

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037792**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.21

(21) Номер заявки
201171060

(22) Дата подачи заявки
2010.02.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ЧЕЛОВЕЧЕСКОМУ ОХ40 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/153,038**

(32) **2009.02.17**

(33) **US**

(43) **2012.07.30**

(86) **PCT/US2010/024377**

(87) **WO 2010/096418 2010.08.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Лосан Эластер Дэвид Гриффитс,
Несбитт Эндрю Малколм,
Попплевелл Эндрю Джордж, Шоу
Стивен Грэхем (GB), Шпектор Диана,
Чжан И (US)**

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(56) WO-A2-2008106116
US-A1-20080069822
WO-A2-2005061540
US-A1-20040146948
RENSING et al. Predicted protein
[Physcomitrella patens subsp. patens]. GenBank
Accession No. XP_001761998. 29 January 2009
(29.01.2009) [online]: downloaded from [http: //
www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/168018930](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/168018930) on 25
March 2012

US-A1-20070224627
US-A1-20070110747
US-A1-20050181448
WO-A2-2006131951
US-A1-20060228358

(57) В изобретении описаны молекулы антитела, обладающего специфичностью к антигенным детерминантам человеческого ОХ40, терапевтическое применение молекул антитела и способы получения указанных молекул антитела.

B1**037792****037792****B1**

Данное изобретение относится к молекулам антител, обладающих специфичностью к антигенным детерминантам OX40 и композициям, состоящим из подобных антител. Кроме того, данное изобретение относится к терапевтическому использованию молекул антител, композиций и способов для производства указанных молекул антител.

OX40 (также известный как CD134, TNFRSF4, ACT35 или TXGP1L) является членом суперсемейства рецепторов ФНО, которое включает 4-1BB, CD27, CD30 и CD40. Внеклеточный домен OX40 для связывания с лигандом состоит из 3 полных и обогащенных цистеином доменов (CRD) и 4 частичных CRD на С-конце (Bodmer et al., 2002, *Trends Biochem Sci*, 27, 19-26).

Лиганд для OX40 представлен OX40L, и 3 копии OX40 связываются с тримерным лигандом с образованием комплекса OX40-OX40L (Compaan and Hymowitz, 2006, *Structure*, 14, 1321-1330). OX40 является рецептором, находящимся в мембране; также была выявлена его растворимая изоформа (Taylor and Schwarz, 2001, *J. Immunol. Methods*, 255, 67-72). Функциональная значимость растворимой формы в настоящий момент не известна. OX40 не экспрессируется находящимися в состоянии покоя Т-клетками, но временно экспрессируется активированными Т-клетками после лигирования Т-клеточного рецептора (ТКР). Лиганд для OX40, OX40L является членом семейства ФНО и экспрессируется на активированных антиген-представляющих клетках (АПК), включая В-клетки, макрофаги, эндотелиальные клетки и дендритные клетки (ДК).

OX40 является основным костимулирующим рецептором с включением последовательности CD28 и OX40 и необходим для оптимальной пролиферации Т-клеток и их выживания. Лигирование OX40 на активированных Т-клетках ведет к повышенной выработке цитокинов и пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (Gramaglia et al., 2000, *J. Immunol*, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala et al., 2004, *J. Immunol*, 172, 4821-425), что может способствовать непрерывному возникновению ответов как Th1, так и Th2 (Gramaglia et al., 1998, *J. Immuno*, 161, 6510-6517, Arestides et al., 2002, *Eur. J. Immunol.* 32, 2874-2880). Костимуляция OX40 увеличивает выживаемость Т-клеток за пределами начальной эффекторной фазы иммунного ответа и повышает число Т-клеток памяти посредством ингибирования смерти эффектора Т-клеток.

При избыточной или неконтролируемой иммунной активации могут возникнуть патологическая аллергия, астма, воспаление, аутоиммунные и другие родственные заболевания. Принимая во внимание функции OX40 в плане усиления иммунного ответа, это может привести к ухудшению состояния аутоиммунного и воспалительного заболевания.

Роль взаимодействий OX40/OX40L была показана на модели заболевания у OX40 нокаутных мышей. При экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЕ) у нокаутных мышей OX40 был выявлен множественный склероз, менее тяжелые клинические признаки заболевания и пониженное количество воспалительного инфильтрата в ЦНС (Carboni et al., 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). Кроме того, у нокаутных мышей OX40, которые были примированы и сенсибилизированы яичным альбумином, отмечалось пониженное легочное воспаление (80-90% снижение эозинофилии), пониженная выработка слизи и значительно сниженная гиперреактивность дыхательных путей (Jember et al., 2001, *J. Exp. Med.*, 193, 387-392). Моноклональные антитела к мышинному лиганду OX40 обладали преимущественным эффектом в модели коллаген-индуцированного ревматоидного артрита (Yoshioka et al., 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2815-2823), ЭАЭ (Nohara et al., 2001, *J. Immunol.*, 166, 2108-2115), не страдающих ожирением мышей с диабетом (NOD) (Pakala et al., 2004, *Eur. J. Immunol.*, 34, 3039-3046), колита у мышей с восстановленным количеством Т-клеток (Malmstrom et al., 2001, *J. Immunol.*, 166, 6972-6981, Totsuka et al., 2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284, G595-G603) и в 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 человеческому OX40L было изучено на модели легочного воспаления у макаки-резус, в результате чего были выявлены пониженные уровни ИЛ-5, ИЛ-13 и эффекторных Т-клеток памяти в бронхоальвеолярном смыве после воздействия аллергена (Seshasayee et al., 2007, *J. Clin. Invest.*, 117, 3868-3878).

Повышенная выработка OX40 также была отмечена при нескольких аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Это включает повышение 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). Подобным образом, повышение экспрессии OX40 отмечалось в ткани желудочно-кишечного тракта 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), а также в активных поражениях у пациентов с множественным склерозом (Carboni et al., 2003, *J. Neuroimmunology*, 145, 1-11). OX40L может быть также выявлен в гладкой мускулатуре дыхательных путей человека (ГМДП), при этом клетки ГМДП у пациентов с астмой характеризуются большим воспалительным ответом на лигирование OX40L, чем у здоровых доноров, что указывает на роль сигнального 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). Также сообщалось, что CD4⁺ Т-клетки, выделенные из периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), экспрессируют повышенные уровни OX40, что связано с активностью болезни (Patschan et al., 2006, *Clin. Exp. Immunol.*, 145, 235-242).

Принимая во внимание роль OX40 при аллергии, астме и заболеваниях, связанных с аутоиммунитетом и воспалением, один из подходов в лечении таких заболеваний состоит в блокировании сигнального пути OX40-OX40L посредством использования антител к OX40L или антагонистических антител к OX40L.

Антитела к OX40L уже были описаны ранее (см., например, WO 2006/029879). Многочисленные антагонистические антитела к OX40 также были описаны ранее, однако известно лишь несколько антагонистических антител к OX40. Поликлональное кроличье антимышиное антитело к OX40 было получено Stuber et al., 1996, J. Exp. Med., 183, 979-989, и такое антитело блокирует взаимодействие между OX40 и OX40L. Мышиные моноклональные антитела 131 и 315, которые связываются с человеческим OX40, были получены Imuga et al., 1996, J. Exp. Med., 2185-2195.

Полностью человеческие антагонистические антитела были описаны в WO 2007/062245, и такие антитела обладают наибольшей аффинностью для клеточной поверхности, экспрессирующей OX40 (активированные Т-клетки) 11 нмоль.

Гуманизированные антагонистические антитела были описаны в WO 2008/106116, и наилучший показатель аффинности антитела к OX40 составляет 0,94 нмоль.

Были описаны и другие антитела к OX40, включая мышиное L106 (патент США № 6277962) и мышиное ACT35, представленное на рынке компанией eBioscience.

В соответствии с этим в данной области все еще существует необходимость в усовершенствовании антитела к OX40, подходящего для лечения пациентов.

На данный момент нами было выявлено антагонистическое антитело к OX40, обладающее высокой аффинностью и подходящее для лечения или профилактики патологических расстройств, опосредованных OX40 или связанных с повышенным уровнем OX40.

Краткое описание фигур

Фиг.1 отображает определенные аминокислотные или ДНК-последовательности, относящиеся к антителам в соответствии с описанием;

фиг. 2 - диаграмму антитела формата A26 Fab'-PEG;

фиг. 3 - аффинность клеток к антителу A26 Fab'-PEG для OX40 на поверхности клеток;

фиг. 4 - процентный показатель ингибирования связывания OX40L с активированными Т-клетками антителом A26 Fab'-PEG;

фиг. 5 - процентный показатель ингибирования пролиферации Т-клеток антителом A26 Fab'-PEG в ходе реакции смешанной культуры лимфоцитов человека;

фиг. 6 - ингибирование A26 Fab'-PEG пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови, подвергнутых воздействию столбнячным анатоксином;

фиг. 7 - процентный показатель ингибирования A26 Fab'-PEG выработки ИЛ-13 в мононуклеарных клетках периферической крови, подвергнутых воздействию аллергическим экстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*;

фиг. 8 - процентный показатель ингибирования A26 Fab'-PEG выработки цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови, подвергнутых воздействию аллергическим экстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*;

фиг. 9 - ингибирование A26 Fab'-PEG пролиферации CD4+ и CD8+ Т-клеток в модели Hu-SCID;

фиг. 10 - ингибирование A26 Fab'-PEG показателя артрита (в виде площади под кривой) в модели *in vivo*;

фиг. 11 - общие гистологические параметры артрита в модели *in vivo*.

Оригинальное крысиное антитело, из которого были получены гуманизированные антитела, обозначено здесь как CA044_00026.

Гуманизированное CA044_00026, представленное, как правило, в форме фрагмента Fab или другого фрагмента, обозначено здесь как A26.

ПЭГилированное антитело A26 в формате, представленном на фиг. 2, указывается здесь как A26 Fab'-PEG.

Остатки в переменных доменах антител обычно нумеруются в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Такая система описана в Kabat et al., 1987 в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (в дальнейшем по тексту указывается как "Kabat et al. (см. выше)"). Такая система нумерации используется в настоящей спецификации, за исключением определенных случаев, где указывается другая система нумерации.

Обозначения остатков в системе Kabat не всегда прямо соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная последовательность аминокислот может содержать меньшее или большее количество аминокислот, чем при строгой нумерации Kabat, указывая на сокращение или вставку в структурном компоненте, будь это каркасный или гипервариабельный участок (CDR) основной структуры вариабельного домена. Правильная нумерация остатков по Kabat может проводиться для отдельного антитела путем выравнивания гомологичных остатков в последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной последовательностью Kabat.

CDR вариабельного домена тяжелой цепи располагаются в остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-

65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3) в соответствии с системой нумерации Kabat. Однако согласно Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, расширяется от остатка 26 к остатку 32. Таким образом, если не указано иное, "CDR-H1" в контексте данного описания обозначает остатки 26-35, как это определяется при комбинировании системы нумерации Kabat и топологического определения петли Chothia.

CDR варибельного домена легкой цепи располагаются в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и остатках 89-97 (CDR-L3) в соответствии с системой нумерации Kabat.

Как это используется в данном документе, термин "антагонистическое антитело" описывает антитело, способное ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность OX40, например, путем блокирования связывания или существенного снижения связывания OX40 с лигандом OX40 и, таким образом, ингибируя активацию OX40.

Антитела, предназначенные к использованию в данном изобретении, могут быть получены с использованием любого известного науке способа. Полипептид/белок OX40, включая белки слияния, например белки слияния OX40-FC или клетки (полученные рекомбинантным или естественным путем), экспрессирующие полипептид (например, активированные Т-клетки), могут использоваться для получения антител, специфически распознающих OX40. Полипептид OX40 также может быть представлен "зрелым" полипептидом или его биологически активным фрагментом или производным. Подходящий полипептид OX40 представлен зрелым человеческим полипептидом, или его внеклеточным доменом, или фрагментом. Внеклеточный домен, как правило, состоит из аминокислот 29-214 белка OX40 (SWISS PROT запись P43489). Полипептиды OX40 могут быть получены с помощью хорошо известных науке процессов из полученных генетическим образом клеток-хозяев, включающих системы экспрессии, или же могут быть получены из естественных биологических источников. В данной заявке на изобретение термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Эти термины используются взаимозаменяемым образом, если не указано иное. Полипептид OX40 может в некоторых случаях быть частью большего белка, например белка слияния, слитого, например, с аффинной меткой. Антитела, выработанные против полипептида OX40, могут быть получены при необходимости иммунизации животного путем введения полипептидов животному, предпочтительно не являющемуся человеком, с использованием хорошо известных и стандартных протоколов (см., например, Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Для иммунизации может использоваться целый ряд видов теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако обычно наиболее подходящими являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Антитела для использования в данном изобретении включают целые антитела и их функционально активные фрагменты или производные и могут быть представлены (не ограничиваясь этим) моноклональными, гуманизированными, полностью человеческими или химерными антителами.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любого известного науке способа, например, способом гибридомы (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), способом триомы, способом гибридомы В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и способом ВЭБ-гибридомы (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела для использования в изобретении также могут быть получены с использованием отдельных лимфоцитов путем клонирования и экспрессии варибельного участка кДНК иммуноглобулина, полученного от отдельных лимфоцитов, выбранных для получения специфических антител, например, с помощью способов, описанных в Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; WO 92/02551; WO 2004/051268 и международной заявке на патент № WO 2004/106377.

Скрининг антител может проводиться с помощью анализов для определения связывания с человеческим OX40 и/или анализов для измерения способности блокировать связывание OX40 со своим лигандом, OX40L. Примером анализа связывания служит ИФА, в частности, с использованием белка слияния человеческого OX40 и человеческого Fc при иммобилизации на планшетах, а также при использовании конъюгированного вторичного антитела для определения антитела к OX40, связанного с белком слияния. Примером анализа блокирования служит анализ на основе проточной цитометрии, измеряющий показатель блокирования связывания белка слияния лиганда OX40 с OX40 на человеческих CD4 клетках. Для определения количества белка слияния лиганда OX40, связывающегося с клеткой, используется флуоресцентно-меченое вторичное антитело. Такой анализ позволяет выявить снижение сигнала, т.к. антитело в надосадочной жидкости блокирует связывание белка слияния лиганда с OX40. Примером также может служить анализ блокирования, где блокирование костимуляции нативных человеческих Т-клеток опосредовано белком слияния лиганда OX40, нанесенного на планшет, а измерение осуществляется с помощью введения меченного тритием тимидина.

Гуманизированные антитела (включая CDR-привитые антитела) представлены молекулами антител, имеющими один или несколько гиперварибельных участков (CDR) и полученными у животных, а также содержащими каркасный участок, полученный из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, US 5585089; WO 91/09967). Следует иметь в виду, что необходимость может заключаться лишь в переносе определяющих специфичность остатков CDR, а не всего CDR (см., например, Kashmiri et al.,

2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут, в некоторых случаях, также содержать один или несколько каркасных остатков, полученных у животных, у которых были получены и CDR.

Химерные антитела состоят из элементов, полученных от двух разных видов, например, элементов, обладающих характеристиками видов, из которых они были получены. Как правило, химерное антитело будет состоять из переменного участка, полученного у одного вида, например, мыши, крысы, кролика и т.п., и константного участка, полученного у другого вида, такого как человек.

Антитела для использования в данном изобретении также могут быть получены с помощью различных способов фаговых дисплеев, известных науке, и могут включать способы, описанные Brinkman et al. (в J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) и WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и патентах США 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108.

Полностью гуманизированные антитела представлены антителами, в которых все переменные участки и константные участки (где имеются) как легких, так и тяжелых цепей имеют человеческое происхождение или значительно идентичны последовательностям человеческого происхождения, при этом они необязательно могут быть получены из одного и того же антитела. Примеры полностью человеческих антител человека могут включать антитела, полученные, например, с помощью способов фагового дисплея, описанных выше, а также антитела, полученные у мышей, у которых гены переменного и, в некоторых случаях, константного участков мышиного иммуноглобулина были замещены их человеческими аналогами, например, как это описано в общих понятиях в EP 0546073 B1, патентах США №№ 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, EP 0438474 и EP 0463151.

В одном варианте воплощения изобретения, данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из тяжелой цепи, в которой переменный домен тяжелой цепи состоит как минимум из одного CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20 для CDR-H2, и CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 3 для CDR-H3.

В другом варианте воплощения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из тяжелой цепи, в которой как минимум два CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 переменного домена тяжелой цепи выбираются из следующего: последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 для CDR-H2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3. Например, антитело может включать тяжелую цепь, в которой CDR-H1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и CDR-H2 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. С другой стороны, антитело может состоять из тяжелой цепи, в которой CDR-H1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и CDR-H3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или антитело может включать тяжелую цепь, в которой CDR-H2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и CDR-H3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3. Во избежание сомнений следует понимать, что включены все пермутации.

В другом варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из тяжелой цепи, в которой переменный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 для CDR-H2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3 для CDR-H3.

В другом варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из тяжелой цепи, в которой переменный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 для CDR-H2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3 для CDR-H3.

В одном варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из легкой цепи, в которой переменный домен легкой цепи состоит как минимум из одного CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 21 для CDR-L1, CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и CDR с последовательностью, представленной на фиг. 1(c), SEQ ID NO: 6 для CDR-L3.

В другом варианте воплощения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из легкой цепи, в которой как минимум два CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 переменного домена легкой цепи выбираются из следующего: последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4 для CDR-L1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3. Например, антитело может включать легкую цепь, в которой CDR-L1 имеет последовательность, представленную в SEQ

ID NO: 4, и CDR-L2 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5. С другой стороны, антитело может состоять из легкой цепи, в которой CDR-L1 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и CDR-L3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или антитело может включать легкую цепь, в которой CDR-L2 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В целях избежания сомнений понимается, что включены все пермутации.

