



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107341** (13) **C2**  
(51) МПК**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07H 21/04** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 15/63** (2006.01)**A61P 37/02** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 11078</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Лоусон Елестер Девід Гріффітс (GB), Несбітт Ендрю Малкольм (GB), Попплвелл Ендрю Джордж (GB), Шоу Стіван Грехем (GB), Шпектор Дайана (GB), Жанг Йї (GB)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>17.02.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЮСІБІ ФАРМА С.А., 60 Allee de la Recherche, B-1070 Brussels, Belgium (BE)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.12.2014</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Петошевіч Діна Анатоліївна, реєстр. №284</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/153,038</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>WO 2007/062245 A2, 31.05.2007 WO 2008/106116 A2, 04.09.2008 MING LI ET AL: "Effects of CD134 Monoclonal Antibody on Hemolysis Activities and Expression of Perforin in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Systemic Lupus Erythematosus Patients", HYBRIDOMA, vol. 26, no. 4, 1 August 2007 (2007-08-01) , pages 191-200, XP055057235, ISSN: 1554-0014 A D Weinberg et al.: "Selective depletion of myelin-reactive T-cells with the anti OX40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis", Nature Medicine, vol. 2, no. 2 1 February 1996 (1996-02-01), pages 183-189, XP055057498</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>17.02.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.10.2011, Бюл.№ 20</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.12.2014, Бюл.№ 24</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/US2010/024377, 17.02.2010</b>	

**(54) МОЛЕКУЛИ АНТИТІЛ, ЩО МАЮТЬ СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДО ЛЮДСЬКОГО ОХ40****(57) Реферат:**

Винахід стосується антагоністичного антитіла, що зв'язується з людським ОХ40, яке складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з одного CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20 для CDR-H2, і CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:3 для CDR-H3, і в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається принаймні з одного CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21 для CDR-L1, CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:5

UA 107341 C2

для CDR-L2, і CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:6 для CDR-L3. Винахід також стосується способу одержання зазначеного антитіла та його терапевтичного застосування.

Даний винахід стосується молекул антитіл, що мають специфічність до антигенних детермінантів OX40, і композицій, що складаються із подібних антитіл. Даний винахід також описує терапевтичне використання молекул антитіл, композицій і способів для виробництва зазначених молекул антитіл.

OX40 (також відомий як CD134, TNFRSF4, ACT35 або TXGP1L) є членом суперсімейства рецепторів ФНО, яке включає 4-1BB, CD27, CD30 і CD40. Позаклітинний домен OX40 для зв'язування з лігандом складається з 3 повних і збагачених цистеїном доменів (CRD) і 4 часткових CRD на С-кінці (Bodmer et al., 2002, Trends Biochem Sci, 27, 19-26).

Ліганд для OX40 представлений OX40L, і 3 копії OX40 зв'язуються із тримірним лігандом з утворенням комплексу OX40-OX40L (Compaan and Hymowitz, 2006, Structure, 14, 1321-1330). OX40 являється рецептором, що перебуває у мембрані; також була виявлена його розчинна ізоформа (Taylor and Schwarz, 2001, J.Immunol. Methods, 255, 67-72). Функціональна значимість розчинної форми в даний момент не відома. OX40 не експресується Т-клітинами, що перебувають у стані спокою, але тимчасово експресується активованими Т-клітинами після лігування Т-клітинного рецептора (ТКР). Ліганд для OX40, OX40L являється членом сімейства ФНО і експресується на активованих антиген-представляючих клітинах (АПК), включаючи В-клітини, макрофаги, ендотеліальні клітини і дендритні клітини (ДК).

OX40 є основним ко-стимулюючим рецептором із включенням послідовності CD28 і OX40 і необхідний для оптимальної проліферації Т-клітин і їх виживання. Лігування OX40 на активованих Т-клітинах веде до підвищеного вироблення цитокінів і проліферації CD4+ і CD8+ Т-клітин (Gramaglia et al., 2000, J. Immunol, 165, 3043-3050, Bansal-Pakala et al., 2004, J.Immunol, 172, 4821-425), що може сприяти безперервному виникненню відповідей як Th1, так і Th2 (Gramaglia et al., 1998, J. Immuno., 161, 6510-6517, Arestides et al., 2002, Eur. J. Immunol. 32, 2874-2880). Ко-стимуляція OX40 збільшує виживаність Т-клітин за межі початкової ефекторної фази імунної відповіді і підвищує число Т-клітин пам'яті за допомогою інгібування смерті ефектора Т-клітин.

При надлишковій або неконтрольованій імунній активації можуть виникнути патологічна алергія, астма, запалення, аутоімунні і інші споріднені захворювання. Беручи до уваги функції OX40 у плані посилення імунної відповіді, це може привести до погіршення стану аутоімунного і запального захворювання.

Роль взаємодій OX40/OX40L була показана на моделі захворювання OX40 у нокаутних мишей. При експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ) у нокаутних мишей OX40 був виявлений множинний склероз, менш важкі клінічні ознаки захворювання і знижена кількість запального інфільтрату в ЦНС (Carboni et al., 2003, J.Neuroimmunology, 145, 1-11). Крім того, у нокаутних мишей OX40, які були премовані і сенсibilізовані яєчним альбуміном, відзначалось знижене легеневе запалення (80-90 % зниження еозинофілії), знижене вироблення слизу і значно знижена гіперреактивність дихальних шляхів (Jember et al., 2001, J. Exp.Med., 193, 387-392). Моноклональні антитіла до мишачого ліганду OX40 мали переважний ефект у моделі колаген-індукованого ревматоїдного артриту (Yoshioka et al., 2000, Eur. J. Immunol., 30, 2815-2823), ЕАЕ (Nohara et al., 2001, J. Immunol., 166, 2108-2115), не страждаючих ожирінням мишей з діабетом (NOD) (Pakala et al., 2004, Eur. J. Immunol., 34, 3039-3046), коліту у мишей з відновленою кількістю Т-клітин (Malmstrom et al., 2001, J. Immunol., 166, 6972-6981, Totsuka et al., 2003, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 284, G595-G603) і в моделях легеневого запалення (Salek-Ardakani et al., 2003, J. Exp. Med., 198, 315-324, Hoshino et al., 2003, Eur.J.Immunol, 33, 861-869). Антитіло до людського OX40L було вивчено на моделі легеневого запалення у макаки-резус, в результаті чого були виявлені знижені рівні ІЛ-5, ІЛ-13 і ефекторних Т-клітин пам'яті в бронхоальвеолярному змиві після впливу алергену (Seshasayee et al., 2007, J. Clin.Invest, 117, 3868-3878).

Підвищене вироблення OX40 також було відзначено при декількох аутоімунних і запальних захворюваннях. Це включає підвищення експресії OX40 на Т-клітинах, виділених із синовіальної рідини пацієнтів з ревматоїдним 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). Подібним чином, підвищення експресії OX40 відзначалось в тканині шлунково-кишкового тракту пацієнтів з виразковим колітом і хворобою Крона (Souza et al., 1999, Gut, 45, 856-863; Stuber et al., 2000, Eur.J.Clin.Invest., 30, 594-599), а також в активних осередках ураження у пацієнтів із множинним склерозом (Carboni et al., 2003, J.Neuroimmunology, 145, 1-11). OX40L може бути також виявлений у гладкій мускулатурі дихальних шляхів людини (ГМДШ), при цьому клітини ГМДШ у пацієнтів з астмою характеризуються більшою запальною відповіддю на лігування OX40L, ніж у більш здорових донорів, що вказує на роль сигнального шляху OX40/OX40L при астмі (Burgess et al., 2004, J. Allergy Clin Immunol., 113, 683-689; Burgess

et al., 2005, J. Allergy Clin Immunol., 115, 302-308). Також повідомлялося, що CD4+T-клітини, виділені з периферичної крові пацієнтів із системним червоним вовчаком (СЧВ), експресують підвищені рівні OX40, що пов'язано з активністю хвороби (Patschan et al., 2006, Clin. Exp. Immunol., 145, 235-242).

5 Беручи до уваги роль OX40 при алергії, астмі і захворюваннях, пов'язаних з аутоімунитетом і запаленням, один з підходів у лікуванні таких захворювань полягає у блокуванні сигнального шляху OX40-OX40L за допомогою використання антитіл до OX40L або антагоністичних антитіл до OX40L.

10 Антитіла до OX40L вже були описані раніше (див., наприклад, WO2006/029879). Численні антагоністичні антитіла до OX40 також були описані раніше, однак відомо лише декілька антагоністичних антитіл до OX40. Поліклональне кроляче антимишаче антитіло до OX40 було одержано Stuber et al., 1996, J. Exp. Med., 183, 979-989, і таке антитіло блокує взаємодію між OX40 і OX40L. Мишачі моноклональні антитіла 131 і 315, які зв'язуються з людським OX40, були одержані Imura et al., 1996, J. Exp. Med., 2185-2195.

15 Повністю людські антагоністичні антитіла були описані в WO2007/062245, і такі антитіла мають найбільшу афінність для клітинної поверхні, яка експресує OX40 (активовані T-клітини), - 11 нмоль.

Гуманізовані антагоністичні антитіла були описані в WO2008/106116, і найкращий показник афінності антитіла до OX40 становить 0,94 нмоль.

20 Були описані і інші антитіла до OX40, включаючи мишаче L106 (патент США No 6 277 962) і мишаче АСТ35, представлене на ринку тільки компанією eBioscience.

Відповідно до цього, в даній галузі все ще існує необхідність в удосконаленні антитіла до OX40, що підходить для лікування пацієнтів.

25 На даний момент нами було виявлено антагоністичне антитіло до OX40, що має високу афінність і придатне для лікування або профілактики патологічних розладів, опосередкованих OX40 або пов'язаних з підвищеним рівнем OX40.

Короткий опис фігур

Фігура 1 відображає певні амінокислотні або ДНК-послідовності, що відносяться до антитіл відповідно до опису

30 Фігура 2 відображає діаграму антитіла формату A26 Fab'-PEG

Фігура 3 відображає афінність клітин до антитіла A26 Fab'-PEG для OX40 на поверхні клітин

Фігура 4 відображає процентний показник інгібування зв'язування OX40L з активованими T-клітинами антитілом A26 Fab'-PEG

35 Фігура 5 відображає процентний показник інгібування проліферації T-клітин антитілом A26 Fab'-PEG у ході реакції змішаної культури лімфоцитів людини

Фігура 6 відображає інгібування A26 Fab'-PEG проліферації мононуклеарних клітин периферичної крові, підданих впливу правцевим анатоксином

40 Фігура 7 відображає процентний показник інгібування A26 Fab'-PEG вироблення IL-13 в мононуклеарних клітинах периферичної крові, підданих впливу алергенним екстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*

Фігура 8 відображає процентний показник інгібування A26 Fab'-PEG вироблення цитокінів у мононуклеарних клітинах периферичної крові, підданих впливу алергенним екстрактом *Dermatophagoides pteronyssinus*

45 Фігура 9 відображає інгібування A26 Fab'-PEG проліферації CD4+ і CD8+T-клітин у моделі Hu-SCID

Фігура 10 відображає інгібування A26 Fab'-PEG показника артриту (у вигляді площі під кривою) у моделі *in vivo*

Фігура 11 відображає загальні гістологічні параметри артриту в моделі *in vivo*

50 У даному тексті оригінальне щуряче антитіло, з якого були одержані гуманізовані антитіла, зазначене як CA044\_00026.

Гуманізоване CA044\_00026, представлене у формі фрагмента Fab або іншого фрагмента, зазначене як A26.

ПЕГільоване антитіло "A26" у форматі, представленому на Фігурі 2, вказується тут як A26 Fab'-PEG.

55 Залишки у варіабельних доменах антитіл звичайно нумеруються відповідно до системи, розробленої Kabat et al. Така система описана в Kabat et al., 1987 в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (надалі по тексті вказується як "Kabat et al. (див. вище)"). Така система нумерації використовується в даному описі, за винятком певних випадків, де вказується інша нумерація.

Позначення залишків у системі Kabat не завжди прямо відповідає лінійній нумерації амінокислотних залишків. Фактична лінійна послідовність амінокислот може містити меншу або більшу кількість амінокислот, ніж при чіткій нумерації Kabat, указуючи на скорочення або вставку в структурному компоненті, будь це каркасна або гіперваріабельна ділянка (CDR) основної структури варіабельного домену. Правильна нумерація залишків по Kabat може проводитись для окремого антитіла шляхом вирівнювання гомологічних залишків у послідовності антитіла зі "стандартною" пронумерованою послідовністю Kabat.

CDR варіабельного домену важкого ланцюга розташовуються в залишках 31-35 (CDR-H1), залишках 50-65 (CDR-H2) і залишках 95-102 (CDR-H3) відповідно до системи нумерації Kabat. Однак згідно Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, еквівалентна CDR-H1, розширюється від залишку 26 до залишку 32. Таким чином, якщо не зазначене інше, "CDR-H1" у контексті даного опису позначає залишки 26-35, як це визначається при комбінуванні системи нумерації Kabat і топологічного визначення петлі Chothia.

CDR варіабельного домену легкого ланцюга розташовуються в залишках 24-34 (CDR-L1), залишках 50-56 (CDR-L2) і залишках 89-97 (CDR-L3) відповідно до системи нумерації Kabat.

Як це використовується в даному документі, термін "антагоністичне антитіло" описує антитіло, здатне інгібувати та/або нейтралізувати біологічну сигнальну активність OX40, наприклад, шляхом блокування зв'язування або суттєвого зниження зв'язування OX40 з лігандом OX40 і, таким чином, інгібуючи активацію OX40.

Антитіла, призначені до використання в даному винаході, можуть бути одержані з використанням будь-якого відомого науці способу. Поліпептид/білок OX40, включаючи білки злиття, наприклад, білки злиття OX40-Fc або клітини (одержані рекомбінантним або природним шляхом), що експресують поліпептид (наприклад, активовані Т-клітини), можуть використовуватись для одержання антитіл, що специфічно розпізнають OX40. Поліпептид OX40 також може бути представлений "зрілим" поліпептидом або його біологічно активним фрагментом або похідним. Придатний поліпептид OX40 представлений зрілим людським поліпептидом або його позаклітинним доменом, або фрагментом. Позаклітинний домен, як правило, складається з амінокислот 29-214 білка OX40 (SWISS PROT запис P43489). Поліпептиди OX40 можуть бути одержані за допомогою добре відомих науці процесів з одержаних генетичним чином клітин-хазяїв, що включають системи експресії, або ж можуть бути одержані із природних біологічних джерел. У даній заявці на винахід термін "поліпептиди" включає пептиди, поліпептиди і білки. Ці терміни використовуються взаємозамінним чином, якщо не зазначене інше. Поліпептид OX40 може в деяких випадках бути частиною більшого білка, наприклад, білка злиття, злитого, наприклад, з афінною міткою. Антитіла, вироблені проти поліпептиду OX40, можуть бути одержані за необхідності імунізації тварини шляхом введення поліпептидів тварині, що переважно не є людиною, з використанням добре відомих і стандартних протоколів (див., наприклад, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Для імунізації може використовуватись цілий ряд видів теплокровних тварин, таких як кролики, миші, щури, вівці, корови, верблюди або свині. Однак найбільше підходять миші, кролики, свині і щури.

Антитіла для використання в даному винаході включають цілі антитіла і їх функціонально активні фрагменти або похідні і можуть бути представлені (не обмежуючись) моноклональними, гуманізованими, повністю людськими або химерними антитілами.

Моноклональні антитіла можуть бути одержані з використанням будь-якого відомого науці способу, наприклад, способом гібридоми (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), способом тріюми, способом гібридоми В- клітин людини (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) і способом БЕБ-гібридоми (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитіла для використання у винаході також можуть бути одержані з використанням окремих лімфоцитів шляхом клонування і експресії варіабельної ділянки кДНК імуноглобуліну, одержаного від окремих лімфоцитів, вибраних для одержання специфічних антитіл, наприклад, за допомогою способів, описаних в Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848; WO92/02551; WO2004/051268 і міжнародній заявці на патент № WO2004/106377.

Скринінг антитіл може проводитись за допомогою аналізів для визначення зв'язування з людським OX40 і/або аналізів для виміру здатності блокувати зв'язування OX40 зі своїм лігандом OX40L. Прикладом аналізу зв'язування служить ІФА, зокрема, з використанням білка злиття людського OX40 і людського Fc при іммобілізації на планшетах, а також при використанні кон'югованого вторинного антитіла для визначення антитіла до OX40, пов'язаного з білком злиття. Прикладом аналізу блокування служить аналіз на основі проточної цитометрії, який

вимірює показник блокування зв'язування білка злиття ліганда OX40 з лігандом на людських CD4 клітинах. Для визначення кількості білка злиття ліганда OX40, що зв'язується із клітиною, використовується флуоресцентно мічене вторинне антитіло. Такий аналіз дозволяє виявити зниження сигналу, тому що антитіло в надосадовій рідині блокує зв'язування білка злиття ліганда з OX40. Прикладом також може служити аналіз блокування, де блокування ко-

стимуляції нативних людських Т-клітин опосередковане білком злиття ліганда OX40, нанесеного на планшет, а вимірювання здійснюється за допомогою введення міченого тритієм тимідину. Гуманізовані антитіла (включаючи CDR-привиті антитіла) представлені молекулами антитіл, що мають одну або декілька гіперваріабельних ділянок (CDR) і одержаними у тварин, а також утримуючими каркасну ділянку, одержану з молекули людського імуноглобуліну (див., напр. US 5,585,089; WO91/09967). Потрібно мати на увазі, що необхідність може полягати лише в перенесенні залишків CDR, які визначають специфічність, а не всього CDR (див., наприклад, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманізовані антитіла можуть у деяких випадках містити один або декілька каркасних залишків, одержаних у тварин, у яких були одержані і CDR.

Химерні антитіла складаються з елементів, одержаних від двох різних видів, наприклад, елементів, що мають характеристики видів, з яких вони були одержані. Як правило, химерне антитіло буде складатись з варіабельної ділянки, одержаної у одного виду, наприклад, миші, щура, кролика або т.п., і константної ділянки, одержаної у іншого виду, наприклад, людини.

Антитіла для використання в даному винаході також можуть бути одержані за допомогою різних способів фагових дисплеїв, відомих науці, і можуть включати способи, описані 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) і WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; і патентах США №№ 5 698 426; 5 223 409; 5 403 484; 5 580 717; 5 427 908; 5 750 753; 5 821 047; 5 571 698; 5 427 908; 5 516 637; 5 780 225; 5 658 727; 5 733 743 і 5 969 108.

Повністю гуманізовані антитіла представлені антитілами, у яких варіабельні ділянки і константні ділянки (за наявності), як легких так і важких ланцюгів мають людське походження або значно ідентичні послідовностям людського походження, при цьому вони необов'язково можуть бути одержані з того самого антитіла. Приклади повністю людських антитіл людини можуть включати антитіла, одержані, наприклад, за допомогою способів фагового дисплею, описаних вище, а також антитіла, одержані у мишей, у яких гени варіабельної і у деяких випадках константної ділянок мишачого імуноглобуліну були заміщені їх людськими аналогами, наприклад, як це описане в загальних поняттях в EP0546073 B1, патентах США No 5 545 806, 5 569 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 661 016, 5 770 429, EP 0438474 і EP0463151.

В одному варіанті втілення винаходу даний винахід описує антагоністичне антитіло, яке має специфічність до людського OX40, що складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається принаймні з одного CDR з послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:1 для CDR-H1, CDR з послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20 для CDR-H2, і CDR з послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:3 для CDR-H3.

В іншому варіанті втілення даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з важкого ланцюга, в якому принаймні два CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 варіабельного домену важкого ланцюга вибирають з наступного: послідовності, представленої в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:2 для CDR-H2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:3 для CDR-H3. Наприклад, антитіло може включати важкий ланцюг, в якому CDR-H1 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:1, і CDR-H2 з послідовністю, представлену в SEQ ID NO:2. З іншого боку, антитіло може складатись з важкого ланцюга, в якому CDR-H1 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:1, і CDR-H3 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:3, або антитіло може включати важкий ланцюг, в якому CDR-H2 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:2, і CDR-H3 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:3. З метою запобігання сумнівів розуміється, що включені всі пермутації.

В іншому варіанті втілення винаходу даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:2 для CDR-H2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:3 для CDR-H3.

В іншому варіанті втілення даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний

домен важкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:20 для CDR-H2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:3 для CDR-H3.

