

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035112**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |  |   |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента<br><b>2020.04.28</b> | (51) Int. Cl. <i>C07K 16/28</i> (2006.01)<br><i>C07K 16/44</i> (2006.01)<br><i>C07K 16/46</i> (2006.01)<br><i>A61K 39/00</i> (2006.01)<br><i>C07K 16/00</i> (2006.01)<br><i>A61K 39/395</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки<br><b>201400565</b>                      |   |
| (22) Дата подачи заявки<br><b>2012.11.09</b>               |   |

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТСЯ С ОХ40 ЧЕЛОВЕКА И СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА, ЕГО ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ**

- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| (31) <b>61/558,545</b> | (56) WO-A1-2010035012 |
| (32) <b>2011.11.11</b> | WO-A1-2011030107      |
| (33) <b>US</b>         | WO-A1-2011086091      |
| (43) <b>2014.12.30</b> | WO-A2-2010096418      |

- (86) **PCT/EP2012/072325**
- (87) **WO 2013/068563 2013.05.16**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮСБ БАЙОФАРМА СПРЛ (BE)**
- (72) Изобретатель:  
**Адамс Ралф, Бхатта Паллави, Хейвуд  
Сэм Филип, Хамфриз Дейвид Пол  
(GB)**

- (74) Представитель:  
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к биспецифическому антителу, которое связывается с ОХ40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащему тяжелую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_{H1}$ ),  $C_{H1}$ -домен и второй вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_{H2}$ ), и легкую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый вариабельный домен легкой цепи ( $V_{L1}$ ),  $C_L$ -домен, и второй вариабельный домен легкой цепи ( $V_{L2}$ ), где  $V_{H1}$  и  $V_{L1}$  образуют первый антигенсвязывающий центр, который связывает ОХ40, а  $V_{H2}$  и  $V_{L2}$  образуют второй антигенсвязывающий центр, который связывает сывороточный альбумин, а также к способу лечения или профилактики с помощью этого антитела, его применению, а также получению при использовании предложенных ДНК, векторов и клеток-хозяев.

**B1**

**035112**

**035112**

**B1**

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, специфичному в отношении антигенных детерминант OX40, и к композициям, содержащим такое антитело. Оно также относится к терапевтическому применению этого антитела, композициям и способам его получения.

OX40 (также известный как CD134, TNFRSF4, ACT35 или TXGP1L) является членом суперсемейства рецепторов TNF, которое включает 4-1BB, CD27, CD30 и CD40. Внеклеточный лигандсвязывающий домен OX40 состоит из трех полных богатых цистеином доменов (CRD) и неполного четвертого С-концевого CRD (Bodmer et al., 2002, Trends Biochem. Sci., 27, 19-26).

Лигандом для OX40 является OX40L, и три копии OX40 связываются с трехмерным лигандом с образованием комплекса OX40-OX40L (Compaan and Hymowitz, 2006, Structure, 14, 1321-1330).

OX40 является мембраносвязанным рецептором, однако его растворимая изоформа также была обнаружена (Taylor and Schwarz, 2001, J. Immunol. Methods, 255, 67-72). Функциональное значение растворимой формы в настоящее время неизвестно. OX40 не экспрессируется на неактивных Т-клетках, но временно экспрессируется на активированных Т-клетках после связывания Т-клеточного рецептора (TCR). Лиганд для OX40, OX40L, является членом семейства TNF и экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках (APC), в том числе на В-клетках, макрофагах, эндотелиальных клетках и дендритных клетках (DC).

OX40 является одним из основных костимулирующих рецепторов с последующим участием CD28 и OX40, необходимым для оптимальной пролиферации и выживания Т-клеток. Связывание OX40 на активированных Т-клетках приводит к повышенному производству цитокинов и пролиферации как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Gramaglia et al., 2000, J. Immunol., 165, 3043-3050, Bansal-Pakala et al., 2004, J. Immunol., 172, 4821-425) и может вносить вклад в оба T<sub>h</sub>1 и T<sub>h</sub>2 ответа (Gramaglia et al., 1998, J. Immunol., 161, 6510-6517, Arestides et al., 2002, Eur. J. Immunol. 32, 2874-2880). Костимуляция OX40 увеличивает выживаемость Т-клеток на начальной эффекторной фазе иммунного ответа и увеличивает количество Т-клеток памяти посредством ингибирования гибели эффекторных Т-клеток.

Когда иммунная активация является чрезмерной или неконтролируемой, может возникнуть патологическая аллергия, астма, воспаление, аутоиммунные и другие родственные заболевания. Поскольку OX40 повышает иммунный ответ, это может усугубить аутоиммунные и воспалительные заболевания.

Роль взаимодействий OX40/OX40L на моделях заболевания была продемонстрирована на OX40-нокаутных мышах. При экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЕАЕ), модели рассеянного склероза, были отмечены менее тяжелые клинические признаки заболевания и уменьшение воспалительного инфильтрата в ЦНС у OX40-нокаутных мышей (Carboni et al., 2003, J. Neuroimmunology, 145, 1-11). Также OX40-нокаутные мыши, примированные и иммунизированные овалбумином, демонстрируют уменьшенное легочное воспаление (80-90% снижение эозинофилии), сниженную выработку слизи и значительное уменьшение гиперреактивности дыхательных путей (Jember и соавт., 2001, J. Exp. Med., 193, 387-392). Моноклональные антитела к мышинному лиганду OX40 показали положительные результаты при коллаген-индуцированном артрите на модели ревматоидного артрита (Yoshioka et al., 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823), ЕАЕ (Nohara et al., 2001, J. Immunol., 166, 2108-2115), у не страдающих ожирением диабетических (NOD) мышей (Pakala et al., 2004, Eur. J. Immunol., 34, 3039-3046), при колите у мышей с восстановленными Т-клетками (Malmstrom et al., 2001, J. Immunol., 166, 6972-6981, Totsuka et al., 2003, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 284, G595-G603) и на моделях легочного воспаления (Salek-Ardakani et al., 2003, J. Exp. Med., 198, 315-324, Hoshino et al., 2003, Eur. J. Immunol., 33, 861-869). Антитело к OX40L человека было изучено на модели легочного воспаления у макак-резусов и приводило к снижению уровней IL-5, IL-13 и эффекторных Т-клеток памяти в жидкости бронхоальвеолярного лаважа после иммунизации аллергеном (Seshasayee et al., 2007, J. Clin. Invest, 117, 3868-3878).

Повышение экспрессии OX40 было отмечено при некоторых аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Сюда входит увеличение экспрессии OX40 на Т-клетках, выделенных из синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом (Brugnoni D. et al., 1998, Br. J. Rheum., 37, 584-585; Yoshioka et al., 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823; Giacomelli R. et al., 2001, Clin. Exp. Rheumatol., 19, 317-320). Аналогично, увеличение экспрессии OX40 было отмечено в желудочно-кишечной ткани у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона (Souza et al., 1999, Gut, 45, 856-863; Stuber et al., 2000, Eur. J. Clin. Invest., 30, 594-599) и в местах активного поражения у пациентов с рассеянным склерозом (Carboni et al., 2003, J. Neuroimmunology, 145, 1-11). OX40L также обнаружены на гладких мышцах дыхательных путей человека (ASM), причем клетки больных астмой проявляют более сильную воспалительную реакцию на связывание OX40L, чем таковые у здоровых доноров, что указывает на роль пути OX40/OX40L при астме (Burgess et al., 2004, J. Allergy Clin. Immunol., 113, 683-689; Burgess et al., 2005, J. Allergy Clin. Immunol., 115, 302-308). Кроме того, было сообщено, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки, выделенные из периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (SLE), экспрессируют повышенные уровни OX40, которые связаны с активностью заболевания (Patschan et al., 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242).

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

Антитела к OX40L были описаны, см., например, WO 2006/029879.

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

Полноразмерные антагонистические антитела человека были описаны в WO 2007/062245, самой высокой аффинностью этих антител была аффинность в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 (активированные Т-клетки), которая составляла 11 нМ.

Гуманизированные антагонистические антитела были описаны в WO 2008/106116, и антитело с лучшей аффинностью в отношении OX40 имело аффинность, равную 0,94 нМ.

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

Ранее были описаны высокоаффинные антагонистические антитела к OX40 (см. международную заявку на патент с номером WO 2010/096418).

Также ранее в международной заявке на патент с номером WO 2010/035012 была описана новая молекула мультиспецифического антитела, упоминаемая в дальнейшем как Fab-dsFv и проиллюстрированная в данном документе на фиг. 1. Эта же заявка содержит сведения о полезных переменных областях, связывающих альбумин, которые могут быть использованы для продления периода полураспада молекулы.

В настоящем изобретении эти альбумин-связывающие переменные области были усовершенствованы и объединены в формате Fab-dsFv с антителами к OX40, описанными в WO 2010/096418. Новое биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению имеет улучшенную эффективность в ряде анализов *in vitro* и *in vivo*, описанных в данном документе, по сравнению с молекулой Fab'-PEG, ранее описанной в WO 2010/096418. Соответственно, настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, которое связывает одновременно OX40 человека и сывороточный альбумин человека, и которое пригодно для лечения или профилактики патологических нарушений, опосредованных OX40 или связанных с повышенным уровнем OX40.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показано биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению (формат Fab-dsFv).

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

На фиг. 9а показано связывание A26 Fab-dsFv, меченого AlexaFluor 488, с активированными CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека.

На фиг. 9b показано связывание A26Fab', Fab-Fv A26 и A26 Fab'-PEG в присутствии 5% бычьего сывороточного альбумина (HSA) на активированных CD4<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup> Т-клетках человека.

На фиг. 10а показан эффект A26 Fab-dsFv на выработку цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), подвергнутыми действию аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*.

На фиг. 10b показана способность A26 Fab-dsFv ингибировать пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток на модели мышей Hu-NSG.

На фиг. 11а показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека с помощью A26 Fab-dsFv.

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

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

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

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

На фиг. 14 показано, что Fab-Fv и Fab-PEG, введенные до переноса клеток, дозозависимым образом ингибируют пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в модели Hu-NSG.

Гуманизированное антитело к OX40 CA044\_00026 упоминается в данном документе как A26.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению упомянуто в данном документе как Fab-dsFv, проиллюстрировано на фиг. 1. В настоящем изобретении Fab-фрагмент (содержащий первые переменные области тяжелой и легкой цепей и константные домены) связывается с OX40 человека, а dsFv-фрагмент (содержащий вторые переменные области тяжелой и легкой цепей, соединенные дисульфидной связью) связывается с сывороточным альбумином человека. В частности, Fab-фрагмент содержит CDR, полученные из антагонистического антитела к OX40, а Fv-фрагмент содержит переменные области тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела к альбумину, и эти альбумин-связывающие переменные области соединены дисульфидной связью.

Соответственно, настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, которое связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащему тяжелую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H1}$ ),  $C_{H1}$ -домен, и второй переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H2}$ ), легкую цепь, содержащую в последовательности от N-конца первый переменный домен легкой цепи ( $V_{L1}$ ),  $C_L$ -домен, и второй переменный домен легкой цепи ( $V_{L2}$ ), где  $V_{H1}$  и  $V_{L1}$  образуют первый антигенсвязывающий центр, который связывает OX40, а  $V_{H2}$  и  $V_{L2}$  образуют второй антигенсвязывающий центр, который связывает сывороточный альбумин человека. Причем первый переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H1}$ ) этого антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-H3, и первый переменный домен легкой цепи ( $V_{L1}$ ) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3, а его второй переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H2}$ ) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и второй переменный домен легкой цепи ( $V_{L2}$ ) имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, при этом второй переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H2}$ ) и второй переменный домен легкой цепи ( $V_{L2}$ ) соединены дисульфидной связью.