В другом варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из легкой цепи, в которой вариабельный домен состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4 для CDR-L1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3.

В другом варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, состоящее из легкой цепи, в которой вариабельный домен состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 для CDR-L1, последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3.

Молекулы антитела данного изобретения состоят соответствующим образом из комплементарной легкой цепи или комплементарной тяжелой цепи соответственно.

Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из тяжелой цепи, в которой вариабельный домен тяжелой цепи включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20 для CDR-H2, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 для CDR-H3, а также легкой цепи, в которой вариабельный домен легкой цепи включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 21 для CDR-L1, последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3.

Следует иметь в виду что, в соответствии с данным изобретением CDR может включать замену, вставки и/или делеции одной или нескольких аминокислот без существенного изменения способности антитела связываться с OX40 и нейтрализовать активность OX40. Эффект замен, вставок и/или делеций любых аминокислот может с легкостью быть изучен специалистом в данной области, например, с использованием описанных здесь способов, в частности представленных в примерах, для определения связывания OX40 и ингибирования взаимодействия OX40/OX40L. В соответствии с этим данное изобретение описывает антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40 и состоящее из одного или нескольких CDR, выбранных из CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), CDRH-2 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20), CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), CDRL-1 (SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 21), CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) и CDRL-3 (SEQ ID NO: 6), в которых одна или несколько аминокислот в одном или нескольких CDR замещены другой аминокислотой, желателен подобной аминокислотой, как это будет определено ниже. В одном варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40 и состоящее из CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), CDRH-2 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20), CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), CDRL-1 (SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 21), CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) и CDRL-3 (SEQ ID NO: 6), как это показано на фиг. 1(c), например, в которых одна или несколько аминокислот в одном или нескольких CDR замещены другой аминокислотой, такой как подобная аминокислота, как это будет определено ниже.

В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения состоит из тяжелой цепи, в которой вариабельный домен тяжелой цепи состоит из трех CDR, при этом последовательность CDRH-1 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, CDRH-2 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или CDRH-3 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3. В другом варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения состоит из тяжелой цепи, в которой вариабельный домен тяжелой цепи состоит из трех CDR, при этом последовательность CDRH-1 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, CDRH-2 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, и/или CDRH-3 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3.

"Идентичность" в контексте данного изобретения указывает, что любой отдельный участок выровненных последовательностей с аминокислотными остатками идентичен между последовательностями. "Подобие" в контексте данного изобретения указывает, что аминокислотные остатки в любом отдельном участке выровненных последовательностей представлены в последовательностях аминокислотами подобного типа. Например, лейцин может быть замещен изолейцином или валином. Другие аминокислоты, которые могут быть часто замещены друг другом, включают, но не ограничиваясь этим, следующие:

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты с боковыми ароматическими кольцами);

лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты с обычными боковыми цепями);

аспартат и глутамат (аминокислоты с боковыми цепями в виде кислотных остатков);
 аспарагин и глутамин (аминокислоты с боковыми цепями в виде амидов) и
 цистеин и метионин (аминокислоты с боковыми цепями, содержащими серу).

Степень идентичности и подобия можно легко вычислить (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 на 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).

В другом варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения состоит из легкой цепи, в которой вариабельный домен легкой цепи состоит из трех CDR, при этом последовательность CDRL-1 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, CDRL-2 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и/или CDRL-3 обладает как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6. В другом варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения состоит из легкой цепи, в которой вариабельный домен легкой цепи состоит из трех CDR, при этом последовательность CDRL-1 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, CDRL-2 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и/или CDRL-3 обладает как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6.

В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено моноклональным антителом.

В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено химерным антителом.

В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено молекулой CDR-привитого антитела, состоящего из одного или нескольких CDR, включенных в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 и/или 21 (фиг. 1(c)), или вариантами такого антитела. В контексте данного изобретения термин "молекула CDR-привитого антитела" относится к молекуле антитела, в котором легкая и/или тяжелая цепи состоят из одного или нескольких CDR (включая, по желанию, один или несколько модифицированных CDR) от донорского антитела (например, мышиногo моноклонального антитела), привитых к каркасу вариабельного участка тяжелой и/или легкой цепи антитела-акцептора (например, антитела человека). См. более подробно в Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном варианте воплощения изобретения в остов антитела человека переносится не весь CDR, а только один или несколько гипервариабельных участков любого из описанных выше в этом документе CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). В одном варианте воплощения изобретения в структуру человеческого антитела переносятся только гипервариабельные участки одного или нескольких описанных выше в этом документе CDR. В другом варианте воплощения изобретения в структуру человеческого антитела переносятся только гипервариабельные участки каждого из описанных выше в этом документе CDR.

При прививании CDR или гипервариабельных участков может использоваться любая подходящая структурная последовательность вариабельного участка акцептора, относящаяся к классу/типу антитела-донора, из которого был получен CDR, включая вариабельные участки мышей, приматов и человека. Таким образом, в контексте данного изобретения CDR-привитое антитело имеет вариабельный домен, состоящий из акцепторных каркасных участков человека, а также одного или нескольких CDR или гипервариабельных участков, описанных выше. В одном варианте воплощения изобретения, таким образом, представлено нейтрализующее CDR-привитое антитело, в котором вариабельный домен состоит из каркасных участков-акцепторов человека и донорских CDR животных.

Примеры каркасных участков человека, которые могут использоваться в данном изобретении, представлены KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., см. выше). Например, KOL и NEWM могут использоваться для тяжелой цепи, REI может использоваться для легкой цепи, а EU, LAY и POM могут использоваться как для тяжелой, так и для легкой цепи. С другой стороны, могут использоваться эмбриональные последовательности человека, представленные на <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

В CDR-привитом антителе данного изобретения тяжелые и легкие цепи акцептора необязательно должны быть получены из одного и того же антитела и могут, при желании, состоять из композитных цепей, имеющих каркасные участки, полученные из разных цепей.

Подходящий каркасный участок для тяжелой цепи CDR-привитого антитела данного изобретения получен из подгруппы VH3 последовательности человека 1-3 3-07 вместе с JH4. В соответствии с этим описывается нейтрализующее CDR-привитое антитело, состоящее как минимум из одного донорского CDR, полученного у животных, в котором каркасный участок тяжелой цепи получен из подгруппы VH3 последовательности человека 1-3 3-07 вместе с JH4. Последовательность человеческого JH4 представле-

на следующим образом: (YFDY)WGQGLTVTVSS (Seq ID No: 22). Мотив YFDY является частью CDR-H3, а не частью каркасного участка 4 (Ravetch, J.V. et al., 1981, Cell., 27, 583-591).

Подходящий каркасный участок для легкой цепи CDR-привитого антитела данного изобретения получен из эмбриональной подгруппы VK1 последовательности человека 2-1 1-02 вместе с JK4. В соответствии с этим описывается нейтрализующее CDR-привитое антитело, состоящее как минимум из одного донорского CDR, полученного у животных, в котором каркасный участок легкой цепи получен из подгруппы последовательности человека 2-1 1-02 вместе с JK4. Последовательность JK1 представлена следующим образом: (WT)FGQGTKVEIK (Seq ID No: 23). Мотив WT является частью CDR-L3, а не частью каркасного участка 4 (Hieter, P.A., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

Кроме того, в CDR-привитом антителе данного изобретения каркасные участки необязательно должны иметь одну и ту же последовательность, что и антитело-акцептор. Например, необычные остатки могут быть заменены более встречающимися остатками для отдельного типа или класса цепи акцептора. С другой стороны, выбранные остатки в каркасных участках акцептора могут быть изменены таким образом, чтобы они соответствовали остатку, находящемуся в том же самом положении, что и в антителе-доноре (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Подобные изменения сведут к минимуму необходимость в восстановлении аффинности антитела-донора. Протокол для выбора остатков в каркасных участках акцептора, который может потребовать изменений, приводится в WO 91/09967.

Таким образом, если в молекуле CDR-привитого антитела данного изобретения тяжелая цепь акцептора имеет последовательность VH3 1-3 3-07 человека вместе с JH4, то каркасные участки тяжелой цепи акцептора включают, кроме одного или нескольких CDR донора, донорский остаток как минимум в одной из позиций 37, 73, 78 или 94 (в соответствии с Kabat et al., (см. выше)). В соответствии с этим описывается CDR-привитое антитело, в котором как минимум остатки в положениях 37, 73, 78 и 94 вариативного домена тяжелой цепи являются донорскими остатками.

Таким образом, если в молекуле CDR-привитого антитела данного изобретения легкая цепь акцептора имеет последовательность VK1 2-1 1-02 подгруппы человека вместе с JK4, то каркасные участки легкой цепи акцептора включают, кроме одного или нескольких CDR донора, донорский остаток как минимум в одной из позиций 64 или 71. В соответствии с этим описывается CDR-привитое антитело, в котором остатки как минимум в положениях 64 и 71 вариативного домена легкой цепи являются донорскими остатками.

Донорские остатки являются остатками от антитела-донора, т.е. антитела, из которого были первоначально получены CDR.

В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает тяжелую цепь, в которой вариативный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, представленной на фиг. 1(b), SEQ ID NO: 9.

Следует иметь в виду, что в соответствии с данным изобретением вариативные домены антитела могут включать замены, вставки и/или делеции одной или нескольких аминокислот без существенного изменения способности антитела связываться с OX40 и нейтрализовать активность OX40. Эффект замен, вставок и/или делеций любых аминокислот может с легкостью быть изучен специалистом в данной области, например, с использованием описанных здесь способов, в частности, представленных в примерах, для определения связывания OX40 и блокирования лиганда.

В другом варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает тяжелую цепь, в которой вариативный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9. В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает тяжелую цепь, в которой вариативный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9.

В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает легкую цепь, в которой вариативный домен легкой цепи состоит из последовательности, представленной на фиг. 1(a), SEQ ID NO: 7.

В другом варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает легкую цепь, в которой вариативный домен легкой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7. В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает легкую цепь, в которой вариативный домен легкой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью SEQ ID NO: 7.

В одном варианте воплощения изобретения антитело данного изобретения включает тяжелую цепь, в которой вариативный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и легкой цепи, в которой вариативный домен легкой цепи состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7.

В другом варианте воплощения изобретения антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, при этом вариативный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, а вариативный

домен легкой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7. Таким образом, антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью SEQ ID NO: 9, и легкой цепи, где переменный домен легкой цепи состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7.

Молекулы антитела согласно данному изобретению могут состоять из молекулы полного антитела, имеющего тяжелые и легкие цепи полной длины или их фрагменты, и могут быть представлены, но не ограничиваясь этим, Fab, модифицированным Fab, Fab', модифицированным Fab', F(ab')₂, Fv, антителами с одиночным доменом (например, VH, или VL, или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентными антителами, Bis-scFv, димерами, тримерами, тетрамерами и фрагментами, связывающимися с эпитопами, любого из указанных антител (см., например, Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Способы создания и производства таких фрагментов антител широко известны в данной области техники (см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Другие фрагменты антитела, предназначенные для использования в данном изобретении, включают Fab и Fab' фрагменты, описанные в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Мультивалентные антитела могут иметь множественную специфичность или быть моноспецифичными (см., например, WO 92/22853 и WO 05/113605).

В одном варианте воплощения изобретения антитело, в соответствии с данным описанием, представлено белком слияния, связывающимся с антителом OX40, который состоит из участка иммуноглобулина, например, Fab или Fab' фрагмента, и одного или двух антител с одним доменом (dAb), связанных с ним непосредственно или косвенно, например, как это описано в WO 2009/040562.

В одном варианте воплощения белок слияния состоит из антител с двумя доменами, например, в качестве пары переменного тяжелого (VH) и переменного легкого (VL) фрагментов, которые, в некоторых случаях, могут быть соединены дисульфидной связью.

В одном варианте воплощения изобретения элемент Fab или Fab' белка слияния обладает одинаковой или подобной специфичностью в сравнении с однодоменным антителом или антителами. В одном варианте воплощения изобретения, Fab или Fab' обладает различной специфичностью относительно однодоменного антитела или антител, т.е. белок слияния является мультивалентным. В одном варианте воплощения изобретения мультивалентный белок слияния согласно данному изобретению имеет участок связывания альбумина, например пару VH/VL, что обеспечивает связывание альбумина.

Домены константного участка молекулы антитела данного изобретения, в случае их присутствия, могут отбираться в зависимости от предполагаемой функции молекулы антитела, и, в частности, от функций эффектора, в которых может быть необходимость. Например, домены константного участка могут быть представлены доменами человеческих IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В частности, могут использоваться домены константного участка IgG человека, особенно изотипы IgG1 и IgG3, если молекула антитела предназначена для использования в терапевтических целях и необходимы эффекторные функции антитела. С другой стороны, изотипы IgG2 и IgG4 могут использоваться, когда молекула антитела предназначена для лечебных целей и эффекторные функции антитела не требуются, например, просто для блокирования активности OX40. Следует иметь в виду, что также могут использоваться варианты последовательностей таких доменов константного участка. Например, могут использоваться молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 был замещен пролином, как это описано в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Специалист в данной области также поймет, что антитела могут подвергаться целому ряду посттрансляционных модификаций. Тип и степень таких модификаций часто зависят от используемой линии клеток-хозяев для экспрессии антитела, а также условий культивирования. Подобные модификации могут включать изменения, выраженные в виде гликозилирования, окисления метионина, образования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и деамидации аспарагина. Частой модификацией является потеря остатка основания с карбоксильного конца (например, лизина или аргинина) по причине действия карбоксипептидаз (как это описано в Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). В соответствии с этим С-терминальный лизин тяжелой цепи антитела, представленного на фиг. 1(f), SEQ ID NO: 15, может отсутствовать.

В одном варианте воплощения изобретения тяжелая цепь состоит из домена CH1, а легкая цепь антитела состоит из домена CL (каппа или ламбда).

В одном варианте воплощения изобретения антитело, описываемое данным изобретением, представлено антагонистическим антителом, обладающим специфичностью к человеческому OX40, при этом константный участок тяжелой цепи включает модифицированную шарнирную область. Согласно этому данное изобретение описывает антитело, в котором тяжелая цепь включает или состоит из последовательности, представленной на фиг. 1(f), SEQ ID NO: 15.

Следует иметь в виду, что в соответствии с данным изобретением переменные и/или константные домены антитела могут включать замены, вставки и/или делеции одной или нескольких аминокислот без

существенного изменения способности антитела связываться с OX40 и нейтрализовать активность OX40. Эффект замен, вставок и/или делеций любых аминокислот может с легкостью быть изучен специалистом в данной области, например, с использованием описанных здесь способов, в частности, представленных в примерах для определения связывания OX40 и блокирования взаимодействия OX40/OX40L.

В одном варианте воплощения изобретения антитело включает тяжелую цепь, в которой тяжелая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15. Согласно этому антитело включает тяжелую цепь, которая состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15.

В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела, согласно данному изобретению состоит из легкой цепи, включающей последовательность, представленную на фиг. 1(d), SEQ ID NO: 11.

В одном варианте воплощения изобретения антитело включает легкую цепь, которая состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11. Например, антитело включает легкую цепь, и такая легкая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11.

В одном варианте воплощения данное изобретение описывает антитело, в котором тяжелая цепь включает или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, а легкая цепь включает или состоит из последовательности SEQ ID NO: 11.

В одном варианте воплощения изобретения антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, при этом тяжелая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, а легкая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 60% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11. Как правило, антитело состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, при этом тяжелая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15, а легкая цепь состоит из последовательности, обладающей как минимум 70, 80, 90, 95 или 98% идентичностью или подобием с последовательностью SEQ ID NO: 11.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, придавая, таким образом, молекуле чистый положительный или отрицательный заряд. Количество общих "наблюдаемых" зарядов будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности молекулы, условий нахождения заряженных групп в трехмерной структуре и условий окружающей среды молекулы. Изоэлектрическая точка (pI) представляет собой значение pH, при котором отдельная молекула или доступная поверхность растворителя не несет чистого электрического заряда. В одном варианте воплощения изобретения антитело или фрагмент в соответствии с представленным описанием имеет значение изоэлектрической точки (pI) как минимум 7. В одном варианте воплощения изобретения антитело или фрагмент обладает значением изоэлектрической точки как минимум 8, например 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 9.

Антитело к OX40 и фрагменты этого изобретения были разработаны с тем, чтобы обладать соответствующим значением изоэлектрической точки. Это может привести к появлению антител и/или фрагментов с более робастными свойствами, в частности, подходящими профилями растворимости и/или устойчивости и/или улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном своем аспекте изобретение описывает гуманизированное антитело OX40, разработанное с целью наличия изоэлектрической точки, значение которой отличается от такого значения у оригинально выявленного антитела CA044_00026. Например, антитело может быть сконструировано путем замены аминокислотного остатка, например замены кислого аминокислотного остатка одним или несколькими основными аминокислотными остатками. С другой стороны, могут быть вставлены основные аминокислотные остатки или кислые аминокислотные остатки могут быть удалены. С другой стороны, если молекула обладает неприемлемо высоким значением pI, для понижения такого значения pI могут быть введены кислые аминокислотные остатки (в случае необходимости). Целевое значение pI сконструированного антитела или фрагмента по желанию может составлять, например, 8 или выше, например 8,5 или 9. Манипуляции со значением pI следует производить с осторожностью, чтобы сохранить желаемую активность антитела или фрагмента. Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения, сконструированное антитело или фрагмент обладает такой же самой или практически такой же самой активностью, что и "немодифицированное" антитело или фрагмент.

Для прогнозирования значения изоэлектрической точки антитела или фрагмента могут использоваться такие программы, как ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html и http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html.

Кроме того, данное изобретение предусматривает наличие специфического участка или эпитопа человеческого OX40, который связывается с антителом согласно данному изобретению, в частности с антителом, включающим последовательность тяжелой цепи gH2 (SEQ ID NO: 9) и/или последовательность

легкой цепи gL8 (SEQ ID NO: 7).

