млекопитающих с секрецией в питательную среду для выращивания клеток, запускаемой нативным сигнальным пептидом белка TNFRSF4 человека. Для выработки рекомбинантного белка упомянутый выше рекомбинантный вектор трансфецировали в адаптированные к супензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI<sup>TM</sup> («Polyplus-transfection S.A.», Страсбург, Франция; дистрибутер: «Brunschnig», Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с белком A (колонка с сефарозой-белком A HiTrap; «GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария).

Для получения рекомбинантного белка OX40 человека-his внеклеточный домен TNFRSF4 (SEQ ID №: 11) человека амплифицировали посредством ПЦР, добавляя линкер 3' GSG-6xHis и сайты рестрикции для клонирования. Далее продукт ПЦР клонировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1(-), описанную выше. Указанная рекомбинантная плазмида обеспечивала возможность экспрессии белка OX40 человека-his в клетках млекопитающих с секрецией в питательную среду для выращивания клеток, запускаемой нативным сигнальным пептидом TNFRSF4 человека. Для выработки белка рекомбинантный вектор трансфецировали в адаптированные к супензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI<sup>TM</sup> («Polyplus-transfection S.A.», Страсбург, Франция; дистрибутер: «Brunschnig», Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали

дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с Ni<sup>2+</sup>-NTA (колонка с сефарозой- Ni<sup>2+</sup>-NTA HiTrap; «GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария). Было показано, что рекомбинантный белок OX40 человека-Fc и OX40-his были чистыми на 95%, о чем судили методом SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле), и дальше проводили замену буфера на фосфатно-солевой буфер (ФСБ) перед применением.

Рекомбинантный белок OX40 человека-Fc, растворенный в ФСБ, смешивали с эквивалентным объемом адьюванта Stimune («Prionics», Швейцария, идентификационный номер: 7925000) и готовили эмульсию. Эмульсию переносили в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл («BD Pharmingen», Аллсвиль, Швейцария) и вводили животным BALB/c («Harlan», Нидерланды) подкожно в подушечку стопы задней конечности, в основание хвоста и шею в дозе 50 мкг эмульгированного белка. Иммунизацию повторяли через две недели с тем же количеством антигена и с тем же путем введения.

Присутствие циркулирующих антител к OX40 человека у иммунизированных мышей в сыворотке оценивали посредством прямого ELISA с применением планшетов, покрытых рекомбинантным белком OX40 человека-his. Сыворотку мыши в разных разведениях (от 1:10<sup>0</sup> до 1:10<sup>9</sup>) добавляли в планшеты, и связавшиеся антитела определяли при помощи овечьего анти-мышиного H+L цельного антитела-HRP («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария). Конечные усиливающие дозы 50 мкг антигена без адьюванта вводили подкожно животным, проявляющим самый высокий титр IgG к OX40 человека в сыворотке перед умерщвлением.

Животных подвергали эвтаназии, и паховые, подмышечные, плечевые, подколенные и седалищные лимфатические узлы извлекали и готовили суспензию отдельных клеток путем распределения архитектуры лимфатических узлов двумя иглами 25G в растворе ДНКазы («Roche Diagnostics (Schweiz) AG», Роткрайц, Швейцария) и коллагеназы («Roche Diagnostics (Schweiz) AG», Роткрайц, Швейцария). Суспензии отдельных клеток объединяли с линией клеток миеломы X63AG8.653 (линия клеток миеломы мыши BALB/c; номер доступа ATCC: CRL 1580; Kearney JF *et al.*, (1979) *J. Immunol.* 123(4): 1548-1550) в соотношении 7:1 (партнеры по слиянию – собираемые клетки

лимфатических узлов) с полиэтиленгликолем 1500 («Roche Diagnostics (Schweiz) AG», Роткрайц, Швейцария). Слившиеся клетки помещали в планшеты на 96 лунок с плоским дном, покрытые макрофагами мыши в среде DMEM-10 («Invitrogen AG, Базель», Швейцария) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 2 mM L-глутамата, 100 Е/мл пенициллина («Biochrom AG», Германия), 100 мкг/мл стрептомицина («Biochrom AG», Германия), 10 mM HEPES («Invitrogen AG», Базель, Швейцария), 50 мкМ гипоксантина/аминоптерина/тимицина («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) и 1% фактора роста («Hybridokine, Interchim/Uptima», Монлюкон, Франция).

В результате слияния приблизительно 800 лунок подвергали скринингу посредством ELISA на наличие IgG мыши, который распознает OX40 человека и блокирует связывание OX40 человека на его рецепторах. Содержимое лунок с положительной реакцией распространяли и подвергали двум циклам субклонирования. Клетки собирали, и тяжелые и легкие цепи клонировали и секвенировали.

### **Пример 2:**

#### **Клонирование и секвенирование VH и VL цепей антитела против OX40 из клеток гибридомы**

Для каждой гибридомы, отобранный с положительным результатом, готовили общую РНК, проводили обратную транскрипцию с образованием кДНК, и гены VH и VL, соответственно, амплифицировали посредством ПЦР. Продукты ПЦР вшивали в «спасающий» вектор (вектор pDrive; «QIAGEN AG», Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 231124), который делает возможным секвенирование ДНК индивидуальных продуктов ПЦР и определение моно- или поликлональности выбранных гибридом. При применении данного вектора можно было проводить селекцию по синему/белому цвету в планшетах с LB-агаром, содержащим IPTG (изопропилтиогалактозид) и X-gal (колонии без вставки имели синее окрашивание из-за расщепления X-gal пептидом LacZ α). Рекомбинантные плазмиды из положительных (белых) бактериальных клонов готовили и секвенировали с применением стандартных ДНК-праймеров для секвенирования, специфических в отношении остова вектора (M13rev, M13fwd, T7 или SP6). В конце последовательности ДНК субклонировали в вектор экспрессии для рекомбинантной экспрессии рассматриваемого антитела в клетках млекопитающих.

### Выделение РНК

Общую РНК выделяли из  $2-10 \times 10^6$  клеток с применением набора RNeasy Mini от компании «QIAGEN» («QIAGEN AG», Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 74106) в соответствии с протоколом производителя; количественную оценку в пробах проводили на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («WITEC AG», Литтау, Швейцария).

### Одноэтапная ПЦР с ОФ

Препараты общей РНК, полученные, как было описано выше, подвергали обратной транскрипции с получением кДНК, и фрагменты VH и VL амплифицировали с применением двух разных смесей вырожденных праймеров, каждый из которых позволял восстановить вариабельные фрагменты тяжелых цепей и соединительные области вариабельных областей тяжелых цепей всех подсемейств иммуноглобулинов мыши или восстановить вариабельные фрагменты легких цепей каппа и соединительные области вариабельных областей легких цепей всех подсемейств иммуноглобулинов мыши. Праймеры, применяемые для обратной транскрипции и амплификации, были синтезированы компанией «Microsynth» (Балгах, Швейцария), и подвергались очистке посредством ВЭЖХ (Таблицы 1-4). И обратную транскрипцию, и ПЦР-амплификацию проводили одновременно с применением набора для одноэтапной ПЦР с ОФ компании «QIAGEN» («QIAGEN AG», Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 210212). Поскольку указанная технология основана на применении специфических праймеров, каждую пробу мРНК затем подвергали обработке в двух экземплярах, что позволяло проводить индивидуальную обратную транскрипцию и амплификацию либо VH, либо VL фрагментов. 2 мкг общей РНК, растворенной в воде, не содержащей РНКазу, до конечного объема 30 мкл, смешивали с: 10 мкл 5x матричного раствора буфера для одноэтапной ПЦР с ОФ компании «QIAGEN», 2 мкл смеси дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфатов) в концентрации 10 мМ, 3 мкл смеси праймеров в концентрации 10 мкМ и 2 мкл смеси ферментов для одноэтапной ПЦР с ОФ компании «QIAGEN». Затем итоговую смесь помещали в пробирку для ПЦР и подвергали циклам в ПЦР-термоциклире (iCycler «BioRad», версия 4.006, «Bio-Rad Laboratories AG», Рейнах, Швейцария) со следующими установками:

30 мин при 50 °C

15 мин при 95 °C

40 циклов: 30 сек при 94 °C

30 сек при 55 °C

1 мин при 72 °C

10 мин при 72 °C

Выдерживать при 4 °C

#### Клонирование в вектор pDrive

Продукты ПЦР загружали на 2% агарозные гели. После электрофореза ДНК рассматриваемые фрагменты (~450пн) вырезали из агарозных гелей и подвергали дальнейшей экстракции при помощи набора NucloSpin Extract II компании «Macherey-Nagel» 250 («Macherey-Nagel», Энзинген, Швейцария; Кат. № 740609.250). Для секвенирования ДНК экстрагированные продукты ПЦР клонировали в «спасающий» вектор (вектор pDrive; «QIAGEN AG», Хомбрехтикон, Швейцария; Кат. № 231124) и трансформировали в *E. coli* штамм TOP10 («Invitrogen AG», Базель, Швейцария; Кат. № C404006).

#### Экстракция по протоколу «Miniprep»

Колонии, продемонстрировавшиеся положительный результат, культивировали в течение ночи при 37 °C (взбалтывание при 250 об./мин) в 1,5 мл среды Луриа-Бертани (LB) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, засеянной в блокирующих планшетах с квадратными лунками «Macherey-Nagel» («Macherey-Nagel», Энзинген, Швейцария; Кат. № 740488.24). На следующий день экстракцию ДНК по протоколу «miniprep» проводили с применением набора плазмид NucleoSpin Multi-8 («Macherey-Nagel», Энзинген, Швейцария; Кат. № 740620.5).

#### Секвенирование и анализ последовательностей

Пробы отправляли для секвенирования ДНК в компанию "Fasteris", оказывающую услуги по секвенированию (План-ле-Отс, Швейцария). Применили стандартные праймеры: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (Таблица 5). Для анализа последовательностей применяли профессиональную версию Clone Manager 9 («Scientific & Educational Software», Северная

Каролина, США) и программу BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, TA (1999) Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98)

Клонирование вектора экспрессии для экспрессии рекомбинантного химерного антитела

Для рекомбинантной экспрессии в клетках млекопитающих изолированные фрагменты VH и VL мыши переводили в форму химерных иммуноглобулинов при помощи способов ПЦР, основанных на сборке. Указанные химерные антитела состоят из тяжелой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи мыши соединена с константными доменами тяжелой цепи IgG1 человека (области  $\gamma$ 1, шарнир,  $\gamma$ 2 и  $\gamma$ 3), и легкой цепи, где вариабельный домен мышиной легкой цепи соединен с константным доменом человека каппа (Ск). Собранные посредством ПЦР мышьи вариабельные и человеческие константные части впоследствии клонировали в модифицированный вектор экспрессии для клеток млекопитающих, основанный на модифицированном векторе pcDNA3.1(-) от компании «Invitrogen», упоминаемом в Примере 1, с тем отличием, что для запуска секреции белка применялся лидерный пептид легкой цепи каппа иммуноглобулина. Для выработки белка иммуноглобулинов-кандидатов эквивалентные количества ДНК-вектора для тяжелой и легкой цепи совместно трансфенировали в адаптированные к суспензии клетки HEK-293 (номер ATCC: CRL-1573). Через пять дней надосадочную жидкость культуры отбирали и очищали с применением колонки для аффинной хроматографии с белком А (колонка с сефарозой-белком А HiTrap), которой управляла система ÄKTA FPLC («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбрugg, Швейцария).

**Таблица 1: Смесь праймеров VH - обратные**

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC  
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

**Таблица 1: Смесь праймеров VH - прямые**

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT  
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

**Таблица 3: Смесь праймеров VL - обратные**

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC  
 GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC  
 GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC  
 GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC  
 GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

**Таблица 4: Смесь праймеров VL - прямые**

ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG  
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

**Таблица 5: праймеры для секвенирования**

M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rev	AACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

### **Пример 3:**

#### **Описание биологических свойств антитела к OX40 человека**

##### *Oпределение OX40-специфичных антител посредством ELISA:*

Титры, специфичность и выработку антител гибридомами, а также кандидаты в рекомбинантные антитела определяли посредством ELISA. Если кратко, в микропланшеты на 96 лунок («Costar», США, дистрибутор: «VWR AG», Нью, Швейцария) наносили 100 мкл рекомбинантного OX40 человека-his в концентрации 2 мкг/мл в ФСБ (информацию о генерировании белка OX40-his см. в Примере 1). Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем блокировали 2% БСА в ФСБ (бычий сывороточный альбумин, «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия) при комнатной температуре (КТ) в течение одного часа. Блокирующий раствор удаляли, добавляли надосадочную жидкость от гибридом или очищенные антитела. Планшеты инкубировали при КТ в течение 30 минут, затем проводили отмывку десять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария), и добавляли меченные пероксидазой хрена (HRP) овечьи антимышечные антитела для детекции H+L («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) в разведении 1:1000. Для определения рекомбинантных химерных антител (см., Пример 2), которые содержат фрагмент Fc человека, в качестве антитела для определения применяли HRP-меченные кроличьи античеловеческие антитела-IgG («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) в разведении 1:1000. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре (КТ), проводили отмывку девять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли в планшеты ТМБ (тетраметилбензидиновый) субстрат («Bio-rad Laboratories AG», Рейнах, Швейцария), и через шесть минут реакцию останавливали путем добавления H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем измеряли поглощение на длине волны 450 нм на микропланшетном ридере («Biotek», США; дистрибутор: «WITTEC AG», Литтау, Швейцария). На Фигуре 1А показано, что химерное антитело 1D4 и химерное антитело 2F8 распознают белок OX40-his, нанесенный на планшет.

##### *OX40L-блокирующий ELISA:*

Рекомбинантный белок - лиганд OX40 человека (OX40L) генерировали следующим образом: кДНК для TNFSF4 человека (номер клона: IOH46203) приобретали у компании «imaGenes» (Берлин, Германия) и внеклеточную часть (аминокислоты 51-183) лиганда TNFSF4 человека (нумерация в соответствии с последовательностью Q6FGS4 Uniprot)

амплифицировали с фланкирующими сайтами рестрикции. Полученный продукт ПЦР, окружающий линкер ASA и последовательность метки 8-His на своем 5'-конце, впоследствии клонировали в модифицированную версию вектора pREP4 от компании «Invitrogen» («Invitrogen AG», Базель, Швейцария), несущую промотор CMV, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста и лидерный пептид VJ2C мыши для запуска секреции указанного рекомбинантного белка. Для выработки рекомбинантного белка указанный рекомбинантный вектор трансфектировали в адаптированные к супензии клетки HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) с применением реагента для трансфекции jetPEI<sup>TM</sup> («Polyplus-transfection S.A.», Страсбург, Франция; дистрибутор: «Brunswhig», Базель, Швейцария). Надосадочную жидкость питательной среды отбирали через пять дней и подвергали дальнейшей очистке с применением колонки для аффинной хроматографии с белком A (колонка с сефарозой-белком A HiTrap; «GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария), которой управляла система ÄKTA FPLC («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария).

Чтобы определить, могут ли сгенерированные антитела против OX40 блокировать связывание OX40L с рецептором OX401, применяли блокирующий ELISA. В микропланшеты на 96 лунок («Costar», США, дистрибутор: «VWR AG», Нyon, Швейцария) наносили 100 мкл рекомбинантного OX40 человека-Fc (см. Пример 1) в концентрации 2 мг/мл в ФСБ. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем блокировали 2% БСА в ФСБ при КТ в течение одного часа. Блокирующий раствор удаляли и добавляли надосадочную жидкость от гибридом или очищенные антитела. Через пять минут в каждую лунку добавляли 50 мкг биотинилированного рекомбинантного OX40L человека в концентрации 0,04 мг/мл. Планшеты инкубировали при КТ в течение 60 минут, затем проводили отмывку девять раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли HRP-стрептавидин («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) в разведении 1:2000. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при КТ, проводили отмывку 9 раз 0,01% раствором Твин-20 в ФСБ и добавляли в планшеты ТМБ субстрат («Bio-rad Laboratories AG», Рейнах, Швейцария), и через 6 минут реакцию останавливали путем добавления H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем измеряли поглощение на длине волны 450 нм на микропланшетном ридере («Biotek», США; дистрибутор: «WITTEC AG», Литтгау, Швейцария). На Фигуре 1В показано, что химерное антитело 1D4 способно блокировать взаимодействие между OX40 и OX40L с зависимостью от дозы, а химерное антитело 2F8 не способно блокировать взаимодействие между OX40 и OX40L.

Реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR)

Кровь у двух разных доноров отбиралась в три закрытые системы взятия венозной крови объемом на 10 мл с цитратом в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Нюмбрехт, Германия). Клетки от донора №1 применяли в качестве клеток-эффекторов, а клетки от донора №2 применяли в качестве клеток-мишеней. РВМС (мононуклеарные клетки периферической крови) от 2 указанных доноров очищали с применением 50 мл пробирок Blood-Sep-Filter (дистрибутор: «Brunschtig», Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмыкке 2 раза в среде Мемориального Института Розуэлл-Парк (RPMI, «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия) без ФБС. Клетки-мишени инкубировали с 50 мкг/мл митомицина С («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки отмывали 3 раза средой RPMI без ФБС и повторно суспендировали с плотностью  $1 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI, 10% ФБС («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 2 mM L-глутамина («Lonza», Лёвен, Бельгия), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина («Biochrom AG», Берлин, Германия). В микропланшетах на 96 лунок с U-образным дном («TPP», Тразадинген, Швейцария) распределяли 50 000 клеток-мишеней и 80 000 клеток-эффекторов в конечном объеме 100 мкл для каждой лунки. В лунки добавляли 1000 мкл разведенных антител. Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Через 7 дней после начала MLR в клетках генерировали импульсы при помощи 0,5 мКюри <sup>3</sup>Н-тимицина («Perkin Elmer»). Через 8 часов после генерирования импульсов клетки собирали и количественно определяли включенную радиоактивную метку при помощи бета-счетчика Wallac. На Фигуре 2 показано, что химерное антитело 1D4 способно блокировать MLR с зависимостью от дозы в большей степени, чем положительный контроль.

**Пример 4:**

**Связывание антител к OX40 человека с активированными мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) человека и других видов животных, определяемое посредством проточной цитометрии**

Клетки человека

Фильтры, содержащие лейкоциты человека, были взяты из Центра сбора крови в г. Ла-Шо-де-Фон, Швейцария (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клетки снимали с фильтров посредством обратной промывки 60 мл ФСБ, содержащего 10 Е/мл ликвемина («Drossapharm AG», Люцерн, Швейцария). Затем РВМС очищали при помощи пробирок Blood-Sep-Filter на 50 мл (дистрибутер:

«Brunschwig», Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмывке 3 раза в среде Мемориального Института Розуэлл-Парк (RPMI, «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия) с ФБС («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия). Клетки повторно суспендировали с плотностью  $3 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI, 10% ФБС («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 2 мМ ультраглутамина («Lonza», Лёвен, Бельгия), 10 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина («Biochrom AG», Берлин, Германия), 10 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА; «Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) + 100 Е/мл рекомбинантного IL-2 человека (пролейкин, «Novartis», Базель, Швейцария) в планшете на 24 лунки («TPP», Тразадинген, Швейцария). Через сорок восемь часов клетки отбирали и анализировали посредством проточной цитометрии, как описано ниже.

Клетки HPB-ALL (линия клеток острого Т-клеточного лейкоза от компании «Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH», Брауншвейг, Германия) культивировали в RPMI, 10% ФБС.  $2 \times 10^5$  клеток распределяли в планшете на 96 лунок с V-образным дном («TPP», Тразадинген, Швейцария) и центрифугировали в течение трех минут при 1300 об/мин; надосадочную жидкость сливали, клетки отбирали и анализировали посредством проточной цитометрии, как описано ниже.

PBMC и клетки HPB-ALL, подготовленные как описано выше, повторно суспендировали в 50 мкл буфера FACS (ФСБ, 2% ФБС, 10% версена («Invitrogen», США) с 5 мкг/мл химерного антитела 1D4 или 5 мкг/мл соответствующего по изотипу контроля, или 20 мл PE-меченного коммерческого антитела к OX40 человека (клон L106, «BD Biosciences», Адлисвиль, Швейцария). Клетки инкубировали в течение 30 минут на льду, подвергали отмывке два раза и повторно суспендировали в 50 мкл буфера FACS. Для определения химерного антитела 1D4 и контрольного антитела по изотипу применяли античеловеческий IgG-фикоэрритин-PE («BD Biosciences», Адлисвиль, Швейцария), разведенный в отношении 1/200. Клетки инкубировали в течение 15 минут на льду, подвергали отмывке один раз, повторно суспендировали в 400 мкл буфера FACS и анализировали на инструменте FACS («Cyan, Beckman Coulter International S.A.», Нyon, Швейцария).

#### Первичные клетки яванских макак

Цельную кровь яванских макак (полученных от профессора Эрика Роуллера, Лаборатория нейрофизиологии, Университета Фрибурга, г. Фрибург, Швейцария) отбирали в пробирки

с цитратом («BD Biosciences», Адлисвиль, Швейцария). 2 мл ФСБ смешивали с 3 мл крови, и указанную смесь насыщали сверху на 10 мл смеси фриколла: ФСБ 85:15 («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбругг, Швейцария). Пробы центрифугировали в течение 20 минут при комнатной температуре без перерыва. Слой РВМС отбирали и промывали трижды в ФСБ. Клетки повторно суспендировали с плотностью  $3 \times 10^6$  клеток/мл в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 10% ФБС («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), с заменимыми аминокислотами («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 1 мМ пирувата натрия («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 2 мМ ультраглутамина («Lonza», Бельгия), 100 Е/мл пенициллина («Biochrom AG», Германия), 100 мкг/мл стрептомицина («Biochrom AG», Германия). 1 мл суспензии клеток распределяли в планшете на 24 лунки («TPP», Тразадинген, Швейцария) и добавляли 10 мкг/мл ФГА (РНА/М, «Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария), 100 Е/мл рекомбинантного IL-2 человека (пролейкин, «Novartis», Базель, Швейцария). Клетки инкубировали в течение 57 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Активированные РВМС отбирали и повторно суспендировали в ФБС/2,5% ФСБ (буфер FACS). 50 000 клеток в 50 мкл буфера FACS распределяли в планшете на 96 лунок с V-образным дном, и к лункам добавляли 25 мкг/мл биотинилированного химерного антитела 1D4 к OX40 человека или биотинилированного контрольного антитела по изотипу, или биотинилированного коммерческого антитела к OX40 человека, выработанного в организме овцы («BD Biosciences», Адлисвиль, Швейцария). Пробы инкубировали в течение 20 минут на льду, а затем клетки подвергали отмыкке два раза холодным буфером FACS, а затем инкубировали со стрептавидином-РЕ («BD Biosciences», Адлисвиль, Швейцария) в разведении 1:20 в течение 15 минут на льду. Клетки подвергали однократной отмыкке буфером FACS, а затем повторно суспендировали в 300 мкл буфера FACS. К каждой пробе добавляли иодид пропидия в объеме 2 мкл (PI; «Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария), чтобы исключить мертвые клетки. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии (Cyana, «Beckman Coulter International S.A.», Ньон, Швейцария).

На Фигурах 3А и 3В показано, что химерное антитело 1D4 способно распознавать OX40, экспрессируемый на поверхности активированных лимфоцитов человека и яванской макаки, соответственно, таких образом, обеспечивая свойства перекрестной реактивности, которые так желательны при разработке лекарственных препаратов.

### **Пример 5:**

**Кинетические константы аффинного связывания химерного антитела 1D4 с внеклеточным доменом рецептора ОX40 человека, измеренные посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

Кинетические константы аффинного связывания ( $K_D$ ) измеряли по захваченному белком А антителу с применением внеклеточного домена рекомбинантного рецептора ОX40 человека с гистидиновой меткой, который описан в Примере 1, в качестве анализируемого вещества. Измерения проводили на приборе BIAcore 2000 («GE Healthcare – BIAcore», Упсала, Швеция) при комнатной температуре, и результаты анализировали при помощи компьютерной программы (BIAcore; v4.1).

Сенсорный чип исследовательского класса CM5 («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбрugg, Швейцария; BR-1000-14) активировали путем введения 35 мкл раствора N-гидроксисульфосукцинида (NHS)/ 1-этил-3-[3-диметиламинпропил]карбодииимида гидрохлорида (EDC) в соотношении 1:1 (по объему, скорость потока 5 мкл/мин; 1 и 2 пути движения потоков). Белок А (идентификационный номер P7837; «Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) разводили до конечной концентрации 50 мкг/мл в ацетатном буфере с pH 4,5 (GE, BR-1003-50; на одну единицу pH ниже, чем рI) и впоследствии иммобилизовывали на предварительно активированном сенсорном чипе путем введения 35 мкл по обоим путям движения потоков – 1 и 2 (5 мкл/мин); это соответствовало приблизительно 1500 единицам ответов (EO). Затем сенсорный чип белок-А-CM5 инактивировали путем введения 35 мкл раствора этаноламина (5 мкл/мин). В итоге проводили два введения раствора глицина по 10 мкл («GE», идентификационный номер BR-1003-54; 10 mM; pH 1.5) для высвобождения молекул белка А, не вступивших в перекрестные сшивки.

Перед измерением сродства проводили пробу на ограничение массопереноса путем введения фиксированной концентрации анализируемого вещества в фиксированное количество антитела, захваченного белком, при разных скоростях потока (5, 15, 30, 50, 75 мкл/мин в течение 2 мин). Анализ наклона скорости прямой реакции при разных скоростях потока указывает на наличие массопереноса.

Для измерений сродства химерное антитело 1D4, которое хранили в 1 x ФСБ-буфере, разводили до конечной концентрации 15 нМ в буфере HBS-EP(«GE», идентификационный

номер BR-1001-88; 0,01 М Hepes, 0,15 М NaCl, EDTA 3 мМ, 0,005% поверхностного активного вещества P20, pH 7,4). 10 мкл такого разведенного матричного раствора впоследствии вводили во 2-ой путь движения потока чипа белок-А-CM5 (30 мкл/мин) так, чтобы достичь 200-250 ЕО. После данного этапа захвата внеклеточный домен рекомбинантного рецептора OX40 человека с гистидиновой меткой вводили в разных концентрациях (от 50 нМ до 0,4 мкМ) в 1-ый и 2-ой пути движения потока (1-ый путь движения потока применяли в качестве эталонного) со скоростью потока 30 мкл/мин. После каждого события связывания поверхность подвергали регенерации при помощи глицинового буфера с pH 1,5, вводимого в течение 1 мин (10 мкл/мин).

Измерения (сенсограмма: fc2-fc1) наилучшим образом удавалось аппроксимировать двухвалентной моделью анализируемого вещества 2:1 с массопереносом. Чтобы учесть экспериментальный разброс в отношении антитела, захваченного белком А, в начале каждого измерения, выставляли местное значение R<sub>max</sub> при всех подгонках. Время диссоциации составило по меньшей мере 300-600 секунд. Измерения проводили в двух экземплярах, и для сравнения включали пробы с нулевой концентрацией. Значение Хи-квадрат соответствует сумме квадратов разностей между экспериментальными данными и эталонными данными в каждой точке; хотя графики остатков показывают разность между экспериментальными и эталонными данными для каждой точки в подгонке. И Хи-квадрат, и значения остатков применяли для оценки качества подгонки между экспериментальными данными и индивидуальными моделями связывания.

Измерения проводили в двух повторениях с захваченными химерными антителами 1D4 к OX40 человека, иммобилизованными на сенсорном чипе с белком А и внеклеточным доменом рекомбинантного рецептора OX40 человека с гистидиновой меткой в качестве анализируемого вещества. Значение KD варьировало в диапазоне от 91 до 116 нМ, а значения Хи-квадрат были < 1,25.

### **Пример 6:**

#### **Гуманизация моноклонального антитела 1D4 мыши**

В настоящей заявке описана гуманизация антитела 1D4 мыши к OX40 человека, включая выбор акцепторных каркасных областей человека, обратные мутации и мутации, которые в значительной степени позволяют сохранить и/или улучшить свойства связывания акцепторных каркасных областей человека с привитыми CDR.

### Дизайн видоизмененных вариабельных областей

Для выбора акцепторных каркасных областей человека для прививки CDR антитела 1D4 применяли гомологичное соответствие. Для идентификации подсемейств антител человека, к которым принадлежит V области тяжелых и легких цепей антитела мыши, и для определения максимально соответствующей каркасной области антител человека эмбрионального типа для применения в качестве акцепторной молекулы, можно применять базы данных, например, базу данных генов вариабельных областей эмбрионального типа из локусов человека и мыши (база данных IMGT (International ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP *et al.*, (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q *et al.*, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6(4): 253-64) или VBASE2 (Retter I *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, Выпуск базы данных D671-D674) или база данных Кабата (Johnson G *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218)), или публикации (например, Kabat EA *et al.*, *выше*). Выбор последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) в указанных подсемействах, которые следует применять в качестве акцептора, может основываться на гомологии последовательностей и/или соответствии структуры областей CDR1 и CDR2, что позволит сохранить соответствующее родственное представление шести CDR после прививки.

Например, применение базы данных IMGT позволяет выявить хорошую гомологию между вариабельной каркасной областью тяжелой цепи 1D4 и членами подсемейства 2 вариабельных доменов тяжелых цепей человека. Максимальная гомология и идентичность последовательностей и CDR, и каркасных областей были выявлены в последовательностях эмбрионального типа: IGHV 2-70\*10 (SEQ ID №: 19), IGHV2-70\*01 (SEQ ID №: 20), IGHV2-70\*13 (SEQ ID №: 21), IGHV2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и IGHV2-70\*11 (SEQ ID №: 23), каждая из которых обладает идентичностью последовательности выше 73% для целой последовательности вплоть до CDR3. IGHV 2-70\*10, IGHV2-70\*01 и IGHV2-70\*13 обладают идентичностью последовательности 74%; а IGHV2-5\*09 и IGHV2-70\*11 обладает идентичностью последовательности 73,5% и 73%, соответственно.

При применении того же подхода последовательность вариабельного домена легкой цепи 1D4 демонстрировала хорошую гомологию с членами подсемейства 3 вариабельного домена каппа легкой цепи человека. Максимальная гомология и идентичность последовательностей и CDR, и каркасных областей были выявлены в последовательностях эмбрионального типа: IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24) (идентичность 65,3%), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25) (64,9% идентичность), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26) (идентичность 64,9%), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №: 27) (идентичность 64,2%) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28) (идентичность 62.5%).

В качестве начального этапа процесса гуманизации в качестве акцептора для CDR антитела 1D4 были выбраны вариабельные домены антитела человека IGHV 2-70\*10 (SEQ ID №: 19) и IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24). IGHV 2-70\*10 был выбран в отличие от других вариабельных доменов тяжелых цепей человека на основании его более высокой гомологии с 1D4 в его каркасной области номер один.

Было получено первое гуманизированного антитело изотипа гамма-один человека (см. ниже). Указанное антитело заключало в себе гибридный вариабельный домен тяжелой цепи человека-мыши и гибридный вариабельный домен легкой цепи человека-мыши. Гибридный вариабельный домен тяжелой цепи был основан на вариабельном домене тяжелой цепи человека IGHV 2-70\*10, в котором CDR 1 и 2 эмбрионального типа были заменены на CDR 1 и 2 тяжелой цепи из 1D4. Наилучшее соответствие последовательности сегмента JH с акцепторной каркасной областью антитела человека было идентифицировано при поиске в базе данных IMGT, упоминаемой выше. В настоящей заявке полученная в результате последовательность гибридной вариабельной области тяжелой цепи человека-мыши, содержащая каркасные области IGHV 2-70\*10, CDR из антитела мыши 1D4, и обладающая наилучшим соответствием JH с акцепторной областью из антитела человека, обозначается как вариабельный домен тяжелой цепи VH1 с последовательностью SEQ ID №: 29. Аналогично, гибридный вариабельный домен легкой цепи человека-мыши, применяемый для данного первого гуманизированного антитела-кандидата, содержал каркасные области антитела человека IGKV3-11\*01, CDR 1D4 мыши, и обладал наилучшим соответствием JH с акцепторной областью из антитела человека, и в настоящей заявке обозначается как вариабельный домен легкой цепи VL1 с последовательностью ID №: 30. Первое гуманизированное антитело, заключающее в себе VH1 и VL1, сокращенно обозначается в настоящей заявке как антитело VH1/VL1

Получение прототипа первого гуманизированного антитела

Кодирующие последовательности ДНК (кДНК) для VH1 и VL1 были синтезированы в форме scFv компанией «GENEART AG» (Регенсбург, Германия), благодаря чему стало возможно, чтобы одна последовательность ДНК заключала в себе оба вариабельных домена (SEQ ID №: 31). кДНК индивидуальных вариабельных доменов извлекали из данного конструкта scFv посредством ПЦР, и затем собирали расположенную выше последовательность(и) кДНК их соответствующих константных доменов при помощи технологии ПЦР-сборки. В итоге полную тяжелую и легкую цепь кДНК вшивали в независимые векторы, которые были созданы на основе модифицированного вектора pcDNA3.1 («Invitrogen», Калифорния, США), несущего промотор CMV и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста. Специфический вектор для легкой цепи позволял проводить экспрессию легких цепей человека каппа-изотипа благодаря лигированию кДНК рассматриваемого вариабельного домена легкой цепи перед кДНК константного домена легкой цепи каппа с применением сайтов рестрикции BamHI и BsiWI; а специфический вектор для тяжелой цепи был сконструирован так, чтобы было возможно вшить кДНК рассматриваемого вариабельного домена тяжелой цепи перед последовательностью кДНК, кодирующей константные области CH1 IGHG1 человека, шарнирную область IGHG1, CH2 IGHG1 и IGHG1 CH3, с применением сайтов рестрикции BamHI и SallI. В векторе экспрессии как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи секреция запускалась лидерным пептидом VJ2C мыши, содержащим сайт BamHI. Сайт рестрикции BsiWI расположен в константном домене каппа; а сайт рестрикции SallI обнаруживается в домене CH1 IGHG1.