Это антитело препятствует связыванию OX40 с OX40L.

В предпочтительном варианте предложенное биспецифическое антитело имеет пептидный линкер между  $C_{H1}$ -доменом и вторым переменным доменом тяжелой цепи ( $V_{H2}$ ) или имеет пептидный линкер между  $C_L$ -доменом и вторым переменным доменом легкой цепи ( $V_{L2}$ ).

Первый переменный домен тяжелой цепи этого биспецифического антитела ( $V_{H1}$ ) может содержать последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, или его первый переменный домен легкой цепи ( $V_{L1}$ ) может содержать последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

Предпочтительно тяжелая цепь указанного антитела может содержать последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, или состоять из таковой, а его легкая цепь может содержать последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, или состоять из таковой.

Вторым вариантом данного изобретения является биспецифическое антитело, которое связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, и имеет тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, а также легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

Еще объектами данного изобретения являются выделенная ДНК, кодирующая вышеуказанные биспецифические антитела и вектор клонирования или экспрессии, содержащий кодирующую их ДНК.

Причем предпочтительно этот вектор может содержать последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

Другим объектом предложенного изобретения служит клетка-хозяин, предназначенная для получения заявленных антител, содержащая указанный вектор клонирования или экспрессии.

Изобретение также относится к способу получения биспецифических антител, включающему культивирование указанной клетки-хозяина и выделение биспецифического антитела.

В нем описана фармацевтическая композиция для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40, содержащая вышеописанные биспецифические антитела и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

Наконец, еще одним объектом предложенного изобретения является способ лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40, у нуждающегося в этом пациента, при этом способ включает введение пациенту описанных биспецифических антител.

Кроме того, изобретение касается применения этих антител для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40, а также для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое связано с повышенным уровнем OX40.

В предпочтительных вариантах патологическое расстройство выбирается из группы, состоящей из аллергии, хронической обструктивной болезни легких, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции "трансплантат против хозяина", воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, системной склеродермии, вирусного воспаления легких, воспалительного заболевания органов малого таза, болезни Пейрони, заболевания брюшной полости, перитонита, псориаза, васкулита, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуно-опосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, синдрома Гийена-Барре, атопического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, панкреатита и периодонтита. В других более предпочтительных вариантах это расстройство вы-

бредается из группы, состоящей из ревматоидного артрита, хронической обструктивной болезни легких, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, заболевания брюшной полости, псориаза, сахарного диабета I типа, системной красной волчанки, синдрома Гийена-Барре, атопического дерматита, болезни Грейвса и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

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

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

CDR вариабельного домена тяжелой цепи расположены в положении остатков 31-35 (CDR-H1), остатков 50-65 (CDR-H2) и остатков 95-102 (CDR-H3) согласно системе нумерации Kabat. Тем не менее, согласно Chothia (Chothia C. and Lesk A. M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)) петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, "CDR-H1", использованное в данном документе, предназначено для обозначения остатков с 26 по 35, как описано при сочетании системы нумерации Kabat и топологического определения петли по Chothia.

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

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению содержит Fab-фрагмент антагонистического антитела к OX40, ранее описанного в WO 2010/096418. Используемый в данном документе термин "антагонистический" описывает антитело, которое способно ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность OX40, например блокируя связывание или существенно уменьшая связывание OX40 с лигандом OX40 и, таким образом, ингибируя активацию OX40.

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

В настоящем изобретении вариабельные области являются гуманизированными. Гуманизированные антитела (которые включают CDR-привитые антитела) являются молекулами антител, имеющими один или несколько гипервариабельных участков (CDR), не принадлежащих человеку, и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, патент США № 5585089; WO 91/09967). Следует иметь в виду, что иногда необходимо перенести только определяющие специфичность остатки CDR, а не весь CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков, не принадлежащих человеку, а соответствующих виду, от которого были получены CDR.

В настоящем изобретении CDR из V<sub>H</sub>1 и V<sub>L</sub>1 получены из антитела, известного как A26, описанного в WO 2010/096418. Следует иметь в виду, что в CDR согласно изобретению могут быть осуществлены заменой одной или нескольких аминокислот, инсерции и/или делеции, без значительного изменения способности антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных замен, инсерций и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с использованием способов, описанных в WO 2010/096418, для определения связывания OX40 и ингибирования взаимодействия OX40/OX40L.

"Идентичность", использованная в данном документе, означает, что в любом конкретном положении аминокислотные остатки в выравниваемых последовательностях совпадают. "Сходство", использованное в данном документе, означает, что в любом конкретном положении в выравниваемых последовательностях аминокислотные остатки являются остатками аналогичного типа. Например, лейцин может быть заменен на изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены друг на друга, включают, но без ограничения:

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);  
 лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);  
 аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);  
 аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи);  
 цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

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

Используемый в данном документе термин "молекула CDR-привитого антитела" относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит один или несколько CDR (в том числе, если необходимо, один или несколько модифицированных CDR) из донорного антитела (например, моноклонального антитела мыши), привитых на каркас варибельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, антитела человека) (см. обзор см. Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998). Вместо переноса полного CDR возможен перенос на каркас антитела человека только одного или нескольких определяющих специфичность остатков из любых из CDR, описанных в данном документе выше (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Если CDR или определяющие специфичность остатки привиты, может быть использована любая приемлемая акцепторная последовательность каркаса варибельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены CDR, в том числе каркасные области мыши, примата и человека. Соответственно, CDR-привитое антитело имеет варибельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также один или несколько CDR или определяющих специфичность остатков, описанных выше. Примерами каркасов человека, которые могут быть использованы, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM могут быть использованы для тяжелой цепи, REI может быть использован для легкой цепи и EU, LAY и POM могут быть использованы как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, могут быть использованы последовательности зародышевого типа человека; они доступны по адресу: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>.

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

Подходящую каркасную область для первого варибельного домена тяжелой цепи ( $V_H1$ ) можно получить из последовательности 1-3 3-07 подгруппы VH3 человека вместе с JH4. Подходящую каркасную область легкой цепи для первого варибельного домена легкой цепи ( $V_L1$ ) можно получить из последовательности 2-1 1-02 подгруппы VK1 зародышевого типа человека вместе с JK4.

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

Соответственно, в первой варибельной области тяжелой цепи ( $V_H1$ ), если акцепторная тяжелая цепь имеет последовательность 1-3 3-07 VH3 человека вместе с JH4, акцепторные каркасные области тяжелой цепи содержат в дополнение к одному или нескольким донорским CDR донорский остаток по меньшей мере в одном из положений 37, 73, 78 или 94 (в соответствии с Kabat et al., (выше)). Соответственно, получается биспецифическое антитело, в котором, по меньшей мере, остатки в положениях 37, 73, 78 и 94 первого варибельного домена тяжелой цепи являются донорскими остатками.

Соответственно, в первой варибельной области легкой цепи ( $V_L1$ ), если акцепторная легкая цепь имеет последовательность 2-1 1-02 подгруппы VK1 человека вместе с JK4, акцепторные каркасные области легкой цепи содержат в дополнение к одному или нескольким донорским CDR донорский остаток по меньшей мере в одном из положений 64 или 71. Соответственно, получается биспецифическое антитело, в котором, по меньшей мере, остатки в положениях 64 и 71 первого варибельного домена легкой цепи являются донорскими остатками.

Донорские остатки являются остатками из донорного антитела, т.е. антитела, из которого были первоначально получены CDR.

Следует понимать, что замены, инсерции и/или делеции могут быть осуществлены в первых переменных доменах тяжелой и легкой цепей, без значительного изменения способности слитого белка антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных замен, инсерций и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с применением способов, описанных в WO 2010/096418, для определения связывания с OX40 и блокирования лиганда.

В биспецифическом антителе тяжелая цепь содержит C<sub>H</sub>1-домен и легкая цепь содержит C<sub>L</sub>-домен, каппа или ламбда.

Следует понимать, что замены, инсерции и/или делеции могут быть также осуществлены в переменных и/или константных доменах антитела без значительного изменения способности антитела к связыванию с OX40 и нейтрализации активности OX40. Эффект любых аминокислотных замен, инсерций и/или делеций может быть легко проверен специалистом в данной области техники, например, с применением способов, описанных в WO 2010/096418, для определения связывания с OX40 и блокирования взаимодействия OX40/OX40L.

Вторым антигеном, с которым связывается биспецифическое антитело, является сывороточный альбумин человека. С ним связывается Fv-фрагмент из Fab-dsFv, который составлен из вторых переменных доменов тяжелой и легкой цепей, V<sub>H</sub>2 и V<sub>L</sub>2. В настоящем изобретении V<sub>H</sub>2 и V<sub>L</sub>2 получены из одного из антител, описанных в WO 2010/035012, и представляют собой улучшенный, более гуманизированный трансплантат этого антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению соответственно имеют высокую аффинность связывания, в частности пиколярную аффинность в отношении OX40 человека и наномлярную аффинность в отношении сывороточного альбумина человека. Аффинность может быть измерена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники, включая поверхностный плазмонный резонанс, например BIACore™, как описано для OX40 в WO 2010/096418 и сывороточного альбумина в WO 2010/035012, с применением выделенного природного или рекомбинантного OX40, или сывороточного альбумина, или подходящего слитого белка/полипептида.

Аффинность измеряют с использованием внеклеточного домена рекомбинантного OX40 человека, как описано в WO 2010/096418. Причем используемый внеклеточный домен рекомбинантного OX40 человека представляет собой димер, например слитый димер Fc. Соответственно, антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания выделенного OX40 человека около 200 пМ или менее, предпочтительно 100 пМ или менее, наиболее предпочтительно около 50 пМ или менее и, наконец, около 40 пМ или менее.

Антитела согласно настоящему изобретению соответственно имеют высокую аффинность связывания в отношении OX40 человека, экспрессированного на поверхности активированных Т-клеток, например наномлярную или пиколярную аффинность. Аффинность может быть измерена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники, в том числе способом, описанным в WO 2010/096418, с применением активированных CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клеток человека. В частности, антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении экспрессированного на клеточной поверхности OX40 человека около 2 нМ или более предпочтительно около 1 нМ или более, наиболее предпочтительно около 0,5 нМ или более и, наконец, около 0,2 нМ или более.

Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению имеют аффинность связывания в отношении выделенного сывороточного альбумина человека около 50 нМ или менее, предпочтительно около 20 нМ или менее, наиболее предпочтительно 10 нМ или менее, и, наконец, 5 нМ или менее или около 2 нМ или менее.

Антитела по настоящему изобретению могут связываться с сывороточным альбумином человека и сывороточным альбумином яванского макака, мыши и крысы. Антитело согласно настоящему изобретению может связываться с сывороточным альбумином яванского макака с аффинностью 5 нМ или менее и с сывороточным альбумином мыши с аффинностью 5 нМ или менее.

Антитела по настоящему изобретению способны связываться с OX40 человека и сывороточным альбумином человека одновременно.