Такой специфический участок или эпитоп человеческого полипептида OX40 может быть идентифицирован с помощью любого подходящего способа картирования антигенных детерминант, известного в данной области, в сочетании с любым антителом данного изобретения. Примеры таких способов включают скрининг пептидов различной длины, полученных из OX40, для связывания антитела данного изобретения с наименьшим фрагментом, который может специфически связываться с антителом, содержащим последовательность антигенной детерминанты, распознаваемой антителом. Пептиды OX40 могут быть получены путем синтеза или протеолиза полипептида OX40. Пептиды, связывающиеся с антителом, могут быть идентифицированы, например, с помощью масс-спектрометрического анализа. Другой пример: для идентификации эпитопа, связанного антителом данного изобретения, может использоваться ЯМР-спектроскопия или рентгеновская кристаллография. Как только была проведена идентификация, фрагмент эпитопа, который связывается с антителом данного изобретения, может использоваться (в случае необходимости) в качестве иммуногена для получения дополнительных антагонистических антител, связывающихся с таким же эпитопом.

Антитела, блокирующие перекрестным образом связывание антитела данного изобретения, в частности антитела, состоящего из последовательности тяжелой цепи gH2 (SEQ ID NO: 9) и последовательности легкой цепи gL8 (SEQ ID NO: 7), могут быть подобным образом полезны в антагонизировании активности OX40. В соответствии с этим данное изобретение также описывает антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40 и блокирующее связывание любого описанного выше антитела с человеческим OX40 перекрестным образом и/или блокирующее связывание OX40 с любым из таких антител перекрестным образом. В одном способе воплощения изобретения подобное антитело связывается с таким же самым эпитопом, что и антитело, описанное выше в этом документе. В другом варианте воплощения изобретения нейтрализующее антитело, блокирующее перекрестным образом, связывается с эпитопом, который граничит и/или перекрывается с эпитопом, связанным описанным выше антителом. В другом варианте воплощения изобретения нейтрализующее антитело данного аспекта изобретения, блокирующее перекрестным образом, не связывается с одним и тем же эпитопом, что и антитело данного изобретения, или эпитопом, который граничит и/или перекрывается с указанным эпитопом.

Блокирующие перекрестным образом антитела могут быть идентифицированы с помощью любого подходящего способа, например, при использовании анализов ИФА или VIAcore, в которых связывание блокирующего перекрестным образом антитела с человеческим OX40 предотвращает связывание антитела данного изобретения или наоборот.

В одном варианте воплощения изобретения представлено антагонистическое антитело, обладающее специфичностью к человеческому OX40, при этом блокируя перекрестным образом связывание антитела, тяжелая цепь которого состоит из последовательности gH2 (SEQ ID NO: 9), а легкая цепь состоит из последовательности gL8 (SEQ ID NO: 7), с человеческим OX40. В одном варианте воплощения изобретения описанные антитела, обуславливающие перекрестное связывание, ингибируют связывание антитела, состоящего из тяжелой цепи с последовательностью gH2 (SEQ ID NO: 9) и легкой цепи с последовательностью gL8 (SEQ ID NO: 7), более чем на 80%, например более чем на 85%, более чем на 90%, в частности более чем на 95%.

С другой стороны или в дополнение к этому, антагонистические антитела данного аспекта изобретения могут быть блокированы перекрестным образом от связывания с человеческим OX40 антителом с последовательностью тяжелой цепи gH2 (SEQ ID NO: 9) и последовательностью легкой цепи gL8 (SEQ ID NO: 7). Кроме того, представлена молекула антагонистического антитела, обладающая специфичностью к человеческому OX40 и блокируемая перекрестным образом от связывания с человеческим OX40 антителом с последовательностью тяжелой цепи gH2 (SEQ ID NO: 9) и последовательностью легкой цепи gL8 (SEQ ID NO: 7). В одном варианте воплощения изобретения описанные в этом аспекте изобретения антагонистические антитела ингибированы от связывания человеческого OX40 антителом, состоящим из тяжелой цепи с последовательностью gH2 (SEQ ID NO: 9) и легкой цепи с последовательностью gL8 (SEQ ID NO: 7), более чем на 80%, например более чем на 85%, более чем на 90%, в частности более чем на 95%.

В одном варианте воплощения изобретения представленные в данном изобретении антитела, блокирующие связывание перекрестным образом, являются полностью человеческими. В одном варианте воплощения изобретения представленные антитела, блокирующие связывание перекрестным образом, являются гуманизированными. В одном варианте воплощения изобретения представленные антитела, блокирующие связывание перекрестным образом, обладают аффинностью к человеческому OX40 100 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения представленные в данном изобретении антитела, блокирующие связывание перекрестным образом, обладают аффинностью к человеческому OX40 50 пмоль или выше.

В одном варианте воплощения изобретения представленные антитела, блокирующие связывание перекрестным образом, имеют значение изоэлектрической точки как минимум 7, например как минимум 8, т.е. 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0.

Молекулы антитела данного изобретения обладают соответствующим высоким значением аффинности, в частности, выраженным в пикомолях. Аффинность может быть измерена с использованием любого подходящего и известного науке способа, включая анализ ВІАсоге, как это описано в примерах ниже, с применением выделенного естественного или рекомбинантного ОХ40 или подходящего белка слияния/полипептида. В одном примере аффинность измеряется с использованием внеклеточного домена человеческого рекомбинантного ОХ40, как это описано в примерах данной заявки на изобретение. В одном примере используемый внеклеточный домен человеческого рекомбинантного ОХ40 представлен димером, например димером слияния Fc. Соответственно, молекулы антитела данного изобретения имеют значение аффинности связывания с изолированным человеческим ОХ40 200 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения имеет значение аффинности связывания, равное 100 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения имеет значение аффинности связывания, равное 50 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения имеет значение аффинности связывания, равное 40 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения имеет значение аффинности связывания, равное 30 пмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения является полностью человеческой или гуманизированной и имеет значение аффинности связывания, равное 100 пмоль или выше.

Молекулы антитела согласно данному изобретению имеют соответствующий высокий показатель аффинности для связывания с человеческим ОХ40, экспрессируемым на поверхности активированных Т-клеток, например, в значениях наномоль или пикомоль. Аффинность может быть измерена с использованием любого соответствующего и известного науке способа, включая способ, описанный в примерах данной заявки на изобретение, с применением активированных CD4+ ОХ40+ Т-клеток человека. В частности, молекулы антитела данного изобретения имеют значение аффинности связывания с человеческим ОХ40, экспрессируемым на поверхности клеток, равное 2 нмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения молекулы антитела данного изобретения имеют значение аффинности связывания с человеческим ОХ40, экспрессируемым на поверхности клеток, равное 1,5 нмоль или выше. В другом варианте воплощения изобретения молекулы антитела данного изобретения имеют значение аффинности связывания с человеческим ОХ40, экспрессируемым на поверхности клеток, равное 1,2 нмоль или выше. В одном варианте воплощения изобретения описывается молекула полностью человеческого или гуманизированного антитела, обладающего аффинностью связывания 2 нмоль или выше с ОХ40, экспрессируемым поверхностью клеток человека.

Следует иметь в виду, что аффинность антител данного изобретения может быть изменена с использованием любого соответствующего и известного науке способа. Таким образом, данное изобретение также рассматривает варианты молекул антител данного изобретения с улучшенным показателем аффинности относительно ОХ40. Такие варианты могут быть получены с помощью целого ряда протоколов "созревания аффинности", включая мутации CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перестановки в цепи (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), применение мутационных штаммов E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), изменение последовательности ДНК (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фаговые дисплеи (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и половые ПЦР (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (см. выше) проводит обсуждение таких способов "созревания аффинности".

В одном варианте воплощения изобретения молекулы антитела данного изобретения блокируют взаимодействие между ОХ40 и ОХ40L. В примерах описаны многочисленные анализы, подходящие для определения способности антитела блокировать такое взаимодействие. В одном варианте воплощения изобретения описывается нейтрализующее антитело, обладающее специфичностью к человеческому ОХ40 и способное ингибировать связывание человеческого ОХ40L (тестировано при конечной концентрации 2 мкг/мл) с активированными CD4+ ОХ40+ Т-клетками человека на 50% при концентрации менее 5 нмоль. В одном варианте воплощения изобретения используемые в анализе человеческие ОХ40L представлены естественным человеческим ОХ40. В одном варианте воплощения изобретения используемые в анализе человеческие ОХ40 представлены рекомбинантным человеческим ОХ40. В одном варианте воплощения изобретения нейтрализующее антитело представлено гуманизированным или полностью человеческим антителом.

При необходимости, антитело для использования в данном изобретении может быть конъюгировано с одной или несколькими молекулами-эффекторами. Следует иметь в виду, что молекула-эффектор может включать одну молекулу-эффектор или две или более подобных молекул, соединенных таким образом, чтобы образовать одну общую молекулу, которая может присоединяться к антителам данного изобретения. В случае необходимости получения фрагмента антитела, присоединенного к молекуле-эффектору, это можно осуществить с помощью стандартных химических способов или способов рекомбинации ДНК, в ходе которых фрагмент антитела связывается непосредственно или посредством связующего агента с молекулой-эффектором. Способы конъюгирования таких молекул-эффекторов вместе с антителами хорошо известны в данной области техники (см. Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd

Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Отдельные химические процедуры включают, например, процедуры, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03031581. С другой стороны, если молекула-эффектор представлена белком или полипептидом, связь может быть образована с использованием процедур рекомбинации ДНК, например, как это описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Термин "молекула-эффектор" в контексте данного изобретения включает, например, противоопухолевые агенты, препараты, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другие антигены или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиойодиды, радиоизотопы, хелатообразующие металлы, наночастицы и "репортерные" группы, такие как флуоресцирующие соединения или соединения, которые могут быть определены с помощью ЯМР или спектроскопии ЭПР.

Примеры молекул-эффекторов могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любые агенты, которые действуют губительным образом на клетки (например, убивают их). Примеры включают комбрестины, доластатин, эпотилоны, стауропорины, майтансиноиды, спонгистатины, ризоксины, халихондрины, рорины, гемистерлины, таксол, цитохаласин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромин, а также их аналоги и гомологи.

Молекулы-эффекторы также включают, но не ограничиваются этим, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарабин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтин, тиоэта хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфид, дибромманнитол, стрептозоцин, митомин С и цисдихлордиамин платины(II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины), и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие молекулы-эффекторы могут включать хелирующие радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 , или препараты, такие как, но не ограничиваясь этим, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие молекулы-эффекторы включают белки, пептиды и ферменты. Интересующие ферменты включают, но не ограничиваются этим, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Интересующие белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются этим, следующие: иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, например инсулин, фактор некроза опухолей, α -интерферон, β -интерферон, ростовой фактор нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромбический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, например лимфокин, интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-2 (ИЛ-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), ростовой фактор нервов (РФН) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другие молекулы-эффекторы могут включать определяемые вещества, используемые, например, при диагностике. Примеры определяемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцирующие материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, позитрон-излучающие металлы (для использования в позитрон-эмиссионной томографии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. Ионы металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования при диагностике, представлены в общем виде в патенте США № 4741900. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцирующие материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламина флуоресцеин, дансила хлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере молекула-эффектор может увеличивать период полувыведения антитела *in vivo* и/или снижать иммуногенность антитела и/или повышать проницаемость антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих молекул-эффекторов такого типа включают полимеры, альбумин, альбумин-связывающие белки или альбумин-связывающие соединения, например, описанные в WO 05/117984.

Если молекула-эффектор представлена полимером, это может быть, как правило, синтетически полученным или естественным полимером, например полиалкиленом с замещенной в некоторых случаях

прямой или разветвленной цепью, полиалкениленом или полиоксиалкилен полимером или полисахаридом с разветвленной или неразветвленной цепью, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Специфические оптические заместители, которые могут присутствовать в указанных выше синтетических полимерах, включают одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Специфические примеры синтетических полимеров включают полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, которые в некоторых случаях могут иметь замещающие группы в прямой или разветвленной цепи, или их производные, в частности замещенный в некоторых случаях полиэтиленгликоль, например метоксиполиэтиленгликоль или его производные.

Специфические и встречающиеся в природе полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

Термин "производные" в контексте данного изобретения обозначает реакционноспособные производные, например тиол-избирательные реакционные группы, такие как малеимиды и т.п. Реакционная группа может быть прямо или косвенно (посредством линкера) присоединена к полимеру. Следует иметь в виду, что остаток такой группы в некоторых случаях образует часть продукта в качестве группы-линкера между фрагментом антитела и полимера.

Размер полимера может при желании варьировать, однако в среднем молекулярный вес варьирует от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да или от 20000 до 40000 Да. Размер полимера может выбираться, в частности, на основе предполагаемого использования продукта, например способности локализовать определенные ткани, такие как опухоли, или продлевать период полувыведения (см. обзор Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, если продукт должен покинуть кровеносное русло и проникнуть в ткань, например, для использования в лечении опухоли, предпочтительным будет использование полимера с небольшим молекулярным весом, например с молекулярным весом около 5000 Да. В случае если продукт должен остаться в кровотоке, предпочтительным будет использовать полимер с высоким молекулярным весом, например с молекулярным весом в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкилены, например полиэтиленгликоль или, в частности, метоксиполиэтиленгликоль или его производное, и, в частности, с молекулярным весом в диапазоне от примерно 15000 до примерно 40000 Да.

В одном примере антитела для использования в данном изобретении присоединены к молекулам полиэтиленгликоля (ПЭГ). В отдельном примере антитело представлено фрагментом антитела, и молекулы ПЭГ могут присоединяться посредством любой имеющейся аминокислотной боковой цепи или терминальной функциональной группы аминокислоты, расположенной на фрагменте антитела, например свободной амино-, имино-, тиоловой, гидроксильной или карбоксильной группы. Такие аминокислоты могут возникнуть естественным образом в фрагменте антитела или могут быть синтезированы в фрагмент с использованием способов рекомбинации ДНК (см., например, патенты США № 5219996; 5667425; WO 98/25971). В одном примере молекула антитела данного изобретения представлена модифицированным Fab-фрагментом, в котором модификация заключается в добавлении к С-концу тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот, что позволяет присоединить молекулу-эффектор. Подобным образом, дополнительные аминокислоты образуют модифицированный шарнирный участок, содержащий один или несколько остатков цистеина, к которым может присоединяться молекула-эффектор. Для присоединения двух или нескольких молекул ПЭГ может использоваться несколько участков.

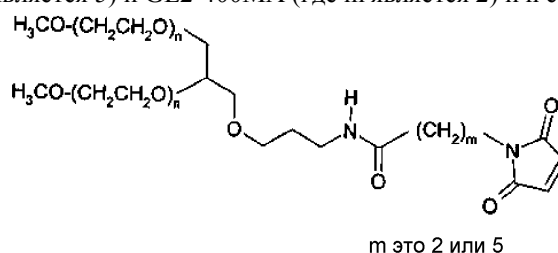
Подходящие молекулы ПЭГ присоединяются ковалентным образом посредством тиоловой группы как минимум одного остатка цистеина, расположенного в фрагменте антитела. Каждая молекула полимера, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно присоединена к атому серы остатка цистеина, который находится в фрагменте. Ковалентная связь в целом будет представлена дисульфидной связью или, в частности, связью между атомами серы и углерода. Если тиоловая группа используется в качестве участка присоединения активированных соответствующим образом молекул-эффекторов, могут использоваться, например, избирательные тиоловые соединения, такие как малеимиды и производные цистеина. В качестве исходного материала в получении полимер-модифицированных фрагментов антител, как это описано выше, может использоваться активированный полимер. Активированный полимер может быть представлен любым полимером, содержащим реакционноспособную тиоловую группу, например α -галогенкарбоновой кислотой или эфиром, например йодацетамидом, имидом, например малеимидом, винилсульфоном или дисульфидом. Такие исходные материалы могут быть получены у производителей (например, от компании Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, США) или из представленных на рынке исходных материалов с использованием общепринятых химических процедур. Отдельные молекулы ПЭГ включают 20К метокси-ПЭГ-амин (предоставленный компаниями Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere и SunBio) и M-PEG-SPA (предоставленный компанией Nektar, ранее Shearwater).

В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено модифицированным Fab или di-Fab ПЭГилированным фрагментом, т.е. фрагментом, который содержит ПЭГ (полиэтиленгликоль), ковалентно присоединенный к фрагменту, например, в соответствии со способом, описанным в EP 0948544 или EP 1090037 [см. также "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications",

1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. В одном примере ПЭГ присоединяется к цистеину в шарнирном участке. В одном примере модифицированный ПЭГ Fab фрагмент включает малеимидную группу, которая ковалентно присоединена к единственной тиоловой группе в модифицированном шарнирном участке. Остаток лизина может быть ковалентно присоединен к малеимидной группе и к каждой аминокислоте остатка лизина вместе с имеющимся полимером метокси-полиэтиленгликолем с молекулярной массой около 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к фрагменту Fab, может составлять около 40000 Да.