В одному варіанті втілення даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається принаймні з одного CDR з послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21 для CDR-L1, CDR з послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і CDR с послідовністю, представленою на Фігурі 1 (с) SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

В іншому варіанті втілення даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з легкого ланцюга, в якому принаймні два з CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 варіабельного домену легкого ланцюга вибирають з наступного: послідовності, представленої в SEQ ID NO:4 для CDR-L1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:6 для CDR-L3. Наприклад, антитіло може включати легкий ланцюг, в якому CDR-L1 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:4, і CDR-L2 з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:5. З іншого боку, антитіло може складатись з легкого ланцюга, в якому CDR-L1 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:4, і CDR-L3 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:6, або антитіло може включати легкий ланцюг, в якому CDR-L2 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:5, і CDR-L3 має послідовність, представлену в SEQ ID NO:6. З метою запобігання сумнівів розуміється, що включені всі пермутації.

В іншому варіанті втілення даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:4 для CDR-L1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

В іншому варіанті втілення винаходу даний винахід описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:21 для CDR-L1, послідовності, представленої в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і послідовності, представленої в SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

Молекули антитіла даного винаходу складаються відповідним чином з комплементарного легкого ланцюга або комплементарного важкого ланцюга відповідно.

Таким чином, в одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга включає послідовність SEQ ID NO:1 для CDR-H1, послідовність, представлену в SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20 для CDR-H2, і послідовність, представлену в SEQ ID NO:3 для CDR-H3, а також легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга включає послідовність, представлену в SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21 для CDR-L1, послідовність, представлену в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і послідовність, представлену в SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

Відповідно до даного винаходу, CDR може включати заміну, вставки та/або делеції однієї або декількох амінокислот без суттєвої зміни здатності антитіла зв'язуватись з OX40 і нейтралізувати активність OX40. Ефект замін, вставок і/або делецій будь-яких амінокислот може з легкістю бути вивчений фахівцем у даній галузі, наприклад, з використанням описаних тут способів, зокрема, представлених у Прикладах способах для визначення зв'язування OX40 і інгібування взаємодії OX40/OX40L. Відповідно до цього, даний винахід описує антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з одного або декількох CDR, вибраних з CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) і CDRL-3 (SEQ ID NO:6), в яких одна або декілька амінокислот в одному або декількох CDR замінені іншою відповідною амінокислотою, як це буде визначено нижче. В одному варіанті втілення, даний винахід описує антитіло, що має специфічність до людського OX40, що складається з CDRH-1 (SEQ ID NO:1), CDRH-2 (SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20), CDRH-3 (SEQ ID NO:3), CDRL-1 (SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21), CDRL-2 (SEQ ID NO:5) і CDRL-3 (SEQ ID NO:6), як це показано на Фігурі 1 (с), в яких одна або декілька амінокислот в одному або декількох CDR замінені іншою відповідною амінокислотою, як це буде визначено нижче.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається із трьох CDR, при цьому послідовність CDRH-1 має принаймні 60 % ідентичності або схожості з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:1, CDRH-2 має принаймні 60 % ідентичності або схожості з

послідовністю, представленою в SEQ ID NO:2, і/або CDRH-3 має принаймні 60 % ідентичності або схожості з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:3. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу складається з важкого ланцюга, в якому варіабельний домен складається із трьох CDR, при цьому послідовність CDRH-1 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:1, CDRH-2 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:2, і/або CDRH-3 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:3.

"Ідентичність" в контексті даного винаходу вказує, що будь-яка окрема ділянка вирівняних послідовностей з амінокислотними залишками ідентична між послідовностями. "Схожість" у контексті даного винаходу вказує, що амінокислотні залишки в будь-якій окремій ділянці вирівняних послідовностей представлені у послідовностях амінокислотами подібного типу. Наприклад, лейцин може бути заміщений ізолейцином або валіном. Інші амінокислоти, які можуть бути часто заміщені одним, включають, але не обмежуються, наступним:

- фенілаланін, тирозин і триптофан (амінокислоти з бічними ароматичними кільцями);
- лізин, аргінін і гістидін (амінокислоти зі звичайними бічними ланцюгами);
- аспарат і глутамат (амінокислоти з бічними ланцюгами у вигляді кислотних залишків);
- аспарагін і глутамін (амінокислоти з бічними ланцюгами у вигляді амідів); і
- цистеїн і метіонін (амінокислоти з бічними ланцюгами, що містять сірку). Ступінь

ідентичності і схожості можна легко обчислити (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, програмне забезпечення the BLAST™ доступне 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 іншому варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу складається з легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається із трьох CDR, при цьому послідовність CDRL-1 має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:4, CDRL-2 має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:5, і/або CDRL-3 має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:6. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу складається з легкого ланцюга, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається із трьох CDR, при цьому послідовність CDRL-1 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:4, CDRL-2 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:5, і/або CDRL-3 має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:6.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло представлено моноклональним антитілом.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло представлене химерним антитілом.

Ще в одному варіанті втілення винаходу антитіло представлене молекулою CDR-привитого антитіла, що складається з одного або декількох CDR, включених у послідовності SEQ ID Nos:1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 і/або 21 (Фігура 1 (c)), або варіантами такого антитіла. У контексті даного винаходу термін "молекула CDR-привитого антитіла" стосується молекули антитіла, в якій легкий та/або важкий ланцюги складаються з одного або декількох CDR (включаючи, за бажанням, один або декілька модифікованих CDR) від донорського антитіла (наприклад, мишачого моноклонального антитіла), привитих до каркасу варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга антитіла-акцептора (наприклад, антитіла людини). Див. більш докладно Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одному варіанті втілення винаходу в остів антитіла людини переноситься не весь CDR, а тільки один або декілька гіперваріабельних ділянок одного з описаних вище CDR (див., наприклад, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). В одному варіанті втілення винаходу в структуру людського антитіла переносяться тільки гіперваріабельні ділянки одного або декількох описаних вище CDR. В іншому варіанті втілення винаходу в структуру людського антитіла переносяться тільки гіперваріабельні ділянки кожного з описаних вище CDR.

При прививанні CDR або гіперваріабельних ділянок, може використовуватись будь-яка придатна структурна послідовність варіабельної ділянки акцептора, що стосується класу/типу



антитіла-донора, з якого був одержаний CDR, включаючи антитіла мишей, приматів і людини. Таким чином, у контексті даного винаходу CDR-привите антитіло має варіабельний домен, що складається з акцепторних каркасних ділянок людини, а також одного або декількох CDR або гіперваріабельних ділянок, описаних вище. В одному варіанті втілення винаходу таким чином

представлено нейтралізуюче CDR-привите антитіло, в якому варіабельний домен складається з каркасних ділянок-акцепторів людини і донорських CDR тварин.

Приклади каркасних ділянок людини, які можуть використовуватись в даному винаході, представлені KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY і POM (Kabat et al., див. вище). Наприклад, KOL і NEWM можуть використовуватись для важкого ланцюга, REI може використовуватись для легкого ланцюга, а EU, LAY і POM можуть використовуватись як для важкого, так і для легкого ланцюга. З іншого боку, можуть використовуватись ембріональні послідовності людини, представлені на <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

В CDR-привитому антитілі даного винаходу важкі і легкі ланцюги акцептора необов'язково повинні бути одержані з того самого антитіла, і можуть, за бажання, складатись з композитних ланцюгів, що мають каркасні ділянки, одержані з різних ланцюгів.

Придатна каркасна ділянка для важкого ланцюга CDR-привитого антитіла даного винаходу одержана з підгрупи VH3 послідовності людини 1-3 3-07 разом з JH4. Відповідно до цього, описується нейтралізуюче CDR-привите антитіло, що складається принаймні з одного донорського CDR, одержаного у тварин, в якому каркасна ділянка важкого ланцюга одержана з підгрупи VH3 послідовності людини 1-3 3-07 разом з JH4. Послідовність людського JH4 представлена в такий спосіб: (YFDY)WGQGTLLTVSS (Seq ID No: 22). Мотив YFDY є частиною CDR-H3, а не частиною каркасної ділянки 4 (Ravetch, J.V. et al., 1981, Cell, 27, 583-591).

Придатна каркасна ділянка для легкого ланцюга CDR-привитого антитіла даного винаходу одержана з ембріональної підгрупи VK1 послідовності людини 2-1 1-02 разом з JK4. Відповідно до цього описується нейтралізуюче CDR-привите антитіло, що складається принаймні з одного донорського CDR, одержаного у тварин, в якому каркасна ділянка легкого ланцюга одержана з підгрупи послідовності людини 2-1 1-02 разом з JK4. Послідовність JK1 представлена у такий спосіб: (WT)FGQGTKVEIK (Seq ID No: 23). Мотив WT є частиною CDR-L3, а не частиною каркасної ділянки 4 (Hieter, P.A., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

Крім того, в CDR-привитому антитілі даного винаходу каркасні ділянки необов'язково повинні мати ту саму послідовність, що і антитіло-акцептор. Наприклад, незвичайні залишки можуть бути замінені залишками для окремого типу або класу ланцюга акцептора, що найчастіше зустрічаються. З іншого боку, вибрані залишки в каркасних ділянках акцептора можуть бути змінені таким чином, щоб вони відповідали залишку, що перебуває в тому ж самому положенні, що і в антитілі-донорі (див. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Подібні зміни зведуть до мінімуму необхідність у відновленні афінності антитіла-донора. Протокол для вибору залишків у каркасних ділянках акцептора, який може вимагати змін, наводиться в WO 91/09967.

Таким чином, якщо в молекулі CDR-привитого антитіла даного винаходу важкий ланцюг акцептора має послідовність VH3 1-3 3-07 людини разом з JH4, тоді каркасні ділянки важкого ланцюга акцептора можуть включати, крім одного або декількох CDR донора, донорський залишок у положеннях принаймні однієї з позицій 37, 73, 78 або 94 (відповідно до Kabat et al., (див. вище)). Відповідно до цього, описується CDR-привите антитіло, в якому залишки принаймні у положеннях 37, 73, 78 і 94 варіабельного домену важкого ланцюга є донорськими залишками.

Таким чином, якщо в молекулі CDR-привитого антитіла даного винаходу легкий ланцюг акцептора має послідовність VK1 2-1 1-027 підгрупи людини разом з JK4, тоді каркасні ділянки легкого ланцюга акцептора можуть включати, крім одного або декількох CDR донора, донорський залишок у положеннях принаймні 64 або 71. Відповідно до цього, описується CDR-привите антитіло, в якому залишки принаймні у положеннях 64 і 71 варіабельного домену легкого ланцюга є донорськими залишками.

Донорські залишки є залишками від антитіла-донора, тобто антитіла, з якого були спочатку одержані CDR.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає важкий ланцюг, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, представленої на Фігурі 1 (b) SEQ ID NO:9.

Відповідно до даного винаходу, варіабельні домени антитіла можуть включати заміни, вставки та/або делеції однієї або декількох амінокислот без суттєвої зміни здатності антитіла зв'язуватись з OX40 і нейтралізувати активність OX40. Ефект заміни, вставок та/або делецій будь-яких амінокислот може з легкістю бути вивчений фахівцем у даній галузі, наприклад, з

використанням описаних тут способів, зокрема, представлених у Прикладах способах для визначення зв'язування OX40 і блокування ліганду.

В іншому варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає важкий ланцюг, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:9. В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає важкий ланцюг, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:9.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає легкий ланцюг, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, представленої на фігурі 1 (а) SEQ ID NO:7.

В іншому варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає легкий ланцюг, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:7. В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає легкий ланцюг, в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:7.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло даного винаходу включає важкий ланцюг, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:9, і легкого ланцюга, в якому варіабельний домен складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:7.

В іншому варіанті втілення винаходу антитіло складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, при цьому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:9, а варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:7. Таким чином, антитіло складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, при цьому варіабельний домен важкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:9, при цьому варіабельний домен легкого ланцюга складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:7.

Молекули антитіла даного винаходу можуть складатись з молекули повного антитіла, що мають важкі і легкі ланцюги повної довжини або їх фрагменти, і можуть бути представлені, але не обмежуючись цим, Fab, модифікованим Fab, Fab<sup>2</sup>, модифікованим Fab<sup>2</sup>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, антитілами з одиночним доменом (наприклад, VH або VL, або VHH), scFv, двох-, трьох- або чотиривалентними антитілами, Bis-scFv, діантитілами, триантитілами, тетратілами і фрагментами, що зв'язуються з епітопами, кожного із зазначених антитіл (див., наприклад, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217). Способи створення і виробництва таких фрагментів антитіл широко відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Інші фрагменти антитіла, призначені для використання в даному винаході, включають Fab і Fab<sup>2</sup> фрагменти, описані в міжнародних заявках на видачу патенту WO2005/003169, WO2005/003170 і WO2005/003171. Мультивалентні антитіла можуть мати множинну специфічність або бути моноспецифічними (див., наприклад, WO 92/22853 і WO05/113605).

В одному варіанті втілення винаходу антитіло відповідно до даного опису представлено білком злиття, що зв'язується з антитілом OX40, який складається з ділянки імунoglobуліну, наприклад, Fab або Fab<sup>2</sup> фрагмента, і одного або двох антитіл з одним доменом (dAb), зв'язаних з ним безпосередньо або побічно, наприклад, як це описане в WO2009/040562.

В одному варіанті втілення білок злиття складається з антитіл із двома доменами, наприклад, як пара варіабельного важкого (VH) і варіабельного легкого (VL) фрагментів, які в деяких випадках можуть бути з'єднані дисульфідним зв'язком.

В одному варіанті втілення винаходу елемент Fab або Fab<sup>2</sup> білка злиття має однакову або подібну специфічність у порівнянні з однодоменним антитілом або антитілами. В одному варіанті втілення винаходу Fab або Fab<sup>2</sup> має різну специфічність щодо однодоменного антитіла або антитіл, тобто, білок злиття є мультивалентним. В одному варіанті втілення винаходу мультивалентний білок злиття згідно з даним винаходом має ділянку зв'язування альбуміну, наприклад, пари VH/VL, що забезпечує зв'язування альбуміну.

Домени константної ділянки молекули антитіла даного винаходу, у випадку їх присутності, можуть відбиратись залежно від передбачуваної функції молекули антитіла, і, зокрема, від функцій ефектора, в яких може бути необхідність. Наприклад, домени константної ділянки можуть бути представлені доменами людських IgA, IgD, IgE, IgG або IgM. Зокрема, можуть використовуватись домени константної ділянки IgG людини, особливо ізотипи IgG1 і IgG3, якщо молекула антитіла призначається для використання в терапевтичних цілях і необхідні ефекторні функції антитіла. З іншого боку, ізотипи IgG2 і IgG4 можуть використовуватись, коли молекула антитіла призначається для лікувальних цілей і ефекторні функції антитіла не потрібні, наприклад, просто для блокування активності OX40. Слід приймати до уваги, що також можуть використовуватись варіанти послідовностей таких доменів константної ділянки. Наприклад, можуть використовуватись молекули IgG4, в яких серин у положенні 241 був заміщений проліном, як це описане в Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Фахівець в даній галузі також зрозуміє, що антитіла можуть піддаватись цілому ряду посттрансляційних модифікацій. Тип і ступінь таких модифікацій часто залежать від використовуваної лінії клітин-хазяїв для експресії антитіла, а також умов культивування. Подібні модифікації можуть включати зміни, виражені у вигляді глікозилювання, окиснення метіоніну, утворення дікетопіперазину, ізомеризації аспартату і деамідації аспарагіну. Частою модифікацією є втрата залишку основи з карбоксильного кінця (наприклад, лізину або аргініну) через дію карбоксипептидаз (як це описане Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Відповідно до цього, С-термінальний лізин важкого ланцюга антитіла, представленого на Фігурі 1 (f), SEQ ID NO: 15, може бути відсутнім.

В одному варіанті втілення винаходу важкий ланцюг антитіла складається з домену CH1, а легкий ланцюг антитіла складається з домену CL (каппа або лямбда).

В одному варіанті втілення винаходу антитіло, описуване даним винаходом, презентовано антагоністичним антитілом, що має специфічність до людського OX40, при цьому константна ділянка важкого ланцюга включає модифіковану шарнірну область. Згідно із цим, даний винахід описує антитіло, в якому важкий ланцюг складається з послідовності, представлені на Фігурі 1 (f), SEQ ID NO:15.

Відповідно до даного винаходу, варіабельні та/або константні домени антитіла можуть включати заміни, вставки та/або делеції однієї або декількох амінокислот без суттєвої зміни здатності антитіла зв'язуватись з OX40 і нейтралізувати активність OX40. Ефект заміни, вставок і/або делецій будь-яких амінокислот може з легкістю бути вивчений фахівцем у даній галузі, наприклад, з використанням описаних тут способів, зокрема, представлених у Прикладах способів для визначення зв'язування OX40 і блокування взаємодії OX40/OX40L.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло включає важкий ланцюг, в якому варіабельний домен складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:15. Згідно із цим, антитіло включає важкий ланцюг, який складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:15.

В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла складається з легкого ланцюга, що включає послідовність, представлену на Фігурі 1 (d), SEQ ID NO:11.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло включає легкий ланцюг, який складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:11. Наприклад, антитіло включає легкий ланцюг, і такий легкий ланцюг складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:11.

В одному варіанті втілення даний винахід описує антитіло, в якому важкий ланцюг включає послідовність, представлену в SEQ ID NO:15, а легкий ланцюг включає послідовність, представлену в SEQ ID NO:11.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, при цьому важкий ланцюг складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:15, а легкий ланцюг складається з послідовності, що має принаймні 60 % ідентичність або схожість з послідовністю SEQ ID NO:11. Як правило, антитіло складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, при цьому важкий ланцюг складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:15, а легкий ланцюг складається з послідовності, що має принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ідентичність або схожість з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:11.

Біологічні молекули, такі як антитіла або фрагменти, містять кислотні та/або основні функціональні групи, надаючи, таким чином, молекулі чистий позитивний або негативний заряд.

Кількість загальних "спостережуваних" зарядів буде залежати від абсолютної амінокислотної послідовності молекули, умов знаходження заряджених груп у трьохмірній структурі і умов навколишнього середовища молекули. Ізоелектрична точка (pI) являє собою значення pH, при якому окрема молекула або доступна поверхня розчинника не несе чистого негативного заряду.

5 В одному варіанті втілення винаходу антитіло або фрагмент, відповідно до представленого опису, має значення ізоелектричної точки (pI) принаймні 7. В одному варіанті втілення винаходу антитіло або фрагмент має значення ізоелектричної точки принаймні 8, тобто 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 або 9.

10 Антитіло до ОХ40 і його фрагменти за цим винаходом були розроблені для того, щоб мати відповідне значення ізоелектричної точки. Це може привести до появи антитіл і/або фрагментів з більш робастними властивостями, зокрема придатними профілями розчинності та/або стійкості та/або поліпшеними характеристиками очищення.

Таким чином, в одному своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до ОХ40, розроблене з метою наявності ізоелектричної точки, значення якої відрізняється від такого значення у оригінально виявленого антитіла CA044\_00026. Наприклад, антитіло може бути сконструйоване шляхом заміни кислотного амінокислотного залишку, наприклад, заміни амінокислотного залишку одним або декількома основними амінокислотними залишками. З іншого боку, можуть бути вставлені основні амінокислотні залишки, а кислотні амінокислотні залишки можуть бути видалені. З іншого боку, якщо молекула має неприйнятно високе значення pI, для зниження такого значення pI можуть бути введені кислотні амінокислотні залишки (якщо буде необхідність). Цільове значення pI сконструйованого антитіла або фрагмента за необхідності може становити, наприклад, 8 або вище, наприклад, 8,5 або 9. Маніпуляції із значенням pI слід робити з обережністю, щоб зберегти бажану активність антитіла або фрагмента. Таким чином, в одному варіанті втілення винаходу сконструйоване антитіло або

20 фрагмент має таку ж саму або практично таку ж саму активність, що і "немодифіковане" антитіло або фрагмент.

Для прогнозування значення ізоелектричної точки антитіла або фрагмента можуть використовуватись такі програми, як \*\* ExPASy [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), і [http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d\\_abim/compo-p.html](http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html).

30 Крім того, даний винахід передбачає наявність специфічної ділянки або епітопу людського ОХ40, який зв'язується з антитілом даного винаходу, зокрема, з антитілом, що включає послідовність важкого ланцюга gH2 (SEQ ID NO:9) і/або послідовність легкого ланцюга gL8 (SEQ ID NO:7).