Преимущественно антитела по настоящему изобретению имеют высокую аффинность в отношении OX40 и также имеют достаточный период полураспада *in vivo* для того, чтобы быть терапевтически пригодным, например период полураспада варьирует в диапазоне 5-15 дней, например 7-11 дней.

Следует иметь в виду, что аффинность слитого белка антитела к OX40 человека и/или сывороточному альбумину человека может быть изменена с применением любого подходящего способа, известного в данной области техники. Такие варианты могут быть получены с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутирование CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), применение штаммов-мутаторов E.coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), ДНК-перетасовку (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и "половую" ПЦР (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). В Vaughan et al. (выше) рассматриваются эти способы созревания аффинности.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению блокирует взаимодействие между OX40 и OX40L. Многочисленные анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать это взаимодействие, описаны в WO 2010/096418. Антитело может иметь специфичность в отношении OX40 человека, который способен на 50% ингибировать связывание OX40L человека (исследуют при конечной концентрации 2 мкг/мл) с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека при концентрации менее 0,5 нМ. OX40L человека, использованный в анализе, может быть природным OX40 человека. OX40 человека, использованный в анализе, также может быть рекомбинантным OX40 человека.

При необходимости, антитело может быть конъюгировано с одной или несколькими эффекторными молекулами. Следует иметь в виду, что эффекторная молекула может включать одну эффекторную молекулу либо две или более таких молекул, связанных так, чтобы образовать единый фрагмент, который может быть присоединен к антителам. Если необходимо получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, это может быть получено с помощью стандартных химических процедур или процедур рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела соединяют непосредственно или с помощью связывающего агента с эффекторной молекулой. Методы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области техники (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2<sup>nd</sup> Ed., Robinson et al., eds., 1987, p. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, если эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, соединение может быть достигнуто с применением процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

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

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

Эффекторные молекулы также включают, но без ограничения, антимиетаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиоэпахламорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнитол, стрептозотоцин, митомидин С и цис-дихлородиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимиотические средства (например, винкристин и винбластин).

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

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

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, полезные, например, в диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радионуклиды, позитронно-активные металлы (для применения в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. В патенте США № 4741900 описаны ионы металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в качестве диагностических. Пригодные фер-

менты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; пригодные простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; пригодные флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; пригодные люминесцентные материалы включают люминол; пригодные биоломинесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  и  $^{99}\text{Tc}$ .

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

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

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

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

Термин "производные", использованный в данном документе, предназначен для включения реакционноспособных производных, например тиол-селективных реакционноспособных групп, таких как малеимиды и т.п. Реакционноспособная группа может быть соединена непосредственно или посредством линкерного сегмента с полимером. Следует иметь в виду, что остаток такой группы будет в некоторых случаях образовывать часть продукта в виде связующей группы между фрагментом антитела и полимером.

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

Пригодные эффекторные молекулы могут быть присоединены через любую доступную аминокислотную боковую цепь или концевую аминокислотную функциональную группу, расположенную в антителе, например любую свободную amino-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут быть природного происхождения во фрагменте антитела или могут быть встроены во фрагмент с применением способов рекомбинантной ДНК (см., например, патенты США № 5219996; 5667425, WO 98/25971).

Последовательности ДНК, которые кодируют антитело, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все тяжелую и легкую цепи антитела, могут быть синтезированы в соответствии с пожеланиями из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

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

Целевые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. Сайт-направленный мутагенез и методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть использованы при необходимости.

Примеры подходящих последовательностей приведены в SEQ ID NO: 21 фиг. 5(a); SEQ ID NO: 22 фиг. 5(b); SEQ ID NO: 23 фиг. 6(a); SEQ ID NO: 24 фиг. 6(b). Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO: 21 и 1-63 в SEQ ID NO: 23 кодируют последовательность сигнального пептида OmpA, который расщепляется с получением антагонистического антитела. Другие примеры подходящих последовательностей приведены в SEQ ID NO: 25 фиг. 7(a); SEQ ID NO: 26 фиг. 7(b); SEQ ID NO: 27 фиг. 8(a); SEQ ID NO: 28 фиг. 6(b). Нуклеотиды 1-57 в SEQ ID NO: 25 и 1-60 в SEQ ID NO: 27 кодируют последовательность сигнального пептида мышинного антитела B72.3 (Whittle et al., 1987, Protein Eng. 1 (6) 499-505.), который расщепляется с получением антагонистического антитела. Соответственно, вектор клонирования или экспрессии может содержать две последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепи молекулы антитела. Таким образом, вектор может содержать последовательности, представленные в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23. Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO: 21 и 1-63 в SEQ ID NO: 23 кодируют последовательность сигнального пептида из OmpA.

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

Любая подходящая клетка-хозяин и векторная система могут быть использованы для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела. Могут быть использованы бактериальные, например E.coli, и другие микробные системы или эукариотические, например системы млекопитающих,

а также системы экспрессии клетки-хозяина. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают СНО, клетки миеломы или гибридомы.

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

Поскольку антитела пригодны для лечения и/или профилактики патологического состояния, то они могут быть включены в фармацевтическую или диагностическую композицию с одним или более фармацевтически приемлемым наполнителем, разбавителем или носителем. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Антитело может быть единственным активным ингредиентом в фармацевтической или диагностической композиции или может сопровождаться другими активными ингредиентами, в том числе другими антителами, например антителом к TNF, антителом к IL-1 $\beta$ , антителом к Т-клеткам, антителом к IFN $\gamma$  или антителом к LPS, или ингредиентами, не являющимися антителами, такими как ксантины. Другие подходящие активные ингредиенты включают в себя антитела, способные индуцировать толерантность, например антитела к CD3 или антитела к CD4.

Антитела или композицию можно использовать в комбинации с дополнительным фармацевтически активным средством, например кортикостероидом (таким как флутиказона пропионат) и/или бета-2-агонистом (таким как сальбутамол, сальметерол или формотерол), или ингибиторами роста и пролиферации клеток (такими как рапамицин, циклофосфамид, метотрексат), или альтернативным ингибитором CD28 и/или CD40. Фармацевтические композиции соответственно содержат терапевтически эффективное количество антитела. Термин "терапевтически эффективное количество", использованный в данном документе, относится к количеству терапевтического средства, необходимому для лечения, облегчения или профилактики заболевания или состояния или для достижения обнаруживаемого терапевтического или профилактического эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может быть оценено первоначально в анализах на клеточных культурах или на животных моделях, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Модель на животных может быть также использована для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация затем может быть использована для определения подходящих доз и путей введения человеку.

Точное терапевтически эффективное количество для субъекта-человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья субъекта, возраста, веса и пола субъекта, от диеты, времени и частоты введения, комбинации (комбинаций) лекарственного средства, чувствительности реакции и толерантности/ответа на терапию. Это количество может быть определено путем рутинного экспериментирования и находится в компетенции врача-клинициста. Как правило, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 до 50 мг/кг, например от 0,1 до 20 мг/кг. Фармацевтические композиции могут быть удобно представлены в форме стандартных доз, содержащих заранее определенное количество активного средства на дозу.

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

Доза, в которой вводят антитело, зависит от природы состояния, подлежащего лечению, от имеющейся степени воспаления и от того, используется ли молекула антитела профилактически, или для лечения существующего состояния.

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

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

Могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

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

приема внутрь пациентом.

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

После составления композиции можно вводить непосредственно субъекту. Субъектами, подлежащими лечению, могут быть животные.

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

Предпочтительно, чтобы антитело не имело рН, которая соответствует общей нейтральной молекуле. Это делает молекулу менее чувствительной к агрегации.

Фармацевтические композиции можно вводить любым путем, включая, но без ограничения, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, чрескожный (см., например, WO 98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, вагинальный или ректальный пути. Безыгольный инжектор также может быть использован для введения фармацевтических композиций. Как правило, терапевтические композиции могут быть подготовлены для инъекции в виде либо жидких растворов, либо суспензий. Но и твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией, также могут быть получены.

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

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

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

Состав может представлять собой состав для местного введения, включая ингаляцию.

Подходящие ингаляционные препараты включают ингаляционные порошки, дозирующие аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или ингаляционные растворы, свободные от газов-пропеллентов. Ингаляционные порошки, содержащие активное вещество, могут состоять только из указанных выше активных веществ или из смеси указанных выше активных веществ с физиологически приемлемым наполнителем.

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

Частицы для осаждения в легких требуют размер частиц менее 10 мкм, например 1-9 мкм, например от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм.

Размер частиц активного ингредиента (такого как антитело или его фрагмент) имеет первостепенное значение.

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

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

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

области техники.

Содержащие газ-пропеллент ингаляционные аэрозоли могут содержать до 5 вес.% активного вещества. Аэрозоли содержат, например, от 0,002 до 5 вес.%, от 0,01 до 3 вес.%, от 0,015 до 2 вес.%, от 0,1 до 2 вес.%, от 0,5 до 2 вес.% или от 0,5 до 1 вес.% активного ингредиента.

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

Антитела могут быть доставлены диспергированными в растворителе, например, в виде раствора или суспензии. Они могут быть суспендированы в подходящем физиологическом растворе, например солевом растворе или другом фармацевтически приемлемом растворителе или буферном растворе. Буферные растворы, известные в данной области техники, могут содержать 0,05-0,15 мг динатрий эдетата, 8,0-9,0 мг NaCl, 0,15-0,25 мг полисорбата, 0,25-0,30 мг безводной лимонной кислоты и 0,45-0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды так, чтобы достичь pH от около 4,0 до 5,0. В суспензии можно использовать, например, лиофилизованное антитело.

Терапевтические составы в виде суспензий или раствора могут также содержать один или несколько наполнителей. Наполнители хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав может быть получен с использованием процессов, которые включают производство и стерилизацию фильтрованием буферного растворителя/раствора, используемого для состава, асептическое суспендирование антитела в стерильном буферном растворителе/растворе и распределение состава в стерильные сосуды с помощью методов, известных специалистам в данной области техники.

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

Антитела могут быть доставлены путем распыления.

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

Антитела (или композиции, содержащие его, могут применяться для контроля воспалительных заболеваний, например, остро или хронического воспалительного заболевания. Соответственно, антитела (или композиции, содержащие его) могут быть использованы для уменьшения воспалительного процесса или для предотвращения воспалительного процесса. Они обеспечивают снижение *in vivo* активированных Т-клеток, в частности тех, которые участвуют в воспалительных иммунных ответах, например, привлеченных в район/местоположение такого ответа.

Снижение количества активированных Т-клеток может быть снижением на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с их количеством до лечения или без лечения.

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

Патологическое состояние, которое опосредовано OX40 или связано с повышенным уровнем OX40, может, например, быть выбрано из группы, состоящей из инфекций (вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных), эндотоксического шока, связанного с инфекцией, артрита, ревматоидного артрита, астмы, COPD, воспаления органов таза, болезни Альцгеймера, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, болезни Пейрони, целиакии, заболевания желчного пузыря, пилонидальной болезни, перитонита, псориаза, васкулита, хирургических спаек, инсульта, сахарного диабета I типа, болезни Лайма, артрита, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуно-опосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, таких как рассеянный склероз, волчанки (например, системной красной волчанки и волчаночного нефрита) и синдрома Гийена-Барре, atopического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, болезни Грейвса, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, болезни Меньера, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, гранулематоза Вегенера, других аутоиммунных заболеваний, панкреатита, травмы (хирургической операции), реакции "трансплантат против хозяина", отторжения трансплантата, болезни сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистого свертывания, резорбции кости, остеопороза, остеоартрита, пародонтита и гипохлоридрии.

