

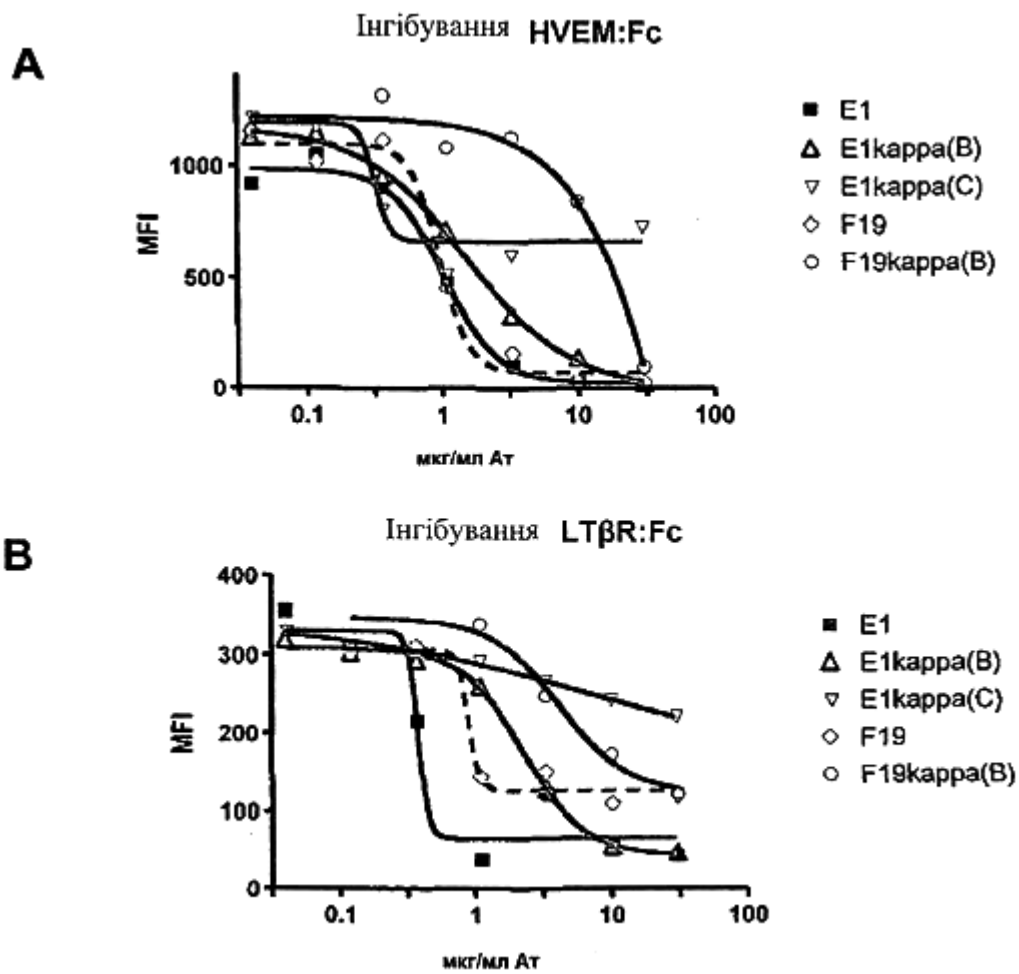
**УКРАЇНА****(19) UA (11) 99714 (13) C2**
(51) МПК**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 37/06** (2006.01)**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2009 02921	(72) Винахідник(и): Гренджер Стівен В. (US), Като Сінтіро (US), Уер Карл Ф. (US)
(22) Дата подання заявки: 24.08.2007	(73) Власник(и): ЛЯ ХОЙЯ ІНСТІТУТ ФОР ЕЛЛЕРДЖИ ЕНД ІММЬЮНОЛОДЖИ, 9420 Athena Circle, La Jolla, CA 92037, United States of America (US), КЮВА ХАККО КІРІН КО., ЛІМІТЕД, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan (JP)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.09.2012	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 60/840,774, 60/897,875	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 03089575 A, 30.10.2003. TAMADA KOJI ET AL: "Modulation of T-cell- mediated immunity in tumor and graft-versus- host disease models through the LIGHT co- stimulatory pathway" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 283-289, XP002246831 ISSN: 1078- 8956.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.08.2006, 25.01.2007	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2009, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2012, Бюл.№ 18	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2007/018832, 24.08.2007	

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З LIGHT**(57) Реферат:**

Винахід належить до ізолюваного антитіла, що специфічно зв'язується з LIGHT людини (hLIGHT), молекули нуклеїнової кислоти, що його кодує, вектора, клітини-хазяїна, способу одержання антитіла, композиції, що його містить. Винахід також належить до способу ослаблення одного або більше симптомів запального захворювання кишечника (IBD) у людини, яка потребує такого ослаблення, та способу ослаблення одного або більше симптомів хвороби "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) у людини.

UA 99714 C2



У даному винаході запропоновані антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом LIGHT людини (hLIGHT) (лімфотоксин-подібний, проявляє експресію, що індукується, і конкурує з глікопротеїном D HSV за HVEM, рецептор, що експресується Т-лімфоцитами), фрагментом поліпептиду hLIGHT або іншим епітопом hLIGHT. У деяких варіантах антитіла є повністю людськими антитілами, переважно, повністю людськими моноклональними антитілами, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Також запропоновані ізольовані нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Винахід, крім того, стосується векторів і клітин-хазяїнів, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT, а також способів одержання антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Також запропоновані способи застосування анти-hLIGHT-антитіл, пропонування у даному винаході, для інгібування біологічної активності hLIGHT in vivo і/або для лікування або іншого впливу на hLIGHT-опосередковане захворювання у пацієнта.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

LIGHT (лімфотоксин-подібний, проявляє експресію, що індукується, і конкурує з глікопротеїном D HSV за HVEM, рецептор, що експресується Т-лімфоцитами) є однією з можливих мішеней цитокінів, що залучена до процесів хронічних запальних аутоімунних захворювань (Mauri et al. 1998 Immunity 8: 21-30). Як представник суперсімейства лігандів TNF (TNFSF), пептид LIGHT також відомий як TNFSF14 або CD258. LIGHT експресується на поверхні Т-клітин при активації строго регульованим чином, з'являючись у межах 4 годин, досягаючи піку до 12-24 годин і зникаючи до 48 годин (Castellano et al. 2002 J. Biol. Chem. 277: 42841-51). Однак, LIGHT також конститутивно є присутнім на рівні, що реєструється, на поверхні незрілих дендритних клітин (Tamada et al. 2000 J. Immunol. 164: 4105-10) і на Т-клітинах і клітинах-природних кілерів (NK) у кишечнику (Cohavy et al. 2005 J. Immunol. 174: 646-53). LIGHT опосередковує свої біологічні ефекти завдяки зв'язуванню з трьома рецепторами суперсімейства TNF, включаючи рецептор лімфотоксину β (LT β R) (Crowe et al. 1994 Science 264: 707-10, Browning et al. 1997 J. Immunol. 159: 3288-98), медіатор проникнення вірусу герпесу (HVEM) (Montgomery et al. 1996 Cell 87(3): 427-36) і рецептор-пастку 3 (DcR3) (Yu et al. 1999 J. Biol. Chem. 274: 13733-6).

У мишей, яких лікували інгібуючим злитим білком LT β R-Fc, знижувалися симптоми запалення у моделі коліту на основі перенесення Т-клітин CD4+CD45RB^{high}, патології, опосередкованої Т-клітинами CD4+ (Mackay et al. 1998 Gastroenterology 115 1464-75). Також показано, що конститутивна специфічна для трансгенних Т-клітин експресія LIGHT також приводить до тяжкого запалення кишечника з аутоімунно-подібною патологією, подібною до запального захворювання кишечника (IBD) у людини (Wang et al. 2005 J. Immunol. 174: 8173-82, Shaikh et al. 2001 J. Immunol. 167: 6330-7, Wang et al. 2001 J. Immunol. 167: 5099-105, Wang et al. 2004 J. Clin. Invest. 113: 826-35). Лімфоцити, що експресують LIGHT, можуть індукувати IBD-подібні симптоми (наприклад, профілі цитокінів, що відповідають хворобі Крона, виразки, що розтріскуються, ілеїт і підвищення IFN- γ і TNF в ободовій кишці) у тому випадку, коли клітини кишкових лімфатичних вузлів від трансгенних за LIGHT тварин переносять RAG-/- (Wang et al. 2005 J. Immunol. 174: 8173-82). У випадку захворювання людини збільшення експресії LIGHT спостерігали у пацієнтів з хворобою Крона в активній стадії (Cohavy et al. 2005 J. Immunol. 174: 646-53, Wang et al. 2005 J. Immunol. 174: 8173-82, Wang et al. 2004 J. Clin. Invest. 113: 826-35, Cohavy et al. 2004 J. Immunol. 173 251-8). Також показано, що рівень LIGHT підвищений у Т-клітинах кишечника у пацієнтів з IBD (Cohavy et al. 2004 J. Immunol. 173: 251-8). Генетичні дані також свідчать про роль LIGHT в IBD (Granger et al. 2001 J. Immunol. 167: 5122-8); (Rioux et al. 2000 Am. J. Hum. Genet. 66: 1863-70; Low et al. 2004 Inflamm. Bowel Dis. 10: 173-81; Bonen and Cho 2003 Gastroenterology 124: 521-36).

Крім того, показано, що передача сигналу CCL20-CCR6 залучена до IBD, і LIGHT індукує секрецію CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини лінії HT29.14s. У дослідженнях на людині виявлено, що епітеліальні клітини ободової кишки є основним джерелом CCL20 у пацієнтів з IBD, і експресія CCL20 зростає у людей, хворих на IBD (Kwon et al. 2002 Gut 51: 818-26, Kaser et al. 2004 J. Clin. Immunol. 24: 74-85).

hLIGHT також залучений до хвороби "трансплантат проти хазяїна" (GVHD). Наприклад, показано, що LIGHT забезпечує сильну костимулюючу активність для Т-клітин, підсилюючи проліферацію і продукування цитокінів Th1, незалежні від шляху B7-CD28 (див., наприклад, Tamada et al. 2000 J. Immunol. 164: 4105-4110). Блокування костимуляції LIGHT-HVEM або моноклональними анти-HVEM-антитілами, HVEM-Ig, або злитим білком LT β R інгібує відповіді

алогенних Т-клітин (див., наприклад, Tamada et al. 2000 J. Immunol. 164: 4105-4110, Harrop et al. 1998 J. Immunol. 161: 1786). Крім того, введення *in vivo* LT β R-Ig або мишачих анти-LIGHT-антитіл інгібує відповіді цитотоксичних Т-лімфоцитів проти хазяїна (CTL) у моделі гострого GVHD у мишей (Tamada et al. 2000 Nat. Med. 6: 283-289).

Хоча спостереження, такі як спостереження, обговорювані вище, свідчать про роль LIGHT у запальних розладах, таких як IBD або GVHD, поки що не одержані антитіла людини проти LIGHT людини і не показано, що які-небудь анти-hLIGHT-антитіла людини або моноклональні анти-hLIGHT-антитіла є антагоністичними стосовно біологічної активності hLIGHT. По суті продовжує існувати необхідність у виявленні способів терапії, таких як анти-LIGHT-терапія, застосовних для лікування запальних захворювань у людини. Цитування або обговорення посилань у даному описі не слід розцінювати як допущення того, що зазначене є попереднім рівнем техніки стосовно даного винаходу.

СУТЬ ВИНАХОДУ

У даному винаході запропоновані антитіла, такі як повністю людські антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Також запропоновані ізолювані нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, такі як повністю людські антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Крім того, запропоновані вектори і клітини-хазяїни, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, такі як повністю людські антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Запропоновані також способи одержання антитіл, таких як повністю людські антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У даному винаході запропонований також спосіб лікування опосередкованого hLIGHT захворювання, що включає в себе введення антитіла, такого як повністю людське антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У переважних варіантах анти-hLIGHT-антитіла, пропонувані у даному описі, є антагоністичними антитілами, які ослаблюють, нейтралізують або іншим чином інгібують біологічну активність hLIGHT *in vivo* (наприклад, опосередковані hLIGHT продукування або секрецію CCL20, IL-8 або RANTES з клітин, що експресують ліганд hLIGHT, такий як рецептор hLIGHT (наприклад, HVEM, LT β R і/або DcR3)). Антитіло відповідно до винаходу може являти собою повнорозмірне антитіло або антигензв'язувальний фрагмент антитіла. Антитіла відповідно до винаходу також застосовні для виявлення hLIGHT, а також для ослаблення, нейтралізації або інгібування іншим чином активності hLIGHT, наприклад, у людини, яка страждає від розладу, при якому шкідлива активність hLIGHT.

Таким чином, в одному аспекті даного винаходу запропоноване ізолюване антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У деяких варіантах антитіло імуноспецифічно зв'язується з (а) тримерним (або нативним) епітопом hLIGHT, (b) мономерним (або денатурованим) епітопом hLIGHT, (c) як з тримерним епітопом hLIGHT, так і з мономерним епітопом hLIGHT, (d) тримерним епітопом hLIGHT, але не з мономерним епітопом hLIGHT, або (e) мономерним епітопом hLIGHT, але не з тримерним епітопом hLIGHT. У переважних варіантах антитіло імуноспецифічно зв'язує тримерний епітоп hLIGHT, але не мономерний епітоп hLIGHT людини. У переважних варіантах антитіло являє собою антитіло E1, антитіло E13, антитіло E63, антитіло F19 або антитіло F23.

Гібридами, які продукують кожне з антитіл E1, E13, E63, F19 і F23, депонували за умовами Будапештського договору в Американській колекції типових культур (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) 12 липня 2006 (номери доступу ATCC PTA-7729 (гібрида 124 E1) і PTA-7728 (гібрида 124 F23), відповідно), 17 серпня 2006 (номери доступу ATCC PTA-7818 (гібрида 124 E63) і PTA-7819 (гібрида 124 F19)) і 23 серпня 2006 (номер доступу ATCC PTA-7842 (гібрида 124 E13)) і включені у даний опис у вигляді посилання. Антитіла, що продукуються кожною з гібридом 124 E1, 124 E13, 124 E63, 124 F19 і 124 F23, також можуть бути названі у даному описі E1, E13, E63, F19, F23, відповідно, і/або зазначені під номерами доступу в ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 і PTA-7728, відповідно.

Зазначені антитіла, гібридами, способи одержання антитіл і способи застосування таких антитіл включені в обсяг винаходу.

У конкретних варіантах антитіло відповідно до винаходу являє собою антитіло, що конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином) антитілом E1, антитілом E13 і/або антитілом E63 стосовно зв'язування з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом hLIGHT або епітопом

hLIGHT. В інших варіантах антитіло конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином) антитілом F19 і/або антитілом F23 стосовно зв'язування з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом hLIGHT або епітопом hLIGHT. У конкретних варіантах антитіло конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином) антитілом E1, антитілом E13 і/або антитілом E63, але конкурентно не блокується (наприклад, залежним від дози чином) антитілом F19 і/або антитілом F23 стосовно зв'язування з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом hLIGHT або епітопом hLIGHT. В інших варіантах антитіло конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином) антитілом E1, антитілом E13 і/або антитілом E63 стосовно зв'язування з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом hLIGHT або епітопом hLIGHT. Приклади тестів стосовно конкурентного блокування наведені у даному описі у розділі "Приклади".

У даному винаході запропоновані також антитіла або антигензв'язувальні фрагменти антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У деяких варіантах антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містить ланцюг VH, ланцюг VL, домен VH, домен VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіл E1, E13, E63, F19 або F23.

У деяких варіантах антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить менше шести CDR. У деяких варіантах антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить або складається з однієї, двох, трьох, чотирьох або п'яти CDR, вибраних з групи, що складається з CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL. У конкретних варіантах антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить або складається з однієї, двох, трьох, чотирьох або п'яти CDR, вибраних з групи, що складається з CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіл E1, E13, E63, F19 або F23.

У даному винаході запропоновані також фармацевтичні композиції, що містять анти-hLIGHT-антитіло відповідно до винаходу, таке як E1, E13, E63, F19 або F23.

У конкретних варіантах антитіло відповідно до винаходу являє собою повністю людське антитіло, моноклональне антитіло, рекомбінантне антитіло, антагоністичне антитіло або будь-яку їх комбінацію. У конкретних варіантах антитіло являє собою повністю людське антитіло, таке як повністю людське моноклональне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що імуноспецифічно зв'язується з hLIGHT. У переважних варіантах антитіло є антагоністичним антитілом.

У деяких варіантах антитіло конкурує (наприклад, залежним від дози чином) з HVEM, LT β R, DcR3 або їх злитими білками (наприклад, Fc:HVEM, Fc:LT β R або Fc:DcR3) за зв'язування з поліпептидом hLIGHT, таким як поліпептид hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинний поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або епітоп hLIGHT. Приклади тестів стосовно блокування наведені у даному описі у розділі "Приклади".

У другому аспекті даного винаходу запропоновані ізольовані нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У деяких варіантах нуклеїнова кислота кодує VH-ланцюг, VL-ланцюг, VH-домен, VL-домен, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіл E1, E13, E63, F19 або F23.

У третьому аспекті даного винаходу запропоновані вектори і клітини-хазяїни, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT.

У четвертому аспекті даного винаходу запропоновані способи одержання антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У деяких варіантах антитіло імуноспецифічно зв'язується з варіантом поліпептиду hLIGHT, обумовленим однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L і/або 214K-32L. У даному винаході запропоновані також гібридами, які продукують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT або його SNP-варіантом. У переважних варіантах гібридома являє собою гібридому, що продукує E1, E13, E63, F19 або F23.

У п'ятому аспекті даного винаходу запропоновані способи лікування або іншим чином ослаблення одного або декількох симптомів hLIGHT-опосередкованого захворювання у суб'єкта (наприклад, у людини), що включають в себе введення суб'єкту ефективної кількості антитіла,

що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), при цьому активність hLIGHT інгібується антитілом. У деяких варіантах hLIGHT-опосередкованим захворюванням є IBD, таке як хвороба Крона або виразковий коліт. В інших варіантах hLIGHT-опосередкованим захворюванням є GVHD.

У шостому аспекті даного винаходу запропоновані способи зниження або інгібування зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3 у суб'єкта (наприклад, у людини), що включають в себе введення суб'єкту ефективної кількості антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT).

У сьомому аспекті даного винаходу запропоновані способи зниження або інгібування біологічної активності hLIGHT, такої як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES у суб'єкта (наприклад, у людини), що включають в себе введення суб'єкту ефективної кількості антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні), при цьому біологічна активність hLIGHT знижується або інгібується антитілом.

У восьмому аспекті даного винаходу запропоновані способи зниження або інгібування зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3 у клітині, що має експресований на клітинній поверхні hLIGHT, здійснюючи контактування клітини з ефективною кількістю антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT), таким як поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або епітоп hLIGHT.

У дев'ятому аспекті даного винаходу запропоновані способи зниження або інгібування біологічної активності hLIGHT, такої як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, у клітині, що має експресований на клітинній поверхні рецептор hLIGHT (такий як HVEM, LT β R і/або Dc3R), здійснюючи контактування клітини з ефективною кількістю антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, або розчинним hLIGHT, або його SNP-варіантом), при цьому біологічна активність hLIGHT знижується або інгібується антитілом.

У десятому аспекті даного винаходу запропоноване антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло додатково містить мітку, що реєструється. У деяких варіантах анти-hLIGHT-антитіла, які містять мітку, що реєструється, використовують у способі реєстрації hLIGHT у зразку, при цьому зазначений спосіб включає в себе здійснення контакту зразка з анти-hLIGHT-антитілом. У конкретних варіантах зразок містить клітину, що експресує hLIGHT на поверхні клітини.

В одинадцятому аспекті даного винаходу запропоновані набори, що містять антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT.

ТЕРМІНОЛОГІЯ

Якщо не зазначено особливо, всі технічні і наукові терміни, використовувані у даному описі, мають таке ж значення, що звичайно має на увазі фахівець у даній галузі. Всі патенти, заявки, опубліковані заявки та інші публікації включені у вигляді посилання у повному обсязі. У тому випадку, коли існує множина визначень для використовуваного у даному описі терміну, переважають ті, які наведені у даному розділі, якщо не зазначено інше.

Термін "близько" або "приблизно" означає у межах 20 %, переважно у межах 10 % і більш переважно у межах 5 % (або 1 % або менше) від заданого значення або діапазону.

У використовуваному у даному описі значенні "вводити" або "введення" стосується акту ін'єкції або іншої фізичної доставки речовини, що існує поза організмом (наприклад, анти-hLIGHT-антитіло, пропоноване у винаході) пацієнту, наприклад, через слизову оболонку, інтрадермальної, внутрішньовенної, внутрішньом'язової доставки і/або будь-якого іншого способу фізичної доставки, описаного у даній публікації або відомого у даній галузі. При лікуванні захворювання або його симптому, введення речовини звичайно здійснюють після прояву захворювання або його симптомів. У випадку профілактики захворювання або його симптомів введення речовини звичайно здійснюють до прояву захворювання або його симптомів.

У контексті поліпептиду термін "аналог" у використовуваному у даному описі значенні стосується поліпептиду, що має функцію, подібну до або ідентичну функції поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла, але не обов'язково містить амінокислотну послідовність, подібну до або ідентичну амінокислотній послідовності

поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла, або має структуру, подібну до або ідентичну структурі поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла. Поліпептид, що має подібну амінокислотну послідовність, стосується поліпептиду, який відповідає, щонайменше, одному з наступних поліпептидів: (а) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 30 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 % і переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 95 % або найбільш переважно щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності поліпептиду hLIGHT (наприклад, SEQ ID NO: 52), фрагмента поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла, описаного у даній публікації; (b) поліпептид, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується у жорстких умовах з нуклеотидною послідовністю, що кодує поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла (або його VH- або VL-область), описані у даній публікації, щонайменше з 5 амінокислотних залишків, щонайменше з 10 амінокислотних залишків, щонайменше з 15 амінокислотних залишків, щонайменше з 20 амінокислотних залишків, щонайменше з 25 амінокислотних залишків, щонайменше з 40 амінокислотних залишків, щонайменше з 50 амінокислотних залишків, щонайменше з 60 амінокислотних залишків, щонайменше з 70 амінокислотних залишків, щонайменше з 80 амінокислотних залишків, щонайменше з 90 амінокислотних залишків, щонайменше з 100 амінокислотних залишків, щонайменше з 125 амінокислотних залишків або щонайменше з 150 амінокислотних залишків (див., наприклад, Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY); і (c) поліпептид, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка щонайменше на 30 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 % і переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 95 % або найбільш переважно щонайменше на 99 % ідентична нуклеотидній послідовності, що кодує поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла (або його VH- або VL-область), описані у даній публікації. Поліпептид зі структурою, подібною до структури поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла, описаних у даній публікації, стосується поліпептиду, що має вторинну, третинну або четвертинну структуру, подібну до відповідної структури поліпептиду hLIGHT, фрагмента hLIGHT або hLIGHT-антитіла, описаних у даній публікації. Структуру поліпептиду можна визначити способами, відомими фахівцям у даній галузі, включаючи без обмеження рентгенівську кристалографію, ядерно-магнітний резонанс і кристалографічну електронну мікроскопію.

Щоб визначити ідентичність у відсотках двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнової кислоти, послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння (наприклад, можуть бути введені пробіли у послідовність першої амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти для оптимального вирівнювання з другою амінокислотною послідовністю або послідовністю нуклеїнової кислоти). Потім порівнюють амінокислотні залишки або нуклеотиди у відповідних положеннях амінокислот або положеннях нуклеотидів. Коли положення у першій послідовності зайняте таким же амінокислотним залишком або нуклеотидом, що і у відповідному положенні у другій послідовності, то молекули ідентичні за таким положенням. Ідентичність у відсотках між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних положень, наявних в обох послідовностях (тобто % ідентичності = кількість ідентичних положень, що сполучаються/загальна кількість положень \times 100 %). В одному варіанті дві послідовності мають однакову довжину.

Визначення ідентичності у відсотках між двома послідовностями (наприклад, амінокислотними послідовностями або послідовностями нуклеїнових кислот) також можна здійснити з використанням математичного алгоритму. Переважним необмежувальним прикладом математичного алгоритму, застосовуваним для порівняння двох послідовностей, є алгоритм Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2264-2268, модифікований, як описано у Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873-5877. Такий алгоритм включений у програми NBLAST і XBLAST Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403. Пошуки нуклеотидів у BLAST можна здійснити, використовуючи установки параметрів програми для нуклеотидів NBLAST, наприклад, рахунок = 100, довжина слова = 12, щоб одержати нуклеотидні послідовності, гомологічні молекулам нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу. Пошук

білків BLAST можна здійснити, використовуючи установки параметрів програми XBLAST, наприклад, рахунок = 50, довжина слова = 3, щоб одержати амінокислотні послідовності, гомологічні молекулі білка відповідно до даного винаходу. Щоб одержати вирівнювання з пробілами з метою порівняння можна використовувати Gapped BLAST, що описаний в Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Альтернативно, можна використовувати PSI BLAST, щоб здійснити ітераційний пошук, що виявляє віддалені взаємозв'язки між молекулами (там же). При використанні програм BLAST, Gapped BLAST і PSI BLAST можна використовувати параметри відповідних програм (наприклад, XBLAST і NBLAST) за умовчанням (див., наприклад, National Center for Biotechnology Information (NCBI) в Інтернеті ncbi.nlm.nih.gov). Іншим переважним необмежувальним прикладом математичного алгоритму, використовованого для порівняння послідовностей, є алгоритм Myers and Miller, 1988, *CABIOS* 4: 11-17. Такий алгоритм включений у програму ALIGN (версія 2.0), що є частиною пакета комп'ютерних програм з вирівнювання послідовностей GCG. У випадку застосування програми ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей можна використовувати матрицю зважених залишків PAM120, штраф за довжину пробілу 12 і штраф за пробіл 4.

Ідентичність у відсотках між двома послідовностями можна визначити, використовуючи методики, подібні до методик, описаних вище, допускаючи або не допускаючи пробіли. При розрахунку ідентичності у відсотках звичайно враховують тільки точні збіги.

У використовованому у даному описі значенні "антагоністичний" або "інгібуючий" hLIGHT стосується молекули, яка здатна інгібувати або іншим чином знижувати одну або декілька біологічних активностей hLIGHT, наприклад, у клітині, що експресує hLIGHT, або у клітині, що експресує ліганд hLIGHT, такий як рецептор hLIGHT. Наприклад, у деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу є антагоністичними антитілами, які інгібують або іншим чином зменшують секрецію CCL20, IL-8 і/або RANTES з клітини, що має експресований на клітинній поверхні рецептор hLIGHT (наприклад, HVEM, LT β R і/або DcR3), у тому випадку, коли зазначене антитіло контактує із зазначеною клітиною. У деяких варіантах антагоніст hLIGHT (наприклад, антагоністичне антитіло відповідно до винаходу) може, наприклад, діяти за допомогою інгібування або зниження іншим чином активації і/або клітинних шляхів передачі сигналу у клітині, що експресує рецептор hLIGHT, тим самим інгібуючи hLIGHT-опосередковану біологічну активність клітини у порівнянні з hLIGHT-опосередкованою біологічною активністю за відсутності антагоніста. У деяких варіантах антитіла, пропоновані у винаході, є повністю людськими антагоністичними анти-hLIGHT-антитілами, переважно повністю людськими моноклональними антагоністичними анти-hLIGHT-антитілами.

Термін "антитіло" та "імуноглобулін" або "Ig" можуть бути використані у даному описі взаємозамінно. Терміни "антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT", "антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT", "анти-hLIGHT-антитіла" і аналогічні терміни також використовуються у даному описі взаємозамінно і стосуються антитіл і їх фрагментів, які специфічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, таким як антиген або епітоп hLIGHT. Антитіло або його фрагмент, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, може перехресно реагувати зі спорідненими антигенами. Переважно антитіло або його фрагмент, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, перехресно не реагує з іншими антигенами. Антитіло або його фрагмент, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, може бути ідентифіковане, наприклад, за допомогою імуноаналізів, BIAcore, або інших способів, відомих фахівцям у даній галузі. Антитіло або його фрагмент специфічно зв'язується з антигеном hLIGHT у тому випадку, коли воно зв'язується з антигеном hLIGHT з більш високою афінністю, ніж з будь-яким перехресно реагуючим антигеном, що визначають, використовуючи експериментальні методики, такі як радіоімуноаналізи (RIA) і твердофазові імуноферментні аналізи (ELISA). Звичайно специфічна або вибірна взаємодія буде давати сигнал, що перевищує фоновий сигнал або шум, щонайменше, у два рази і більш звичайно перевищує фон більш ніж у 10 разів. Обговорення, що стосується специфічності антитіл, див., наприклад, у Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York, 332-336.

Антитіла відповідно до винаходу включають без обмеження синтетичні антитіла, моноклональні антитіла, рекомбінантно одержані антитіла, поліспецифічні антитіла (включаючи біспецифічні антитіла), людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, внутрішньоклітинні антитіла, одноланцюжкові Fv (scFv) (наприклад, включаючи моносспецифічні, біспецифічні і т.д.), верблюдизовані антитіла, Fab-фрагменти, F(ab')-фрагменти, зв'язані дисульфідним зв'язком Fv (sdFv), анти-ідіотипічні (анти-Id) антитіла і фрагменти, що зв'язують епітопи, будь-якого із зазначених вище антитіл. Зокрема, антитіла відповідно до даного винаходу включають молекули імуноглобулінів та імунологічно активні частини молекул імуноглобулінів, тобто антигензв'язувальні домени або молекули, які містять

антигензв'язувальний сайт, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT (наприклад, одну або декілька областей, що визначають комплементарність (CDR) анти-hLIGHT-антитіла). Антитіла відповідно до винаходу можуть належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), будь-якого класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або будь-якого підкласу (наприклад, IgG2a і IgG2b) молекули імуноглобуліну. У переважних варіантах hLIGHT-антитіла є повністю людськими, такими як повністю людські моноклональні hLIGHT-антитіла. У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу є IgG-антитілами або належать до його класу (наприклад, IgG1 або IgG4 людини) або підкласу.

Термін "антигензв'язувальний домен", "антигензв'язувальна область", "антигензв'язувальний фрагмент" і подібні терміни стосуються такої частини антитіла, що містить амінокислотні залишки, які взаємодіють з антигеном і надають зв'язувальному агенту специфічність і афінність стосовно антигену (наприклад, області, що визначають комплементарність (CDR)). Антигензв'язувальна область може бути одержана від будь-якого виду тварини, такого як гризуни (наприклад, кролик, щур або хом'ячок) і людина. Переважно антигензв'язувальна область може мати людське походження.

У використовуваному у даному описі значенні мається на увазі, що термін "композиція" охоплює продукт, що містить специфічні інгредієнти (наприклад, антитіло відповідно до винаходу) необов'язково у конкретній кількості, а також будь-який продукт, що прямо або опосередковано є результатом комбінації конкретних інгредієнтів необов'язково у конкретних кількостях.

Термін "константна область" або "константний домен" стосується розташованої на карбоксильному кінці частини легкого і важкого ланцюга, які безпосередньо не залучені до зв'язування антитіла з антигеном, але виконують різні ефекторні функції, такі як взаємодія з рецептором Fc. Терміни стосуються частини молекули імуноглобуліну, що має більш консервативну амінокислотну послідовність у порівнянні з іншою частиною імуноглобуліну, варіабельним доменом, що містить антигензв'язувальну ділянку. Константний домен містить домени CH1, CH2 і CH3 важкого ланцюга і домен CHL легкого ланцюга.