Така специфічна ділянка або епітоп людського поліпептиду ОХ40 може бути ідентифікована за допомогою будь-якого придатного способу картирування антигенних епітопів, відомих в даній галузі, у комбінації з будь-яким антитілом даного винаходу. Приклади таких способів включають скринінг пептидів різної довжини, одержаних з ОХ40, для зв'язування антитіла даного винаходу з найменшим фрагментом, який може специфічно зв'язуватись з антитілом, що містить послідовність антигенної детермінанти, яка розпізнається антитілом. Пептиди ОХ40 можуть бути одержані шляхом синтезу або протеолізу поліпептиду ОХ40. Пептиди, що зв'язуються з антитілом, можуть бути ідентифіковані, наприклад, за допомогою мас-спектрометричного аналізу. Інший приклад: для ідентифікації епітопу, зв'язаного антитілом даного винаходу, може використовуватись ЯМР-спектроскопія або рентгенівська кристалографія. Як тільки була проведена ідентифікація, фрагмент епітопу, який зв'язується з антитілом даного винаходу, може використовуватись (якщо буде необхідність) як імуноген для одержання додаткових

40 антагоністичних антитіл, що зв'язуються з таким же епітопом.

Антитіла, що блокують перехресним чином зв'язування антитіла даного винаходу, зокрема, антитіла, що складаються з послідовності важкого ланцюга gH2 (SEQ ID NO:9) і послідовності легкого ланцюга gL8 (SEQ ID NO:7), можуть бути подібним чином корисні в антагонізованні активності ОХ40. Відповідно до цього, даний винахід також описує антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського ОХ40 і має блокувальне зв'язування будь-якого описаного вище антитіла з ОХ40 людини перехресним чином і/або блокувальне зв'язування ОХ40 з кожним з таких антитіл перехресним чином. В одному способі втілення винаходу подібне антитіло зв'язується з таким же самим епітопом, що і описане вище антитіло. В іншому варіанті втілення винаходу нейтралізуюче антитіло, що блокує перехресним чином, зв'язується з епітопом, який граничить і/або перекривається з епітопом, зв'язаним описаним вище антитілом. В іншому варіанті втілення винаходу нейтралізуюче антитіло даного аспекту винаходу, що блокує перехресним чином, не зв'язується з тим самим епітопом, що і антитіло даного винаходу, або епітопом, який граничить і/або перекривається із зазначеним епітопом.

50

55

Антитіла, які блокують перехресним чином, можуть бути ідентифіковані за допомогою будь-якого придатного способу, наприклад, при використанні аналізів ІФА або ВІАcore, в яких зв'язування антитіла, яке блокує перехресним чином, з людським ОХ40 запобігає зв'язуванню антитіла даного винаходу або навпаки.

В одному варіанті втілення винаходу представлено антагоністичне антитіло, що має специфічність до людського ОХ40, при цьому блокуючи перехресним чином зв'язування антитіла, важкий ланцюг якого складається з послідовності gH2 (SEQ ID NO:9), а легкий ланцюг складається з послідовності gL8 (SEQ ID NO:7), з людським ОХ40. В одному варіанті втілення винаходу описані антитіла, які блокують перехресним чином, інгібують зв'язування антитіла, що складається з важкого ланцюга з послідовністю gH2 (SEQ ID NO:9) і легкого ланцюга з послідовністю gL8 (SEQ ID NO:7), більш ніж на 80 %, наприклад, більш ніж на 85 %, більш ніж на 90 %, зокрема, більш ніж на 95 %.

З іншого боку, антагоністичні антитіла даного аспекту винаходу можуть бути блоковані перехресним чином від зв'язування з людським ОХ40 антитілом з послідовністю важкого ланцюга gH2 (SEQ ID NO:9) і послідовністю легкого ланцюга gL8 (SEQ ID NO:7). Крім того, представлена молекула антагоністичного антитіла, що має специфічність до людського ОХ40, що блокується перехресним чином від зв'язування з людським ОХ40 антитілом з послідовністю важкого ланцюга gH2 (SEQ ID NO:9) і послідовністю легкого ланцюга gL8 (SEQ ID NO:7). В одному варіанті втілення винаходу описані в цьому варіанті втілення винаходу антагоністичні антитіла інгібовані від зв'язування людського ОХ40 антитілом, що складається із важкого ланцюга з послідовністю gH2 (SEQ ID NO:9) і легкого ланцюга з послідовністю gL8 (SEQ ID NO:7), більш ніж на 80 %, наприклад, більш ніж на 85 %, більш ніж на 90 %, зокрема, більш ніж на 95 %.

В одному варіанті втілення винаходу представлені антитіла, що блокують зв'язування перехресним чином, є повністю людськими. В одному варіанті втілення винаходу представлені антитіла, що блокують зв'язування перехресним чином, є гуманізованими. В одному варіанті втілення винаходу представлені антитіла, що блокують зв'язування перехресним чином, мають афінність до людського ОХ40 100 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу представлені антитіла, що блокують зв'язування перехресним чином, мають афінність до людського ОХ40 50 пмоль або вище.

В одному варіанті втілення винаходу представлені в даному винаході антитіла, що блокують зв'язування перехресним чином, мають значення ізоелектричної точки принаймні 7, наприклад, принаймні 8, тобто 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 або 9,0.

Молекули антитіла даного винаходу мають відповідно високе значення афінності, зокрема, виражене в пікомолях. Афінність може бути виміряна з використанням будь-якого придатного і відомого науці способу, включаючи аналіз ВІАcore, як це описано в Прикладах нижче, із застосуванням виділеного природного або рекомбінантного ОХ40 або придатного білка злиття/поліпептиду. В одному прикладі афінність вимірюється з використанням позаклітинного домену людського рекомбінантного ОХ40, як це описано в Прикладах даної заявки на винахід. В одному прикладі використовуваний позаклітинний домен людського рекомбінантного ОХ40 представлений димером, наприклад, димером злиття Fc. Відповідно, молекули антитіла даного винаходу мають значення афінності зв'язування з ізольованим людським ОХ40 200 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу має значення афінності зв'язування, що дорівнює 100 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу має значення афінності зв'язування, що дорівнює 50 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу має значення афінності зв'язування, що дорівнює 40 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу має значення афінності зв'язування, що дорівнює 30 пмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу представлена повністю людським або гуманізованим антитілом і має значення афінності зв'язування, що дорівнює 100 пмоль або вище.

Молекули антитіла даного винаходу мають відповідний високий показник афінності для зв'язування з людським ОХ40, що експресується на поверхні активованих Т-клітин, наприклад, у значеннях наномоль або пікомоль. Афінність може бути виміряна з використанням будь-якого відповідного і відомого науці способу, включаючи спосіб, описаний у Прикладах даної заявки на винахід, із застосуванням активованих CD4<sup>+</sup>ОХ40<sup>+</sup> Т-клітин людини. Зокрема, молекули антитіла даного винаходу мають значення афінності зв'язування з людським ОХ40, що експресується на поверхні клітин, яке дорівнює 2 нмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу молекули антитіла даного винаходу мають значення афінності зв'язування з людським ОХ40, що експресується на поверхні клітин, яке дорівнює 1,5 нмоль або вище. В іншому варіанті втілення

винаходу молекули антитіла даного винаходу мають значення афінності зв'язування з людським ОХ40, що експресується на поверхні клітин, яке дорівнює 1,2 нмоль або вище. В одному варіанті втілення винаходу описується молекула повністю людського або гуманізованого антитіла, що має афінність зв'язування 2 нмоль або вище з людським ОХ40, що експресується на поверхні клітин.

Слід мати на увазі, що афінність антитіл даного винаходу може бути змінена з використанням будь-якого відповідного і відомого науці способу. Таким чином, даний винахід також розглядає варіанти молекул антитіл даного винаходу з покращеним показником афінності відносно ОХ40. Такі варіанти можуть бути одержані за допомогою цілого ряду протоколів "дозрівання афінності", включаючи мутації CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), перестановки в ланцюзі (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), застосування мутаційних штамів E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), зміни послідовності ДНК (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фарові дисплеї (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) і статеві ПЦР (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (див. вище) проводить обговорення таких способів "созрівання афінності".

В одному варіанті втілення винаходу молекули антитіла даного винаходу блокують взаємодію між ОХ40 і ОХ40L. У прикладах описані численні аналізи, що підходять для визначення здатності антитіла блокувати такі взаємодії. В одному варіанті втілення винаходу описується нейтралізуюче антитіло, що має специфічність до людського ОХ40 і здатне інгібувати зв'язування людського ОХ40L (тестовано при кінцевій концентрації 2 мкг/мл) з активованими CD4+ОХ40+T- клітинами людини на 50 % при концентрації менше 5 нмоль. В одному варіанті втілення винаходу використовувані в аналізі людські ОХ40L представлені природним людським ОХ40. В одному варіанті втілення винаходу використовувані в аналізі людські ОХ40 представлені рекомбінантним людським ОХ40. В одному варіанті втілення винаходу нейтралізуюче антитіло представлене гуманізованим або повністю людським антитілом.

За необхідності, антитіло для використання в даному винаході може бути кон'юговане з однією або декількома молекулами-ефекторами. Слід мати на увазі, що молекула-ефектор може включати одну молекулу-ефектор або дві або більше подібних молекул, з'єднаних таким чином, щоб утворювати одну загальну молекулу, яка може приєднуватись до антитіл даного винаходу. Якщо буде необхідність в одержанні фрагмента антитіла, приєданого до молекули-ефектора, це можна здійснити за допомогою стандартних хімічних способів або способів рекомбінації ДНК, в ході яких фрагмент антитіла зв'язується безпосередньо або за допомогою з'єднувального агента з молекулою-ефектором. Способи кон'югування таких молекул-ефекторів разом з антитілами добре відомі в даній галузі техніки (див. 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). Окремі хімічні процедури включають, наприклад, процедури, описані в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 і WO03031581. З іншого боку, якщо молекула-ефектор представлена білком або поліпептидом, зв'язок може бути утворений з використанням процедур рекомбінації ДНК, наприклад, як це описане в WO 86/01533 і EP0392745.

Термін молекула-ефектор у контексті даного винаходу включає, наприклад, протипухлинні агенти, препарати, токсини, біологічно активні білки, наприклад, ферменти, інші антитіла або фрагменти антитіл, синтетичні або природні полімери, нуклеїнові кислоти і їх фрагменти, наприклад, ДНК, РНК і їх фрагменти, радіонукліди, зокрема, радіойоди, радіоізотопи, хелатоутворюючі метали, наночастки і "репортерні" групи, такі як флуоресціюючі сполуки або сполуки, які можуть бути визначені за допомогою ЯМР або спектроскопії ЕПР.

Приклади молекул-ефекторів можуть включати цитотоксини або цитотоксичні агенти, включаючи будь-які агенти, які діють згубним чином (наприклад, вбивають) на клітини. Приклади включають комбрестатини, доластатини, епотилони, стауроспорини, майтансинаїди, спонгістатини, ризоксини, халіхондрини, рорідини, геміастерліни, таксол, цитохаласин В, граміцидин D, етідію бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин, а також їх аналоги і гомологи.

Молекули-ефектори також включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогuanін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіотепу хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклотосфамід, бусульфан, дибромманнітол, стрептозотозин, мітоміцин С і цис-дихлордіамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше

- дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше - актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин, антраміцин (АМС), каліхеаміцини або дуокарміцини), і антимітотичні агенти (наприклад, вінкрисдин і вінбластин).

Інші молекули-ефектори можуть включати хелуючі радіонукліди, такі як  $^{111}\text{In}$  і  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , Вісмут $^{213}$ , Каліфорній $^{252}$ , Іридій $^{192}$  і Вольфрам $^{188}$ /Реній $^{188}$ , або препарати, такі як алкілфосфохоліни, інгібітори топоізомерази I, таксоїди і сурамін.

Інші молекули-ефектори включають білки, пептиди і ферменти. Ферменти, що представляють інтерес, включають, але не обмежуються цим, протеолітичні ферменти, гідролази, ліази, ізомерази, трансферази. Білки, що представляють інтерес, поліпептиди і пептиди включають, але не обмежуються цим, наступні: імуноглобуліни, токсини, такі як абрін, рицин А, екзотоксин *pseudomonas* або дифтерійний токсин, білок, наприклад, інсулін, фактор некрозу пухлин,  $\alpha$ -інтерферон,  $\beta$ -інтерферон, фактор росту нервів, тромбоцитарний фактор росту або тканинний активатор плазміногену, тромбоцитарний агент або антиангіогенний агент, наприклад інгібітор ангіогенезу, наприклад, ангіостатин або ендостатин, або модифікатор біологічної відповіді, наприклад, лімфокін, інтерлейкін-1 (ІЛ-1), інтерлейкін-2 (ІЛ-2), гранулоцитарно-макрофаговий колонієстимулюючий фактор (ГМСКФ), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (ГКСФ), фактор росту нервів (ФРН) або інші фактори росту та імуноглобуліни.

Інші молекули-ефектори можуть включати речовини, які можуть виявити, використовувати, наприклад, при діагностиці. Приклади речовин, які можуть виявити, включають різні ферменти, простетичні групи, матеріали, що флуоресціюють, люмінесцентні матеріали, біоломінесцентні матеріали, радіоактивні нукліди, позитрон-випромінювальні метали (для використання в позитрон-емісійній томографії) і нерадіоактивні парамагнітні іони металів. Іони металів, які можуть бути кон'юговані з антитілами для використання при діагностиці, представлені в патенті США № 4 741 900. Придатні ферменти включають пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу; придатні простетичні групи включають стрептавідин, авідин і біотин; придатні флуоресціюючі матеріали включають умбелліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламіну флуоресцеїн, дансилу хлорид і фікоеритрин; придатні люмінесцентні матеріали включають люмінол; придатні біоломінесцентні матеріали включають люциферазу, люциферин і екворин; придатні радіоактивні нукліди включають  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  і  $^{99}\text{Tc}$ .

В іншому прикладі молекула-ефектор може збільшувати період напіввиведення антитіла *in vivo* і/або знижувати імуногенність антитіла та/або проникність антитіла через епітеліальний бар'єр в імунну систему. Приклад придатних молекул-ефекторів такого типу включає полімери, альбумін, альбумін-з'єднувальні білки, або альбумін-з'єднувальні сполуки, наприклад, описані в WO05/117984.

Якщо молекула-ефектор представлена полімером, вона може бути, як правило, синтетично одержаним або природним полімером, наприклад, поліалкіленом із заміщеним в деяких випадках прямим або розгалуженим ланцюгом, поліалкеніленом або поліоксіалкілен полімером або полісахаридом з розгалуженим або нерозгалуженим ланцюгом, наприклад, гомо- або гетерополісахаридом.

Специфічні оптичні замісники, які можуть бути присутніми у зазначених вище синтетичних полімерах, включають одну або декілька гідроксильних, метильних або метоксі-груп.

Специфічні приклади синтетичних полімерів включають поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, полівініловий спирт, які в деяких випадках можуть мати заміщувальні групи в прямому або розгалуженому ланцюгу, або їх похідні, зокрема, заміщений у деяких випадках поліетиленгліколь, наприклад, метоксіполіетиленгліколь або його похідні.

Специфічні полімери, що зустрічаються в природі, включають лактозу, амілозу, декстран, глікоген або їх похідні.

Термін "похідні" в контексті даного винаходу означає реакційноздатні похідні, наприклад, тіол-селективні реакційні групи, такі як малеїміди і т.п. Реакційна група може прямо або опосередковано (за допомогою лінкера) бути приєднана до полімеру. Слід мати на увазі, що залишок такої групи в деяких випадках утворює частину продукту як групу-лінкер між фрагментом антитіла і полімером.

Розмір полімеру може, за бажання, варіювати, однак в середньому молекулярна вага варіює від 500 Да до 50000 Да, наприклад, від 5000 до 40000 Да або від 20000 до 40000 Да. Розмір полімеру може вибиратися, зокрема, на основі передбачуваного використання продукту, наприклад здатності локалізувати певні тканини, наприклад, пухлини, або продовжувати період напіввиведення (див., наприклад, Charman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким чином, якщо продукт повинен покинути кровоносне русло і проникнути в тканину,

наприклад, для використання у лікуванні пухлини, переважним буде використання полімеру з невеликою молекулярною масою, наприклад, з молекулярною масою близько 5000 Да. У випадку якщо продукт повинен залишитись в кровотоці, переважним буде використовувати полімер з високою молекулярною масою, наприклад, з молекулярною масою в діапазоні від 20000 Да до 40000 Да.

Придатні полімери включають поліалкілени, наприклад, поліетиленгліколь або, зокрема, метоксіполіетиленгліколь або його похідне, з молекулярною масою в діапазоні приблизно від 15000 Да до приблизно 40 000 Да.

В одному прикладі антитіла для використання в даному винаході приєднані до молекул поліетиленгліколю (ПЕГ). В окремому прикладі антитіло представлено фрагментом антитіла, і молекули ПЕГ можуть приєднуватись за допомогою будь-якого наявного амінокислотного бокового ланцюга або термінальної функціональної групи амінокислоти, розташованої на фрагменті антитіла, наприклад, вільної аміно-, іміно-, тіолової, гідроксильної або карбоксильної групи. Такі амінокислоти можуть виникнути природно у фрагменті антитіла або можуть бути синтезовані у фрагмент із використанням способів рекомбінації ДНК (див., наприклад, патенти США №№ 5 219 996; 5 667 425; WO98/25971). В одному прикладі молекула антитіла даного винаходу представлена модифікованим Fab-фрагментом, в якому модифікація полягає у додаванні до С-кінця важкого ланцюга однієї або декількох амінокислот, що дозволяє приєднати молекулу-ефектор. Подібним чином, додаткові амінокислоти утворюють модифіковану шарнірну ділянку, що містить один або декілька залишків цистеїну, до яких може приєднуватись молекула-ефектор. Для приєднання двох або декількох молекул ПЕГ може використовуватись декілька ділянок.

Придатні молекули ПЕГ приєднуються ковалентним чином за допомогою тіолової групи принаймні одного залишку цистеїну, розташованого у фрагменті антитіла. Кожна молекула полімеру, приєднана до модифікованого фрагмента антитіла, може бути ковалентно приєднана до атома сірки залишку цистеїну у фрагменті. Ковалентний зв'язок у цілому буде представлений дисульфідним зв'язком або, зокрема, зв'язком між атомами сірки і вуглецю. Якщо тіолова група використовується як ділянка приєднання активованих відповідним чином молекул-ефекторів, можуть використовуватись, наприклад, вибіркові тіолові похідні, такі як малеїміди і похідні цистеїну. Як вихідний матеріал в одержанні полімер-модифікованих фрагментів антитіл, як це описане вище, може використовуватись активований полімер. Активований полімер може бути представлений будь-яким полімером, що містить реакційноздатну тіолову групу, наприклад,  $\alpha$ -галогенкарбоною кислотою або ефіром, наприклад, йодацетамідом, імідом, наприклад, малеїмідом, вінілсульфоном або дисульфідом. Такі вихідні матеріали можуть бути одержані у виробників (наприклад, від компанії Nektar, раніше Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, США) або із представлених на ринку вихідних матеріалів з використанням загальноприйнятих хімічних процедур. Окремі молекули ПЕГ включають 20 K метоксі-ПЕГ-амін (наданий компаніями Nektar, раніше Shearwater; Rapp Polymere; і SunBio) і M-PEG-SPA (наданий компанією Nektar, раніше Shearwater).

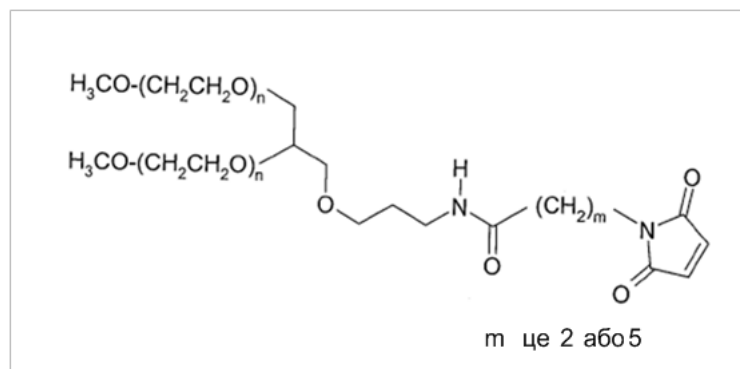
В одному варіанті втілення винаходу антитіло представлено модифікованим Fab або diFab ПЕГільованим фрагментом, тобто фрагментом, який містить ПЕГ (поліетиленгліколь), ковалентно приєднаний до фрагмента, наприклад, згідно зі способом, описаним в EP 0948544 або EP1090037 [див. також "Poly(ethyleneglycol) 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 одному прикладі ПЕГ приєднується до цистеїну в шарнірній ділянці. В одному прикладі модифікований ПЕГ Fab фрагмент включає малеїмідну групу, яка ковалентно приєднана до єдиної тіолової групи в модифікованій шарнірній ділянці. Залишок лізину може бути ковалентно приєднаний до малеїмідної групи і до кожної аміногрупи залишку лізину може бути приєднаний полімер метоксіполіетиленгліколь з молекулярною масою близько 20 000 Да. Таким чином, загальна молекулярна маса ПЕГ, приєданого до фрагмента Fab, може становити близько 40 000 Да.