Механизм, посредством которого работают антитела, включает ингибирование пролиферации или выживания Т-клеток, и/или повышение выработки Treg, и/или снижение дифференцировки В-клеток, и/или снижение производства цитокинов.

Антитело, его фрагмент или композиция могут применяться для изготовления лекарственного препарата для лечения или профилактики одного или нескольких медицинских показаний, описанных в данном документе.

Антитело или композиция могут быть использованы в любой терапии, когда желательно уменьшить эффекты OX40 в организме человека или животного. OX40 может циркулировать в организме или может быть представлен на нежелательно высоком уровне локализованным в определенном месте в организме, например в месте воспаления.

Антитело или содержащую его композицию можно использовать для контроля воспалительного заболевания, например, описанного в данном документе.

Способ лечения человека или животных субъектов, страдающих от или подверженных риску нарушения, опосредованного OX40, включает введение субъекту эффективного количества антитела или композиции, содержащей его.

Биспецифическое антитело, которое связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, по существу, является очищенным от, в частности, не содержит или по существу не содержит эндотоксина и/или белка или ДНК клетки-хозяина.

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

Термин "по существу не содержащий эндотоксина" предназначен для обозначения содержания эндотоксина 1 EU на 1 мг продукта антитела или менее, например 0,5 или 0,1 EU на 1 мг продукта.

Термин "по существу не содержащий белка или ДНК клетки-хозяина" предназначен для обозначения содержания белка и/или ДНК клетки-хозяина 400 мкг на 1 мг продукта антитела или менее, например 100 мкг на 1 мг или менее, в частности 20 мкг на 1 мг, в случае необходимости.

Антитело также может быть использовано в диагностике, например в диагностике *in vivo* и в визуализации болезненных состояний с участием OX40.

Преимущественно антитела считаются безопасными для введения людям в надлежащей терапевтической дозе, в частности, потому что они не являются суперагонистами и вряд ли могут вызвать цитокиновый шторм.

Термин "суперагонист", использованный в данном документе, относится к антителу, которое приводит к размножению Т-клеток без участия TCR.

A26 Fab-Fv снижает индекс деления. Этот эффект предположительно опосредован НК-клетками, которые экспрессируют OX40. Индекс деления представляет собой среднее количество клеточных делений, которое претерпела клетка в исходной популяции, и включает не разделившиеся клетки.

Индекс пролиферации отражает только пролиферацию отвечающей популяции, причем ингибиторный эффект A26 Fab-Fv при использовании этого измерения может быть относительно снижен.

Термин "содержащий" в контексте настоящего описания предполагает значение "включающий".

Настоящее изобретение дополнительно описано в следующих примерах.

### Примеры

Подробное описание фигур.

Фиг. 1: биспецифическое антитело, названное Fab-dsFv.

Фиг. 2:

- a) V-область легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 7),
- b) V-область тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 8),
- c) CDRH1 (SEQ ID NO: 1), CDRH2 (SEQ ID NO: 2), CDRH3 (SEQ ID NO: 3), CDRL1 (SEQ ID NO: 4), CDRL2 (SEQ ID NO: 5) и CDRL3 (SEQ ID NO: 6) антитела A26,
- d) легкая цепь Fab-компонента антитела A26 (SEQ ID NO: 9),
- e) тяжелая цепь Fab-компонента антитела A26 (SEQ ID NO: 10).

Фиг. 3:

- a) тяжелая цепь Fv-компонента 645gH5 к альбумину (SEQ ID NO: 11),
- b) легкая цепь Fv-компонента 645gL4 к альбумину (SEQ ID NO: 12),
- c) линкер 1 (SEQ ID NO: 13),
- d) линкер 2 (SEQ ID NO: 14),
- e) тяжелая цепь Fab-dsFv (SEQ ID NO: 15),
- f) легкая цепь Fab-dsFv (SEQ ID NO: 16).

Фиг. 4:

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

Фиг. 5:

а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv, включая лидерную последовательность OmpA (SEQ ID NO: 21),

б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь Fab-dsFv без лидерной последовательности OmpA (SEQ ID NO: 22).

Фиг. 6:

а) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, включая лидерную последовательность OmpA (SEQ ID NO: 23),

б) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv без лидерной последовательности OmpA (SEQ ID NO: 24).

Фиг. 7:

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

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

Фиг. 8:

а) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv, включая лидерную последовательность B72.3 (SEQ ID NO: 27),

б) ДНК, кодирующая легкую цепь Fab-dsFv без лидерной последовательности B72.3 (SEQ ID NO: 28).

На фиг. 9а показано связывание A26 Fab-dsFv, меченного AlexaFluor 488, с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека.

На фиг. 9б показано связывание A26Fab', A26 Fab-Fv и A26 Fab'-PEG в присутствии 5% HSA на активированных CD4<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup> Т-клетках человека.

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

На фиг. 10б показана способность A26 Fab-dsFv ингибировать пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в модели мышей Nu-NSG.

На фиг. 11а показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека с помощью A26 Fab-dsFv.

На фиг. 11б показано ингибирование связывания OX40L с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека с помощью A26Fab', A26 Fab-dsFv, A26 Fab'-PEG и двух контролей.

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

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

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

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

Обработка ДНК и общие способы.

Компетентные штаммы *E.coli* использовали для трансформаций и рутинного культивирования. Ферменты для рестрикции и модификации ДНК получили от Roche Diagnostics Ltd. and New England Biolabs. Плазмидные препараты получили с использованием наборов Maxi Plasmid purification (QIAGEN, номер по каталогу 12165). Реакции секвенирования ДНК выполнили с использованием набора ABI Prism Big Dye terminator sequencing (номер по каталогу 4304149) и провели на автоматическом секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems). Данные проанализировали с помощью программы Sequencher (Genecodes). Олигонуклеотиды получили от Sigma или Invitrogen. Гены, кодирующие начальные последовательности V-области, сконструировали методом автоматизированного синтеза с помощью DNA2.0 и модифицировали для создания привитых версий путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Концентрацию Fab-Fv определили методом ВЭЖХ на основе белка G.

Пример 1. Создание и анализ различных гуманизированных трансплантатов 645 в A26Fab-645dsFv.

Ранее авторами изобретения описан формат антитела Fab-dsFv (фиг. 1) (иногда называемый в данном документе просто как Fab-Fv) и гуманизированное антитело к альбумину, известное как "645gH1gL1", в WO 2010/035012. Также ранее описано создание гуманизированного антагонистического антитела к OX40, известного как 'A26', и его пэглированного Fab'-фрагмента в /096418. Здесь мы описываем создание нового улучшенного гуманизированного трансплантата антитела '645', известного как 645dsgH5gL4, и создание молекулы антитела Fab-dsFv, включающей этот трансплантат в Fv-компоненте и варибельные области "A26" в Fab-компоненте. Варибельные области A26 приведены на фиг. 2а и 2b (SEQ ID NO: 7 и 8).

Последовательности варибельной и константной области A26 совместно приведены на фиг. 2d и 2e (SEQ ID NO: 9 и 10).

Последовательности 645gH1 и gL1 приведены на фиг. 4(a) и (b), SEQ ID NO 17 и 18. Если использован термин Fab'-PEG или A26 Fab'-PEG, то это относится к A26 Fab'-40K PEG', описанному в WO 2010/096418.

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

Общую кодирующую область легкой цепи A26Fab-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 20) клонировали в вектор экспрессии млекопитающих UCB под контролем промотора HCMV-MIE и последовательности полиаденилирования SV40E. Варибельную область легкой цепи из 645dsFv (gL1) (SEQ ID NO: 18) мутировали в 645dsFv (gL4) (SEQ ID NO: 12) способом перекрывающейся ПЦР. Всю область кодирования тяжелой цепи A26Fab-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 19) клонировали в вектор экспрессии млекопитающих UCB под контролем промотора HCMV-MIE и последовательности полиаденилирования SV40E. Варибельную область тяжелой цепи 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 17) мутировали в 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 11) способом перекрывающейся ПЦР. Конструкции подтвердили секвенированием. Обе конструкции содержали линкер 3×G4S, приведенный в SEQ ID NO: 14, фиг. 3(d).

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

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

1.3. Очистка A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4) белком G.

Примерно 50 мл отфильтрованных через 0,22 мкм супернатантов сконцентрировали до ~2 мл с помощью концентраторов Amicon Ultra-15 с низкопроточной мембраной для молекулярного веса 10 кДа и центрифугированием при 4000×g в поворотном роторе. 1,8 мл концентрированного супернатанта поместили в колонку 1 мл Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) со скоростью потока 1 мл/мин, уравновешенной 20 mM фосфата, 40 mM NaCl, pH 7,4. Колонку промыли с 20 mM фосфата, 40 mM NaCl, pH 7,4 и связанный материал элюировали 0,1 M глицин/HCl pH 2,7. Пик элюирования собрали и pH довели примерно до 7 с помощью 2 M Tris/HCl pH 8,5. Элюат с доведенным pH сконцентрировали и подвергли диалфильтрации в 20 mM фосфата, 150 mM NaCl, pH 7,4 с помощью концентраторов Amicon Ultra-15 с низкопроточной мембраной для молекулярного веса 10 кДа и центрифугированием при 4000×g в колебательном роторе до конечного объема ~0,3 мл.

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

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

Пример 2.

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

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

BIA (анализ биомолекулярного взаимодействия) выполнили с использованием BIAcore T200 (GE Healthcare). F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент аффинного антитела козы к IgG человека, специфичного в отношении F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорный чип CM5 с помощью химии связывания аминов до уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). Буфер HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% суфрактант P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Введение 10 мкл A26 Fab' при 0,5 мкг/мл или A26Fab-dsFv при 1 мкг/мл использовали для захвата иммобилизованным F(ab')<sub>2</sub> к IgG человека. OX40 человека титровали к захваченному A26 в различных концентрациях (от 25 до 1,5625 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали посредством введения 2×10 мкл 50 mM HCl с последующим введением 5 мкл 5 mM NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычитанием фона проанализи-

ровали с помощью программного обеспечения T200 evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам. Кинетические параметры определили исходя из алгоритма подбора.

Таблица 1

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

Среднее по 4 определениям.

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

BIA (анализ биомолекулярного взаимодействия) выполнили с использованием BIAcore T200 (GE Healthcare). Аффинный F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент антитела козы к IgG человека, специфичного в отношении F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента (Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорный чип CM5 с помощью химии связывания аминов до уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). Буфер HBS-EP (10 мМ HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% суфрактант P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера со скоростью потока 10 мкл/мин. Введение 10 мкл Fab-Fv при 0,75 мкг/мл использовали для захвата иммобилизованным F(ab')<sub>2</sub> к IgG человека. Сывороточный альбумин человека (HSA), сывороточный альбумин мыши (MSA) и сывороточный альбумин яванского макака (CSA) титровали к захваченному Fab-Fv при различных концентрациях (от 50 до 6,25 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали введением 2×10 мкл 50 мМ HCl с последующим введением 5 мкл 5 мМ NaOH при скорости потока 10 мкл/мин. Кривые связывания с вычитанием фона проанализировали с помощью программного обеспечения T200 evaluation (версия 1.0), следуя стандартным процедурам. Кинетические параметры определили исходя из алгоритма подбора.