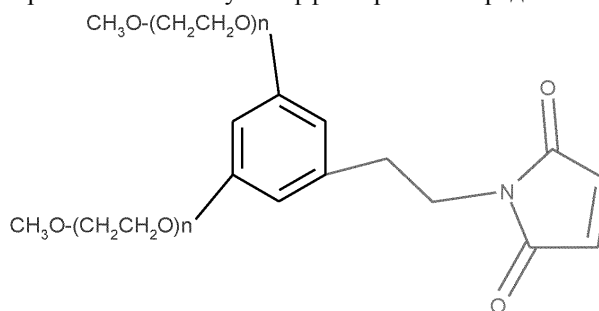
В одном варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает молекулу антагонистического антитела, обладающего специфичностью к человеческому OX40, и такое антитело представлено модифицированным Fab-фрагментом, в котором тяжелая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 9, легкая цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 7, а на С-конце тяжелой цепи находится модифицированный шарнирный участок, содержащий как минимум один остаток цистеина, к которому присоединена молекула-эффектор. Молекула-эффектор соответственно представлена ПЭГ и присоединяется с использованием способов, описанных в WO 98/25971 и WO 2004072116 или в WO 2007/003898. Молекула-эффектор присоединяется таким образом, что лизил-малеимидная группа присоединяется к остатку цистеина на С-конце тяжелой цепи, и каждая аминокислота остатка лизина ковалентно присоединяется к своему остатку метоксиполиэтиленгликоля с молекулярным весом около 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к антителу, может составлять около 40000 Да. Отдельные молекулы ПЭГ включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин N,N'-бис(метоксиполи(этиленгликоль) MW 20,000) модифицированный лизин, также известный как PEG2MAL40K (предоставляется компанией Nektar, ранее Shearwater).

Альтернативные источники линкеров ПЭГ включают компанию NOF, поставляющую GL2-400MA2 (где m в структуре ниже является 5) и GL2-400MA (где m является 2) и n составляет примерно 450



Таким образом, молекулярная масса каждого ПЭГ составляет примерно 20000 Да.

Дополнительные альтернативные молекулы-эффекторы ПЭГ представлены следующим:



и предоставляются компаниями Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном варианте воплощения изобретения описано ПЭГилированное антитело (например, с помощью описанного здесь ПЭГ), при этом ПЭГ присоединяется посредством остатка аминокислоты цистеина в положении аминокислоты 226 цепи, например аминокислоты 226 тяжелой цепи (считается по порядку).

В одном варианте воплощения изобретения данное изобретение описывает молекулу антагонистического антитела, обладающего специфичностью к человеческому OX40; такое антитело представлено модифицированным Fab-фрагментом, в котором тяжелая цепь состоит из или включает последовательность SEQ ID NO: 15, легкая цепь состоит из или включает последовательность SEQ ID NO: 11; кроме того, имеется молекула-эффектор, которая присоединяется к цистеину в положении 226 тяжелой цепи (линейная нумерация от SEQ ID NO: 15). Молекула-эффектор представлена ПЭГ и присоединяется с использованием способов, описанных в WO 98/25971 и WO 2004072116 или WO 2007/003898; лизил-малеимидная группа присоединяется к остатку цистеина в положении 226 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15), и каждая аминокислота остатка лизила ковалентно связана с остатком метоксиполиэтиленгликоля с

молекулярной массой около 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к антителу, может составлять около 40000 Да. Отдельные молекулы ПЭГ включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин N,N'-бис(метоксиполи(этиленгликоль) MW 20,000) модифицированный лизин, также известный как PEG2MAL40K (предоставляется компанией Nektar, ранее Shearwater). Молекула антитела данного изобретения представлена ПЭГилированным модифицированным Fab'-фрагментом, как это показано на фиг. 2. ПЭГилированная молекула в контексте данного изобретения указывается как A26Fab'-PEG.

В другом примере молекула-эффектор может присоединяться к фрагментам антитела с использованием способов, описанных в заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

Данное изобретение также описывает изолированные последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и/или легкие цепи(цепь) молекулы антитела данного изобретения. Последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела данного изобретения. Последовательность ДНК данного изобретения может быть представлена синтетически полученной ДНК, например, с помощью химической обработки, кДНК, геномной ДНК или любой из указанных комбинаций. Последовательности ДНК, кодирующие молекулу антитела данного изобретения, могут быть получены с использованием широко известных науке способов. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или полные тяжелые или легкие цепи антитела, могут быть синтезированы, при желании, из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующие последовательности каркасных участков акцептора, широко известны специалистам в данной области и могут быть с легкостью синтезированы на основе известных аминокислотных последовательностей.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела данного изобретения, могут использоваться стандартные способы молекулярной биологии. Необходимые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием способов синтеза олигонуклеотидов. Также могут использоваться сайт-специфический мутагенез и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Примеры подходящих последовательностей представлены на фиг. 1(h) SEQ ID NO: 8; фиг. 1(i) SEQ ID NO: 10; фиг. 1(j) SEQ ID NO: 13; фиг. 1(k) SEQ ID NO: 14; фиг. 1(l) SEQ ID NO: 17 и фиг. 1(m) SEQ ID NO: 18. Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO: 18 и 1-63 в SEQ ID NO: 14 кодируют последовательность сигнального пептида OmpA, который расщепляется с получением молекулы антагонистического антитела данного изобретения (сигнальный пептид соответствует остаткам аминокислот 1-21 на фиг. 1(g) SEQ ID NO: 16 и 1-21 на фиг. 1(e) SEQ ID NO: 12 соответственно). Данное изобретение также описывает изолированные последовательности ДНК, кодирующие тяжелую цепь антитела данного изобретения, включающие SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18. Данное изобретение также описывает изолированные последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь антитела данного изобретения, включающие SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

Данное изобретение также описывает вектор клонирования или вектор экспрессии, включающие одну или несколько последовательностей ДНК данного изобретения. В соответствии с этим представлены вектор клонирования или вектор экспрессии, включающие одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих антитело данного изобретения. Вектор клонирования или вектор экспрессии состоит из двух последовательностей ДНК, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела данного изобретения соответственно. Таким образом, в соответствии с данным изобретением вектор включает последовательности SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18. Нуклеотиды 1-63 в SEQ ID NO: 18 и 1-63 в SEQ ID NO: 14 кодируют последовательность сигнального пептида OmpA (остатки 1-21 в SEQ ID NO: 16 и 1-21 в SEQ ID NO: 12 соответственно), который может расщепляться с образованием молекулы нейтрализующего антитела данного изобретения. В одном примере вектор включает межгенную последовательность между тяжелой и легкой цепями, например IGS2 (см. WO 03/048208). В соответствии с этим в одном варианте воплощения изобретения вектор включает последовательность, представленную на фиг. 1(n) (SEQ ID NO: 19).

Общие способы конструирования векторов, способы трансфекции и культивирования широко известны специалисту в данной области. В этом отношении см. "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

Кроме того, описывается также клетка-хозяин, включающая один или несколько векторов клонирования или экспрессии, которые, в свою очередь, состоят из одной или нескольких последовательностей ДНК, кодирующих антитело данного изобретения. Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела данного изобретения, может использоваться любая подходящая система клетка-хозяин/вектор. Могут использоваться бактериальные, например, E. coli, и другие системы микроорганизмов или эукариотические системы экспрессии в клетках-хозяевах (например, млекопитающих). Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки миеломы или гибридомы.

Данное изобретение также описывает процесс производства молекулы антитела в соответствии с

данным изобретением, и такой процесс включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор данного изобретения, в условиях, подходящих для проведения экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела данного изобретения с ее последующей изоляцией.

Молекула антитела может состоять только из полипептида легкой или тяжелой цепи; в таком случае для трансфекции клеток-хозяев может использоваться кодирующая последовательность только для легкой или тяжелой цепи. Для производства продукции, включающей как тяжелую, так и легкую цепи, линия клеток может быть трансфицирована двумя векторами: первый вектор кодирует полипептид легкой цепи, а второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. С другой стороны, может использоваться один вектор, который включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой и тяжелой цепей.

Антитела данного изобретения и их фрагменты экспрессируются в клетках-хозяевах на достаточно высоком уровне. Таким образом, оптимизированы свойства антител и/или фрагментов, подходящих для коммерческого производства.

Поскольку антитела данного изобретения полезны в лечении и/или профилактике патологического состояния, данное изобретение также описывает фармацевтическую или диагностическую композицию, включающую молекулу антитела данного изобретения в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, растворителем или носителем. В соответствии с этим антитело изобретения используется для производства медикамента. Композиция будет поставляться, как правило, в качестве части стерильной фармацевтической композиции, которая будет обычно включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция данного изобретения может дополнительно включать фармацевтически приемлемый адъювант.

Данное изобретение также описывает процесс производства фармацевтической или диагностической композиции, который включает добавление и смешивание молекулы антитела данного изобретения с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, растворителем или носителем.

Молекула антитела может выступать в качестве единственного активного действующего вещества или диагностической композиции или может сопровождаться другими активными действующими веществами, включая другие компоненты антитела, например антитело к ФНО, антитело к ИЛ-1 β , антитело к Т-клеткам, антитело к ИФН- γ или антитело к ЛПС, или ингредиенты, не являющиеся антителами, например ксантины. Другие подходящие активные действующие вещества включают антитела, способные индуцировать переносимость, например антитела к CD3 или к CD4.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело, фрагмент или композиция, соответствующие описанию, включены в комбинацию с дополнительным фармацевтически активным агентом, например кортикостероидом (таким как флутиказона пропионат), и/или β -2-агонистом (таким как сальбутамол, сальметерол или формотерол), или ингибиторами клеточного роста и пролиферации (такими как рапамицин, циклофосфамид, метотрексат), или, в другом случае, ингибитором CD28 и/или CD40. В одном варианте воплощения изобретения ингибитор является небольшой молекулой. В другом варианте воплощения изобретения ингибитор представлен антителом, специфичным относительно мишени.

Фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество антитела изобретения. Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте данного изобретения относится к количеству терапевтического агента, необходимого для лечения, ослабления или предотвращения указанного заболевания или состояния, или для оказания определяемого лечебного или превентивного эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может быть оценено первоначально с помощью анализов клеточных культур или на животных моделях, обычно на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Животная модель также может использоваться для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Подобная информация может использоваться для определения полезных доз и путей введения у человека.

Точное терапевтически эффективное количество для человека будет зависеть от степени тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента, возраста, веса и пола, диеты, времени и частоты введения, комбинации(й) препаратов, реакции чувствительности и переносимости/ответа на лечение. Такое количество может быть определено с помощью стандартных способов и устанавливается на усмотрение доктора. Как правило, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 до 50 мг/кг, например от 0,1 до 20 мг/кг. Фармацевтические композиции для удобства будут представлены в единицах лекарственной формы, содержащей предопределенное количество активного действующего вещества изобретения на дозу.

Композиции могут вводиться пациенту отдельным образом или могут вводиться в сочетании (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими агентами, препаратами или гормонами.

Доза, вводимая пациенту и содержащая молекулу антитела данного изобретения, зависит от природы состояния, подвергнутого лечению, степени присутствующего воспаления и способа использования молекулы антитела (для профилактики или лечения существующего состояния).

Частота дозы будет зависеть от времени полужизни молекулы антитела и длительности его эффек-

та. Если молекула антитела имеет короткий период полувыведения (например, 2-10 ч), может стать необходимым получение одной или нескольких доз в сутки. С другой стороны, если молекула антитела имеет длительный период полувыведения (например, 2-15 дней), доза может приниматься один раз в день, один раз в неделю или даже один раз в месяц или каждые 2 месяца.

Фармацевтически приемлемый носитель сам по себе не должен индуцировать выработку антител, действующих губительным образом на пациента, принимающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящие носители могут быть представлены большими, подвергающимися медленному метаболизму макромолекулами, такими как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы.

Могут использоваться 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 такие жидкости, как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты или эмульгаторы, или буферные вещества для установления pH. Такие носители позволяют представлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для проглатывания пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, пригодные для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Если продукт должен быть введен путем инъекции или инфузии, он может быть представлен в форме суспензии, раствора или эмульсии с масляным или водным носителем и может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие агенты, консерванты, стабилизаторы и/или диспергирующие агенты. С другой стороны, молекула антитела может быть представлена в сухой форме для восстановления перед использованием с соответствующей стерильной жидкостью.

После приготовления композиции изобретения могут быть введены непосредственно пациенту. Подвергнутые лечению пациенты могут быть представлены животными. Однако в одном или нескольких вариантах воплощения изобретения композиции адаптированы для введения человеку.

Согласно данному описанию, pH конечной лекарственной формы отличается от значения изоэлектрической точки антитела или фрагмента, например, если pH лекарственной формы составляет 7, значение pI составляет 8-9 или выше. Не желая проводить связь с теорией, считается, что в конечном итоге это должно предоставить конечной лекарственной форме повышенные показатели устойчивости, например сохранение антитела или его фрагмента в растворе.

В одном варианте воплощения изобретения фармацевтическая лекарственная форма со значением pH в диапазоне 4,0-7,0 состоит из: антитела 1-200 мг/мл в соответствии с данным описанием, буфера 1-100 ммоль, сурфактанта 0,001-1%, а) стабилизатора 10-500 ммоль; б) стабилизатора 10-500 ммоль и вещества, регулирующего тоничность, 5-500 ммоль; или в) вещества, регулирующего тоничность, 5-500 ммоль.

Например, лекарственная форма со значением pH 6 может включать 1-50 мг/мл антитела, 20 ммоль L-гистидина HCl, 240 ммоль трегалозы и 0,02% полисорбата 20. С другой стороны, лекарственная форма со значением pH приблизительно 5,5 может включать 1-50 мг/мл антитела, 20 ммоль цитратного буфера, 240 ммоль сахарозы, 20 ммоль аргинина и 0,02% полисорбата 20.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут вводиться путем целого ряда способов, включая, но не ограничиваясь этим, следующие: пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, чрескожный (см., например, WO 98/20734), подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный. Для введения фармацевтических композиций изобретения могут также использоваться безыгольные шприцы. Как правило, терапевтические композиции могут быть представлены в виде инъеклируемых препаратов: жидких растворов или суспензий. Также могут быть представлены твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидком носителе перед введением.

Непосредственная доставка композиций будет сопровождаться, как правило, введением (подкожным, интраперитонеальным, внутривенным или внутримышечным) или доставкой в интерстициальное пространство ткани. Кроме того, композиции могут вводиться внутрь очага повреждения. Лечение дозами может включать график введения однократной дозы или график введения множественной дозы.

Следует иметь в виду, что активное действующее вещество в композиции будет представлено молекулой антитела. Таким образом, оно будет восприимчиво к распаду в желудочно-кишечном тракте. Следовательно, если композиция должна вводиться через желудочно-кишечный тракт, она должна содержать агенты, защищающие антитело от распада и позволяющие выводить антитело после поглощения из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей представлено в Remington's Phar-

maceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном варианте воплощения изобретения лекарственная форма представлена лекарственной формой для местного применения, включая ингаляции.

Подходящие ингалируемые композиции включают ингалируемые порошки, дозированные аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или ингалируемые растворы, не содержащие газы-пропелленты. В соответствии с данным описанием ингалируемые порошки содержат активное действующее вещество и могут состоять исключительно из указанных выше активных действующих веществ или смеси указанных выше активных действующих веществ с физиологически приемлемым вспомогательным средством.

Такие ингалируемые порошки могут включать моносахариды (например, глюкозы или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбитол, маннитол, ксилитол), соли (например, натрия хлорид, кальция карбонат) или смеси указанных веществ. В большинстве своем используются моно- и дисахариды, при этом лактоза или глюкоза используются в большинстве своем в виде гидратов.

Частицы для депонирования в легких должны иметь размер менее 10 мкм, например 1-9 мкм, т.е. 0,1-5 мкм, в частности 1-5 мкм. Размер частиц активного действующего вещества (например, антитела или фрагмента) играет важную роль.

Газы-пропелленты, которые могут использоваться для приготовления ингалируемых аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбираются из ряда углеводородов, таких как n-пропан, n-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как содержащие хлор и/или фтор производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Указанные выше газы-пропелленты могут использоваться самостоятельно или в смеси.

Отдельные подходящие газы-пропелленты представлены галогенизированными производными алканов, выбранных среди TG 11, TG 12, TG 134a и TG 227. Из указанных выше галогенизированных углеводородов особенно подходят TG 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG 227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Содержащие газы-пропелленты ингалируемые аэрозоли могут также содержать и другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (сурфактанты), антиоксиданты, лубриканты и средства для корректировки pH. Все эти ингредиенты известны в данной области техники.

Содержащие газы-пропелленты ингалируемые аэрозоли в рамках данного изобретения могут содержать до 5 вес.% активного действующего вещества. Аэрозоли данного изобретения содержат, например, 0,002-5, 0,01-3, 0,015-2, 0,1-2, 0,5-2 или 0,5-1 вес.% активного действующего вещества.

С другой стороны, способ местного применения в легкие также может осуществляться путем введения жидкого раствора или суспензии, например, с использованием такого устройства, как небулайзер, например небулайзер, присоединенный к компрессору (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), присоединенный к компрессору Pari Master(R), произведенному Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va).

Антитело данного изобретения может быть доставлено диспергированным в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Оно может быть суспендировано в подходящем физиологическом растворе, например растворе хлорида натрия или другом фармакологически приемлемом растворителе или забуференном растворе. Известные науке забуференные растворы могут содержать 0,05-0,15 мг ди-натрия эдетата, 8,0-9,0 мг NaCl, 0,15-0,25 мг полисорбата, 0,25-0,30 мг кислоты лимонной безводной, 0,45-0,55 мг натрия цитрата на 1 мл воды, таким образом, значение pH будет составлять 4,0-5,0. Суспензия может включать, например, лиофилизированное антитело.

Терапевтические суспензии или растворы могут также содержать один или несколько вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества 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, натрия хлорид, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биологически разлагаемые микросферы. Лекарственная форма в большинстве своем будет поставляться в практически стерильном виде и производиться в ходе стерильного производственного процесса.

Такой процесс может включать производство и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого в лекарственной форме, асептической суспензии антитела в стерильном забуференном растворе/растворителе, и диспергирование лекарственной формы в стерильные резервуары с использованием известных специалисту в данной области способов.

Лекарственные формы данного изобретения в виде небулайзеров могут быть представлены, например, в виде единиц с однократной дозой (например, герметически запакованные пластиковые контейнеры или ампулы), упакованных в оболочку из фольги. Каждая ампула содержит единицу дозы в объеме, например, 2 мл забуференного растворителя/раствора.

Описанные здесь антитела могут подходить для доставки путем небулизации.