У контексті поліпептиду термін "похідне", у використовуваному у даному описі значенні, стосується поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, що був змінений введенням амінокислотних замінів, делецій або приєднань. Термін "похідне" у використовуваному у даному описі значенні також стосується поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, які були хімічно модифіковані, наприклад, ковалентним зв'язуванням будь-якого типу молекули з поліпептидом. Як приклад, але не з метою обмеження, поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або hLIGHT-антитіло можуть бути хімічно модифіковані, наприклад, за допомогою глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідування, дериватизації відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичного розщеплення, зв'язування з клітинним лігандом або іншим білком і т.д. Похідні модифікують таким чином, що вони відрізняються від таких, що зустрічаються у природі, або вихідних пептидів або поліпептидів або за типом, або за положенням зв'язаних молекул. Похідні додатково мають делецію однієї або декількох хімічних груп, які присутні у природному пептиді або поліпептиді. Похідне поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або hLIGHT-антитіла можна хімічно модифікувати, використовуючи хімічні модифікації, способами, відомими фахівцям у даній галузі, включаючи без обмеження специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину і т.д. Крім того, похідне поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або hLIGHT-антитіла може містити одну або декілька неklasичних амінокислот. Похідне поліпептиду має функцію, подібну до або ідентичну функції поліпептиду hLIGHT, фрагмента поліпептиду hLIGHT або hLIGHT-антитіла, описаного у даній публікації.

Термін "ефективна кількість" у використовуваному у даному описі значенні стосується кількості терапевтичного засобу (наприклад, антитіла або фармацевтичної композиції, пропонованої у даному винаході), що є достатньою для зниження і/або ослаблення тяжкості і/або тривалості даного захворювання, і/або пов'язаного з ним симптому. Зазначений термін також охоплює кількість, необхідну для зниження або ослаблення розвитку або прогресування даного захворювання, зниження або ослаблення рецидиву, розвитку або прояву даного захворювання і/або для поліпшення або посилення профілактичного або терапевтичного ефекту (ефектів) іншого терапевтичного засобу (наприклад, іншого терапевтичного засобу, відмінного від анти-hLIGHT-антитіла, пропонованого у даному винаході). У деяких варіантах ефективна кількість антитіла відповідно до винаходу складає приблизно від 0,1 мг/кг (мг

антитіла на кг маси тіла суб'єкта) до приблизно 100 мг/кг. У деяких варіантах ефективна кількість антитіла, пропонованого у даному винаході, складає приблизно 0,1 мг/кг, приблизно 0,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 3 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 80 мг/кг, приблизно 90 мг/кг або приблизно 100 мг/кг (або значення у зазначеному діапазоні). У деяких варіантах "ефективна кількість", у використовуваному у даному описі значенні, також стосується кількості антитіла відповідно до винаходу, необхідної для досягнення конкретного результату (наприклад, інгібування біологічної активності hLIGHT клітини, такого як інгібування секреції CCL20, IL-8 або RANTES з клітини).

Термін "епітоп" у використовуваному у даному описі значенні стосується локалізованої області на поверхні антигену, такого як поліпептид hLIGHT або фрагмент поліпептиду hLIGHT, яка може бути зв'язана з однією або декількома антигензв'язувальними областями антитіла і яка має антигенну або імуногенну активність у тварини, переважно ссавця і найбільш переважно у людини, що здатна викликати імунну відповідь. Епітоп, що має імуногенну активність, є частиною поліпептиду, що викликає гуморальну відповідь у тварини. Епітоп, що має антигенну активність, є частиною поліпептиду, з яким антитіло імуноспецифічно зв'язується, що визначають будь-яким способом, добре відомим у даній галузі, наприклад, за допомогою імуноаналізів, описаних у даній публікації. Антигенні епітопи необов'язково повинні бути імуногенними. Епітопи звичайно складаються з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики стосовно заряду. Область поліпептиду, що здійснює внесок в епітоп, може являти собою амінокислоти поліпептиду, які безперервно йдуть одна за одною, або епітоп може являти собою об'єднання двох або більше несуміжних областей поліпептиду. Епітоп може бути тривимірною поверхневою ознакою антигену або не бути таким. У деяких варіантах епітоп hLIGHT є тривимірною поверхневою ознакою поліпептиду hLIGHT (наприклад, у тримерній формі поліпептиду hLIGHT). В інших варіантах епітоп hLIGHT є лінійною ознакою поліпептиду hLIGHT (наприклад, у тримерній формі або мономерній формі поліпептиду hLIGHT). Антитіла, пропоновані у даному винаході, можуть імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом мономерної (денатурованої) форми hLIGHT, епітопом тримерної (нативної) форми hLIGHT або з обома формами - мономерною (денатурованою) формою і тримерною (нативною) формою hLIGHT. У конкретних варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, імуноспецифічно зв'язуються з епітопом тримерної форми hLIGHT, але не імуноспецифічно зв'язуються з мономерною формою hLIGHT.

Термін "ексципієнт" у використовуваному у даному описі значенні стосується інертних речовин, які звичайно використовують як розріджувач, наповнювач, консерванти, зв'язувальні речовини або стабілізуючий агент для лікарських засобів, і включає без обмеження білки (наприклад, сироватковий альбумін і т.д.), амінокислоти (наприклад, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, лізин, аргінін, гліцин, гістидин і т.д.), жирні кислоти і фосфоліпіди (наприклад, алкілсульфонати, каприлати і т.д.), поверхнево-активні речовини (наприклад, SDS, полісорбат, неіоногенну поверхнево-активну речовину і т.д.), сахариди (наприклад, сахарозу, мальтозу, трегалозу і т.д.) і поліоли (наприклад, маніт, сорбіт і т.д.). Також див. публікацію Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA, що включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

У контексті пептиду або поліпептиду термін "фрагмент" у використовуваному у даному описі значенні стосується пептиду або поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність, меншу, ніж повнорозмірна. Такий фрагмент може бути, наприклад, результатом укорочення на амінокінці, укорочення на карбоксильному кінці і/або внутрішньої делеції залишку (залишків) з амінокислотної послідовності. Фрагменти можуть виникати, наприклад, у результаті альтернативного сплайсингу РНК або у результаті протеазної активності *in vivo*. У деяких варіантах фрагменти hLIGHT включають в себе поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність, щонайменше, з 5 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 10 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 15 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 20 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 25 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 40 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 50 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 60 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 70 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 80 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, з 90 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, зі 100 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, зі 125 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, зі 150 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше, зі 175 сусідніх амінокислотних залишків, щонайменше.

з 200 сусідніх амінокислотних залишків або, щонайменше, з 250 сусідніх амінокислотних залишків амінокислотної послідовності поліпептиду hLIGHT або антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT. У конкретному варіанті фрагмент поліпептиду hLIGHT або антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, зберігає щонайменше 1, щонайменше 2 або щонайменше 3 функції поліпептиду або антитіла.

Терміни "повністю людське антитіло" або "антитіло людини" використовуються у даному описі взаємозамінно і стосуються антитіла, що містить варіабельну область людини і найбільш переважно константну область людини. У конкретних варіантах терміни стосуються антитіла, що містить варіабельну область і константну область людини. "Повністю людські" анти-hLIGHT-антитіла у деяких варіантах також можуть охоплювати антитіла, які зв'язують поліпептиди hLIGHT і кодуються послідовностями нуклеїнових кислот, які являють собою соматичні варіанти, що зустрічаються у природі, послідовності нуклеїнової кислоти імуноглобуліну людини зародкової лінії. У конкретному варіанті анти-hLIGHT-антитіла, пропонувані у даному винаході, є повністю людськими антитілами. Термін "повністю людське антитіло" включає антитіла, що мають варіабельні і константні області, які відповідають послідовностям імуноглобулінів людини зародкової лінії, які описані у Kabat et al. (Див. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Приклади способів одержання повністю людських антитіл наведені, наприклад, у даному описі у розділі "Приклади", але можна використовувати будь-який спосіб, відомий у даній галузі.

Термін "рекомбінантне антитіло людини" означає антитіла людини, які одержані, експресовані, створені або виділені способами, що базуються на рекомбінації, наприклад, антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного експресуючого вектора, трансфікованого у клітину-хазяїна, антитіла, виділені з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних антитіл людини, антитіла, виділені з організму тварини (наприклад, миші або корови), яка є трансгенною і/або трансхромосомною за генами імуноглобуліну людини (див., наприклад, Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), або антитіла, одержані, експресовані, створені або виділені будь-яким іншим способом, що полягає у зрощуванні послідовностей генів імуноглобулінів людини з іншими послідовностями ДНК. Такі рекомбінантні антитіла людини можуть мати варіабельні і константні області, одержані з послідовностей імуноглобулінів зародкової лінії людини (див. Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Однак, у деяких варіантах такі рекомбінантні антитіла людини піддають мутагенезу *in vitro* (або, у випадку використання тварини, трансгенної за послідовностями Ig людини, соматичному мутагенезу *in vivo*), і, відповідно амінокислотні послідовності VH- і VL-областей рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, незважаючи на те, що вони одержані і є спорідненими з послідовностями VH і VL зародкової лінії людини, можуть не бути присутніми у репертуарі антитіл зародкової лінії людини *in vivo*.

Термін "злитий білок" у використовуваному у даному описі значенні стосується поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність антитіла і амінокислотну послідовність гетерологічного поліпептиду або білка (тобто поліпептиду або білка, що не є у нормі частиною антитіла (наприклад, не є антитілом проти антигену hLIGHT)). Термін "злиття" при використанні стосовно hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла стосується з'єднання пептиду або поліпептиду або його фрагмента, варіанта і/або похідного з гетерологічним пептидом або поліпептидом. Переважно, злитий білок зберігає біологічну активність hLIGHT або анти-hLIGHT-антитіла. У деяких варіантах злитий білок містить VH-домен, VL-домен, CDR VH (одну, дві або три CDR VH) і/або CDR VL (одну, дві або три CDR VL) hLIGHT-антитіла, при цьому злитий білок імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT.

Термін "важкий ланцюг" при використанні стосовно антитіла стосується п'яти різних типів, названих альфа (α), дельта (δ), епсилон (ϵ), гамма (γ) і мію (μ), на підставі амінокислотної послідовності константного домену важкого ланцюга. Такі різні типи важких ланцюгів добре відомі і визначають утворення п'яти класів антитіл, IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, відповідно, включаючи чотири підкласи IgG, а саме IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Переважно важкий ланцюг є важким ланцюгом людини.

Термін "хазяїн" у використовуваному у даному описі значенні стосується тварини, переважно ссавця і найбільш переважно людини.

Термін "клітина-хазяїн" у використовуваному у даному описі значенні стосується конкретної клітини, трансфікованої молекулою нуклеїнової кислоти, і потомства або можливого потомства такої клітини. Потомство такої клітини може бути неідентичним батьківській клітині, трансфікованій молекулою нуклеїновою кислоти, внаслідок мутацій або впливу навколишнього

середовища, які можуть мати місце у наступних поколіннях, або внаслідок інтеграції молекули нуклеїнової кислоти у геном клітини-хазяїна.

Термін "імуномодулюючий засіб" і його варіанти, включаючи без обмеження імуномодулюючі засоби, у використуваному у даному описі значенні стосується засобу, що модулює імунну систему хазяїна. У деяких варіантах імуномодулюючий засіб є імунодепресантом. У деяких інших варіантах імуномодулюючий засіб є імуностимулятором. Відповідно до винаходу імуностимулюючий засіб, використовуваний у комбінованій терапії відповідно до винаходу, не містить анти-hLIGHT-антитіла або антигензв'язувального фрагмента. Імуномодулюючі засоби включають без обмеження малі молекули, пептиди, поліпептиди, білки, злиті білки, антитіла, неорганічні молекули, міметики і органічні молекули.

У використуваному у даному описі значенні термін "у комбінації" у контексті введення інших терапевтичних засобів стосується застосування більш ніж одного терапевтичного засобу. Використання терміну "у комбінації" не обмежує порядок, в якому терапевтичні засоби вводять суб'єкту, який має інфекцію. Перший терапевтичний засіб може бути введений до (наприклад, за 1 хвилину, 45 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів), одночасно або після (наприклад, через 1 хвилину, 45 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів) введення другого терапевтичного засобу суб'єкту, який мав, має або є сприйнятливим до hLIGHT-опосередкованого захворювання. Будь-який додатковий терапевтичний засіб може бути введений разом з іншими додатковими терапевтичними засобами у будь-якому порядку. У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу можуть бути введені у комбінації з одним або декількома терапевтичними засобами (наприклад, терапевтичними засобами, які не є антитілами відповідно до винаходу, які вводять у наш час для профілактики, лікування, надання допомоги і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT). Необмежувальними прикладами терапевтичних засобів, які можна вводити у комбінації з антитілом відповідно до винаходу, є анальгетики, анестетики, антибіотики або імуномодулюючі засоби або будь-який інший засіб, перерахований у Фармакопеї США і/або настільному довіднику лікаря.

Термін "неорганічна сіль" у використуваному у даному описі значенні стосується будь-яких сполук, що не містять вуглецю, які є результатом заміни частини або всіх атомів водню кислоти металом або групою, що діє подібно до металу, і які часто використовують як засіб для коригування тонічності у фармацевтичних композиціях і препаратах біологічних матеріалів. Найпоширенішими неорганічними солями є NaCl, KCl, NaH_2PO_4 і т.д.

"Ізольоване" або "очищене" антитіло по суті не містить клітинного матеріалу або інших забруднюючих білків з клітинного або тканинного джерела, з якого одержане антитіло, або по суті не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин у тому випадку, коли воно синтезоване хімічно. Вираз "по суті не містить клітинного матеріалу" означає препарати антитіла, в яких антитіло відділене від клітинних компонентів клітин, з яких воно виділене або рекомбінантно одержане. Таким чином, антитіло, що по суті не містить клітинного матеріалу, включає препарати антитіла, які містять менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (сухої маси) гетерологічного білка (також називаного у даному описі "забруднюючим білком"). У тому випадку, коли антитіло одержують рекомбінантно, воно також переважно по суті не містить культурального середовища, тобто об'єм культурального середовища становить менш ніж приблизно 20 %, 10 % або 5 % від об'єму препарату білка. Коли антитіло одержують хімічним синтезом, воно переважно по суті не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин, тобто воно відділене від хімічних попередників або інших хімічних речовин, які використовуються у синтезі білка. Відповідно, такі препарати антитіла містять менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (сухої маси) хімічних попередників або інших сполук, відмінних від антитіла, що представляє інтерес. У переважному варіанті антитіла відповідно до винаходу є ізольованими або очищеними.

"Ізольована" молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу, що відділена від інших молекул нуклеїнових кислот, які присутні у природному джерелі молекули нуклеїнової кислоти. Крім того, "ізольована" молекула нуклеїнової кислоти, така як молекула кДНК, по суті може не містити іншого клітинного матеріалу або культурального середовища, у тому випадку, коли її одержують способами, що базуються на рекомбінації, або по суті не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин у тому випадку, коли її синтезують хімічно. У конкретному варіанті молекула (молекули) нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло відповідно до винаходу, є ізольованою або очищеною.

Термін "LIGHT людини", "hLIGHT" або "поліпептид hLIGHT" і подібні терміни стосуються поліпептидів ("поліпептиди", "пептиди" і "білки" використовують у даному описі взаємозамінно), що містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, і споріднених поліпептидів, включаючи їх SNP-варіанти. Споріднені поліпептиди включають алельні варіанти (наприклад, SNP-варіанти); варіанти, одержані при сплайсингу; фрагменти; похідні; варіанти із замінами, делеціями та інсерціями; злиті поліпептиди; і гомологи з різних видів, переважно такі, які зберігають активність hLIGHT і/або достатні для того, щоб викликати імунну відповідь проти hLIGHT. Приклади несинонімічних SNP-варіантів включають без обмеження поліпептиди hLIGHT, що містять 214E-32S (глутамінову кислоту у положенні 214 і серин у положенні 32 поліпептиду hLIGHT (наприклад, поліпептиду hLIGHT, представленого у вигляді SEQ ID NO: 52)), 214K-32S, 214E-32L і 214E-32L. Також приклади включають розчинні форми hLIGHT, які достатні для того, щоб викликати імунну відповідь проти hLIGHT (див., наприклад, SEQ ID NO: 53 і SEQ ID NO: 54). Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, анти-hLIGHT-антитіло відповідно до винаходу може зв'язуватися з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду, антигеном і/або епітопом, тому що епітоп є частиною більшого антигену, що є частиною більшого фрагмента поліпептиду, що у свою чергу є частиною більшого поліпептиду. hLIGHT може існувати у тримерній (нативній) або мономерній (денатурованій) формі.

Терміни "нумерація за Кабатом" і подібні терміни відомі у даній галузі і стосуються системи нумерації амінокислотних залишків, які є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого і легкого ланцюга антитіла або його антигензв'язувальної частини (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 і Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). У випадку варіабельної області важкого ланцюга гіперваріабельна область звичайно знаходиться у межах положень амінокислот 31-35 для CDR1, положень амінокислот 50-65 для CDR2 і положень амінокислот 95-102 для CDR3. У випадку варіабельної області легкого ланцюга гіперваріабельна область звичайно знаходиться у межах положень амінокислот 24-34 для CDR1, положень амінокислот 50-56 для CDR2 і положень амінокислот 89-97 для CDR3.

Термін "легкий ланцюг" при використанні стосовно антитіла стосується двох різних типів, названих каппа (κ) або лямбда (λ), на підставі амінокислотної послідовності константних доменів. Амінокислотні послідовності легкого ланцюга добре відомі у даній галузі. У переважних варіантах легкий ланцюг є легким ланцюгом людини.

У використовуваному у даному описі значенні терміни "надати допомогу", "надання допомоги" і "ведення хворого" стосуються корисних ефектів, які суб'єкт одержує у результаті терапії (наприклад, профілактично або терапевтичним засобом), що не приводить до зцілення від інфекції. У деяких варіантах суб'єкту вводять один або декілька терапевтичних засобів (наприклад, профілактичних або терапевтичних засобів, таких як антитіло відповідно до винаходу), щоб "надати допомогу" у випадку hLIGHT-опосередкованого захворювання (наприклад, IBD або GVHD), за наявності одного або декількох його симптомів для того, щоб запобігти прогресуванню або погіршенню стану при захворюванні.

Термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, одержаного з популяції гомогенних або по суті гомогенних антитіл, і кожне моноклональне антитіло звичайно буде пізнавати один епітоп антигену. У переважних варіантах "моноклональне антитіло" у використовуваному у даному описі значенні означає антитіло, що продукується однією гібридомою або іншою клітиною, при цьому антитіло імуноспецифічно зв'язується тільки з епітопом hLIGHT, що визначають, наприклад, шляхом ELISA або шляхом іншого аналізу зв'язування антигену або конкурентного зв'язування, відомого у даній галузі або описаного у наведених у даному описі прикладах. Термін "моноклональне" не обмежений яким-небудь конкретним способом одержання антитіла. Наприклад, моноклональні антитіла відповідно до винаходу можуть бути одержані способом, що базується на гібридомах, що описаний у Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), або можуть бути виділені з фагових бібліотек з використанням методики, описаної, наприклад, у даній публікації. Інші способи одержання моноклональних клітинних ліній і моноклональних антитіл, що експресуються ними, добре відомі у даній галузі (див., наприклад, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York). Інші приклади способів одержання інших моноклональних антитіл наведені у розділі "Приклади" у даному описі.

Термін "такий, що зустрічається у природі" або "нативний" при використанні у зв'язку з біологічними матеріалами, такими як молекули нуклеїнових кислот, поліпептиди, клітинні хазяїни і тому подібне, стосується матеріалів, які зустрічаються у природі і не створені людиною.

Термін "фармацевтично прийнятний" у використовуваному у даному описі значенні означає схвалений контролюючим органом федерального уряду або уряду штату або зазначений у списку у фармакопеї США, Європейській фармакопеї або інших загальновідомих фармакопеях для застосування на тваринах і більш конкретно на людині.

Термін "поліклональні антитіла" у використовуваному у даному описі значенні стосується популяції антитіл, що виробляються при імунній відповіді на білок, що має багато епітопів, і, отже, означає множину різних антитіл, направлених до того самого і до різних епітопів білка. Способи одержання поліклональних антитіл відомі у даній галузі (див., наприклад, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

У використовуваному у даному описі значенні термін "полінуклеотид", "нуклеотид", "нуклеїнова кислота", "молекула нуклеїнової кислоти" та інші подібні терміни використовують взаємозамінно, і терміни охоплюють ДНК, РНК, мРНК і тому подібні.

У використовуваному у даному описі значенні терміни "запобігати", "запобігання" і "профілактика" стосуються повного або часткового інгібування розвитку, рецидиву, появи або поширення hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому, що є результатом введення терапевтичного засобу або комбінації терапевтичних засобів, пропонує у даному винаході (наприклад, комбінації профілактичних або терапевтичних засобів, таких як антитіло відповідно до винаходу).

У використовуваному у даному описі значенні термін "профілактичний засіб" стосується будь-якого засобу, що може повністю або частково інгібувати розвиток, рецидив, появу або поширення hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому у суб'єкта. У деяких варіантах термін "профілактичний засіб" стосується антитіла відповідно до винаходу. У деяких інших варіантах термін "профілактичний засіб" стосується іншого засобу, відмінного від антитіла відповідно до винаходу. Переважно, профілактичним засобом є засіб, який, як відомо, є корисним або застосовувався, або застосовується у наш час для профілактики hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому, або перешкоджає появі, розвитку, прогресуванню і/або знижує тяжкість hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому. У конкретних варіантах профілактичним засобом є повністю людське анти-hLIGHT-антитіло, таке як повністю людське моноклональне анти-hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах відповідно до винаходу "профілактично ефективний титр у сироватці" означає титр у сироватці суб'єкта, переважно людини, що повністю або частково інгібує розвиток, рецидиви, появу або поширення hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому у зазначеного суб'єкта.

Термін "антиген hLIGHT" стосується такої частини поліпептиду hLIGHT, з якою імуноспецифічно зв'язується антитіло. Антиген hLIGHT також стосується аналога або похідного поліпептиду hLIGHT або його фрагмента, з якими імуноспецифічно зв'язується антитіло. У деяких варіантах антиген hLIGHT є мономерним антигеном hLIGHT або тримерним антигеном hLIGHT. Область поліпептиду hLIGHT, що здійснює внесок в епітоп, може являти собою область, утворену сусідніми амінокислотами поліпептиду, або епітоп може бути утворений двома або більше областями поліпептиду, які не є сусідніми одна відносно одної. Епітоп може бути тривимірною поверхневою ознакою антигену. Локалізована область на поверхні антигену hLIGHT, що здатна викликати імунну відповідь, являє собою епітоп hLIGHT. Епітоп може бути тривимірною поверхневою ознакою антигену або не бути таким.

Терміни "захворювання, опосередковане hLIGHT" і "розлад, опосередкований hLIGHT" використовують взаємозамінно, і вони стосуються будь-якого захворювання, яке повністю або частково викликане або є результатом впливу hLIGHT. У деяких варіантах hLIGHT аномально (наприклад, у високому ступені) експресується на поверхні клітини. У деяких варіантах hLIGHT може піддаватися аномальній підвищувальній регуляції у конкретному типі клітин. В інших варіантах нормальна, аномальна або надлишкова передача сигналів у клітині викликана зв'язуванням hLIGHT з лігандом hLIGHT. У деяких варіантах лігандом hLIGHT є рецептор hLIGHT (наприклад, HVEM, LT β R або DcR3), наприклад, рецептор, що експресується на поверхні клітини, такої як епітеліальна клітина ободової кишки. У деяких варіантах захворюванням, опосередкованим hLIGHT, є запальне захворювання кишечника (IBD), таке як хвороба Крона (CD) або виразковий коліт (UC). В інших варіантах захворюванням, опосередкованим hLIGHT, є хвороба "трансплантат проти хазяїна" (GVHD).

"Ліганд hLIGHT" стосується молекули, що зв'язується або іншим способом взаємодіє з hLIGHT. У переважних варіантах лігандом hLIGHT є рецептор hLIGHT.

Терміни "рецептор hLIGHT" або "рецептор, що зв'язує hLIGHT" використовують у даному описі взаємозамінно, і терміни стосуються рецепторного поліпептиду, що зв'язується з hLIGHT. У конкретних варіантах рецептором hLIGHT є HVEM, Fc β R або DcR3. У деяких варіантах рецептор hLIGHT експресується на поверхні клітини, такої як епітеліальна клітина ободової кишки.

Термін "сахарид" у використовуваному у даному описі значенні стосується класу молекул, які є похідними багатоатомних спиртів. Сахариди звичайно називають вуглеводами, і вони можуть містити різні кількості одиниць цукру (сахариду), наприклад, моносахариди, дисахариди і полісахариди.

Термін "титр у сироватці" у використовуваному у даному описі значенні стосується середнього титру у сироватці у популяції щонайменше 10, переважно щонайменше 20 і найбільш переважно щонайменше 40 суб'єктів, приблизно до 100, 1000 або більше.

У використовуваному у даному описі значенні термін "побічні ефекти" охоплює небажані і несприятливі ефекти терапії (наприклад, профілактичним або терапевтичним засобом). Небажані ефекти не обов'язково є шкідливими. Несприятливий ефект терапії (наприклад, профілактичним або терапевтичним засобом) може бути шкідливим або неприємним, або небезпечним. Приклади побічних ефектів включають діарею, кашель, гастроентерит, хрипи, нудоту, блювання, анорексію, спастичні болі у животі, підвищену температуру, біль, втрату маси тіла, зневоднювання, алопецію, віддишку, безсоння, запаморочення, мукозит, нервові і м'язові ефекти, втому, сухість у роті і втрату апетиту, висип або набрякання у місці введення, симптоми, подібні до грипу, такі як підвищення температури, озноб і втома, проблеми травного тракту і алергійні реакції. Додаткові небажані ефекти, які можуть виникати у суб'єктів, численні і відомі у даній галузі. Багато з них описані у Physician's Desk Reference (60th ed., 2006).

Термін "мала молекула" і аналогічні терміни включають без обмеження пептиди, пептидоміметики, амінокислоти, аналоги амінокислот, полінуклеотиди, аналоги полінуклеотидів, нуклеотиди, аналоги нуклеотидів, органічні або неорганічні сполуки (тобто включаючи гетероорганічні і металоорганічні сполуки), що мають молекулярну масу менш ніж приблизно 10000 грамів/моль, органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менш ніж приблизно 5000 грамів/моль, органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менш ніж приблизно 1000 грамів/моль, органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну масу менш ніж приблизно 500 грамів/моль, і солі, складні ефіри та інші фармацевтично прийнятні форми таких сполук.

Терміни "стабільність" і "стабільний" у використовуваному у даному описі значенні у контексті рідкого препарату, що містить антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, стосується резистентності антитіла у препараті до термічного і хімічного розгортання структури, агрегації, руйнування або фрагментації у даних умовах виробництва, приготування, транспортування і зберігання. "Стабільні" препарати відповідно до винаходу зберігають біологічну активність, що дорівнює або більш висока ніж 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % або 99,5 %, у даних умовах виробництва, приготування, транспортування і зберігання. Стабільність антитіла можна оцінити за ступенем агрегації, руйнування або фрагментації способами, відомими фахівцям у даній галузі, включаючи без обмеження капілярний гель-електрофорез у відновлювальних умовах (rCGE), електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) і HPSEC, у порівнянні з еталонним антитілом. Загальну стабільність препарату, що містить антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, можна оцінити у різних імунологічних аналізах, включаючи, наприклад, ELISA і радіоімуноаналіз, використовуючи специфічний епітоп hLIGHT.

У використовуваному у даному описі значенні терміни "суб'єкт" і "пацієнт" використовують взаємозамінно. У використовуваному у даному описі значенні суб'єктом переважно є ссавець, такий як ссавець, що не належить до приматів (наприклад, корови, свині, коні, коти, собаки, щури і т.д.), або примат (наприклад, мавпа і людина), найбільш переважно людина. В одному варіанті суб'єктом є ссавець, переважно людина, що має опосередковане hLIGHT захворювання. В іншому варіанті суб'єктом є ссавець, переважно людина, для якого існує ризик розвитку опосередкованого hLIGHT захворювання.

У використовуваному у даному описі значенні "по суті" стосується, щонайменше, приблизно 60 %, щонайменше, приблизно 70 %, щонайменше, приблизно 75 %, щонайменше, приблизно 80 %, щонайменше, приблизно 85 %, щонайменше, приблизно 90 %, щонайменше, приблизно 95 %, щонайменше, приблизно 98 %, щонайменше, приблизно 99 % або приблизно 100 %.

Термін "по суті не містить поверхнево-активної речовини" у використовуваному у даному описі значенні стосується препарату антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT у тому випадку, коли зазначений препарат містить менш ніж 0,0005 %, менш ніж

0,0003 % або менш ніж 0,0001 % поверхнево-активних речовин і/або менш ніж 0,0005 %, менш ніж 0,0003 % або менш ніж 0,0001 % поверхнево-активних речовин.

Термін "по суті не містить солі" у використовуваному у даному описі значенні стосується препарату антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, у тому випадку, коли зазначений препарат містить менш ніж 0,0005 %, менш ніж 0,0003 % або менш ніж 0,0001 % неорганічних солей.

Термін "поверхнево-активна речовина" у використовуваному у даному описі значенні стосується органічних речовин, що мають амфіпатичні структури; а саме, вони складаються з груп з протилежною тенденцією до розчинності, звичайно маслорозчинним вуглеводневим ланцюгом і водорозчинною іоногенною групою. Поверхнево-активні речовини можна класифікувати в залежності від заряду поверхнево-активного залишку на аніоногенні, катіоногенні і неіоногенні поверхнево-активні речовини. Поверхнево-активні речовини часто використовують як зволожувачі, емульгатори, солюбілізатори і диспергуючі засоби для різних фармацевтичних композицій і препаратів біологічних матеріалів.

У використовуваному у даному описі значенні термін "мітка" стосується будь-якого типу залишку, який зв'язують, наприклад, з поліпептидом і/або полінуклеотидом, що кодує hLIGHT або hLIGHT-антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент. Наприклад, полінуклеотид, що кодує hLIGHT, hLIGHT-антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, може містити одну або декілька нуклеотидних послідовностей, що кодують мітку, які кодують, наприклад, залишок, що реєструється, або залишок, що сприяє здійсненню афінного очищення. При трансклюванні мітка і антитіло можуть бути у формі злитого білка. Термін "що реєструється" або "реєстрація" у зв'язку з міткою стосується будь-якої мітки, яку можна візуалізувати, або коли наявність мітки можна визначити і/або виміряти іншим способом (наприклад, кількісним аналізом). Необмежувальним прикладом мітки, що реєструється, є флуоресціююча мітка.

У використовуваному у даному описі значенні термін "терапевтичний засіб" стосується будь-якого засобу, який можна використовувати для лікування, надання допомоги або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання і/або пов'язаного з ним симптому. У деяких варіантах термін "терапевтичний засіб" стосується антитіла відповідно до винаходу. У деяких інших варіантах термін "терапевтичний засіб" стосується іншого засобу, відмінного від антитіла відповідно до винаходу. Переважно терапевтичним засобом є засіб, який, як відомо, корисний або був використаний, або використовується у наш час для лікування, надання допомоги або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання або одного, або декількох пов'язаних з ним симптомів. У конкретних варіантах терапевтичним засобом є повністю людське анти-hLIGHT-антитіло, таке як повністю людське моноклональне анти-hLIGHT-антитіло.

Комбінована терапія (наприклад, застосування комбінації профілактичних або терапевтичних засобів) є більш ефективною, ніж адитивні ефекти двох або декількох окремих терапевтичних засобів. Наприклад, синергетична дія комбінації профілактичних і/або терапевтичних засобів дозволяє застосовувати більш низькі дози одного або декількох засобів і/або менш часто вводити зазначені засоби суб'єкту із захворюванням, опосередкованим hLIGHT. Можливість використання більш низьких доз профілактичних або терапевтичних засобів і/або введення зазначених засобів менш часто зменшує токсичність, пов'язану з введенням зазначених терапевтичних засобів суб'єкту, без зниження ефективності зазначених засобів для профілактики, надання допомоги, лікування або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT. Крім того, синергетична дія може приводити до більш високої ефективності терапевтичних засобів для профілактики або надання допомоги, лікування або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT. Нарешті, синергетична дія комбінації засобів терапії (наприклад, профілактичних або терапевтичних засобів) дозволяє уникати або зменшувати несприятливі або небажані побічні ефекти, пов'язані із застосуванням будь-якого окремого засобу терапії.