Таблица 2

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

Среднее по 3 определениям.

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

Оценили одновременное связывание OX40 человека и сывороточного альбумина человека с A26 Fab-dsFv. Конструкция A26 Fab-dsFv была помещена на поверхности сенсорного чипа, как указано в способе для кинетики связывания A26 Fab-dsFv с альбумином по BIAcore. 50 нМ HSA, 25 нМ OX40 или смешанный раствор с конечной концентрацией 50 нМ HSA и 25 нМ OX40 отдельно титровали к захваченному A26 Fab-dsFv. Ответ связывания для комбинированного раствора HSA/OX40 был эквивалентен сумме ответов независимых инъекций. Это подтверждает, что Fab-dsFv способен к одновременному связыванию как с OX40 человека, так и с HSA.

Таблица 3

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

(34)

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

Способы.

Связывание A26 Fab-Fv с активированными CD4<sup>+</sup> OX40<sup>+</sup> Т-клетками человека.

PBMC выделяли путем разделения в градиенте Ficoll и активировали с помощью 4 мкг/мл PMA-L в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% влажности. CD4<sup>+</sup> Т-клетки выделяли путем негативной селекции с помощью магнитных гранул (CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II for Human; Miltenyi Biotec). Приблизительно 1 × 10<sup>5</sup> клеток инкубировали в присутствии антитела либо в буфере Facs (PBS/0,2 % BSA/0,09 % NaN<sub>3</sub>), либо в буфере Facs с добавлением 5% HSA при 4°C. Конечная концентрация антитела колебалась в пределах от 48 до 0,0005 нМ. Клетки промыли в PBS перед анализом методом проточной цитометрии с использованием FACScalibur (Becton Dickinson). Два набора данных титрования получили в обоих буферных условиях, один с A26 Fab-dsFv и второй с нерелевантным контрольным Fab-Fv, чтобы определить неспецифическое связывание. Число молей связанного антитела рассчитали с использованием интерполированных значений из стандартной кривой, созданной с использованием гранул, состоящих из различных, но известных количеств флуоресцентного красителя. Геометрические средние значения флуоресценции определили в анализе проточной цитометрии клеток и гранул. Неспецифическое связывание вычли из значений для A26 Fab-dsFv и созданные таким образом кривые специфического связывания проанализировали с помощью нелинейной регрессии, используя уравнение связывания с одним сайтом (GraphPad Prism®) для определения K<sub>D</sub>.

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

Равновесное связывание описывается с помощью следующего уравнения:



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

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

При равновесии скорости ассоциации и диссоциации равны, и можно получить уравнение, которое описывает изотерму связывания; на полулогарифмическом участке связывание является сигмоидальным. K<sub>D</sub> определяется как k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub> и может быть рассчитана из кривой связывания как концентрация, при которой происходит половина от максимального связывания.

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

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

Среднее значение K<sub>D</sub>, полученное на активированных клетках от 5 различных доноров, составляет 145 пМ.

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

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

PBMC выделили путем разделения в градиенте Ficoll и активировали с помощью 4 мкг/мл РНА-L в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% влажности.

Затем эти CD4<sup>+</sup> Т-клетки выделили путем негативной селекции с помощью магнитных гранул (CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II for Human; Miltenyi Biotec). Приблизительно 1×10<sup>5</sup> клеток инкубировали в присутствии антитела либо в буфере Facs (PBS/0,2 % BSA/0,09 % NaN<sub>3</sub>), либо в буфере Facs с добавлением 5% HSA при 4°C. Конечная концентрация антитела колебалась в пределах от 48 до 0,0005 нМ. Клетки промыли в PBS перед анализом проточной цитометрии с использованием FACScalibur (Becton Dickinson). Наборы данных титрования также были получены для изотипических контрольных антител к каждому формату A26, чтобы определить неспецифическое связывание. Число молей связанного антитела рассчитали с использованием интерполированных значений из стандартной кривой, созданной с использованием гранул, состоящих из различных, но известных количеств флуоресцентного красителя. Геометрические средние значения флуоресценции определили в анализе проточной цитометрии клеток и гранул. Неспецифическое связывание вычли из значений для A26 Fab-dsFv, и созданные таким образом кривые специфического связывания проанализировали с помощью нелинейной регрессии, используя уравнение связывания с одним сайтом (GraphPad Prism®) для определения K<sub>D</sub>.

Таблица 4

Средние значения K<sub>D</sub> для антител A26 в анализах аффинности на клетках человека

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

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

PBMC выделили у добровольцев с аллергией разделением в градиенте Ficoll. Очищенные PBMC подвергли воздействию 25 мкг/мл аллергенного экстракта Dermatophagoides pteronyssinus в присутствии испытываемого антитела (диапазон концентраций от 50 до 0,0005 мкг/мл) в конечном объеме 200 мкл/лунку в 96-луночном круглодонном планшете. Через 6 дней инкубации при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% влажности супернатанты собрали и проанализировали на содержание IL-13 с помощью MSD. График на фиг. 10(а) показывает репрезентативные данные 1-го репрезентативного донора из 4, где средняя EC<sub>50</sub> ингибирования производства IL-13 составила 0,87 нМ (диапазон от 0,6 до 1,07 нМ).

Значения  $EC_{50}$  (табл. 5) рассчитали из кривых ингибирования у отдельных доноров с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®.

Таблица 5

Средние значения  $EC_{50}$  для антител A26 в анализах *in vitro* на HDM человека

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

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

$CD4^+$  Т-клетки от доноров с аллергией простимулировали *in vitro* в течение 7 дней 25 мкг/мл аллергенного экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) и аутологичными APC без антитела или в присутствии 10 мкг/мл A26 Fab'PEG, A26 Fab-Fv или контрольного Fab'(A33 Fab'). Клетки промыли и оставили на 3 суток, а затем рестимулировали экстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*, как ранее (фиг. 13). Через 3 дня клетки промыли и флуоресцентно окрасили на поверхностные CD3, CD4 и CD25. Затем клетки проанализировали проточной цитометрией на проточном цитометре FACS Canto (BD). Клетки отделили от живых лимфоцитов и перед анализом от экспрессирующих  $CD3^+CD4^+$ . Данные представляют  $n=3$  донора, включая среднее значение, A26 Fab-Fv по сравнению с контрольным Fab' (значимость изменена с использованием парного двустороннего Т-критерия).

Пример 4. A26 Fab-Fv ингибирует пролиферацию  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток на модели мышей Hu-NSG.

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

Модель Hu-NSG демонстрирует, что A26 Fab-Fv полностью ингибирует пролиферацию Т-клеток человека *in vivo* и подтверждает A26 Fab-Fv в качестве терапевтического кандидата на ингибирование опосредованных Т-клетками патологий. Кроме того, формат Fab-Fv обладает большей эффективностью при более низких дозах, чем формат Fab'-PEG. Уменьшение данного ксено-пролиферативного ответа донорских Т-клеток доказывает, что A26 Fab-Fv может быть пригодным для применения терапевтическим средством при GVHD.

Пример 5. Лиганд-блокирующая способность.

Способность A26 Fab-dsFv к блокированию взаимодействия между экспрессированным на клеточной поверхности OX40 и рекомбинантным OX40L измерили с использованием анализа блокирования лиганда, основанного на проточной цитометрии. Коротко, активированные  $CD4^+$  OX40<sup>+</sup> Т-клетки человека предварительно проинкубировали с титрованием A26 Fab-Fv. Затем рекомбинантный OX40L добавили к клеткам и оставили для связывания в присутствии A26 Fab-dsFv. Определили долю связанного OX40L с помощью проточной цитометрии с использованием меченого вторичного реагента. На фиг. 11 показана кривая ингибирования, представляющая объединенные данные от 3 независимых доноров, и продемонстрировано, что A26 Fab-dsFv способно полностью блокировать связывание OX40L. Средняя  $IC_{50}$  ингибирования связывания рекомбинантного OX40L составила 0,44 нМ ( $n=3$  донора).

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

PBMC выделили путем разделения в градиенте Ficoll и активировали с 4 мкг/мл PHA-L (Sigma) в течение 3 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% влажности. Затем  $CD4^+$  Т-клетки очистили от культуры путем негативной селекции с использованием колонки MACS (Miltenyi Biotech,  $CD4^+$  T cell isolation kit II).  $2 \times 10^5$   $CD4^+$  Т-клеток инкубировали в присутствии A26 Fab-dsFv (диапазон конечной концентрации 10-0,000056 мкг/мл (136,6-0,000765 нМ)) в течение 30 мин при 4°C. OX40L (биотинилированный CD252- $\mu$ CD8, Ancell) добавили в конечной концентрации 2 мкг/мл и инкубировали еще в течение 30 мин при 4°C. Клетки промыли и связывание OX40L обнаружили с помощью инкубации с PE-меченым стрептавидином (Jackson ImmunoResearch) до анализа путем проточной цитометрии с использованием FACS Canto (Becton Dickinson). Соответствующее Fab-dsFv, не связывающее OX40, использовали в качестве контроля. Кривую ингибирования проанализировали с помощью нелинейной регрессии (GraphPad Prism®), чтобы определить  $IC_{50}$ . Кривая ингибирования, представляющая объединенные данные от трех независимых доноров, показана на фиг. 11, где точки данных представляют среднее, а планки погрешностей представляют SEM.

Средняя  $EC_{50}$  ингибирования связывания рекомбинантного OX40L с OX40 с помощью A26 Fab-Fv составила 0,445 нМ. Для сравнения, A26 Fab'PEG было немного менее активным при блокировании лиганда ( $EC_{50}=0,739$  нМ), тогда как A26 Fab' было незначительно более активным ( $EC_{50}=0,242$  нМ), чем Fab-Fv, как показано ниже.

Таблица 6

Значения  $EC_{50}$  ингибирования связывания OX40L с активированными  $CD4^+OX40^+$  Т-клетками человека с помощью антител A26

Формат антитела	$EC_{50}$ блокирования лиганда (нМ) среднее $\pm$ S.E.M.
A26 Fab-Fv ( $n = 3$ )	0,445 $\pm$ 0,110
A26 Fab'PEG ( $n = 3$ )	0,739 $\pm$ 0,166
A26 Fab' ( $n = 3$ )	0,242 $\pm$ 0,069

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

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

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

A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов.

Однонаправленная реакция аллогенных смешанных лимфоцитов (MLR) является моделью *in vitro* активации и пролиферации аллореактивных Т-клеток (Bach et al., 1964, O'Flaherty et al., 2000). Донорские Т-клетки активируют посредством распознавания аллогенных антигенов МНС на неродственных донорских стимулирующих РВМС, приводя к клеточной пролиферации и производству цитокинов (Lukacs et al., 1993). Аллореакция Т-лимфоцитов, как было показано, вызвана одновременно аллогенным антигеном МНС и связанным пептидом (Sherman et al., 1993). Величина ответа MLR коррелирует со степенью неправильного подбора МНС между парой респондер-стимулятор (Forrester et al., 2004). Ответ MLR приводит к пролиферации клеток донора и производству как  $T_H1$  (IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), так и  $T_H2$  (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) Т-клеточных цитокинов. Точный цитокиновый профиль в MLR считают специфичным при образовании пары респондер-стимулятор (Jordan et al., 2002). Анализы MLR широко используют в исследованиях по изучению путей активации Т-клеток, в скрининге иммунодепрессантных лекарственных средств и для прогноза возможного отторжения донорского органа у реципиентов с трансплантацией (Bromelow et al., 2001).