Также предусматривается, что антитело данного изобретения может вводиться путем использова-

ния генной терапии. Для достижения этого пациенту вводятся последовательности ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи молекулы антитела под контролем соответствующих ДНК компонентов, таким образом, цепи антитела экспрессируются ДНК последовательностями и собираются *in situ*.

Данное изобретение также описывает молекулу антитела (или содержащие ее композиции), которая может использоваться для контроля воспалительных заболеваний, например, острого или хронического воспалительного заболевания. Молекула антитела (или содержащие ее композиции) может использоваться для снижения воспалительного процесса или предотвращения воспалительного процесса. В одном варианте воплощения изобретения описано *in vivo* снижение активированных Т-клеток, в частности Т-клеток, задействованных в несоответствующих воспалительных иммунных ответах, например, находящихся поблизости/в месте возникновения такого ответа.

Снижение активированных Т-клеток, для использования в этом документе может быть представлено снижением на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более процентов в сравнении с показателем до лечения или без лечения. Преимущество состоит в том, что лечение антителом, фрагментом или композицией в соответствии с данным изобретением может снизить уровень активированных Т-клеток без снижения общего числа Т-клеток пациента (неактивированных Т-клеток). Это может привести к меньшему количеству побочных эффектов и, возможно, предотвратить снижение числа Т-клеток у пациента.

Данное изобретение также описывает молекулу антитела для использования в лечении или профилактике патологического расстройства, обусловленного ОХ40 или вызванного повышением уровня ОХ40. Патологическое состояние может быть выбрано, например, из группы, включающей следующее: инфекции (вирусные, бактериальные, грибковые или паразитические), эндотоксический шок, вызванный инфекцией, артрит, ревматоидный артрит, астма, ХОБЛ, воспалительное заболевание таза, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание толстого кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, целиакия, заболевание желчного пузыря, пилонидальное заболевание, перитонит, псориаз, васкулит, хирургические спайки, инсульт, сахарный диабет 1 типа, болезнь Лайма, артрит, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, иммунно-опосредованное воспалительное заболевание центральной и периферической нервной системы, такое как множественный склероз, волчанка (например, системная красная волчанка) и синдром Гийена-Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, болезнь Грейва, нефропатия IgA, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Меньера, пузырчатка, первичный цирроз желчных протоков, саркоидоз, склеродермия, некротический неинфекционный гранулематоз, другие аутоиммунные расстройства, панкреатит, травма (хирургическая операция), заболевание трансплантат против хозяина, отторжение трансплантата, заболевание сердца, включая ишемическую болезнь, например инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистая коагуляция, резорбция кости, остеопороз, остеоартрит, периодонтит и гипохлоргидрия.

В одном варианте воплощения изобретения антитело изобретения задействовано в лечении аллергии, ХОБЛ, аутоиммунного заболевания или ревматоидного артрита.

Данное изобретение также описывает молекулу антитела для использования в лечении или профилактике боли, в частности боли, вызванной воспалением.

Данное изобретение в дальнейшем описывает использование молекулы антитела, фрагмента или композиции в производстве медикамента для лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного ОХ40 или вызванного повышением уровня ОХ40, в частности патологического расстройства при ревматоидном артрите, астме или ХОБЛ.

Данное изобретение в дальнейшем описывает использование молекулы антитела, фрагмента или композиции в производстве медикамента для лечения или профилактики одного или нескольких описанных здесь медицинских показаний.

Молекула антитела, фрагмент или композиция данного изобретения могут использоваться в любом лечении для снижения эффектов ОХ40 в организме человека или животных. ОХ40 может циркулировать в организме или присутствовать в нежелательно высоком количестве, локализованном в отдельной части организма, например в месте воспаления.

В одном варианте воплощения изобретения молекула антитела данного изобретения или композиция, содержащая такое антитело, используется для контроля воспалительного заболевания, например, описанного выше.

Данное изобретение также описывает способ лечения человека или животных, страдающих от или находящихся при риске возникновения расстройства, опосредованного ОХ40, способ лечения, включающий введение пациенту эффективного количества молекулы антитела данного изобретения или композиции, содержащей такое антитело.

В одном варианте воплощения изобретения описывается процесс очистки антитела (в частности, антитела или фрагмента в соответствии с изобретением), включающий следующие этапы: проведение анионообменной хроматографии несвязывающим образом так, что примеси остаются в колонке, а антитело элюируется.

Подходящие ионообменные смолы для использования в процессе включают смолу Q.FF (поставляется компанией GE-Healthcare). Этот этап, например, может проводиться при уровне pH примерно 8.

Процесс в дальнейшем может включать этап первичного связывания с использованием катионо-

менной хроматографии, выполняемой, например, при pH от 4 до 5, например 4,5. Катионообменная хроматография может выполняться, например, с использованием такой смолы, как CaptoS или сефарозы SP FF (поставляется GE-Healthcare). Антитело или фрагмент может быть элюирован из смолы с использованием раствора ионной соли, например натрия хлорида, например, в концентрации 200 ммоль.

Таким образом, этап хроматографии может включать один или несколько этапов промывания (при необходимости).

Процесс очистки может также состоять из одного или нескольких этапов фильтрации, например этапа диафильтрации.

При рI выше 8, например 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 9,0 фрагмента или антитела, считается, что необходимо провести очистку антитела или фрагмента для обеспечения "отсутствия" или "практического отсутствия" примесей, таких как эндотоксин, ДНК и белки клеток-хозяев.

Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения описано очищенное антитело к ОХ40 или его фрагмент, например гуманизированное антитело или его фрагмент, в частности антитело или фрагмент данного изобретения, которые были существенно образом очищены, в частности практически или существенно очищены от содержания эндотоксина и/или белка клетки-хозяина или ДНК.

Очищенная форма (см. выше) должна иметь чистоту как минимум 90%, т.е. 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% в/в или больше.

Практически полное отсутствие эндотоксина обычно обозначает содержание эндотоксина 1 ЕЭ на 1 мг продукта антитела или менее, т.е. 0,5 или 0,1 ЕЭ на 1 мг продукта.

Практически полное отсутствие белка или ДНК клеток-хозяев обычно обозначает содержание белка и/или ДНК клеток-хозяев, равное 400 мкг на 1 мг продукта антитела или менее, т.е. 100 мкг на 1 мг или менее, в частности 20 мкг на 1 мг.

Молекула антитела данного изобретения также может использоваться в диагностике, например в *in vivo* диагностике и визуализации состояний заболевания, включая ОХ40.

"Состоящий из" в контексте данной спецификации означает "включающий".

Где это технически оправдано, варианты воплощения изобретения могут быть скомбинированы.

Описанные здесь варианты воплощения изобретения содержат определенные характеристики/элементы. Описание также распространяется на отдельные варианты воплощения изобретения, состоящие в большинстве своем из указанных характеристик/элементов.

Данное изобретение в дальнейшем описывается только в виде иллюстративных примеров, которые относятся к сопровождающим описание фигурам.

Примеры

Описание фигуры 1:

- a) участок V легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 7),
- b) участок V тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 9),
- 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), CDRL3 (SEQ ID NO: 6) антитела A26 и CDRH2 (SEQ ID NO: 20) и CDRL1 (SEQ ID NO: 21) антитела CA044_00026,
- d) легкая цепь антитела A26 (SEQ ID NO: 11),
- e) легкая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (подчеркнуто) (SEQ ID NO: 12),
- f) тяжелая цепь антитела A26 (SEQ ID NO: 15),
- g) тяжелая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (подчеркнуто) (SEQ ID NO: 16),
- h) ДНК, кодирующая переменный участок легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 8),
- i) ДНК, кодирующая переменный участок тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO: 10),
- j) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26 (SEQ ID NO: 13),
- k) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 14),
- l) ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26 (SEQ ID NO: 17),
- m) ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO: 18),
- n) ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела A26, включая сигнальные последовательности и межгенную последовательность IGS2 (SEQ ID NO: 19).

Манипуляции с ДНК и общие способы.

Штамм *E. coli* INVαF' (Invitrogen) использовался для трансформации и стандартного культивирования. Рестриктазы и модификационные ферменты для ДНК были предоставлены Roche Diagnostics Ltd. и New England Biolabs. Приготовление плазмид проводилось с использованием наборов очистки Maxi Plasmid (QIAGEN, номер по каталогу 12165). Реакции секвенирования ДНК проводились с использованием набора терминации секвенирования ABI Prism Big Dye (номер по каталогу 4304149) и были запущены на автоматическом секвенсере ABI 3100 (Applied Biosystems). Данные были проанализированы с использованием программы AutoAssembler (Applied Biosystems). Олигонуклеотиды были предоставлены

компанией Invitrogen. Гены, кодирующие первичные последовательности переменного участка, были разработаны и сконструированы путем автоматического синтеза Entelechon GmbH, а затем модифицированы для получения привитых версий путем направленного мутагенеза олигонуклеотидов. Концентрация Fab' определялась с использованием набора ИФА для Fab'.

Пример 1. Производство и гуманизирование нейтрализующего антитела A26 к OX40.

Самки крыс линии Sprague Dawley были иммунизированы рекомбинантным белком слияния человеческого OX40 и mFc. Антитело CA044_00026, которое связывает человеческий OX40, было изолировано с использованием способов, описанных в WO 92/02551. Гены для переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) антитела CA044_00026 были изолированы и секвенированы с последующим клонированием посредством ПЦР с обратной транскрипцией.

С использованием каркасных акцепторных участков переменного домена человека и путем варьирования числа остатков-доноров в каркасных участках была разработана серия гуманизированных VL и VH участков. Было разработано два привитых VH участка (gH1 и 2) и 8 привитых VL участков (-gL18), а гены были получены путем сборки олигонуклеотида и мутагенеза ПЦР.

Фрагменты Fab' антитела были сконструированы для каждого привитого участка с использованием генов, кодирующих гуманизированные переменные домены, субклонированные в вектор экспрессии pTTOD E. coli, содержащий ДНК, кодирующую тяжелую цепь C γ 1 человеческого домена CH1 (аллотип G1m17) и легкую к-цепь константного домена человека (аллотип K1m3) (как это было описано ранее в WO 03/048208). Шарнирный участок подвергается усечению и модификации, которая состоит в изменении последовательности с цис-про-про-цис на цис-ала-ала, с получением шарнирного участка с одним остатком цистеина, доступного для сайт-специфического присоединения молекулы ПЭГ (см. пример 2).

Последовательности, кодирующие сигнальный пептид OmpA, были присоединены к 5'-концу генов, кодирующих как тяжелые, так и легкие цепи. В ходе экспрессии сигнальные последовательности нацелены на транспорт каждого полипептида в периплазму бактерий. После транслокации посредством клеточной мембраны сигнальная последовательность расщепляется с образованием зрелых Fab' легких и тяжелых цепей.

Вектор pTTOD, содержащий каждый привитый участок, был трансформирован в штамм-хозяин E.coli K12 W3110, и фрагменты Fab' антитела продуцировались E.coli с использованием стандартных способов культивирования при высокой плотности клеток. Антитела были очищены с использованием катионообменной, а затем и анионообменной хроматографии с использованием стандартных способов (Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320).

Различные полученные Fab'-фрагменты были тестированы на предмет связывания и блокирования, как это было описано выше, и каждый фрагмент был подвергнут оценке на предмет своей экспрессии в E.coli, активности относительно родительского антитела и пригодности для очистки и последующей обработки. Это приводит к отбору привитого участка gL8gH2, названного A26. Последовательности V-участка такого привитого фрагмента представлены на фиг. 1(a) и (b) и в SEQ ID NO: 7 и 9 для легкой цепи (gL2) и тяжелой цепи (gH2) соответственно.

Акцепторный каркасный участок тяжелой цепи представлен последовательностью VH3 1-3 3-07 зародышевой линии человека с каркасным участком 4, полученным из данного JH участка зародышевой линии человека JH4. Акцепторный каркасный участок легкой цепи представлен последовательностью VK1 2-1 1-02 зародышевой линии человека с каркасным участком 4, полученным из данного JK участка зародышевой линии человека JK4. Аминокислотные остатки в положении 37, 73, 78 и 94 (согласно нумерации Kabat) в тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 являются донорскими остатками (от родительского антитела) и играют важную роль в сохранении полной активности. Остаток 64 в CDRH2 был конвертирован с донорского глутамата на акцепторный лизин (E64K) для создания молекулы с более высоким значением pI, которое более благоприятно для ион-обменной очистки. Аминокислотные остатки в положении 64 и 71 (согласно нумерации Kabat) в легкой цепи SEQ ID NO: 7 являются донорскими остатками и играют важную роль в сохранении полной активности. Остатки 27 и 28 в CDR-L1 были преобразованы с донорского глутамата и аспартата на акцепторный глутамин (E27Q) и серин (D28S) для создания молекулы с более высоким значением pI, которое наиболее подходит для ион-обменной очистки.

CDR такого антитела представлены на фиг. 1(c), так как и оригинальные CDRH2 (SEQ ID NO: 20) и CDRL1 (SEQ ID NO: 21), которые остались неизменными. Легкие и тяжелые цепи с полной длиной представлены на фиг. 1(d) и (f) соответственно.

Гены gL8 и gH2 были реконструированы на уровне ДНК с целью включения кодонов для переменных и константных участков, оптимизированных для экспрессии в E.coli и экспрессии в векторе pTTOD(Fab'), как это описано выше. Последовательности ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи, представлены на фиг. 1(k), SEQ ID NO: 14 и (m) SEQ ID NO: 18 соответственно.

Белковая последовательность такого Fab' (включая константные участки) представлена в SEQ ID NO: 11 и 12 (легкая цепь с/без сигнального пептида OmpA) и SEQ ID NOS: 15 и 16 (тяжелая цепь с/без сигнального пептида OmpA). Двухцистронный вектор экспрессии pTTOD (A26 IGS2) включает последовательность, представленную на фиг. 1(n) и SEQ ID NO: 19. Последовательность содержит межгенную

последовательность, IGS2, между генами легкой и тяжелой цепи (см. WO 03/048208) и лидерную последовательность OmpA в начале генов как легкой, так и тяжелой цепей.

Пример 2. Получение A26Fab'-PEG.

Фрагмент Fab' A26, полученный с помощью E.coli и очищенный в соответствии с описанием, представленным в примере 1, был ПЭГилирован в соответствии со способами, описанными в WO 2007/003898.

ПЭГ был присоединен к шарнирному цистеину в положении 226 (линейная нумерация) тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15) таким образом, что лизил-малеимидная группа была присоединена к остатку цистеина в положении 226 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15), и каждая аминокислотная группа остатка лизила была ковалентно присоединена к остатку метоксиполиэтиленгликоля с молекулярной массой около 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к антителу, составила около 40000 Да, как это представлено на фиг. 2.

Пример 3. Оценка аффинности A26 и A26Fab'-PEG для OX40.

Технология BIAcore позволяет контролировать связывание между биомолекулами в режиме реального времени без необходимости в мечении. Один из участников взаимодействия, называемый лигандом, иммобилизован непосредственным образом или зафиксирован на иммобилизированной поверхности, в то время как другой участник, называемый аналитом, перемещается в растворе мимо иммобилизированной поверхности. Сенсор определяет изменение массы на своей поверхности, т.к. аналит связывается с лигандом с образованием комплекса на поверхности. Это соответствует процессу ассоциации. Диссоциация аналита от лиганда контролируется при замещении аналита буфером. В ходе анализа аффинности BIAcore лиганд представлен антителом, подвергаемым тестированию, а аналит представлен человеческим OX40.

Инструмент: Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Швеция.

Сенсорный чип: CM5 (класс для исследования). Номер по каталогу: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Швеция. Чипы хранились при температуре 4°C.

Набор для связывания амина: номер по каталогу: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Швеция.

Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC). Разводится до концентрации 75 мг/мл дистиллированной водой и хранится в виде аликвот по 200 мкл при температуре -70°C.

N-гидроксисукцинимид (NHS). Разводится до концентрации 11,5 мг/мл дистиллированной водой и хранится в виде аликвот по 200 мкл при температуре -70°C.

1М этаноламина гидрохлорид-NaOH pH 8,5. Хранится в виде аликвот 200 мкл при температуре -70°C.

Буферы: подвижный буфер: HBS-EP (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 ммоль ЭДТА, 0,005% сурфактант P20). Номер по каталогу: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Швеция. Буфер хранился при температуре 4°C.

Буфер для иммобилизации: ацетат 5,0 (10 ммоль натрия ацетат pH 5,0). Номер по каталогу: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Швеция. Буфер хранился при температуре 4°C.

Фиксация лиганда: Affinipure F(ab')₂ фрагмент козляного IgG к антителу человека, F(ab')₂ специфический фрагмент. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA) Номер по каталогу: 109-006-097. Реагент хранился при температуре 4°C.

Лиганд: антитела A26 и A26Fab'-PEG, хранились при температуре 4°C.

Аналит: внеклеточный домен человеческого OX40 (185 aa), слитый с мышиным IgG2a Fc (232 aa) (0,5 мг/мл, Ancell № 513-020, партия 142805), хранился при температуре 4°C.

Раствор для регенерации: 40 ммоль HCl было приготовлено путем разведения дистиллированной водой 11,6М маточного раствора (BDH, Poole, Англия. Номер по каталогу: 101254H).

5 ммоль NaOH было приготовлено путем разведения дистиллированной водой 50 ммоль маточного раствора. Номер по каталогу: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Швеция.

Способ анализа: формат анализа заключался в захвате антитела иммобилизованным антителом к человеческому F(ab')₂ с последующей титрацией на внеклеточном домене человеческого OX40 на захваченной поверхности.

Пример процедуры приводится ниже.