Антитело VH1/VL1 временно вырабатывалось в результате совместной трансфекции эквивалентным количеством векторов тяжелой и легкой цепи в адаптированные к сусpenзии клетки HEK293-EBNA1 (каталожный номер ATCC®: CRL-10852) с применением полиэтиленамина (PEI, «Sigma», Букс, Швейцария). Обычно 100 мл клеток в сусpenзии с плотностью 0,8-1,2 миллиона клеток на мл трансфецируют смесью ДНК-PEI, содержавшей 50 мг вектора экспрессии, кодирующего тяжелую цепь, и 50 мг вектора экспрессии, кодирующего легкую цепь. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, встраиваются в клетки-хозяева, антитела вырабатываются при последующем культивировании клеток в течение периода 4 – 5 дней, чтобы была возможна секреция в питательную среду (EX-CELL 293, среды для HEK293 без

сыворотки; «Sigma», Букс, Швейцария) с добавлением 0,1% плюрониловой кислоты, 4 мМ глутамина и 0,25 мкг/мл генетицина).

Антитело VH1/VL1 очищали от надосадочной жидкости без клеток при помощи плавно протекающей среды с рекомбинантным белком А («GE Healthcare Europe GmbH», Глаттбрugg, Швейцария), и проводили обмен буфера в фосфатно-солевом буфере перед проведением проб. Связывание антитела с ОХ40 человека измеряли посредством поверхностного плазмонного резонанса, как описано в Примере 5.

#### Обратные мутации привитых каркасных областей из антитела человека

Поскольку прямая прививка CDR из антитела 1D4 мыши приводит к тому, что кандидат не способен связываться с ОХ40 человека (Таблица 6 и ФИГ. 4), инициировали мутагенез, в ходе которого остатки аминокислот в антителе человека были заменены на остатки аминокислот из антитела мыши. Данный способ называется обратной мутацией, и является наиболее непредсказуемой процедурой при гуманизации моноклональных антител. При реализации данного способа возникает необходимость в идентификации и отборе критических остатков в каркасной области антитела мыши, которые необходимо сохранить, чтобы сохранилось сродство, и в то же время, чтобы минимизировать потенциальную иммуногенность в гуманизированном антителе. В Таблице 7, Таблице 8 и на ФИГ.5 показаны остатки (нумерация по Кабату), которые различаются в каркасных областях антитела человека и мыши. Остатки, которые могут влиять на конформации CDR или упаковку внутри вариабельных областей, представляют особый интерес, поскольку они могут оказывать наибольшее влияние на сродство антитела.

Чтобы идентифицировать остатки, которые могут влиять на конформацию большинства CDR и/или упаковку внутри вариабельных областей, рассчитывали 3-мерную модель для пары VH1-VL1 вариабельных доменов при помощи сервера для моделирования структурной гомологии SWISS-MODEL (Arnold K *et al.*, (2006) Bioinformatics, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>), установленного в автоматический режим. Анализ модели позволил выбрать подгруппу положений на основании их предположительного влияния на области CDR и/или упаковку вариабельных доменов легкой-тяжелой цепи. Указанная подгруппа положений включала положения в вариабельном домене тяжелой цепи: 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, а также положения в вариабельном домене легкой цепи: 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71 (нумерация по Кабату). Помимо указанных обратных мутаций у

некоторых кандидатов была проведена делеция в положении Y31 в легкой цепи антитела VH1/VL1.

В контексте последовательности антитела VH1/VL1 с применением стандартного мутагенеза и способов, описанных выше, были получены дополнительные гуманизированные кандидаты на основе разных комбинаций замен в тяжелых и легких цепях. Кандидаты в гуманизированные антитела оценивали по их сродству связывания методом поверхностного плазмонного резонанса, который описан в Примере 5.

Количественный выход и свойства связывания некоторых гуманизированных антител, полученных на основе указанной одной или сочетания замен, приведены в Таблице 6. Из 28 показанных антител девять кандидатов не продемонстрировали какого-либо связывания с OX40 человека, а другая группа из девяти антител обладали слабым или плохим связыванием. Гуманизированные антитела на основе VL9 демонстрировали при SPR наиболее согласованное слабое связывание с OX40 человека. Только два антитела VH6/VL9 и VH7/VL9 демонстрировали хорошее связывание с OX40 человека. Оба гуманизированных антитела подверглись обратной мутации в вариабельной области тяжелой цепи в положениях: 23, 35b, 50, 60 и 62, и в вариабельной области легкой цепи в положениях: 33, 34, 46, 47 и 71 (нумерация по Кабату). Помимо указанных обратных мутаций оба антитела - VH6/VL9 и VH7/VL9 – получили благоприятный результат от удаления остатка в положении 31 легкой цепи. Неожиданно, что антитело VH7/VL9 приобрело повышенное сродство к OX40 человека по сравнению с антителом 1D4 и вариантом VH6/VL9. Сродство связывания указанных гуманизированных антител указано в обобщенном виде в Таблице 9.

*Термостабильность выбранных гуманизированных анти-OX40 антител, определенная посредством дифференциальной сканирующей калориметрии*

Термостабильность гуманизированных антител измеряли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Профиль температур плавления моноклональных антител является свойством, характерным для их изотипа (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 751-7), однако среднюю температуру плавления фрагмента FAB можно легко идентифицировать даже в контексте полноразмерного IgG. Такую среднюю температуру плавления части FAB применяли для отслеживания моноклональной стабильности гуманизированных кандидатов.

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем калориметре VP-DSC («MicroCal», Нортхемптон, Соединенное Королевство). Объем кюветы составлял 0,128 мл, скорость нагрева составляла 200°C/ч, и избыточное давление поддерживали на уровне 65 фунтов на кв. дюйм. Все антитела применяли в концентрации 1 мг/мл в ФСБ (рН 7,4). Молярную теплоемкость антитела оценивали путем сравнения с пробами в двух экземплярах, содержащими идентичный буфер, в котором не было антител. Парциальную молярную теплоемкость и кривые плавления анализировали посредством стандартных процедур. Термограммы корректировали на нулевую линию, а концентрацию нормировали перед дальнейшим анализом с применением модели «Non-Two State» в программе Origin v7.0.

Фрагмент FAB гуманизированного варианта VH6/VL9 проявлял один переход при температуре 76,3°C, по форме и амплитуде согласующийся с кооперативным раскручиванием, которое, как правило, наблюдается для компактно свернутых фрагментов FAB, что указывает на то, что процесс конструирования оказался успешным в отношении сохранения стабильности FAB. В целом гуманизированный вариант демонстрировал хорошую термостабильность.

**Таблица 6: гуманизированные антитела к OX40 человека**

Варианты гуманизированных антител (IGHG1)	SEQ ID №	Мутации VH/VL	Временная экспрессия (мг/мл)	Связывание с OX40 человека
VH1/VL1	32, 39	H.П./H.П.	40	Нет
VH1/VL2	32, 40	H.П./L33M	21	Нет
VH1/VL3	32, 41	H.П./F71Y	17	Нет
VH2/VL1	33, 39	T23S/H.П.	13	Нет
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	Нет
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	Нет
VH3/VL1	34, 39	R50H/H.П.	23	Нет
VH3/VL2	34, 40	R50H /L33M	22	Нет
VH3/VL3	34, 41	R50H /F71Y	18	Нет
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	Плохое
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P- L47W-F71Y	3	Weak
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M- F71Y	15	Плохое
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Плохое
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	Плохое
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P- L47W-F71Y	6	Слабое
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	0	H.O.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0.5	H.O.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-F71Y	14	H.O.

**Таблица 6 (продолжение): гуманизированные антитела к ОХ40 человека**

Варианты гуманизированных антител (IGHG1)	SEQ ID №	Мутации VH/VL	Временная экспрессия (мг/мл)	Связывание с ОХ40 человека
VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-F71Y	7	H.O.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3.5	Хорошее
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M –R54L-T56S-F71Y	0.5	H.O.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5.5	H.O.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ L33M-L46P-L47W-F71Y	1	H.O.
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	H.O.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-F71Y	1.5	Слабое
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-F71Y	10	Слабое
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	Хорошее
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31deletion-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11.5	Слабое/ Хорошее

**Таблица 7: сравнение каркасной области 1D4 и акцепторных каркасной области тяжелой цепи человека IGHV 2-70\*10**

Положение в соответствии с нумерацией Кабата	1D4	IGHV 2-70*10 с привитыми CDR
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

**Таблица 8: сравнение каркасной области 1D4 и акцепторных каркасной области легкой цепи человека IGKV 3-11\*01**

Положение в соответствии с нумерацией Кабата	1D4	IGHV 3-11*01 с привитыми CDR
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

**Таблица 9: характеристики связывания избранных гуманизированных и химерных анти-OX40 антител**

Гуманизированные варианты	SEQ ID №	$k_{on}$ (1/мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)
Химера 1D4	50, 51	$3.4 \times 10^4$	$3.08 \times 10^{-3}$	91
VH6/VL9	37, 47	$3.54 \times 10^4$	$3.56 \times 10^{-3}$	101
VH7/VL9	38, 47	$4.45 \times 10^4$	$3.12 \times 10^{-3}$	70

### **Пример 7:**

#### **Описание свойств эпитопа гуманизированных анти-OX40 антител.**

С целью описания эпитопа гуманизированных анти-OX40 антител, антитело VH6/VL9 картировали, чтобы определить домен внеклеточной области OX40 человека с применением разных химерных белков OX40 человека-крысы.

#### Получение химерных белков OX40 человека-крысы и ELISA

Белкам OX40 крысы и человека-крысы придавали форму Fc-гибридных белков в соответствии со способом, описанным в Примере 1. Для проведения ELISA белок OX40 наносили в планшеты на 96 лунок с высокой степенью связывания («Coastar») в концентрации 2 мкг/мл. в ФСБ и выдерживали в течение ночи при 4°C. Реакцию в планшетах блокировали при помощи 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ перед инкубацией с антителом VH6/VL9 или контрольным антителом по изотипу. Затем планшеты подвергали отмывке и инкубировали с фрагментом F(ab')2 овечьего-антителовеческого Ig, специфичным к HRP («Jackson ImmunoResearch Europe Ltd», Ньюмаркет, Соединенное Королевство). После отмычки планшеты инкубировали с ТМБ субстратом («Bio-Rad Laboratories AG», Рейнах, Швейцария) для выявления связывания антител. Реакцию останавливали путем добавления 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и считывали показатели оптической плотности на длине волны 450 нМ (OD 450 нМ) на спектрофотометре Synergy HT2 («Biotek», США; дистрибутор: «WITTEC AG», Литтау, Швейцария).

#### Результаты

Независимо от происхождения внеклеточная область OX40 была разделена на четыре структурных модуля, обозначаемые как домен 1, 2, 3 и 4 (Compaan DM & Hymowitz SG

(2006) *Structure*, 14(8): 1321-30). Химерные белки OX40, соответствующие внеклеточной области OX40 человека (аминокислоты 29-214 TNFRSF4 человека, пронумерованные в соответствии с последовательностью Uniport P43489) были сконструированы путем обмена одного из четырех доменов между последовательностями человека и крысы. Например, химерный белок OX40 RHRR соответствует внеклеточной области OX40 крысы, в котором второй домен был заменен последовательностью соответствующего домена человека.

Для оценки реакционной способности антитела VH6/VL9 в отношении внеклеточной области OX40 человека (сокращенно HHHH с последовательностью SEQ ID №: 11), внеклеточной области OX40 крысы (сокращено RRRR с последовательностью SEQ ID №: 52) и четырех химерных белков человека-крысы RHRR (SEQ ID №: 53), HRRR (SEQ ID №: 54), HHRR (SEQ ID №: 55) и RRHH (SEQ ID №: 56)) проводили связывающий ELISA. Результат такого ELISA показан на Фиг.7. Предпосылкой к проведению данного эксперимента по картированию эпитопов послужило то, что было показано, что антитело VH6/VL9 связывается с белком OX40 человека, но не с белком OX40 крысы, что указывает на то, что перекрестной реактивности с OX40 крысы нет. Было показано, что антитело VH6/VL9 связывалось с RHRR и HHRR, но не с HRRR или RHH, что указывает на то, что эпитоп VH6/VL9 картируется во втором домене внеклеточной области OX40 человека.

### **Пример 8:**

#### **Антитело VH6/VL9 блокирует реакцию смешанной культуры лимфоцитов посредством механизма их уничтожения и блокирования**

Активность антитела VH6/VL9 в отношении подавления иммунных реакций *in vitro* оценивали в односторонней реакции смешанной аллогенной культуры лимфоцитов (MLR). MLR представляет собой модель *in vitro* аллореактивной активации и пролиферации Т-лимфоцитов (O'Flaherty E *et al.*, (2000) *Immunology*, 100(3): 289-99; DuPont B & Hansen JA (1976) *Adv. Immunol.* 23: 107-202). Когда смешивают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух неродственных доноров, Т-лимфоциты активируются посредством распознавания молекул аллогенного главного комплекса гистосовместимости (МНС). Такая активация приводит к пролиферации Т-лимфоцитов. Реакция MLR широко применялась для демонстрации эффекта иммunoспрессорных препаратов, направленных на Т-лимфоциты (Bromelow KV *et al.*,

(2001) J. Immunol. Methods, 247(1-2): 1-8). Иммуносупрессоры, такие как циклоспорин, действуют главным образом посредством подавления активации Т-лимфоцитов. Помимо оценки блокирующего действия антитела VH6/VL9 также проводили изучение вклада цитотоксических механизмов, таких как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), на подавление MLR. В данной пробе оценивали три разных формы антител VH6/VL9: форма IGHG1 (в настоящей заявке обозначается VH6/VL9), форма не фукозилированного IGHG1 (IgG1) (в настоящей заявке обозначается не фукозилированная VH6/VL9) и форма IGHG4 (IgG4) (в настоящей заявке обозначается VH6/VL9 IGHG4 S228P). Известно, что IGHG1 (IgG1) компетентны в отношении механизмов цитотоксичности, таких как ADCC. Известно, что не фукозилированные антитела IGHG1 подавляют повышенную активность ADCC вследствие более высокой активности к Fc<sub>γ</sub>RIIIa, экспрессируемому на поверхности цитотоксических клеток, таких как естественные киллеры (клетки NK) (Mizushima T *et al.*, (2011) Genes Cells, 16(11): 1071-80). Напротив, известно, что антитела IGHG4 (IgG4) не обладают такими механизмами Fc-опосредуемой цитотоксичности, как ADCC.

#### Придание определенной формы антителу VH6/VL9

Придания формы иммуноглобулину IGHG4, содержащему замену S228P, достигали путем замещения последовательности кДНК, кодирующей константные домены IGHG1 CH1, шарнирную область IGHG1, IGHG1 CH2 и IGHG1 CH3, в специфическом векторе для тяжелой цепи, описанном в Примере 6. Замену S228P вводили в матрицу кДНК тяжелой цепи IGHG4 посредством стандартной технологии ПЦР-мутагенеза. Полученная в результате тяжелая цепь имела последовательность SEQ ID №: 57. Получение не фукозилированного антитела IGHG1 VH6/VL9 проводили в соответствии с протоколом в Примере 14 в публикации WO2010/095031.

#### Реакция смешанной культуры лимфоцитов

Кровь у двух разных доноров отбирали в три закрытые системы взятия венозной крови объемом на 10 мл с цитратом в качестве антикоагуланта («Sarstedt», Нюмбрехт, Германия). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух указанных доноров очищали с применением 50 мл пробирок Blood-Sep-Filter (дистрибутор: «Brunschwig», Базель, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки подвергали отмыкке 2 раза в среде Мемориального Института Розуэлл-Парк (RPMI, «PAA Laboratories», Пассинг, Австрия) без ФБС. Стимулирующие клетки от двух доноров

готовили путем инкубации с 50 мкг/мл митомицина С («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Букс, Швейцария) в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки отмывали 3 раза средой RPMI без ФБС и повторно суспендировали с плотностью  $1 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI, 10% ФБС («PAA Laboratories», Пассинг, Австрия), 2 мМ L-глутамина («Lonza», Лёвен, Бельгия), 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина («Biochrom AG», Берлин, Германия). В микропланшетах на 96 лунок с U-образным дном («TPP», Тразадинген, Швейцария) распределяли 50 000 реактивных клеток и 80 000 стимулирующих клеток в конечном объеме 100 мкл для каждой лунки. В лунки добавляли 100 мкл разведений антител (или только среду). Планшеты инкубировали в течение 7 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. В течение последних 18 часов в клетках генерировали импульсы при помощи 0,5 мКюри <sup>3</sup>Н-тимицина («Perkin Elmer», Базель, Швейцария). Клетки собирали на плоский фильтр («Perkin Elmer») и проводили количественное определение включенной радиоактивной метки на бета-счетчике Wallac («Perkin Elmer»).