Эффект A26 Fab-Fv на активацию и пролиферацию аллореактивных Т-клеток человека *in vitro* исследовали с использованием анализа MLR, по существу, как описано O'Flaherty et al., 2000. РВМС от двух неродственных доноров совместно культивировали в присутствии или в отсутствие A26 Fab-Fv, A26 Fab' или A26 Fab'PEG и измерили клеточную пролиферацию по включению  $^3H$ -тимидина. Как показано на фиг. 12, A26 Fab-Fv ингибировало клеточную пролиферацию зависимым от концентрации образом со значением  $EC_{50}$  0,56 нМ (40,9 нг/мл) и максимальным ингибированием на 55% ( $n=3$  донорских пар). A26 Fab-Fv было немного более активным, чем A26 Fab'PEG, которое имело значение  $EC_{50}$  0,88 нМ, в то время как A26 Fab' имело значение  $EC_{50}$  0,25 нМ, как показано в табл. 7.

РВМС человека от двух неродственных доноров выделили из цельной крови. Клетки от одного донора инактивировали  $\gamma$ -облучением для создания популяции-стимулятора. Клетки от оставшегося донора образовали популяцию-респондер. Популяции стимулятора и респондера смешали в соотношении 1:1 ( $1 \times 10^5$  клеток/донор) и культивировали в присутствии A26 Fab', A26 Fab-Fv или A26 Fab'PEG (0,4 нг-25 мкг/мл) в течение 6 дней. Реагент собственного производства CA162-01297.1 Fab-Fv использовали в качестве подобранного по изотипу контроля. Клеточную пролиферацию измерили на шестой день по включению  $^3H$ -тимидина (0,5 мКи/лунку). Данные показаны как процент ингибирования по отношению к ответу "респондер плюс стимулятор" в отсутствие биологического реагента, и являются объединенными данными из трех донорских пар. Значения  $EC_{50}$  рассчитали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism®.

Таблица 7

Значения  $EC_{50}$  ингибирования пролиферативного ответа MLR человека с помощью антител A26

Формат антитела	$EC_{50}$ (нМ) среднее $\pm$ S.E.M.
A26 Fab-Fv ( $n = 3$ )	0,56 $\pm$ 0,12
A26 Fab'PEG ( $n = 3$ )	0,88 $\pm$ 0,44
A26 Fab' ( $n = 3$ )	0,25 $\pm$ 0,06

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

РВМС человека от двух неродственных доноров выделили из цельной крови. Клетки от одного донора инактивировали  $\gamma$ -облучением для создания популяции-стимулятора. Клетки от оставшегося донора образовали популяцию-респондер. Популяции стимулятора и респондера смешали в соотношении 1:1 ( $1 \times 10^5$  клеток/донор) и культивировали в присутствии 25 мкг/мл A26 Fab', A26 Fab-Fv, A26 Fab'PEG или контроля (A33 Fab' или CA162.01297.1) в течение 6 дней. Супернатанты собрали и проанализировали на содержание IFN- $\gamma$  с использованием анализа MSD. Процент ингибирования рассчитали по отношению к клеткам, культивированным без каких-либо антител. Графики представляют объединенные данные от трех доноров (среднее  $\pm$  SEM). \*\*  $P < 0,01$ ; A26 Fab-Fv по сравнению с контрольным Fab-Fv (значимость измерена с помощью парного двустороннего Т-критерия).

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

Исследовали эффект A26 Fab-Fv на деление NK-клеток в MLR. Аллореакция Т-лимфоцитов стимулирует ответ смешанных лимфоцитов и A26.

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

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

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

## Перечень последовательностей

<110> ЮСБ Фарма С.А.  
 <120> Молекулы антител, имеющие специфичность в отношении OX40 человека  
 <130> G0160 W001  
 <150> US 61/558,545  
 <151> 2011-11-11  
 <160> 28  
 <170> PatentIn версия 3.5  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> Белок  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> CDRH1  
 <400> 1  
 Asn Tyr Gly Ile His  
 1 5  
  
 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> CDRH2  
 <400> 2  
 Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> CDRH3  
 <400> 3  
 Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr  
 1 5  
  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> CDRL1  
 <400> 4  
 Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 5  
 <211> 7

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, которое связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, содержащее:

тяжелую цепь, содержащую от N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H1}$ ),  $C_{H1}$ -домен и второй переменный домен тяжелой цепи ( $V_{H2}$ );

легкую цепь, содержащую от N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи ( $V_{L1}$ ),  $C_L$ -домен и второй переменный домен легкой цепи ( $V_{L2}$ ),

где  $V_{H1}$  и  $V_{L1}$  образуют первый антигенсвязывающий центр, который связывает OX40, а  $V_{H2}$  и  $V_{L2}$  образуют второй антигенсвязывающий центр, который связывает сывороточный альбумин человека,

причем  $V_{H1}$  содержит CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR-H2 - с последовательностью SEQ ID NO: 2 и CDR-H3 - с последовательностью SEQ ID NO: 3, и  $V_{L1}$  содержит CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR-L2 - с последовательностью SEQ ID NO: 5, и CDR-L3 - с последовательностью SEQ ID NO: 6;

$V_{H2}$  имеет последовательность SEQ ID NO: 11, а  $V_{L2}$  имеет последовательность SEQ ID NO: 12;

$V_{H2}$  и  $V_{L2}$  соединены дисульфидной связью.

2. Биспецифическое антитело по п.1, которое препятствует связыванию OX40 с OX40L.

3. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, содержащее пептидный линкер между  $C_{H1}$ -доменом и  $V_{H2}$ .

4. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-3, содержащее пептидный линкер между  $C_L$ -доменом и  $V_{L2}$ .

5. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-4, где  $V_{H1}$  содержит последовательность SEQ ID NO: 8.

6. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-5, где  $V_{L1}$  содержит последовательность SEQ ID NO: 7.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-6, где тяжелая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 15 или имеет SEQ ID NO: 15.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 16 или имеет SEQ ID NO: 16.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-8, имеющее тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16.

10. Выделенная ДНК, кодирующая биспецифическое антитело по любому из пп.1-9.

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

12. Вектор клонирования или экспрессии по п.11, где указанная ДНК содержит последовательности SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24.

13. Клетка-хозяин для получения биспецифического антитела по любому из пп.1-9, содержащая вектор клонирования или экспрессии по п.11 или 12.

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

15. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп.1-9 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

16. Способ лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40, включающий введение пациенту биспецифического антитела по любому из пп.1-9.

17. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-9 для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое ассоциировано с повышенным уровнем OX40.

18. Применение биспецифического антитела по любому из пп.1-9 для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано OX40 или которое связано с повышенным уровнем OX40.

19. Способ по п.16, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аллергии, хронической обструктивной болезни легких, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции "трансплантат против хозяина", воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, системной склеродермии, вирусного воспаления легких, воспалительного заболевания органов малого таза, болезни Пейрони, заболевания брюшной полости, перитонита, псориаза, васкулита, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуно-опосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, синдрома Гийена-Барре, атопического

дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, панкреатита и периодонтита.

20. Способ по п.19, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, хронической обструктивной болезни легких, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, заболевания брюшной полости, псориаза, сахарного диабета 1 типа, системной красной волчанки, синдрома Гийена-Барре, атопического дерматита, болезни Грейвса и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

21. Применение по п.17 или 18, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из аллергии, хронической обструктивной болезни легких, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, астмы, реакции "трансплантат против хозяина", воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, тяжелой миастении, болезни Грейвса, отторжения трансплантата, гранулематоза Вегенера, пурпуры Шенлейна-Геноха, системной склеродермии, вирусного воспаления легких, воспалительного заболевания органов малого таза, болезни Пейрони, заболевания брюшной полости, перитонита, псориаза, васкулита, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуно-опосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, синдрома Гийена-Барре, атопического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, IgA-нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, панкреатита и периодонтита.

22. Применение по п.21, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, хронической обструктивной болезни легких, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, заболевания брюшной полости, псориаза, сахарного диабета 1 типа, системной красной волчанки, синдрома Гийена-Барре, атопического дерматита, болезни Грейвса и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

23. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой ревматоидный артрит.

24. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

25. Способ по п.19, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, язвенного колита и заболевания брюшной полости.

26. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой атопический дерматит.

27. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой псориаз.

28. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой системную красную волчанку.

29. Способ по п.19, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, синдрома Гийена-Барре, болезни Грейвса и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

30. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой аллергию.

31. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой астму.

32. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина".

33. Способ по п.19, где патологическое расстройство представляет собой отторжение трансплантата.

34. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой ревматоидный артрит.

35. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

36. Применение по п.21, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, язвенного колита и заболевания брюшной полости.

37. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой атопический дерматит.

38. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой псориаз.

39. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой системную красную волчанку.

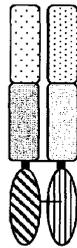
40. Применение по п.21, где патологическое расстройство выбрано из группы, состоящей из сахарного диабета 1 типа, синдрома Гийена-Барре, болезни Грейвса и идиопатической тромбоцитопенической пурпуры.

41. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой аллергию.

42. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой астму.

43. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина".

44. Применение по п.21, где патологическое расстройство представляет собой отторжение трансплантата.



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

Фиг. 1

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYIRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSS

## (c)

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

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF  
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYIRD  
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC

Фиг. 2

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

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNK  
NTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

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

DIQMTQSPSSVSASVGRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRSGSGSDFTLT  
ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKRT

## (c) Линкер 1 (SEQ ID NO:13)

SGGGSGGGGTGGGGS

## (d) Линкер 2 (SEQ ID NO:14)

GGGGSGGGSGGGGS

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA  
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCSGGGG  
SGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAK  
GRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

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

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPKGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSLTI  
SSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV  
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSG  
GGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRSGSGSD  
FTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIKRT

## Фиг. 3

## (A) Варибельный домен тяжелой цепи 645gH1 (SEQ ID NO:17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDTT  
VYQLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

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

DIQMTQSPSSVSASVGRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRKSGSGSDFTLT  
ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIK

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDA  
KNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPEP  
KSCSGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIW  
ASGTTFYATWAKGRFTISRDTTAVYQLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

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

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRATQSIYNALAWYQQKPKGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSLTI  
SSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG  
GGSGGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSQ  
VPSRFRKSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDITFGCGTKVEIK

## Фиг. 4

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

ATGAAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAAGTTCAGCTG  
 GTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTTC  
 ACCAАСТACGGTATCCACTGGATTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCT  
 GGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAAАСТCTCCG  
 TACCTGCAAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTC  
 GACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCT  
 CCGTCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGGTGCCTGGTGAAGACTACTTCCCAGAACCACTT  
 ACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCACCTCTGGTGTTCACACCTTCCAGCAGTCTCCAGTCTTCTGGTCTG  
 TACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCGGTCTTCTTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCAC  
 AAACCGTCCAACACCAAGGTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGCTCAGGTGGAGGC  
 GGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTG  
 CGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGAAG  
 TGTTTAGAATGGATCGGTATAАТАТGGGCCAGTGGGACGACCTTTATGCTACATGGGCGAAAGGAAGGTTACA  
 ATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAATGAACTCCTTGCAGCAGAGGACACGGCGGTGTAC  
 TATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCTACTTTCGATCTGTGGGGACAAGGGACCTGGTGACT  
 GTTTCAAGTTAA