BIA (биомолекулярный анализ взаимодействия) проводился с использованием BIAcore 3000 (Biacore AB). Фрагмент Affinipure F(ab')₂ антитела козы к человеческому IgG, F(ab')₂ специфический фрагмент (Jackson ImmunoResearch) был иммобилизован на сенсорном чипе CM5 посредством реакции аминного связывания на уровне захвата ≈4000 единиц ответа (ЕО). Использовался буфер HBS-EP (10 ммоль HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 ммоль ЭДТА, 0,005% сурфактант P20, Biacore AB) при скорости подвижного буфера 10 мкл/мин. Для захвата иммобилизованным антителом к IgG-F(ab')₂ человека использовалось введение 10 мкл Fab' при концентрации 0,5 мкг/мл или Fab'-PEG при концентрации 50 мкг/мл. Человеческий OX40 был титрован вместе с захваченным антителом при различных концентрациях (от 25 до 0,78 нмоль) и скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность была восстановлена введением 10 мкл 40 ммоль HCl с последующим введением 5 мкл 5 ммоль NaOH при скорости потока 10 мкл/мин.

Кривые связывания за вычетом исходных параметров были анализированы с использованием программного обеспечения BIAevaluation (версия 3.2) с соблюдением стандартных процедур. Кинетические параметры определялись с помощью алгоритма аппроксимации.

Значение аффинности определялось для A26 и находилось в диапазоне 19-45,4 пмоль; для A26Fab'-PEG такое значение составляло 13,7-50,3 пмоль.

В таблице ниже приводятся данные для неПЭГилированного гуманизированного фрагмента Fab A26 (fab*) и A26 Fab'-PEG Fab фрагмента (Fab-PEG**), связывающихся с человеческим OX40.

Таблица 1

Образец	ka(1/мс)	Kd(1/с)	KD(M)	KD(pM)
Fab*	4,86 ± 1,6 E+05	1,29 ± 0,07 E-05	2,96E-11	29,6
Fab-PEG**	4,76 ± 2,1 E+05	1,30 ± 0,46 E-05	3,13E-11	31,3

* среднее для 5 определенных значений,

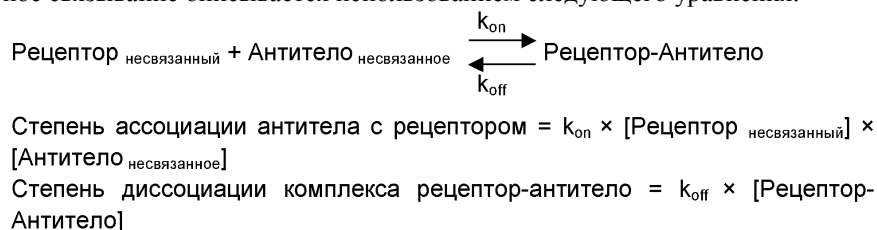
** среднее для 4 определенных значений.

Пример 3а. Клеточно-опосредованная аффинность и способность блокирования лигандом A26Fab'-PEG.

Клеточно-опосредованная аффинность.

Для определения аффинности A26 Fab'-PEG для ангитена, экспрессированного клеточной поверхностью, проводились эксперименты насыщения связывания с использованием активированных CD4+ OX40+ Т-клеток и меченых флуоресцеином антител. Специфическое связывание антитела с рецептором at equilibrium при диапазоне концентраций лиганда использовалось для определения K_D при условии, что с рецептором связывалась лишь небольшая фракция антитела в любой точке кривой связывания.

Равновесное связывание описывается использованием следующего уравнения:



В равновесном состоянии скорость ассоциации и диссоциации равны, и может быть выведено уравнение, описывающее изотерму связывания; на полулогарифмическом графике связывание имеет сигмоидальную форму.

Значение K_D получают путем деления k_{off} на k_{on} , и оно может быть рассчитано на основе кривой связывания, т.к. возникает концентрация с полумаксимальным значением связывания.

Связывание меченого флуоресцеином антитела A26 Fab'-PEG с активированными CD4+ OX40+ Т-клетками человека было измерено путем потоковой цитометрии в 4-логарифмическом диапазоне концентраций. Кривая репрезентативного связывания для A26 Fab'-PEG представлена на фиг. 3. Значения K_D , полученные для активированных клеток трех разных доноров, составили 1,193 нмоль, 1,071 нмоль и 1,055 нмоль.

Значение клеточно-опосредованного K_D для A26 Fab'-PEG (среднее 1,106 нмоль) значительно меньше, чем показатель связывания с рекомбинантным OX40, измеренным с помощью BIAcore (31,3 пмоль). Это может объясняться рядом факторов. A26 Fab'-PEG может иметь более высокий показатель аффинности для рекомбинантного OX40, экспрессируемого в виде димерного белка слияния Fc, обладающего другой третичной и четвертичной структурой, чем нативный OX40, экспрессируемый поверхностью клеток, который используется для прогнозирования взаимосвязи в качестве нековалентного тримера на мембране клеток (Chan et al., 2000). Кроме того, на аффинность может влиять дифференциальное гликозилирование рекомбинантного OX40 в сравнении с нативным OX40. Трехмерная структура клеточной мембраны, включая конволюции мембраны и совместно локализованные белки, также может представлять собой стерическое препятствие, ограничивая доступность OX40 для A26 Fab'-PEG. Вследствие этого клеточная аффинность, вероятно, представляет собой более приближенную меру истинной аффинности препарата в условиях in vivo.

Способы. Связывание A26 Fab'-PEG с активированными CD4+OX40+ Т-клетками человека.

МКПК были изолированы путем сепарирования на градиенте Ficoll и активированы 1 мкг/мл РНА-Л в течение 3 дней при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. CD4+ Т-клетки были изолированы путем отрицательного отбора с использованием магнитных микроносителей (набор II для изоляции CD4+ Т-клеток человека; Miltenyi Biotec). Примерно $1,2 \times 10^5$ клеток были инкубированы в присутствии антитела (диапазон финальной концентрации 10 мкг/мл - 0,0006 мкг/мл (111 нмоль - 0,0068 нмоль)) в течение 2 ч на льду. Перед анализом в ходе потоковой цитометрии с использованием FACScalibur (Бес-

ton Dickinson) клетки были промыты. Были построены две кривые титрации: одна с A26 Fab'-PEG и другая с gA33 Fab'-PEG в качестве контроля неспецифического связывания. Для отнятия показателя неспецифического связывания использовался линейный регрессионный анализ, после чего была построена кривая специфического связывания с анализом по методу нелинейной регрессии (Graphpad Prism®) для определения значения K_D .

Пример 3b. Способность блокирования лиганда.

Способность A26 Fab'-PEG блокировать взаимодействие между OX40, экспрессируемым поверхностью клеток и рекомбинантным OX40L измерялась с использованием анализа блокирования лиганда, основанного на потоковой цитометрии. Активированные CD4+OX40+ Т-клетки человека были предварительно инкубированы с титрацией A26 Fab'-PEG. Впоследствии в клетки был добавлен рекомбинантный OX40L для возможности связывания в присутствии A26 Fab'-PEG. С использованием потоковой цитометрии и меченого вторичного реагента определялась доля связанного OX40L. На фиг. 4 представлена репрезентативная кривая ингибирования, которая указывает на то, что A26 Fab'-PEG способен полностью блокировать связывание OX40L. Среднее значение IC_{50} для ингибирования связывания рекомбинантного OX40L составило 4,1 нмоль ($n = 2$ донора).

Способы. Ингибирование связывания OX40L с активированными CD4+OX40+ Т-клетками человека A26 Fab'-PEG.

МКПК были изолированы путем сепарирования на градиенте Ficoll и активированы 1 мкг/мл РНА-Л в течение 3 дней при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. Примерно $2,5 \times 10^5$ клеток были инкубированы в присутствии антитела (диапазон финальной концентрации 20 мкг/мл - 0,0003 мкг/мл (229 нмоль - 0,0035 нмоль)) в течение 10 мин на льду. Был добавлен OX40L (биотинилированный CD252 muCD8, Ancell) в финальной концентрации 2 мкг/мл с последующей инкубацией в течение дополнительных 30 мин на льду. Перед анализом потоковой цитометрией с использованием FACScalibur (Becton Dickinson) клетки были промыты, после чего путем инкубации с PE-меченым стрептавидином (Jackson ImmunoResearch) было определено значение OX40L. В качестве неспецифического контроля использовался gA33 Fab'-PEG. Кривая ингибирования была проанализирована путем нелинейной регрессии (Graphpad Prism®) для определения значения IC_{50} . Представлены данные, полученные для одного из двух репрезентативных доноров.

Пример 4. Активность A26 Fab'-PEG в ходе функциональных анализов на человеке.

Для оценки активности в блокировании эндогенного связывания OX40-OX40L в ходе клеточных взаимодействий A26 Fab'-PEG тестировался для целого ряда ответов Т-клеток человека, обусловленных воздействием антигена.

Пример 4а. Реакция смешанной культуры лимфоцитов.

Разработанная впервые в 1964 г. (Bach et al., 1964, Science 143, 813-814) реакция смешанной аллогенной культуры лимфоцитов (РСКЛ) является *in vitro* моделью аллореакционной активации и пролиферации Т-клеток (O'Flaherty et al., 2000, Immunology, 100, 289-299) с использованием мононуклеарных клеток цельной периферической крови (МКПК), полученных у двух неродственных доноров. Донорские Т-клетки активируются посредством распознавания аллогенных антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) относительно стимулятора неродственного донора МКПК, что приводит к пролиферации клеток и выработке цитокинов (Lukacs et al., 1993, Am J. Pathology, 143, 1179-1188). Было доказано, что аллореакция Т-лимфоцитов запускается как аллогенным антигеном ГКГС, так и связанным пептидом (Sherman et al., 1993, Annu. Rev. Immunol, 11, 385-402), что позволяет предположить, что ответ РСКЛ может возникнуть при воздействии аллогенных антигенов ГКГС и связанных пептидов. Степень ответа МКПК коррелирует со степенью несоответствия ГКГС между парой ответчик-стимулятор (Forrester et al., 2004, Corneal Transplantation: An Immunological Guide to the Clinical Problem, Imperial College Press, 66-67). Ответ РСКЛ приводит к пролиферации клеток донора-ответчика и выработке цитокинов T_H1 (ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α) и T_H2 (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13) Т-клетками. Точный профиль цитокина в ходе РСКЛ считается специфичным относительно пары ответчик-стимулятор (Jordan et al., 2002, J. Immunol. Methods, 260, 1-14). Анализы РСКЛ широко использовались в исследовании для изучения путей активации Т-клеток и скрининга иммуносупрессирующих препаратов, а также в клинических исследованиях для оценки функции иммунной системы при синдроме приобретенного иммунодефицита (СПИД) у пациентов и прогнозировании возможного отторжения донорского органа у реципиентов трансплантатов (Bromelow et al., 2001, J. Immunol. Methods, 247, 1-8).

Эффект A26 Fab'-PEG на *in vitro* активацию аллореакционных Т-клеток человека и их пролиферацию был изучен с помощью анализа РСКЛ, как это описано O'Flaherty et al., 2000. МКПК двух неродственных доноров были совместно культивированы в присутствии и отсутствии A26 Fab'-PEG, а клеточная пролиферация была измерена с помощью включения ³H-тимидина. Как это показано на фиг. 5, A26 Fab'-PEG ингибировал пролиферацию Т-клеток дозозависимым образом со значением IC_{50} 2,149 нмоль (0,1877 мкг/мл), а максимальное ингибирование составило 57%. Надосадочная жидкость, полученная в ходе РСКЛ человека, была проанализирована в ходе анализа цитокинов человека Meso Scale Discovery (MSD) с целью исследования эффекта A26 Fab'-PEG на выработку цитокинов. В ходе РСКЛ A26 Fab'-

PEG частично ингибировал выработку ИФН- γ (55% ингибирование), ИЛ-13 (50% ингибирование) и ИЛ-5 (80% ингибирование) (данные не представлены).

Способ. Ингибирование пролиферации аллогенных односторонних целостных ответов МКПК человека A26 Fab'-PEG в ходе РСКЛ.

Человеческие МКПК от двух неродственных доноров были изолированы из цельной крови. Клетки от одного донора были инактивированы путем γ -облучения для получения популяции стимулятора. Клетки другого донора образовывали популяцию ответчика. Популяции стимулятора и ответчика были смешаны в соотношении 1:1 (1×10^5 клеток/донор) и культивированы в присутствии A26 Fab'-PEG (1 нг-100 мкг/мл) в течение 6 дней. В качестве контрольного реагента использовался A33 Fab'-PEG (внутренний реагент). Пролиферация клеток оценивалась на 6 день путем введения ^3H -тимидина (0,5 МКСи/лунка). Данные представлены в виде процентного показателя ингибирования относительно ответа ответчика плюс стимулятора в отсутствие биологического реагента, а также в виде комбинированных данных, полученных в результате 10 разных пар доноров (среднее $\pm$ СП). Значения IC_{50} были рассчитаны с использованием программного обеспечения Graphpad Prism®. Результаты приведены на фиг. 5.

Пример 4b. Ответ на столбнячный анатоксин.

Столбнячный анатоксин (СА) индуцирует сильный специфический иммунный ответ со стороны Т-клеток у вакцинированных пациентов. В условиях *in vitro* антиген-специфический ответ на воздействие СА может быть определен путем мониторинга пролиферации и выработки цитокинов ($\text{T}_{\text{H}}1$ и $\text{T}_{\text{H}}2$) МКПК (Bishop et al., 2005). A26 Fab'-PEG ингибировал пролиферацию и выработку ИЛ-5, ИЛ-13, ИФН- γ и ФНО- α (данные не представлены) дозозависимым образом с максимальным показателем ингибирования пролиферации 38%. Значения IC_{50} для ингибирования пролиферации, рассчитанные для 2 доноров, составили 0,58 нмоль (0,051 мкг/мл) и 1,11 нмоль (0,097 мкг/мл). На фиг. 6 представлена кривая ингибирования пролиферации A26 Fab'-PEG для 1 донора.

Способ. A26 Fab'-PEG ингибирует пролиферацию МКПК, подвергнутых воздействию столбнячным анатоксином.

МКПК были изолированы путем сепарации на градиенте Ficoll и подвергнуты воздействию 1 мкг/мл столбнячного анатоксина (Calbiochem) в присутствии A26 Fab'-PEG (диапазон концентраций 5-0,001 мкг/мл) в конечном объеме 200 мкл на лунку в круглодонном 96-луночном планшете. Спустя 5 дней инкубации при температуре 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности пролиферация клеток была измерена путем введения ^3H -тимидина (0,5 МКСи/лунка) в активно делящиеся клетки. Представлены результаты, полученные у одного репрезентативного донора. Значения IC_{50} были рассчитаны с использованием программного обеспечения Graphpad Prism®.

Пример 4с. Ответ на клеща домашней пыли.

Тяжелые и острые приступы астмы могут быть инициированы путем вдыхания антигенов, таких как клещ домашней пыли (Tillie-Leblond et al., 2005, Allergy, 60, (1), 23-29), включая виды рода *Dermatophagoides pteronyssinus*. Такие аллергены индуцируют пролиферативный ответ в периферических кровяных клетках и выработку $\text{T}_{\text{H}}2$ поляризованных цитокинов у атопичных, но не у неатопичных пациентов (Ling et al., 2004, Lancet, 363, 608-615). В ходе *in vitro* анализа был определен эффект блокады OX40 при выработке $\text{T}_{\text{H}}2$ цитокина ИЛ-13 в ответ на воздействие антигена. У атопичных людей с показателем аллерген-специфичности IgE (RAST) 3-5 (шкала от 0 до 6) были отобраны МКПК и стимулированы антигеном *Dermatophagoides pteronyssinus* в присутствии A26 Fab'-PEG или контрольного антитела. A26 Fab'-PEG ингибировал выработку ИЛ-13 с максимальным значением 60% и IC_{50} 1,23 нмоль (фиг. 7). Более того, в ходе такого анализа A26 Fab'-PEG также сильно ингибировал выработку цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и ФНО- α , что приводило к повышению уровней регуляторного цитокина ИЛ-10 (фиг. 8).

Способ фиг. 7. A26 Fab'-PEG ингибирует выработку ИЛ-13 в МКПК, подвергнутых воздействию экстракта аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus*.

МКПК были изолированы у страдающих аллергией добровольцев путем сепарирования на градиенте Ficoll. Очищенные МКПК были подвергнуты воздействию 25 мкг/мл экстракта аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) в присутствии исследуемого антитела (диапазон концентраций 10-0,0005 мкг/мл) в конечном объеме 200 мкл на лунку в круглодонном 96-луночном планшете. После 6 дней инкубации при температуре 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности надосадочная жидкость была собрана и проанализирована на предмет содержания ИЛ-13 путем ИФА (Biosource). График представляет объединенные данные, полученные для трех доноров (среднее $\pm$ СП). Значения IC_{50} были рассчитаны с использованием программного обеспечения Graphpad Prism®.

Способ фиг. 8. A26 Fab'-PEG модулирует выработку цитокинов МКПК, подвергнутых воздействию экстракта аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus*.

МКПК были изолированы у страдающих аллергией добровольцев путем сепарирования на градиенте Ficoll. Очищенные МКПК были подвергнуты воздействию 25 мкг/мл экстракта аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) в присутствии 10 мкг/мл A26 Fab'-PEG (114 нмоль) или контроля (TN3 Fab'-PEG) в конечном объеме 200 мкл на лунку в круглодонном 96-луночном планшете. После 6 дней инкубации при температуре 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности надосадочная жидкость была собрана и

проанализирована на предмет содержания цитокина путем анализа multi-spot (MSD). График представляет объединенные данные, полученные для трех доноров (среднее $\pm$ СП).

Резюме.