У деяких варіантах здійснення винаходу "терапевтично ефективний титр у сироватці" означає титр у сироватці суб'єкта, переважно людини, що зменшує тяжкість, тривалість і/або симптоми, пов'язані з опосередкованим hLIGHT захворюванням у зазначеного суб'єкта.

У використовуваному у даному описі значенні термін "терапія" стосується будь-якого протоколу, способу і/або засобу, які можна використовувати для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT (наприклад, IBD або GVHD). У деяких варіантах терміни "засоби терапії" і "терапія" стосуються біологічної терапії, підтримуючої терапії і/або інших способів терапії, застосованих для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, відомих фахівцям у даній галузі, наприклад, медичному персоналу.

У використовуваному у даному описі значенні терміни "лікувати" і "лікування" стосуються зменшення або ослаблення прогресування, тяжкості і/або тривалості опосередкованого hLIGHT захворювання (наприклад, IBD або GVHD) у результаті введення одного або декількох засобів лікування (включаючи без обмеження введення одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів, таких як антитіло відповідно до винаходу). У конкретних варіантах такі терміни стосуються зменшення або інгібування зв'язування hLIGHT з HVEM, зменшення або інгібування зв'язування hLIGHT з LT β R, зменшення або інгібування зв'язування hLIGHT з DcR3, зменшення або інгібування продукування або секреції CCL20 з клітини суб'єкта, що експресує рецептор hLIGHT, зменшення або інгібування продукування або секреції IL-8 з клітини суб'єкта, що експресує рецептор hLIGHT, зменшення або інгібування продукування або секреції RANTES з клітини суб'єкта, що експресує рецептор hLIGHT, і/або інгібування або зменшення одного або декількох симптомів, пов'язаних із захворюванням, опосередкованим hLIGHT, таким як IBD або GVHD. У конкретних варіантах профілактичним засобом є повністю людське анти-hLIGHT-антитіло, таке як повністю людське моноклональне анти-hLIGHT-антитіло.

Термін "варіабельна область" або "варіабельний домен" стосується частини легких і важких ланцюгів, звичайно амінокінцевих приблизно 120-130 амінокислот у важкому ланцюзі і приблизно 100-110 амінокислот у легкому ланцюзі, які сильно відрізняються за послідовністю у різних антитілах і використовуються у зв'язуванні і забезпеченні специфічності кожного конкретного антитіла стосовно конкретного антигену. Варіабельність послідовностей сконцентрована в областях, називаних областями, що визначають комплементарність (CDR), тоді як більш консервативні області у варіабельному домені називають каркасними областями (FR). CDR легких і важких ланцюгів головним чином відповідальні за взаємодію антитіла з антигеном. Нумерація положень амінокислот, використовувана у даному описі, відповідає EU Index, як у Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D. C.) 5th ed. ("Kabat et al."). У переважних варіантах варіабельна область є варіабельною областю людини.

Термін "варіант" при використанні стосовно hLIGHT або hLIGHT-антитіла стосується пептиду або поліпептиду, що містить одну або декілька (наприклад, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 20 і переважно від приблизно 1 до приблизно 15, більш переважно від приблизно 1 до приблизно 10 і найбільш переважно від приблизно 1 до приблизно 5) замінів, делецій і/або додатків в амінокислотній послідовності у порівнянні з нативною або немодифікованою послідовністю. Наприклад, варіант hLIGHT може виникати у результаті однієї або декількох (наприклад, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 20 і переважно від приблизно 1 до приблизно 15, більш переважно від приблизно 1 до приблизно 10 і найбільш переважно від приблизно 1 до приблизно 5) змін амінокислотної послідовності нативного hLIGHT. Також як приклад варіант анти-hLIGHT-антитіла може виникати у результаті однієї або декількох (наприклад, від приблизно 1 до приблизно 25, від приблизно 1 до приблизно 20 і переважно від приблизно 1 до приблизно 15, більш переважно від приблизно 1 до приблизно 10 і найбільш переважно від приблизно 1 до приблизно 5) змін амінокислотної послідовності нативного або раніше немодифікованого анти-hLIGHT-антитіла. Варіанти можуть бути варіантами, що зустрічаються у природі, такими як алельні варіанти або варіанти сплайсингу, або можуть бути сконструйовані штучно. Поліпептидні варіанти можуть бути одержані з використанням відповідних молекул нуклеїнових кислот, що кодують такі варіанти. У переважних варіантах варіант hLIGHT або варіант hLIGHT-антитіла зберігає функціональну активність hLIGHT або hLIGHT-антитіла, відповідно. У конкретних варіантах здійснення винаходу варіант hLIGHT-антитіла імуноспецифічно зв'язує hLIGHT і/або є антагоністичним стосовно активності hLIGHT. У деяких варіантах здійснення винаходу варіант кодується варіантом hLIGHT, обумовленим однонуклеотидним поліморфізмом (SNP). Приклад SNP-варіанту hLIGHT кодує або глутамінову кислоту (E), або лізин (K) у положенні амінокислоти 214. Інший приклад SNP-варіанту hLIGHT кодує або серин (S), або лейцин (L) у положенні амінокислоти 32.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На фіг. 1А-1В зображений цитометричний аналіз ендогенно експресованого hLIGHT з використанням анти-hLIGHT-антитіл людини. (А) Лінію Т-клітин людини II-23.D7 активували РМА та іономіцином протягом ночі і забарвлювали відносно маркера активації CD69 у комбінації з різними анти-hLIGHT-антитілами. CD69-позитивні клітини пропускали і аналізували стосовно забарвлювання hLIGHT (жирна лінія) у порівнянні з контрольним IgG1 людини проти вірусу грипу (пунктирна лінія) або забарвлювання неактивованих клітин II23.D7 анти-hLIGHT-антитілами (сіра лінія). Зв'язування виявляли, використовуючи друге антитіло кози проти IgG людини-APC. (В) Забарвлювання активованої лінії Т-клітин людини II-23.D7 анти-hLIGHT-

антитілами людини є насичуваним. Активовані клітини II-23.D7 мітили анти-hLIGHT-антитілами людини у різних концентраціях і виявляли з використанням анти-IgG людини-APC. Показано графіки середніх геометричних значень інтенсивності флуоресценції поряд з нелінійною регресією.

5 На фіг. 2A-2B зображене забарвлювання рекомбінантного hLIGHT на лінії клітин EL4-hLIGHT анти-hLIGHT-антитілами людини. На фіг.(A) і (B) ступінчасто змінювані кількості анти-hLIGHT-антитіл використовували для забарвлювання клітин EL4-hLIGHT, виявляли з використанням анти-IgG людини-APC і аналізували проточною цитометрією. Визначали середнє геометричне значення інтенсивності флуоресценції (MFI) і застосовували нелінійний регресійний аналіз. У

10 всіх експериментах антитіло людини проти білка M2 вірусу грипу використовували як негативний контроль. Дані, одержані у результаті такого аналізу, представлені на фіг. 3.

На фіг. 3 зображені характеристики моноклональних анти-hLIGHT-антитіл людини.

На фіг. 4 зображене перехресне блокування антитілами, виявлене шляхом ELISA. У такому аналізі визначають дві групи на підставі конкуренції за зв'язування з hLIGHT в ELISA. Окремими

15 антитілами покривали ямки 96-ямкового планшета. Розчинний FLAG-hLIGHT попередньо інкубували з розчинними анти-hLIGHT-антитілами і потім додавали у покриті ямки. Зв'язування FLAG-hLIGHT з нанесеним у вигляді покриття антитілом виявляли з використанням анти-FLAG-IgG-HRP. Інгібування у відсотках визначали, використовуючи OD кожного зразка у наступній

формулі: $\% \text{ інгібування} = (\text{максимум} - \text{зразок/максимум}) \times 100$.

20 На фіг. 5A-5B зображена блокада зв'язування HVEM:Fc людини з нативним hLIGHT на клітинній поверхні моноклональними анти-hLIGHT-антитілами людини. У випадку (A) і (B) ступінчасто змінювані кількості антитіл інкубували з клітинами EL4-hLIGHT, додавали біотинільований HVEM:Fc людини у субнасичувальній концентрації і виявляли, використовуючи SA-APC. Як показано на фіг.(A), антитіло людини проти M2 вірусу грипу використовували як

25 контроль.

На фіг. 6A-6B зображена блокада зв'язування LTβR:Fc людини з нативним hLIGHT на клітинній поверхні моноклональними анти-hLIGHT-антитілами людини. У випадку (A)-(B) ступінчасто змінювані кількості антитіл інкубували з клітинами EL4-hLIGHT, додавали полі-His-мічений LTβR:Fc людини у субнасичувальній концентрації і виявляли, використовуючи анти-His-APC. Як показано на фіг.(A), антитіло людини проти M2 вірусу грипу використовували як

30 контроль.

На фіг. 7 зображена опосередкована hLIGHT секреція CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини. Рекомбінантний розчинний hLIGHT додавали у середовище росту клітин HT29.14s у зростаючих концентраціях. Ростове середовище збирали на 3 день після обробки і визначали рівні CCL20, використовуючи ELISA. Відрізки, що характеризують погіршеність, зазначені на підставі двох незалежних обробок.

35 На фіг. 8 зображена опосередкована hLIGHT секреція IL-8 і секреція RANTES з епітеліальних клітин ободової кишки людини. Рекомбінантний розчинний hLIGHT, TNF, LTα₁β₂ і FLAG-BAP (як негативний контроль) додавали у середовище росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з різних ямок у 1, 2 і 3 дні після обробки. Рівні IL-8 і RANTES визначали шляхом ELISA. FLAG-мічену бактеріальну лужну фосфатазу (FLAG-BAP) використовували як мічений нерелевантний білок для негативного контролю.

На фіг. 9A-9B показано, що анти-hLIGHT-антитіла людини інгібують опосередковану hLIGHT секрецію CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини. (A) Рекомбінантний розчинний hLIGHT (1 мкг/мл) попередньо інкубували з анти-hLIGHT-антитілами і додавали у середовище

45 росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні CCL20 визначали шляхом ELISA. Середовище окремо, розчинний hLIGHT окремо, розчинний hLIGHT, інкубований з антитілом проти M2 вірусу грипу, і кожне анти-hLIGHT-антитіло окремо включали як контролю. (B) Нелінійний регресійний аналіз даних, представлених на панелі A.

50 На фіг. 10A-10B показано, що анти-hLIGHT-антитіла людини інгібують опосередковану hLIGHT, що експресується на клітинній поверхні, секрецію RANTES з епітеліальних клітин ободової кишки людини. (A) Фіксовані клітини EL4-hLIGHT попередньо інкубували з анти-hLIGHT-антитілами і додавали у середовище росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні RANTES визначали шляхом

55 ELISA. Середовище окремо, клітини EL4-hLIGHT окремо, розчинний hLIGHT окремо і кожне анти-hLIGHT-антитіло окремо включали як контролю. (B) Графік даних, представлених на панелі (A).

На фіг. 11 зображені результати експериментів з конкурентного блокування зв'язування з hLIGHT.

На фіг. 12 зображена блокуюча активність антитіл стосовно зв'язування HVEM:Fc з клітинами 293-hLIGHT. Моноклональні анти-hLIGHT-антитіла людини E1, E13, F19, мАт R&D і комерційно доступні поліклональні антитіла кози проти hLIGHT (R&D Systems), і кролячі поліклональні анти-hLIGHT-антитіла (eBioscience) тестували стосовно їх здатності блокувати зв'язування HVEM:Fc з клітинами 293, що експресують hLIGHT.

На фіг. 13 зображена блокуюча активність антитіл стосовно зв'язування LTβR:Fc з клітинами 293-hLIGHT. Моноклональні анти-hLIGHT-антитіла людини E1 і E13, мАт R&D і комерційно доступні поліклональні антитіла кози проти hLIGHT (R&D Systems) і кролячі поліклональні анти-hLIGHT-антитіла (eBioscience) тестували стосовно їх здатності блокувати зв'язування LTβR:Fc з клітинами 293, що експресують hLIGHT.

На фіг. 14 зображена блокуюча активність антитіл стосовно зв'язування (А) LTβR:Fc і (В) HVEM:Fc з клітинами 293-hLIGHT, і фігура є графічним представленням даних, показаних на фіг. 12 і 13.

На фіг. 15A-15B зображене зв'язування різних анти-hLIGHT-антитіл з нативним або денатурованим розчинним hLIGHT. П'ять мікрограмів розчинного LIGHT людини або кип'ятили в 2 x буфері для зразків з SDS (денатурований), або не обробляли (нативний), і потім в обох випадках серійно розбавляли, щоразу 6-кратно. 5 мкл кожного розведення hLIGHT одночасно наносили плямами на гідратовані мембрани PVDF з порами 0,2 мкм (Invitrogen, Carlsbad, CA), використовуючи 8-канальну піпетку. Блотам давали можливість висохнути на повітрі, потім повторно гідратували, блокували (1 x TBST (Трис-сольовий буфер з твіном-20) + 2,5 % знежиреного молока + 0,02 % азиду натрію). Кожен блот аналізували, використовуючи як зонд 5 мкг/мл кожного першого антитіла. Блоти 3 рази промивали в 1x TBST, потім додавали біотинільовані другі Ат (біотин-антитіло кози проти Ig людини (Vector Labs, Burlingame, CA), біотин-антитіло кози проти Ig миші (Jackson labs, Bar Harbor, ME), біотин-антитіло проти Ig кози (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, MO)) у концентрації 5 мкг/мл. Блоти 3 рази промивали в 1x TBST, потім додавали SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Для реєстрації застосовували хемілюмінесценцію, використовуючи набір для реєстрації ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), і сигнал візуалізували, експонуючи з візуалізуючою плівкою X-OMAT AR (Kodak, Rochester, New York). (А) Результати дот-блот-аналізу з використанням анти-hLIGHT-мАт людини E1, E13, E63, F19, F23 або двох мишачих моноклональних анти-hLIGHT-антитіл, комерційно доступних з R&D Systems ("мишачі мАт R&D") і Abnova ("мишачі мАт Abnova"). Антитіло проти M2 (нерелевантний антиген) використовували як негативний контроль. (В) Результати дот-блот-аналізу з використанням комерційного препарату поліклональних антитіл кози проти hLIGHT (R&D Systems, "пАт кози R&D") або двох комерційних препаратів поліклональних кролячих анти-hLIGHT-антитіл (eBioscience ("кролячі пАт eBioscience") і Reprotech ("кролячі пАт Reprotech"))).

На фіг. 16 зображене зв'язування різних анти-hLIGHT-антитіл з нативним або денатурованим розчинним hLIGHT, і підсумовані дані, представлені на фіг. 15, у формі таблиці.

На фіг. 17 показано, що анти-LIGHT-антитіла людини відповідно до винаходу інгібують опосередковану LIGHT секрецію CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини, тоді як комерційно доступні мишачі анти-hLIGHT-антитіла не викликають інгібування. Рекombінантний розчинний LIGHT людини (1 мкг/мл) попередньо інкубували з анти-LIGHT-антитілами і додавали у середовище росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні CCL20 визначали шляхом ELISA. Середовище окремо, розчинний LIGHT окремо, розчинний LIGHT, інкубований з антитілом проти M2 вірусу грипу, неблокуюче анти-LIGHT-Ат B12 і кожне анти-LIGHT-антитіло окремо інкубували як контролю. E1 і F19 є типовими представниками кожної групи, що перехресно блокує зв'язування з епітопом.

На фіг. 18 показано, що анти-LIGHT-антитіла людини відповідно до винаходу інгібують опосередковану LIGHT секрецію RANTES з епітеліальних клітин ободової кишки людини, тоді як комерційно доступні мишачі анти-hLIGHT-антитіла не викликають інгібування. Рекombінантний розчинний LIGHT людини (1 мкг/мл) попередньо інкубували з анти-LIGHT-антитілами і додавали до середовища росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні RANTES визначали шляхом ELISA. Середовище окремо, розчинний LIGHT окремо, розчинний LIGHT, інкубований з антитілом проти M2 вірусу грипу, неблокуючий анти-LIGHT-Ат B12 і кожне анти-LIGHT-антитіло окремо включали як контролю. E1 і F19 є типовими представниками кожної групи, що перехресно блокує зв'язування з епітопом.

На фіг. 19A-19B зображений цитометричний аналіз зв'язування експресованого на клітинній поверхні hLIGHT анти-hLIGHT-антитілами людини (А) E1 або (В) F19 у порівнянні з їх рекombінантними аналогами - каппа-одноланцюжковими антитілами. Клітини 293, що стабільно експресують hLIGHT, інкубували зі зростаючими кількостями анти-LIGHT-антитіл, зазначеними у

підписі. Зв'язування реєстрували з використанням другого антитіла проти IgG людини-APC. Антитіла очищали або з культур гідридом, або з клітин 293F, тимчасово трансфікованих експресуючими векторами ссавців, що кодують різні кДНК каппа-ланцюга, спарені з геном важкого ланцюга. Показано графіки середніх геометричних значень інтенсивності флуоресценції поряд з нелінійною регресією.

На фіг. 20 зображене перехресне блокування в аналізі ELISA, в якому порівнювали каппа-одноланцюжкові антитіла з їх вихідними аналогами. У такому аналізі визначають дві групи на основі конкуренції за зв'язування з hLIGHT з використанням аналізу ELISA. Окремими антитілами покривали ямки 96-ямкового планшета. Розчинний FLAG-hLIGHT попередньо інкубували з розчинними анти-hLIGHT-антитілами і потім додавали у покриті ямки. Зв'язування FLAG-hLIGHT з нанесеним у вигляді покриття антитілом визначали, використовуючи анти-FLAG-IgG-HRP. Інгібування у відсотках визначали, використовуючи OD кожного зразка у наступній формулі: $\% \text{ інгібування} = (\text{максимум} - \text{зразок/максимум}) \times 100$.

На фіг. 21A-21B зображена блокада зв'язування (A) HVEM:Fc людини або (B) LTβR:Fc людини з нативним hLIGHT на клітинній поверхні моноклональними анти-hLIGHT-антитілами людини і їх рекомбінантними каппа-одноланцюжковими аналогами. Ступінчасто змінювані кількості антитіл інкубували з клітинами EL4-hLIGHT, біотинільованим HVEM:Fc людини або полі-His-міченим LTβR:Fc людини у субнасичувальній концентрації, і потім виявляли, використовуючи SA-APC або анти-His-APC. Антитіла очищали або з культур гібридом, або з клітин 293F, тимчасово трансфікованих експресуючими векторами ссавців, що кодують різні кДНК каппа-ланцюга, спарені з геном важкого ланцюга.

На фіг. 22 зображене інгібування опосередкованої hLIGHT секреції CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини рекомбінантними каппа-одноланцюжковими анти-LIGHT-антитілами людини у порівнянні з антитілами, що продукуються вихідною гібридомою. Рекомбінантний розчинний LIGHT людини (1 мкг/мл) попередньо інкубували з анти-LIGHT-антитілами і додавали до середовища росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні CCL20 визначали шляхом ELISA. Середовище окремо, розчинний LIGHT окремо (SHL), розчинний LIGHT, інкубований з антитілом проти M2 вірусу грипу, або кожне антитіло за відсутності розчинного LIGHT, включали як контролю. Антитіла, називані "Elk2", містять E1каппа(B) і "F19k2" містять F19каппа(B).

На фіг. 23 показано, що анти-LIGHT-антитіла людини відповідно до винаходу інгібують опосередковану LIGHT секрецію CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки людини, тоді як комерційно доступні мишачі анти-hLIGHT-антитіла або не інгібують (Abnova), або інгібують тільки у дуже високих концентраціях (100 мкг/мл) (R&D). Рекомбінантний розчинний LIGHT людини (1 мкг/мл) попередньо інкубували з анти-LIGHT-антитілами і додавали у середовище росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох ямок у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні CCL20 визначали, використовуючи ELISA. Середовище окремо, розчинний LIGHT окремо (SHL), розчинний LIGHT, інкубований з нерелевантним антитілом проти M2 вірусу грипу, антитіло проти сироваткового альбуміну людини або кожне антитіло за відсутності розчинного LIGHT, включали як контролю. E1 і F19 є типовими представниками кожної групи, що перехресно блокує зв'язування з епітопом.

На фіг. 24A-24B зображена частота алелів деяких несинонімічних варіантів hLIGHT, обумовлених одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), (A) що кодують глутамінову кислоту (E) або лізин (K) у положенні амінокислоти 214; або (B) що кодують лейцин (L) або серин (S) у положенні амінокислоти 32, у різних етнічних популяціях.

Фіг. 25A-25D. На фіг. 25A-25C зображене титрування дозами при забарвлюванні клітинних ліній, що експресують несинонімічні SNP-варіанти LIGHT людини, анти-hLIGHT-антитілами людини 124F23 і 124E1каппа(B). Ступінчасто змінювані кількості анти-hLIGHT-антитіл використовували для забарвлювання клітин EL4-hLIGHT, що експресують SNP-варіант (A) 214E-32S, (B) 214K-32S або (C) 214E-32L, виявляли з використанням анти-IgG людини-APC і аналізували проточною цитометрією. На фіг.(D) зображене титрування дозами у випадку опосередкованої анти-LIGHT-антитілом людини блокади зв'язування HVEM:Fc людини (квадрати) або LTBR:Fc (трикутники) з експресованим на клітинній поверхні SNP-варіантом LIGHT 214K-32S, здійснюваної, як описано на фіг. 5. У випадку (A)-(D) визначали середні геометричні значення інтенсивності флуоресценції (MFI) і застосовували нелінійний регресійний аналіз.

На фіг. 26A-26B зображений проточно-цитометричний аналіз клітинних ліній, які експресують несинонімічні SNP-варіанти, з використанням анти-hLIGHT-антитіл людини. (A) Лінію клітин EL4-LIGHT SNP 214E і (B) лінію клітин EL4 SNP 214K забарвлювали, використовуючи одну концентрацію (10 мкг/мл) кожного з анти-hLIGHT-антитіл. Зв'язування

виявляли за допомогою другого козячого анти-IgG людини-APC антитіла. Контроль ізо типу IgG людини використовували як негативний контроль.

На фіг. 27 зображене інгібування анти-hLIGHT-антитілом людини секреції RANTES з епітеліальних клітин ободової кишки людини, опосередкованої експресованим на клітинній поверхні SNP-варіантом hLIGHT. Рекомбінантний розчинний hLIGHT (SHL) (1 мкг/мл) або 5×10^5 клітин EL4-hLIGHT з SNP-варіантом 214K або 214E попередньо інкубували з анти-hLIGHT-антитілами і додавали у середовище росту клітин HT29.14s. Ростове середовище збирали з двох клітин у випадку кожної обробки на 3 день. Рівні RANTES визначали шляхом ELISA. Середовище окремо, клітини EL4-hLIGHT окремо, розчинний hLIGHT окремо і кожне анти-hLIGHT-антитіло окремо включали як контролю.

На фіг. 28 зображене схематичне представлення моделі гострого ксеногенного захворювання GVHD. Мишам SCID ін'єктували IL2R β -антитіло (TM- β 1) у день -2, щоб зменшити кількість клітин NK. У день -1 миші одержували сублетальну дозу опромінення 2,5 Гр. У день 0 миші одержували 10 мільйонів РВМС людини за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції, після якої відразу ж проводили внутрішньовенну ін'єкцію антитіла людини проти LIGHT людини або негативного контрольного антитіла. Мишей зважували з інтервалами у 3-4 дні, і на 12 день мишей умертвляли, і оцінювали макроскопічну патологію. Витягували селезінки для аналізу проточною цитометрією, витягували сліпу кишку для проведення гістології, і збирали сироватку для аналізу цитокінів і антитіл.

На фіг. 29 зображена оцінка макроскопічної патології, що спостерігається у моделі гострого ксеногенного захворювання GVHD. Представлена оцінка патології у випадку без ін'єкції моноклонального антитіла (кружечки), у випадку ін'єкції моноклонального анти-hLIGHT-антитіла 124F23 (трикутники) і у випадку контрольного моноклонального IgG1-антитіла людини (квадрати). Оцінки 0, 1, 2 або 3 (немає, слабка, помірна або тяжка, відповідно) застосовують для кожної з трьох категорій: діарея, запалення очеревини/асцити і запалення кишечника (максимальна загальна оцінка 9).

На фіг. 30 зображена оцінка гістопатології, що спостерігається у моделі гострого ксеногенного захворювання GVHD у мишей. Представлена оцінка патології у випадку відсутності ін'єкції МАТ (кружечки), у випадку ін'єкції анти-hLIGHT-МАТ 124F23 (трикутники) і у випадку контрольного МАТ hIgG1 (квадрати). Оцінки 0, 1, 2 або 3 (немає, слабка, помірна або тяжка, відповідно) давали для кожної з чотирьох категорій: тяжкість запалення, об'єм запалення, ушкодження/атрофія ворсинок і відсоток ураження (максимальна загальна оцінка 12).

На фіг. 31А-31В зображені типові гістологічні зрізи, забарвлені гематоксиліном і еозином (H&E), сліпої кишки мишей у дослідженні GVHD. (А) Зріз сліпої кишки миші, обробленої анти-LIGHT-МАТ, і (В) миші, обробленої IgG людини. Інволюція підслизової оболонки свідчить про асцит, пунктирні стрілки вказують області крові, і суцільна стрілка вказує область інфільтрату з лімфоцитів.

На фіг. 32 зображена загальна кількість Т-клітин у селезінці миші у дослідженні ксеногенного захворювання GVHD. Зірочками вказані значення t-критерію Стьюдента менше 0,05 для порівняння між тваринами, обробленими анти-LIGHT-МАТ, і контролюми.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

У даному винаході запропоновані антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Запропоновані також ізольовані нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Крім того, запропоновані вектори і клітини-хазяїни, що містять нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. Запропоновані також способи одержання антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT. У даному винаході запропонований також спосіб лікування або надання допомоги при hLIGHT-опосередкованому захворюванні, що включає в себе введення антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT, фрагментом поліпептиду hLIGHT або епітопом hLIGHT.

АНТИТІЛА

Антитіла відповідно до винаходу включають без обмеження синтетичні антитіла, моноклональні антитіла, рекомбінантно одержані антитіла, поліспецифічні антитіла (включаючи біспецифічні антитіла), людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, внутрішньоклітинні антитіла, одноланцюжкові Fv (scFv) (наприклад, включаючи моносспецифічні, біспецифічні і т.д.), верблюдизовані антитіла, Fab-фрагменти, F(ab')-фрагменти, зв'язані

дисульфідним зв'язком Fv (sdFv), анти-ідіотипічні (анти-Id) антитіла і фрагменти, що зв'язують епітопи, будь-якого з зазначених вище антитіл.

Зокрема, антитіла відповідно до даного винаходу включають молекули імуноглобулінів та імунологічно активні частини молекул імуноглобулінів, тобто молекули, які містять антигензв'язувальний сайт, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT. Молекули імуноглобулінів відповідно до винаходу можуть належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), будь-якого класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або будь-якого підкласу молекули імуноглобуліну. У конкретному варіанті антитіло, пропонуване у винаході, є Ig-антитілом, переважно IgG1 або IgG4.

Варіанти і похідні антитіл включають фрагменти антитіл, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з епітопом. Переважні фрагменти включають Fab-фрагменти (фрагмент антитіла, що містить антигензв'язувальний домен і містить легкий ланцюг і частину важкого ланцюга, зв'язаного містком, утвореним дисульфідним зв'язком); Fab" (фрагмент антитіла, що включає в себе один антигензв'язувальний домен, що складає Fab, і додаткову частину важкого ланцюга протягом шарнірної області); F(ab")₂ (дві молекули Fab", зв'язані міжланцюжковими дисульфідними зв'язками у шарнірних областях важких ланцюгів; молекули Fab' можуть бути направлені до того самого або до різних епітопів); біспецифічний Fab (молекула Fab, що має два антигензв'язувальних домени, кожний з яких може бути направлений до різних епітопів); одноланцюжковий Fab-ланцюг, що містить варіабельну область, також відому як sFv (варіабельна область, що визначає зв'язування з антигеном, одного легкого і важкого ланцюга антитіла, зв'язаних разом ланцюгом з 10-25 амінокислот); зв'язаний дисульфідним зв'язком Fv або dsFv (варіабельна область, що визначає зв'язування з антигеном, одного легкого і важкого ланцюга антитіла, зв'язаних разом дисульфідним зв'язком); верблюдизовані VH (варіабельна область, що визначає зв'язування антигену, одного важкого ланцюга антитіла, в якому деякі амінокислоти на межі контакту VH являють собою амінокислоти, знайдені у важкому ланцюзі антитілу верблюда, що зустрічаються у природі); біспецифічний sFv (молекула sFv або dsFv, що має два антигензв'язувальних домени, кожний з яких направлений до різних епітопів); діантитіло (димеризований sFv, утворений у результаті утворення комплексу між VH-доменом першого sFv і VL-доменом другого sFv і утворення комплексу між VL-доменом першого sFv і VH-доменом другого sFv; дві антигензв'язувальні області діантитіла можуть бути направлені до того самого або до різних епітопів); і триантитіло (тримеризований sFv, утворений подібно до діантитіла, але в якому утворюються три антигензв'язувальні домени в одному комплексі; три антигензв'язувальні домени можуть бути направлені до того самого або до різних епітопів). Похідні антитіл також містять одну або декілька послідовностей CDR антигензв'язувальної ділянки антитіла. Послідовності CDR можуть бути зв'язані разом на каркасі у тому випадку, коли присутні дві або більше послідовностей CDR. У деяких варіантах антитіло, застосовуване у винаході, містить одноланцюжковий Fv ("scFv"). scFv являють собою фрагменти антитілу, що містять VH- і VL-домени антитіла, при цьому такі домени знаходяться в одному поліпептидному ланцюзі. Загалом, поліпептид scFv додатково містить поліпептидний лінкер між VH- і VL-доменами, що дозволяє scFv утворювати необхідну структуру для зв'язування антигену. Огляд scFv див. у Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути від будь-якої тварини, включаючи птахів і ссавців (наприклад, людину, мишу, осла, вівцю, кролика, козу, морську свинку, верблюда, коня або курку). У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу є людськими або гуманізованими моноклональними антитілами. У використуваному у даному описі значенні "людські" антитіла включають антитіла, що мають амінокислотну послідовність імуноглобуліну людини, і включають антитіла, виділені з бібліотеки імуноглобулінів людини або з мишей, які експресують антитіла з генів людини.

У переважних варіантах антитіла відповідно до винаходу є повністю людськими антитілами, такими як повністю людські антитіла, які імуноспецифічно зв'язують поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або епітоп hLIGHT. Такі повністю людські антитіла можуть мати переваги у порівнянні з повністю мишачими (або іншими антитілами, що є повністю або частково антитілами інших видів, відмінних від людини), гуманізованими антитілами або химерними антитілами, щоб мінімізувати розвиток небажаних або непотрібних побічних ефектів, таких як імунні відповіді, направлені до не повністю людських антитіл (наприклад, анти-hLIGHT-антитіл, одержаних з інших видів) при введенні в організм суб'єкта.

Антитіла відповідно до даного винаходу можуть бути моноспецифічними, біспецифічними, триспецифічними або мати більшу поліспецифічність. Поліспецифічні антитіла можуть бути специфічними стосовно різних епітопів поліпептиду hLIGHT або можуть бути специфічними як

до поліпептиду hLIGHT, так і до гетерологічного епітопу, такого як гетерологічний поліпептид або матеріал твердої основи. У переважних варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, є моноспецифічними стосовно даного епітопу поліпептиду hLIGHT і імуноспецифічно зв'язуються з іншими епітопами.

5 У переважних варіантах антитіла у композиціях, що містять антитіла, і у способах застосування антитіл відповідно до даного винаходу включають антитіло E1, E13, E63, F19 або F23 (номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728, відповідно). Також у даному винаході запропоновані гібридами, які продукують антитіла E1, E13, E63, F19 або F23 (номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728, відповідно), і/або інші моноклональні анти-hLIGHT-антитіла, описані у даній публікації.