В одному варіанті втілення винаходу даний винахід описує молекулу антагоністичного антитіла, що має специфічність до людського OX40, і таке антитіло представлено модифікованим Fab фрагментом, в якому важкий ланцюг має послідовність SEQ ID NO:9, легкий ланцюг має послідовність SEQ ID NO:7, а на С-кінці важкого ланцюга знаходиться модифікована шарнірна ділянка, що містить принаймні один залишок цистеїну, до якого приєднана молекула-ефектор. Молекула-ефектор, відповідно, представлена ПЕГ і

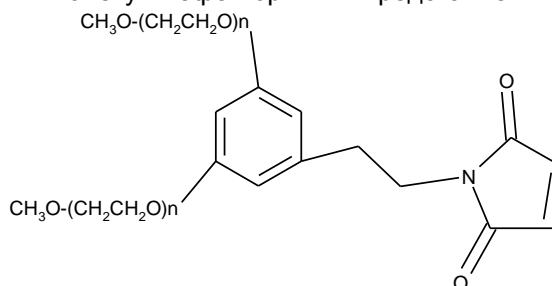


приєднується з використанням способів, описаних в WO98/25971 і WO2004072116 або WO2007/003898. Молекула-ефектор приєднується таким чином, що лізил-малеїмідна група приєднується до залишку цистеїну на С-кінці важкого ланцюга, і кожна аміногрупа залишку лізину ковалентно приєднується до свого залишку метоксиполіетиленгліколю з молекулярною масою близько 20 000 Да. Таким чином, загальна молекулярна маса ПЕГ, приєданого до антитіла, може становити близько 40 000 Да. Окремі молекули ПЕГ включають 2-[3-(N-Малеїмідо)пропіонамідо]етиламід N, N'-біс(метоксиполі(етиленгліколь) MW 20,000) модифікованого лізину, також відомий як PEG2MAL40K (надається компанією Nektar, раніше Shearwater).

Альтернативні джерела лінкерів ПЕГ включають компанію NOF, що постачає GL2-400MA2 (де m у структурі нижче являє собою 5) і GL2-400MA (де m являє собою 2) і n становить приблизно 450:



Таким чином, молекулярна маса кожного ПЕГ становить приблизно 20 000 Да. Додаткові альтернативні молекули-ефектори ПЕГ представлені наступним:



і надаються компаніями Dr Reddy, NOF і Jenkem.

В одному варіанті втілення винаходу описане ПЕГільоване антитіло (наприклад, за допомогою описаного тут ПЕГ), при цьому ПЕГ приєднується за допомогою залишку амінокислоти цистеїну в положенні амінокислоти 226 ланцюга, наприклад, амінокислоти 226 важкого ланцюга (рахується по-порядку).

В одному варіанті втілення винаходу даний винахід описує молекулу антагоністичного антитіла, що має специфічність до людського OX40; таке антитіло представлене модифікованим Fab фрагментом, в якому важкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:15, легкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:11; крім того, є молекула-ефектор, яка приєднується до цистеїну в положенні 226 важкого ланцюга (лінійна нумерація від SEQ ID NO:15). Молекула-ефектор представлена ПЕГ і приєднується з використанням способів, описаних в WO98/25971 і WO2004072116 або WO2007/003898; лізил-малеїмідна група приєднується до залишку цистеїну в положенні 226 важкого ланцюга (SEQ ID NO:15), і кожна аміногрупа залишку лізину ковалентно пов'язана із залишком метоксиполіетиленгліколю з молекулярною масою близько 20 000 Да. Таким чином, загальна молекулярна маса ПЕГ, приєданого до антитіла, може становити близько 40 000 Да. Окремі молекули ПЕГ включають 2-[3-(N-малеїмідо)пропіонамідо]етиламід N, N'-біс(метоксиполі(етиленгліколь) MW 20,000) модифікованого лізину, також відомий як PEG2MAL40K (надається компанією Nektar, раніше Shearwater). Молекула антитіла даного винаходу представлена ПЕГільованим модифікованим Fab" фрагментом, як це показано на Фігурі 2. ПЕГільована молекула в контексті даного винаходу вказується як A26 Fab'-PEG.

В іншому прикладі молекула-ефектор може приєднуватись до фрагментів антитіла з використанням способів, описаних у заявках WO2005/003169, WO2005/003170 і WO2005/003171.

Даний винахід також описує ізольовані послідовності ДНК, що кодують важкі та/або легкі ланцюг(и) молекули антитіла даного винаходу. Послідовність ДНК кодує важкий або легкий ланцюг молекули антитіла даного винаходу. Послідовність ДНК даного винаходу може бути представлена синтетично одержаною ДНК, наприклад, за допомогою хімічної обробки, кДНК, геномної ДНК або кожної із зазначених комбінацій. Послідовності ДНК, що кодують молекулу антитіла даного винаходу, можуть бути одержані з використанням широко відомих науці способів. Наприклад, послідовності ДНК, що кодують частину або повні важкі або легкі ланцюги антитіла, можуть бути синтезовані за необхідності з певних послідовностей ДНК або на основі відповідних амінокислотних послідовностей.

ДНК, що кодують послідовності каркасних ділянок акцептора, широко відомі фахівцям у даній галузі і можуть бути з легкістю синтезовані на основі відомих амінокислотних послідовностей.

Для одержання послідовностей ДНК, що кодують молекулу антитіла даного винаходу, можуть використовуватись стандартні способи молекулярної біології. Необхідні послідовності ДНК можуть бути синтезовані повністю або частково з використанням способів синтезу олігонуклеотидів. Також може використовуватись сайт-специфічний мутагенез і полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Приклади придатних послідовностей представлено на Фігурі 1 (h) SEQ ID NO:8; Фігурі 1 (i) SEQ ID NO:10; Фігурі 1 (j) SEQ ID NO:13; Фігурі 1 (k) SEQ ID NO:14; Фігурі 1 (l) SEQ ID NO:17 і Фігурі 1 (m) SEQ ID NO:18. Нуклеотиди 1-63 в SEQ ID NO 18 і 1-63 в SEQ ID NO:14 кодують послідовність сигнального пептиду OmpA, який розщеплюється з одержанням молекули антагоністичного антитіла даного винаходу (сигнальний пептид відповідає залишкам амінокислот 1-21 на Фігурі 1 (g) SEQ ID NO: 16 і 1-21 на Фігурі 1 (e) SEQ ID NO:12, відповідно). Даний винахід також описує ізольовані послідовності ДНК, що кодують важкий ланцюг антитіла даного винаходу, що включають SEQ ID NO:17 або SEQ ID NO:18. Даний винахід також описує ізольовані послідовності ДНК, що кодують легкий ланцюг антитіла даного винаходу, що включають SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:14.

Даний винахід також описує вектор клонування або вектор експресії, що включає одну або декілька послідовностей ДНК даного винаходу. Відповідно до цього представлений вектор клонування або вектор експресії, що включають одну або декілька послідовностей ДНК, кодуючих антитіло даного винаходу. Вектор клонування або вектор експресії складається із двох послідовностей ДНК, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг молекули антитіла даного винаходу, відповідно. Таким чином, відповідно до даного винаходу вектор включає послідовності SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:18. Нуклеотиди 1-6 в SEQ ID NO 18 і 1-63 в SEQ ID NO 14 кодують послідовність сигнального пептиду OmpA (залишки 1-21 в SEQ ID NO: 16 і 1-21 в SEQ ID NO:12, відповідно), який може розщеплюватись з утворенням молекули нейтралізуючого антитіла даного винаходу. В одному прикладі вектор включає міжгенну послідовність між важким і легким ланцюгами, наприклад IGS2 (див. WO03/048208). Відповідно до цього в одному варіанті втілення винаходу вектор включає послідовність, представлену на Фігурі 1 (n) (SEQ ID NO:19).

Загальні способи конструювання векторів, способи трансфекції і культивування широко відомі фахівцям в даній області. Див. "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

Крім того, описується також клітина-хазяїн, що включає один або декілька векторів клонування або експресії, які, у свою чергу, складаються з однієї або декількох послідовностей ДНК, що кодують антитіло даного винаходу. Для експресії послідовностей ДНК, що кодують молекулу антитіла даного винаходу, може використовуватись будь-яка придатна система клітина-хазяїн/вектор. Можуть використовуватись бактеріальні, наприклад, E. coli, та інші системи мікроорганізмів, або еукаріотичні системи експресії в клітинах-хазяїнах (наприклад, ссавців). Придатні клітини-хазяї ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини мієломи або гібридами.

Даний винахід також описує спосіб виробництва молекули антитіла відповідно до даного винаходу, і такий спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить вектор даного винаходу, в умовах, що підходять для проведення експресії білка із ДНК, що кодує молекулу антитіла даного винаходу з її наступною ізоляцією.

Молекула антитіла може складатись тільки з поліпептиду легкого або важкого ланцюга; у такому випадку для трансфекції клітин-хазяїв може використовуватись кодуєча послідовність тільки для легкого або важкого ланцюга. Для виробництва продукції, що включає як важкий, так і легкий ланцюги, лінія клітин може бути трансфікована двома векторами: перший вектор кодує

5

поліпептид легкого ланцюга, другий вектор кодує поліпептид важкого ланцюга. З іншого боку, може використовуватись один вектор, який включає послідовності, що кодують поліпептиди легкого і важкого ланцюгів.

10

Антитіла даного винаходу і їх фрагменти експресуються в клітинах-хазяїнах на досить високому рівні. Таким чином, оптимізовані властивості антитіл і/або фрагментів, що підходять для комерційного виробництва.

15

Оскільки антитіла даного винаходу корисні у лікуванні та/або профілактиці патологічного стану, даний винахід також описує фармацевтичну або діагностичну композицію, що включає молекулу антитіла даного винаходу в комбінації з однією або декількома фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, розчинником або носієм. Відповідно до цього, антитіло винаходу використовується для виробництва лікарського препарату. Композиція буде

20

постачатись, як правило, як частина стерильної фармацевтичної композиції, яка зазвичай буде включати фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтична композиція даного винаходу може додатково включати фармацевтично прийнятний ад'ювант.

25

Даний винахід також описує спосіб виробництва фармацевтичної або діагностичної композиції, який включає додавання і змішування молекули антитіла даного винаходу з однією або декількома фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, розчинником або носієм.

30

Молекула антитіла може виступати як єдина активна діюча речовина або діагностична композиція, або може супроводжуватись іншими активними діючими речовинами, включаючи інші компоненти антитіла, наприклад, антитіло до ФНО, антитіло до ІЛ-1 $\beta$ , антитіло до Т-клітин, антитіло до ІФН- $\gamma$  або антитіло до ЛПС, або інгредієнти, що не є антитілами, наприклад, ксантини. Інші придатні активні діючі речовини містять антитіла, здатні індукувати переносимість, наприклад, антитіла до CD3 або CD4.

35

У додатковому варіанті втілення винаходу антитіло, фрагмент або композиція, які відповідають опису, включені в комбінацію з додатковою фармацевтично активною речовиною, наприклад, кортикостероїдом (таким як флутиказону пропіонат), і/або бета-2-агоністом (таким як сальбутамол, сальметерол або формотерол), або інгібіторами клітинного росту і проліферації (такими як рапаміцин, циклофосфамід, метотрексат), або, в іншому випадку, інгібітором CD28 і/або CD40. В одному варіанті втілення винаходу інгібітор є невеликою молекулою. В іншому варіанті втілення винаходу інгібітор представлений антитілом, специфічним відносно мішені.

40

Фармацевтична композиція включає терапевтично ефективну кількість антитіла винаходу. Термін "терапевтично ефективна кількість" у контексті даного винаходу стосується кількості терапевтичного агента, необхідної для лікування, ослаблення або запобігання зазначеному захворюванню або стану, або для надання помітного лікувального або превентивного ефекту.

45

Для будь-якого антитіла терапевтично ефективна кількість може бути оцінена спочатку за допомогою аналізів клітинних культур або на тваринних моделях, звичайно на гризунах, кроликах, собаках, свинях або приматах. Тваринна модель також може використовуватись для визначення відповідного діапазону концентрацій і шляхів введення. Подібна інформація може використовуватись для визначення корисних доз і шляхів введення людині.

50

Точна терапевтично ефективна кількість для людини буде залежати від ступеню важкості захворювання, загального стану здоров'я пацієнта, віку, ваги і статі, дієти, часу і частоти введення, комбінації(-й) препаратів, реакції чутливості і переносимості/відповіді на лікування. Така кількість може бути визначена за допомогою стандартних способів і встановлюється на розсуд лікаря. Як правило, терапевтично ефективна кількість буде становити від 0,01 мг/кг до 50 мг/кг, наприклад, від 0,1 мг/кг до 20 мг/кг. Фармацевтичні композиції для зручності будуть представлені в одиницях лікарської форми, що містить визначену кількість активної діючої речовини винаходу на дозу.

55

Композиції можуть вводитись пацієнтові окремим чином або можуть вводитись в комбінації (наприклад, одночасно, послідовно або роздільно) з іншими агентами, препаратами або гормонами.

60

Доза, що вводиться пацієнтові і містить молекулу антитіла даного винаходу, залежить від природи стану, підданого лікуванню, ступеню присутнього запалення і способу використання молекули антитіла (для профілактики або лікування існуючого стану).

Частота дози буде залежати від часу напівжиття молекули антитіла і тривалості його ефекту. Якщо молекула антитіла має короткий період напіввиведення (наприклад, 2-10 годин),

може стати необхідним одержання однієї або декількох доз на добу. З іншого боку, якщо молекула антитіла має тривалий період напіввиведення (наприклад, 2-15 днів), доза може прийматись один раз на день, один раз на тиждень або навіть один раз щомісяця, або кожні 2 місяця.

Фармацевтично прийнятний носій сам по собі не повинен індукувати вироблення антитіл, що діють згубним чином на пацієнта, який приймає композицію, і не повинен бути токсичним. Придатні носії можуть бути представлені великими макромолекулами, що зазнають повільного метаболізму, такими як білки, поліпептиди, ліпосоми, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, амінокислотні співполімери і неактивні вірусні частки.

Можуть використовуватись фармацевтично прийнятні солі, наприклад, солі мінеральних кислот, такі як гідрохлориди, гідроброміди, фосфати і сульфати, або солі органічних кислот, такі як ацетати, пропіонати, малонати і бензоати.

Фармацевтично прийнятні носії в терапевтичних композиціях можуть додатково містити такі рідини, як вода, фізіологічний розчин, гліцерин і етанол. Крім того, у таких композиціях можуть бути присутніми допоміжні речовини, такі як змочувальні агенти або емульгатори, або буферні речовини для встановлення pH. Такі носії дозволяють представляти фармацевтичні композиції у вигляді таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, суспензій і суспензій для проковтування пацієнтом.

Придатні форми для введення включають форми, придатні для парентерального введення, наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії, наприклад, шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії. Якщо продукт повинен бути введений шляхом ін'єкції або інфузії, він може бути представлений у формі суспензії, розчину або емульсії з масляним або водним носієм і може містити допоміжні речовини, такі як суспендуючі агенти, консерванти, стабілізатори та/або диспергуючі агенти. З іншого боку, молекула антитіла може бути представлена в сухій формі для відновлення перед використанням з відповідною стерильною рідиною.

Після приготування, композиції винаходу можуть бути введені безпосередньо пацієнтові. Піддані лікуванню пацієнти можуть бути представлені тваринами. Однак в одному або декількох варіантах втілення винаходу композиції адаптовані для введення людині.

Згідно з даним описом, pH кінцевої лікарської форми відрізняється від значення ізоелектричної точки антитіла або фрагмента, наприклад, якщо pH лікарської форми становить 7, значення pI становить 8-9 або вище. Не бажаючи проводити зв'язок з теорією, вважається, що в остаточному підсумку це повинне надати кінцевій лікарській формі підвищені показники стійкості, наприклад, збереження антитіла або його фрагмента в розчині.

В одному варіанті втілення винаходу фармацевтична лікарська форма зі значенням pH у діапазоні 4,0-7,0 складається з: антитіла 1-200 мг/мл відповідно до даного опису, буфера 1-100 ммоль, сурфактанту 0,001-1 %, а) стабілізатора 10-500 ммоль; б) стабілізатора 10-500 ммоль і речовини, що регулює тонічність, 5-500 ммоль; або в) речовини, що регулює тонічність, 5-500 ммоль.

Наприклад, лікарська форма зі значенням pH 6 може включати 1-50 мг/мл антитіла, 20 ммоль L-гістидину HCl, 240 ммоль трегалози і 0,02 % полісорбату 20. З іншого боку, лікарська форма зі значенням приблизно pH 5,5 може включати 1-50 мг/мл антитіла, 20 ммоль цитратного буфера, 240 ммоль сахарози, 20 ммоль аргініну і 0,02 % полісорбату 20.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть вводитись шляхом цілого ряду способів, включаючи, але не обмежуючись цим, наступні: пероральний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньоартеріальний, інтрамедулярний, інтратекальний, інтравентрикулярний, трансдермальний, черезшкірний (див. наприклад, WO98/20734), підшкірний, інтраперитонеальний, інтраназальний, ентеральний, місцевий, сублінгвальний, інтравагінальний або ректальний. Для введення фармацевтичних композицій винаходу можуть також використовуватись безголкові шприци. Як правило, терапевтичні композиції можуть бути представлені у вигляді препаратів, які ін'єктують, тобто рідких розчинів або суспензій. Також можуть бути представлені тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідкому носії перед введенням.

Безпосередня доставка композицій буде супроводжуватись, як правило, введенням (підшкірним, інтраперитонеальним, внутрішньовенним або внутрішньом'язовим) або доставкою в інтерстиціальний простір тканини. Крім того, композиції можуть вводитись всередину осередку пошкодження. Лікування дозами може включати графік введення одноразової дози або графік введення множинної дози.

Треба мати на увазі, що активна діюча речовина в композиції буде презентована молекулою антитіла. Таким чином, вона буде сприйнятлива до розпаду в шлунково-кишковому тракці.

Отже, якщо композиція повинна вводитись через шлунково-кишковий тракт, вона повинна містити агенти, що захищають антитіло від розпаду, але які дозволяють виводити антитіло після поглинання зі шлунково-кишкового тракту.

Докладне обговорення фармацевтично прийнятних носіїв представлено в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одному варіанті втілення винаходу лікарська форма представлена лікарською формою для місцевого застосування, включаючи інгаляції.

Придатні композиції для інгаляції включають порошки для інгаляції, дозовані аерозолі, що містять гази-пропеленти, або розчини для інгаляції, які не містять гази-пропеленти. Відповідно до даного опису порошки для інгаляції містять активну діючу речовину і можуть складатись винятково із зазначених вище активних діючих речовин або суміші зазначених вище активних діючих речовин з фізіологічно прийнятним допоміжним засобом.

Такі порошки для інгаляції можуть включати моносахариди (наприклад, глюкозу або арабінозу), дисахариди (наприклад, лактозу, сахарозу, мальтозу), оліго- і полісахариди (наприклад, декстрини), поліспирти (наприклад, сорбітол, манітол, ксилітол), солі (наприклад, натрію хлорид, кальцію карбонат) або суміші зазначених речовин. Здебільшого використовуються моно- і дисахариди, при цьому лактоза або глюкоза використовуються зокрема, але не обмежуючись цим, у вигляді гідратів.

Частки для депонування в легенях повинні мати розмір менше 10 мікрон, наприклад, 1-9 мікрон, тобто 0,1-5 мкм, зокрема, 1-5 мкм. Розмір часток активного діючої речовини (наприклад, антитіла або фрагмента) відіграє важливу роль.

Гази-пропеленти, які можуть використовуватись для приготування аерозолів для інгаляції, відомі в даній галузі техніки. Придатні гази-пропеленти вибирають з ряду вуглеводнів, таких як n-пропан, n-бутан або ізобутан, і галогенвуглеводнів, таких як похідні метану, етану, пропану, бутану, циклопропану або циклобутану, які містять хлор і/або фтор. Зазначені вище гази-пропеленти можуть використовуватись самостійно або в суміші.