Значения IC₅₀ для A26 Fab'-PEG в ходе функциональных анализов с использованием материала человека представлены в табл. 2. Активность A26 Fab'-PEG в ходе всех трех анализов подобна и хорошо коррелирует с измерением аффинности клеток (1,106 нмоль). В ходе таких анализов была значительно супрессирована пролиферация клеток и/или выработка множества воспалительных цитокинов, указывая на то, что A26 Fab'-PEGу значительно ингибирует активацию Т-клеток. Анализы при воздействии столбнячного анатоксина и клеща домашней пыли позволяют измерить ответ Т-клеток, обозначая, что A26 Fab'-PEG способен ингибировать установленные показатели ответов Т-клеток на различные антигены.

Таблица 2

Средние значения IC₅₀ для A26 Fab'-PEG, установленные в ходе функциональных *in vitro* анализов с использованием материала человека

Функциональный анализ	Среднее IC ₅₀ (нмоль)	Среднее IC ₅₀ (мкг/мл)
Реакция смешанной культуры лимфоцитов – ингибирование пролиферации (n = 10)	2,149	0,1877
Столбнячный анатоксин - ингибирование пролиферации (n = 2)	0,845	0,0733
Клещ домашней пыли - ингибирование выработки ИЛ-13 (n = 3)	1,23	0,1067

Атопическая анамнестическая реакция Т_H2 на антиген клеща домашней пыли способствует проведению релевантного *in vitro* анализа на присутствие астмы, и полученные данные указывают на то, что A26 Fab'-PEG может оказаться эффективным в лечении такого показателя. Костимуляция OX40 ранее была связана с воспалением легких, при этом предполагалось, что это играет критическую роль в дифференциации не подвергнутых воздействию специфических аллергенов CD4+ Т-клеток на воспалительные Т_H2-клетки и повторный ответ Т_H2 клеток памяти (Wang & Liu, 2007, J. Clin. Invest, 117 (12), 3655-3657). В ходе аллергического воспаления природный цитокин - тимусный стромальный лимфопоэтин (ТСЛП), вырабатываемый подвергнутыми стрессу эпителиальными клетками, запускает процесс созревания дендритных клеток человека и индуцирует экспрессию OX40L. Функционирование OX40L способствует Т_H2 поляризации CD4+ Т-клеток с воспалительным фенотипом и повышенной выработкой ФНО- α , но не ИЛ-10 (Ito et al., 2005, J. Exp. Med, 202 (9), 1213-1223). При ответе на клеща домашней пыли A26 Fab'-PEG значительно ингибирует классические Т_H2 цитокины ИЛ-13, ИЛ-5 и ИЛ-4, а также ФНО- α . Кроме того, у двух из четырех доноров-аллергиков A26 Fab'-PEG повышало выработку ИЛ-10. Таким образом, A26 Fab'-PEG может обладать способностью не только ингибировать аллергический ответ, но и модулировать его относительно регуляторного фенотипа.

Пример 5. A26 Fab'-PEG ингибирует пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток в модели Hu-SCID.

Модель Hu-SCID подразумевает воздействие на мышей линии SCID человеческими МКПК, приводящее к сильному ксеногенному ответу относительно мыши-хозяина. Такой ответ может отслеживаться по пролиферации Т-клеток человека в мышцах. С использованием полученных экспериментально данных о фармакокинетике A26 Fab'-PEG был разработан режим приема доз, приводящий к образованию равновесных плазменных концентраций A26 Fab'-PEG, равных 8, 23 и 34 мкг/мл. Данные на фиг. 9 показывают, что CD4+ и CD8+ Т-клетки подвергаются значительному ингибированию путем поддержания равновесных плазменных концентраций A26 Fab'-PEG на уровне 8, 23 и 34 мкг/мл.

Способ. A26 Fab'-PEG ингибирует пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток в модели Hu-SCID.

Мышам была введена подкожная нагрузочная доза 0,825, 2,475 или 8,25 мг/кг в день -2, затем ежедневно вводились подкожно поддерживающие дозы 0,25, 0,75 или 2,5 мг/кг соответственно. Содержание НК-клеток у мышей было снижено путем введения ТМ β 1 за один день до переноса 8 млн МКПК человека в брюшинную полость на день 0. На 14 день эксперимент был прекращен, и кровь, жидкость от перитонеального смыва и гомогенат селезенки были анализированы на предмет наличия CD4+ и CD8+ клеток. На 14 день мыши были умерщвлены путем смещения шейных позвонков, после чего была отобрана пункция сердца. С помощью анализа FACS было определено число CD4+ и CD8+ клеток человека. Данные (n=10) представлены в виде среднего $\pm$ СП. Снижение числа CD4+ и CD8+ клеток в крови после введения A26 Fab'-PEG представлено на фиг. 9.

Пример 6. Перекрестная реактивность A26 Fab'-PEG с OX40 нечеловекообразных приматов.

Для валидации использования A26 Fab'-PEG у нечеловекообразных приматов (НЧОП), модели заболевания и доклинические данные по токсикологии, а также показатели относительной аффинности и функциональной активности были сопоставлены с использованием клеток человека и НЧОП.

Аффинность, обусловленная клетками НЧОП.

CD4⁺ Т-клетки яванского макака или макаки-резуса были изолированы из периферической крови и активированы для экспрессии высоких уровней ОХ40. Аффинность A26 Fab'-PEG измерялась путем нелинейного регрессионного анализа кривых равновесного связывания, как это показано на фиг. 3. A26 Fab'-PEG приводил к менее чем 2-кратному падению показателя аффинности в CD4⁺ Т-клетках яванского макака или макаки-резуса в сравнении с такими клетками человека, указывая на высокую перекрестную реактивность (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение клеточно-опосредованной аффинности A26 Fab'-PEG для клеток человека и НЧОП

A26 Fab'-PEG	K _D (нмоль)
Человек (n = 3)	1,106
Яванский макак (n = 3)	1,859
Макака-резус (n = 1)	1,202

МКПК НЧОП были сепарированы на градиенте Lympholyte (VN Bio), активированы 1 мкг/мл РНА-Л в течение 3 дней при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности и CD4⁺ Т-клетки были изолированы путем отрицательной селекции с использованием магнитных носителей (набор II для изоляции CD4⁺ Т-клеток НЧОП; MiltenyiBiotec). Показатели аффинности были измерены в соответствии с описанием, представленным в примере 3а (фиг. 3).

Пример 7. Исследование эффективности на модели КИА яванского макака.

Обоснование для исследования и схема исследования.

Коллаген-индуцированный артрит яванского макака является стандартной моделью, используемой для определения профиля потенциальных препаратов против артрита перед испытанием с участием людей. В наших руках такая модель отвечает на лечение, направленное против ФНОα и ИЛ-6. Такие данные соответствуют клиническим результатам при РА с эквивалентными лекарственными препаратами для животных.

Индукция артрита у яванского макака требует проведения двух этапов иммунизации коллагеном II с промежутком в 3 недели. Симптомы артрита (опухание и боль в одном или нескольких суставах) могут проявляться в любое время после второй иммунизации и оценивались еженедельно с использованием шкалы артрита. Эксперимент продолжался в целом 11 недель. ОХ40 является костимуляционной молекулой, и, как ожидается, вмешательство в функции будет иметь определенное влияние на фазы иммунизации данной модели. Оценивалось три режима введения доз A26 Fab'-PEG. Одна группа получала A26 Fab'-PEG (100 мг/кг) только один раз в день перед первой иммунизацией. Вторая группа получала A26 Fab'-PEG (100 мг/кг) только один раз за день перед второй иммунизацией, и третья группа получала A26 Fab'-PEG (100 мг/кг) за один день до первой и второй иммунизации. Контрольная группа животных получала ацетатный буфер. Возникновение заболевания в контрольной группе характеризовалось повышенными сывороточными уровнями С-реактивного белка в период острой фазы (СРБ) и гаптоглобина (такие биомаркеры измеряются клиническим образом в ходе исследований РА). Целостность сустава оценивалась путем рентгенографии и гистологическим анализом.

Результаты и заключение.

У животных, подвергнутых лечению A26 Fab'-PEG за день до первой иммунизации, тяжесть артрита в целом была ниже, чем в контрольной группе. Такие различия в показателе артрита были статистически значимыми на дни 49, 63 и 76. На фиг. 10 показаны общие данные для отдельных животных, выраженные в виде площади под кривой для клинических показателей. Рентгенологическая оценка эрозии кости в суставах, равно как и гистопатологические изменения, были снижены (табл. 4, фиг. 11). Концентрация СРБ и гаптоглобина стремились к понижению в отличие от контрольной группы. Подобные результаты были получены для группы животных, получавших A26 Fab'-PEG за день до первой иммунизации и за день до второй иммунизации. Однако у животных, получавших A26 Fab'-PEG только за один день перед второй иммунизацией, не было получено никакого убедительного противоартритного эффекта. Эти данные показывают противоартритный эффект лечения ОХ40 у яванского макака КИА, а также важность ОХ40 в инициации патогенного иммунного ответа.

Фиг. 10. Ингибирование показателя артрита A26 Fab'-PEG при КИА у яванского макака.

Данные показывают значения площади под кривой (ППК) для отдельных животных для использования в качестве клинических показателей и контроля животных, получающих ацетатный буфер перед первой и второй иммунизациями (Ас Ас), животных, получающих A26 Fab'-PEG перед первой иммунизацией (А26 Ас), животных, получающих A26 Fab'-PEG перед второй иммунизацией (Ас А26), и животных, получающих A26 Fab'-PEG перед первой и второй иммунизациями (А26 А26). Линии представляют собой медианы.

Таблица 4

Влияние лечения A26 Fab'-PEG на рентгенографические показатели эрозии кости

Группа	День		
	0	35	76
Ac Ac	0	3,9 ± 1,7	24,8 ± 5,9
A26 Ac	0	0,3 ± 0,3	7,6 ± 3,9*
Ac A26	0	9,4 ± 4,5	17,9 ± 5,9
A26 A26	0	0,9 ± 0,7	5,3 ± 4,8**

Животные Ac Ac получали ацетатный буфер, животные A26 Ac получали A26 Fab'-PEG перед первой иммунизацией, животные Ac A26 получали A26 Fab'-PEG перед второй иммунизацией и животные A26 A26 получали A26 Fab'-PEG перед первой и второй иммунизациями. Средние ± СП, *p<0,05, **p<0,01 тест Уилкоксона.

Способ фиг. 11. Снижение общего гистологического показателя при КИА у яванского макака при воздействии A26 Fab'-PEG.

Данные показывают общие гистологические показатели (включая дегенерацию хряща и кости, фиброз, грануляционную ткань и гиперплазию) для отдельных животных на момент прекращения исследования. Животные Ac Ac получали ацетатный буфер, животные A26 Ac получали A26Fab'-PEG перед первой иммунизацией, животные Ac A26 получали A26 Fab'-PEG перед второй иммунизацией, и животные A26 A26 получали A26 Fab'-PEG перед первой и второй иммунизациями. Линии представляют собой медианы.

Безусловно, понимается, что данное изобретение было описано только в качестве примера и не может быть ограничено никоим образом, и что в рамках заявленной формулы изобретения могут осуществляться определенные модификации деталей изобретения. Предпочтительные характеристики каждого варианта воплощения изобретения представлены с учетом внесения необходимых изменений. Все публикации, включая, но не ограничиваясь этим, патенты и заявки на патенты, процитированные в данном описании, включены в данное описание посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация была специфически и индивидуально отмечена как внесенная в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Перечень последовательностей

```

<110> UCB Pharma S.A.
      LAWSON, Alastair
      NESBITT, Andrew
      POPPLEWELL, Andrew
      SHAW, Stevan
      SHEPHERD, Diana
      ZHANG, Yi

<120> Антитела к человеческому OX40 и их применение

<130> G0088-W001

<150> US61/153038
<151> 2009-02-17

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His
1           5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<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> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> CDRH3

<400> 3

Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<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

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> CDRL2

<400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr
 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Вариабельный участок легкой цепи антитела A26

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> ДНК, кодирующая переменный участок легкой цепи антитела A26

<400> 8

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60

attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg 120

ggtaaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttccgtct 180

cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg 240

gaagatttgc cgaactacta ctgccagcag tactacgatt acccaactgac gtttggtggt 300

ggtacccaaag ttgagatcaa acgt 324

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Варибельный участок тяжелой цепи антитела A26

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 10
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> ДНК, кодирующая вариационный участок тяжелой цепи антитела A26

<400> 10
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag caagcgggtt caggttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca      120
ccaggtaaa gttcgaatg ggtagcctct atctctccgt ctgggtgtct gacgtactac      180
cgtgactctg tcaaaggteg ttccaccatc tctgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac      240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc taactgggtgt      300
gaagggtatc tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c              351

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Легкая цепь антитела A26

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35             40             45
Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50             55             60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```


Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 12
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Легкая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность

<400> 12

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln
 35 40 45

Ser Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 13
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26

<400> 13
 gatataccaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60

```

attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccc 120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttcgcgtct 180
cgtttctctg cgtctgggtc tggtagggac tctactctga ccatctcttc tctgcagccg 240
gaagatttcc gacactacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttgggtgt 300
ggtaccaaaag ttgagatcaa acgtacgggt gcaagctccat ccgtcttcat ctttccaccg 360
tctgacgaac agctcaaate tggtagctgt tctgtcgttt gcctcctgaa caacttctat 420
ccgcgtgaag cgaaggtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagctcgg taactctcag 480
gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact 540
ctgtccaaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt 600
ctgtcttctc cggttaccaaa aagctttaat agaaggggagt gttaa 645

```

<210> 14
 <211> 708
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность

```

<400> 14
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcga 60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcctc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa 180
ccgggtaaaag ccgcaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgtccg 240
tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gaacttaact tgaccatctc ctctctgcag 300
ccggaagatt tcgcgacctc ctactgccag cagtactacg attaccactc gacgtttggg 360
ggtgggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca 420
ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagt gcttctgtcg ttgacctct gaacaacttc 480
tatccgcgtg aagcgaaggt ccagtggaag gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct 540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccaact actctctgtc tagcacccgt 600
actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag 660
ggtctgtctt ctccgggtac caaaagcttt aatagagggg agtgtaa 708

```

<210> 15
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Тяжелая цепь антитела A26

```

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

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

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

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

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

```

037792

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Ala Ala
225
<210> 16
<211> 248
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Тяжелая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность

<400> 16

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1              5              10              15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
      20              25              30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
      35              40              45

Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys
      50              55              60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr
      65              70              75              80

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

Lys Asn Ser Pro Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
      100             105             110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp
      115             120             125

```

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala
245

<210> 17
<211> 687
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26

<400> 17
gaggttcagc tggctgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggttt caggttcacc aactacgcta tccactggat tcgtcaggca 120

ccaggtaaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctgggtggtct gacgtactac 180

cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac 240

ctqcaqatga actctctgcg tcaqaqaat accqcaqtgt actactgcgc tactqqtqgt 300

gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc 360

aaagggtccga gcgttttccc actggtccg agctctaaat ccacctctg tggtagcgct 420

gcactggggt gcctggtgaa agactacttc ccaagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct 480

ggtgcactga cctctggtgt tcacaccttt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac 540

tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc 600

aacgtcaacc acaaaccgtc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt 660

gacaaaaacc atacctgcgc tgcgtaa 687

<210> 18
<211> 750
<212> ДНК
<213> Искусственный

<220>
<223> ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность

<400> 18
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60

gctgagggtc agctgggtcga gtctggaggc ggccttgctc agcctggagg gagectgcgt 120

ctctcttggt cagcaagcgg tttcacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag 180

gcaccaggta aaggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctgggtg tctgacgtac 240

```

taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg      300
tacctgcaga tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggg      360
ggatgaagga tcttcgacta ctgggggcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct      420
accaaaggte cgagcggttt cccactggct ccgagctcta aatccacctc tggtaggtacg      480
gctgcactgg gttgcctggg gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac      540
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc ttccagcag ttctgcagtc ttctggctg      600
tactccctgt ctacgctggg taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc      660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacg aaagtggaca aaaaagtcga gccgaaatcc      720
tgtgacaaaa cccatacctg cgctgcgtaa      750

```

<210> 19
 <211> 1459
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела A26, включая межгенную последовательность IGS2

```

<400> 19
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggetg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcctc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa      180
ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgtccg      240
tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtagc gaactctactc tgacctctc ctctctgcag      300
ccggaagatt tcgcgccta ctactgccag cagtactacg attaccactc gacgtttggt      360
ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catcgtctt catctttcca      420
ccgtctgacg aacagctcaa atctggtagt gcttctgtcg ttgcctect gaacaacttc      480
tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct      540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccaact actctctgtc tagcacctg      600
actctgtcca aagcagacta cgagaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag      660
ggtctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaaa tgaagaagac      720
tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg ttccgccacc gtggcgcaag ctgaggttca      780
gctgggtcag tctggaggcg ggcttgtcca gcctggaggg agcctgcgtc tctcttgtc      840
agcaagcggg ttcaacttca ccaactacgg tatccactgg attcgtcagg caccaggtaa      900
aggctcgtga tgggtagcct ctatctctcc gtctgggtgt ctgacgtact accgtgaact      960
tgtcaaaagt cgtttcacca tctctcgtga tgacgcgaaa aaactctcgt acctgcagat      1020
gaactctctg cgtgcagaag ataccgcagt gtaactactgc gctactggtg gtgaaggat      1080
cttcgactac tggggtcagg gtaccctggg aactgtctcg agcgcttcta ccaaagggtcc      1140
gagcgttttc ccaactggctc cgagctctaa atccacctct ggtggtacgg ctgcactggg      1200
ttgcctggtg aaagactact tcccagaacc agttaccgtg tcttggaact ctggtgcact      1260
gacctctggt gttcacacct ttccagcagt tctgcagttc tctgggtctgt actccctgtc      1320
tagcgtgggt accgttccgt cttctctctc gggtaactcag acctacatct gcaacgtcaa      1380
ccacaaacgg tccaacacga aagtggaaca aaaagtcgag ccgaaatcct gtgacaaaaac      1440
ccatacctgc gctgcgtaa      1459