10 У деяких варіантах у винаході запропоноване ізольоване антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином): (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23; за умови, що зв'язування з епітопом hLIGHT не блокується обома антитілами: (а) антитілом E1 і антитілом F19, (b) антитілом E1 і антитілом F23, (c) антитілом E13 і антитілом F19, (d) антитілом E13 і антитілом F23, (e) антитілом E63 і антитілом F19 або (f) антитілом E63 і антитілом F23. Антитіло може бути повністю людським антитілом або може не бути таким. У переважних варіантах антитіло є повністю людським моноклональним анти-hLIGHT-антитілом і ще більш переважно повністю людським моноклональним антагоністичним анти-hLIGHT-антитілом. Приклади тестів конкурентного блокування, які можна використовувати, наведені у розділі "Приклади" у даному описі.

В інших варіантах у даному винаході запропоноване ізольоване антитіло, переважно повністю людське антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується (наприклад, залежним від дози чином): (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23. Антитіло може бути повністю людським антитілом або не бути таким. У переважних варіантах антитіло є повністю людським моноклональним анти-hLIGHT-антитілом, і ще більш переважно повністю людським моноклональним антагоністичним анти-hLIGHT-антитілом. Приклади тестів конкурентного блокування, які можна використовувати, наведені у розділі "Приклади" у даному описі.

У деяких варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, конкурують (наприклад, залежним від дози чином) з HVEM, LT β R і/або DcR3 (або їх злитим білком (білками)) за зв'язування з експресованим на клітинній поверхні hLIGHT. В інших варіантах антитіла, пропоновані у винаході, конкурують (наприклад, залежним від дози чином) з HVEM, LT β R і/або DcR3 (або їх злитим білком (білками)) за зв'язування з розчинним hLIGHT. Приклади аналізів конкурентного зв'язування, які можна використовувати, наведені у розділі "Приклади" у даному описі. В одному варіанті антитіло частково або повністю інгібує зв'язування HVEM, LT β R і/або DcR3 з експресованим на клітинній поверхні hLIGHT, таким як hLIGHT. В іншому варіанті антитіло частково або повністю інгібує зв'язування HVEM, LT β R і/або DcR3 з розчинним hLIGHT. У деяких варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, частково або повністю інгібують секрецію CCL20 IL-8, і/або RANTES з клітини, що має експресований на клітинній поверхні ліганд hLIGHT, такий як рецептор hLIGHT (наприклад, HVEM, LT β R і/або DcR3). У деяких варіантах клітиною, що експресує рецептор hLIGHT, є епітеліальна клітина ободової кишки.

45 Антитіла відповідно до даного винаходу включають антитіла і антигензв'язувальні фрагменти наступних антитіл: антитіло E1 (номер доступу ATCC PTA-7729), антитіло E13 (номер доступу ATCC PTA-7842) або антитіло E63 (номер доступу ATCC PTA-7818), антитіло F19 (номер доступу ATCC PTA-7819) або антитіло F23 (номер доступу ATCC PTA-7728), описані у розділі "Приклади" і в інших розділах даної заявки. У конкретному варіанті антитілом відповідно до даного винаходу є антитіло E1, E13, E63, F19 або F23. В іншому варіанті антитіло відповідно до винаходу містить антигензв'язувальний фрагмент (наприклад, Fab-фрагмент) E1, E13, E63, F19 або F23.

50 Переважно антитіла відповідно до винаходу є повністю людськими моноклональними антитілами, такими як повністю людські моноклональні антагоністичні антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з hLIGHT.

У деяких варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, зв'язуються з епітопом hLIGHT, що є тривимірною поверхневою ознакою поліпептиду hLIGHT (наприклад, у тримерній формі поліпептиду hLIGHT). Область поліпептиду hLIGHT, що здійснює внесок в епітоп, може являти собою ділянку з амінокислот поліпептиду, що йдуть одна за одною, або епітоп може бути утворений двома або більше областями поліпептиду, що не йдуть одна за одною. Епітоп

hLIGHT може бути в (а) тримерній формі ("тримерний епітоп hLIGHT") hLIGHT, (b) мономерній формі ("мономерний епітоп hLIGHT") hLIGHT, (c) і у тримерній, і у мономерній формі hLIGHT, (d) у тримерній формі, але не у мономерній формі hLIGHT, або (e) у мономерній формі, але не у тримерній формі hLIGHT.

Наприклад, у деяких варіантах епітоп є присутнім або доступний для зв'язування анти-hLIGHT-антитілом тільки у тримерній (нативній) формі, але не є присутнім або не доступний для зв'язування анти-hLIGHT-антитілом у мономерній (денатурованій) формі. В інших варіантах епітоп hLIGHT є лінійною ознакою поліпептиду hLIGHT (наприклад, у тримерній формі або мономерній формі поліпептиду hLIGHT). Антитіла, пропоновані у даному винаході, можуть імуноспецифічно зв'язуватися (а) з епітопом мономерної форми hLIGHT, (b) з епітопом тримерної форми hLIGHT, (c) з епітопом мономерної, але не тримерної форми hLIGHT, (d) з епітопом тримерної, але не мономерної форми hLIGHT, або (e) з обома, мономерною формою і тримерною формою hLIGHT. У переважних варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, імуноспецифічно зв'язуються з епітопом тримерної форми hLIGHT, але імуноспецифічно не зв'язуються з епітопом мономерної форми hLIGHT.

У конкретному варіанті даний винахід стосується одного або декількох антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять VH-ланцюг і/або VL-ланцюг, що мають амінокислотні послідовності VH-ланцюга і/або VL-ланцюга антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728.

В іншому варіанті даний винахід стосується одного або декількох антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять VH-домен і/або VL-домен, що мають амінокислотні послідовності VH-домену і/або VL-домену антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728.

В іншому варіанті даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну, дві, три або більше CDR, що мають амінокислотну послідовність однієї, двох, трьох або більше CDR антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728.

В одному варіанті даний винахід стосується одного або декількох антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять комбінацію CDR VH і/або CDR VL, що мають амінокислотну послідовність CDR VH і/або CDR VL антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728.

Даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять VH-ланцюг і/або VL-ланцюг, що має амінокислотну послідовність VH-ланцюга і/або VL-ланцюга, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, E13 або E63, або (b) антитілом F19 або F23; за умови, що зв'язування з епітопом hLIGHT не блокується обома антитілами: (а) антитілом E1 і F19, (b) антитілом E1 і F23, (c) антитілом E13 і F19, (d) антитілом E13 і F23, (e) антитілом E63 і F19 або (f) антитілом E63 і F23.

Даний винахід також стосується повністю людських антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять VH-ланцюг і/або VL-ланцюг, що має амінокислотну послідовність VH-ланцюга і/або VL-ланцюга, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23. Переважно повністю людське антитіло є повністю людським моноклональним антитілом і/або антагоністичним hLIGHT-антитілом.

Даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому антитіла містять VH-домен і/або VL-домен, що має амінокислотну послідовність VH-домену і/або VL-домену, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, E13 або E63, або (b) антитілом F19 або F23; за умови, що зв'язування з епітопом hLIGHT не блокується обома антитілами: (а) антитілом E1 і F19, (b) антитілом E1 і F23, (c) антитілом E13 і F19, (d) антитілом E13 і F23, (e) антитілом E63 і F19 або (f) антитілом E63 і F23.

Даний винахід також стосується повністю людських антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять VH-домен і/або VL-домен, що має

амінокислотну послідовність VH-домену і/або VL-домену, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23. Переважно повністю людське антитіло є повністю людським моноклональним антитілом і/або антагоністичним hLIGHT-антитілом.

Даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну, дві або три CDR VH (тобто CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH), що мають амінокислотну послідовність однієї, двох або трьох CDR VH, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, E13 або E63, або (b) антитілом F19 або F23; за умови, що зв'язування з епітопом hLIGHT не блокується обома антитілами: (а) антитілом E1 і F19, (b) антитілом E1 і F23, (c) антитілом E13 і F19, (d) антитілом E13 і F23, (e) антитілом E63 і F19 або (f) антитілом E63 і F23.

Даний винахід також стосується повністю людських антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну, дві або три CDR VH (тобто CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH), що мають амінокислотну послідовність однієї, двох або трьох CDR VH, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23. Переважно повністю людське антитіло є повністю людським моноклональним антитілом і/або антагоністичним hLIGHT-антитілом.

Даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну, дві або три CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL), що мають амінокислотну послідовність однієї, двох або трьох CDR VL, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, E13 або E63, або (b) антитілом F19 або F23; за умови, що зв'язування з епітопом hLIGHT не блокується обома антитілами: (а) антитілом E1 і F19, (b) антитілом E1 і F23, (c) антитілом E13 і F19, (d) антитілом E13 і F23, (e) антитілом E63 і F19 або (f) антитілом E63 і F23.

Даний винахід також стосується повністю людських антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить одну, дві або три CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL), що мають амінокислотну послідовність однієї, двох або трьох CDR VL, відповідно, антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зв'язування антитіла з епітопом hLIGHT конкурентно блокується залежним від дози чином: (а) антитілом E1, антитілом E13 або антитілом E63, або (b) антитілом F19 або антитілом F23. Переважно повністю людське антитіло є повністю людським моноклональним антитілом і/або антагоністичним hLIGHT-антитілом.

Даний винахід також стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну або декілька CDR VH (тобто CDR1 VH, CDR1 VH і/або CDR3 VH), що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR VH (тобто CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH) антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728; або їх комбінацію.

В одному варіанті антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, містять домен VH, що має амінокислотну послідовність домену VH, зазначеного у будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, і/або домен VL, що має амінокислотну послідовність домену VL, зазначеного у будь-якій з послідовностей SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91 або 10.

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (а) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 1, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 82, 6 або 83; (b) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 2, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 7; (c) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 3, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 8; (d) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 4, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 90, 9, 91 або 92; або (e) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 5, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 10. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

В іншому варіанті антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, містять домен VH, що має амінокислотну послідовність домену VH антитіла, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), і/або домен VL, що має амінокислотну послідовність домену VL антитіла, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (а) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1); (b) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13); (c) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63); (d) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19); або (e) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу містять CDR1 VH, що має амінокислотну послідовність CDR1 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. В іншому варіанті антитіла відповідно до винаходу містять CDR2 VH, що має амінокислотну послідовність CDR2 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. В іншому варіанті антитіла відповідно до винаходу містять CDR3 VH, що має амінокислотну послідовність CDR3 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу містять CDR1 VH і/або CDR2 VH, і/або CDR3 VH, незалежно вибрані з CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, які вказані у вигляді будь-якої з областей VH у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5.

Даний винахід також стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять одну або декілька CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL), що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL) антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно); або будь-яку їх комбінацію.

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (1) домен VH, що має (a) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12 і/або 13, відповідно, (b) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 14, 15 і/або 16, відповідно, (c) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 17, 18 і/або 19, відповідно, (d) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 20, 21 і/або 22, відповідно, або (e) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 23, 24 і/або 24, відповідно, і/або (2) домен VL, що має (a) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 84, 26 або 85; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 86, 27 або 87; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 88, 28 або 89, (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 29, 30 і/або 31, відповідно, (c) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 32, 33 і/або 34, відповідно, (d) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 93, 35, 94 або 95; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 6, 36, 97 або 98, або (e) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 38, 39 і/або 40, відповідно. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (1) домен VH, що має (a) CDR1 VH, CDR2 VH, і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH, і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), (b) CDR1 VH, CDR2 VH, і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1

VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), (c) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), (d) CDR1 VH, CDR2 VH, і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), або (e) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23), і/або (2) домен VL, що має (a) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), (c) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), (d) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), або (e) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (1) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12 і/або 13, відповідно, і (b) домен VL, що має CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 84, 26 або 85; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 86, 27 або 87; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 88, 28 або 89; (2) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 14, 15 і/або 16, відповідно, і (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 29, 30 і/або 31, відповідно; (3) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 17, 18, і/або 19, відповідно, і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 32, 33 і/або 34, відповідно; (4) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 20, 21 і/або 22, відповідно, і (b) домен VL, що має CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 93, 35, 94 або 95; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; або (5) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 23, 24 і/або 24, відповідно, і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 38, 39 і/або 40, відповідно. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить (1) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1); (2) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13); (3) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH, і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63); (4) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), і CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19); або (5) (a) домен VH, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер

доступу ATCC PTA-7728 (F23), і (b) домен VL, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

5 У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу містять CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність CDR1 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). В іншому варіанті антитіла відповідно до винаходу містять CDR2 VL, що має амінокислотну
10 послідовність CDR2 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). В іншому варіанті антитіла відповідно до винаходу містять CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність CDR3 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу містять CDR1 VL і/або CDR2 VL, і/або CDR3 VL, незалежно вибрані з CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, які зображені у будь-якій з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, або 10; або антитіла, що продукується
20 гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу містять (1) домен або ланцюг VH, що має одну або декілька (а) CDR1 VH, що має амінокислотну послідовність CDR1 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується
25 гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), (b) CDR2 VH, що має амінокислотну послідовність CDR2 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), або (c) CDR3 VH, що має амінокислотну послідовність CDR3 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно); і/або (2) домен або ланцюг VL, що має одну або декілька (а) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність CDR1 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), (b) CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність CDR2 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), і/або (c) CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність CDR3 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

Таблиця 1

Послідовності CDR-областей антитіл E1, E13, E63, F19 і F23 (SEQ ID NO)

AT.	VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
E1	(SEQ ID NO:1)	RFNMN (SEQ ID NO:11)	YISSSYTIYYADSVKG (SEQ ID NO:12)	SIAAFDY (SEQ ID NO:13)	(SEQ ID NO:82, 6*, 83)	RASQGISSALA (SEQ ID NO:84) RASQSVSSSYLT (SEQ ID NO:26*) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:85)	DASSLES (SEQ ID NO:86) GASSRAT (SEQ ID NO:27*) GASNRAT (SEQ ID NO:87)	QQFNSYRT (SEQ ID NO:88) QQYGSSMYT (SEQ ID NO:28*) QQYGSSPWT (SEQ ID NO:89)
E13	(SEQ ID NO:2)	NAWMS (SEQ ID NO:14)	RIKSKIDGGTTDYAAPVKG (SEQ ID NO:15)	AMAGAFGF (SEQ ID NO:16)	(SEQ ID NO:7)	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:29)	GASSRAT (SEQ ID NO:30)	QQYGSSPMYT (SEQ ID NO:31)
E63	(SEQ ID NO:3)	SGGYWS (SEQ ID NO:17)	YIYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:18)	WITMFRGVGFDP (SEQ ID NO:19)	(SEQ ID NO:8)	RASQSIGSSLH (SEQ ID NO:32)	YASQSF (SEQ ID NO:33)	HQSSSLPLT (SEQ ID NO:34)
F19	(SEQ ID NO:4)	GYNWH (SEQ ID NO:20)	EITHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:21)	EIAVAGTGYGMDV (SEQ ID NO:22)	(SEQ ID NO:90, 9*, 91, 92)	RVSQGISSYLN (SEQ ID NO:93) RASQGINSAFA (SEQ ID NO:35*) RMSQGISSYLA (SEQ ID NO:94) RASQGVSSSYLA (SEQ ID NO:95)	SASNLS (SEQ ID NO:96) DASSLES (SEQ ID NO:36*) AASTLQS (SEQ ID NO:97) DASNRAT (SEQ ID NO:98)	QRTJNAPPT (SEQ ID NO:99) QQFNSYPLT (SEQ ID NO:37*) QQYYSFPYT (SEQ ID NO:100) QQRSNWHP (SEQ ID NO:101)
F23	(SEQ ID NO:5)	GYWN (SEQ ID NO:23)	EINQYNPSLKS (SEQ ID NO:24)	EIAIADKGYGLDV (SEQ ID NO:25)	(SEQ ID NO:10)	RASQGISSALA (SEQ ID NO:38)	DASSLES (SEQ ID NO:39)	QQFNSYPLT SEQ ID NO:40)

* Переважні VL і послідовності CDR1-3 VL E1 і F19.

Даний винахід також стосується антитіл, що містять одну або декілька CDR VH і одну або декілька CDR VL, перерахованих у таблиці 1. Зокрема, винахід стосується антитіла, що містить

5 CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR2 VL

10 (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40);

15 CDR1 VH, CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH

20 (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH

25 (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і

30 CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20, або 23), CDR2 VH (SEQ ID

NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); або будь-яку їх комбінацію CDR VH (SEQ ID NO: 11-25) і CDR VL (SEQ ID NO: 26-40), перерахованих у таблиці 1. Відповідні CDR VH і CDR VL антитіл з номерами доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23) також можна використовувати у будь-яких комбінаціях, зазначених вище. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

Даний винахід також стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT, антитіл, що містять похідні доменів VH, CDR VH, доменів VL і CDR VL, описаних у даній публікації, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT. Даний винахід також стосується антитіл, що містять похідні E1, E13, E63, F19 і/або F23, при цьому зазначені антитіла імуноспецифічно зв'язуються з епітопом hLIGHT. Стандартні способи, відомі фахівцям у даній галузі, можна використовувати для введення мутацій у нуклеотидну послідовність, що кодує молекулу відповідно до винаходу, включаючи, наприклад, сайт-специфічний мутагенез і ПЛР-опосередкований мутагенез, що приводить до амінокислотних замін. Переважно похідні містять менше 25 амінокислотних замін, менше 20 амінокислотних замін, менше 15 амінокислотних замін, менше 10 амінокислотних замін, менше 5 амінокислотних замін, менше 4 амінокислотних замін, менше 3 амінокислотних замін або менше 2 амінокислотних замін у порівнянні з вихідною молекулою. У переважному варіанті похідні містять консервативні амінокислотні заміни в одному або декількох попередньо обчислених неістотних амінокислотних залишках. "Консервативна амінокислотна заміна" являє собою заміну, при якій амінокислотний залишок замінюють амінокислотним залишком, що має бічний ланцюг з подібним зарядом. Сімейства амінокислотних залишків, що мають бічні ланцюги з подібними зарядами, визначені у даній галузі. Такі сімейства включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами

(наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Альтернативно, мутації можуть бути введені випадково протягом всієї або тільки у частині кодууючої послідовності, наприклад, за допомогою насичувального мутагенезу, і одержані мутанти можуть бути піддані скринінгу стосовно біологічної активності, щоб ідентифікувати мутанти, які зберігають активність. Після мутагенезу може бути експресований білок, що кодується, і може бути визначена активність білка.

В іншому варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності E1, E13, E63, F19 і/або F23 або антигензв'язувального фрагмента зазначених антитіл, такого як VH-домен, VL-домен, VH-ланцюг або VL-ланцюг. В одному варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності, зазначеній у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. В іншому варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності, зазначеній у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10. У ще одному варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, містить амінокислотну послідовність CDR VH і/або CDR VL, яка щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності CDR VH, зазначеній у SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 (CDR VH) і/або амінокислотній послідовності CDR VL, зазначеній у SEQ ID NO: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 або 40.

У конкретних варіантах антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло. Повністю людські антитіла можуть бути одержані будь-яким способом, відомим у даній галузі. Приклади способів включають імунізацію антигеном hLIGHT (будь-яким поліпептидом hLIGHT, здатним викликати імунну відповідь і необов'язково кон'югованим з носієм) трансгенних тварин (наприклад, мишей), які здатні продукувати репертуар антитіл людини за відсутності продукування ендогенних імуноглобулінів; див., наприклад, Jakobovits et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 2551; Jakobovits et al., (1993) Nature, 362: 255 258 (1993); Bruggermann et al., (1993) Year in Immunol., 7:33. Інші способи одержання повністю людських анти-hLIGHT-антитіл можна знайти у розділі "Приклади" у даному описі.

Альтернативно, повністю людські антитіла можуть бути одержані у результаті скринінгу *in vitro* бібліотек антитіл у фаговому дисплеї; див., наприклад, публікації Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991), включені у даний опис у вигляді посилання. Різні бібліотеки, що містять антитіла, на основі фагового дисплею описані і можуть бути легко одержані фахівцем у даній галузі. Бібліотеки можуть містити різноманітні послідовності антитіл людини, такі як фрагмент Fab, Fv і scFv людини, які можуть бути піддані скринінгу проти відповідної мішені.

У переважних варіантах антитіла, застосовувані відповідно до способів, пропонованих у винаході, мають високу афінність стосовно поліпептиду hLIGHT або фрагмента поліпептиду або його епітопу. В одному варіанті антитіла, застосовувані відповідно до способів, пропонованих у винаході, мають більш високу афінність стосовно антигену hLIGHT, ніж відомі антитіла (наприклад, комерційно доступні моноклональні антитіла, обговорювані у даному описі). У конкретному варіанті антитіла, застосовувані відповідно до способів, пропонованих у винаході, мають у 2-10 разів (або більше) більш високу афінність стосовно антигену hLIGHT, ніж відоме анти-hLIGHT-антитіло, що оцінюють способами, обговорюваними у даному описі або відомими

фахівцеві у даній галузі (наприклад, в аналізі BIAcore). Відповідно до зазначених варіантів, афінність антитіл в одному варіанті оцінюють з використанням аналізу BIAcore.

У конкретному варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язує антиген hLIGHT, містить амінокислотну послідовність домену VH і/або амінокислотну послідовність домену VL, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридується з (1) комплементом нуклеотидної послідовності, що кодує будь-який з доменів VH і/або VL, зазначений у SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 або 45 (VH) і/або SEQ ID NO: 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 або 50 (VL), або (2) з комплементом нуклеотидної послідовності, що кодує будь-який з доменів VH або VL антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23) у жорстких умовах (наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі ДНК у 6х хлориді натрію/цитраті натрію (SSC) приблизно при 45 °C з подальшими одним або декількома промиваннями в 0,2х SSC/0,1 % SDS приблизно при 50-65 °C), в умовах високої жорсткості (наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі нуклеїновою кислотою в 6х SSC приблизно при 45 °C з подальшими одним або декількома промиваннями в 0,1х SSC/0,2 % SDS приблизно при 68 °C), або в умовах гібридизації іншої жорсткості, які відомі фахівцям у даній галузі (див., наприклад, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., New York, pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

В іншому варіанті антитіло, що імуноспецифічно зв'язує антиген hLIGHT, містить амінокислотну послідовність CDR VH або амінокислотну послідовність CDR VL, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридується з комплементом нуклеотидної послідовності, що кодує будь-яку з CDR VH і/або CDR VL, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 (CDR VH) і/або SEQ ID NO: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 або 40 (CDR VL), або (b) з комплементом послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує будь-яку з CDR VH і/або CDR VL антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23) у жорстких умовах (наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі ДНК в 6х SSC приблизно при 45 °C з подальшими одним або декількома промиваннями в 0,2х SSC/0,1 % SDS приблизно при 50-65 °C), в умовах високої жорсткості (наприклад, гібридизація зі зв'язаною на фільтрі нуклеїновою кислотою в 6х SSC приблизно при 45 °C з подальшими одним або декількома промиваннями в 0,1х SSC/0,2 % SDS приблизно при 68 °C), або в умовах гібридизації іншої жорсткості, які відомі фахівцям у даній галузі (див., наприклад, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., New York, pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

Антитіла відповідно до винаходу включають антитіла, які є хімічно модифікованими, наприклад, ковалентним зв'язуванням будь-якого типу молекули з антитілом. Як приклад, але не з метою обмеження, похідні антитіл включають антитіла, які були хімічно модифіковані, наприклад, глікозилуванням, ацетилюванням, пегілюванням, фосфорилюванням, амідуванням, дериватизацією відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичним розщепленням, зв'язуванням з клітинним лігандом або іншим білком і т.д. Будь-яка з численних хімічних модифікацій може бути здійснена відомими способами, включаючи без обмеження специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину і т.п. Крім того, антитіло може містити одну або декілька неklasичних амінокислот.

Даний винахід також стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, які містять каркасну область, відому фахівцям у даній галузі (наприклад, фрагмент антитіл людини або тварини, відмінної від людини). Каркасна область, наприклад, може являти собою такі, що зустрічаються у природі, або консенсусні каркасні області. Найбільш переважно каркасна область антитіла відповідно до винаходу є каркасною областю людини (див., наприклад, Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479, де наведений список каркасних областей людини, дана публікація включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі). Також див. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed.

У конкретному варіанті даний винахід стосується антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять амінокислотну послідовність однієї або декількох CDR E1, E13, E63, F19, і/або F23 (тобто SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 (CDR VH) або SEQ ID NO: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 або 40 (CDR VL), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728, і каркасні області людини з однією або декількома амінокислотними

замінами в одному, двох, трьох або більше з наступних залишків: (а) рідкі каркасні залишки, які різні у каркасі мишачого антитіла (тобто каркасі донорного антитіла) та у каркасі антитіла людини (тобто каркасі акцепторного антитіла); (b) залишки зони Вен'єра у випадку відмінності між каркасом донорного антитіла і каркасом акцепторного антитіла; (c) залишки для пакування ланцюгів в області контакту VH/VL, за якими відрізняються каркас донорного антитіла і каркас акцепторного антитіла; (d) канонічні залишки, за якими відрізняються послідовності каркаса донорного антитіла і каркаса акцепторного антитіла, зокрема, каркасні області, які є ключовими для визначення канонічного класу петель CDR мишачого антитіла; (e) залишки, які є сусідніми з CDR; (g) залишки, здатні взаємодіяти з антигеном; (h) залишки, здатні взаємодіяти з CDR; і (i) залишки, що беруть участь у контакті між VH-доменом і VL-доменом. У деяких варіантах антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, які містять каркасні області людини з однією або декількома амінокислотними замінами в одному, двох, трьох або більше ідентифікованих вище залишках, є антагоністичними hLIGHT-антитілами.

В обсяг даного винаходу входять антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять амінокислотну послідовність домену VH і/або домену VL або їх антигензв'язувального фрагмента антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728), або антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23, що має мутації (наприклад, одну або декілька амінокислотних заміни) у каркасних областях. У деяких варіантах антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, містять амінокислотну послідовність домену VH і/або домену VL або їх антигензв'язувального фрагмента антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23 з однією або декількома замінами амінокислотних залишків у каркасних областях доменів VH і/або VL.

В обсяг даного винаходу також входять антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, при цьому зазначені антитіла містять амінокислотну послідовність домену VH і/або домену VL антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728, або антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23, що має мутації (наприклад, одну або декілька заміни амінокислотних залишків) у гіперваріабельній і каркасній областях. Переважно, амінокислотні заміни у гіперваріабельній і каркасній областях поліпшують зв'язування антитіла з антигеном hLIGHT.

У деяких варіантах антитіла, пропоновані у даному описі, зменшують або інгібують зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3, і/або зменшують або інгібують біологічну активність hLIGHT, таку як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, у суб'єкта (наприклад, у людини). У деяких варіантах антитіла, пропоновані у даному описі, такі як моноклональне анти-hLIGHT-антитіло людини, зменшують або інгібують зв'язування розчинного або експресованого на клітинній поверхні hLIGHT з HVEM або LT β R, і/або зменшують або інгібують секрецію CCL20 і/або RANTES після контакту з розчинним або експресованим на клітинній поверхні hLIGHT, у суб'єкта. У деяких варіантах антитіла є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L. Блокуюча активність антитіла, пропонованого у даному описі, стосовно зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DCR3 може бути виявлена з використанням аналізу, що описаний у будь-якому з прикладів 1-4. Інгібування біологічної активності клітин, що експресують рецептор hLIGHT, hLIGHT-антитілом, пропонованим у даному винаході, можна виявити, використовуючи аналіз, що описаний у будь-якому з прикладів 1-4.

В інших варіантах антитіла, пропоновані у даному винаході, зменшують або інгібують зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3, і/або зменшують або інгібують біологічну активність hLIGHT, таку як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, у клітині, що має експресований на клітинній поверхні рецептор hLIGHT (такий як HVEM, LT β R і/або Dc3R). У деяких варіантах, антитіло, пропоноване у даному винаході, таке як моноклональне анти-hLIGHT антитіло людини, зменшує або інгібує зв'язування розчинного або експресованого на клітинній поверхні hLIGHT з HVEM або LT β R, і/або зменшує або інгібує секрецію CCL20 і/або RANTES у клітині, що має експресований на клітинній поверхні рецептор hLIGHT, після контакту з розчинним або експресованим на клітинній поверхні hLIGHT. У деяких варіантах здійснення винаходу hLIGHT є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L. Блокуюча активність антитіла, пропонованого у даному винаході, стосовно зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DCR3 можна виявити, використовуючи аналіз, що описаний у будь-якому з прикладів 1-4. Інгібування біологічної активності клітин, що експресують рецептор hLIGHT, hLIGHT-антитілом, пропонованим у даному винаході, можна виявити, використовуючи аналіз, що описаний у будь-якому з прикладів 1-4.

Даний винахід також стосується злитих білків, що містять антитіло, пропоноване у даному винаході, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, і гетерологічний поліпептид. У

деяких варіантах гетерологічний поліпептид, з яким зливають антитіло, корисний для націлювання антитіла на клітини-мішені, що мають експресований на клітинній поверхні hLIGHT.

У даному винаході запропоновані також панелі антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT. У конкретних варіантах винахід стосується панелей антитіл, що мають різні константи швидкості асоціації, різні константи швидкості дисоціації, різні афінності стосовно антигену hLIGHT і/або різні специфічності стосовно антигену hLIGHT. Винахід стосується панелей, що містять приблизно 10, переважно приблизно 25, приблизно 50, приблизно 75, приблизно 100, приблизно 125, приблизно 150, приблизно 175, приблизно 200, приблизно 250, приблизно 300, приблизно 350, приблизно 400, приблизно 450, приблизно 500, приблизно 550, приблизно 600, приблизно 650, приблизно 700, приблизно 750, приблизно 800, приблизно 850, приблизно 900, приблизно 950 або приблизно 1000 антитіл або більше. Панелі антитіл можна використовувати, наприклад, у 96-ямкових або 384-ямкових планшетах, наприклад, для аналізів, таких як ELISA.

КОН'ЮГАТИ АНТИТІЛ І ЗЛИТІ БІЛКИ

У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу кон'югують або рекомбінантно зливають з діагностичним засобом, засобом, що реєструється, або терапевтичним засобом, або будь-якою іншою молекулою. Кон'юговані або рекомбінантно злиті антитіла можуть бути застосовні, наприклад, для контролювання або прогнозування появи, розвитку, прогресування і/або тяжкості захворювання, опосередкованого hLIGHT, як частина процедури клінічного випробування, такого як визначення ефективності конкретної терапії.

Таку діагностику і виявлення можна здійснити, наприклад, за допомогою зв'язування антитіла з речовинами, що реєструються, включаючи без обмеження різні ферменти, такі як без обмеження пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, бета-галактозидаза або ацетилхолінестераза; простетичними групами, такими як без обмеження стрептавідин/біотин і авідин/біотин; флуоресціюючими речовинами, такими як без обмеження умбеліферон, флуоресцеїн, ізотіоціанат флуоресцеїну, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин; люмінесцентними речовинами, такими як без обмеження люмінол; біолюмінесцентними речовинами, такими як без обмеження люцифераза, люциферин і екворин; радіоактивними речовинами, такими як без обмеження йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I і ^{121}I), вуглець (^{14}C), сірка (^{35}S), тритій (^3H), індій (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In і ^{111}In), технецій (^{99}Tc), талій (^{201}Tl), галій (^{68}Ga , ^{67}Ga), паладій (^{103}Pd), молібден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn і ^{117}Sn ; і позитронно-активними металами при використанні позитронно-емісійної томографії, і нерадіоактивними парамагнітними іонами металів.