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

GAAGTTCAGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGC  
 GGTTTCACGTTACCAАСТACCGTATCCACTGGATTCGTCAGGCACCAGGTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT  
 ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCG  
 AAAАСТCTCCGTACCTGCAAAATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT  
 GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTT  
 TTCCCACTGGCTCCGTCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGGTGCCTGGTGAAGACTACTTC  
 CCAGAACCACTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCACCTCTGGTGTTCACACCTTCCAGCAGTTCTCCAG  
 TCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCGGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGC  
 AACGTCAACCASAAACCGTCCAACACCAAGGTCGACAAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGC  
 TCAGGTGGAGGCGGGACCGGTGGAGGTGGCAGCGAGGTTCAACTGCTTGAGTCTGGAGGAGGCCTAGTCCAGCCT  
 GGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGTAAGCGGCATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAA  
 GCTCCGGGGAAGTGTTTAGAATGGATCGGTATAАТАТGGGCCAGTGGGACGACCTTTATGCTACATGGGCGAAA  
 GGAAGGTTTACAATTAGCCGGGACAATAGCAAAAACACCGTGTATCTCCAATGAACTCCTTGCAGCAGAGGAC  
 ACGGCGGTGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCCAGGTTATAGCACTGCACCTACTTTCGATCTGTGGGGACAAGGG  
 ACCCTGGTGACTGTTCAAGTTAA

Фиг. 5

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

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTTGGCTGGTTTCGCGACCGTTGCGCAAGCTGATATCCAGATG  
 ACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATC  
 TACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTG  
 CATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTCCAG  
 CCGGAAGATTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTT  
 GAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTACT  
 GCTTCTGTGCTTGCCTCCTGAACAACCTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTC  
 CAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTG  
 ACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCG  
 GTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTCA  
 GACATACAAATGACCCAGAGTCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTGGCGATAGGGTACTATTACATGTCAAAGC  
 TCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTTAT  
 GAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTCACGTTGACA  
 ATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACA  
 TTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

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

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA  
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAAC  
 GCGAACACTCTGCATACTGGTGTTCGGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC  
 TCCTCTCTCCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT  
 GGTAACAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTC  
 AAATCTGGTACTGCTTCTGTGCTTTCCTCCTGAACAACCTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTC  
 GACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTG  
 TCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGT  
 CTGAGCTCTCCGGTTACCAAATCCTTTAATAGAGGGAGTGTGGTGGCGGTGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGA  
 GGTGGCGGTTACAGACATACAAATGACCCAGAGTCTTCATCGGTATCCGCGTCCGTGGCGATAGGGTACTATT  
 ACATGTCAAAGCTCTCCTAGCGTCTGGAGCAATTTCTATCCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAA  
 CTCTGATTTATGAAGCCTCGAAACTCACCAGTGGAGTTCGGTCAAGATTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGAC  
 TTCACGTTGACAATCAGTTCGCTGCAACCAGAGGACTTTGCGACCTACTATTGTGGTGGAGGTTACAGTAGCATA  
 AGTGATACGACATTTGGGTGCGGTACTAAGGTGGAATCAAACGTACCTAA

Фиг. 6

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

ATGGAATGGTCTGGGTCTTCCTGTTTTTCCTTTCTGTACAAACCGGGGTGCACAGCGAGGTGCAGCTCGTCGAG  
TCTGGAGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCCCTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTACAGTTCACCAAC  
TACGGTATCCACTGGATTTCGTACAGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGT  
CTGACGTAACCTGACCTGTCAAAGGTCTTTACCATCTCTCGTGTGACGCGAAAAAATCTCCGTACCTG  
CAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTAC  
TGGGGTCAGGTACCTGGTAACGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGCCCAATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTG  
TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCTGGACTTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC  
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTACC  
GGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCGCTTG  
TCCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCCTC  
GAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAGGGTAGATTACAAATCTCA  
CGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACTGCAGATGAACTCCCTGCCGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGT  
GCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGCACTCTGGTCACCGTCTCG  
AGTTGA

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

GAGGTGCAGTCTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCCCTCTCTTGTGCAGCAAGC  
GGTTTACAGTTCACCAACTACCGTATCCACTGGATTTCGTACAGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCT  
ATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAACCTGACCTGTCAAAGGTCTTTACCATCTCTCGTGTGACGCG  
AAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGT  
GAAGGTATCTTCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACGTCTCAAGCGCTTCTACAAAGGCCCAATCGGTCT  
TCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAG  
TCCTCTGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTCGGAGGTGGCGGT  
TCCGGAGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCC  
GGAGGCAGTCTTCGCTTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCGACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAG  
GCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAG  
GGTAGATTACAAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACACAGTGTACTGCAGATGAACTCCCTGCCGAGCAGAGGAT  
ACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCACTGTCCAGGTTATAGCACTGCACCCCTACTTTGATCTGTGGGGGCAGGGC  
ACTCTGGTCACCGTCTCGAGTTGA

Фиг. 7

**а) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645(gL4), включающая лидерную последовательность В72.3 (SEQ ID NO:27)**

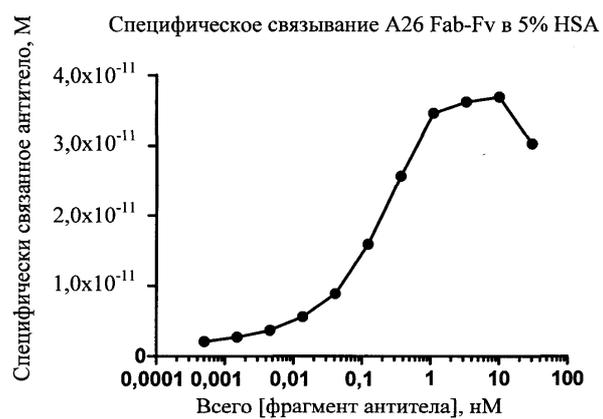
ATGTCAGTTCACACAGGTGCTGGCCCTGCTTCTGTTGTGGCTCACCGATGCTAGGTGTGATATCCAGATGACC  
 CAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGCATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTAC  
 AACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACCGGAACACTCTGCAT  
 ACCGGTGTCCGCTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCG  
 GAAGATTTCCGACSTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAG  
 ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAGTCTGGCACTGCC  
 TCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTTCAA  
 TCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCACACTGACA  
 CTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCCAAGTGACACATCAAGGCTGAGCTCACCCGTG  
 ACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGAGGCGGAGGAAGCGAC  
 ATCCAGATGACCCAGAGCCCTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTGGGAGACAGAGTGACTATTACCTGCCAAAGCTCC  
 CCTCAGTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAGCCCGAAAGGCTCCTAAATTTGCTGATCTACGAA  
 GCAAGCAAACCTACCAGCGCGTGCACAGCAGGTTACGCGCAGTGGGTCTGGAAGTACTTTACCCTGACAATC  
 TCCTCACTCCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTGATACGACATTT  
 GGATGCGGCACTAAAGTGAAATCAAGCGTACCTGA

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

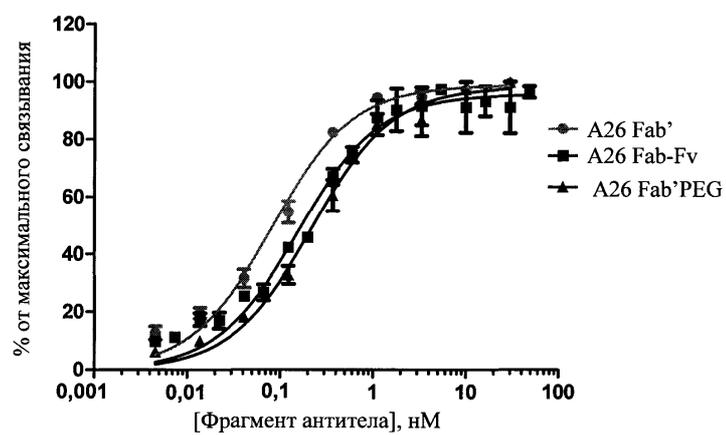
GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGGCATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCA  
 ACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAAC  
 CGGAACACTCTGCATACCGGTGTCCGCTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATC  
 TCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTCCGACSTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGT  
 GGTACCAAAGTTGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTG  
 AAGTCTGGCACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTG  
 GATAACGCCCTTCAATCCGGAAACTCCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTT  
 AGCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGTCTACGCCTGCCAAGTGACACATCAAGGC  
 CTGAGCTCACCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGGGGAGAGTGTGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGTGGCTCCGGA  
 GCGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTCCTCTGTAAGCGCCAGTGTGGGAGACAGAGTGACTATT  
 ACCTGCCAAAGCTCCCTTCACTCTGGTCCAATTTTCTATCCTGGTACCAGCAAAGCCCGAAAGGCTCCTAAA  
 TTGCTGATCTACGAAGCAAAGCAAACCTACCAGCGCGTGCACAGCAGGTTACGCGCAGTGGGTCTGGAAGTAC  
 TTTACCCTGACAATCTCCTCACTCCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATA  
 AGTGATACGACATTTGGATGCGGCACTAAAGTGAAATCAAGCGTACCTGA

Фиг. 8

A

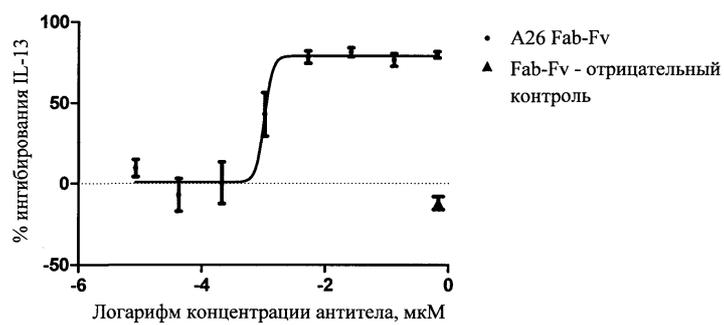


B

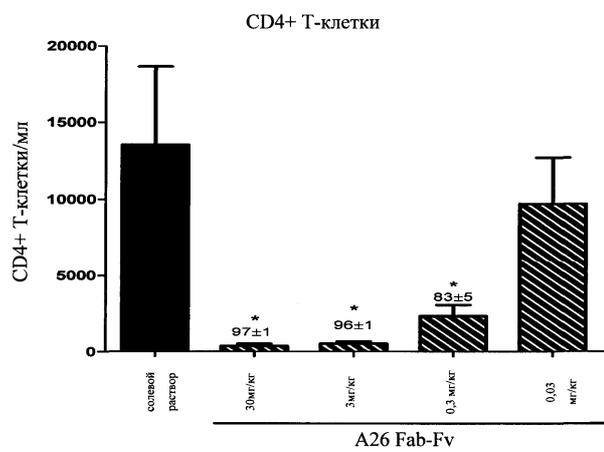


Фиг. 9

(a)