### Результаты

Результаты, показанные на ФИГ.8, демонстрируют, что антитело VH6/VL9 способно эффективно подавлять MLR у двух разных индивидуумов (пациентов, отвечающих на лечение) со значением ЭК<sub>50</sub> приблизительно 100 нг/мл. Также результаты показывают разную реакцию в зависимости от применяемой формы антитела, а также наблюдается различие во вкладе блокирующего и цитотоксического механизма при MLR от разных индивидуумов.

Реактивность Т-лимфоцитов от пациента, отвечающего на лечение, №1 (ФИГ.8А) эффективно подавлялась формами IGHG1 и IGHG4, что указывает на то, что цитотоксические механизмы не критичны для пациента, отвечающего на лечение, №1. Напротив, форма IGHG4 была лишь в малой степени способна блокировать MLR от пациента, отвечающего на лечение, №2 (ФИГ.8В) при высокой концентрации, и очень быстро утрачивала свое действие при более низких концентрациях, а форма IGHG1 позволяла достичь более чем 60% подавления, и это означает, что для пациента, отвечающего на лечение, №2, механизмы уничтожения обусловливают большую часть подавляющего действия.

Указанное различие в механизме действия, вероятно, возникает вследствие того факта, что активация, пролиферация и выживание Т-лимфоцитов при MLR реакции в

переменной степени зависит от ко-стимулирующих сигналов OX40 между индивидуумами, в зависимости от степени аллогенной реактивности и, возможно, других ко-стимулирующих сигналов. У индивидуумов, у которых малая зависимость от OX40-порождаемых сигналов, устранение активированных Т-лимфоцитов по механизму ADCC является основным механизмом действия VH6/VL9.

Неожиданно, что не фукозилированная форма IGHG1 проявляла очень высокую способность к подавлению MLR у обоих пациентов, отвечающих на лечение. Данный результат вскрыл тот факт, что даже если блокирующего механизма может быть достаточно для достижения подавления MLR, добавление или усиление уничтожающего механизма улучшает подавляющее действие анти-OX40 антител. Такое усиление особенно полезно, когда проводят лечение OX40-опосредованных расстройств независимо от ко-стимулирующего статуса OX40 пациента, например у пациентов с низким уровнем экспрессии OX40.

### **Пример 9:**

**Антитело VH6/VL9 блокирует реакцию ксеногенного трансплантата против хозяина**  
 Реакции ксеногенного трансплантата против хозяина (GVH) является моделью болезни «аллогенный трансплантат против хозяина» (GVHD), наблюданной после пересадки костного мозга у людей. Реакция GVH представляет собой острый иммунный ответ, опосредуемый пересаженными иммунными клетками, которые атакуют окружение организма-хозяина, как следствие распознавания аллогенного или ксеногенного главного комплекса гистосовместимости (Murphy WJ *et al.*, (1996) Semin. Immunol. 8(4): 233-41). В реакции GVH главными клетками-эффекторами являются Т-лимфоциты. Активность антитела VH6/VL9 как иммуносупрессора оценивали в модели ксеногенного GVHD на основании воссоздания мышей с SCID с клетками PBMC человека. В данной модели PBMC человека, и, главным образом, Т-лимфоциты, запускают сильную реакцию против клеток организма мыши-хозяина. Данная реакция приводит к тяжелому воспалению кожи и кишечника, сопровождающемуся потерей веса. Наиболее значимым показателем данной модели является выживание животных.

### *Метод*

Животных (мыши с SCID) подвергали сублетальному облучению перед введением им 30 миллионов PBMC человека внутрибрюшинно. Также у указанных животных истощали

запас мышиных NK путем введения антитела ТМ-бета1 два раза в неделю. Лечение антителом VH6/VL9, Энбрелом® или основой проводили посредством в/в инъекций раз в неделю (пять доз подряд), и начинали указанное лечение за два дня до инъекции PBMC. Животным вводили либо основу (ФСБ), либо антитело VH6/VL9 в дозе 10 мг/кг или 1 мг/кг, либо Энбрел® (гибридный белок из растворимого рецептора TNF человека 2, соединенного с компонентом Fc IgG1 человека, «Amgen-Pfizer») в дозе 8 мг/кг. Животных проверяли и оценивали их состояние три раза в неделю с целью выявления следующим симптомов – потеря веса, диарея, состояние меха и общее поведение. Животных умерщвляли в соответствии с этическими нормами, если симптомы рассматривались, как очень тяжелые.

### Результаты

На ФИГ. 9 показано, что антитело VH6/VL9 очень сильно подавляло реакцию GVHD даже при более низкой дозе – 1 мг/кг. Неожиданно, что антитело VH6/VL9 демонстрировало более высокую эффективность, чем Энбрел®, который является признанным средством от GVHD у человека (Xhaard A *et al.*, (2011) Bull. Cancer, 98(8): 889-99; Simpson D (2001) Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109-17). Среднее время выживания животных, получавших антитело VH6/VL9 в дозе 1 или 10 мг/кг, было в четыре раза больше, чем в группе, получавшей основу (Таблица 10), и в два раза больше по сравнению с Энбрел®. Кроме того, данный результат вскрыл тот факт, что антитело VH6/VL9 у обладает агонистической активностью, поскольку сообщалось, что агонистическое антитело против OX40 усугубляет GVHD в моделях аллогенных мышей (Valzasina B *et al.*, (2005) Blood, 105(7): 2845-51; Blazar BR *et al.*, (2003) Blood, 101(9): 3741-8), ситуация, которая не наблюдалась в настоящем исследовании.

**Таблица 10: Медиана времени выживания (в днях) в указанных лечебных группах**

Лечение	Основа	Энбрел®	1D4 (1 мг/кг)	1D4 (10 мг/кг)
Медиана выживания (дни)	11,5	20,5	42	47,5

Основа: только ФСБ. 1D4: антитело GBR 830-1D4; Энбрел® был клиническим препаратом.

Перечень последовательностей

<110> ГЛЕНМАРК ФАРМАСЬЮТИКАЛС С.А.

<120> Антитела, которые связываются с OX40, и их применение

<130> 17741/US

<150> US 61/506,491

<151> 2011-07-11

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи 1D4

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly

1                5                10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи 1D4

<400> 2

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys

1                5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи 1D4

<400> 3

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
 1            5            10

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR1 легкой цепи 1D4

<400> 4

Ser Ser Val Ser Tyr  
 1            5

<210> 5  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR2 легкой цепи 1D4

<400> 5

Ala Thr Ser  
 1

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR3 легкой цепи 1D4

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 1            5

<210> 7  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность вариабельной области тяжелой цепи 1D4

&lt;400&gt; 7

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
20				25					30						

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

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ala
50				55			60								

Leu	Lys	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65				70			75		80						

Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
85					90			95							

Cys	Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
100					105			110							

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			115		

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность вариабельной области легкой цепи 1D4

&lt;400&gt; 8

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

Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20                25                30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu  
 65                70                75                80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85                90                95

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

<210> 9

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи 1D4

<400> 9

caggtgacgc tgaaggagtc tggccctggg atattgcagc cctcccaagac cctcagtctg      60

acttggttctt tctctgggtt ttcaactgagc acttctggta tgggtgttagg ctggattctg      120

cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcacacattt ggtggatga tgataagtac      180

tataacacag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggc      240

ttcctcaaga tcgccagtgt ggacactaca gatactgcc aatactactg tgctcgaaa      300

gactgggacg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ctca      354

<210> 10

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Последовательность ДНК вариабельной области легкой цепи 1D4

<400> 10	
cagattgtac tgactcagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccaggggga gaaggtcaca	60
atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga	120
tctccccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgtcg	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcaacagagt ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cgtggacgtt cggtggaggc	300
accaagctgg agataaaa	318

<210> 11  
<211> 186  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Внеклеточный домен QX40 человека (аминокислоты 29-214 P43489)

<400> 11

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
1           5           10           15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp  
 85                90                95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala  
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln  
 115                120                125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro  
 130                135                140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr  
 145                150                155                160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr  
 165                170                175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala  
 180                185

<210> 12  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Рецептор OX40 человека (P43489)

<400> 12

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
 1                5                10                15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val  
 20                25                30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro  
 35                40                45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys  
 50                55                60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
 65                70                75                80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys

85                  90                  95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly  
 100                  105                  110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys  
 115                  120                  125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp  
 130                  135                  140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn  
 145                  150                  155                  160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro  
 165                  170                  175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr  
 180                  185                  190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu  
 195                  200                  205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val  
 210                  215                  220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu  
 225                  230                  235                  240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
 245                  250                  255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
 260                  265                  270

Thr Leu Ala Lys Ile  
 275

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> Протяженная CDR1 тяжелой цепи 1D4

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp  
 1           5           10

<210> 14  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> Протяженная CDR2 тяжелой цепи 1D4

<400> 14

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 1           5           10           15

Leu Lys Ser

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> Протяженная CDR3 тяжелой цепи 1D4

<400> 15

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
 1           5           10

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> Протяженная CDR1 легкой цепи 1D4

<400> 16

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
 1            5            10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Протяженная CDR2 легкой цепи 1D4

<400> 17

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1            5            10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Протяженная CDR3 легкой цепи 1D4

<400> 18

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 1            5

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IGHV2-70\*10 человека

<400> 19

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100                105                110

Val Ser Ser  
 115

<210> 20  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223>IGHV2-70\*01 человека

<400> 20

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65	70	75
----	----	----

80		
----	--	--

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100                105                110

Val Ser Ser  
 115

<210> 21  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> IGHV2-70\*13 человека

<400> 21

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100                105                110

Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223>IGHV2-5\*09 человека

<400> 22

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Gly Pro Ser  
 50            55            60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65            70            75            80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85            90            95

Cys Ala His Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100            105            110

Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IGHV2-70\*11 человека

&lt;400&gt; 23

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

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
20		25		30											

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

Trp	Leu	Ala	Arg	Ile	Asp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ser
50		55		60											

Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65		70		75		80									

Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
85		90		95											

Cys	Ala	Arg	Ile	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
100		105		110											

Val	Ser	Ser
115		

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IGKV3-11\*01 человека

&lt;400&gt; 24

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20                25                30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp  
 85                90                95

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

<210> 25  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> IGKV1-39\*01 человека

<400> 25

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 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20                25                30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85                90                95

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

<210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> IGKV1D-39\*01 человека

<400> 26

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 Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20                25                30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85                90                95

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

<210> 27  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IGKV3-11\*02

&lt;400&gt; 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20           25           30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp  
 85           90           95

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

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IGKV3-20\*01 человека

&lt;400&gt; 28

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35                  40                  45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85                90                95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100              105

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариабельный домен тяжелой цепи VH1

<400> 29

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20              25              30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50              55              60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65              70              75              80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85              90              95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 30  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен легкой цепи VL1  
 <400> 30

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

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

<210> 31  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; κДНК VH1-VL1 scFv

&lt;400&gt; 31

caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc	ctggtaagc ccaccagac actgaccctg	60
acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc	acaagcggca tggcggtgtc ctggatcaga	120
cagectcctg gcaaggccct ggaatggatc	gcccggtttt ggtgggacga cgacaagtac	180
tacagcacca gcctgaaaac ccggctgacc	atcagcaagg acaccagcaa gaaccagg	240
gtgctgacca tgaccaacat ggacccctg	gacaccgcca cctactactg cgccagaatc	300
gactgggacg gttcgccata ttggggccag	ggaaccctgg tcaccgtgtc tagggaggc	360
ggaggatctg gcggcggagg aagtggcgg	gggggatctg agatcgtgtc gacacagagc	420
cccgccaccc tgtctctgag ccctggcgaa	agagccaccc tgagctgtag agccagcagc	480
agcgtgtcct actacctggc ctggtatcag	cagaagcccc gccaggctcc ccggctgtcg	540
atctacgcca ccagcaatcg ggccacagggc	atccctgcca gatttctgg cagccgtcc	600
ggcaccgact tcaccctgac catctccagc	ctggaaccccg aggacttcgc cgtgtactac	660
tgccagcagt ggtccagcaa cccctggaca	tttggccagg gcaccaaggt ggaaatcaag	720

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH1 тяжелой цепи IGHG1

&lt;400&gt; 32

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

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
20		25		30											

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

Trp	Ile	Ala	Arg	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                230                235                240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245                250                255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260                  265                  270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275                  280                  285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290                  295                  300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                  310                  315                  320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325                  330                  335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340                  345                  350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355                  360                  365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                  375                  380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                  390                  395                  400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                  410                  415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                  425                  430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                  440                  445

<210> 33

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH2 тяжелой цепи IGHG1

&lt;400&gt; 33

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20           25           30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50           55           60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65           70           75           80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85           90           95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100          105         110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                230                235                240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245                250                255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260                265                270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275                280                285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290                295                300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                310                315                320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325                330                335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340                345                350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355                360                365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                375                380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                390                395                400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                  410                  415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                  425                  430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                  440                  445

<210> 34

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH3 тяжелой цепи IGHG1

<400> 34

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115                120                125

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                230                235                240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245                250                255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260                265                270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275                280                285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290                295                300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                310                315                320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325                330                335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340                345                350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355                360                365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                375                380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                390                395                400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                410                415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                425                430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                440                445

<210> 35

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH4 тяжелой цепи IGHG1

<400> 35

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                230                235                240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245                250                255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260                265                270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275                280                285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290                295                300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                310                315                320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325                330                335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340                345                350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355                360                365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                375                380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                390                395                400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                410                415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                425                430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                440                445

<210> 36  
 <211> 448  
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH5 тяжелой цепи IGHG1

<400> 36

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50            55            60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65            70            75            80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85            90            95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100            105            110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180	185	190	30
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                  410                  415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                  425                  430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                  440                  445

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH6 тяжелой цепи IGHG1

<400> 37

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                  25                  30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50                  55                  60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                  70                  75                  80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                  90                  95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                  105                  110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                230                235                240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245                250                255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260                265                270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275                280                285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290                295                300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                310                315                320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325                330                335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340                345                350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355                360                365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370                375                380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                390                395                400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405                410                415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420                425                430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                440                445

<210> 38  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH7 тяжелой цепи IGHG1

<400> 38

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35	40	45	
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala			
50	55	60	
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val			
65	70	75	80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260            265            270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275            280            285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290            295            300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305            310            315            320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325            330            335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340            345            350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355            360            365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370            375            380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385            390            395            400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405            410            415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420            425            430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435            440            445

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL1 легкой цепи

<400> 39

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
85 90 95

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

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  
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 40  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL2 легкой цепи  
 <400> 40

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

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

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  
 130                135                140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 41  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL3 легкой цепи

<400> 41

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                70                75                80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

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

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  
 130                135                140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 42  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL4 легкой цепи

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                70                75                80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

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

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  
 130                135                140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 43  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL5 легкой цепи

<400> 43

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

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

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35            40            45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50            55            60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65            70            75            80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85            90            95

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

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  
 130            135            140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 44  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL6 легкой цепи

<400> 44

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

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

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35                40                45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                70                75                80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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  
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 45  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL7 легкой цепи

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                55                60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65                70                75                80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85                90                95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 46  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL8 легкой цепи

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85            90            95

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195                200                205

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 47  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL9 легкой цепи  
<400> 47

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20                25                30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr  
35                40                45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50                55                60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65                70                75                80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85                90                95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 48  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL10 легкой цепи

<400> 48

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 49  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL11 легкой цепи

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                55                60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65                70                75                80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85                90                95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 50  
 <211> 448  
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь химеры 1D4

<400> 50

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50            55            60

Leu Lys Ser Gly Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65            70            75            80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85            90            95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100            105            110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			

385            390            395            400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405            410            415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420            425            430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435            440            445

<210> 51

<211> 213

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь химеры 1D4

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu  
 65            70            75            80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85            90            95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 52  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<220>  
 <223> внеклеточный домен OX40 крысы  
 <400> 52

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
 1                5                10                15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
 20                25                30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr  
 35                40                45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn  
 50                55                60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp  
 65            70            75            80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser  
 85            90            95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser  
 100            105            110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser  
 115            120            125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys  
 130            135            140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr  
 145            150            155            160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr  
 165            170            175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
 180            185            190

<210> 53

<211> 191

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерный внеклеточный домен OX40 человека-крысы RHRR

<400> 53

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
 1            5            10            15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
 20            25            30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr  
 35            40            45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn  
 50            55            60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp  
 65            70            75            80

Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser  
 85            90            95

His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser  
 100            105            110

Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser  
 115            120            125

Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys  
 130            135            140

Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr  
 145            150            155            160

Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr  
 165            170            175

Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
 180            185            190

<210> 54

<211> 190

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерный внеклеточный домен OX40 человека-крысы RHHH

<400> 54

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His  
 1            5            10            15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys  
 20            25            30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr  
 35            40            45

Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn  
 50            55            60

Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp  
 65            70            75            80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys  
 85            90            95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly  
 100            105            110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys  
 115            120            125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp  
 130            135            140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala  
 145            150            155            160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln  
 165            170            175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala  
 180            185            190

<210> 55

<211> 187

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерный внеклеточный домен ОХ40 человека-крысы HHRR

<400> 55

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His  
 1            5            10            15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln  
 20            25            30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val  
 35            40            45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly  
 50            55            60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Gln  
 65            70            75            80

Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser Ser His Lys Leu Gly  
 85            90            95

Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Ser Asn  
 100            105            110

Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile  
 115            120            125

Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser  
 130            135            140

Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro  
 145            150            155            160

Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro  
 165            170            175

Ser Thr Pro Thr Leu Val Ala Pro Glu Gly Pro  
 180            185

<210> 56

<211> 189

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Химерный внеклеточный домен ОХ40 человека-крысы RRHH

<400> 56

Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro Ser Gly His

1 5 10 15

Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg Cys

20 25 30

Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro Gly Phe Tyr

35 40 45

Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys Asn

50 55 60

His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Glu Asp

65 70 75 80

Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys

85 90 95

Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly

100 105 110

Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys

115 120 125

His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp

130 135 140

Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala

145 150 155 160

Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln

165 170 175

Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg  
 180                  185

<210> 57  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH6 тяжелой цепиIGHG4 S228P

<400> 57

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
 130                135                140

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
 195            200            205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys  
 210            215            220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225            230            235            240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245            250            255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260            265            270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275            280            285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290            295            300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305            310            315            320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325            330            335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340            345            350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355                360                365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370                375                380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385                390                395                400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405                410                415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420                425                430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435                440                445

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариабельный домен тяжелой цепи VH6

<400> 58

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 59  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен тяжелой цепи VH7

<400> 59

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20              25              30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50              55              60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65              70              75              80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85              90              95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 60  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> вариабельный домен легкой цепи VL9  
<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20            25            30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr  
35            40            45

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85            90            95

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

<210> 61  
<211> 354  
<212> DNA  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность ДНК, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи VH6

<400> 61  
caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtaagc ccacccagac actgaccctg      60

acctgcagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tggcggtgg ctggatcaga 120  
 cagecctctg gcaaggccct ggaatggatc gcccatattt ggtggatga tgataaatat 180  
 tataacacccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagg 240  
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccggtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300  
 gactgggacg gtttcgccta ttggggccag ggaaccctgg tgaccgttag cagc 354

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность ДНК, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи VH7

&lt;400&gt; 62

caggtcacac tgaaagagtc tggacccgcc ctggtaagc ccaccagac actgaccctg 60  
 acctgcagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggca tggcggtgg ctggatcaga 120  
 cagcctctg gcaaggccct ggaatggctc gcccacattt ggtggatga tgataaatat 180  
 tataacacccg ccctgaaaac ccgcctgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagg 240  
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccggtg gacaccgcca cctactactg cgccagaatc 300  
 gactgggacg gtttcgccta ttggggccag ggcaccctgg tgaccgttag cagc 354

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность ДНК, кодирующая вариабельный домен легкой цепи VH6VL9

&lt;400&gt; 63

gagatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga aagagccacc 60  
 ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatgcact ggtatcagca gaagccggc 120  
 caggcgccgc gcccggttatgtcgacc agcaatcggtt ccacaggcat ccctgcccaga 180  
 tttctggca gggctccgg caccgactac accctgacca tctccagcct ggaaccggag 240  
 gacttcgcgc tgtactactg ccagcagtgg tccagcaacc cctggacatt tggccaggc 300

accaaagtgg aaataaaa 318

<210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR1 VH6 тяжелой цепи

<400> 64

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly  
 1            5            10

<210> 65  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR2 VH6 тяжелой цепи

<400> 65

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys  
 1            5

<210> 66  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> CDR3 VH6 тяжелой цепи

<400> 66

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
 1            5            10

<210> 67  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>

<223> CDR1 VL9 легкой цепи

<400> 67

Ser Ser Val Ser Tyr  
1            5

<210> 68

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> CDR2 VL9 легкой цепи

<400> 68

Ala Thr Ser  
1

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> CDR3 VL9 легкой цепи

<400> 69

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
1            5

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Протяженная CDR1 VH6 тяжелой цепи

<400> 70

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp  
1            5            10

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Протяженная CDR2 VH6 тяжелой цепи

<400> 71

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 1           5           10           15

Leu Lys Thr

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Протяженная CDR3 VH6 тяжелой цепи

<400> 72

Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr  
 1           5           10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Протяженная CDR1 VL9 легкой цепи

<400> 73

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr  
 1           5           10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Протяженная CDR2 VL9 легкой цепи

<400> 74

Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr  
 1            5            10

<210> 75  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <223> Протяженная CDR3 VL9 легкой цепи

<400> 75

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 1            5

<210> 76  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Модуль 2 внеклеточного домена OX40 человека

<400> 76

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
 1            5            10            15

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys  
 20            25            30

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg  
 35            40

<210> 77  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен VH2 тяжелой цепи

<400> 77

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Ile Ala Arg Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50            55            60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65            70            75            80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85            90            95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100            105            110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариабельный домен VH3 тяжелой цепи

<400> 78

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20            25            30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                105                110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 79  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен VH4 тяжелой цепи  
 <400> 79

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20                25                30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
 50                55                60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                70                75                80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85                90                95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 80  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен VH5 тяжелой цепи

<400> 80

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20              25              30

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

Trp Ile Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala  
 50              55              60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65              70              75              80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85              90              95

Cys Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 81  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариабельный домен VL2 легкой цепи

<400> 81

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50            55            60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85            90            95

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

<210> 82  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариабельный домен VL3 легкой цепи

<400> 82

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                70                75                80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85                90                95

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

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL4 легкой цепи

<400> 83

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85              90              95

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

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL5 легкой цепи

<400> 84

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

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

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35              40              45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50              55              60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85              90              95

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

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL6 легкой цепи

<400> 85

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

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

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile  
 35            40            45

Tyr Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50            55            60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65            70            75            80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp  
 85            90            95

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

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL7 легкой цепи

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85            90            95

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

<210> 87

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL8 легкой цепи

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85                90                95

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

<210> 88  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариабельный домен VL10 легкой цепи

<400> 88

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20                25                30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                55                60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
 65                70                75                80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
 85                90                95

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

<210> 89  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельный домен VL11 легкой цепи

<400> 89

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20            25            30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50            55            60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65            70            75            80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Trp Thr  
85            90            95

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

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антагонистичное антитело или фрагмент указанного антитела, которые связываются с OX40 человека, и содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, и/или, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5 и/или CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.
2. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1, которые отличаются тем, что указанное антитело или его фрагмент содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 2, CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 3; и/или содержат CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 6.
3. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, которые отличаются тем, что указанное антитело представляет собой антитело мыши, химерное антитело или гуманизированное антитело.
4. Антитело или указанного антитела фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, которые отличается тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
5. Антитело или указанного антитела фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 7.

6. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID №: 7.
7. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность тяжелой цепи, содержащей последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 35, 36, 37 и 38.
8. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.7, отличающиеся тем, что указанная последовательность тяжелой цепи содержит область, отличную от CDR,, которая по меньшей мере на 80% идентична области, отличной от CDR, последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 35, 36, 37 или 38.
9. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 58, 59, 79 и 80.
10. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат область, отличную от CDR, последовательности вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична области, отличной от CDR, последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 58, 59, 79 и 80.
11. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGHV2-70\*10 (SEQ ID №: 19), IGHV2-70\*01 (SEQ ID №: 20), IGHV2-70\*13 (SEQ ID №: 21), IGHV2-5\*09 (SEQ ID №: 22) и IGHV2-70\*11 (SEQ ID №: 23).
12. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGHV2-70\*10

(SEQ ID №: 19), и отличающиеся тем, что указанная каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышного антитела.

13. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 32, и отличающиеся тем, что указанная каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи соответствующего мышного антитела.

14. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела по п. 12 или 13, отличающиеся тем, что модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23, 35b, 48, 50, 60 и 62, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

15. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела по п. 12 или 13, отличающиеся тем, что модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 23S, 35bG, 48L, 50H, 60N, и 62A, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

16. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID №: 8.

17. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи SEQ ID №: 8.

18. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность легкой цепи,

содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 45, 46, 47 и 49.

19. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.18, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 45, 46, 47 или 49.

20. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 60, 86, 87 и 89.

21. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности области, отличной от CDR, вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 60, 86, 87 и 89.

22. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность каркасного участка вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), IGKV1-39\*01 (SEQ ID №: 25), IGKV1D-39\*01 (SEQ ID №: 26), IGKV3-11\*02 (SEQ ID №: 27) и IGKV3-20\*01 (SEQ ID №: 28).

23. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат каркасный участок вариабельной области легкой цепи, которая является продуктом или получена из гена человека IGKV3-11\*01 (SEQ ID №: 24), и при этом указанный каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего мышевого антитела.

24. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или его фрагмент содержат последовательность легкой цепи,

содержащую последовательность аминокислот of SEQ ID №: 39, и при этом каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с соответствующим каркасным участком вариабельной области легкой цепи соответствующего мышного антитела.

25. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела по п. 23 или 24, отличающиеся тем, что указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1, 33, 34, 46, 47, 54, 56 и 71, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

26. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела по п. 23 или 24, отличающиеся тем, что указанная модификация аминокислоты включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из 1Q, 33M, 34H, 46P, 47W, 54L, 56S, и 71Y, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

27. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела по п. 23 или 24, отличающиеся тем, что указанная модификация аминокислоты включает делецию аминокислоты в положении 31, при этом положение аминокислоты для каждого члена группы указывается в соответствии с нумерацией по Кабату.

28. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.2, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент указанного антитела содержат:

- (c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 37 или 38; и
- (d) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 47.

29. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.2, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент указанного антитела содержат:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 58 или 59; и
- (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот согласно SEQ ID №: 60.

30. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 29, отличающиеся тем, что по меньшей мере один из CDR тяжелой цепи и/или один из CDR легкой цепи содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты.
31. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 30, дополнительно содержащие константные области тяжелой и/или легкой цепи.
32. Антитело или фрагмент указанного антитела по п.31, отличающиеся тем, что указанную константную область тяжелой цепи человека выбирают из областей группы иммуноглобулинов человека, состоящей из IGHG1, не фукозилированного IGHG1 и IGHG4.
33. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 31, отличающиеся тем, что указанное антитело является моновалентным антителом.
34. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 31, отличающиеся тем, что указанное антитело является полноразмерным антителом.
35. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 31, отличающиеся тем, что указанное антитело является фрагментом антитела, выбранным из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')2, scFv, биспецифических одноцепочечных димеров Fv, диател, триател и фрагментов scFv, образованных посредством слияния генов одинаковых или разных антител.
36. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 31, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит вариант области Fc, который содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты по сравнению с областью Fc исходного антитела, тогда как указанное антитело, содержащее вариант области Fc, проявляет измененную эффекторную функцию по сравнению с исходным антителом.
37. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 36, отличающиеся тем, что указанное антитело или фрагмент указанного антитела связываются OX40 человека со сродством (KD) 110 nM или менее.
38. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 36, отличающиеся тем, что указанное антитело или фрагмент указанного антитела сохраняют по меньшей

мере 75% от сродства связывания с OX40 ( $K_D$ ) по сравнению с соответствующим химерным антителом.

39. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 36, отличающиеся тем, что указанное антитело или фрагмент указанного антитела обладают таким же или более высоким сродством связывания ( $K_D$ ) по сравнению с соответствующим химерным антителом.

40. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 36, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит фрагмент FAB, который термостабилен при температуре выше 75°C.

41. Антитело или фрагмент указанного антитела, которые связывается с OX40 человека и которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело по любому из п. 1 - 36.

42. Эпитоп на внеклеточном домене OX40 человека, с которым связывается антитело по любому из п. 1 - 36.

43. Эпитоп по п.42, отличающейся тем, что указанным внеклеточным доменом OX40 человека является домен 2 (SEQ ID №: 76).

44. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41.

45. Изолированная нуклеиновая кислота по п.44, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, содержащая последовательность нуклеотидов согласно SEQ ID №: 61 или 62; и/или ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи, содержащая последовательность нуклеотидов согласно SEQ ID №: 63.

46. Вектор, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту по п. 44 или 45.

47. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 44 или 45 или вектор по п. 46.

48. Способ получения антитела или фрагмент указанного антитела а, которые связываются с OX40 человека, включающий культивирование клетки-хозяина по п.47, таким образом, что указанная нуклеиновая кислота экспрессируется, и происходит продукция указанного антитела.

49. Антитело или фрагмент указанного антитела , которое связывается с ОХ40 человека, кодируемое изолированной нуклеиновой кислотой по п. 44 или 45.

50. Композиция, содержащая антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41 и фармацевтически приемлемую основу.

51. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 – 41, соединенное с терапевтическим агентом.

52. Композиция, содержащая иммуноконъюгат по п. 51 и фармацевтически приемлемую основу.

53. Композиция по п. 50 или 52, дополнительно содержащая другой фармацевтически активный агент.

54. Способ лечения ОХ40-опосредованного расстройства у субъекта, способ, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента указанного антитела а по любому из п. 1 - 41.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что указанное ОХ40-опосредованное расстройство выбрано из группы, включающей инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунныйuveит, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпурну, синдром Меньера, пузырчатку, первичный биллиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, другие аутоиммунные расстройства, панкреатит, травму (операцию), реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной

ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелит зрительного нерва.

56. Способ по п.54, отличающийся тем, что указанное ОХ40-опосредованное расстройство выбрано из группы, включающей инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные), эндотоксический шок, ассоциированный с инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астму, бронхит, грипп, респираторно-синцитиальный вирус, пневмонию, ХОБЛ, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), криптогенный фиброзирующий альвеолит (КФА), идиопатическую фиброзирующую интерстициальную пневмонию, эмфизему, воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, глютеновую болезнь, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, васкулит, послеоперационные спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунныйuveит, иммунно-опосредованные воспалительные расстройства центральной и периферической нервной системы, такие как множественный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка) и синдром Джулиана-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, нефропатию IgA-типа, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпурну, синдром Меньера, пузырчатку, первичный биллиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, грануллематоз Вегенера и другие аутоиммунные расстройства, панкреатит, травму (операцию), реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD), отторжение трансплантата, сердечно-сосудистые заболевания, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистое свертывание, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит, гипохлоргидрию и нейромиелит зрительного нерва.

57. Способ по любому из п. 54 - 56, отличающийся тем, что указанный субъект имеет низкий уровень экспрессии ОХ40.

58. Способ по любому из п. 54 to 56, отличающийся тем, что указанное антитело обладает повышенной цитотоксичностью по сравнению с антителом, содержащим константную область тяжелой цепи человекаIGHG1.

59. Применение антитела или фрагмента указанного антитела по любому из п. 1 - 41 в качестве лекарственного препарата.

60. Применение антитела или фрагмента указанного антитела по любому из п. 1 - 41 при получении лекарственного препарата для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

61. Применение антитела или фрагмент указанного антитела по п. 60, отличающееся тем, что указанным ОХ40-опосредуемым расстройством является GVHD, и при этом указанное антитело или фрагмент указанного антитела более эффективны, чем Энврел<sup>®</sup> при подавлении GVHD.

62. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41 для применения в качестве лекарственного препарата.

63. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41 для применения в способе лечения ОХ40- опосредованного расстройства.