Даний винахід, крім того, стосується застосувань антитіл відповідно до винаходу, кон'югованих або рекомбінантно злитих з терапевтичним компонентом (або одним або декількома терапевтичними компонентами). Антитіло може бути кон'юговане або рекомбінантно злите з терапевтичним компонентом, таким як цитотоксин, наприклад, цитостатичним або цитотоксичним засобом, терапевтичним засобом або іоном радіоактивного металу, наприклад, таким, що випромінює альфа-частинки. Цитотоксином або цитотоксичним засобом є будь-який засіб, який є згубним для клітин. Терапевтичні компоненти включають без обмеження антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин); алкілувальні засоби (наприклад, мехлоретамін, тіотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BCNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бісультан, дибромманіт, стрептозотозин, мітоміцин С і цисдихлордіамін платини (II) (DDP), і цисплатин); антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) і доксорубіцин); антибіотики (наприклад, актиноміцин D (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC)); молекули ауристатину (наприклад, ауристатин PHE, біостатин 1 і соластатин 10; див. Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3802-8 (2002), Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3580-4 (2001), Mohammad et al., *Anticancer Drugs* 12: 735-40 (2001), Wall et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 76-80 (1999), Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15: 367-72 (1999), всі публікації включені у даний опис у вигляді посилання); гормони (наприклад, глюкокортикоїди, прогестини, андрогени і естрогени), інгібітори ферментів репарації ДНК (наприклад, етопозид або топотекан), інгібітори кіназ (наприклад, сполука ST1571, мезилат іматинібу (Kantarjian et al., *Clin. Cancer Res.* 8(7): 2167-76 (2002)); цитотоксичні засоби (наприклад, паклітаксел, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, емітин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацидин, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин, і їх аналоги або гомологи, і сполуки, описані у патентах США № 6245759, 6399633, 6383790, 6335156, 6271242, 6242196, 6218410, 6218372,

6057300, 6034053, 5985877, 5958769, 5925376, 5922844, 5911995, 5872223, 5863904, 5840745, 5728868, 5648239, 5587459); інгібітори фарнезилтрансферази (наприклад, R115777, BMS-214662 і сполуки, описані, наприклад, у патентах США № 6458935, 6451812, 6440974, 6436960, 6432959, 6420387, 6414145, 6410541, 6410539, 6403581, 6399615, 6387905, 6372747, 6369034, 6362188, 6342765, 6342487, 6300501, 6268363, 6265422, 6248756, 6239140, 6232338, 6228865, 6228856, 6225322, 6218406, 6211193, 6187786, 6169096, 6159984, 6143766, 6133303, 6127366, 6124465, 6124295, 6103723, 6093737, 6090948, 6080870, 6077853, 6071935, 6066738, 6063930, 6054466, 6051582, 6051574 і 6040305); інгібітори топоізомераз (наприклад, каптотецин; іринотекан; SN-38; топотекан; 9-амінокамптотецин; GG-211 (GI 147211); DX-8951f; IST-622; рубітекан; піразолакридин; XR-5000; саїнтопін; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN 1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; і ребекаміцин); болгарейн; агенти, що зв'язуються з малою борозенкою ДНК, такі як барвник Hoescht 33342 і барвник Hoechst 33258; нітидин; фагаронін; епіберберин; коралін; бета-лапахон; BC-4-1; бісфосфонати (наприклад, алендронат, цимадронат, клондронат, тилудронат, етидронат, ібандронат, неридронат, олпандронат, ризедронат, піридронат, памідронат, золендронат), інгібітори HMG-CoA-редуктази (наприклад, ловастатин, симвастатин, аторвастатин, правастатин, флувастатин, статин, церивастатин, лескол, лупітор, розувастатин і аторвастатин); антисмислові олігонуклеотиди (наприклад, олігонуклеотиди, описані у патентах США № 6277832, 5998596, 5885834, 5734033 і 5618709); інгібітори аденозиндезамінази (наприклад, фосфат флударабіну і 2-хлордезоксиаденозин); ібритумомаб тіуксетан (Zevalin®); тоситумомаб (Bexxar®) і їх фармацевтично прийнятні солі, сольвати, клатрати і проліки.

Крім того, антитіло відповідно до винаходу може бути кон'юговане або рекомбінантно злите з терапевтичним залишком або залишком проліків, що модифікує дану біологічну відповідь. Терапевтичні залишки або залишки проліків не слід вважати обмеженими класичними хімічними терапевтичними засобами. Наприклад, залишком лікарського засобу може бути білок, пептид або поліпептид, що має необхідну біологічну активність. Такі білки можуть включати, наприклад, токсин, такий як абрин, рицин А, екзотоксин *Pseudomonas*, холерний токсин або дифтерійний токсин; білок, такий як фактор некрозу пухлин, γ -інтерферон, α -інтерферон, фактор росту нервів, фактор росту, одержаний з тромбоцитів, тканинний активатор плазміногену, апоптозний агент, наприклад, TNF- γ , AIM I (див. міжнародну публікацію WO 97/33899), AIM II (див. міжнародну публікацію WO 97/34911), ліганд Fas (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567-1574) і VEGF (див. міжнародну заявку WO 99/23105), антиангіогенний засіб, наприклад, ангіостатин, ендостатин або компонент шляху коагуляції (наприклад, тканинний фактор); або модифікатор біологічної відповіді, такий як, наприклад, лімфокін (наприклад, інтерферон-гамма, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-5 ("IL-5"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), інтерлейкін-7 ("IL-7"), інтерлейкін 9 ("IL-9"), інтерлейкін-10 ("IL-10"), інтерлейкін-12 ("IL-12"), інтерлейкін-15 ("IL-15"), інтерлейкін-23 ("IL-23"), колонієстимулюючий фактор гранулоцитів і макрофагів ("GM-CSF") і колонієстимулюючий фактор гранулоцитів ("G-CSF")) або фактор росту (наприклад, гормон росту ("GH")), або коагулюючий агент (наприклад, кальцій, вітамін К, тканинні фактори, такі як без обмеження фактор Хагемана (фактор XII), високомолекулярний кініноген (HMWK), прекалікреїн (PK), коагуляційні білки-фактори II (протромбін), фактор V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, фосфоліпід і мономер фібрину).

Даний винахід стосується антитіл відповідно до винаходу, рекомбінантно злитих або хімічно кон'югованих (ковалентна або нековалентна кон'югація) з гетерологічним білком або поліпептидом (або їх фрагментом, переважно з поліпептидом довжиною приблизно 10, приблизно 20, приблизно 30, приблизно 40, приблизно 50, приблизно 60, приблизно 70, приблизно 80, приблизно 90 або приблизно 100 амінокислот) з утворенням злитих білків. Зокрема, винахід стосується злитих білків, що містять антигензв'язувальний фрагмент антитіла відповідно до винаходу (наприклад, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, VH-домен, CDR VH, VL-домен або CDR VL) і гетерологічний білок, поліпептид або пептид. В одному варіанті гетерологічний білок, поліпептид або пептид, з яким зливають антитіло, придатний для націлювання антитіла на конкретний тип клітин, такий як клітина, що експресує hLIGHT або рецептор hLIGHT. Наприклад, антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з рецептором клітинної поверхні, експресованим клітиною конкретного типу (наприклад, імунною клітиною), може бути злите або кон'юговане з модифікованим антитілом відповідно до винаходу.

Кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить будь-яке антитіло відповідно до винаходу, описане у даній публікації, і гетерологічний поліпептид. В одному варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить антитіло E1, E13, E63, F19 або F23, або антитіло, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-

7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і гетерологічний поліпептид. В іншому варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить антигензв'язувальний фрагмент E1, E13, E63, F19 або F23 або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63 F19, або F23), і гетерологічний поліпептид. В іншому варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить домен VH, що має амінокислотну послідовність будь-якого з доменів VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, або домен VH антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23) і/або домен VL, що має амінокислотну послідовність будь-якого з доменів VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, або домен VL антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і гетерологічний поліпептид. В іншому варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до даного винаходу містить одну або декілька CDR VH, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR VH, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25, або CDR VH антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F1 9, або F23), і гетерологічний поліпептид. В іншому варіанті кон'югований або злитий білок містить одну або декілька CDR VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR VL, зазначену у SEQ ID NO: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 або 40, або CDR VL антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і гетерологічний поліпептид. В іншому варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить, щонайменше, один домен VH і, щонайменше, один домен VL, зазначені у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5 і SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно, або домени антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19, або F23), і гетерологічний поліпептид. У ще одному варіанті кон'югований або злитий білок відповідно до винаходу містить, щонайменше, одну CDR VH і, щонайменше, одну CDR VL, зазначені у SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 і SEQ ID NO: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 або 40, відповідно, або CDR антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і гетерологічний поліпептид.

Крім того, антитіло відповідно до винаходу може бути кон'юговане з терапевтичними компонентами, такими як іон радіоактивного металу, наприклад, що випромінює альфа-частинки, таким як ^{213}Bi , або макроциклічними хелаторами, застосовними для кон'югування іонів радіоактивних металів, включаючи без обмеження, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , з поліпептидами. У деяких варіантах макроциклічним хелатором є 1,4,7,10-тетраазаціклододекан-N, N",N",N"-тетраоцтова кислота (DOTA), що може бути зв'язана з антитілом за допомогою лінкерної молекули. Такі лінкерні молекули загальновідомі у даній галузі і описані у Denardo et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4(10): 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4): 553-7; і Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8): 943-50, кожна публікація включена у вигляді посилання у повному обсязі.

Крім того, антитіла відповідно до винаходу можуть бути злиті з маркерними послідовностями, такими як пептид, щоб полегшити очищення. У переважних варіантах маркерною амінокислотою послідовністю є пептид гексагістидин, наприклад, мітка, передбачена у векторі pQE (QIAGEN, Inc.), поряд з іншими векторами, багато з яких є комерційно доступними. Як описано, наприклад, у Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, гексагістидин забезпечує зручне очищення злитого білка. Інші пептидні мітки, застосовні для очищення, включають без обмеження гемаглютинінову ("HA") мітку, що відповідає епітопу, одержаному з білка гемаглютину вірусу грипу (Wilson et al., 1984, Cell 37: 767), і мітку "FLAG".

Способи злиття або кон'югування терапевтичних компонентів (включаючи поліпептиди) з антитілами добре відомі, див., наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985);

"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; патенти США № 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851, 5723125, 5783181, 5908626, 5844095 і 5112946; EP 307434; EP 367166; EP 394827; публікації PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 і WO 99/04813; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Traunecker et al., Nature, 331: 84-86, 1988; Zheng et al., J. Immunol., 154: 5590-5600, 1995; Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11337-11341, 1992, які включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

Злиті білки можуть бути створені, наприклад, способами перетасування генів, перетасування мотивів, перетасування екзонів і/або перетасування кодонів (які разом називають "перетасуванням ДНК"). Перетасування ДНК можна використовувати для зміни активностей антитіл відповідно до винаходу (наприклад, антитіл з більш високими афінностями і більш низькими швидкостями дисоціації). Загальний опис див. у патентах США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 і 5837458; Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76; і Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2): 308-313 (кожний із зазначених патентів і публікацій включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі). Антитіла або антитіла, що кодуються, можуть бути змінені у результаті випадкового мутагенезу за допомогою схильної до помилок PCR, інсерції випадкових нуклеотидів або іншими способами перед рекомбінацією. Полінуклеотид, що кодує антитіло відповідно до винаходу, може бути рекомбінований з одним або декількома компонентами, мотивами, ділянками, частинами, доменами, фрагментами і т.д. однієї або декількох гетерологічних молекул.

Антитіло відповідно до винаходу також може бути кон'юговане з другим антитілом з утворенням кон'югату антитіл, як описано у патенті США № 4676980, що включений у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

Терапевтичний залишок або лікарський засіб, кон'югований або рекомбінантно злитий з антитілом відповідно до винаходу, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, необхідно вибирати так, щоб досягти необхідного профілактичного або терапевтичного ефекту (ефектів). У деяких варіантах антитіло є модифікованим антитілом. Клініцисти або інший медичний персонал повинні враховувати наступні фактори при рішенні того, який терапевтичний залишок або лікарський засіб кон'югувати або рекомбінантно зливати з антитілом відповідно до винаходу: природу захворювання, тяжкість захворювання і стан пацієнта.

Антитіла відповідно до винаходу також можуть бути зв'язані з твердими основами, які особливо застосовні для імуноаналізів або очищення антигену-мішені. Такі тверді основи включають без обмеження скло, целюлозу, поліакриламід, нейлон, полістирол, полівінілхлорид або поліпропілен.

ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ

Терапевтичні препарати, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу, пропонованих у даному винаході, можуть бути одержані для зберігання змішуванням антитіла, що має необхідний ступінь очищення, з необов'язковими фізіологічно прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA) у формі ліофілізованих препаратів або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, і включають буфери, такі як буфери на основі фосфату, цитрату та інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (менш ніж приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі засоби, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солетворні протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як TWEENTM, PLURONICSTM або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Антитіла відповідно до винаходу, описані у даній публікації, також можуть бути приготовані, наприклад, у вигляді ліпосом. Ліпосоми, які містять молекулу, що представляє інтерес, одержують способами, відомими у даній галузі, такими як способи, описані в Epstein et al.(1985)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688; Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030; і патентах США № 4485045 і 4544545. Ліпосоми зі збільшеним часом циркуляції описані у патенті США № 5013556.

Особливо застосовні імуноліпосоми можуть бути одержані способом упарювання оберненої фази, при цьому до складу ліпідів входять фосфатидилхолін, холестерин і ПЕГ-дериватизований фосфатидилетаноламін (PEG-PE). Ліпосоми видавлювали через фільтри з визначеним розміром пор, щоб одержати ліпосоми необхідного діаметру. Fab'-фрагменти антитіла, пропонованого у даному винаході, можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як описано у Martin et al. (1982) J. Biol. Chem. 257: 286-288, за допомогою реакції дисульфідного обміну. Ліпосома необов'язково містить хіміотерапевтичний засіб (такий як доксорубіцин); див. Gabizon et al., (1989) J. National Cancer Inst. 81(19): 1484.

Препарати, такі як препарати, описані у даній публікації, також можуть містити більше однієї активної сполуки, які необхідні у випадку конкретного захворювання, що піддається лікуванню. У деяких варіантах препарати містять антитіло відповідно до винаходу і одну або декілька активних сполук з доповнюючими активностями, які не здійснюють несприятливого впливу одна на одну. Такі молекули відповідно присутні у комбінації у кількостях, які є ефективними у передбачуваних цілях. Наприклад, антитіло відповідно до винаходу можна комбінувати з одним або декількома іншими терапевтичними засобами. Таку комбіновану терапію можна проводити пацієнту періодично або одночасно, або послідовно.

Антитіло відповідно до винаходу також може бути вміщене у мікрокапсулу, одержану, наприклад, способом коацервації або полімеризацією на межі фаз, наприклад, мікрокапсулу з гідроксиметилцелюлози або желатину і мікрокапсулу з полі(метилметакрилату), відповідно, у колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або у макроемульсії. Такі способи описані у Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

Препарат, застосовуваний для введення *in vivo*, може бути стерильним. Стерилізацію легко здійснити фільтруванням, наприклад, через стерильні мембрани для фільтрування.

Т також можуть бути одержані препарати уповільненого вивільнення. Придатні приклади препаратів уповільненого вивільнення включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антагоніст, і такі матриці мають визначену форму, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць для уповільненого вивільнення включають складні поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетилметакрилат) або полі(вініловий спирт)), полілактиди (патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти і етил-L-глутамату, співполімери етилен-вінілацетату, що не піддаються розпаду, співполімери молочна кислота-гліколева кислота, що піддаються розпаду, такі як LUPRON DEPOTTM (ін'єкційні мікросфери, що складаються зі співполімеру молочна кислота-гліколева кислота і ацетату лейпроліду), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота. У той час як полімери, такі як етилен-вінілацетат і молочна кислота-гліколева кислота здатні вивільняти молекули протягом більш ніж 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш коротких періодів часу. Коли інкапсульовані антитіла зберігаються в організмі протягом тривалого часу, вони можуть денатурувати або агрегувати у результаті впливу вологи при 37 °C, що приводить до втрати біологічної активності і можливих змін імуногенності. Може бути розроблена раціональна методика стабілізації в залежності від механізму, залученого до процесу. Наприклад, якщо виявлено, що механізмом агрегації є утворення міжмолекулярного S-S-зв'язку за допомогою тіодисульфідного обміну, стабілізація досягається модифікацією сульфгідрильних залишків, ліофілізацією з кислих розчинів, регулюванням вмісту вологи, використанням придатних домішок і розробкою специфічних композицій у полімерному матриксі.

Фармацевтичні композиції, пропоновані у даному винаході, містять терапевтично ефективні кількості одного або декількох антитіл відповідно до винаходу, описаних у даній публікації, і необов'язково один або декілька додаткових профілактичних або терапевтичних засобів у фармацевтично прийнятному носії. Такі фармацевтичні композиції застосовні для профілактики, лікування, надання допомоги або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, такого як запальне захворювання кишечника або один, або декілька його симптомів.

Фармацевтичні носії, придатні для введення сполук, пропонованих у винаході, включають будь-які носії, які, як відомо фахівцям у даній галузі, підходять для конкретного способу введення.

Крім того, антитіла відповідно до винаходу можуть бути одержані у вигляді єдиного фармацевтично активного інгредієнта у композиції або можуть бути у комбінації з іншими активними інгредієнтами (такими як один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів).

Композиції можуть містити одне або декілька антитіл відповідно до винаходу. В одному варіанті антитіла одержують у вигляді придатних фармацевтичних препаратів, таких як розчини, суспензії, таблетки, таблетки, що диспергуються, пігулки, капсули, порошки, препарати уповільненого вивільнення або еліксири, для перорального введення або у вигляді стерильних розчинів або суспензій для парентерального введення, а також препарату у вигляді трансдермального пластиру і порошкових інгаляторів. В одному варіанті антитіла, описані вище, одержують у вигляді фармацевтичних композицій, використовуючи методики і способи, добре відомі у даній галузі (див., наприклад, Ansel (1985) *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 4th Ed., p. 126).

У композиціях ефективні концентрації одного або декількох антитіл або їх похідних змішують з придатним фармацевтичним носієм. Концентрації сполук у композиціях є ефективними для доставки такої кількості при введенні, що лікує, запобігає або ослаблює hLIGHT-опосередковане захворювання або його симптом.

В одному варіанті композиції одержують для введення окремими дозами. Щоб одержати композицію, наважку сполуки розчиняють, суспендують, диспергують або іншим способом змішують у вибраному носії в ефективній концентрації, що дозволяє полегшувати, запобігати стану, що піддається лікуванню, або ослаблювати один або декілька симптомів.

Антитіло відповідно до винаходу вводять у фармацевтично прийнятний носій в ефективній кількості, достатній для того, щоб викликати терапевтично корисний ефект за відсутності небажаних побічних ефектів у пацієнта, який піддається лікуванню. Терапевтично ефективну концентрацію можна визначити емпірично, тестуючи сполуки у системах *in vitro* та *in vivo* звичайними способами і потім екстраполюючи дані, щоб одержати дози для людини.

Концентрація антитіла у фармацевтичній композиції буде залежати, наприклад, від фізико-хімічних характеристик антитіла, схеми дозування і кількості, що вводиться, а також інших факторів, відомих фахівцям у даній галузі.

В одному варіанті терапевтично ефективна доза забезпечує концентрацію антитіла у сироватці від приблизно 0,1 нг/мл до приблизно 50-100 мкг/мл. В іншому варіанті фармацевтичні композиції забезпечують дозу, що складає від приблизно 0,001 мг до приблизно 2000 мг антитіла на кілограм маси тіла на добу. Можуть бути одержані фармацевтичні стандартні лікарські форми, які забезпечують від приблизно 0,01 мг, 0,1 мг або 1 мг до приблизно 500 мг, 1000 мг або 2000 мг, і в одному варіанті від приблизно 10 мг до приблизно 500 мг антитіла і/або комбінації інших необов'язкових необхідних інгредієнтів у стандартній лікарській формі.

Антитіло можна вводити однократно або можна розділити на декілька менших доз, щоб вводити через визначені інтервали часу. Слід розуміти, що точна доза і тривалість лікування залежать від захворювання, що піддається лікуванню, і їх можна визначити емпірично, використовуючи відомі протоколи тестування або екстраполюючи дані, одержані при тестуванні *in vivo* або *in vitro*. Слід зазначити, що концентрації і значення доз також можуть варіювати в залежності від тяжкості стану, який необхідно полегшити. Крім того, має бути зрозуміло, що для будь-якого конкретного суб'єкта конкретні схеми дозування можна коригувати з плином часу відповідно до індивідуальних потреб і професійної думки особи, яка вводить або контролює введення композицій, і що діапазони концентрацій, зазначені в описі, є тільки зразковими і не призначені для обмеження обсягу або практичного застосування заявлених композицій.

При змішуванні або додаванні антитіла одержана суміш може являти собою розчин, суспензію, емульсію або тому подібне. Форма одержаної суміші залежить від ряду факторів, включаючи передбачуваний спосіб введення і розчинність сполуки у вибраному носії або наповнювачі. Ефективна концентрація достатня для ослаблення симптомів захворювання, розладу або стану, що піддається лікуванню, і може бути визначена емпірично.

Запропоновані фармацевтичні композиції для введення людині і тваринам у стандартних лікарських формах, таких як таблетки, капсули, пігулки, порошки, гранули, стерильні парентеральні розчини або суспензії і пероральні розчини або суспензії, і емульсії типу "масло у воді", що містять придатні кількості сполук або їх фармацевтично прийнятних похідних. Антитіло в одному варіанті одержують і вводять у формі, що містить одиничну стандартну дозу, або у формі, що містить множину доз. Стандартні лікарські форми у використовуваному у даному описі значенні стосуються фізично дискретних одиниць, придатних для людини і тварин і упакованих окремо, як відомо у даній галузі. Кожна стандартна доза містить попередньо визначену кількість антитіла, достатню для одержання необхідного терапевтичного ефекту, разом з необхідним фармацевтичним носієм, наповнювачем або розріджувачем. Приклади стандартних лікарських форм включають ампули і шприци, і окремо упаковані таблетки або капсули. Стандартні лікарські форми можна вводити частинами або по декілька штук. Форма,

що містить множину доз, являє собою множину ідентичних стандартних лікарських форм, упакованих в одну ємність, для введення у вигляді окремих стандартних лікарських форм. Приклади форм, що містять множину доз, включають пляшечки, флакони з таблетками або капсулами, або флакони, вміст яких вимірюється пінтами або галонами. Отже, форма, що

5 містить множину доз, являє собою множину стандартних доз, які не розділені в упаковці.

У переважних варіантах одне або декілька анти-hLIGHT-антитіл відповідно до винаходу знаходяться у рідкому фармацевтичному препараті. Рідкі фармацевтично прийнятні композиції можуть бути одержані, наприклад, розчиненням, диспергуванням або змішуванням іншим чином активної сполуки, яка визначена вище, і необов'язкових фармацевтичних ад'ювантів у носії, такому як, наприклад, вода, фізіологічний розчин солі, водний розчин декстрази, гліцерин, гліколі, етанол і тому подібне, щоб таким чином одержати розчин або суспензію. За необхідності фармацевтична композиція, яку необхідно вводити, також може містити невеликі кількості нетоксичних допоміжних речовин, таких як зволожувачі, емульгатори, солюбілізуючі агенти, засоби для рН-буферів і тому подібне, наприклад, ацетат натрію, цитрат натрію, похідні циклодестрину, монолаурат сорбітану, ацетат триетаноламіну, олеат триетаноламіну та інші такі засоби.

Реальні способи одержання таких дозованих форм відомі або будуть очевидні для фахівців у даній галузі; наприклад, див. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

20 Можуть бути одержані дозовані форми або композиції, що містять антитіло у діапазоні від 0,005 % до 100 %, при цьому інша частина представлена нетоксичним носієм. Способи одержання таких композицій відомі фахівцям у даній галузі.

Пероральні фармацевтичні дозовані форми є або твердими, або гелеподібними, або рідкими. Тверді дозовані форми являють собою таблетки, капсули, гранули і нефасовані порошки. Типи пероральних таблеток включають пресовані таблетки, жувальні коржі і таблетки, які можуть мати кишково-розчинне покриття, покриття цукром або плівкове покриття. Капсули можуть являти собою тверді або м'які желатинові капсули, у той час як гранули і порошки можуть бути у нешипучій або шипучій формі з комбінацією інших інгредієнтів, відомих фахівцям у даній галузі.

30 У деяких варіантах препарати являють собою тверді дозовані форми. У деяких варіантах препарати являють собою капсули або таблетки. Таблетки, пігулки капсули, пастилки і тому подібне можуть містити один або декілька з наведених далі інгредієнтів або сполук подібної природи: зв'язувальний агент, змащувальна речовина, розріджувач, ковзна речовина, дезінтегруючий засіб, барвник, підсолоджувач, коригент, зволожувач, кишково-розчинне покриття і плівкове покриття. Приклади зв'язувальних агентів включають мікрокристалічну целюлозу, трагакантову камедь, розчин глюкози, аравійську камедь, розчин желатину, меласу, полівінілпіролідон, повідон, кросповідони, сахарозу і крохмальну пасту. Змащувальні речовини включають тальк, крохмаль, стеарат магнію або кальцію, лікоподій і стеаринову кислоту. Розріджувачі включають, наприклад, лактозу, сахарозу, крохмаль, каолін, сіль, маніт і фосфат дикальцію. Ковзні речовини включають без обмеження колоїдний діоксид кремнію. Дезінтегруючі засоби включають кроскармелозу натрію, натрієву сіль гліколяту крохмалю, альгінову кислоту, кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, бентоніт, метилцелюлозу, агар і карбоксиметилцелюлозу. Барвники включають, наприклад, будь-який зі схвалених сертифікованих водорозчинних барвників FD і C, і їх сумішей, і водонерозчинних барвників FD і C, суспендованих гідратом алюмінію. Підсолоджувачі включають сахарозу, лактозу, маніт і штучні підсолоджувачі, такі як сахарин, і будь-який з коригентів, висушених розпилювальним сушінням. Коригенти включають природні коригенти, екстраговані з рослин, таких як фрукти, і синтетичні суміші сполук, які викликають приємні відчуття, такі як без обмеження м'ята перцева і метилсаліцилат. Зволожувачі включають моностеарат пропіленгліколю, моноолеат сорбітану, монолаурат діетиленгліколю і лауриловий ефір поліоксіетилену. Кишково-розчинні оболонки включають жирні кислоти, жири, воски, шелак, амонізований шелак і ацетатфталат целюлози. Плівкові покриття включають гідроксіетилцелюлозу, натрій-карбоксиметилцелюлозу, поліетиленгліколь 4000 і ацетатфталат целюлози.

Антитіла відповідно до винаходу можуть входити до складу композиції, яка захищає їх від кислого середовища у шлунку. Наприклад, композиція може бути приготована у кишково-розчинному покритті, що зберігає свою цілісність у шлунку і вивільняє активну сполуку у кишечнику. Композиція також може бути приготована у комбінації з антацидом або іншим таким інгредієнтом.

У тому випадку, коли стандартна лікарська форма являє собою капсулу, вона може крім речовини зазначеного вище типу, містити рідкий носій, такий як жирне масло. Крім того,

стандартні лікарські форми можуть містити різні інші речовини, які модифікують фізичну форму стандартної лікарської форми, наприклад, покриття з цукру та інших кишково-розчинних засобів. Сполуки також можна вводити у вигляді компонента еліксиру, суспензії, сиропу, облатки, засобу для зрошення, жувальної гумки або тому подібного. Сироп крім активної сполуки може містити

5 сахарозу як підсолоджувач і деякі консерванти, барвники і коригенти.

Антитіло також може бути змішане з іншими активними речовинами, які не погіршують необхідної дії, або з речовинами, які доповнюють необхідну дію, такими як антациди, блокатори H₂ і діуретики. Активним інгредієнтом є антитіло або його фармацевтично прийнятне похідне, які описані у даній публікації. Можуть бути включені більш високі концентрації аж до приблизно

10 98 % мас. активного інгредієнта.

У всіх варіантах препарати у вигляді таблеток і капсул можуть бути покриті, як відомо фахівцям у даній галузі, щоб модифікувати або уповільнити розчинення активного інгредієнта. Таким чином, вони можуть бути покриті, наприклад, звичайно кишково-розчинними покриттями, такими як фенілсаліцилат, воски і ацетат фталат целюлози.

15 У переважних варіантах препарати мають рідкі дозовані форми. Рідкі пероральні дозовані форми включають водні розчини, емульсії, суспензії, розчини і/або суспензії, одержані перерозчиненням нешипучих гранул, і шипучі препарати, одержані перерозчиненням шипучих гранул. Водні розчини включають, наприклад, еліксири і сиропи. Емульсії можуть бути або типу "масло у воді", або типу "вода у маслі".

20 Еліксири являють собою прозорі, підсолоджені, водно-спиртові препарати. Фармацевтично прийнятні носії, використовувані в еліксах, включають розчинники. Сиропи являють собою концентровані водні розчини цукру, наприклад, сахарози, і можуть містити консервант. Емульсія є двофазною системою, в якій одна рідина диспергована у формі невеликих крапельок в іншій рідині. Фармацевтично прийнятними носіями, використовуваними в емульсіях, є неводні рідини, емульгатори і консерванти. У суспензіях використовують фармацевтично прийнятні суспендуючі засоби і консерванти. Фармацевтично прийнятні речовини, використовувані у нешипучих гранулах, які необхідно перерозчиняти для одержання рідкої пероральної дозованої форми, включають розріджувачі, підсолоджувачі і зволожувачі. Фармацевтично прийнятні речовини, використовувані у шипучих гранулах, які необхідно перерозчиняти для одержання рідкої

30 пероральної дозованої форми, включають органічні кислоти і джерело діоксиду вуглецю. Барвники і коригенти використовують у всіх зазначених вище дозованих формах.

Розчинники включають гліцерин, сорбіт, етиловий спирт і сироп. Приклади консервантів включають гліцерин, метил- і пропілпарабен, бензойну кислоту, бензоат натрію і спирт. Приклади неводних рідин, використовуваних в емульсіях, включають мінеральне масло і бавовняну олію. Приклади емульгаторів включають желатин, аравійську камедь, трагакантову камедь, бентоніт і поверхнево-активні речовини, такі як моноолеат поліоксіетиленсорбітану. Суспендуючі засоби включають натрій-карбоксиметилцелюлозу, пектин, трагакантову камедь, вігум і аравійську камедь. Підсолоджувачі включають сахарозу, сиропи, гліцерин і штучні підсолоджувачі, такі як сахарин. Зволожувачі включають моностеарат пропіленгліколю, моноолеат сорбітану, монолаурат діетиленгліколю і лауриловий ефір поліоксіетилену. Органічні кислоти включають лимонну і винну кислоту. Джерела діоксиду вуглецю включають бікарбонат натрію і карбонат натрію. Барвники включають будь-який зі схвалених сертифікованих водорозчинних барвників FD і C, і їх сумішей. Коригенти включають природні коригенти, екстраговані з рослин, таких як фрукти, і синтетичні суміші сполук, які викликають приємні

45 відчуття.

Для одержання твердої дозованої форми розчин або суспензію, наприклад, у пропіленкарбонаті, рослинних оліях або тригліцеридах в одному варіанті інкапсулюють у желатинову капсулу. Такі розчини і їх одержання та інкапсулювання описані у патентах США № 4328245, 4409239 і 4410545. Для одержання рідкої дозованої форми розчин, наприклад, у поліетиленгліколі, може бути розбавлений з використанням достатньої кількості фармацевтично прийнятного рідкого носія, наприклад, води, для простоти вимірювання у випадку введення.