Окремі придатні гази-пропеленти представлені галогенізованими похідними алканів, вибраних серед TG 11, TG 12, TG 134a і TG227. Із зазначених вище галогенізованих вуглеводнів особливо підходять TG134a (1,1,1,2-тетрафторетан) і TG227 (1,1,1,2,3,3, 3-гептафторпропан) та їх суміші.

Аерозолі для інгаляції, які містять гази-пропеленти, можуть також містити й інші інгредієнти, такі як співрозчинники, стабілізатори, поверхнево-активні речовини (сурфактанти), антиоксиданти, лубриканти і засоби для коректування pH. Всі ці інгредієнти відомі в даній галузі техніки.

Аерозолі для інгаляції, які містять гази-пропеленти, в рамках даного винаходу можуть містити до 5 % (за вагою) активної діючої речовини. Аерозолі даного винаходу містять, наприклад, 0,002-5 % за вагою, 0,01-3 % за вагою, 0,015-2 % за вагою, 0,1-2 % за вагою, 0,5-2 % за вагою або 0,5-1 % за вагою активної діючої речовини.

З іншого боку, спосіб місцевого застосування в легені також може здійснюватись шляхом введення рідкого розчину або суспензії, наприклад, з використанням такого обладнання як небулайзер, наприклад, небулайзер, приєднаний до компресора (наприклад, небулайзер Pari Lc-jet Plus(R), приєднаний до компресора Pari Master(R), виготовленого Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Антитіло даного винаходу може бути доставлено диспергованим у розчиннику, наприклад, у формі розчину або суспензії. Воно може бути суспендоване у придатному фізіологічному розчині, наприклад, розчині хлориду натрію або іншому фармакологічно прийнятному розчиннику або забуференому розчині. Відомі в даній галузі техніки забуферені розчини можуть містити 0,05-0,15 мг динатрію едетату, 8,0-9,0 мг NaCl, 0,15-0,25 мг полісорбату, 0,25-0,30 мг кислоти лимонної безводної, 0,45-0,55 мг натрію цитрату на 1 мл води, таким чином, значення pH буде становити 4,0-5,0. Суспензія може включати, наприклад, ліофілізоване антитіло.

Терапевтичні суспензії або розчини можуть також містити одну або декілька допоміжних речовин. Допоміжні речовини добре відомі в даній галузі техніки і включають буфери (наприклад, цитратний буфер, фосфатний буфер, ацетатний буфер і бікарбонатний буфер), амінокислоти, сечовину, спирти, аскорбінову кислоту, фосфоліпіди, білки (наприклад, сироватковий альбумін), ЕДТА, натрію хлорид, ліпосоми, маніт, сорбіт і гліцерин. Розчини або суспензії можуть бути інкапсульовані в ліпосоми або мікросфери, що біологічно розкладаються. Лікарська форма здебільше буде постачатись у практично стерильному вигляді і виготовлятись в ході стерильного виробничого процесу.

Такий процес може включати виробництво і стерилізацію шляхом фільтрації забуференого розчинника/розчину, використовованого у лікарській формі, асептичній суспензії антитіла в

стерильному забуференому розчині/розчиннику, і диспергування лікарської форми у стерильні резервуари з використанням відомих фахівцями в даній галузі способів.

Лікарські форми даного винаходу у вигляді небулайзерів можуть бути представлені, наприклад, у вигляді одиниць із одноразовою дозою (наприклад, герметично запаковані 5 пластикові контейнери або ампули), упакованих в оболонку з фольги. Кожна ампула містить одиницю дози в обсязі, наприклад, 2 мл, забуференого розчинника/розчину.

Описані тут антитіла можуть підходити для доставки шляхом небулізації.

Також передбачається, що антитіло даного винаходу може вводиться шляхом використання генної терапії. Для досягнення цього пацієнтові вводяться послідовності ДНК, що кодують легкі та важкі ланцюги молекули антитіла під контролем відповідних ДНК компонентів, таким чином, 10 ланцюги антитіла експресуються ДНК послідовностями і збираються *in situ*.

Даний винахід також описує молекулу антитіла (або композиції, які її містять), яка може використовуватись для контролю запальних захворювань, наприклад, гострого або хронічного 15 запального захворювання. Молекула антитіла (або композиції, які її містять) може використовуватись для зниження запального процесу або запобігання запальному процесу. В одному варіанті втілення винаходу описане *in vivo* зниження активованих Т-клітин, зокрема, Т-клітин, задіяних у невідповідних запальних імунних відповідях, наприклад, що знаходяться поблизу/у місці виникнення такої відповіді.

Зниження активованих Т-клітин для використання в цьому документі може бути 20 презентовано зниженням на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або більш відсотків у порівнянні з показником до лікування або без лікування. Перевага полягає в тому, що лікування антитілом, фрагментом або композицією відповідно до даного винаходу може знизити рівень активованих Т-клітин без зниження загального числа Т-клітин пацієнта (неактивованих Т-клітин). Це може привести до меншої кількості побічних ефектів і, можливо, запобігти зниженню числа Т-клітин у 25 пацієнта.

Даний винахід також описує молекулу антитіла для використання у лікуванні або профілактиці патологічного розладу, обумовленого ОХ40 або викликаного підвищенням рівня ОХ40. Патологічний стан може бути вибраний, наприклад, із групи, що включає наступне: 30 інфекції (вірусні, бактеріальні, грибові або паразитичні), ендотоксичний шок, викликаний інфекцією, артрит, ревматоїдний артрит, астма, ХОХЛ, запальне захворювання тазу, хвороба Альцгеймера, запальне захворювання товстого кишечника, хвороба Крона, виразковий коліт, хвороба Пейроні, целіакія, захворювання жовчного міхура, пілонідальне захворювання, перитоніт, псоріаз, васкуліт, хірургічні спайки, інсульт, цукровий діабет 1 типу, хвороба Лайма, артрит, менінгоенцефаліт, аутоімунний увеїт, імунно-опосередковане запальне захворювання 35 центральної і периферичної нервової системи, таке як множинний склероз, вовчак (наприклад, системний червоний вовчак) і синдром Гієна-Барре, atopічний дерматит, аутоімунний гепатит, фіброзуючий альвеоліт, хвороба Грейва, нефропатія IgA, ідіопатична тромбocyтопенія пурпура, хвороба Мен'єра, пухирчатка, первинний цироз жовчних проток, саркоїдоз, склеродермія, некротичний неінфекційний грануломатоз, інші аутоімунні розлади, панкреатит, 40 травма (хірургічна операція), хвороба "трансплантат проти хазяїна", відторгнення трансплантату, захворювання серця, включаючи ішемічну хворобу, наприклад, інфаркт міокарда, а також атеросклероз, внутрішньосудинна коагуляція, резорбція кістки, остеопороз, остеоартрит, періодонтит і гіпохлоридрія.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло винаходу задіяне у лікуванні алергії, ХОХЛ, 45 аутоімунного захворювання або ревматоїдного артриту.

Даний винахід також описує молекулу антитіла для використання у лікуванні або профілактиці болю, зокрема, болю, викликаного запаленням.

Даний винахід надалі описує використання молекули антитіла, фрагмента або композиції у виробництві лікарського препарату для лікування або профілактики патологічного розладу, 50 опосередкованого ОХ40 і викликаного підвищенням рівня ОХ40, зокрема, патологічного розладу при ревматоїдному артриті, астмі або ХОХЛ.

Даний винахід надалі описує використання молекули антитіла, фрагмента або композиції у виробництві лікарського препарату для лікування або профілактики одного або декількох описаних тут медичних показань.

Молекула антитіла, фрагмент або композиція даного винаходу можуть використовуватись 55 при будь-якому лікуванні для зниження ефектів ОХ40 в організмі людини або тварин. ОХ40 може циркулювати в організмі або бути присутнім у небажано високій кількості, локалізованій в окремій частині організму, наприклад, у місці запалення.

В одному варіанті втілення винаходу молекула антитіла даного винаходу або композиція, що містить таке антитіло, використовується для контролю запального захворювання, наприклад, описаного вище.

Даний винахід також описує спосіб лікування людини або тварин, що страждають від або що перебувають при ризику виникнення розладу, опосередкованого ОХ40, спосіб лікування, що включає введення пацієнтові ефективної кількості молекули антитіла даного винаходу або композиції, що містить таке антитіло.

В одному варіанті втілення винаходу описується спосіб очищення антитіла (зокрема, антитіла або фрагмента відповідно до винаходу), що включає наступні етапи: проведення аніон-обмінної хроматографії незв'язувальним чином, таким чином, що домішки залишаються в колонці, а антитіло елююється.

Придатні іонообмінні смоли для використання в способі включають смоли Q.FF (постачається компанією Ge-Healthcare). Цей етап, наприклад, може проводитись на рівні рН 8.

Спосіб надалі може включати етап первинного зв'язування з використанням катіон-обмінної хроматографії, виконуваної, наприклад, при рН від 4 до 5, наприклад, 4,5. Катіон-обмінна хроматографія може виконуватись з використанням такої смоли, як CaptoS або сефарози SP FF (постачається GE-Healthcare). Антитіло або фрагмент може бути елюований зі смоли з використанням розчину іонної солі, наприклад, натрію хлориду, наприклад, у концентрації 200 ммоль.

Таким чином, етап хроматографії може включати один або декілька етапів промивання (за необхідності).

Процес очищення може також складатись з одного або декількох етапів фільтрації, наприклад, етапу діа-фільтрації.

При рІ вище 8, наприклад, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 або 9,0 фрагмента або антитіла, вважається, що необхідно провести очищення антитіла або фрагмента для забезпечення "відсутності" або "практичної відсутності" домішок, таких як ендотоксин, ДНК і білки клітин-хазяїв.

Таким чином, в одному варіанті втілення винаходу описане очищене антитіло до ОХ40 або його фрагмент, наприклад, гуманізоване антитіло або його фрагмент, зокрема, антитіло або фрагмент даного винаходу, які були суттєво очищені, зокрема практично або суттєво очищені від вмісту ендотоксину та/або білка клітини-хазяїна або ДНК.

Очищена форма (див. вище) повинна мати чистоту принаймні 90 %, тобто 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % в/в або більше.

Практично повна відсутність ендотоксину звичайно означає вміст ендотоксину 1 ОЕ на мг продукту антитіла або менше, тобто 0,5 або 0,1 ОЕ на мг продукту.

Практично повна відсутність білка або ДНК клітин-хазяїв звичайно означає вміст білка та/або ДНК клітин-хазяїв, що дорівнює 400 мкг на мг продукту антитіла або менше, тобто 100 мкг на мг або менше, зокрема, 20 мкг на мг.

Молекула антитіла даного винаходу також може використовуватись в діагностиці, наприклад, в in vivo діагностиці і візуалізації станів захворювання, включаючи ОХ40.

"Той, що містить" в контексті даного опису означає "той, що включає".

Де це технічно виправдано, варіанти втілення винаходу можуть бути скомбіновані.

Описані тут варіанти втілення винаходу містять певні характеристики/елементи. Опис також поширюється на окремі варіанти втілення винаходу, що складаються здебільше із зазначених характеристик/елементів.

Даний винахід надалі описується тільки у вигляді ілюстративних прикладів, які стосуються супроводжувальних даних опис Фігур.

Приклади

Опис Фігури 1:

- a) Ділянка V легкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:7)
- b) Ділянка V важкого ланцюга антитіла 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) антитіла A26) і CDRH2 (SEQ ID NO:20) і CDRL1 (SEQ ID NO:21) антитіла CA044\_00026.
- d) Легкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:11)
- e) Легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (підкреслене) (SEQ ID NO:12)
- f) Важкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:15)
- g) Важкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (підкреслене) (SEQ ID NO:16)
- h) ДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:8)

i) ДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:10)  
 j) ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:13)  
 к) ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (SEQ ID NO:14)

5 l) ДНК, що кодує важкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:17)

m) ДНК, що кодує важкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (SEQ ID NO:18)

n) ДНК, що кодує важкий і легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальні послідовності і міжгенну послідовність IGS2 (SEQ ID NO:19).

10 Маніпуляції із ДНК і загальні способи

Штам *E. coli* INVαF' (Invitrogen) використовувався для трансформації і стандартного культивування. Рестриктази і модифікаційні ферменти для ДНК були надані Roche Diagnostics Ltd. і New England Biolabs. Приготування плазмід проводилось з використанням наборів очищення Maxi Plasmid (QIAGEN, номер за каталогом 12165). Реакції секвенування ДНК проводились з використанням набору термінації секвенування ABI Prism Big Dye (номер за каталогом 4304149) і були запущені на автоматичному секвенсері ABI 3100 (Applied Biosystems). Дані були проаналізовані з використанням програми Autoassembler (Applied Biosystems). Олігонуклеотиди були надані компанією Invitrogen. Гени, що кодують первинні послідовності варіабельної ділянки, були розроблені і сконструйовані шляхом автоматичного синтезу Entelechon GmbH, а потім модифіковані для одержання привитих версій шляхом спрямованого мутагенезу олігонуклеотидів. Концентрація Fab" визначалась з використанням набору ІФА для Fab".

Приклад 1: Виробництво і гуманізування нейтралізуючого антитіла A26 до OX40

25 Самки щурів лінії Sprague Dawley були імунізовані рекомбінантним білком злиття людського OX40 і mFc. Антитіло CA044\_00026, яке зв'язує людський OX40, було ізольоване з використанням способів, описаних в WO92/02551. Гени для варіабельного домену важкого ланцюга (VH) і варіабельного домену легкого ланцюга (VL) антитіла CA044\_00026 були ізольовані і секвеновані з наступним клонуванням за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією.

30 З використанням каркасних акцепторних ділянок варіабельного домену людини і шляхом варіювання числа залишків-донорів у каркасних ділянках була розроблена серія гуманізованих VL і VH ділянок. Було розроблено дві привиті VH ділянки (gH1 і 2) і 8 привитих VL ділянок (gL1-8), а гени були одержані шляхом збирання олігонуклеотиду і мутагенезу ПЛР.

35 Фрагменти Fab" антитіла були сконструйовані для кожної привитої ділянки з використанням генів, що кодують гуманізовані варіабельні домени, субклонувані у вектор експресії pTTOD *E. coli*, які містять ДНК, що кодує важкий ланцюг Cy1 людського домену CH1 (аллотип G1m17) і легкий каппа-ланцюг константного домену людини (аллотип K1m3) (як це було описане раніше в WO03/048208). Шарнірна ділянка зазнає усікання і модифікації, яка полягає у зміні послідовності із Цис-Про-Про-Цис на Цис-Ала-Ала, з одержанням шарнірної ділянки з одним залишком цистеїну, доступного для сайт-специфічного приєднання молекули ПЕГ (див. Приклад 2).

40 Послідовності, що кодують сигнальний пептид OmpA, були приєднані до 5'-кінця генів, що кодують як важкі, так і легкі ланцюги. В ході експресії, сигнальні послідовності націлені на транспорт кожного поліпептиду в періплазму бактерій. Після транслокації за допомогою клітинної мембрани, сигнальна послідовність розщеплюється з утворенням зрілих Fab" легких і важких ланцюгів.

Вектор pTTOD, що містить кожну привиту ділянку, був трансформований у штам-хазяїн *E. coli* K12 W3110, і фрагменти Fab" антитіла продукувались *E. coli* з використанням стандартних способів культивування при високій щільності клітин. Антитіла були очищені з використанням катіон-обмінної, а потім і аніон-обмінної хроматографії з використанням стандартних способів (Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320).

50 Різні одержані Fab" фрагменти були тестовані на предмет зв'язування і блокування, як це було описано вище, і кожний фрагмент був підданий оцінці на предмет своєї експресії в *E. coli*, активності щодо батьківського антитіла і придатності для очищення і наступної обробки. Це приводить до відбирання привитої ділянки gL8gH2, названої A26. Послідовності V-ділянки такого привитого фрагмента представлено на Фігурі 1 (a) і (b) і в SEQ ID Nos: 7 і 9 для легкого ланцюга (gL2) і важкого ланцюга (gH2), відповідно.

60 Акцепторна каркасна ділянка важкого ланцюга представлена послідовністю VH3 1-3 3-07 зародкової лінії людини з каркасною ділянкою 4, одержаною з даної ділянки JH зародкової лінії людини JH4. Акцепторна каркасна ділянка легкого ланцюга представлена послідовністю VHК 2-



1 1-02 зародкової лінії людини з каркасною ділянкою 4, одержаною з даної ділянки JK4. Амінокислотні залишки в положенні 37, 73, 78 і 94 (згідно з нумерацією Kabat) у важкому ланцюзі SEQ ID NO:9 є донорськими залишками (від батьківського антитіла) і відіграють важливу роль у збереженні повної активності. Залишок 64 в CDRH2 був конвертований з донорського глутамату на акцепторний лізин (E64 K) для створення молекули з більш високим значенням pI, яке більш прийнятне для іон-обмінного очищення. Амінокислотні залишки в положенні 64 і 71 (згідно з нумерацією Kabat) у легкому ланцюзі SEQ ID NO:7 є донорськими залишками і відіграють важливу роль у збереженні повної активності. Залишки 27 і 28 в CDR-L1 були перетворені з донорського глутамату і аспартату на акцепторний глутамін (E27Q) і серін (D28S) для створення молекули з більш високим значенням pI, яке найбільше підходить для іон-обмінного очищення.

CDR такого антитіла представлено на Фігурі 1(c), так як і оригінальні CDRH2 (SEQ ID NO:20) і CDRL1 (SEQ ID NO:21), які залишились незміненими. Легкі і важкі ланцюги з повною довжиною представлено на Фігурах 1(d) і (f), відповідно.

Гени gL8 і gH2 були реконструйовані на рівні ДНК з метою включення кодонів для варіабельних і константних ділянок, оптимізованих для експресії в *E.coli* і експресії у векторі pTTOD(Fab"), як це описане вище. Послідовності ДНК, що кодують легкий і важкий ланцюги, представлено на Фігурах 1(k), SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:18, відповідно.

Білкова послідовність такого Fab' (включаючи константні ділянки) представлена в Fab" фрагмента (включаючи константні частини) представлена послідовністю SEQ ID NO:11 і 12 (легкий ланцюг з/ без сигнального пептиду OmpA) і SEQ ID NOS: 15 і 16 (важкий ланцюг з/ без сигнального пептиду OmpA). Двоцистронний вектор експресії pTTOD (A26 IGS2) включає послідовність, представлену на Фігурі (n) і SEQ ID NO:19. Послідовність містить міжгенну послідовність IGS2 між генами легкого і важкого ланцюга (див. WO03/048208) і лідерну послідовність OmpA на початку генів як легкого, так і важкого ланцюгів.

#### Приклад 2: Одержання A26 Fab'-PEG

Фрагмент Fab" A26, одержаний за допомогою *E.coli* і очищений відповідно до опису, представленого у Прикладі 1, був ПЕГільований згідно зі способами, описаними в WO2007/003898.

ПЕГ був приєднаний до шарнірного цистеїну в положенні 226 (лінійна нумерація) важкого ланцюга (SEQ ID NO:15) таким чином, що лізил-малеїмідна група була приєднана до залишку цистеїну в положенні 226 важкого ланцюга (SEQ ID NO:15), і кожна аміногрупа залишку цистеїну була ковалентно приєднана до метоксиполіетиленгліколю з молекулярною масою близько 20 000 Да. Таким чином, загальна молекулярна маса ПЕГ, приєднаного до антитіла, склала близько 40 000 Да, як це презентовано на Фігурі 2.

#### Приклад 3: Оцінка афінності A26 і A26 Fab'-PEG для OX40

Технологія BIAcore дозволяє контролювати зв'язування між біомолекулами в режимі реального часу без необхідності в міченні. Один з учасників взаємодії, названий лігандом, іммобілізований безпосереднім чином або зафіксований на іммобілізованій поверхні, у той час як інший учасник, названий аналітом, переміщається в розчині повз іммобілізовану поверхню. Сенсор визначає зміну маси на своїй поверхні, тому що аналіт зв'язується з лігандом з утворенням комплексу на поверхні. Це відповідає процесу асоціації. Дисоціація аналіту від ліганду контролюється при заміщенні аналіту буфером. В ході аналізу афінності BIAcore ліганд представлений антитілом, що зазнає тестування, а аналіт представлений людським OX40.

Інструмент: BIAcore ® 3000, BIAcore AB, Uppsala, Швеція.

Сенсорний чіп: CM5 (клас для дослідження) Номер за каталогом: BR-1001-14, BIAcore AB, Uppsala, Швеція. Чіпи зберігались при температурі 4°C.

Набір для зв'язування аміну: Номер за каталогом: BR-1000-50, BIAcore AB, Uppsala, Швеція.

Етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду гідрохлорид (EDC). Розводиться до концентрації 75 мг/мл дистильованою водою і зберігається у вигляді аліквот по 200 мкл при температурі -70°C.

N-Гідроксисукцинімід (NHS). Розводиться до концентрації 11,5 мг/мл дистильованою водою і зберігається у вигляді аліквот по 200 мкл при температурі -70°C.

1 М етаноламіну гідрохлорид-NaOH pH 8,5. Зберігається у вигляді аліквот 200 мкл при температурі -70°C.

Буфери: Рухомий буфер: HBS-EP (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 ммоль EDTA, 0,005 % сурфактант P20). Номер за каталогом: BR-1001-88, BIAcore AB, Uppsala, Швеція. Буфер зберігався при температурі 4°C.

Буфер для іммобілізації: Ацетат 5,0 (10 ммоль натрію ацетат pH 5,0). Номер за каталогом: BR-1003-51, BIAcore AB, Uppsala, Швеція. Буфер зберігався при температурі 4°C.

Фіксація ліганду: Affinipure F(ab')<sub>2</sub> фрагмент козиного IgG до антитіла людини, F(ab')<sub>2</sub> специфічний фрагмент. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA) Номер за каталогом: 109-006-097. Реагент зберігався при температурі 4°C.

Ліганд: Антитіла A26 і A26 Fab'-PEG, зберігались при температурі 4°C.

Аналіт: Позаклітинний домен людського OX40 (185 aa), злитий з мишачим IgG2a Fc (232 aa). (0,5 мг/мол, Ancell №513-020, партія 142805), зберігався при температурі 4°C.

Розчин для регенерації: 40 ммоль HCl було приготовано шляхом розведення дистильованою водою 11,6 М маточного розчину (BDH, Poole, Англія. Номер за каталогом: 101254H).

5 ммоль NaOH було приготовано шляхом розведення дистильованою водою 50 ммоль маточного розчину. Номер за каталогом: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Швеція.

Спосіб аналізу: формат аналізу полягав у захопленні антитіла іммобілізованим антитілом до людського F(ab')<sub>2</sub> з наступною титрацією на позаклітинному домені людського OX40 на захопленій поверхні.

Приклад процедури наводиться нижче:

BIA (Біомолекулярний аналіз взаємодії) проводився з використанням Biacore 3000 (Biacore AB). Фрагмент Affinipure F(ab')<sub>2</sub> антитіла кози до людського IgG, F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch) специфічний фрагмент був іммобілізований на сенсорному чіпі CM5 за допомогою реакції аміного зв'язування на рівні захоплення  $\approx 4000$  одиниць відповіді (ОВ). Використовувався буфер HBS-EP (10 ммоль HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 ммоль EDTA, 0,005 % сурфактант P20, Biacore AB) при швидкості рухомого буфера 10 мкл/хв. Для захоплення іммобілізованим антитілом до IgG-F(ab')<sub>2</sub> людини використовувалось введення 10 мкл Fab' при концентрації 0,5 мкг/мл або Fab'-PEG при концентрації 50 мкг/мл. Людський OX40 був титрований разом із захопленим антитілом при різних концентраціях (від 25 нмоль до 0,78 нмоль) і швидкості потоку 30 мкл/хв. Поверхня була відновлена введенням 10 мкл 40 ммоль HCl з наступним введенням 5 мкл 5 ммоль NaOH при швидкості потоку 10 мкл/хв.

Криві зв'язування за винятком вихідних параметрів були аналізовані з використанням програмного забезпечення BIAevaluation (версія 3.2) з дотриманням стандартних процедур. Кінетичні параметри визначались за допомогою алгоритму апроксимації.

Значення афінності визначалось для A26 і знаходилось в діапазоні 19-45,4 пмоль; для A26 Fab'-PEG таке значення становило 13,7-50,3 пмоль.

У таблиці нижче наводяться дані для неПЕГільованого гуманізованого фрагмента Fab A26 (fab\*) і A26 Fab'-PEG Fab фрагмента (Fab-PEG\*\*), що зв'язується з людським OX40.

Таблиця 1

Зразок	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

\* середнє для 5 певних значень,

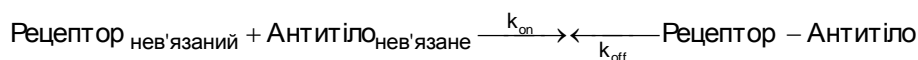
\*\*середнє для 4 певних значень

Приклад 3а: Клітинно-опосередкована афінність і здатність блокування лігандом A26 Fab'-PEG

Клітинно-опосередкована афінність

Для визначення афінності A26 Fab'-PEG для антигена, що експресується клітинною поверхнею, проводились експерименти насичення зв'язування з використанням активованих CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клітин і мічених флуоресцеїном антитіл. Специфічне зв'язування антитіла з рецептором at equilibrium при діапазоні концентрацій ліганду використовувалось для визначення K<sub>D</sub> за умови, що з рецептором зв'язувалась лише невелика фракція антитіла в будь-якій точці кривої зв'язування.

Рівноважне зв'язування описується використанням наступного рівняння:



Ступінь асоціації антитіла з рецептором =  $k_{\text{on}} \times [\text{Рецептор}_{\text{незв'язаний}}] \times [\text{Антитіло}_{\text{незв'язане}}]$

Ступінь дисоціації комплексу рецептор-антитіло =  $k_{\text{off}} \times [\text{Рецептор} - \text{Антитіло}]$

У рівноважному стані швидкість асоціації і дисоціації рівні, і може бути виведене рівняння, що описує ізотерму зв'язування; на напівлогарифмічному графіку зв'язування має сигмоїдальну форму. Значення  $K_D$  одержують шляхом ділення  $k_{off}$  на  $k_{on}$ , і воно може бути розраховане на основі кривої зв'язування, тому що виникає концентрація з напів-максимальним значенням зв'язування.

Зв'язування міченого флуоресцеїном антитіла A26 Fab'-PEG з активованими CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клітинами людини було виміряне шляхом протокової цитометрії в 4-логарифмічному діапазоні концентрацій. Крива репрезентативного зв'язування для A26 Fab'-PEG представлена на Фігурі 3. Значення  $K_D$ , одержані для активованих клітин трьох різних донорів, склали 1,193 нмоль, 1,071 нмоль і 1,055 нмоль.

Значення клітинно-опосередкованого  $K_D$  для A26 Fab'-PEG (середнє 1,106 нмоль) значно менше, ніж показник зв'язування з рекомбінантним OX40, виміряним за допомогою BIAcore (31,3 пмоль). Це може пояснюватись рядом факторів. A26 Fab'-PEG може мати більш високий показник афінності для рекомбінантного OX40, що експресується у вигляді димерного білка злиття Fc, що має іншу третинну і четвертинну структуру, ніж нативний OX40, що експресується поверхнею клітин, який використовується для прогнозування взаємозв'язку як нековалентного тримера на мембрані клітин (Chan et. al., 2000). Крім того, на афінність може впливати диференціальне глікозилювання рекомбінантного OX40 у порівнянні з нативним OX40. Трьохмірна структура клітинної мембрани, включаючи конволюції мембрани і спільно локалізовані білки, також може являти собою стеричну перешкоду, обмежуючи доступність OX40 для A26 Fab'-PEG. Внаслідок цього, клітинна афінність, імовірно, являє собою більш наближене вимірювання дійсної афінності препарату в умовах *in vivo*.

Способи: Зв'язування A26 Fab'-PEG з активованими CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клітинами людини

МКПК були ізольовані шляхом сепарування на градієнті Ficoll і активовані 1 мкг/мл РНА-L протягом 3 днів при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, і 100 % вологості. CD4<sup>+</sup> Т-клітини були ізольовані шляхом негативного відбору з використанням магнітних мікроносіїв (набір II для ізоляції CD4<sup>+</sup> Т-клітин людини; Miltenyi Biotec). Приблизно 1,2×10<sup>5</sup> клітин були інкубовані в присутності антитіла (діапазон фінальної концентрації 10 мкг/мл – 0,0006 мкг/мл (111 нмоль – 0,0068 нмоль)) протягом 2 годин на льоді. Перед аналізом в ході протокової цитометрії з використанням FACScalibur (Becton Dickinson), клітини були промиті. Були побудовані дві криві титрації: одна з A26 Fab'-PEG і інша з gA33 Fab'-PEG як контроль неспецифічного зв'язування. Для віднімання показника неспецифічного зв'язування використовувався лінійний регресійний аналіз, після чого була побудована крива специфічного зв'язування з аналізом за методом нелінійної регресії (Graphpad Prism®) для визначення значення  $K_D$ .

Приклад 3b: Здатність блокування ліганду

Здатність A26 Fab'-PEG блокувати взаємодію між OX40, що експресується поверхнею клітин, і рекомбінантного OX40L вимірювалась з використанням аналізу блокування ліганду, основаного на потоковій цитометрії. Активовані CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клітини людини були попередньо інкубовані з титрацією A26 Fab'-PEG. Згодом у клітини був доданий рекомбінантний OX40L для можливості зв'язування у присутності A26 Fab'-PEG. З використанням потокової цитометрії і міченого вторинного реагенту визначалась частка зв'язаного OX40L. На Фігурі 4 представлена репрезентативна крива інгібування, яка вказує на те, що A26 Fab'-PEG здатний повністю блокувати зв'язування OX40L. Середнє значення IC<sub>50</sub> для інгібування зв'язування рекомбінантного OX40L склало 4,1 нмоль (n=2 донора).

Способи: Інгібування зв'язування OX40L з активованими CD4<sup>+</sup>OX40<sup>+</sup> Т-клітинами людини A26 Fab'-PEG.

МКПК були ізольовані шляхом сепарування на градієнті Ficoll і активовані 1 мкг/мл РНА-L протягом 3 днів при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, і 100 % вологості. Приблизно 2,5×10<sup>5</sup> клітин були інкубовані у присутності антитіла (діапазон фінальної концентрації 20 мкг/мл – 0,0003 мкг/мл (229 нмоль – 0,0035 нмоль)) протягом 10 хвилин на льоді. Був доданий OX40L (біотинілований CD252 mCD8, Ancell) у фінальній концентрації 2 мкг/мл з наступною інкубацією протягом додаткових 30 хвилин на льоді. Перед аналізом потоковою цитометрією з використанням FACScalibur (Becton Dickinson), клітини були промиті, після чого шляхом інкубації з РЕ-міченим стрептавідином (Jackson ImmunoResearch) було визначене значення OX40L. Як неспецифічний контроль використовувався gA33 Fab'-PEG. Крива інгібування була проаналізована шляхом нелінійної регресії (Graphpad Prism®) для визначення значення IC<sub>50</sub>. Представлені дані, одержані для одного із двох репрезентативних донорів.

Приклад 4: Активність A26 Fab'-PEG в ході функціональних аналізів на людині

Для оцінки активності у блокуванні ендogenous зв'язування OX40-OX40L у в клітинних взаємодій, A26 Fab'-PEG тестувався для цілого ряду відповідей Т-клітин людини, обумовлених впливом антигену.

#### Приклад 4a: Реакція змішаної культури лімфоцитів

Розроблена вперше у 1964 р. (Bach et al., 1964, Science 143, 813-814), реакція змішаної аллогенної культури лімфоцитів (РЗКЛ) є *in vitro* моделлю аллореакційної активації і проліферації Т-клітин (O'Flaherty et al., 2000, Immunology, 100, 289-299) з використанням моноклеарних клітин цільної периферичної крові (МКПК), одержаних у двох неспоріднених донорів. Донорські Т-клітини активуються за допомогою розпізнавання аллогенних антигенів головного комплексу гістосумісності (ГКГС) відносно стимулятора неспорідненого донора МКПК, що приводить до проліферації клітин і вироблення цитокінів (Lukacs et al., 1993, Am J Pathology, 143, 1179-1188). Було доведено, що аллореакція Т-лімфоцитів запускається як аллогенним антигеном ГКГС, так і зв'язаним пептидом (Sherman et al., 1993, Annu. Rev. Immunol, 11, 385-402), що дозволяє припустити, що відповідь РЗКЛ може виникнути при впливі аллогенних антигенів ГКГС і зв'язаних пептидів. Ступінь відповіді МКПК корелює зі ступенем невідповідності ГКГС між парою відповідач-стимулятор (Forrester et al., 2004, Corneal Transplantation: An Immunological Guide to the Clinical Problem, Imperial College Press, 66-67). Відповідь РЗКЛ приводить до проліферації клітин донора-відповідача і вироблення цитокінів  $T_H1$  (ІЛ-2, ІФН- $\gamma$  і ФНО- $\alpha$ ) і  $T_H2$  (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 і ІЛ-13) Т-клітинами. Точний профіль цитокіну в ході РЗКЛ вважається специфічним відносно пари відповідач-стимулятор (Jordan et al., 2002, J. Immunol. Methods, 260, 1-14). Аналізи РЗКЛ широко використовувались у дослідженні для вивчення шляхів активації Т-клітин і скринінгу імуносупресуючих препаратів, а також у клінічних дослідженнях для оцінки функції імунної системи при синдромі набутого імунодефіциту (СНІД) у пацієнтів і прогнозуванні можливого відторгнення донорського органу у реципієнтів трансплантатів (Bromelow et al., 2001, J. Immunol. Methods, 247, 1-8).

Ефект A26 Fab'-PEG на *in vitro* активацію аллореакційних Т-клітин людини і їх проліферацію був вивчений за допомогою аналізу РЗКЛ, як це описано O'Flaherty et al., 2000. МКПК двох неспоріднених донорів були спільно культивовані у присутності і за відсутності A26 Fab'-PEG, а клітинна проліферація була виміряна за допомогою включення  $^3H$ -тимідину. Як це показано на Фігурі 5, A26 Fab'-PEG інгібував проліферацію Т-клітин дозо-залежним чином зі значенням  $IC_{50}$  2,149 нмоль (0,1877 мкг/мл), а максимальне інгібування склало 57 %. Надосадова рідина, одержана в ході РЗКЛ людини, була проаналізована в ході аналізу Meso Scale Discovery (MSD) з метою дослідження ефекту A26 Fab'-PEG на вироблення цитокінів. В ході РЗКЛ A26 Fab'-PEG частково інгібував вироблення ІФН- $\gamma$  (55 % інгібування), ІЛ-13 (50 % інгібування) і ІЛ-5 (80 % інгібування) (дані не представлені).

Спосіб: Інгібування проліферації аллогенних однобічних цілісних відповідей МКПК людини A26 Fab'-PEG в ході РЗКЛ.

Людські МКПК від двох неспоріднених донорів були ізольовані із цільної крові. Клітини від одного донора були інактивовані шляхом  $\gamma$ -опромінення для одержання популяції стимулятора. Клітини іншого донора утворювали популяцію відповідача. Популяції стимулятора і відповідача були змішані у співвідношенні 1:1 ( $1 \times 10^5$  клітин/донор) і культивовані у присутності A26 Fab'-PEG (1 нг-100 мкг/мл) протягом 6 днів. Як контрольний реагент використовувався A33 Fab'-PEG (внутрішній реагент). Проліферація клітин оцінювалась на 6 день шляхом введення  $^3H$ -тимідину (0,5 мкСі/ямку). Дані представлені у вигляді процентного показника інгібування щодо відповіді відповідача плюс стимулятора під час відсутності біологічного реагенту, а також у вигляді комбінованих даних, одержаних в результаті 10 різних пар донорів (середнє  $\pm$  СП). Значення  $IC_{50}$  було розраховано з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism®. Результати наведено на Фігурі 5.

#### Приклад 4b: Відповідь на правцевий анатоксин

Правцевий анатоксин (ПА) індукуює сильну специфічну імунну відповідь з боку Т-клітин у вакцинованих пацієнтів. В умовах *in vitro* антиген-специфічна відповідь на вплив ПА може бути визначена шляхом моніторингу проліферації і вироблення цитокінів ( $T_H1$  и  $T_H2$ ) МКПК (Bishop et al., 2005). A26 Fab'-PEG інгібував проліферацію і вироблення ІЛ-5, ІЛ-13, ІФН- $\gamma$  і ФНО- $\alpha$  (дані не представлені) дозо-залежним чином з максимальним показником інгібування проліферації 38 %. Значення  $IC_{50}$  для інгібування проліферації, розраховані для 2 донорів, склали 0,58 нмоль (0,051 мкг/мл) і 1,11 нмоль (0,097 мкг/мл). На Фігурі 6 представлена крива інгібування проліферації A26 Fab'-PEG для 1 донора.

Спосіб: A26 Fab'-PEG інгібує проліферацію МКПК, підданих впливу правцевим анатоксином

МКПК були ізольовані шляхом сепарації на градієнті Ficoll і піддані впливу 1 мкг/мл правцевого анатоксину (Calbiochem) у присутності A26 Fab'-PEG (діапазон концентрацій 5

мкг/мл – 0,001 мкг/мл) у кінцевому обсязі 200 мкл на ямку у круглодонному 96-ямковому планшеті. Через 5 днів інкубації при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % вологості, проліферація клітин була виміряна шляхом введення <sup>3</sup>H-тимідину (0,5 мкCi/ямку) у клітини, що активно діляться. Представлені результати, одержані у одного репрезентативного донора. Значення IC<sub>50</sub> були розраховані з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism®.

Приклад 4с: Відповідь на кліща домашнього пилу

Важкі і гострі приступи астми можуть бути ініційовані шляхом вдихання антигенів, таких як кліщ домашнього пилу (Tillie-Leblond et al., 2005, Allergy, 60, (1), 23-29), включаючи види роду *Dermatophagoides pteronyssinus*. Такі алергени індукують проліферативну відповідь у периферичних кров'яних клітинах і вироблення T<sub>H</sub>2 поляризованих цитокінів у atopічних, але не у неатопічних пацієнтів (Ling et al., 2004, Lancet, 363, 608-615). В ході *in vitro* аналізу був визначений ефект блокади OX40 при виробленні T<sub>H</sub>2 цитокіну ІЛ-13 у відповідь на вплив антигену. У atopічних людей з показником алерген-специфічності IgE (RAST) 3-5 (шкала від 0 до 6) були відібрані МКПК і стимульовані антигеном *Dermatophagoides pteronyssinus* у присутності A26 Fab'-PEG або контрольного антитіла. A26 Fab'-PEG інгібував вироблення ІЛ-13 з максимальним значенням 60 % і IC<sub>50</sub> 1,23 нмоль (Фігура 7). Більше того, в ході такого аналізу A26 Fab'-PEG також сильно інгібував вироблення цитокінів ІЛ-4, ІЛ-5 і ФНО-α, що приводило до підвищення рівнів регуляторного цитокіну ІЛ-10 (Фігура 8).

Спосіб Фігура 7: A26 Fab'-PEG інгібує вироблення ІЛ-13 у МКПК, підданих впливу екстракту алергену *Dermatophagoides pteronyssinus*.

МКПК були ізольовані у страждаючих на алергію добровольців шляхом сепарування на градієнті Ficoll. Очищені МКПК були піддані впливу 25 мкг/мл екстракту алергену *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) у присутності досліджуваного антитіла (діапазон концентрацій 10 мкг/мл – 0,005 мкг/мл) у кінцевому обсязі 200 мкл на ямку в круглодонному 96-ямковому планшеті. Після 6 днів інкубації при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % вологості, надосадова рідина була зібрана і проаналізована на предмет вмісту ІЛ-13 шляхом ІФА (Biosource). Графік представляє об'єднані дані, одержані для трьох донорів (середнє±СП). Значення IC<sub>50</sub> були розраховані з використанням програмного забезпечення Graphpad Prism®.

Спосіб Фігура 8: A26 Fab'-PEG модулює вироблення цитокінів МКПК, підданих впливу екстрактом алергену *Dermatophagoides pteronyssinus*.

МКПК були ізольовані у страждаючих на алергію добровольців шляхом сепарування на градієнті Ficoll. Очищені МКПК були піддані впливу 25 мкг/мл екстракту алергену *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer) у присутності 10 мкг/мл A26 Fab'-PEG (114 нмоль) або контролю (TN3 Fab'-PEG) у кінцевому обсязі 200 мкл на ямку в круглодонному 96-ямковому планшеті. Після 6 днів інкубації при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> і 100 % вологості, надосадова рідина була зібрана і проаналізована на предмет вмісту цитокіну шляхом аналізу multi-spot (MSD). Графік представляє об'єднані дані, одержані для трьох донорів (середнє±СП).