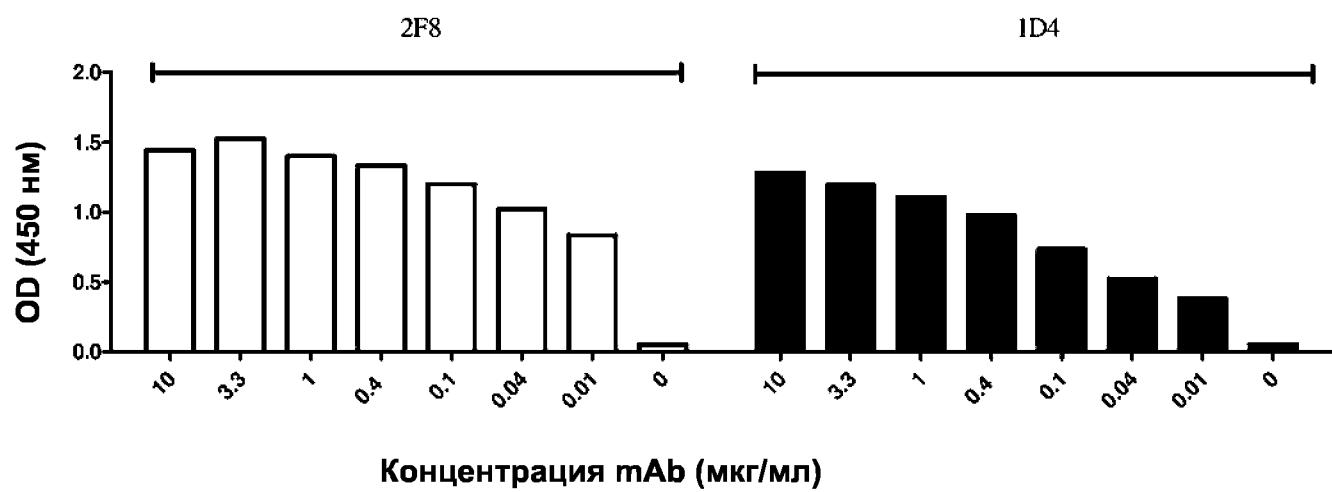
64. Антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41 для применения в способе лечения ОХ40- опосредованного расстройства, отличающееся тем, что указанным ОХ40-обусловленным расстройством является GVHD, и отличающееся тем, что указанное антитело или фрагмент указанного антитела более эффективны, чем Энврел<sup>®</sup> при подавлении GVHD.

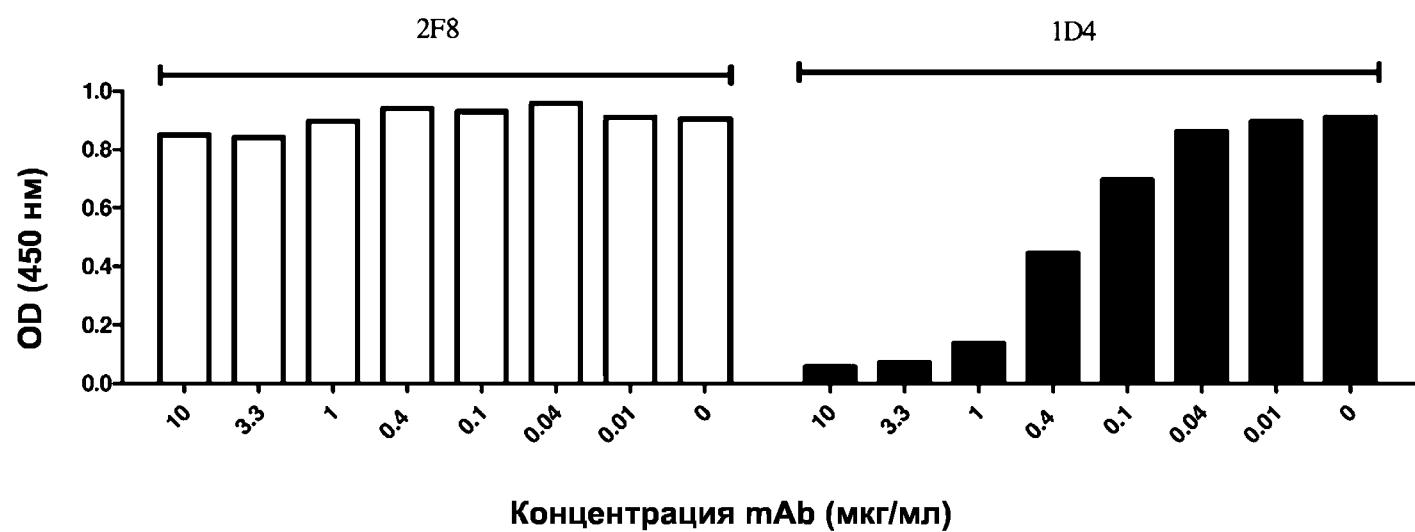
65. Готовое изделие, содержащее антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 41, композицию по п.50, 52 или 53, или иммуноконъюгат по п.51, для лечения ОХ40-опосредованного расстройства.

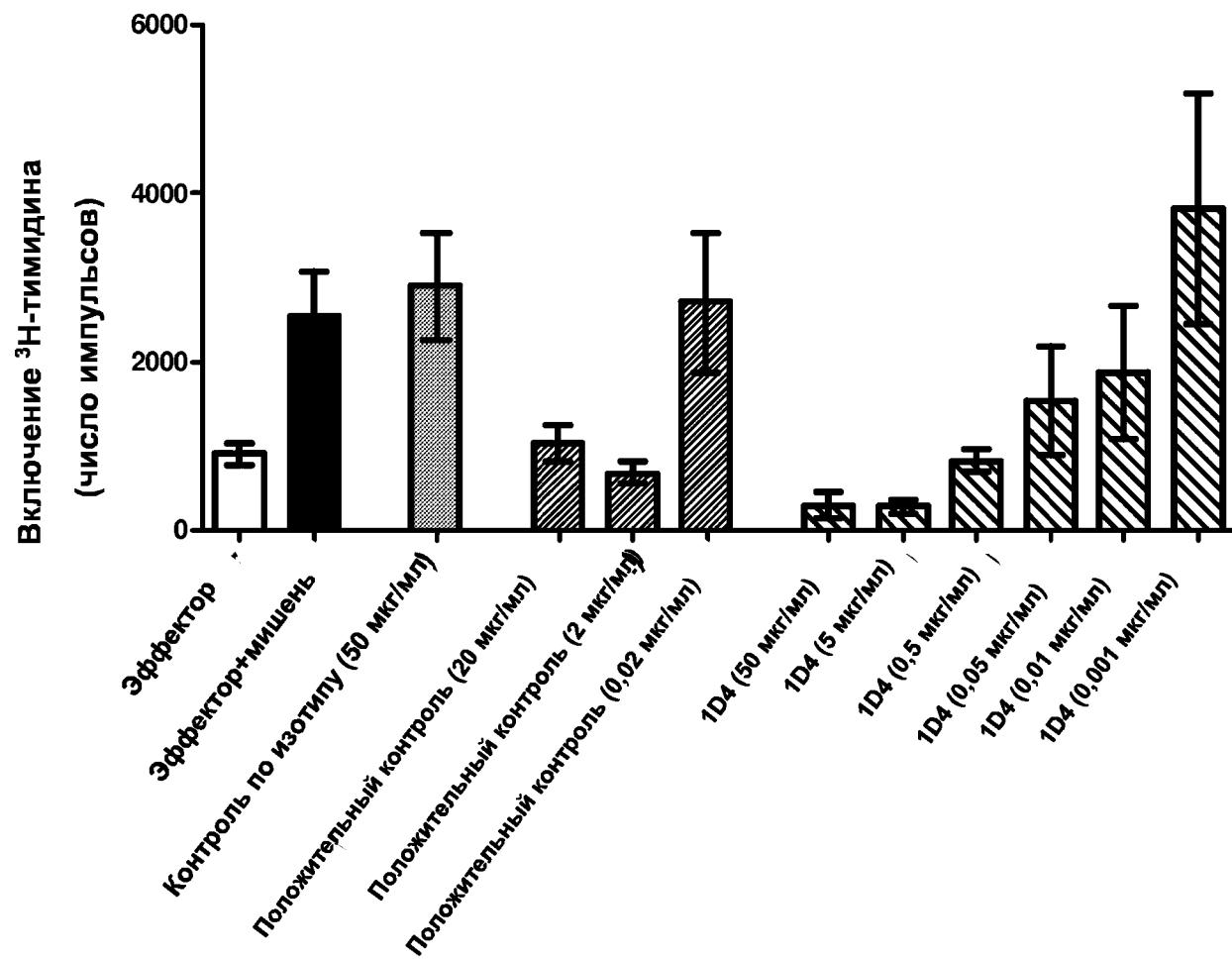
66. Набор, включающий антитело или фрагмент указанного антитела по любому из п. 1 - 30, композицию по п.50, 52 или 53, или иммуноконъюгат по п.51 для лечения ОХ40- опосредованного расстройства.

67. Способ скрининга *in vitro* для определения пациента с низким уровнем экспрессии ОХ40, включающий этапы:

- (а) очистки мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от других компонентов пробы крови пациента;
- (б) осуществление анализа PBMC способом проточной цитометрии ; и
- (с) определение количества ОХ40-положительных клеток среди CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и сравнение указанного количества с контрольными уровнями.