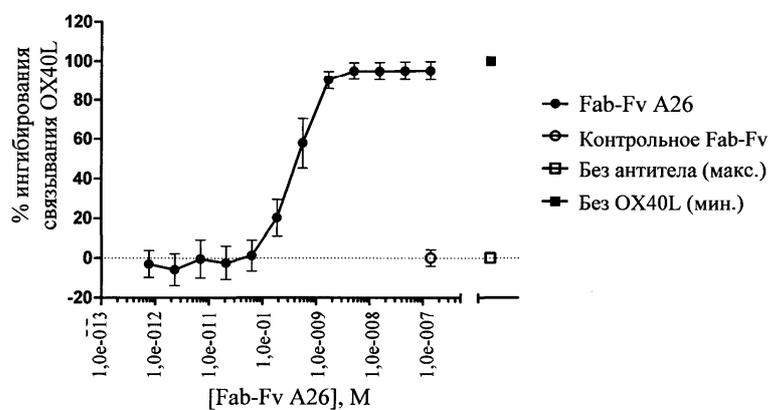
(b)



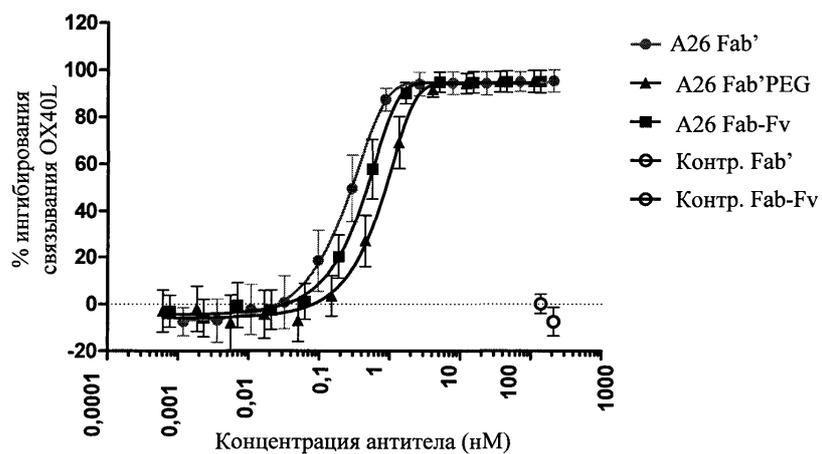
Фиг. 10

А

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

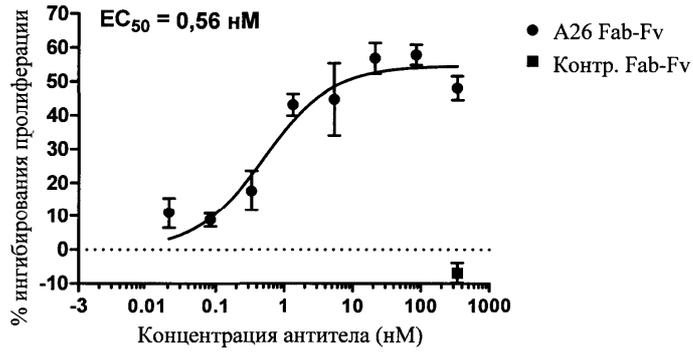


В

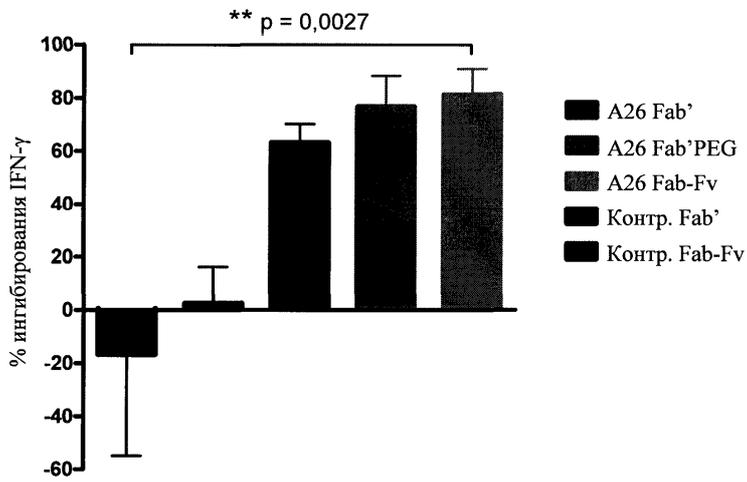


Фиг. 11

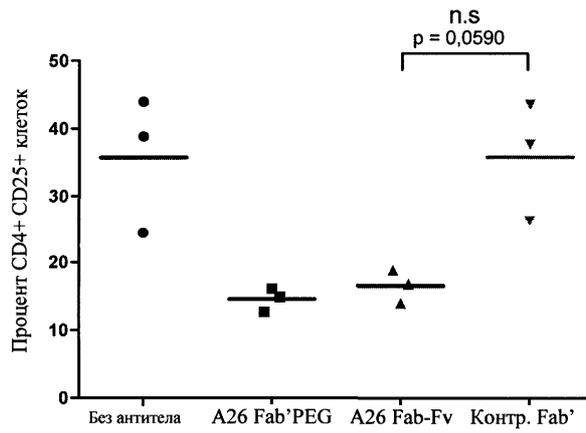
A A26 Fab-Fv ингибирует реакцию смешанных лимфоцитов человека



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

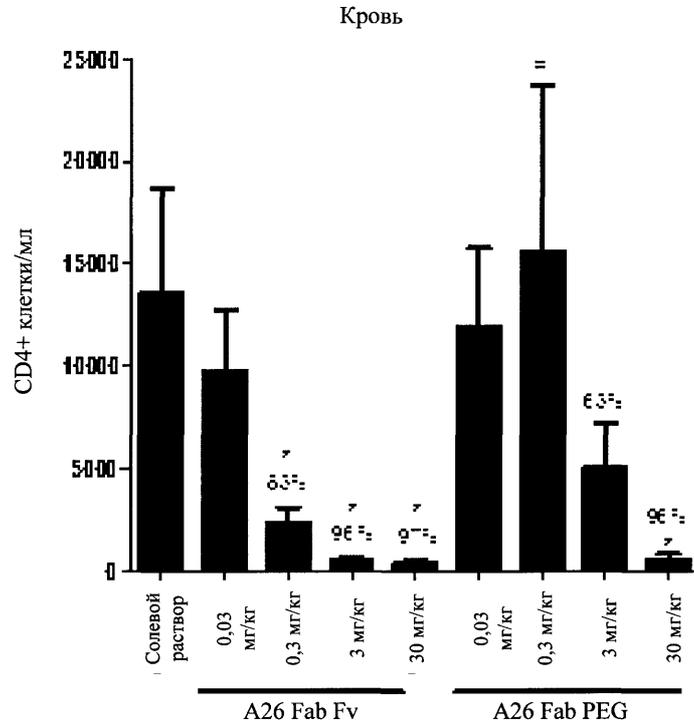


Фиг. 12



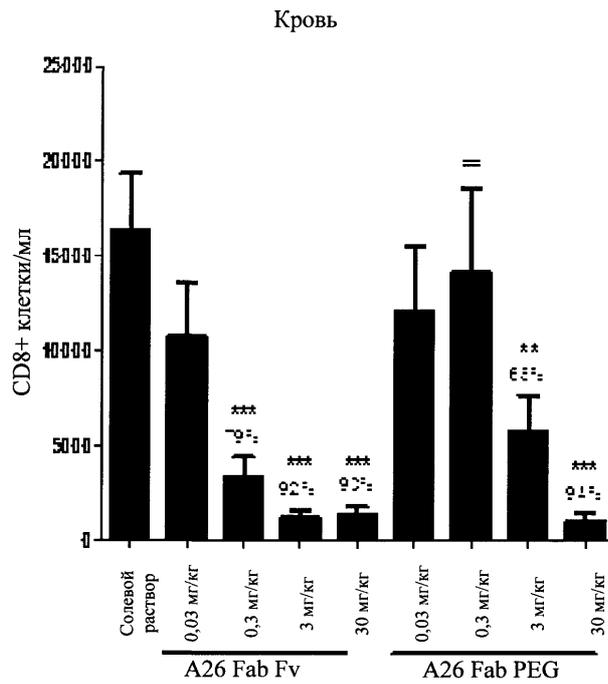
Фиг. 13

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



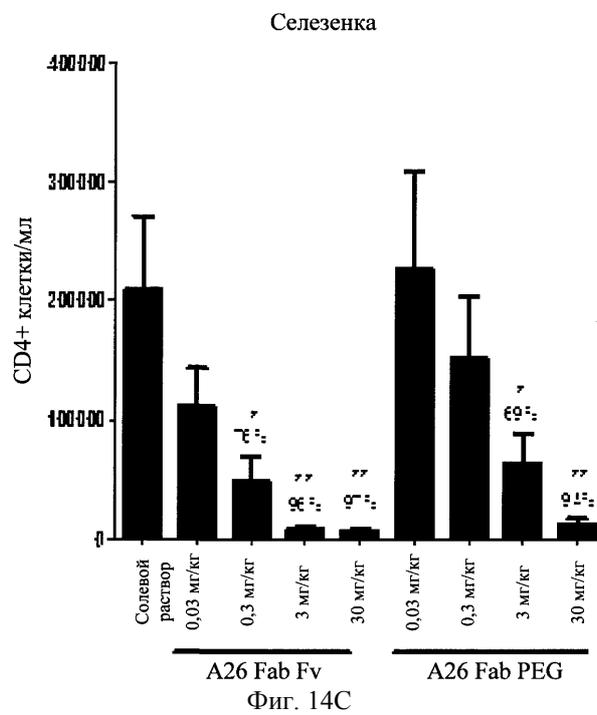
Фиг. 14А

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

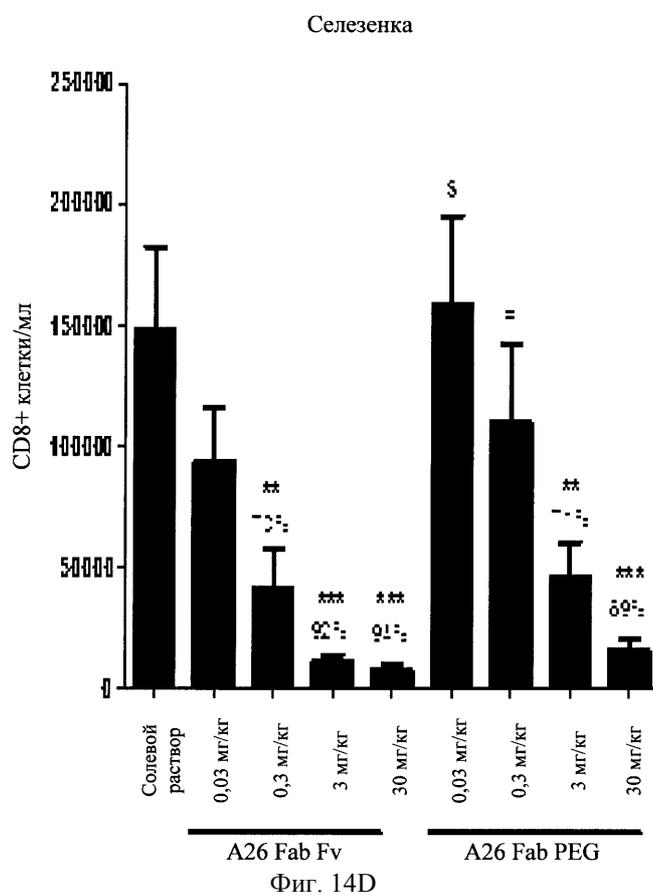


Фиг. 14В

A26 Fab-Fv, введенное до клеточного переноса, дозозависимым образом ингибирует пролиферацию CD4<sup>+</sup> T-клеток в модели Ну-NSG



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



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2