```

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственный

```

<220>
<223> CDRH2

<400> 20

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Glu
1             5             10             15

Gly

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> CDR L1

<400> 21

Arg Ala Thr Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1             5             10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> человеческий JH4

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1             5             10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> JK1 последовательность

<400> 23

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1             5             10

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, содержащее(ий) тяжелую цепь и легкую цепь, в котором тяжелая цепь включает CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 для CDR-H1, CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20 для CDR-H2, и CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3 для CDR-H3, и в котором легкая цепь включает CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 21 для CDR-L1, CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5 для CDR-L2, и CDR с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6 для CDR-L3.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, в котором тяжелая цепь включает последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO: 9.

3. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, в котором легкая цепь включает последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO: 7.

4. Антитело или его фрагмент по п.1, в котором фрагмент представляет собой Fab, модифицированный Fab', Fab', F(ab')₂, Fv, VH, VL или scFv фрагменты.

5. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, содержащее(ий) тяжелую цепь, включающую последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, включающую последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO: 7.

6. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, в котором легкая цепь включает последовательность вариабельной области, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 7, а тяжелая цепь включает последовательность вариабельной области, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 9.

7. Антитело или его фрагмент по п.6, в котором легкая цепь включает последовательность вариабельной области, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, а тяжелая цепь включает последовательность вариабельной области, обладаю-

щую по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9.

8. Антитело или его фрагмент по п.6, в котором легкая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 7, а тяжелая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9.

9. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, содержащее(ий) тяжелую цепь, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

10. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, содержащее(ий) легкую цепь, которая включает последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11, и тяжелую цепь, которая включает последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15.

11. Антитело или его фрагмент по п.10, в котором легкая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11, а тяжелая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15.

12. Антитело или его фрагмент по п.10, в котором легкая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 11, а тяжелая цепь включает последовательность, обладающую по меньшей мере 98% идентичностью с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 15.

13. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-12, дополнительно связанное(ый) с молекулой-эффектором.

14. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-12, дополнительно связанное(ый) с одним или несколькими полимерами, при этом один или несколько полимеров могут быть представлены полиалкиленом, полиалкениленом или полиоксипаликиленом с необязательно замещенной прямой или разветвленной цепью или полисахаридом с прямой или разветвленной цепью.

15. Антитело или его фрагмент по п.14, в котором один или несколько полимеров представлены метоксиполиэтиленгликолем или полиэтиленгликолем.

16. Антитело или его фрагмент по п.15, содержащее(ий) лизил-малеимидную группу или лизил-бис-малеимидную группу, присоединенную к одному из остатков цистеина на С-конце тяжелой цепи, при этом остаток метоксиполиэтиленгликоля с молекулярной массой около 20000 Да присоединен к каждой аминокислоте остатка лизина.

17. Антитело или его фрагмент, связывающееся(ийся) с человеческим OX40, содержащее(ий) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, и имеющее(ий) лизил-малеимидную группу, присоединенную к остатку цистеина в положении 226 тяжелой цепи, при этом остаток метоксиполиэтиленгликоля с молекулярной массой около 20000 Да присоединен к каждой аминокислоте остатка лизина.

18. Изолированная ДНК, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-12.

19. Вектор клонирования, включающий ДНК по п.18.

20. Вектор экспрессии, включающий ДНК по п.18.

21. Вектор по п.19 или 20, отличающийся тем, что вектор включает последовательности, представленные в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18.

22. Вектор по п.19 или 20, отличающийся тем, что вектор включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

23. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или его фрагмента по любому из пп.1-12, включающая вектор клонирования или экспрессии по любому из пп.19-22.

24. Способ получения антитела или его фрагмента по любому из пп.1-12, включающий культивирование клетки-хозяина по п.23 и выделение антитела или его фрагмента.

25. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного OX40 или связанного с повышенным уровнем OX40, включающая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-17 в сочетании с одним или более веществами, выбранными из фармацевтически приемлемых наполнителей, разбавителей или носителей.

26. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-17 для лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного OX40 или связанного с повышенным уровнем OX40.

27. Применение фармацевтической композиции, включающей антитело или его фрагмент по любому из пп.1-17, для лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного OX40 или связанного с повышенным уровнем OX40.

28. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-17 в производстве медикамента для лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного OX40 или связанного с повышенным уровнем OX40.

29. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что патологическое расстройство пред-

ставляет собой вирусную, бактериальную, грибковую или паразитическую инфекцию.

30. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что патологическое расстройство представляет собой заболевание трансплантат против хозяина.

31. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что патологическое расстройство представляет собой отторжение трансплантата.

32. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что патологическое расстройство представляет собой системную красную волчанку.

33. Применение по любому из пп.26-28, отличающееся тем, что патологическое расстройство представляет собой аллергию, ХОБЛ, астму, аутоиммунное заболевание или ревматоидный артрит.

34. Способ лечения или профилактики патологического расстройства, опосредованного ОХ40 или связанного с повышенным уровнем ОХ40, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества антитела или его фрагмента по любому из пп.1-17.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что патологическое расстройство представляет собой вирусную, бактериальную, грибковую или паразитическую инфекцию.

36. Способ по п.34, отличающийся тем, что патологическое расстройство представляет собой заболевание трансплантат против хозяина.

37. Способ по п.34, отличающийся тем, что патологическое расстройство представляет собой отторжение трансплантата.

38. Способ по п.34, отличающийся тем, что патологическое расстройство представляет собой системную красную волчанку.

39. Способ по п.34, отличающийся тем, что патологическое расстройство представляет собой аллергию, ХОБЛ, астму, аутоиммунное заболевание или ревматоидный артрит.

40. Слитый белок, включающий антитело или его фрагмент по п.1, связывающееся(ийся) с ОХ40, и два однодоменных антитела, связанных с антителом или его фрагментом, связывающимся с ОХ40, при этом два однодоменных антитела представляют собой вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), связывающие альбумин.

41. Слитый белок по п.40, отличающийся тем, что фрагмент, связывающийся с ОХ40, представлен Fab или Fab' фрагментами.

42. Слитый белок по п.40 или 41, отличающийся тем, что VH и VL домены однодоменных антител соединены дисульфидной связью.

(a) Вариабельный участок легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Вариабельный участок тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEIGFDYWGQGITLVSS

(c)

CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2: SISPSGGLTYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
SISPSGGLTYRDSVEG (SEQ ID NO:20)
CDRH3: GGEIGFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
RATEDIYNALA (SEQ ID NO:21)
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QYYDYPLT (SEQ ID NO:6)

(d) Легкая цепь антитела A26 (SEQ ID NO:11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRF
SASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Легкая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO:12)

(
MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPG
KAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(f) Тяжелая цепь антитела A26 (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYIRD
SVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(g) Тяжелая цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO:16)

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAP
GKLEWVASISPSGGLTYIRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGI
FDYWQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCA
A

(h) ДНК, кодирующая переменный участок легкой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:8)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTG
TCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGTAAGCGCCAAAAC
TCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGT
ACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTA
CTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAGTTGAGATCAAACGT

(i) ДНК, кодирующая переменный участок тяжелой цепи антитела A26 (SEQ ID NO:10)

GAGGTTCAAGTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCTGCAGGCACCAG
GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAC
TCTGTCAAAGGTCTGTTTACCAATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT
GAATCTCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTGTAATACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT
TCGACTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGC

(j) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26 (SEQ ID NO:13)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTAT
TACCTGTCTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGTA
AAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTC
TCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT
CGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAG
TTGAGATCAAACGTACGTTTGCAGTCCATCCGTCTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAG
CTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCTCTCTGAACAATCTATCCGCGTGAAGCGAA
AGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAAC
AGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCAGAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTCTCCGGTTACCAA
AAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTAA

(k) ДНК, кодирующая легкую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO:14)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC
TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA
TTACCTGTCTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGTT
AAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTT
CTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT
TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAA
GTTGAGATCAAACGTACGTTTGCAGTCCATCCGTCTTCATCTTCCACCGTCTGACGAACA
GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCTCTCTGAACAATCTATCCGCGTGAAGCGA
AAGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAA
CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCAGAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTCTCCGGTTACCA
AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTAA

(l) ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26 (SEQ ID NO:17)

GAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
 TTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTACGGCACCAG
 GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGAC
 TCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGAT
 GAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCT
 TCGACTACTGGGTCAGGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGC
 GTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCGCT
 GGTGAAAGACTACTTCCAGAACCAAGTTACCGTGTCTTGAAGTCTGGTGCCTGACCTCTG
 GTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGT
 ACCGTTCCTCTTCTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGT
 CAACACGAAAGTGGACAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTG
 CGTAA

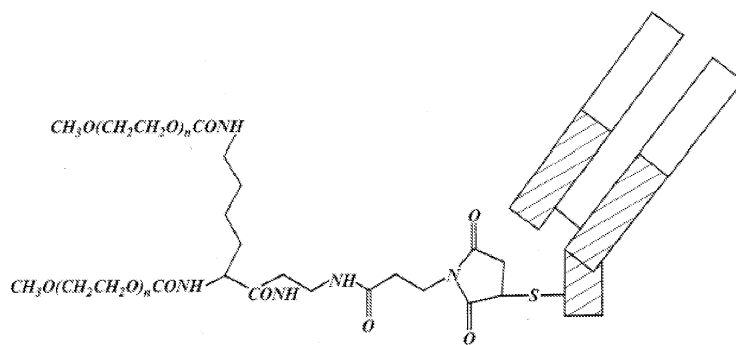
(m) ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела A26, включая сигнальную последовательность (SEQ ID NO:18)

ATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGC
 TGAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCT
 CTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTACGGCACCA
 GGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTGA
 CTCTGTCAAAGGTCGTTTCACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGA
 TGAAGTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATC
 TTCGACTACTGGGTCAGGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAG
 CGTTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCG
 TGGTGAAGACTACTTCCAGAACCAAGTTACCGTGTCTTGAAGTCTGGTGCCTGACCTCT
 GGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGT
 TACCGTTCCGTCTTCTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGT
 CCAACACGAAAGTGGACAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCT
 GCGTAA

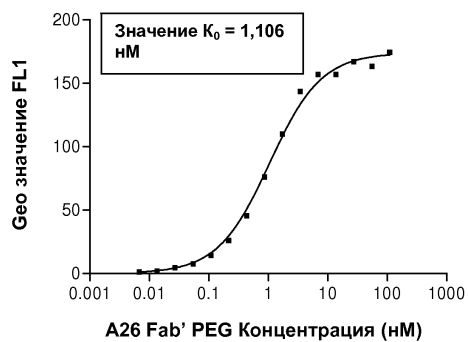
(n) ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела A26, включая межгенную последовательность IGS2 (SEQ ID NO:19)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGC
 TGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTA
 TTACCTGTCTGTCGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGT
 AAAGCGCCAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTT
 CTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT
 TCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAA
 GTTGAGATCAAAACGTACGGTTGCAGTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACA
 GCTCAAATCTGGTACTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGA
 AAGTCCAGTGGAAGTCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAA
 CAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTA
 CGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGCAGAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCA
 AAAGCTTTAATAGAGGGGAGTGTTAAATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCT
 AGCTGGTTTCCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAGGTTACGCTGGTTCGAGTCTGGAGGCGGGCTT
 TCCAGCCTGGAGGAGCCTGCGTCTCTTGTGTCAGCAAGCGGTTTACGTTACCAACTAC
 GGTATCCACTGGATTTCGTACGGCACCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCC
 GTCTGGTGGTCTGACGTACTACCGTACTCTGTCAAAGGTCTGTTTACCATCTCTCGTGATG
 ACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTAC
 TACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGTCAGGGTACCCCTGGTAACTGT
 CTCGAGCGCTTCTACCAAAGTCCGAGCGTTTCCCACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCT
 CTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTGCGTGGTGAAGACTACTTCCAGAACCAAGTTACCGTG
 TCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTTCCAGCAGTCTGTGAGTCTTC
 TGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCGTCTTCTTCTCTGGGTACTCAGACCT
 ACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAAACGAAAGTGGACAAAAAGTCGAGCCGAA
 TCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

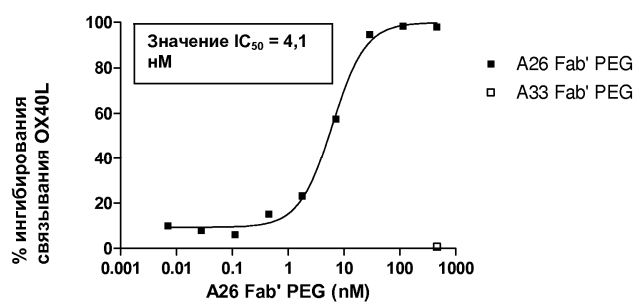
Фиг. 1



Фиг. 2

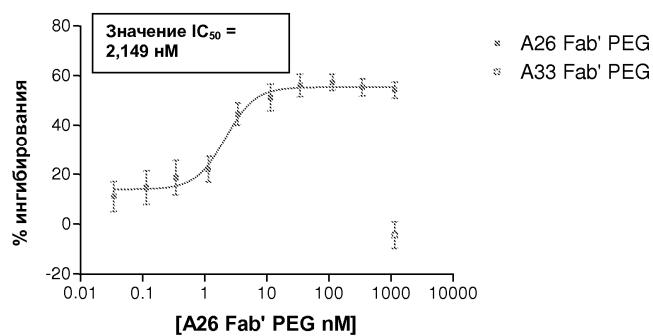


Фиг. 3

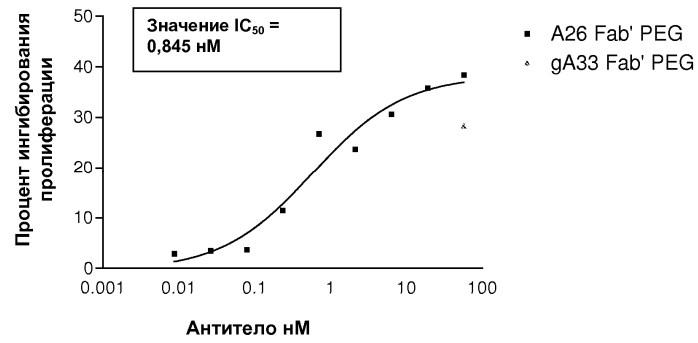


Фиг. 4

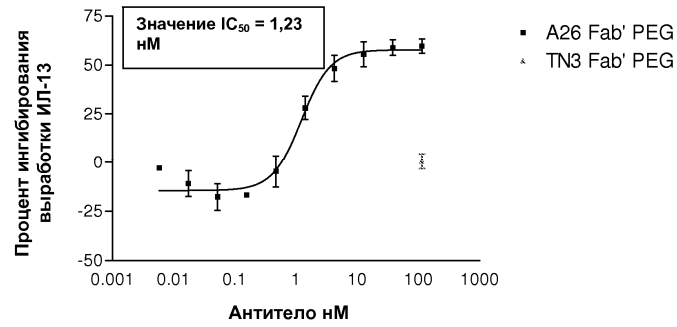
Человеческая СКЛ - A26 Fab' PEG



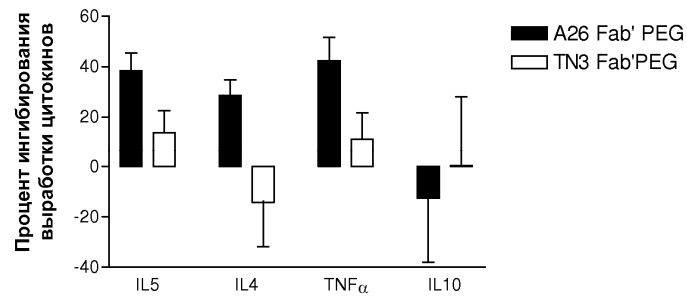
Фиг. 5



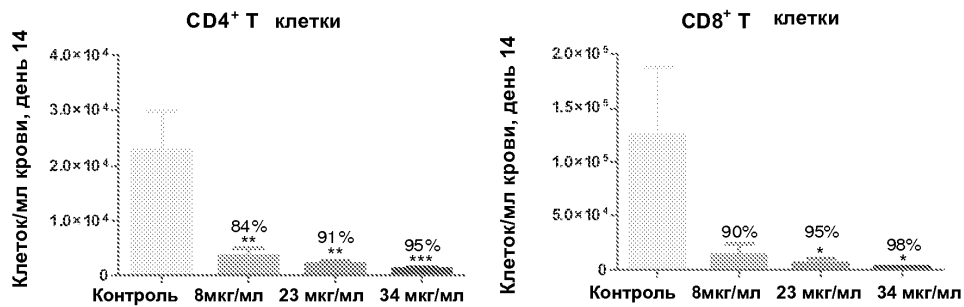
Фиг. 6



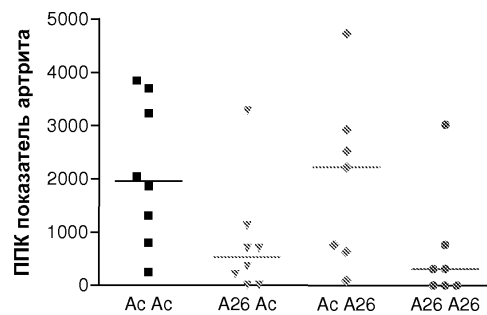
Фиг. 7



Фиг. 8

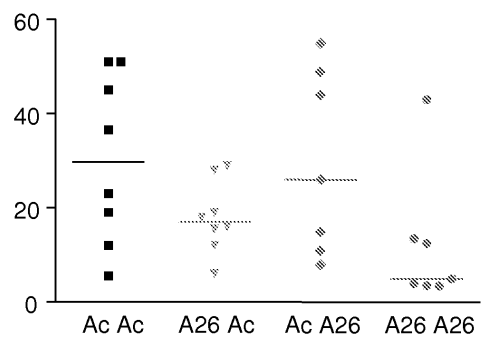


Фиг. 9



Фиг. 10

Общий гистологический показатель



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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