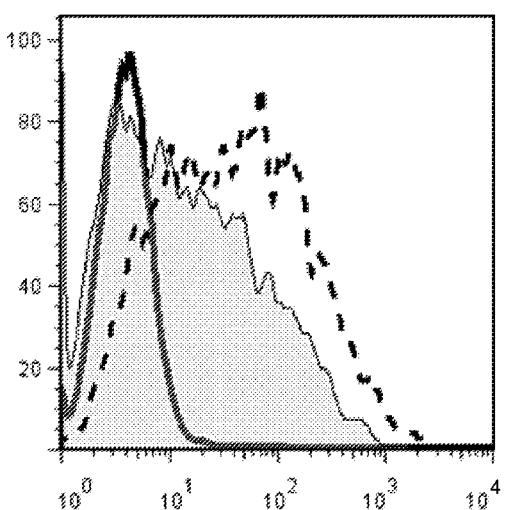
**ФИГ.1А**

**ФИГ.1В**

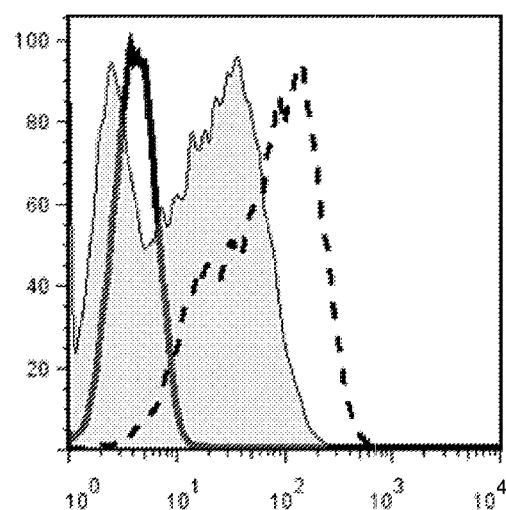
**ФИГ.2**

## ФИГ.3А

Активированные РВМС человека



HPB-ALL



Флуоресценция окрашенного антитела



Контроль по изотипу

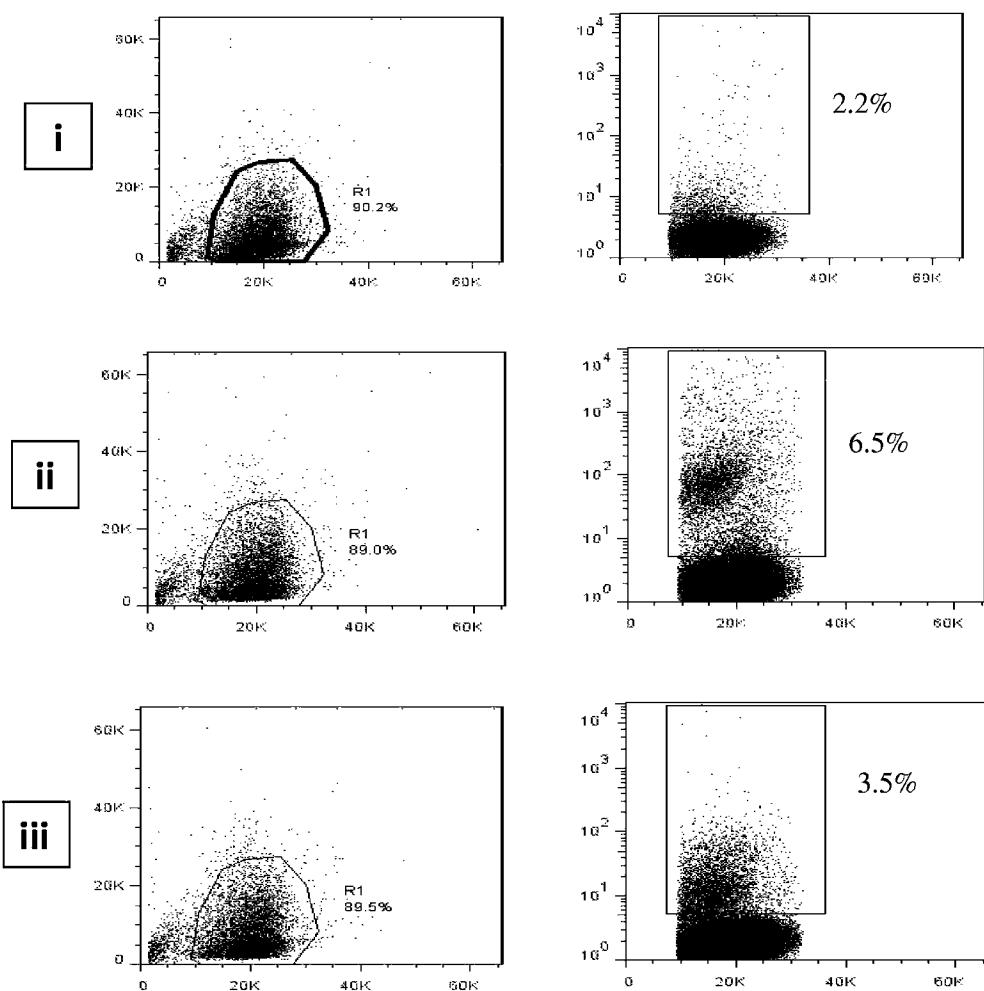


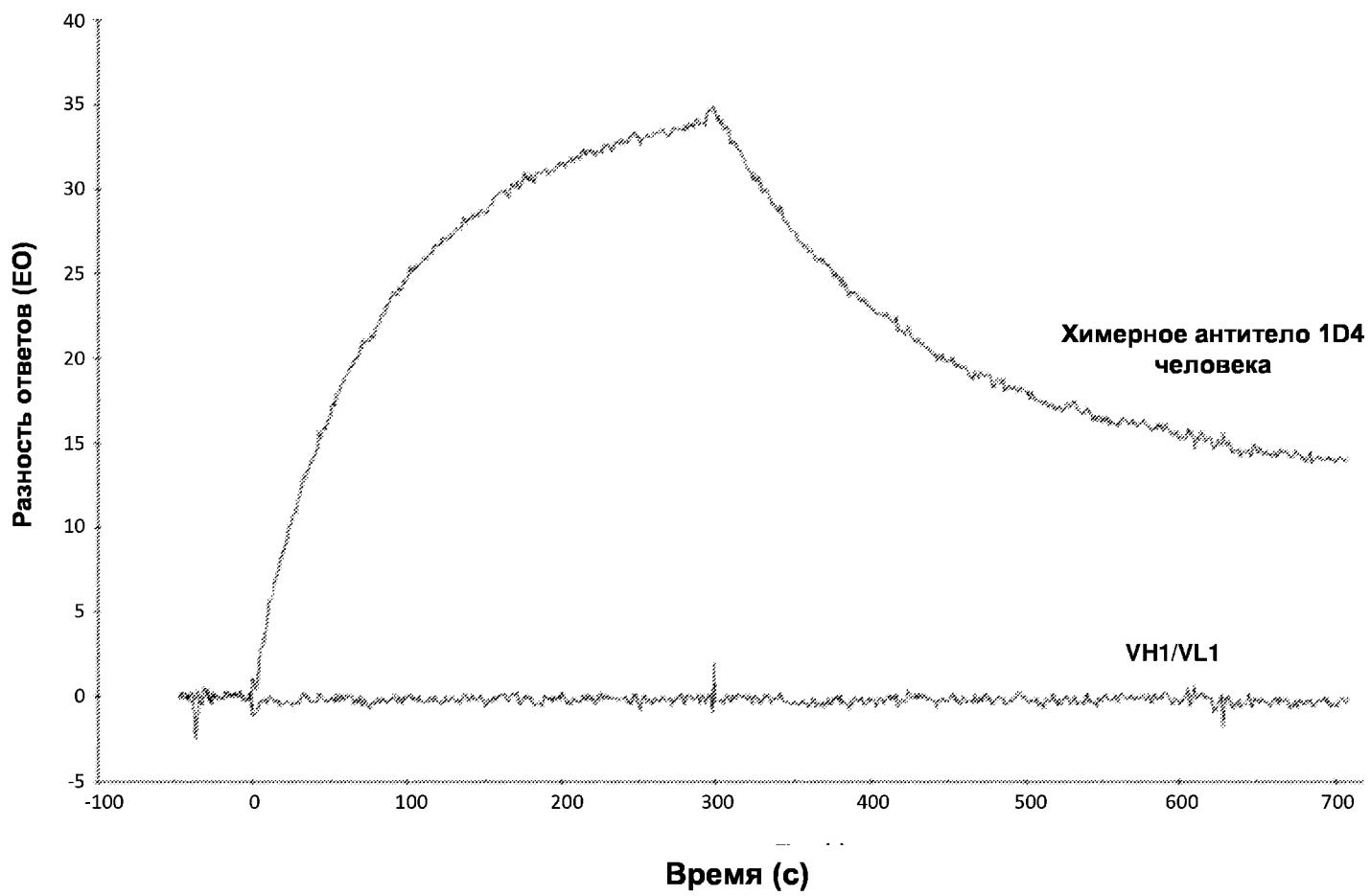
Коммерческое анти-OX40



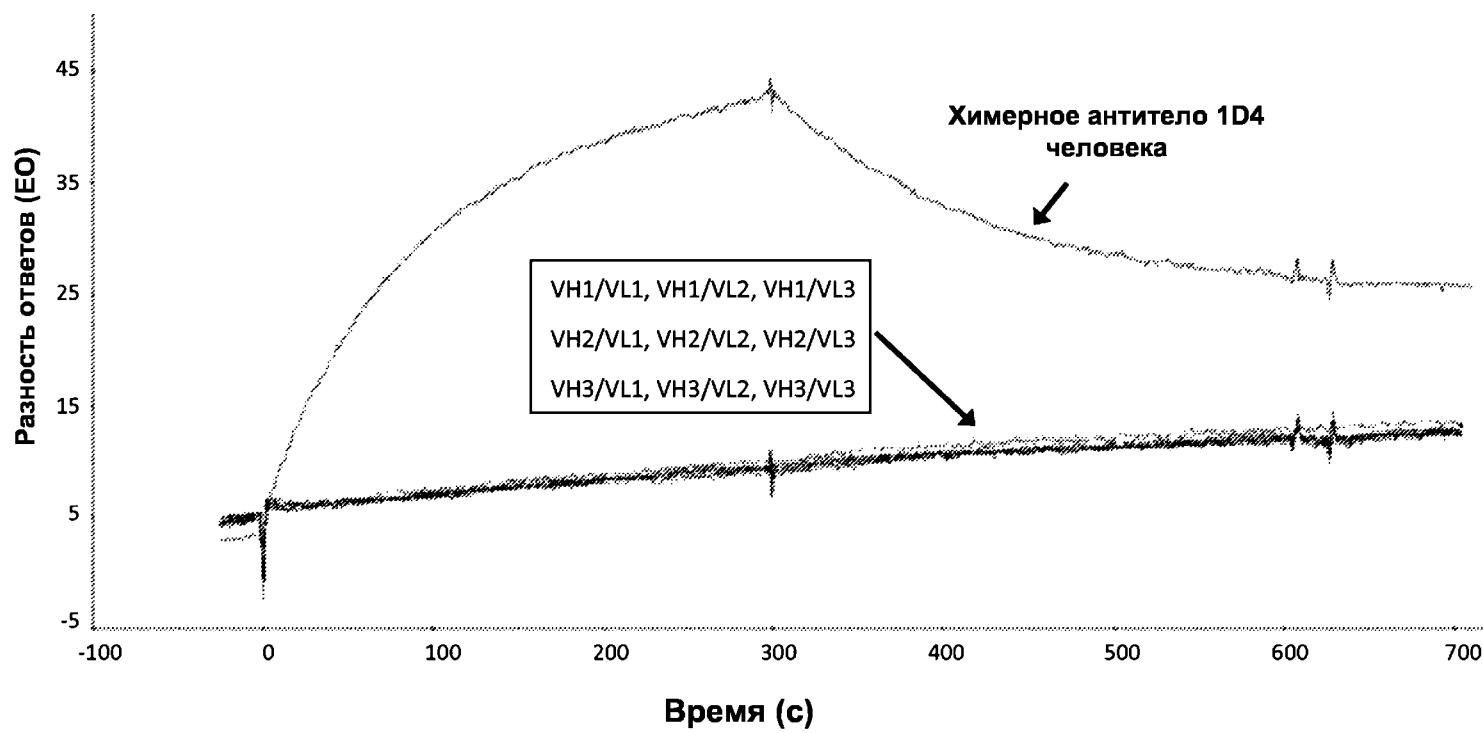
1D4

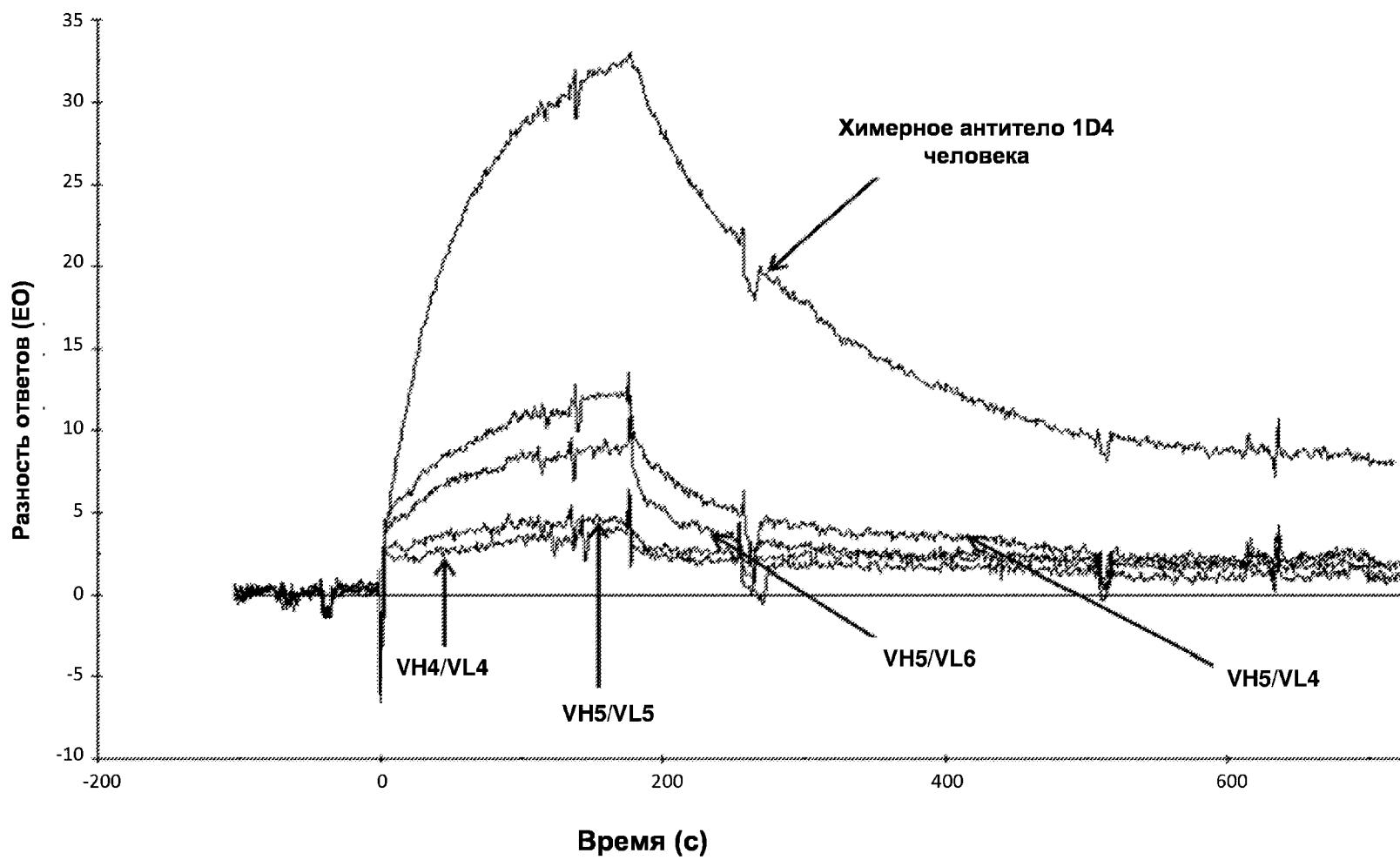
## ФИГ.3В

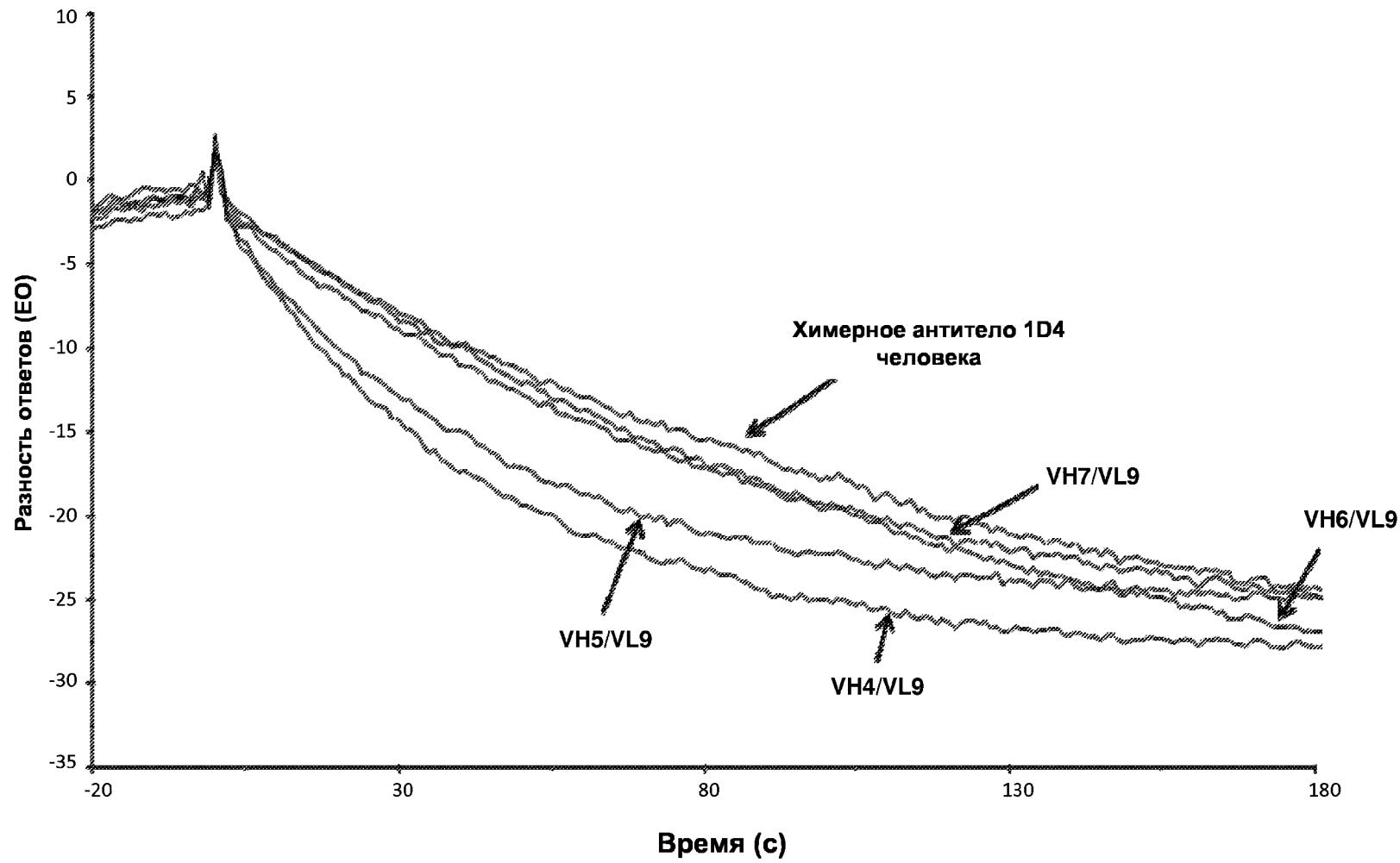


**ФИГ.4А**

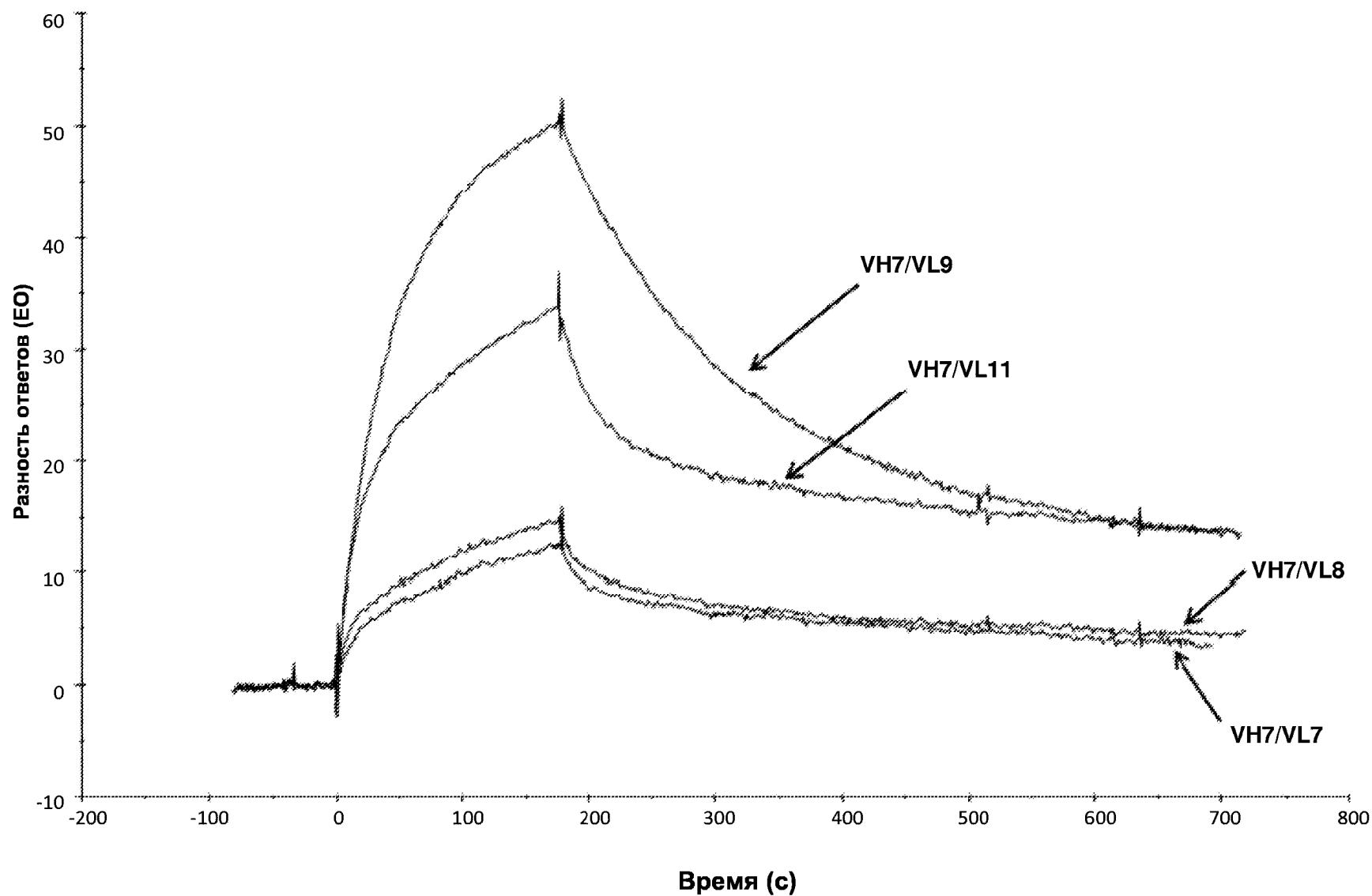
ФИГ.4В

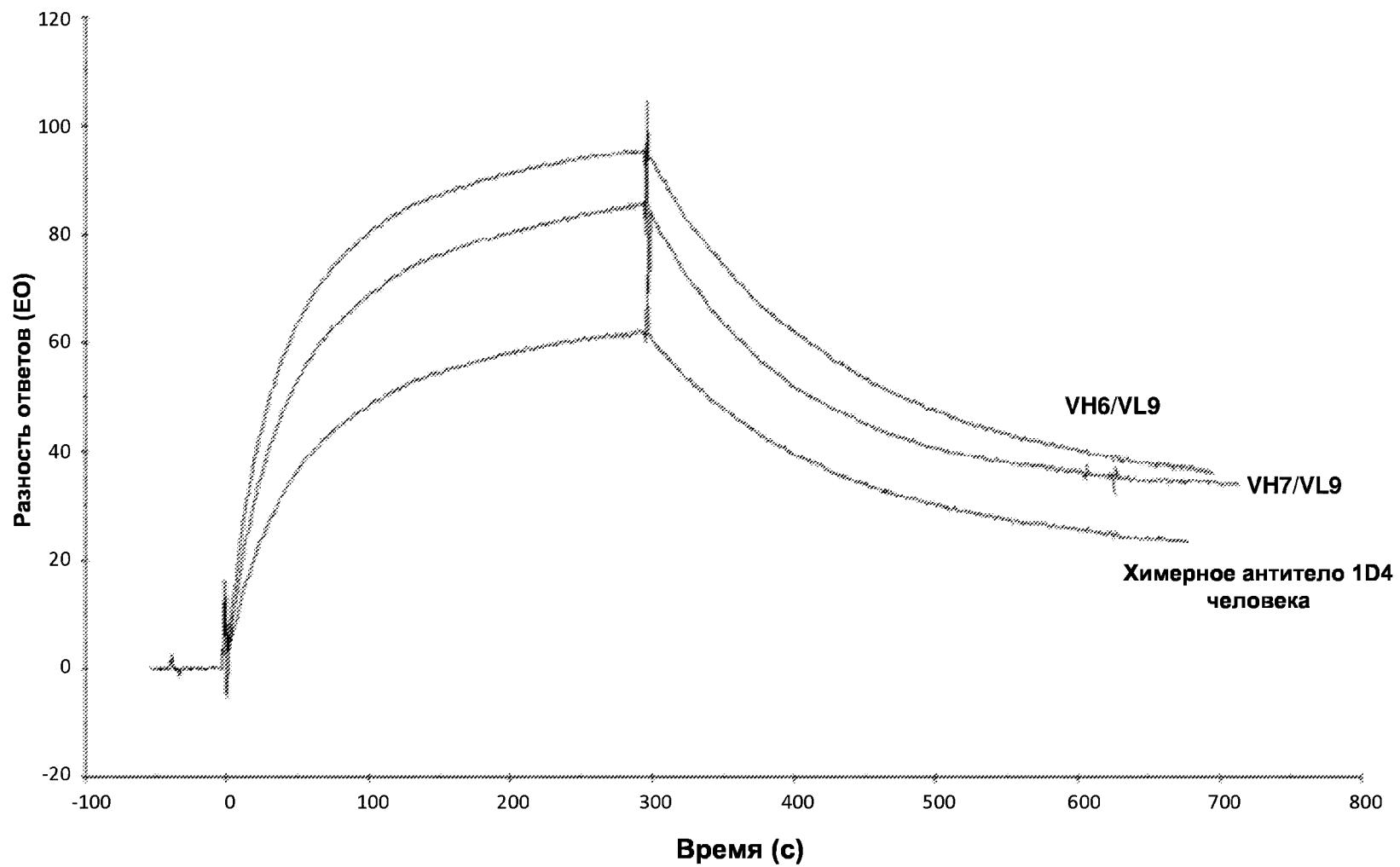


**ФИГ.4С**

**ФИГ.4Д**

ФИГ.4Е



**ФИГ.4F**

ФИГ.5А

**№ VH по Кабету**  
1D4 VH  
**IGHV2-70\*10 человек**  
VH1  
VH2 [T23S]  
VH3 [R50H]  
VH4 [T23S/R50H]  
VH5 [T23S/R50H/S]  
VH6 [T23S/S35bg/  
VH7 [T23S/S35bg/

**№ VH по Кабелу**  
1D4 VH  
**IGHV2-70\*10** чиповки  
VH1  
VH2 [T23S]  
VH3 [R50H]  
VH4 [T23S/R50H]  
VH5 [T23S/R50H/S60N/S62A]  
VH6 [T23S/S35bG/R50H/S60N/S62A]  
VH7 [T23S/S35bG/I48L/R50H/S60N]

ФИГ.5В

№ VL по Кабалу  
1D4 VL  
IGHV-3-11°01 Чаттерjee

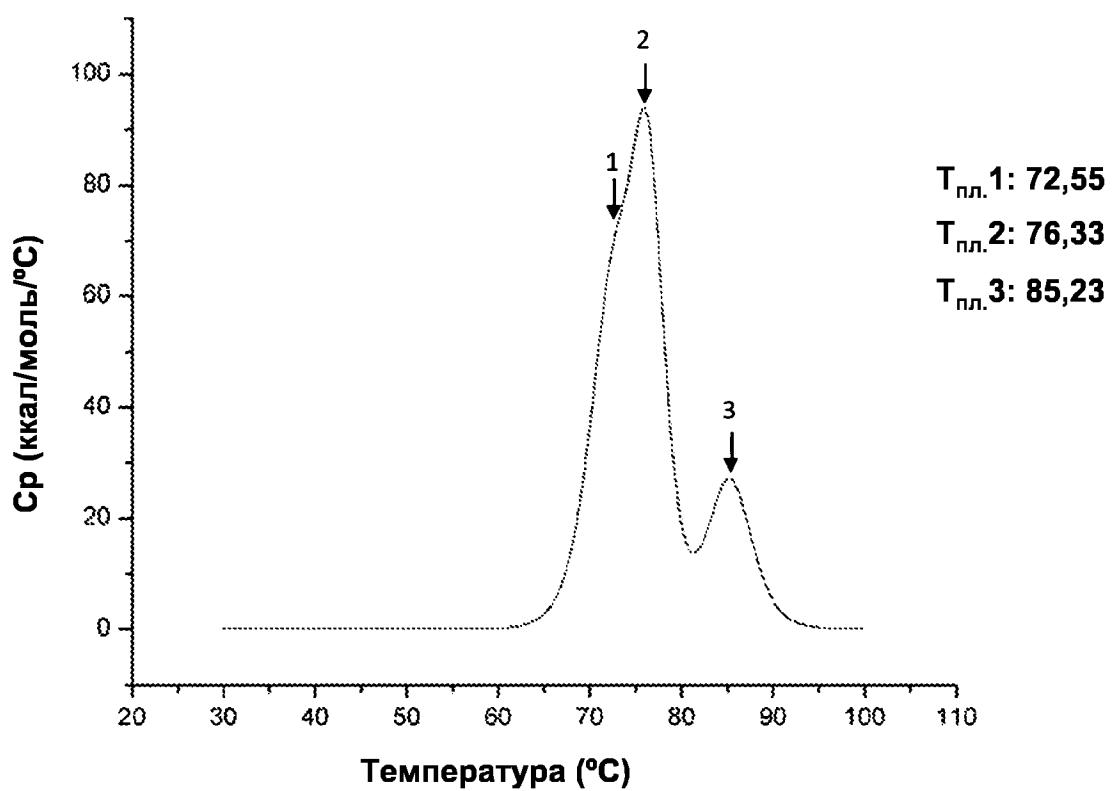
VL1  
VL2 [L33M]  
VL3 [F71Y]  
VL4 [L33M/F71Y]  
VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]  
VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]  
VL7 [Y31del/L33M/F71Y]  
VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]  
VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]  
VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71W]  
VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]

№ VL по Кабелу  
1D4 VL  
IGHV-3-11°01 ЧПГЭМЗ

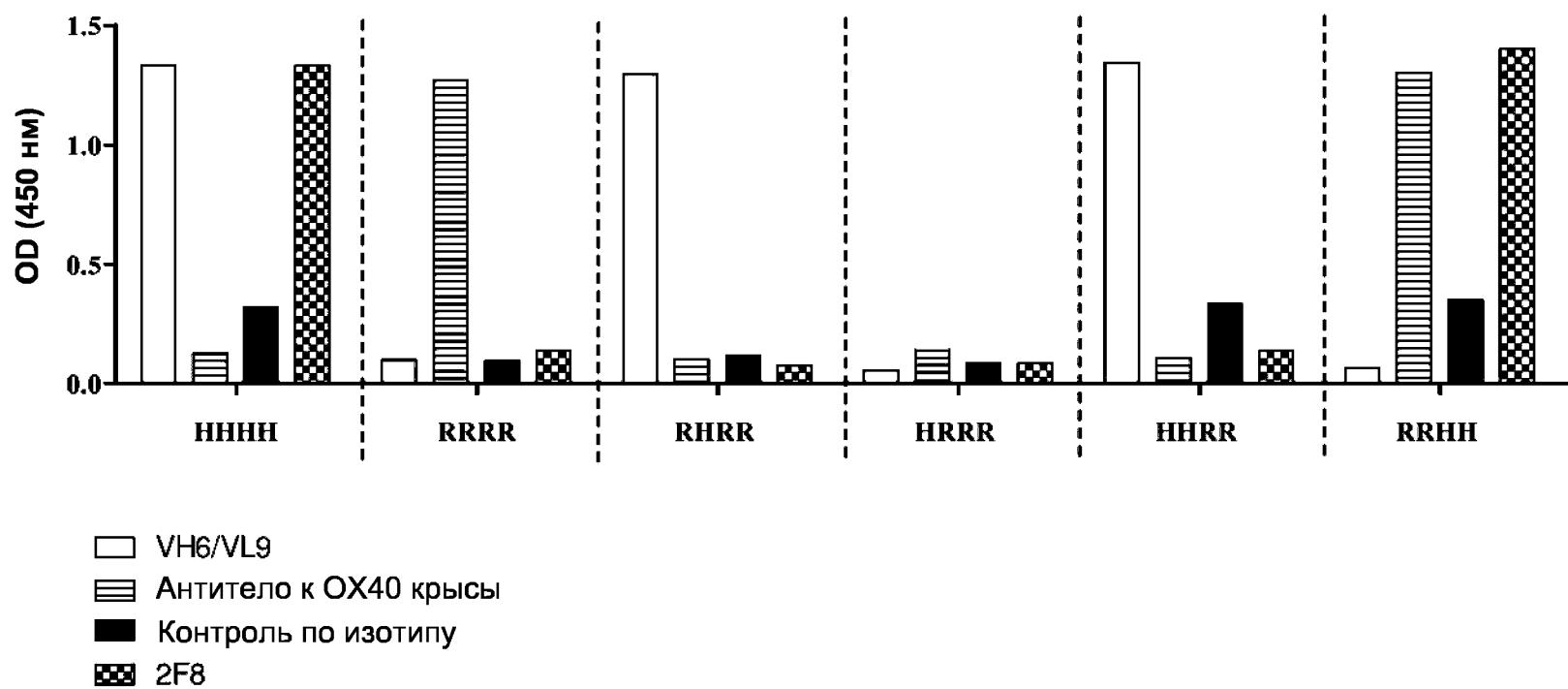
VL1  
VL2 [L33M]  
VL3 [F71Y]  
VL4 [L33M/F71Y]  
VL5 [L33M/L46P/L47W/F71Y]  
VL6 [E1Q/L33M/L46P/L47W/F71Y]  
VL7 [Y31del/L33M/F71Y]  
VL8 [Y31del/L33M/A34H/F71Y]  
VL9 [Y31del/L33M/A34H/L46P/L47W/F71Y]  
VL10 [Y31del/L33M/R54L/T56S/F71Y]  
VL11 [Y31del/L33M/A34H/R54L/T56S/F71Y]

13/18

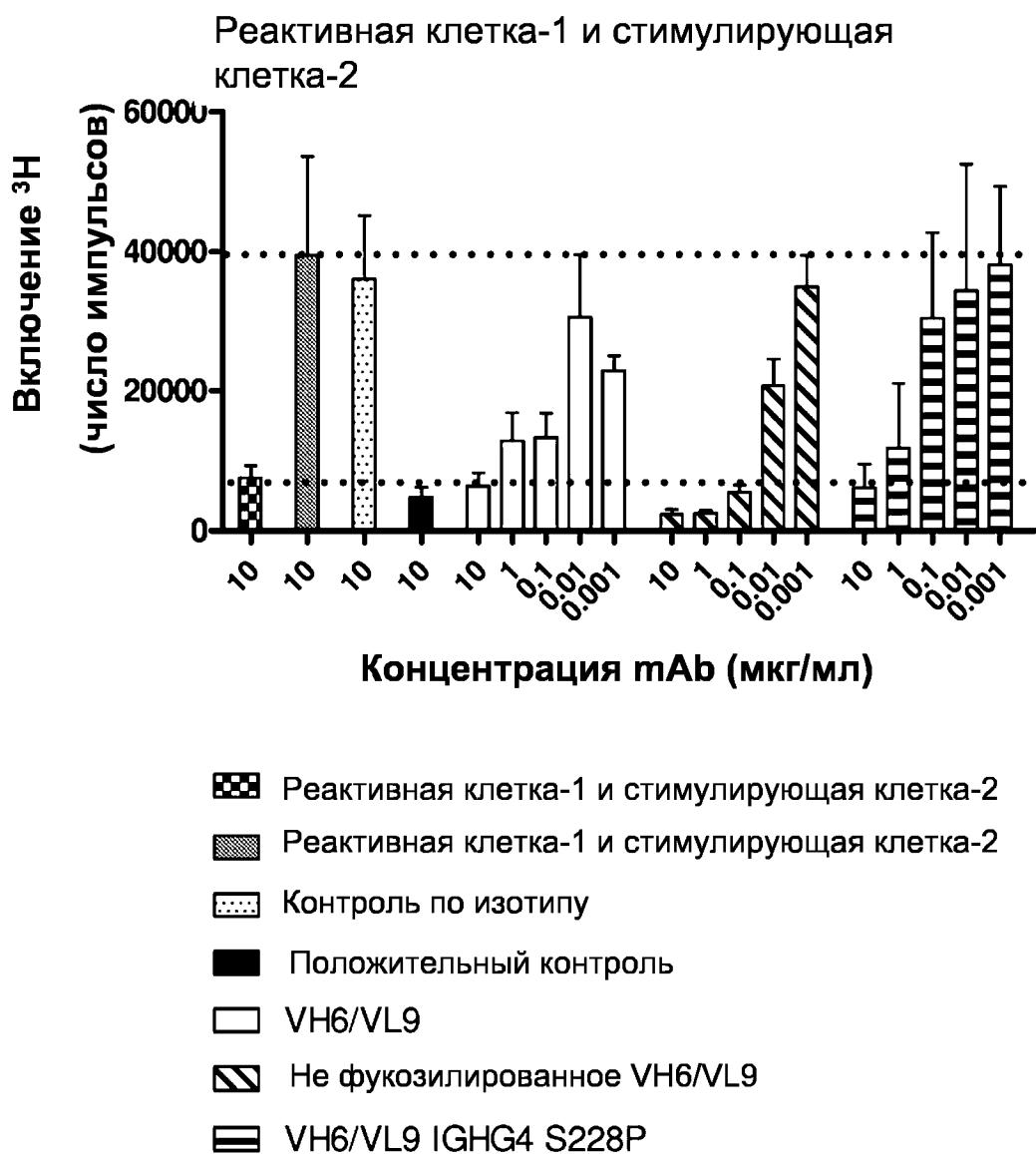
ФИГ.6



ФИГ.7

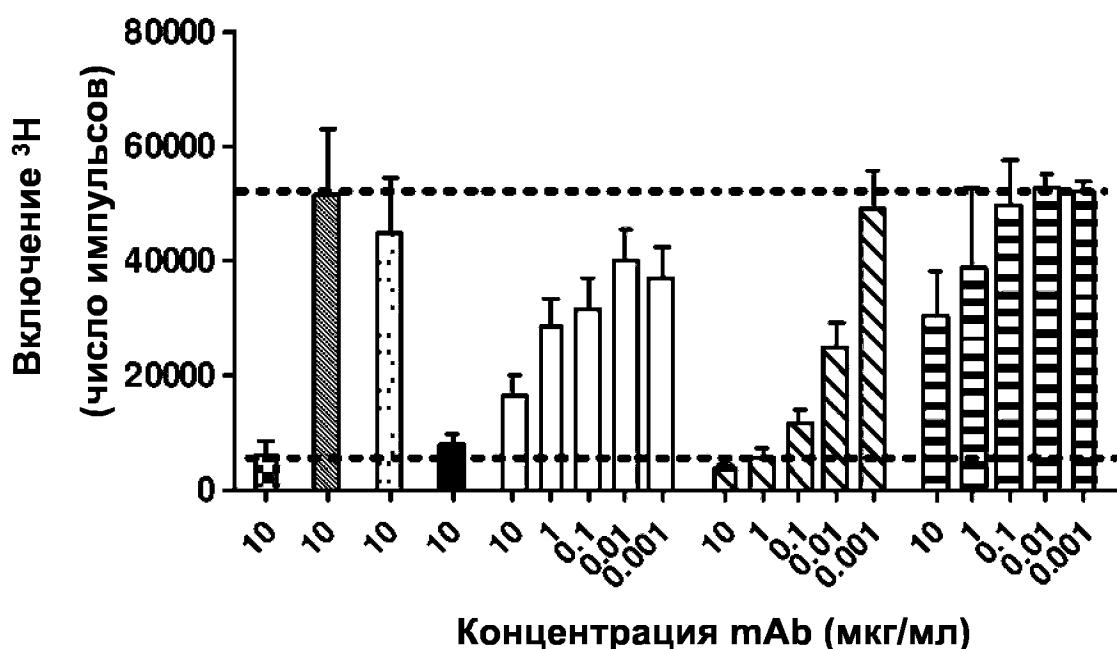


ФИГ.8А



**ФИГ.8В**

Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1



- ▨ Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1
- ▨ Реактивная клетка-2 и стимулирующая клетка-1
- Контроль по изотипу
- Положительный контроль
- VH6/VL9
- ▨ Не фукозилированное VH6/VL9
- ▨ VH6/VL9 IGHG4 S228P

**ФИГ.9**