Альтернативно, рідкі або напівтверді пероральні препарати можуть бути одержані розчиненням або диспергуванням активної сполуки або солі у рослинних оліях, гліколях, тригліцеридах, складних ефірах пропіленгліколю (наприклад, пропіленкарбонаті) та інших таких носіях, та інкапсулюванням таких розчинів або суспензій в оболонки твердих або м'яких желатинових капсул. Іншими застосовними препаратами є препарати, описані у патентах США № RE28819 і 4358603. Коротко, такі препарати включають без обмеження препарати, що містять сполуку, пропоновану у винаході, діалкілований моно- або поліалкіленгліколь, включаючи без обмеження 1,2-диметоксиметан, диглім, триглім, тетраглім, диметилловий ефір поліетиленгліколю-350, диметилловий ефір поліетиленгліколю-550, диметилловий ефір

60 поліетиленгліколю-350, диметилловий ефір поліетиленгліколю-550, диметилловий ефір

поліетиленгліколю-750, де 350, 550 і 750 стосуються зразкової середньої молекулярної маси поліетиленгліколю, і один або декілька антиоксидантів, таких як бутильований гідрокситолуол (BHT), бутильований гідроксіанізол (BHA), пропілгалат, вітамін Е, гідрохінон, гідроксикумарини, етаноламін, лецитин, кефалін, аскорбінова кислота, яблучна кислота, сорбіт, фосфорна кислота, тіодипропіонова кислота і її ефіри і дітіокарбамати.

Інші препарати включають без обмеження водно-спиртові розчини, включаючи фармацевтично прийнятні ацеталі. Спиртами, застосовуваними у таких препаратах, є будь-які фармацевтично прийнятні розчинники, що змішуються з водою, які мають одну або декілька гідроксильних груп, включаючи без обмеження пропіленгліколь і етанол. Ацеталі включають без обмеження ді(нижчий алкіл)ацеталі нижчих алкілальдегідів, таких як діетилацеталь ацетальдегіду.

Парентеральне введення в одному варіанті характеризується ін'єкцією, або підшкірно, або внутрішньом'язово, або внутрішньовенно, і також передбачене у даному винаході. Ін'єкційні препарати можуть бути одержані у звичайних формах, або у вигляді рідких розчинів або суспензій, твердих форм, придатних для приготування розчину або суспензії у рідині перед ін'єкцією, або у вигляді емульсій. Ін'єкційні препарати, розчини і емульсії також містять один або декілька ексципієнтів. Придатними ексципієнтами є, наприклад, вода, фізіологічний розчин солі, декстроза, гліцерин або етанол. Крім того, за необхідності, фармацевтичні композиції, що вводяться, також можуть містити незначні кількості нетоксичних допоміжних речовин, таких як зволожувачі або емульгатори, агенти для рН-буферів, стабілізатори, засоби, що підвищують розчинність, інші такі засоби, наприклад, такі як ацетат натрію, монолаурат сорбітану, олеат триетаноламіну і циклодекстрини.

Імплантація систем повільного вивільнення або тривалого вивільнення для підтримки постійного рівня дози (див., наприклад, патент США № 3710795) також передбачена у даному винаході. Коротко, сполуку, пропоновану у винаході, диспергують у твердому внутрішньому матриксі, наприклад, поліметилметакрилаті, полібутилметакрилаті, пластифікованому або неластифікованому полівінілхлориді, пластифікованому нейлоні, пластифікованому поліетилентерефталаті, природному каучуку, поліізопрені, поліізобутилені, полібутандієні, поліетилені, співполімерах етилен-вінілацетат, силіконових каучуках, полідиметилсилоксанах, співполімерах кремнійорганічних карбонатів, гідрофільних полімерах, таких як гідрогелі складних ефірів акрилової і метакрилової кислоти, колагені, поперечно зшитому полівініловому спирті і поперечно зшитому частково гідролізованому полівінілацетаті, який оточений зовнішньою полімерною мембраною, наприклад, з поліетилену, поліпропілену, співполімерів етилен/пропілен, співполімерів етилен/етилакрилат, співполімерів етилен/вінілацетат, силіконових каучуків, полідиметилсилоксанів, неопренового каучуку, хлорованого поліетилену, полівінілхлориду, співполімерів вінілхлориду з вінілацетатом, вініліденхлоридом, етиленом і пропіленом, іонвмісного поліетилентерефталату, бутилового каучуку, епіхлоргідринних каучуків, співполімеру етилен/вінілового спирту, терполімеру етилен/вінілацетат/вінілового спирту і співполімеру етилен/вінілоксіетанол, яка нерозчинна у рідинах організму. Антитіло дифундує через зовнішню полімерну мембрану поступово з контрольованою швидкістю вивільнення. Кількість антитіла, що міститься у таких парентеральних композиціях, у високій мірі залежить від його конкретної природи, а також активності сполуки і потреб суб'єкта.

Препарати для парентерального введення включають стерильні готові розчини для ін'єкції, стерильні сухі розчинні продукти, такі як ліофільно висушені готові порошки для об'єднання з розчинником безпосередньо перед застосуванням, включаючи підшкірні таблетки, стерильні готові суспензії для ін'єкції, стерильні сухі нерозчинні продукти, готові для об'єднання з наповнювачем безпосередньо перед застосуванням, і стерильні емульсії. Розчини можуть бути або водними, або неводними.

При внутрішньовенному введенні придатні носії включають фізіологічний розчин солі або фосфатно-сольовий буфер (PBS) і розчини, що містять загусники і солюбілізуючі агенти, такі як глюкоза, поліетиленгліколь і поліпропіленгліколь, і їх суміші.

Фармацевтично прийнятні носії, застосовувані у парентеральних препаратах, включають водні наповнювачі, неводні наповнювачі, протимікробні засоби, засоби для ізотонічності, буфери, антиоксиданти, місцеві анестетики, суспендуючі і диспергуючі засоби, емульгатори, комплексоутворюючі або хелатуючі засоби та інші фармацевтично прийнятні речовини.

Приклади водних наповнювачів включають розчин хлориду натрію для ін'єкцій, розчин Рінгера для ін'єкцій, ізотонічний розчин декстрози для ін'єкцій, стерильну воду для ін'єкцій, розчин декстрози і лактату Рінгера. Неводні парентеральні наповнювачі включають нелеткі олії рослинного походження, бавовняну олію, кукурудзяну олію, кунжутну олію і арахісову олію. Протимікробні засоби у бактеріостатичних або фунгістатичних концентраціях можуть бути

додані до парентеральних препаратів, упакованих в ємності, що містять множину доз, і до таких засобів належать феноли або крезолі, ртутні засоби, бензиловий спирт, хлорбутанол, метиловий і пропіловий ефіри п-гідроксибензойної кислоти, тимеросал, хлорид бензалконію і хлорид бензетонію. Засоби для ізотонічності включають хлорид натрію і декстрозу. Буфери включають фосфат і цитрат. Антиоксиданти включають бісульфат натрію. Місцеві анестетики включають гідрохлорид прокаїну. Суспендуєчі і диспергуючі засоби включають натрій-карбоксиметилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу і полівінілпіролідон. Емульгатори включають полісорбат 80 (TWEEN® 80). До засобів, що комплексоутворюють або хелатують іони металів, належить EDTA. Фармацевтичні носії також включають етиловий спирт, поліетиленгліколь і пропіленгліколь для наповнювачів, що змішуються з водою; і гідроксид натрію, хлористоводневу кислоту, лимонну кислоту або молочну кислоту для коригування pH.

Концентрацію фармацевтично активної сполуки коригують так, щоб ін'єкція забезпечувала ефективну кількість для одержання необхідного фармацевтичного ефекту. Точна доза залежить від віку, маси і стану пацієнта або тварини, як відомо у даній галузі.

Стандартні лікарські парентеральні препарати можуть бути упаковані в ампулу, флакон або шприц з голкою. Всі препарати для парентерального введення є стерильними, як відомо і як застосовується на практиці у даній галузі.

Як ілюстрація, внутрішньовенна або внутрішньоартеріальна інфузія стерильного водного розчину, що містить активну сполуку, є ефективним способом введення. Іншим варіантом здійснення є стерильний водний або масляний розчин, або суспензія, що містять активну речовину, які ін'єктують за необхідності для одержання необхідного фармакологічного ефекту.

Ін'єкційні засоби призначені для місцевого і системного введення. В одному варіанті терапевтично ефективну дозу готують так, щоб вона містила концентрацію, яка складає щонайменше від приблизно 0,1 % мас./мас. до приблизно 90 % мас./мас. або більше, у деяких варіантах більше 1 % мас./мас. активної сполуки відносно тканини (тканин), що піддається лікуванню.

Антитіло може бути суспендоване у тонкоподрібненій або іншій придатній формі. Форма одержаної суміші залежить від ряду факторів, включаючи передбачуваний спосіб введення і розчинність сполуки у вибраному носії або наповнювачі. Ефективна концентрація є достатньою для ослаблення симптомів стану і може бути визначена емпірично.

В інших варіантах фармацевтичні препарати являють собою ліофільно висушені порошки, які можна перерозчиняти для введення у вигляді розчинів, емульсій та інших сумішей. Їх також можна перетворювати і готувати у вигляді твердих речовин або гелів.

Ліофілізований порошок готують розчиненням антитіла, пропонованого у даному винаході, або його фармацевтично прийнятного похідного у придатному розчиннику. У деяких варіантах ліофілізований порошок є стерильним. Розчинник може містити ексципієнт, що підвищує стабільність, або інший фармакологічний компонент порошку або відновленого розчину, приготованого з порошку. Ексципієнти, які можна застосовувати, включають без обмеження декстрозу, сорбіт, фруктозу, кукурудзяний сироп, ксиліт, гліцерин, глюкозу, сахарозу або інший придатний засіб. Розчинник також може містити буфер, такий як цитрат, фосфат натрію або калію, або інший подібний буфер, відомий фахівцям у даній галузі, в одному варіанті, приблизно при нейтральному pH. Подальше стерильне фільтрування розчину з подальшою ліофілізацією у стандартних умовах, відомих фахівцям у даній галузі, дозволяє одержувати необхідний препарат. В одному варіанті одержаний розчин розподіляють по флаконах для ліофілізації. Кожний флакон буде містити одну дозу або декілька доз сполуки. Ліофілізований порошок можна зберігати з відповідних умов, таких як від приблизно 4 °C до кімнатної температури.

Перерозчинення такого ліофілізованого порошку у воді для ін'єкції дає препарат для застосування при парентеральному введенні. Для перерозчинення ліофілізований порошок додають у стерильну воду або інший придатний носій. Точна кількість залежить від вибраної сполуки. Така кількість може бути визначена емпірично.

Суміші для місцевого застосування одержують, як описано для локального і системного введення. Одержана суміш може являти собою розчин, суспензію, емульсію або тому подібне, і може бути приготована у вигляді кремів, гелів, мазей, емульсій, розчинів, еліксирів, примочок, суспензій, настоїв, паст, пін, аерозолів, засобів для спринцювання, спреїв, супозиторіїв, пов'язок, шкірних пластирів або будь-яких інших препаратів, придатних для місцевого введення.

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути приготовані у вигляді аерозолів для місцевого застосування, такого як за допомогою інгаляції (див., наприклад, патенти США № 4044126, 4414209 і 4364923, в яких описані аерозолі для доставки стероїду, застосовного для лікування запальних захворювань, особливо астми). Такі препарати для введення у дихальні шляхи можуть бути приготовані у формі аерозолію або розчину для розпилювача або у вигляді

порошку, що складається з мікрочастинок, для інсуфляції, окремо або у комбінації з інертним носієм, таким як лактоза. У такому випадку частинки препарату в одному варіанті будуть мати діаметр менше ніж 50 мікронів, в одному варіанті менше ніж 10 мікронів.

Сполуки можуть бути одержані для локального або місцевого застосування, наприклад, місцевого застосування на шкірі і мембранах слизової оболонки, наприклад, в очі, у формі гелів, кремів і примочок, і для застосування на очах або для інтрацистернального або інтраспінального застосування. Місцеве введення передбачається для трансдермальної доставки, а також для введення в очі або слизову оболонку, або для терапії шляхом інгаляції. Також можна вводити назальні розчини активної сполуки окремо або у комбінації з іншими фармацевтично прийнятними ексципієнтами.

Такі розчини, особливо розчини, призначені для офтальмологічного застосування, можуть бути приготовані у вигляді 0,01 %-10 % ізотонічних розчинів, pH приблизно 5-7, з використанням придатних солей.

Інші шляхи введення, такі як з використанням трансдермальних пластирів, включаючи іонтофоретичні і електрофоретичні пристрої, і ректальне введення, також передбачаються у даному винаході.

Трансдермальні пластири, включаючи іонтофоретичні і електрофоретичні пристрої, добре відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, такі пластири описані у патентах США № 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 і 5860957.

Наприклад, фармацевтичні дозовані форми для ректального введення являють собою ректальні супозиторії, капсули і таблетки для системного впливу. Ректальні супозиторії, використовувані у даному винаході, являють собою тверді тіла для введення у пряму кишку, які плавляться або розм'якшуються при температурі тіла, вивільняючи один або декілька фармакологічно або терапевтично активних інгредієнтів. Фармацевтично прийнятними речовинами, застосовуваними у ректальних супозиторіях, є основи або наповнювачі і засоби для підвищення точки плавлення. Приклади основ включають олію какао (theobroma oil), гліцерин-желатин, карбовакс (поліоксіетиленгліколь) і придатні суміші моно-, ди- і тригліцеридів жирних кислот. Можна використовувати комбінації різних основ. Засоби для підвищення точки плавлення супозиторіїв включають спермацет і віск. Ректальні супозиторії можуть бути одержані або способом пресування, або відливкою. Маса ректального супозиторію в одному варіанті складає приблизно 2-3 грами.

Таблетки і капсули для ректального введення можна одержати з використанням такої ж фармацевтично прийнятної речовини і таких же способів, як у випадку препаратів для перорального введення.

Антитіла та інші композиції, пропонувані у даному описі, також можуть бути приготовані для цілеспрямованого впливу на конкретну тканину, рецептор або іншу ділянку тіла суб'єкта, який піддається лікуванню. Багато з таких способів цілеспрямованого впливу добре відомі фахівцям у даній галузі. Всі такі способи цілеспрямованого впливу передбачаються у даному винаході для застосування з використанням пропонуваних композицій. Необмежувальні приклади способів цілеспрямованого впливу див., наприклад, у патентах США № 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 і 5709874. У деяких варіантах анти-hLIGHT-антитіла відповідно до винаходу цілеспрямовано вводять (або вводять іншим чином) в ободову кишку, наприклад, у пацієнтів, які мають IBD, або пацієнтів, для яких існує ризик розвитку IBD.

В одному варіанті суспензії ліпосом, включаючи націлені на тканини ліпосоми, такі як ліпосоми, націлені на пухлини, також можуть бути придатними як фармацевтично прийнятні носії. Ліпосоми можуть бути приготовані відповідно до способів, відомих фахівцям у даній галузі. Наприклад, препарати ліпосом можуть бути приготовані як описано у патенті США № 4522811. Коротко, ліпосоми, такі як багатошарові везикули (MLV), можуть бути приготовані сушінням яєчного фосфатидилхоліну і фосфатидилсерину головного мозку (молярне співвідношення 7:3) на внутрішній стороні флакона. Додають розчин сполуки, пропонуваної у даному описі, у фосфатно-сольовому буфері, що не містить двовалентних катіонів (PBS), і флакон струшують аж до диспергування ліпідної плівки. Одержані везикули промивають, щоб видалити неінкапсульовану сполуку, осаджують центрифугуванням і потім ресуспендують у PBS.

СПОСОБИ ВВЕДЕННЯ І ДОЗУВАННЯ

Даний винахід, крім того, стосується композицій, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу, для застосування з метою профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT (або його симптому).

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані композиції, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу, для застосування з метою профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, такого як IBD (наприклад, виразкового коліту або хвороби Крона), або його симптому. Симптоми IBD можуть проявлятися у діапазоні від слабких до тяжких і загалом залежать від частини кишкового тракту, залученого до захворювання. Приклади симптомів IBD включають в себе спастичні болі у животі та інші болі у животі, геморагічний пронос, невідкладні позиви до дефекації, підвищену температуру, втрату апетиту, втрату маси, анемію, стомлення і/або виразки на нижніх кінцівках, щиколотках, ікрах, стегнах і руках. Приклади кишкових ускладнень при IBD включають в себе профузну кровотечу з виразок, прорив або розрив кишки, звуження і непрохідність, нориці (аномальне проходження) і періанальне захворювання, токсичний мегаколон (наприклад, гостре необструктивне розширення ободової кишки) і/або злоякісне захворювання (наприклад, рак ободової кишки або тонкого кишечника). Приклади позакишкових ускладнень при IBD включають в себе артрит, шкірні стани, запалення очей, розлади печінки і нирок, і/або втрату кісткової маси. Будь-якій комбінації зазначених симптомів можна запобігати, її можна полегшувати, лікувати і/або ослаблювати, застосовуючи композиції і способи, запропоновані у даному винаході.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані композиції, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу для застосування з метою профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, такого як GVHD, або його симптому. GVHD звичайно виникає після алогенних або співпадаючих неспоріднених трансплантацій кісткового мозку (BMT).

У деяких варіантах GVHD являє собою гостре захворювання GVHD. Симптоми гострого GVHD можуть швидко з'являтися і можуть бути слабкими або тяжкими. У деяких випадках гостре GVHD розвивається приблизно протягом трьох місяців після трансплантації, наприклад, коли аналіз крові відновлюється після трансплантації. У деяких випадках гостре GVHD уражує шкіру, шлунково-кишковий тракт (GI) і/або печінку. Наприклад, у деяких пацієнтів гостре шкірне GVHD починається з висипу, наприклад, на долонях рук пацієнтів, підшвах ніг або на плечах. Однак, висип може широко поширитися і може бути сверблячим і хворобливим, і/або може покриватися пухирями і злущуватися. Гостре GVHD печінки впливає на нормальні функції печінки, наприклад, на ферменти печінки, які, у свою чергу, можуть викликати жовтяницю. Гостре GVHD печінки також може викликати здуття живота і болі у пацієнта, якщо печінка збільшується. Нарешті, симптоми гострого GVHD кишечника (або GVHD травної системи) можуть включати діарею, появу слизу і крові у калі, спастичні або абдомінальні болі, порушення травлення, нудоту і/або втрату апетиту. Інші загальні симптоми гострого GVHD можуть включати анемію, субфебрильну температуру і/або більшу чутливість до інфекцій. Будь-якій комбінації зазначених симптомів гострого GVHD можна запобігати, її можна полегшувати, лікувати і/або ослаблювати, застосовуючи композиції і способи, запропоновані у даному винаході.

В інших варіантах GVHD являє собою хронічне захворювання GVHD. Хронічне GVHD може проявлятися, починаючи приблизно з трьох місяців до приблизно року або більше після трансплантації. Хронічне GVHD може бути слабким або тяжким, і звичайно включає симптоми, подібні до симптомів при гострому GVHD. Хронічне GVHD може уражувати шкіру і травну систему, включаючи печінку, але також може впливати на інші органи та імунну систему (наприклад, робить пацієнтів більш схильними до інфекцій) і/або сполучні тканини. Симптоми хронічного GVHD шкіри включають висип, суху шкіру, стягнутість шкіри, шкірний свербіж, потемніння кольору шкіри, потовщення шкіри, і/або захворювання може уражувати волосся (наприклад, втрата волосся, поява сивини) або нігті (наприклад, тверді або ламкі нігті). Хронічне GVHD кишечника може уражувати травну систему, ротову порожнину, стравохід, вистілку шлунка і/або вистілку кишечника, і симптоми можуть включати діарею, сухість або біль у роті, хворобливе ковтання, низьке всмоктування поживних речовин у шлунку, здуття живота, спазми шлунка. Хронічне GVHD печінки може викликати ушкодження і рубцювання печінки (цироз). Хронічне GVHD очей може впливати на залози, які виробляють сльози, викликаючи сухість очей, печіння і хворобливість, або приводить до того, що пацієнт тяжко переносить яскраве світло. Хронічне GVHD легенів може викликати ускладнення подиху, свистячий подих, хронічний кашель і/або робить пацієнтів більш схильними до інфекцій грудей. Хронічне GVHD уражує сухожилля (наприклад, запалення), які зв'язують м'язи з кістками, викликаючи ускладнення при випрямленні або згинанні рук і ніг. Будь-якій комбінації зазначених симптомів хронічного GVHD можна запобігати, її можна полегшувати, лікувати і/або ослаблювати, застосовуючи композиції і способи, запропоновані у даному винаході.

7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і одну або декілька CDR2 VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR2 VL, зазначених у SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39 (тобто CDR2 VL з VL, зазначеної у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23). В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить одне або декілька антитіл, що містять одну або декілька CDR2 VH, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR2 VH, зазначених у SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24 (тобто CDR2 VH з VH, зазначеної у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і одну або декілька CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR3 VL, зазначеної у SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40 (тобто CDR3 VL з VL, зазначеної у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23).

В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить одне або декілька антитіл, що містять одну або декілька CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR3 VH, зазначених у SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25 (тобто CDR3 VH з VH, зазначеної у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і одну або декілька CDR1 VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR1 VL, зазначених у SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95 або 38 (тобто CDR1 VL з VL, зазначеної у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23). В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить одне або декілька антитіл, що містять одну або декілька CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR3 VH, зазначених у SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25 (тобто CDR3 VH з VH, зазначеної у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і одну або декілька CDR2 VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR2 VL, зазначених у SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39 (тобто CDR2 VL з VL, зазначеної у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23). В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить одне або декілька антитіл, що містять одну або декілька CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR3 VH, зазначених у SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25 (тобто CDR3 VH з VH, зазначеної у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), і одну або декілька CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR3 VL, зазначених у SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101, або 40 (тобто CDR3 VL з VL, зазначеної у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10, відповідно), або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23).

В одному варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить домен VH, що має амінокислотну послідовність домену VH, зазначеного у будь-якій з SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5, і/або домен VL, що має амінокислотну послідовність домену VL, зазначеного у будь-якій з SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91 або 10.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (а) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 1, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 82, 6 або 83; (b) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 2, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 7; (c) домен VH, що має амінокислотну

послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 3, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 8; (d) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 4, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 90, 9, 91 або 92; або (е) домен VH, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 5, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 10. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить домен VH, що має амінокислотну послідовність домену VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), і/або домен VL, що має амінокислотну послідовність домену VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (а) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1); (b) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13); (c) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63); (d) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19); або (е) домен VH, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23), і домен VL, що має амінокислотну послідовність антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR1 VH, що має амінокислотну послідовність CDR1 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR2 VH, що має амінокислотну послідовність CDR2 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR3 VH, що має амінокислотну послідовність CDR3 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5. У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR1 VH і/або CDR2 VH, і/або CDR3 VH, незалежно вибрані з CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, які зазначені у будь-якій з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5.

Даний винахід також стосується композиції для застосування з метою профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, що містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить одну або декілька CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL), що мають амінокислотну послідовність будь-якої з CDR VL (тобто CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL) антитіла E1, E13, E63, F19 і/або F23; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номер доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно); або будь-яку їх комбінацію.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло

містить (1) VH-домен, що має (a) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12 і/або 13, відповідно, (b) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 14, 15 і/або 16, відповідно, (c) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 17, 18 і/або 19, відповідно, (d) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 20, 21 і/або 22, відповідно, або (e) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 23, 24 і/або 24, відповідно, і/або (2) VL-домен, що має (a) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 84, 26 або 85; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 86, 27 або 87; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 88, 28 або 89, (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 29, 30 і/або 31, відповідно, (c) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 32, 33 і/або 34, відповідно, (d) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 93, 35, 94 або 95; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98, або (e) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 38, 39 і/або 40, відповідно. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (1) VH-домен, що має (a) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), (b) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), (c) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), (d) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), або (e) CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23), і/або (2) VL-домен, що має (a) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), (c) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), (d) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), або (e) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (1) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 11, 12 і/або 13, відповідно, і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 84, 26 або 85; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 86, 27 або 87; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 88, 28 або 89; (2) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 14, 15 і/або 16, відповідно, і (b) CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 29, 30 і/або 31, відповідно; (3) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 17, 18 і/або 19, відповідно, і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 32, 33 і/або 34, відповідно; (4) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3

VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 20, 21 і/або 22, відповідно, і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 93, 35, 94 або 95; CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; і/або CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність, зазначену у будь-якій з SEQ ID NO: 96, 36, 97 або 98; або (5) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 23, 24 і/або 24, відповідно, і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність, зазначену у SEQ ID NO: 38, 39 і/або 40, відповідно. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (1) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1), і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7729 (E1); (2) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13), і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7842 (E13); (3) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63), і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7818 (E63); (4) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19), і CDR1 VL, CDR2 VL, і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7819 (F19); або (5) (a) VH-домен, що має CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VH, CDR2 VH і/або CDR3 VH антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23) і (b) VL-домен, що має CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL, що мають амінокислотну послідовність CDR1 VL, CDR2 VL і/або CDR3 VL антитіла, що має номер доступу ATCC PTA-7728 (F23). Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність CDR1 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність CDR2 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). В іншому варіанті композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність CDR3 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно). У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR1 VL і/або CDR2 VL, і/або CDR3 VL, незалежно вибрані з CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, які зображені у будь-якій з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92

або 10; або областей антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

У деяких варіантах композиція для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить (1) домен або ланцюг VH, що має одну або декілька з наведених далі CDR (a) CDR1 VH, що має амінокислотну послідовність CDR1 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), (b) CDR2 VH, що має амінокислотну послідовність CDR2 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), або (c) CDR3 VH, що має амінокислотну послідовність CDR3 VH будь-якої з областей VH, зазначених у SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 або 5; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно); і/або (2) домен або ланцюг VL, що має одну або декілька з наведених далі CDR (a) CDR1 VL, що має амінокислотну послідовність CDR1 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), (b) CDR2 VL, що має амінокислотну послідовність CDR2 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно), і/або (c) CDR3 VL, що має амінокислотну послідовність CDR3 VL будь-якої з областей VL, зазначених у SEQ ID NO: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 або 10; або антитіла, що продукується гібридомою, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23, відповідно).

Даний винахід також стосується композиції для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, що містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить одну або декілька CDR VH і одну або декілька CDR VL, перерахованих у таблиці 1. Зокрема, винахід стосується композиції для застосування у випадку профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, що містить антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT, при цьому зазначене антитіло містить CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH, CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR3

VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR2 VH (SEQ ID NO: 12, 15, 18, 21 або 24), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); CDR1 VH (SEQ ID NO: 11, 14, 17, 20 або 23), CDR3 VH (SEQ ID NO: 13, 16, 19, 22 або 25), CDR1 VL (SEQ ID NO: 84, 26, 85, 29, 32, 35 або 38), CDR2 VL (SEQ ID NO: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 або 39) і CDR3 VL (SEQ ID NO: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 або 40); або будь-яку комбінацію CDR VH (SEQ ID NO: 11-25) і CDR VL (SEQ ID NO: 26-40), перерахованих у таблиці I. Відповідні CDR VH і CDR VL антитіл з номерами доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23), також можна використовувати у будь-якій з комбінацій, перерахованих вище. Переважно антитіло є повністю людським антитілом, таким як повністю людське моноклональне антитіло і/або антагоністичне hLIGHT-антитіло.

Як обговорюється більш докладно у даному описі, композицію відповідно до винаходу можна застосовувати або окремо, або у комбінації з іншими сполуками або композиціями. Крім того, антитіла можуть бути додатково рекомбінантно злиті з гетерологічним поліпептидом на N- або C-кінці, або хімічно кон'юговані (включаючи ковалентну і нековалентну кон'югацію) з поліпептидами або іншими композиціями. Наприклад, антитіла відповідно до даного винаходу можуть бути рекомбінантно злиті або кон'юговані з молекулами, застосовними як мітки в аналізах для реєстрації і ефекторних молекул, таких як гетерологічні поліпептиди, лікарські засоби, радіонукліди або токсини. Див., наприклад, публікації PCT WO 92/08495, WO 91/14438, WO 89/12624, патент США № 5314995 і EP 396387.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані способи зменшення або інгібування зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3 у суб'єкта (наприклад, людини), що включають в себе введення суб'єкту ефективної кількості антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, експресованим на клітинній поверхні або розчинним hLIGHT). В одному варіанті hLIGHT є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L. У деяких варіантах біологічна активність hLIGHT у суб'єкта, така як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, також знижується або інгібується.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані способи зменшення або інгібування біологічної активності hLIGHT, такої як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, у суб'єкта (наприклад, у людини), що включають в себе введення суб'єкту ефективною кількістю антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, експресований на клітинній

5 поверхні hLIGHT), при цьому біологічна активність hLIGHT знижується або інгібується антитілом. У деяких варіантах hLIGHT є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L.

В інших варіантах здійснення даного винаходу запропоновані способи зменшення або інгібування зв'язування hLIGHT з HVEM, LT β R і/або DcR3 у клітині, що має експресований на клітинній поверхні hLIGHT, що включають в себе контактування клітини з ефективною кількістю антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, експресованим на клітинній поверхні або розчинним hLIGHT), таким як поліпептид hLIGHT, фрагмент поліпептиду hLIGHT або епітоп hLIGHT. У деяких варіантах hLIGHT є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L. У деяких варіантах біологічна активність

10 hLIGHT, така як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, також знижується або інгібується у клітині.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу запропоновані способи зменшення або інгібування біологічної активності hLIGHT, такої як секреція CCL20, IL8 і/або RANTES, у клітині, що має експресований на клітинній поверхні рецептор hLIGHT (такий як HVEM, LT β R і/або Dc3R), що включають в себе контактування клітини з ефективною кількістю антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з поліпептидом hLIGHT (наприклад, експресованим на клітинній

20 поверхні або розчинним hLIGHT), при цьому біологічна активність hLIGHT знижується або інгібується антитілом. У деяких варіантах hLIGHT є SNP-варіантом hLIGHT, таким як 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L або 214K-32L.

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути використані, наприклад, для очищення, виявлення і цілеспрямованого впливу на антигени hLIGHT у діагностичних і терапевтичних

25 способах, як *in vitro*, так і *in vivo*. Наприклад, модифіковані антитіла знаходять застосування в імуноаналізах для якісного і кількісного вимірювання рівнів hLIGHT у біологічних зразках. Див., наприклад, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (публікація включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі).

Винахід також стосується способів профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання за допомогою введення суб'єкту ефективною кількістю антитіла або фармацевтичної композиції, що містить антитіло відповідно до винаходу. В одному аспекті антитіло по суті очищене (тобто по суті не містить речовин, які обмежують його дію або викликають небажані побічні ефекти). У переважних варіантах антитіло є повністю людським моноклональним антитілом, таким як повністю людське моноклональне

30 антагоністичне антитіло. Суб'єктом, якому проводять терапію, переважно є ссавець, такий як ссавець, який не є приматом (наприклад, корови, свині, коні, коти, собаки, щури і т.д.), або є приматом (наприклад, мавпи, такі як макаки-крабоді, або людина). У переважному варіанті суб'єктом є людина. В іншому переважному варіанті суб'єктом є новонароджена людина або новонароджена людина, яка народилася передчасно. В іншому варіанті суб'єктом є людина з hLIGHT-опосередкованим захворюванням.

40

Відомі різні системи доставки, і вони можуть бути використані для введення профілактичного або терапевтичного засобу (наприклад, антитіла відповідно до винаходу), включаючи без обмеження, інкапсулювання у ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули,

45 рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло, опосередкований рецепторами ендцитоз (див., наприклад, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)), конструкцію нуклеїнової кислоти у вигляді частини ретровірусного або іншого вектора і т.д. Способи введення профілактичного або терапевтичного засобу (наприклад, антитіла відповідно до винаходу), або фармацевтичної композиції включають без обмеження парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення і введення через слизову оболонку (наприклад, інтраназальний і пероральний шляхи). У конкретному варіанті профілактичний або терапевтичний засіб (наприклад, антитіло відповідно до даного винаходу) або фармацевтичну композицію вводять інтраназально, внутрішньом'язово, внутрішньовенно або підшкірно. Профілактичні або

50 терапевтичні засоби або композиції можна вводити будь-яким звичайним шляхом, наприклад, за допомогою інфузії або болюсної ін'єкції, за допомогою всмоктування через епітеліальну або шкірно-слизову вистілку (наприклад, слизову оболонку ротової порожнини, слизову оболонку носа, слизову оболонку прямої кишки і кишечника і т.д.), і вони можуть бути введені разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або локальним. Крім

60 того, можна застосовувати введення у легені, наприклад, використовуючи інгалятор або

розпилювач і препарат з агентом, що забезпечує утворення аерозолі. Див., наприклад, патенти США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078 і публікації PCT No. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, кожна з яких включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

У конкретному варіанті може бути необхідне введення профілактичного або терапевтичного засобу або фармацевтичної композиції відповідно до винаходу локально в область, яку необхідно піддати лікуванню. Це можна здійснювати, наприклад, але не як обмеження, локальною інфузією, місцевим введенням (наприклад, використовуючи інтраназальний спрей), ін'єкцією або використовуючи імплантат, при цьому зазначений імплантат складається з пористого, непористого або гелеподібного матеріалу, включаючи мембрани, такі як силіконові мембрани або волокна. Переважно при введенні антитіла відповідно до винаходу необхідно обережно використовувати матеріали, на яких не відбувається абсорбція антитіла.