#### Резюме

Значення IC<sub>50</sub> для A26 Fab'-PEG в ході функціональних аналізів з використанням матеріалу людини представлені у Таблиці 2. Активність A26Fab'-PEG в ході всіх трьох аналізів подібна і добре корелює з вимірюванням афінності клітин (1,106 нмоль). В ході таких аналізів була значно супресована проліферація клітин і/або вироблення множини запальних цитокінів, вказуючи на те, що A26 Fab'-PEGу значно інгібує активацію Т-клітин. Аналізи при впливі правцевого анатоксину і кліща домашнього пилу дозволяють виміряти відповідь Т-клітин, позначаючи, що A26 Fab'-PEG здатний інгібувати встановлені показники відповідей Т-клітин на різні антигени.

Таблиця 2

Середні значення IC<sub>50</sub> для A26 Fab'-PEG, встановлені в ході функціональних *in vitro* аналізів з використанням матеріалу людини

Функціональний аналіз	Середнє IC <sub>50</sub> (нмоль)	Середнє IC <sub>50</sub> (мкг/мл)
Реакція змішаної культури лімфоцитів – інгібування проліферації (n=10)	2,149	0,1877
Правцевий анатоксин - інгібування проліферації (n=2)	0,845	0,0733
Кліщ домашнього пилу - інгібування вироблення ІЛ-13 (n=3)	1,23	0,1067

Атопічна анамнестична реакція  $T_H2$  на антиген кліща домашнього пилу сприяє проведенню релевантного *in vitro* аналізу на присутність астми, і одержані дані вказують на те, що A26 Fab'-PEG може виявитись ефективним у лікуванні такого показання. Ко-стимуляція OX40 раніше була пов'язана із запаленням легенів, при цьому передбачалось, що це відіграє критичну роль у диференціації не підданих впливу специфічних алергенів  $CD4^+$  Т-клітин на запальні  $T_H2$ -клітини і повторну відповідь  $T_H2$ -клітин пам'яті (Wang & Liu, 2007, J. Clin. Invest, 117 (12), 3655-3657). В ході алергійного запалення, природний цитокін – тимусний стромальний лімфопоетин (ТСЛП), що виробляється підданими стресу епітеліальними клітинами, запускає процес дозрівання дендритних клітин людини та індукує експресію OX40L. Функціонування OX40L сприяє  $T_H2$  поляризації  $CD4^+$  Т-клітин із запальним фенотипом і підвищеним виробленням ФНО- $\alpha$ , але не ІЛ-10 (Ito et al, 2005, J. Exp. Med, 202 (9), 1213-1223). При відповіді на кліща домашнього пилу, A26 Fab'-PEG значно інгібує класичні  $T_H2$  цитокіни ІЛ-13, ІЛ-5 і ІЛ-4, а також ФНО- $\alpha$ . Крім того, у двох із чотирьох донорів-алергіків A26 Fab'-PEG підвищувало вироблення ІЛ-10. Таким чином, A26 Fab'-PEG може мати здатність не тільки інгібувати алергійну відповідь, але і модулювати її щодо регуляторного фенотипу.

Приклад 5: A26 Fab'-PEG інгібує проліферацію  $CD4^+$  і  $CD8^+$ Т-клітин у моделі Hu-SCID

Модель Hu-SCID має на увазі вплив на мишей лінії SCID людськими МКПК, що приводить до сильної ксеногенної відповіді відносно миші-хазяїна. Така відповідь може відслідковуватись за проліферацією Т-клітин людини у миші. З використанням одержаних експериментально даних про фармакокінетику A26 Fab'-PEG, був розроблений режим приймання доз, що приводить до утворення рівноважних плазмових концентрацій A26 Fab'-PEG, які дорівнюють 8, 23 і 34 мкг/мл. Дані на Фігурі 9 показують, що  $CD4^+$  і  $CD8^+$  Т-клітини зазнають значного інгібування шляхом підтримування рівноважних плазмових концентрацій A26 Fab'-PEG на рівні 8, 23 і 34 мкг/мл.

Спосіб: A26 Fab'-PEG інгібує проліферацію  $CD4^+$  і  $CD8^+$ Т-клітин у моделі Hu-SCID.

Мишам була введена підшкірна навантажувальна доза 0,825, 2,475 або 8,25 мг/кг на день - 2, потім щодня вводились підшкірно підтримуючі дози 0,25, 0,75 або 2,5 мг/кг, відповідно. Вміст НК-клітин у мишей було знижено шляхом введення ТМ $\beta$ 1 за один день до перенесення 8 млн МКПК людини в очерединну порожнину на день 0. На 14 день експеримент був припинений, і кров, рідина від перитонеального змиву і гомогенат селезінки були аналізовані на предмет наявності  $CD4^+$  і  $CD8^+$  клітин. На 14 день миші були умертвлені шляхом зсуву шийних хребців, після чого була відібрана пункція серця. За допомогою аналізу FACS було визначене число  $CD4^+$  і  $CD8^+$  клітин людини. Дані (n=10) представлені у вигляді середнього  $\pm$  СП. Зниження числа  $CD4^+$  і  $CD8^+$  клітин у крові після введення A26 Fab'-PEG презентовано на Фігурі 9.

Приклад 6: Перехресна реактивність A26 Fab'-PEG з OX40 нелюдиноподібних приматів

Для валідації використання A26 Fab'-PEG у нелюдиноподібних приматів (НЛПП), моделі захворювання і доклінічні дані з токсикології, а також показники відносної афінності і функціональної активності були зіставлені з використанням клітин людини і НЛПП.

Афінність, обумовлена клітинами НЛПП

$CD4^+$  Т-клітини яванського макака або макак-резусу були ізольовані з периферичної крові і активовані для експресії високих рівнів OX40. Афінність A26 Fab'-PEG вимірювали шляхом нелінійного регресійного аналізу кривих рівноважного зв'язування, як це показано на Фігурі 3. A26 Fab'-PEG приводив до менше ніж 2-кратного падіння показника афінності у  $CD4^+$  Т-клітинах яванського макаки або макак-резусу у порівнянні з такими клітинами людини, вказуючи на високу перехресну реактивність (Таблиця 3).

Таблиця 3

Порівняння клітинно-опосередкованої афінності A26 Fab'-PEG для клітин людини і НЛПП

A26 Fab'-PEG	$K_D$ (нмоль)
Людина (n=3)	1,106
Яванський макак (n=3)	1,859
Макак-Резус (n=1)	1,202

МКПК НЛПП були сепаровані на градієнті Lympholyte (VH Bio), активовані 1 мкг/мл PHA-L протягом 3 днів при температурі 37°C, 5 %  $CO_2$  і 100 % вологості, і  $CD4^+$  Т-клітини були ізольовані шляхом негативної селекції з використанням магнітних носіїв (набір II для ізоляції  $CD4^+$  Т-клітин НЛПП; Miltenyi Biotec). Показники афінності були виміряні відповідно до опису, представленого у Прикладі 3а (Фігура 3).

Приклад 7: Дослідження ефективності на моделі KIA яванського макака

Обґрунтування для дослідження і схема дослідження

Колаген-індукований артрит яванського макака є стандартною моделлю, використовуваною для визначення профілю потенційних препаратів проти артриту перед випробуванням за участю людей. У наших руках така модель відповідає на лікування, спрямоване проти ФНО $\alpha$  і ІЛ-6. Такі дані відповідають клінічним результатам при РА з еквівалентними лікарськими препаратами для тварин.

Індукція артриту у яванського макака вимагає проведення двох етапів імунізації колагеном II із проміжком в 3 тижні. Симптоми артриту (набрякання і біль в одному або декількох суглобах) можуть проявлятися в будь-який час після другої імунізації, і вони оцінювались щотижня з використанням шкали артриту. Експеримент тривав у цілому 11 тижнів. ОХ40 є ко-стимуляційною молекулою, і, як очікується, втручання у функції буде мати певний вплив на фази імунізації даної моделі. Оцінювалось три режими введення доз А26 Fab'-PEG. Одна група одержувала А26 Fab'-PEG (100 мг/кг) тільки один раз на день перед першою імунізацією. Друга група одержувала А26 Fab'-PEG (100 мг/кг) тільки один раз за день перед другою імунізацією, і третя група одержувала А26 Fab'-PEG (100 мг/кг) за один день до першої і другої імунізацій. Контрольна група тварин одержувала ацетатний буфер. Виникнення захворювання в контрольній групі характеризувалось підвищеними сироватковими рівнями С-реактивного білка в період гострої фази (СРБ) і гаптоглобіну (такі біомаркери вимірюються клінічним чином в ході досліджень РА). Цілісність суглоба оцінювалась шляхом рентгенографії і гістологічним аналізом.

Результати і висновок

У тварин, підданих лікуванню А26 Fab'-PEG за день до першої імунізації, тяжкість артриту в цілому була нижче, ніж у контрольній групі. Такі відмінності в показнику артриту були статистично значимими на дні 49, 63 і 76. На Фігурі 10 показані загальні дані для окремих тварин, виражені у вигляді площі під кривою для клінічних показників. Рентгенологічна оцінка ерозії кістки в суглобах, так само як і гістопатологічні зміни, були знижені (Таблиця 4, Фігура 11). Концентрації СРБ і гаптоглобіну прагнули до зниження, на відміну від контрольної групи. Подібні результати були одержані для групи тварин, що одержували А26 Fab'-PEG за день до першої імунізації і за день до другої імунізації. Однак у тварин, що одержували А26 Fab'-PEG тільки за один день перед другою імунізацією, не було одержано жодного переконливого протиартритного ефекту. Такі дані показують протиартритний ефект лікування ОХ40 у яванського макаки KIA, а також важливість ОХ40 в ініціації патогенної імунної відповіді.

Фігура 10: Інгібування показника артриту А26 Fab'-PEG при KIA у яванського макака

Дані показують значення площі під кривою (ППК) для окремих тварин для використання як клінічних показників і контролю тварин, що одержують ацетатний буфер перед першою і другою імунізаціями (Ас Ас), тварин, що одержують А26 Fab'-PEG перед першою імунізацією (А26 Ас), тварин, що одержують А26 Fab'-PEG перед другою імунізацією (Ас А26), і тварин, що одержують А26 Fab'-PEG перед першою і другою імунізаціями (А26 А26). Лінії являють собою медіани.

Таблиця 4

Вплив лікування А26 Fab'-PEG на рентгенографічні показники ерозії кістки

Група	День		
	0	35	76
Ас Ас	0	$3,9 \pm 1,7$	$24,8 \pm 5,9$
А26 Ас	0	$0,3 \pm 0,3$	$7,6 \pm 3,9^*$
Ас А26	0	$9,4 \pm 4,5$	$17,9 \pm 5,9$
А26 А26	0	$0,9 \pm 0,7$	$5,3 \pm 4,8^{**}$

Тварини Ас Ас одержували ацетатний буфер, тварини А26 Ас одержували А26 Fab'-PEG перед першою імунізацією, тварини Ас А26 одержували А26 Fab'-PEG перед другою імунізацією і тварини А26 А26 одержували А26 Fab'-PEG перед першою і другою імунізаціями. Середні  $\pm$  СП, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  тест Уїлкоксона.

Спосіб Фігура 11: Зниження загального гістологічного показника при KIA у яванського макака при впливі А26Fab'-PEG

Дані показують загальні гістологічні показники (включаючи дегенерацію хряща і кістки, фіброз, грануляційну тканину і гіперплазію) для окремих тварин на момент припинення

дослідження. Тварини Ас Ас одержували ацетатний буфер, тварини А26 Ас одержували А26 Fab'-PEG перед першою імунізацією, тварини Ас А26 одержували А26 Fab'-PEG перед другою імунізацією і тварини А26 А26 одержували А26 Fab'-PEG перед першою і другою імунізаціями. Лінії являють собою медіани.

- 5 Безумовно, розуміється, що даний винахід був описаний тільки як приклад і не може бути обмежений жодним чином, і що в рамках заявленої формули винаходу можуть здійснюватись певні модифікації деталей винаходу. Кращі характеристики кожного варіанта втілення винаходу представлені з урахуванням внесення необхідних змін. Всі публікації, включаючи, але не обмежуючись цим, патенти або заявки на видачу патентів, процитовані в даному описі,
- 10 включені в даний опис за допомогою посилання, як якщо б кожна окрема публікація була специфічно і індивідуально відзначена як внесена в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання.



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

<120> Молекули антитіл, що мають специфічність до людського OX40

<130> G0088-W001

<150> US61/153038

<151> 2009-02-17

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> CDRH1

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучний

<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> Штучний

<220>

<223> CDRH3

<400> 3

Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучний

<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> Штучний

<220>

<223> CDRL2

<400> 5

Asn Ala Asn Thr Leu His Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла 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> Штучний

<220>

<223> ДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла A26

<400> 8

gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	60
attacctgtc gtgcaaccsa gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg	120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gogaacactc tgcataccgg tgttccgtct	180
cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg	240
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtggt	300
ggtaccaaaag ttgagatcaa acgt	324

<210> 9  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Штучний

<220>

<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла 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> Штучний

<220>

<223> ДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла A26

<400> 10

```

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtgggtct gacgtactac      180
cgtgactctg tcaaaggctg tttcaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac      240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtgt actactgcgc tactggtggt      300
gaaggtatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag c                351
    
```

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

<220>

<223> Легкий ланцюг антитіла 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> Штучний

<220>

<223> Легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність

<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> Штучний

<220>  
<223> ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26

<400> 13  
gatatccaga tgacccagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggcga tcgtgtgact 60

```

attacctgtc gtgcaaccca gagcatctac aacgctctgg cttggtatca gcagaaaccg      120
ggtaaagcgc caaaactcct gatctacaac gcgaacactc tgcataccgg tgttcctgtct      180
cgtttctctg cgtctgggtc tggtagcgac tctactctga ccatctcctc tctgcagccg      240
gaagatttcg cgacctacta ctgccagcag tactacgatt acccactgac gtttggtgggt      300
ggtaccaaag ttgagatcaa acgtacggtt gcagctccat ccgtcttcat ctttccaccg      360
tctgacgaac agctcaaatc tggtagctgt tctgtcgttt gctcctgaa caacttctat      420
ccgcgtgaag cgaaagtcca gtggaaagtc gacaacgcac tccagtctgg taactctcag      480
gaatctgtga ccgaacagga ctccaaagac tccacctact ctctgtctag caccctgact      540
ctgtccaaag cagactacga gaaacacaaa gtgtacgctt gcgaagttac ccatcagggt      600
ctgtcttctc cggttaccaa aagctttaat agaggggagt gttaa                        645

```

<210> 14

<211> 708

<212> ДНК

<213> Штучний

<220>

<223> ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність

<400> 14

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa      180
ccgggtaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttccg      240
tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctgcag      300

```

```

ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attaccact gacgtttggt      360
gggtgtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca      420
ccgtctgacg aacagctcaa atctgggtact gcttctgtcg ttgacctcct gaacaacttc      480
tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct      540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccttg      600
actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag      660
ggctctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggttaa      708

```

<210> 15

<211> 228

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> Важкий ланцюг антитіла 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

```

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> Штучний

<220>

<223> Важкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність

<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> Штучний

<220>  
<223> ДНК, що кодує важкий ланцюг антитіла A26

<400> 17  
gagggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag caagcgggtt cacgttcacc aactacggta tccactggat tcgtcaggca	120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtagcctct atctctccgt ctggtggtct gacgtactac	180
cgtgactctg tcaaaggctg ttccaccatc tctcgtgatg acgcgaaaaa ctctccgtac	240
ctgcagatga actctctgcg tgcagaagat accgcagtggt actactgcgc tactggtggt	300
gaaggatatct tcgactactg gggtcagggt accctggtaa ctgtctcgag cgcttctacc	360
aaagggtccga gcgttttccc actggctccg agctctaaat ccacctctgg tggtagggt	420
gcactgggtt gcctggtgaa agactacttc ccagaaccag ttaccgtgtc ttggaactct	480
ggtgcactga cctctggtgt tcacaccttt ccagcagttc tgcagtcttc tggctctgtac	540
tccctgtcta gcgtgggttac cgttccgtct tcttctctgg gtactcagac ctacatctgc	600
aacgtcaacc acaaaccgtc caacacgaaa gtggacaaaa aagtcgagcc gaaatcctgt	660
gacaaaaccc atacctgcgc tgcgtaa	687

<210> 18

<211> 750

<212> ДНК

<213> Штучний

<220>

<223> ДНК, що кодує важкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність

<400> 18

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa	60
gctgagggtc agctgggtcga gtctggaggc gggcttgtcc agcctggagg gagcctgcgt	120
ctctcttggtg cagcaagcgg ttccacgttc accaactacg gtatccactg gattcgtcag	180
gcaccaggta aagggtctgga atgggtagcc tctatctctc cgtctggtgg tctgacgtac	240

taccgtgact ctgtcaaagg tcgtttcacc atctctcgtg atgacgcgaa aaactctccg	300
tacctgcaga tgaactctct gcgtgcagaa gataccgcag tgtactactg cgctactggg	360
ggtgaaggta tcttcgacta ctgggggtcag ggtaccctgg taactgtctc gagcgcttct	420
accaaaggtc cgagcgTTTT cccactggct ccgagctcta aatccacctc tggtggtacg	480
gctgcactgg gttgcctggg gaaagactac ttcccagaac cagttaccgt gtcttggaac	540
tctggtgcac tgacctctgg tgttcacacc ttccagcag ttctgcagtc ttctggtctg	600
tactccctgt ctagcgtggg taccgttccg tcttcttctc tgggtactca gacctacatc	660
tgcaacgtca accacaaacc gtccaacacg aaagtggaca aaaaagtcga gccgaaatcc	720
tgtgacaaaa cccatacctg cgctgcgtaa	750

<210> 19

<211> 1459

<212> ДНК

<213> Штучний

<220>

<223> ДНК, що кодує важкий і легкий ланцюг антитіла A26, включаючи міжгенні послідовності IGS2

<400> 19

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggtg gtttcgctac cgtagcgcaa	60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg	120
actattacct gtcgtgcaac ccagagcatc tacaacgctc tggcttggtg tcagcagaaa	180
ccgggtaaaag cgccaaaact cctgatctac aacgcgaaca ctctgcatac cgggtgttccg	240
tctcgtttct ctgcgtctgg ttctggtacg gactctactc tgaccatctc ctctctgcag	300
ccggaagatt tcgcgaccta ctactgccag cagtactacg attacccact gacgtttggt	360
ggtggtacca aagttgagat caaacgtacg gttgcagctc catccgtctt catctttcca	420



ccgtctgacg aacagctcaa atctggtact gcttctgtcg tttgcctcct gaacaacttc	480
tatccgcgtg aagcgaaagt ccagtggaaa gtcgacaacg cactccagtc tggtaactct	540
caggaatctg tgaccgaaca ggactccaaa gactccacct actctctgtc tagcaccctg	600
actctgtcca aagcagacta cgagaaacac aaagtgtacg cttgcgaagt taccatcag	660
ggctctgtctt ctccggttac caaaagcttt aatagagggg agtggtaaaa tgaagaagac	720
tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttca	780
gctggtcgag tctggaggcg ggcttgtcca gcctggaggg agcctgcgtc tctcttgtgc	840
agcaagcggg ttcacgttca ccaactacgg tatccactgg attcgtcagg caccaggtaa	900
aggctctggaa tgggtagcct ctatctctcc gtctggtggg ctgacgtact accgtgactc	960
tgtcaaagggt cgtttcacca tctctctgtga tgacgcgaaa aactctccgt acctgcagat	1020
gaactctctg cgtgcagaag ataccgcagt gtactactgc gctactgggtg gtgaagggtat	1080
cttcgactac tggggtcagg gtaccctggt aactgtctcg agcgcttcta ccaaagggtcc	1140
gagcgttttc ccactggctc cgagctctaa atccacctct ggtgggtacgg ctgcactggg	1200
ttgcctggtg aaagactact tcccagaacc agttaccgtg tcttggaact ctggtgcact	1260
gacctctggt gttcacacct ttccagcagt tctgcagtct tctggtctgt actccctgtc	1320
tagcgtgggt accgttccgt cttcttctct ggttactcag acctacatct gcaacgtcaa	1380
ccacaaaccg tccaacacga aagtggacaa aaaagtcgag ccgaaatcct gtgacaaaaac	1440
ccatacctgc gctgcgtaa	1459

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

<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> Штучний

<220>

<223> CDRL1

<400> 21

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

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучний

<220>

<223> людський JH4

<400> 22

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

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

<220>  
 <223> JK1 послідовність

<400> 23

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

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антагоністичне антитіло, що зв'язується з людським OX40, яке складається з важкого ланцюга і легкого ланцюга, в якому варіабельний домен важкого ланцюга складається з одного CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:1 для CDR-H1, CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:20 для CDR-H2, і CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:3 для CDR-H3, і в якому варіабельний домен легкого ланцюга складається принаймні з одного CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:21 для CDR-L1, CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:5 для CDR-L2, і CDR з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:6 для CDR-L3.
- 10 2. Антитіло за п. 1, яке відрізняється тим, що важкий ланцюг складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:9.
- 15 3. Антитіло за будь-яким із пп.1 або 2, яке відрізняється тим, що легкий ланцюг складається з послідовності, представленої в SEQ ID NO:7.
4. Молекула антагоністичного антитіла за будь-яким із пп.1-3, яка відрізняється тим, що молекулу антитіла вибирають з групи, яка включає: молекулу повного антитіла з важкими і легкими ланцюгами повної довжини або їх фрагментами, наприклад Fab, модифікованими Fab', Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, VH, VL або scFv фрагментами.
- 20 5. Антагоністичне антитіло, що зв'язується з людським OX40, яке складається з важкого ланцюга з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:9, і легкого ланцюга з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:7.
6. Антагоністичне антитіло, що зв'язується з людським OX40, яке складається з важкого ланцюга з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:15, і легкого ланцюга з послідовністю, представленою в SEQ ID NO:11.
- 25 7. Молекула антагоністичного антитіла за будь-яким із пп. 1-6, яка відрізняється тим, що має приєднану до неї молекулу-ефектор або репортер.
8. Молекула антагоністичного антитіла за п. 7, яка відрізняється тим, що молекула-ефектор складається з одного або декількох полімерів.
- 30 9. Молекула антагоністичного антитіла за п. 8, яка відрізняється тим, що один або декілька полімерів можуть бути представлені поліалкїленом, поліалкенїленом або поліоксіалкїленом із необов'язково заміщеним прямим або розгалуженим ланцюгом, або полісахаридом із прямим або розгалуженим ланцюгом.
- 35 10. Молекула антагоністичного антитіла за п. 9, яка відрізняється тим, що один або декілька полімерів представлені метоксиполіетиленгліколем або поліетиленгліколем.
11. Молекула антагоністичного антитіла за п. 10, яка відрізняється тим, що містить лізил-малеїмідну групу або лізил біс-малеїмідну групу, приєднану до одного із залишків цистеїну на С-кінці важкого ланцюга, при цьому кожна аміногрупа залишку цистеїну ковалентно приєднується до свого залишку метоксиполіетиленгліколю з молекулярною масою близько 20 000 Да.
- 40 12. Молекула антагоністичного антитіла, що має специфічність до людського OX40, яка представлена модифікованим Fab фрагментом, важкий ланцюг якого містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:15, а легкий ланцюг містить послідовність, представлену в SEQ ID NO:11, та має лізил-малеїмідну групу, приєднану до залишку цистеїну в положенні 226 важкого

ланцюга, при цьому кожна аміногрупа залишку лізилу ковалентно приєднується до свого залишку метоксиполіетиленгліколю з молекулярною масою близько 20 000 Да.

13. Ізольована послідовність ДНК, що кодує важкий та/або легкий ланцюг(-и) антитіла, вказаного у будь-якому з пп. 1-12.

5 14. Вектор клонування або експресії, що складається з однієї або декількох послідовностей ДНК, вказаних у п. 13.

15. Вектор за п. 14, який відрізняється тим, що вектор включає послідовності, представлені в SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:18.

10 16. Вектор за п. 14, який відрізняється тим, що вектор включає послідовність, представлену в SEQ ID NO:19.

17. Клітина-хазяїн, яка включає один або декілька векторів клонування або експресії, вказаних у п. 14 або п. 15, або п. 16.

18. Спосіб одержання антитіла за будь-яким із пп. 1-12, який складається з культивування клітини-хазяїна, вказаної у п. 17, та ізоляції антитіла.

15 19. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло, вказане у будь-якому з пп. 1-12, у комбінації з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, розріджувачем або носієм.

20. Фармацевтична композиція за п. 19, яка відрізняється тим, що містить інші додаткові активні діючі речовини.

20 21. Антитіло за будь-яким з пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 19 або п. 20 для використання у лікуванні або профілактиці патологічного розладу, опосередкованого ОХ40 або пов'язаного з підвищеним рівнем ОХ40.

25 22. Використання антитіла за будь-яким з пп. 1-12 у виробництві лікарського препарату для лікування або профілактики патологічного розладу, опосередкованого ОХ40 або пов'язаного з підвищеним рівнем ОХ40.

23. Використання за п. 22, в якому патологічним розладом є інфекція.

24. Використання за п. 22, при якому патологічним розладом є хвороба "трансплантат проти хазяїна" або відторгнення трансплантата.

30 25. Використання за п. 22, в якому патологічним розладом є алергія, ХОХЛ, астма, аутоімунне захворювання або ревматоїдний артрит.

(a) Варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR

(b) Варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSS

(c)

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

(d) Легкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:11)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (SEQ ID NO:12)

MKKTAAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
TYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фіг. 1

(f) Важкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSV  
KGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL  
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(g) Важкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (SEQ ID NO:16)

MKKTALAIAVAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGK  
GLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYW  
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

(h) ДНК, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:8)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTC  
GTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCCT  
GATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTTCTGGTACGGAC  
TCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATT  
ACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAACGT

**Продовження Фіг. 1**

(i) ДНК, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла A26 (SEQ ID NO:10)

GAGGTTTCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTT  
GTGCAGCAAGCGGTTTACGTTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCAGGTAA  
AGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAACCTGACTCTGTCTC  
AAAGGTCGTTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAACTCTC  
TGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTAACCTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTG  
GGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGC

(j) ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26 (SEQ ID NO:13)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTA  
CCTGTGCTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGC  
GCCAAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTTCTCTGCG  
TCTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCT  
ACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAA  
ACGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGT  
ACTGCTTCTGTCTGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAG  
TCGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTC  
CACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGAC  
GCTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGT  
GTAA

(к) ДНК, що кодує легкий ланцюг антитіла A26, включаючи сигнальну послідовність (SEQ ID NO:14)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAGCTG  
ATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTAC  
CTGTGCTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCG  
CCAAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTTCTCTGCGT  
CTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTA  
CTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAA  
CGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTA  
CTGCTTCTGTCTGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAGT  
CGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCC  
ACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGACG  
CTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGTG  
TTAA

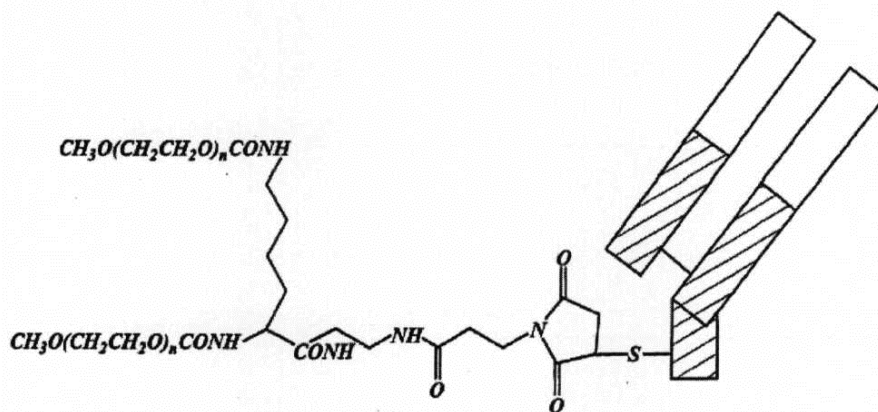
Продовження Фіг. 1



(п) ДНК, що кодує важкий і легкий ланцюг антитіла A26, включаючи міжгенну послідовність IGS2 (SEQ ID NO:19)

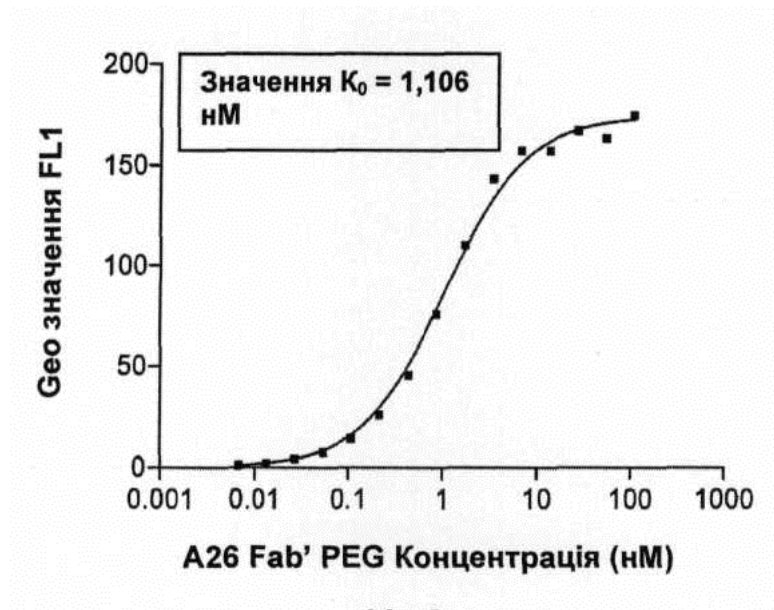
ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGCAAGCTG  
 ATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACTATTAC  
 CTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCG  
 CCAAACTCCTGATCTACAACGCGAACACTCTGCATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGT  
 CTGGTTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTA  
 CTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAAGTTGAGATCAAA  
 CGTACGGTTGCAGCTCCATCCGTCTTCATCTTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAATCTGGTA  
 CTGCTTCTGTCGTTTGCCTCCTGAACAACTTCTATCCGCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGT  
 CGACAACGCACTCCAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGAACAGGACTCCAAAGACTCC  
 ACCTACTCTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACG  
 CTTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGTCTTCTCCGGTTACCAAAGCTTTAATAGAGGGGAGTG  
 TTAAATGAAGAAGACTGCTATAGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTTCGCCACCGTGGCGCA  
 AGCTGAGGTTTACGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTC  
 TCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTTCGTCAGGCACCA  
 GTAAAGGTCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACGTAACCTGACTC  
 TGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAAC  
 TCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACT  
 ACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACCAAAGGTCCGAGCGTTTTCCC  
 ACTGGCTCCGAGCTCTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACTGGGTTCCTGGTGAAGAC  
 TACTTCCCAGAACCAGTTACCGTGTCTTGGAACTCTGGTGCCTGACCTCTGGTGTTCACACCT  
 TTCCAGCAGTTCTGCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCGTGGTTACCGTTCCTCTTC  
 TTCTCTGGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAACCGTCCAACACGAAAGTGGAC  
 AAAAAAGTCGAGCCGAAATCCTGTGACAAAACCCATACCTGCGCTGCGTAA

Продовження Фіг. 1

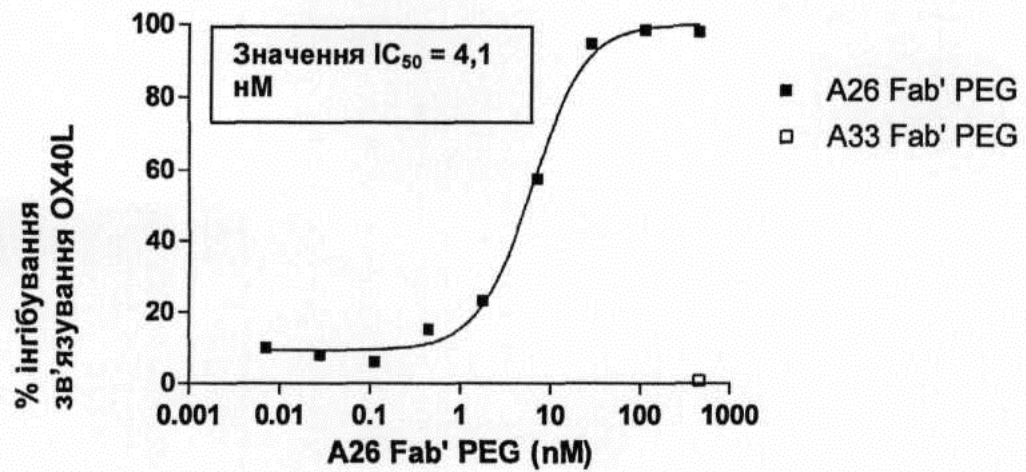


Фіг. 2

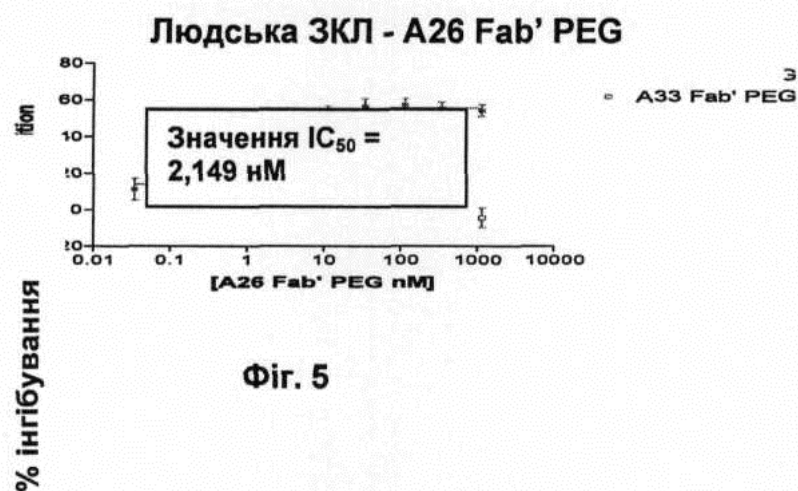




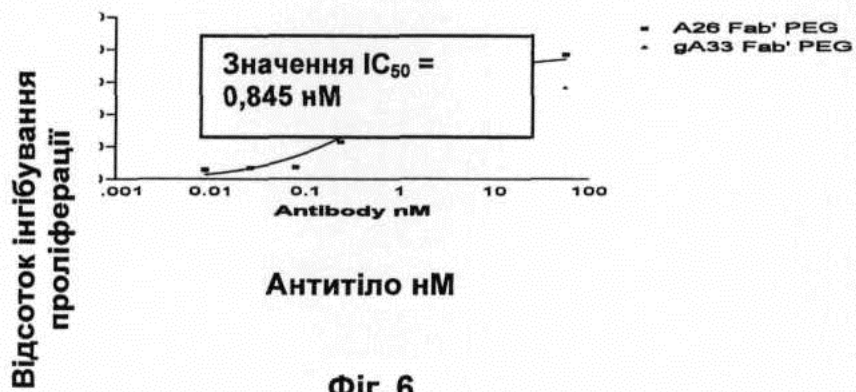
Фіг. 3



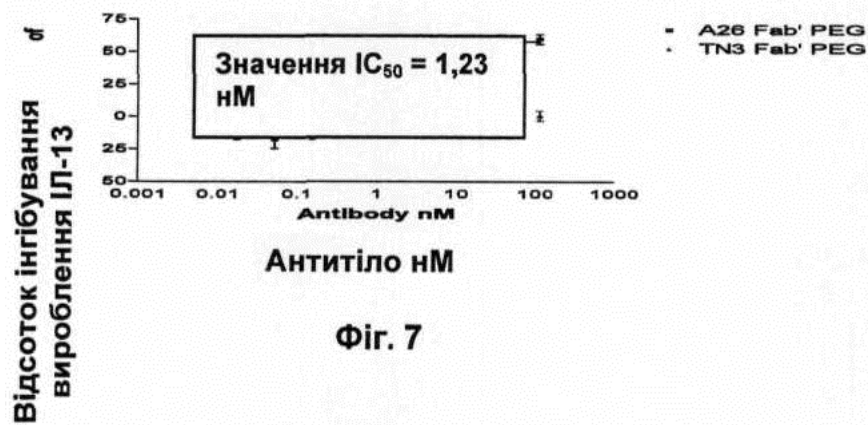
Фіг. 4



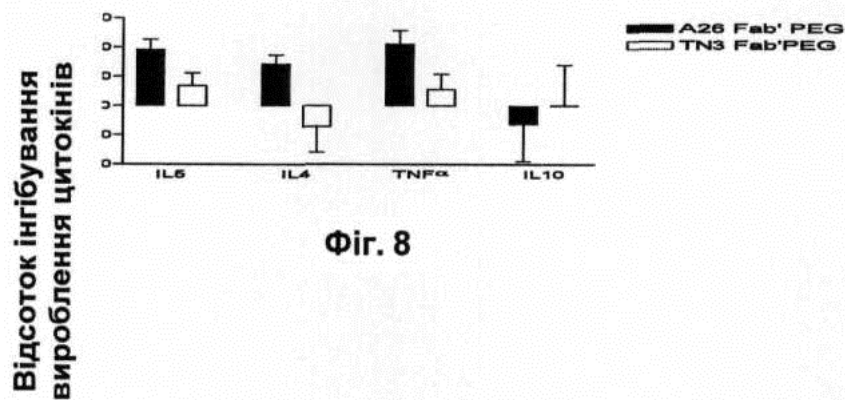
Фіг. 5



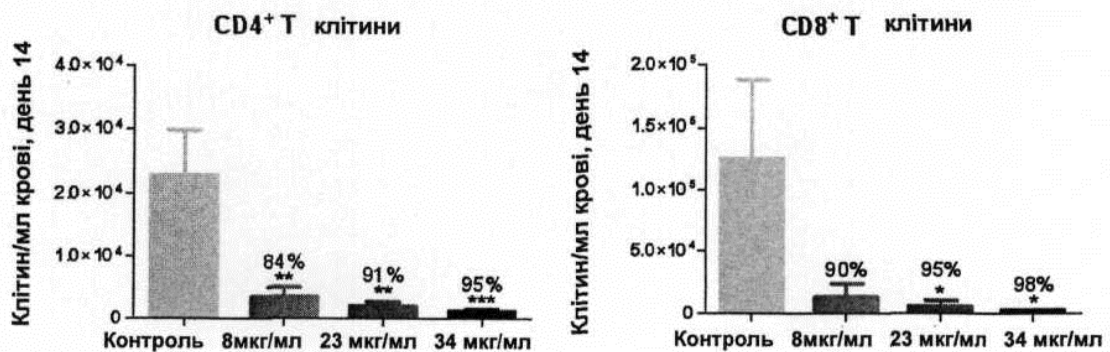
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

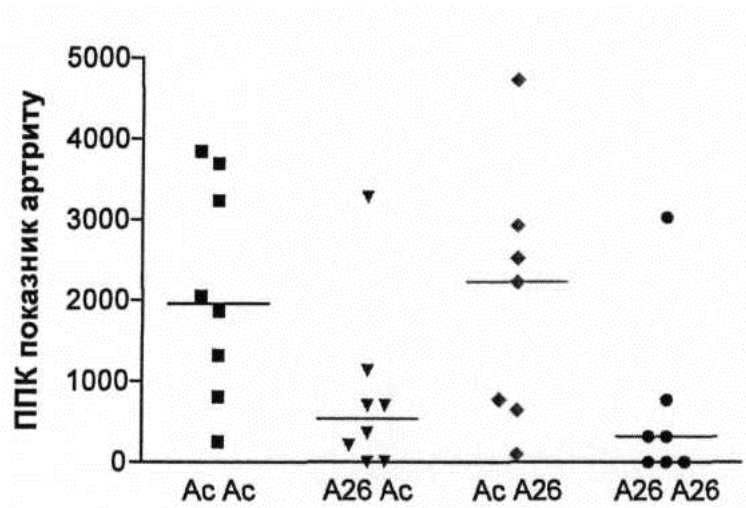


Fig. 10

Загальний гістологічний показник

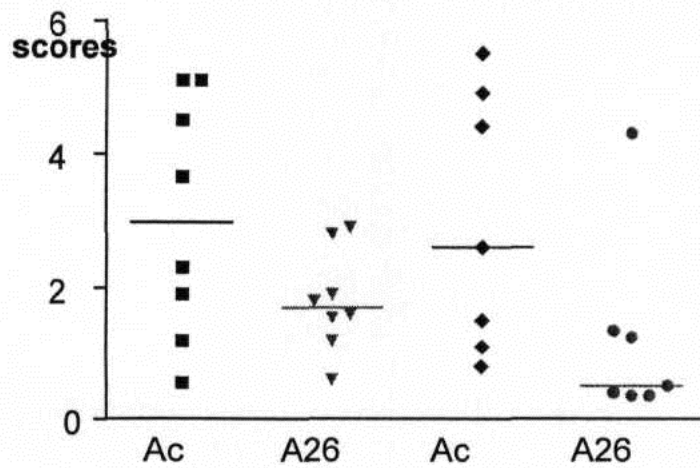


Fig. 11

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601