В іншому варіанті профілактичний або терапевтичний засіб або композиція відповідно до винаходу можуть бути доставлені у везикулах, зокрема, ліпосомах (див. Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, pp. 317-327; див. там же).

В іншому варіанті профілактичний або терапевтичний засіб або композиція відповідно до винаходу можуть бути доставлені у системі контрольованого вивільнення або тривалого вивільнення. В одному варіанті можна використовувати насос, щоб досягти контрольованого або тривалого вивільнення (див. Langer, вище; Sefton, 1987, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14: 20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). В іншому варіанті можна використовувати полімерні матеріали для одержання контрольованого або тривалого вивільнення профілактичного або терапевтичного засобу (наприклад, антитіл відповідно до винаходу), або композиції відповідно до винаходу (див., наприклад, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; див. також Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105); патент США № 5679377, патент США № 5916597, патент США № 5912015, патент США № 5989463, патент США № 5128326, публікацію PCT No. WO 99/15154 і публікацію PCT No. WO 99/20253. Приклади полімерів, використовуваних у препаратах тривалого вивільнення, включають без обмеження, полі(2-гідроксietилметакрилат), полі(метилметакрилат), полі(акрилову кислоту), співполімер полі(етилен-вінілацетат), полі(метакрилову кислоту), полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полі(вініловий спирт), поліакриламід, полі(етиленгліколь), полілактиди (PLA), співполімери полі(лактид-гліколід) (PLGA) і складні поліортоєфіри. У переважному варіанті полімер, використовуваний у препараті тривалого вивільнення, є інертним, таким, що не містить домішок, що вилуговуються, стабільним при зберіганні, стерильним і біорозкладаним. У ще одному варіанті система контрольованого або тривалого вивільнення може бути вміщена поблизу терапевтичної мішені, тобто носових ходах або легенях, при цьому потрібна тільки частина системної дози (див., наприклад, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, вище, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Системи контрольованого вивільнення обговорюються в огляді Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Можна використовувати будь-який спосіб, відомий фахівцям у даній галузі, для одержання препаратів уповільненого вивільнення, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу. Див., наприклад, патент США № 4526938, публікацію PCT WO 91/05548, публікацію PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application, " *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, і Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery, " *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, кожна публікація включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

У конкретному варіанті, у тому випадку, коли композиція відповідно до винаходу являє собою нуклеїнову кислоту, що кодує профілактичний або терапевтичний засіб (наприклад, антитіло відповідно до винаходу), нуклеїнова кислота може бути введена *in vivo*, щоб стимулювати експресію профілактичного або терапевтичного засобу, що кодується нею, за допомогою конструювання її у вигляді частини придатного експресуючого вектора нуклеїнової

кислоти і введення його так, щоб він став внутрішньоклітинним, наприклад, використовуючи ретровірусний вектор (див. патент США № 4980286), або за допомогою прямої ін'єкції, або використовуючи бомбардування мікрочастинками (наприклад, за допомогою генного пістолета; Biolistic, Dupont), або покриваючи ліпідами, або за допомогою рецепторів клітинної поверхні або трансфікуючих агентів, або за допомогою введення у зв'язку з гомеобокс-подібним пептидом, який, як відомо, надходить в ядро (див., наприклад, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868) і т.д. Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно і введена у ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

У конкретному варіанті композиція відповідно до винаходу містить одне, два або більше антитіл відповідно до винаходу. В іншому варіанті композиція відповідно до винаходу містить одне, два або більше антитіл відповідно до винаходу та інший профілактичний або терапевтичний засіб, відмінний від антитіла відповідно до винаходу. Переважно, засоби є застосовними, як відомо, або застосовувалися або застосовуються у наш час для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT. Крім профілактичного або терапевтичного засобу, композиції відповідно до винаходу також можуть містити носії.

Композиції відповідно до винаходу включають нефасовані композиції лікарських засобів, застосовувані у виробництві фармацевтичних композицій (наприклад, композицій, які придатні для введення суб'єкту або пацієнту), які можна використовувати для одержання стандартних лікарських форм. У переважному варіанті композиція відповідно до винаходу являє собою фармацевтичну композицію. Такі композиції містять профілактично або терапевтично ефективну кількість одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів (наприклад, антитіла відповідно до винаходу або іншого профілактичного або терапевтичного засобу) і фармацевтично прийнятний носій. Переважно фармацевтичні композиції готують так, щоб вони відповідали шляху введення суб'єкту.

У конкретному варіанті термін "носій" стосується розріджувача, ад'юванта (наприклад, ад'юванта Фрейнда (повного і неповного)), ексципієнта або наповнювача, з яким вводять терапевтичний засіб. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою стерильні рідини, такі як вода або масла, включаючи масла, одержувані з нафти, масла тваринного, синтетичного походження або олії рослинного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія і тому подібне. Вода є переважним носієм у тому випадку, коли фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно. Розчини солі і водні розчини декстрози і гліцерину також можуть бути використані як рідкі носії, особливо для ін'єкційних розчинів. Придатні фармацевтичні ексципієнти включають крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол і тому подібне. За необхідності композиція також може містити мінорні кількості зволожувачів або емульгаторів, або засобів для рН-буферів. Такі композиції можуть мати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пігулок, капсул, порошків, препаратів тривалого вивільнення і тому подібних. Пероральний препарат може містити стандартні носії, такі як фармацевтично чисті маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію і т.д. Приклади придатних фармацевтичних носіїв описані у Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Такі композиції будуть містити профілактично або терапевтично ефективну кількість антитіла, переважно в очищеній формі, разом з придатною кількістю носія, щоб одержати форму для правильного введення пацієнту. Препарат повинен підходити для способу введення.

У переважному варіанті композицію готують звичайними способами у вигляді фармацевтичної композиції, призначеної для внутрішньовенного введення людині. Звичайно композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини у стерильному ізотонічному водному буфері. За необхідності композиція також може містити солюбілізуючий засіб і місцевий анестетик, такий як лігнокаїн, щоб полегшити біль у місці ін'єкції. Однак, такі композиції можна вводити й іншим шляхом, відмінним від внутрішньовенного.

Загалом, інгредієнти композицій відповідно до винаходу постачають або окремо, або змішаними разом у стандартній лікарській формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або концентрату, що не містить води, у герметично закритій ємності, такий як ампула, або у саше з вказівкою кількості активного засобу. У тому випадку, коли композицію необхідно вводити за допомогою інфузії, вона може відпускатися разом з флаконами для інфузії, що містять стерильну фармацевтично чисту воду або фізіологічний розчин солі. При введенні композиції шляхом ін'єкції може додаватися ампула зі стерильною водою для ін'єкції або фізіологічним розчином, щоб інгредієнти можна було змішати перед введенням.

У винаході також передбачено, що антитіло відповідно до винаходу упаковують у герметично закриту ємність, таку як ампула або саше, на якій зазначена кількості антитіла. В одному варіанті антитіло постачають у вигляді сухого стерилізованого ліофілізованого порошку або концентрату, що не містить води, у герметично закритій ємності, і його можна перерозчинити, наприклад, у воді або фізіологічному розчині у відповідній концентрації для введення суб'єкту. Переважно антитіло постачають у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку у герметично закритій ємності у стандартній дозі, що складає щонайменше 0,1 мг, щонайменше 0,5 мг, щонайменше 1 мг, щонайменше 2 мг або щонайменше 3 мг, і більш переважно щонайменше 5 мг, щонайменше 10 мг, щонайменше 15 мг, щонайменше 25 мг, щонайменше 30 мг, щонайменше 35 мг, щонайменше 45 мг, щонайменше 50 мг, щонайменше 60 мг, щонайменше 75 мг, щонайменше 80 мг, щонайменше 85 мг, щонайменше 90 мг, щонайменше 95 мг або щонайменше 100 мг. Ліофілізоване антитіло можна зберігати при температурі від 2 до 8 °C у вихідній ємності, і антитіло можна вводити у межах 12 годин, переважно у межах 6 годин, у межах 5 годин, у межах 3 годин або у межах 1 години після перерозчинення. В альтернативному варіанті антитіло постачають у рідкій формі у герметично закритій ємності, на якій зазначена кількість і концентрація антитіла. Переважно рідку форму антитіла постачають у герметично закритій ємності у концентрації, що складає щонайменше 0,1 мг/мл, щонайменше 0,5 мг/мл або щонайменше 1 мг/мл, і більш переважно щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 30 мг/мл, щонайменше 40 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 60 мг/мл, щонайменше 70 мг/мл, щонайменше 80 мг/мл, щонайменше 90 мг/мл або щонайменше 100 мг/мл.

Композиції відповідно до винаходу можна готувати у вигляді нейтральної або сольової форми. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з аніонами, такими як аніони, одержані з хлористоводневої, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот і т.д., і солі, утворені з катіонами, такими як катіони, одержані з гідроксидів натрію, калію, амонію, кальцію, заліза, з ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т.д.

Кількість профілактичного або терапевтичного засобу (наприклад, антитіла відповідно до винаходу) або композиції відповідно до винаходу, що буде ефективною для запобігання, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT, можна визначити стандартними клінічними способами.

Відповідно, дозу антитіла або композиції, що дає титр у сироватці, що складає від приблизно 0,1 мкг/мл до приблизно 450 мкг/мл, і у деяких варіантах щонайменше 0,1 мкг/мл, щонайменше 0,2 мкг/мл, щонайменше 0,4 мкг/мл, щонайменше 0,5 мкг/мл, щонайменше 0,6 мкг/мл, щонайменше 0,8 мкг/мл, щонайменше 1 мкг/мл, щонайменше 1,5 мкг/мл, і переважно щонайменше 2 мкг/мл, щонайменше 5 мкг/мл, щонайменше 10 мкг/мл, щонайменше 15 мкг/мл, щонайменше 20 мкг/мл, щонайменше 25 мкг/мл, щонайменше 30 мкг/мл, щонайменше 35 мкг/мл, щонайменше 40 мкг/мл, щонайменше 50 мкг/мл, щонайменше 75 мкг/мл, щонайменше 100 мкг/мл, щонайменше 125 мкг/мл, щонайменше 150 мкг/мл, щонайменше 200 мкг/мл, щонайменше 250 мкг/мл, щонайменше 300 мкг/мл, щонайменше 350 мкг/мл, щонайменше 400 мкг/мл або щонайменше 450 мкг/мл можна вводити людині для запобігання, надання допомоги, лікування і/або ослаблення захворювання, опосередкованого hLIGHT. Крім того, необов'язково можна використовувати аналізи *in vitro*, що допомагають ідентифікувати оптимальні діапазони доз. Точна доза, використовувана у препараті, також буде залежати від шляху введення і тяжкості захворювання, опосередкованого hLIGHT, і рішення має визначатися думкою лікаря і конкретними обставинами у випадку кожного пацієнта.

Ефективні дози можна екстраполювати на основі кривих залежності "доза-відповідь", одержаних у системах тестування *in vitro* або на тваринних моделях.

У випадку антитіл відповідно до винаходу доза, що вводиться пацієнту, звичайно складає від 0,1 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла пацієнта. У деяких варіантах доза, що вводиться пацієнту, складає від приблизно 1 мг/кг до приблизно 75 мг/кг маси тіла пацієнта. Переважно доза, що вводиться пацієнту, складає від 1 мг/кг до 20 мг/кг маси тіла пацієнта, більш переважно від 1 мг/кг до 5 мг/кг маси тіла пацієнта. Загалом, антитіла людини мають більш тривалий час напівжиття в організмі людини, ніж антитіла інших видів внаслідок імунної відповіді на чужорідні поліпептиди. Відповідно, часто можливі більш низькі дози і менш часте введення. Крім того, доза і частота введення антитіл відповідно до винаходу можуть бути знижені за рахунок посилення поглинання і проникнення антитіл у тканині за допомогою модифікацій, наприклад, таких як ліпідизація.

В одному варіанті приблизно 100 мг/кг або менше, приблизно 75 мг/кг або менше, приблизно 50 мг/кг або менше, приблизно 25 мг/кг або менше, приблизно 10 мг/кг або менше, приблизно

5 мг/кг або менше, приблизно 1 мг/кг або менше, приблизно 0,5 мг/кг або менше або приблизно 0,1 мг/кг або менше антитіла відповідно до винаходу вводять 5 разів, 4 рази, 3 рази, 2 рази або переважно 1 раз для лікування hLIGHT-опосередкованого захворювання. У деяких варіантах антитіло відповідно до винаходу вводять приблизно 1-12 разів, при цьому дози за необхідності можна вводити, наприклад, щотижня, раз на два тижні, щомісяця, один раз на два місяці, один раз на три місяці і т.д., як визначає лікуючий лікар. У деяких варіантах більш низьку дозу (наприклад, 1-15 мг/кг) можна вводити більш часто (наприклад, 3-6 разів). В інших варіантах більш високу дозу (наприклад, 25-100 мг/кг) можна вводити менш часто (наприклад, 1-3 рази). Однак, як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, інші дозовані кількості і схеми дозування можна легко визначити, і вони входять в обсяг винаходу.

У конкретному варіанті приблизно 100 мг/кг, приблизно 75 мг/кг або менше, приблизно 50 мг/кг або менше, приблизно 25 мг/кг або менше, приблизно 10 мг/кг або менше, приблизно 5 мг/кг або менше, приблизно 1 мг/кг або менше, приблизно 0,5 мг/кг або менше, приблизно 0,1 мг/кг або менше антитіла відповідно до винаходу у препараті тривалого вивільнення вводять суб'єкту, переважно людині, для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання. В іншому конкретному варіанті приблизно 100 мг/кг, приблизно 75 мг/кг або менше, приблизно 50 мг/кг або менше, приблизно 25 мг/кг або менше, приблизно 10 мг/кг або менше, приблизно 5 мг/кг або менше, приблизно 1 мг/кг або менше, приблизно 0,5 мг/кг або менше або приблизно 0,1 мг/кг або менше болюсу антитіла відповідно до винаходу у препараті не тривалого вивільнення вводять суб'єкту, переважно людині, для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання, і через визначений період часу зазначеному пацієнту вводять приблизно 100 мг/кг, приблизно 75 мг/кг або менше, приблизно 50 мг/кг або менше, приблизно 25 мг/кг або менше, приблизно 10 мг/кг або менше, приблизно 5 мг/кг або менше, приблизно 1 мг/кг або менше, приблизно 0,5 мг/кг або менше або приблизно 0,1 мг/кг або менше антитіла відповідно до винаходу у препараті уповільненого вивільнення (наприклад, інтраназально або внутрішньом'язово) два, три або чотири рази (переважно один раз). Відповідно до даного варіанту, визначений період часу може складати від 1 до 5 днів, тиждень, два тижні або місяць.

У деяких варіантах пацієнту вводять однократну дозу антитіла відповідно до винаходу для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять разів, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять, вісімнадцять, дев'ятнадцять, двадцять, двадцять один, двадцять два, двадцять три, двадцять чотири, двадцять п'ять або двадцять шість разів з двотижневими (наприклад, близько 14 днів) інтервалами протягом року, при цьому дозу вибирають з групи, що складається з приблизно 0,1 мг/кг, приблизно 0,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 55 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 65 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 75 мг/кг, приблизно 80 мг/кг, приблизно 85 мг/кг, приблизно 90 мг/кг, приблизно 95 мг/кг, приблизно 100 мг/кг або їх комбінацію (тобто у різні місяці дози можуть бути ідентичними або не ідентичними).

В іншому варіанті пацієнту вводять однократну дозу антитіла відповідно до винаходу для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять або дванадцять разів приблизно з місячними (наприклад, близько 30 днів) інтервалами протягом року, при цьому дозу вибирають з групи, що складається з приблизно 0,1 мг/кг, приблизно 0,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 55 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 65 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 75 мг/кг, приблизно 80 мг/кг, приблизно 85 мг/кг, приблизно 90 мг/кг, приблизно 95 мг/кг, приблизно 100 мг/кг або їх комбінацію (тобто у різні місяці дози можуть бути ідентичними або не ідентичними).

В одному варіанті пацієнту вводять однократну дозу антитіла відповідно до винаходу для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання два, три, чотири, п'ять або шість разів приблизно з двомісячними (наприклад, близько 60 днів) інтервалами протягом року, при цьому дозу вибирають з групи, що складається з приблизно 0,1 мг/кг, приблизно 0,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 55 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 65 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 75 мг/кг,

приблизно 80 мг/кг, приблизно 85 мг/кг, приблизно 90 мг/кг, приблизно 95 мг/кг, приблизно 100 мг/кг або їх комбінацію (тобто дози кожні два місяці можуть бути ідентичними або не ідентичними).

У деяких варіантах пацієнту вводять однократну дозу антитіла відповідно до винаходу для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання два, три або чотири рази приблизно з тримісячними (наприклад, близько 120 днів) інтервалами протягом року, при цьому дозу вибирають з групи, що складається з приблизно 0,1 мг/кг, приблизно 0,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 55 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 65 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 75 мг/кг, приблизно 80 мг/кг, приблизно 85 мг/кг, приблизно 90 мг/кг, приблизно 95 мг/кг, приблизно 100 мг/кг або їх комбінацію (тобто у різні місяці дози можуть бути ідентичними або не ідентичними).

У деяких варіантах шлях введення пацієнту дози антитіла відповідно до винаходу є інтраназальним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним або являє собою їх комбінацію, але також прийнятні інші шляхи, описані у даній публікації. Окремі дози можна вводити ідентичним шляхом введення або різними шляхами. У деяких варіантах антитіло відповідно до винаходу можна вводити декількома шляхами введення одночасно або після інших доз того самого або іншого антитіла відповідно до винаходу.

У деяких варіантах антитіла відповідно до винаходу вводять суб'єкту профілактично або терапевтично. Антитіла відповідно до винаходу можна вводити суб'єкту профілактично або терапевтично для профілактики, зменшення або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання або його симптому.

ГЕННА ТЕРАПІЯ

У конкретному варіанті нуклеїнові кислоти, що містять послідовності, які кодують антитіла відповідно до винаходу або їх функціональні похідні, вводять для профілактики, надання допомоги, лікування і/або ослаблення hLIGHT-опосередкованого захворювання способом генної терапії. Генна терапія належить до терапії, здійснюваної за допомогою введення суб'єкту експресованої або такої, що експресується, нуклеїнової кислоти. В одному варіанті здійснення винаходу нуклеїнові кислоти продукують антитіло, що кодується, і антитіло опосередковує профілактичний або терапевтичний ефект.

Будь-який зі способів генної терапії, наявних у даній галузі, можна застосовувати відповідно до даного винаходу. Приклади способів описані нижче.

Загальний огляд способів генної терапії див. у Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932 і Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Способи, широко відомі у галузі технології рекомбінантної ДНК, які можна використовувати, описані в Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, NY (1993); і Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

У переважному варіанті композиція відповідно до винаходу містить нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло відповідно до винаходу, при цьому зазначені нуклеїнові кислоти є частиною експресуючого вектора, що експресує антитіло або химерні білки, або їх важкі, або легкі ланцюги у придатному хазяїні. Зокрема, такі нуклеїнові кислоти мають промотори, переважно гетерологічні промотори, функціонально зв'язані з областю, що кодує антитіло, при цьому зазначений промотор є таким, що індукується, або конститутивним, і необов'язково тканиноспецифічним. В іншому конкретному варіанті використовують молекули нуклеїнових кислот, в яких послідовності, що кодують антитіло, і будь-які інші необхідні послідовності фланковані областями, які стимулюють гомологічну рекомбінацію у необхідній ділянці геному, тим самим забезпечуючи внутрішньохромосомну експресію нуклеїнових кислот, що кодують антитіло (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438). У деяких варіантах експресованою молекулою антитіла є одноланцюжкове антитіло; альтернативно, послідовності нуклеїнових кислот містять послідовності, що кодують і важкий, і легкий ланцюги антитіла або їх фрагменти.

Доставка нуклеїнових кислот в організм суб'єкта може бути або безпосередньою, і у такому випадку суб'єкта безпосередньо піддають впливу нуклеїнової кислоти або векторів, що несуть нуклеїнові кислоти, або опосередкованою, і у такому випадку клітини спочатку трансформують нуклеїновими кислотами *in vitro*, потім їх трансплантують в організм суб'єкта. Такі способи відомі, відповідно, як генна терапія *in vivo* або *ex vivo*.

У конкретному варіанті послідовності нуклеїнових кислот безпосередньо вводять *in vivo*, при цьому послідовності експресуються, даючи продукт, що кодується. Це можна здійснити будь-яким з множини способів, відомих у даній галузі, наприклад, конструюючи їх у вигляді частини придатного експресуючого вектора нуклеїнових кислот і введення вектора так, щоб послідовності стали внутрішньоклітинними, наприклад, за допомогою інфекції з використанням дефектних або атенуованих ретровірусів або інших вірусних векторів (див. патент США № 4980286), або прямою ін'єкцією "голої" ДНК, або з використанням бомбардування мікрочастинками (наприклад, генним пістолетом; Biolistic, Dupont), або з використанням покривання ліпідами або за допомогою рецепторів клітинної поверхні, або з використанням трансфікуючих агентів, інкапсулювання у ліпосоми, мікрочастинки або мікрокапсули, або їх введенням у зв'язку з пептидом, який, як відомо, проникає в ядро, введенням у зв'язку з лігандом, який піддається опосередкованому рецепторами ендоцитозу (див., наприклад, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432) (такий спосіб може бути застосовний стосовно типів клітин-мішеней, які специфічно експресують рецептори) і т.д. В іншому варіанті можуть бути утворені комплекси нуклеїнова кислота-ліганд, в яких ліганд містить вірусний білок, що зливає, для руйнування ендосом, що дозволяє нуклеїновій кислоті уникнути лізосомного руйнування. У ще одному варіанті нуклеїнова кислота може бути цілеспрямовано введена *in vivo* для поглинання і експресії специфічними клітинами за допомогою таргетингу конкретного рецептора (див., наприклад, публікації PCT WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316, WO 93/14188, WO 93/20221). Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена всередину клітини і введена у ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; i Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435-438).

У конкретному варіанті використовують вірусні вектори, які містять послідовності нуклеїнових кислот, що кодують антитіло відповідно до винаходу. Наприклад, можна використовувати ретровірусний вектор (див. Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599). Такі ретровірусні вектори містять компоненти, необхідні для правильного упакування вірусного геному та інтеграції у ДНК клітини-хазяїна. Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують антитіло, яке необхідно використовувати у генній терапії, можуть бути клоновані в одному або декількох векторах, які полегшують доставку гена в організм суб'єкта. Більш докладний опис ретровірусних векторів можна знайти у Boesen et al., 1994, Biotherapy 6: 291-302, де описане застосування ретровірусного вектора для доставки гена *mdr 1* у гематопоетичні стовбурові клітини, щоб одержати стовбурові клітини, більш резистентні до хіміотерапії. Інші публікації, що ілюструють застосування ретровірусних векторів у генній терапії: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93: 644-651; Klein et al., 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; i Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114.

Іншими векторами, які можна використовувати у генній терапії, є аденовіруси. Аденовіруси є особливо привабливими носіями для доставки генів в епітелій дихальних шляхів. Аденовіруси у природі інфікують епітелій дихальних шляхів, де вони викликають не тяжке захворювання. Іншими мішенями для систем доставки, що базуються на аденовірусах, є печінка, центральна нервова система, ендотеліальні клітини і м'язи. Аденовіруси мають перевагу, оскільки здатні інфікувати клітини, що не діляться. У Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 наведений огляд генної терапії, що базується на аденовірусах. У Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5: 3-10 показане застосування аденовірусних векторів для перенесення генів в епітелій дихальних шляхів макак-резус. Інші випадки застосування аденовірусів у генній терапії можна знайти у Rosenfeld et al., 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68: 143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91: 225-234; публікації PCT WO 94/12649; i Wang et al., 1995, Gene Therapy 2: 775-783. У переважному варіанті використовують аденовірусні вектори.

Також був запропонований аденоасоційований вірус (AAV) для застосування у генній терапії (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300; i патент США № 5436146).

Інша методика генної терапії полягає у перенесенні гена у клітини у культурі тканини такими способами, як електропорація, ліпофекція, опосередкована фосфатом кальцію трансфекція або вірусна інфекція. Звичайно спосіб перенесення включає в себе перенесення маркера, що селектується, у клітині. Потім клітини поміщають в умови селекції, щоб виділити такі клітини, які захопили і експресують перенесений ген. Потім такі клітини доставляють в організм суб'єкта.

У зазначеному варіанті нуклеїнову кислоту вводять у клітину до введення *in vivo* одержаної рекомбінантної клітини. Таке введення можна здійснити будь-яким способом, відомих у даній галузі, включаючи без обмеження трансфекцію, електропорацію, мікроін'єкцію, інфікування

вірусним вектором або вектором, що базується на бактеріофагу, що містить послідовності нуклеїнових кислот, злиття клітин, опосередковане хромосомами перенесення генів, опосередковане мікроклітинами перенесення генів, злиття сферопластів і т.д. У даній галузі відомі численні способи введення чужорідних генів у клітини (див., наприклад, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Clin. Pharma. Ther. 29: 69-92 (1985)), і їх можна використовувати відповідно до даного винаходу, за умови, що необхідні для розвитку і фізіології функції реципієнтних клітин не порушуються. Спосіб повинен забезпечувати стабільне перенесення нуклеїнової кислоти у клітину, щоб нуклеїнова кислота могла експресуватися у клітині і переважно успадковуватися і експресуватися потомством клітини.

Одержані рекомбінантні клітини можуть бути доставлені в організм суб'єкта різними способами, відомими у даній галузі. Рекомбінантні клітини крові (наприклад, гематопоетичні стовбурові клітини або клітини-попередники) переважно вводять внутрішньовенно. Кількість клітин, передбачених для застосування, залежить від необхідного ефекту, стану пацієнта і т.д. і може бути визначена фахівцем у даній галузі.

Клітини, в які нуклеїнова кислота може бути введена з метою генної терапії, включають будь-який необхідний, доступний тип клітин і включають без обмеження епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, кератиноцити, фібробласти, м'язові клітини, гепатоцити; клітини крові, такі як Т-лімфоцити, В-лімфоцити, моноцити, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, мегакаріоцити, гранулоцити; різні стовбурові клітини або клітини-попередники, зокрема, гематопоетичні стовбурові клітини або клітини-попередники, наприклад, клітини, одержані з кісткового мозку, пуповинної крові, периферичної крові, печінки плоду і т.д.

У переважному варіанті клітина, використовувана для генної терапії, є аутологічною для суб'єкта.

У варіанті, в якому у генній терапії використовують рекомбінантні клітини, послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло відповідно до винаходу, вводять у клітини, таким чином вони експресуються клітинами або їх потомством, і потім рекомбінантні клітини вводять *in vivo* для одержання терапевтичного ефекту. У конкретному варіанті використовують стовбурові клітини або клітини-попередники. Будь-які стовбурові клітини і/або клітини-попередники, які можна виділяти і підтримувати *in vitro*, потенційно можуть бути використані відповідно до даного варіанту здійснення винаходу (див., наприклад, публікацію PCT WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A: 229; і Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61: 771).

У конкретному варіанті нуклеїнова кислота, що вводиться з метою генної терапії, містить промотор, що індукується, оперативно зв'язаний з кодуючою областю, таким чином експресію нуклеїнової кислоти можна регулювати, контролюючи присутність або відсутність відповідного індуктора транскрипції.

ДІАГНОСТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ АНТИТІЛ

Мічені антитіла відповідно до винаходу і їх похідні та аналоги, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, можуть бути використані з діагностичною метою для виявлення, діагностики або моніторингу hLIGHT-опосередкованого захворювання. Винахід стосується способів виявлення захворювання, опосередкованого hLIGHT, що включає в себе: (а) аналіз експресії антигену hLIGHT у клітинах або зразку тканини суб'єкта з використанням одного або декількох антитіл відповідно до винаходу, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT; і (b) порівняння рівня антигену hLIGHT з рівнем у контролі, наприклад, рівнями у зразках нормальних тканин (наприклад, від пацієнта, який не має hLIGHT-опосередкованого захворювання, або від того ж пацієнта до появи захворювання), при цьому збільшення аналізованого рівня антигену hLIGHT у порівнянні з контрольним рівнем антигену hLIGHT є показником захворювання, опосередкованого hLIGHT.

Винахід стосується діагностичного аналізу для діагностики hLIGHT-опосередкованого захворювання, що включає в себе: (а) аналіз рівня антигену hLIGHT у клітинах або у зразку тканини індивідуума з використанням одного або декількох антитіл відповідно до винаходу, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT; і (b) порівняння рівня антигену hLIGHT з контрольним рівнем, наприклад, рівнями у зразках нормальної тканини, при цьому збільшення рівня аналізованого антигену hLIGHT у порівнянні з контрольним рівнем антигену hLIGHT є показником захворювання, опосередкованого hLIGHT. Більш визначений діагноз захворювання, опосередкованого hLIGHT, може дозволяти медикам використовувати превентивні заходи або агресивну тактику лікування раніше, тим самим запобігаючи розвитку або подальшому прогресуванню hLIGHT-опосередкованого захворювання.

Антитіла відповідно до винаходу можна застосовувати для аналізу рівнів антигену hLIGHT у біологічному зразку з використанням класичних імуногістологічних способів, які описані у даній публікації або відомі фахівцям у даній галузі (наприклад, див. Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985; і Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Інші способи, що базуються на антитілах, застосовні для виявлення експресії генів білків, включають імуноаналізи, такі як твердофазовий імуноферментний аналіз (ELISA) і радіоімуноаналіз (RIA). Придатні для аналізу антитіл мітки відомі у даній галузі і включають ферментні мітки, такі як глюкозооксидаза; радіоізотопи, такі як йод (^{125}I , ^{121}I), вуглець (^{14}C), сірка (^{35}S), тритій (^3H), індій (^{121}In) і технецій (^{99}Tc); люмінесцентні мітки, такі як люмінол; і флуоресціюючі мітки, такі як флуоресцеїн і родамін, і біотин.

Один аспект винаходу стосується виявлення і діагностики hLIGHT-опосередкованого захворювання у людини. В одному варіанті діагностика полягає у наступному: а) введення (наприклад, парентерально, підшкірно або внутрішньочеревинно) суб'єкту ефективної кількості міченого антитіла, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT; б) очікування протягом визначеного інтервалу часу після введення, щоб дати можливість міченому антитілу переважно сконцентруватися у тих місцях в організмі суб'єкта, в яких експресується антиген hLIGHT (і щоб незв'язані мічені молекули були виведені до досягнення фонового рівня); с) визначення фонового рівня; і d) виявлення міченого антитіла у суб'єкта, при цьому виявлення міченого антитіла вище фонового рівня вказує на те, що суб'єкт має hLIGHT-опосередковане захворювання. Фоногий рівень можна визначити різними способами, включаючи порівняння кількості виявленої міченої молекули зі стандартним значенням, визначеним раніше для конкретної системи.

Фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що розмір суб'єкта і використовувана система візуалізації будуть визначати кількість візуалізуючого компонента, необхідного для одержання діагностичних зображень. У випадку компонента, що є радіоактивним ізотопом, для людини кількість ін'єктованої радіоактивності звичайно складає від приблизно 5 до 20 мілікорі ^{99}Tc . Потім мічене антитіло переважно буде накопичуватися у тому місці, де знаходяться клітини, які містять конкретний білок. Візуалізація пухлин *in vivo* описана у S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

В залежності від декількох змінних, включаючи тип використовуваної мітки і спосіб введення, інтервал часу після введення для того, щоб дозволити міченому антитілу переважно сконцентруватися у визначених місцях в організмі суб'єкта, і щоб незв'язане мічене антитіло було виведене до досягнення фонового рівня, складає від 6 до 48 годин або від 6 до 24 годин, або від 6 до 12 годин. В іншому варіанті інтервал часу після введення складає від 5 до 20 днів або від 5 до 10 днів.

В одному варіанті моніторинг захворювання, опосередкованого hLIGHT, здійснюють повторюючи спосіб діагностики hLIGHT-опосередкованого захворювання, наприклад, через місяць після встановлення початкового діагнозу, через шість місяців після встановлення початкового діагнозу, через рік після встановлення початкового діагнозу і т.д.

Наявність міченої молекули в організмі суб'єкта можна визначити, використовуючи способи, відомі у даній галузі для сканування *in vivo*. Такі способи залежать від типу використовуваної мітки. Фахівці зможуть визначити придатний спосіб реєстрації конкретної мітки. Способи і пристрої, які можна застосовувати у діагностичних способах відповідно до винаходу, включають без обмеження комп'ютерну томографію (СТ), сканування всього тіла, таке як позитронно-емісійна томографія (PET), магнітно-резонансна візуалізація (MRI) і сонографія.

У конкретному варіанті молекулу мітять радіоактивним ізотопом і виявляють в організмі пацієнта, використовуючи чутливе до випромінювання хірургічне обладнання (Thurston et al., патент США № 5441050). В іншому варіанті молекулу мітять флуоресціюючою сполукою і виявляють в організмі пацієнта, використовуючи чутливе до флуоресценції обладнання для сканування. В іншому варіанті молекулу мітять позитронно-активним металом і виявляють в організмі пацієнта, використовуючи позитронно-емісійну томографію. У ще одному варіанті молекулу мітять парамагнітною міткою і виявляють в організмі пацієнта, використовуючи магнітно-резонансну візуалізацію (MRI).

СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ АНТИТІЛ

Антитіла відповідно до винаходу, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном, можуть бути одержані будь-яким способом, відомим у даній галузі для синтезу антитіл, зокрема, хімічним синтезом або переважно способом рекомбінантної експресії. При практичному здійсненні винаходу, якщо не обумовлено особливо, використовують звичайні способи молекулярної

біології, мікробіології, генетичного аналізу, рекомбінантної ДНК, органічної хімії, біохімії, ПЛР, синтезу і модифікації олігонуклеотидів, гібридизації нуклеїнових кислот і споріднених областей, відомі фахівцям. Такі способи описані у публікаціях, цитованих у даному описі, і повною мірою пояснюються у літературі. Див., наприклад, Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren et al. (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Поліклональні антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном, можуть бути одержані різними способами, добре відомими у даній галузі. Наприклад, антиген людини може бути введений різним тваринам-хазяїнам, включаючи без обмеження кроликів, мишей, щурів і т.д., щоб індукувати вироблення сироватки, що містить поліклональні антитіла, специфічні для антигену людини. Можна використовувати різні ад'юванти для посилення імунної відповіді, в залежності від виду хазяїна, і такі ад'юванти включають без обмеження ад'ювант Фрейнда (повний і неповний), мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, поліюлі, плуроніки, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, гемоціаніни морського блюдечка "замкова щілина", динітрофенол і потенційно застосовні ад'юванти людини, такі як BCG (бацила Кальмета-Герена) і *Corynebacterium parvum*. Такі ад'юванти також добре відомі у даній галузі.

Моноклональні антитіла можуть бути одержані з використанням великої множини способів, відомих у даній галузі, включаючи застосування методик, що базуються на гібридомах, одержанні рекомбінантів і фаговому дисплеї, або їх комбінації. Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути одержані з використанням способів, що базуються на гібридомах, включаючи способи, відомі у даній галузі і описані, наприклад, у Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (зазначені публікації включені у вигляді посилання у повному обсязі). Термін "моноклональне антитіло" у використуваному у даному описі значенні не обмежений антитілами, одержаними способом, що базується на гібридомах. Інші приклади способів одержання моноклональних антитіл обговорюються у даному описі, наприклад, такі як застосування мишей КМTM. Додаткові приклади способів одержання моноклональних антитіл наведені у даному описі у розділі "Приклади".

Способи одержання і скринінгу специфічних антитіл з використанням методики гібридом є звичайними і добре відомими у даній галузі. Коротко, мишей можна іммобілізувати антигеном hLIGHT і після виявлення імунної відповіді, наприклад, виявлення антитіл, специфічних відносно антигену hLIGHT, у сироватці мишей, селезінку мишей збирають і виділяють спленоцити. Потім спленоцити зливають добре відомими способами з будь-якими придатними клітинами мієломи, наприклад, клітинами клітинної лінії SP20, доступної з ATCC. Гібридами виділяють і клонують за допомогою лімітуючого розведення.

Крім того, можна використовувати методику RIMMS (множинні ділянки багаторазової імунізації) для імунізації тварини (Kilpatrick et al., 1997 *Hybridoma* 16: 381-9, публікація включена у вигляді посилання у повному обсязі). Потім клони гібридом аналізують способами, відомими у даній галузі для аналізу клітин, які секретують антитіла, здатні зв'язуватися з поліпептидом відповідно до винаходу. Асцитну рідину, що звичайно містить високі рівні антитіл, можна одержати імунізацією мишей позитивними клонами гібридом.

Відповідно, даний винахід стосується способів одержання антитіл у результаті культивування клітини гібридами, що секретує модифіковане антитіло відповідно до винаходу, при цьому переважно гібридом створюють злиттям спленоцитів, виділених з організму миші, імунізованої антигеном hLIGHT, з клітинами мієломи і подальшим скринінгом гібридом, одержаних у результаті злиття, відносно клонів гібридом, які секретують антитіло, здатне зв'язуватися з антигеном hLIGHT.

Фрагменти антитіл, які упізнають специфічні антигени hLIGHT, можуть бути одержані будь-яким способом, відомим фахівцям у даній галузі. Наприклад, фрагменти Fab і F(ab')₂ відповідно до винаходу можуть бути одержані протеолітичним розщепленням молекул імуноглобулінів з використанням таких ферментів, як папаїн (щоб одержати Fab-фрагменти) або пепсин (щоб одержати F(ab')₂-фрагменти). F(ab')₂-фрагменти містять варіабельну область, константну

область легкого ланцюга і домен CH1 важкого ланцюга. Крім того, антитіла відповідно до даного винаходу також можуть бути одержані з використанням різних способів, що базуються на фаговому дисплеї, відомих у даній галузі.

Наприклад, антитіла також можуть бути одержані з використанням різних способів, що базуються на фаговому дисплеї. У способах, що базуються на фаговому дисплеї, функціональні домени антитіл представлені на поверхні фагових частинок, які несуть полінуклеотидні послідовності, що кодують їх. Зокрема, послідовності ДНК, що кодують домени VH і VL, ампліфікують з бібліотек кДНК тварин (наприклад, бібліотек уражених тканин людини або тварин). ДНК, що кодують домени VH і VL, рекомбінують разом з лінкером scFv за допомогою ПЛР і клонують у фагмідному векторі. Вектор електропорують в *E. coli*, і *E. coli* інфікують хелперним фагом. Фагом, використовуваним у таких способах, звичайно є нитчастий фаг, включаючи fd і M13, і домени VH і VL звичайно рекомбінантно зливають або з геном III, або з геном VIII фагу. Фаг, що експресує антигензв'язувальний домен, що зв'язується з конкретним антигеном, може бути вибраний або ідентифікований з використанням антигену, наприклад, з використанням міченого антигену або антигену, зв'язаного або іммобілізованого на твердій поверхні або кульці. Приклади способів, що базуються на фаговому дисплеї, які можна використовувати для одержання антитіл відповідно до даного винаходу, включають способи, описані у Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958; Persic et al., 1997, *Gene* 187: 9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57: 191-280; заявці PCT No. PCT/GB91/O1134; міжнародних публікаціях No. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 і WO97/13844; і у патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 і 5969108; кожна публікація включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

Як описано у наведених вище публікаціях, після селекції фагу області, що кодують антитіло, можуть бути виділені з фагу і використані для одержання цілих антитіл, включаючи антитіла людини, або будь-якого іншого необхідного антигензв'язувального фрагмента і експресовані у будь-якому необхідному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії, наприклад, які описані нижче. Також можна застосовувати методики рекомбінантного одержання фрагментів Fab, Fab' і F(ab')₂, використовуючи способи, відомі у даній галузі, такі як способи, описані у публікації PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques* 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI* 34: 26-34; і Better et al., 1988, *Science* 240: 1041-1043 (зазначені публікації включені у вигляді посилання у повному обсязі).

Щоб одержати цілі антитіла, можна використовувати праймери ПЛР, що містять нуклеотидні послідовності VH або VL, сайт рестрикції і фланкуючу послідовність для захисту сайту рестрикції, щоб ампліфікувати послідовності VH або VL у клонах scFv. Використовуючи методики клонування, відомі фахівцям у даній галузі, ПЛР-ампліфіковані домени VH можуть бути клоновані у векторах, що експресують константну область VH, наприклад, константну область гамма 4 людини, і ПЛР-ампліфіковані домени VL можуть бути клоновані у векторах, що експресують константну область VL, наприклад, константні області каппа або лямбда людини. Домени VH і VL також можуть бути клоновані в одному векторі, що експресує необхідні константні області. Потім конверсійні вектори важкого ланцюга і конверсійні вектори легкого ланцюга спільно трансфікують у лінії клітин, щоб одержати стабільні або тимчасові клітинні лінії, які експресують повнорозмірні антитіла, наприклад, IgG, використовуючи способи, відомі фахівцям у даній галузі.

У випадку деяких застосувань, включаючи застосування антитіл *in vivo* у людини і реєстраційні аналізи *in vitro*, може бути переважним застосування антитіл людини або химерних антитіл. Повністю людські антитіла особливо бажані для терапевтичного лікування людей. Антитіла людини можуть бути одержані різними способами, відомими у даній галузі, включаючи способи фагового дисплею, описані вище, з використанням бібліотек антитіл, одержаних з послідовностей імуноглобулінів людини. Див. також патенти США № 4444887 і 4716111 і міжнародні публікації WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741; кожна з яких включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

У переважних варіантах одержують антитіла людини. Антитіла людини і/або повністю людські антитіла можуть бути одержані з використанням будь-якого способу, відомого у даній галузі, включаючи пропоновані у даному описі приклади. Наприклад, використовуючи трансгенних мишей, які не здатні експресувати функціональні ендogenous імуноглобуліни, але які можуть експресувати гени імуноглобулінів людини. Наприклад, комплекси генів важких і легких

ланцюгів імуноглобулінів людини можуть бути випадково або за допомогою гомологічної рекомбінації введені в ембріональні стовбурові клітини мишей. Альтернативно, варіабельна область, константна область і область різноманіття людини можуть бути введені в ембріональні стовбурові клітини мишей на додаток до генів важкого і легкого ланцюга людини. Гени важкого і легкого ланцюгів імуноглобулінів мишей можуть бути перетворені у нефункціональні окремо або одночасно з введенням локусів імуноглобулінів людини за допомогою гомологічної рекомбінації. Зокрема, гомозиготна делеція J_H-області запобігає продукуванню ендogenous антитіла. Модифіковані ембріональні стовбурові клітини розмножують і за допомогою мікроін'єкції вводять у бластоцисти, одержуючи химерних мишей. Потім химерних мишей розмножують, одержуючи гомозиготне потомство, яке експресує антитіла людини. Трансгенних мишей звичайним способом імунізують вибраним антигеном, наприклад, повним поліпептидом або частиною поліпептиду відповідно до винаходу. Моноклональні антитіла, направлені проти антигену, можуть бути одержані з організму імунізованих трансгенних мишей з використанням звичайної методики на основі гібридом. Трансгени імуноглобулінів людини, які несуть трансгенні миші, піддаються реаранжуванню під час диференціювання В-клітин і потім піддаються процесу переключення класів і соматичної мутації. Таким чином, застосовуючи таку методику, можна одержати терапевтично корисні антитіла IgG, IgA, IgM і IgE. Огляд такої методики одержання антитіл людини див. у Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Докладне обговорення такої методики одержання антитіл людини і моноклональних антитіл людини і протоколи одержання таких антитіл див., наприклад, у публікаціях PCT No. WO 98/24893, WO 96/34096 і WO 96/33735, і у патентах США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 і 5939598, які включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі. Інші способи докладно описані у даній публікації у розділі "Приклади". Крім того, можна зробити замовлення у такі компанії, як Abgenix, Inc. (Freemont, CA) і Genpharm (San Jose, CA), на одержання антитіл людини, направлених проти вибраного антигену, з використанням методики, подібної до методики, описаної вище.

Химерне антитіло являє собою молекулу, в якій різні частини антитіла одержані з різних молекул імуноглобуліну. Способи одержання химерних антитіл відомі у даній галузі. Див., наприклад, Morrison, 1985, *Science* 229: 1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4: 214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; і патенти США № 5807715, 4816567, 4816397 і 6331415, які включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

Гуманізоване антитіло являє собою антитіло або його варіант, або його фрагмент, яке здатне зв'язуватися з попередньо визначеним антигеном і яке містить каркасну область, що по суті має амінокислотну послідовність імуноглобуліну людини, і CDR, що по суті має амінокислотну послідовність імуноглобуліну виду, відмінного від людини. Гуманізоване антитіло, головним чином, містить, щонайменше, один і звичайно два варіабельних домени (Fab, Fab", F(ab")₂, Fabc, Fv), в яких всі або по суті всі області CDR відповідають областям CDR імуноглобуліну виду, відмінного від людини (тобто донорного антитіла), і всі або по суті всі каркасні області є областями консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Переважно гуманізоване антитіло також містить, щонайменше, частину константної області імуноглобуліну (Fc), звичайно з імуноглобуліну людини. Звичайно антитіло буде містити легкий ланцюг, а також, щонайменше, варіабельний домен важкого ланцюга. Антитіло також може містити області CH1, шарнірну область, CH2, CH3 і CH4 важкого ланцюга. Гуманізоване антитіло може бути вибране з будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Звичайно константний домен є константним доменом, що бере участь у фіксації комплементу, у тому випадку, коли потрібно, щоб гуманізоване антитіло проявляло цитотоксичну активність, і звичайно належить до класу IgG1. У тому випадку, коли така цитотоксична активність не потрібна, константний домен може належати до класу IgG2. Приклади константних доменів VL і VH, які можна використовувати у деяких варіантах здійснення винаходу, включають без обмеження C-каппа і C-гамма-1 (nG1m), описані у Johnson et al. (1997) *J. Infect. Dis.* 176, 1215-1224 і описані у патенті США № 5824307. Гуманізоване антитіло може містити послідовності більш ніж з одного класу або ізотипу, і вибір конкретних константних доменів для оптимізації необхідних ефекторних функцій може здійснити фахівець у даній галузі. Каркасні області і області CDR гуманізованого антитіла не повинні точно відповідати вихідним послідовностям, наприклад, донорна CDR або консенсусний каркас можуть бути піддані мутагенезу за допомогою заміни, інсерції або делеції, щонайменше, одного залишку, таким чином залишок CDR або каркасу у даній ділянці не відповідає ні консенсусній послідовності, ні імпортованому антитілу. Однак, такі мутації не будуть великими. Звичайно, щонайменше, 75 % залишків гуманізованого антитіла будуть відповідати залишкам вихідних послідовностей FR і CDR, більш часто 90 % і найбільш переважно більш ніж 95 %. Гуманізовані

антитіла можуть бути одержані з використанням різних способів, відомих у даній галузі, включаючи без обмеження прищеплення CDR (європейський патент No. EP 239400, міжнародна публікація No. WO 91/09967 і патенти США № 5225539, 5530101 і 5585089), покривання зовнішніх поверхонь або зміну зовнішньої поверхні (європейські патенти No. EP 592106 і EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; і Roguska et al., 1994, *PNAS* 91: 969-973), перетасування ланцюгів (патент США № 5565332) і методики, описані, наприклад, у патенті США № 6407213, патенті США № 5766886, WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.* 169:1119 25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods* 20(3):267 79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10):895 904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994), і Pedersen et al., *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994). Див. також публікацію патенту США № US 2005/0042664 A1 (24 лютого 2005), що включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі. Часто каркасні залишки у каркасних областях можуть бути замінені відповідним залишком з CDR донорного антитіла, щоб змінити, переважно поліпшити, зв'язування антигену. Такі каркасні заміни ідентифікують способами, добре відомими у даній галузі, наприклад, за допомогою моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків, щоб ідентифікувати каркасні залишки, важливі для зв'язування антигену, і порівнянням послідовностей для того, щоб ідентифікувати незвичайні каркасні залишки у конкретних положеннях. (Див., наприклад, Queen et al., патент США № 5585089, і Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323, публікації включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.)

Однодоменні антитіла, наприклад, антитіла, в яких відсутні легкі ланцюги, можуть бути одержані способами, добре відомими у даній галузі. Див. Riechmann et al., 1999, *J. Immunol.* 231: 25-38; Nuttall et al., 2000, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1(3): 253-263; Muylderman, 2001, *J. Biotechnol.* 74(4): 277302; патент США № 6005079 і міжнародні публікації No. WO 94/04678, WO 94/25591 і WO 01/44301, кожна з яких включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

Крім того, антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, у свою чергу можуть бути використані для одержання антиідіотипічних антитіл, які "імітують" антиген, використовуючи способи, добре відомі фахівцям у даній галузі. (Див., наприклад, Greenspan and Bona, 1989, *FASEB J.* 7(5): 437-444 і Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8): 2429-2438).

ПОЛІНУКЛЕОТИДИ, ЩО КОДУЮТЬ АНТИТІЛО

Винахід стосується полінуклеотидів, що містять нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло відповідно до винаходу, що імуноспецифічно зв'язується з епітопом hLIGHT. У винахід також включені полінуклеотиди, які гібридизуються в умовах гібридизації високої жорсткості, середньої або низької жорсткості, наприклад, які визначені вище, з полінуклеотидами, які кодують модифіковане антитіло відповідно до винаходу.

Полінуклеотиди можуть бути одержані і нуклеотидна послідовність полінуклеотидів може бути визначена будь-яким способом, відомим у даній галузі. Оскільки амінокислотні послідовності E1, E13, E63, F19 і F23 відомі (див., наприклад, SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45, 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 і 50; і номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728, відповідно, які включені у даний опис у вигляді посилання), нуклеотидні послідовності, що кодують такі антитіла і модифіковані варіанти таких антитіл, можна визначити, застосовуючи способи, добре відомі у даній галузі, тобто проводять збирання кодонів нуклеотидів, які, як відомо, кодують конкретні амінокислоти, таким чином, щоб одержати нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло. Такий полінуклеотид, що кодує антитіло, може бути зібраний з хімічно синтезованих олігонуклеотидів (наприклад, як описано у Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17: 242), коротко, такий спосіб полягає у синтезі олігонуклеотидів, що перекриваються, які містять частини послідовності, що кодує антитіло, його фрагменти або варіанти, відпалі і лігуванні таких олігонуклеотидів і потім ампліфікації зв'язаних олігонуклеотидів у ПЛР.

Альтернативно, полінуклеотид, що кодує антитіло відповідно до винаходу, може бути одержаний з використанням нуклеїнової кислоти з придатного джерела (наприклад, гібридоми, що має номери доступу ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 або PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 або F23)). Якщо клон, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує конкретне антитіло, недоступний, але послідовність молекули антитіла відома, то нуклеїнову кислоту, яка кодує імуноглобулін, можна синтезувати хімічно або одержати з придатного джерела (наприклад, бібліотеки кДНК антитіл або бібліотеки кДНК, створеної з нуклеїнових кислот, переважно полі А+ РНК, виділених з будь-якої тканини або клітин, що експресують антитіло, таких як клітини гібридоми, вибрані на підставі експресії антитіла відповідно до винаходу) за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням синтетичних праймерів, що гібридизуються з 3'- і

5'-кінцями послідовності, або за допомогою клонування з використанням олігонуклеотидного зонда, специфічного стосовно конкретної генної послідовності, щоб ідентифікувати клон кДНК у бібліотеці кДНК, що кодує антитіло. Ампліфіковані нуклеїнові кислоти, одержані у ПЛР, потім можна клонувати у клонуючих векторах, що реплікуються, будь-яким способом, добре відомим у даній галузі.

У деяких варіантах молекули нуклеїнових кислот відповідно до винаходу містять або складаються з послідовності нуклеїнової кислоти, що зазначена у будь-якій з SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45 (кодує VN) і/або SEQ ID NO: 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 або 50 (кодує VL), або будь-якої їх комбінації (наприклад, у вигляді нуклеотидної послідовності, що кодує антитіло відповідно до винаходу, таке як повнорозмірне антитіло, важкий і/або легкий ланцюг антитіла або одноланцюжкове антитіло відповідно до винаходу).

РЕКОМБІНАНТНА ЕКСПРЕСІЯ АНТИТІЛА

Рекомбінантна експресія антитіла відповідно до винаходу (наприклад, повнорозмірного антитіла, важкого і/або легкого ланцюга антитіла або одноланцюжкового антитіла відповідно до винаходу), що імуноспецифічно зв'язується з антигеном hLIGHT, потребує конструювання експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, що кодує антитіло. Після того як одержаний полінуклеотид, що кодує молекулу антитіла, важкий або легкий ланцюг антитіла, або його фрагмент (переважно, але не обов'язково, що містить варіабельний домен важкого і/або легкого ланцюга) відповідно до винаходу, може бути створений вектор для продукування молекули антитіла з використанням методики рекомбінантної ДНК способами, добре відомими у даній галузі. Відповідно у даній публікації описані способи одержання білка у результаті експресії полінуклеотиду, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло. Можна використовувати способи, які добре відомі фахівцям у даній галузі, щоб сконструювати експресуючі вектори, що містять послідовності, які кодують антитіло, і відповідні сигнали регуляції транскрипції і трансляції. До таких способів належать, наприклад, методика рекомбінантної ДНК *in vitro*, способи синтезу і генетичної рекомбінації *in vivo*. Таким чином, винахід стосується векторів, що реплікуються, які містять нуклеотидну послідовність, що кодує молекулу антитіла відповідно до винаходу, важкий або легкий ланцюг антитіла, варіабельний домен важкого або легкого ланцюга антитіла, або його фрагмент, або CDR важкого або легкого ланцюга, оперативно зв'язану з промотором. Такі вектори можуть містити нуклеотидну послідовність, що кодує константну область молекули антитіла (див., наприклад, міжнародні публікації WO 86/05807 і WO 89/01036 і патент США № 5122464), і у такому векторі може бути клонований варіабельний домен антитіла для експресії повного важкого, повного легкого ланцюга або обох повних важкого і легкого ланцюгів.

Експресуючий вектор переносять у клітину-хазяїна звичайним способом, і потім трансфіковані клітини культивують звичайним способом, щоб одержати антитіло відповідно до винаходу. Таким чином, винахід стосується клітин-хазяїнів, що містять полінуклеотид, що кодує антитіло відповідно до винаходу або його фрагменти, або його важкий, або легкий ланцюг, або їх фрагмент, або одноланцюжкове антитіло відповідно до винаходу, оперативно зв'язаний з гетерологічним промотором. У переважних варіантах для експресії двохланцюжкових антитіл вектори, що кодують і важкий, і легкий ланцюги, можуть бути експресовані спільно у клітині-хазяїні для експресії повної молекули імуноглобуліну, як докладно описано нижче.

Можна використовувати множину систем хазяїн-експресуючий вектор для експресії молекул антитіл відповідно до винаходу (див., наприклад, патент США № 5807715). Такі системи хазяїн-експресуючий вектор включають в себе носії, за допомогою яких кодуючі послідовності, що представляють інтерес, можуть бути одержані і потім очищені, але також включають в себе клітини, які у випадку трансформації або трансфекції придатними кодуючими нуклеотидними послідовностями експресують молекулу антитіла відповідно до винаходу *in situ*. До таких клітин належать без обмеження мікроорганізми, такі як бактерії (наприклад, *E. coli* і *B. subtilis*), трансформовані експресуючими векторами на основі рекомбінантної ДНК бактеріофагу, плазмідної ДНК або космідної ДНК, що містять послідовності, які кодують антитіло; дріжджі (наприклад, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформовані рекомбінантними дріжджовими експресуючими векторами, що містять послідовності, які кодують антитіло; системи клітин комах, інфікованих рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, бакуловірусом), що містять послідовності, які кодують антитіло; системи клітин рослин, інфікованих рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, вірусом мозаїки цвітної капусти, CaMV; вірусом мозаїки тютюну, TMV) або трансформованих рекомбінантними плазмідними експресуючими векторами (наприклад, Ti-плазмідною), що містять послідовності, які кодують антитіло; або системи клітин ссавців (наприклад, клітин COS, CHO, BHK, 293, NS0 і 3T3), що несуть рекомбінантні експресуючі конструкції, що містять промотори, одержані з

геному клітин ссавців (наприклад, промотор металотіонеїну) або з вірусів ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу; промотор 7.5K вірусу вакцині). Переважно для експресії рекомбінантної молекули антитіла використовують бактеріальні клітини, такі як *Escherichia coli*, і більш переважно еукаріотичні клітини, особливо для експресії цілої рекомбінантної молекули антитіла. Наприклад, клітини ссавців, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), разом з вектором, таким як промотор основного негайного раннього гена цитомегаловірусу людини є ефективною системою для експресії антитіл (Foerking et al., 1986, *Gene* 45: 101; і Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2). У переважних варіантах антитіла відповідно до винаходу продукуються у клітинах CHO. У конкретному варіанті експресія нуклеотидних послідовностей, що кодують антитіла відповідно до винаходу, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном hLIGHT, регулюється конститутивним промотором, промотором, що індукується, або тканинспецифічним промотором.

У бактеріальних системах кількість експресуючих векторів переважно може бути вибрана в залежності від передбачуваного застосування молекули антитіла, що експресується. Наприклад, коли необхідно одержати велику кількість такого антитіла для створення фармацевтичних композицій молекули антитіла, можуть бути бажані вектори, які забезпечують експресію високих рівнів злитих білкових продуктів, які легко можна очистити. До таких векторів без обмеження належать експресуючий вектор *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO* 12: 1791), в якому послідовність, що кодує антитіло, може бути лігована окремо у вектор у рамці з кодуючою областю *lac Z*, щоб продукувався злитий білок; вектори pIN (Inouye and Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke and Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509); і тому подібні. Також можуть бути використані вектори pGEX для експресії чужорідних поліпептидів у вигляді білків, злитих з глутатіон-S-трансферазою (GST). Загалом, такі злиті білки є розчинними і легко можуть бути очищені з лізованих клітин адсорбцією і зв'язуванням з кульками з глутатіон-агарозним матриксом з подальшим елюванням у присутності вільного глутатіону. Вектори pGEX конструюють так, щоб вони містили сайти протеазного розщеплення тромбіном або фактором Ха для того, щоб клонований продукт гена-мішені можна було звільнити від залишку GST.

У системі комах використовують вірус ядерного поліедрозу *Autographa californica* (AcNPV) як вектор для експресії чужорідних генів. Вірус зростає у клітинах *Spodoptera frugiperda*. Послідовність, що кодує антитіло, може бути клонована окремо у неістотних областях (наприклад, гені поліедрину) вірусу і вміщена під контроль промотору AcNPV (наприклад, промотор поліедрину).

У клітинах-хазяїнах ссавців можна використовувати декілька систем експресії, що базуються на вірусах. У тих випадках, коли використовують аденовірус як експресуючий вектор, послідовність, що представляє інтерес, що кодує антитіло, можна лігувати з комплексом регуляції транскрипції/трансляції аденовірусу, наприклад, пізнім промотором, і лідерною послідовністю, що складається з трьох частин. Потім такий химерний ген може бути вбудований у геном аденовірусу за допомогою рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Інсерція у неістотну область вірусного геному (наприклад, область E1 або E3) приведе до одержання рекомбінантного вірусу, що є життєздатним і здатним експресувати молекулу антитіла в інфікованих хазяїнах (наприклад, див. Logan and Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 355-359). Специфічні сигнали ініціації також можуть бути потрібні для ефективної трансляції вбудованих послідовностей, що кодують антитіло. До таких сигналів належать кодон ініціації ATG і прилеглі послідовності. Крім того, кодон ініціації повинен бути у фазі з рамкою зчитування необхідної кодуючої послідовності, щоб забезпечити трансляцію всієї вставки. Такі екзогенні сигнали регуляції трансляції і кодони ініціації можуть бути різного походження, як природними, так і синтетичними. Ефективність експресії можна підвищити введенням відповідних елементів енхансерів транскрипції, термінаторів транскрипції і т.д. (див., наприклад, Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 51-544).

Крім того, може бути вибрана лінія клітин-хазяїнів, що модулює експресію вбудованих послідовностей або модифікує і процесує генний продукт необхідним специфічним чином. Такі модифікації (наприклад, глікозилювання) і процесинг (наприклад, розщеплення) білкових продуктів можуть бути важливими для функціонування білка. Різні клітини-хазяїни мають характерні і специфічні механізми пост-трансляційного процесингу і модифікації білків і генних продуктів. Можуть бути вибрані придатні лінії клітин або системи хазяїнів, щоб забезпечити правильну модифікацію і процесинг чужорідного експресованого білка. З цією метою можна використовувати еукаріотичні клітини-хазяїни, які мають клітинний апарат для правильного процесингу первинного транскрипту, глікозилювання і фосфорилювання генного продукту. Такі клітини-хазяїни ссавців включають без обмеження клітини CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK,

293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O і T47D, NS0 (лінія клітин мієломи миші, які ендогенно не продукують жодних ланцюгів імуноглобулінів), CRL7030 і HsS78Bst. У переважних варіантах повністю людські моноклональні анти-hLIGHT-антитіла відповідно до винаходу продукуються у клітинах ссавців, таких як клітини CHO.

5 Для довгострокового продукування рекомбінантних білків з високими виходами переважна стабільна експресія. Наприклад, можуть бути сконструйовані лінії клітин, які стабільно експресують молекулу антитіла. Замість застосування експресуючих векторів, які містять вірусні початки реплікації, клітини-хазяїни можуть бути трансформовані ДНК, яка контролюється відповідними елементами регуляції експресії (наприклад, промоторними, енхансерними послідовностями, термінаторами транскрипції, сайтами поліаденілювання, і т.д.), і маркером, що селектується. Після введення чужорідної ДНК, сконструйованим клітинам можна дозволити 10 рости протягом 1-2 днів у збагаченому середовищі і потім перевести на селективне середовище. Маркер, що селектується, у рекомбінантній плазміді надає резистентність до селекції і дозволяє клітинам стабільно інтегрувати плазмиду у свої хромосоми і рости до утворення осередків, які у свою чергу можуть бути клоновані і розмножені до одержання клітинних ліній. Такий спосіб переважно можна використовувати для конструювання клітинних ліній, які експресують молекулу антитіла. Такі сконструйовані клітинні лінії можуть бути особливо корисні для скринінгу і оцінки композицій, які прямо або опосередковано взаємодіють з молекулою антитіла.

20 Можна використовувати декілька систем селекції, включаючи без обмеження гени тимідинкінази вірусу простого герпесу (Wigler et al., 1977, Cell, 11: 223), і гени гіпоксантинуанінфосфорибозилтрансферази (Szybalska and Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202) і аденінфосфорибозилтрансферази (Lowy et al., 1980, Cell 22: 8-17), які можна використовувати у клітинах tk-, hprt- або aprt-, відповідно. Також можна використовувати 25 резистентність до антиметаболітів як основу селекції стосовно наведених далі генів: dhfr, що надає резистентність до метотрексату (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, що надає резистентність до мікофенолової кислоти (Mulligan and Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, що надає резистентність до аміноглікозиду G-418 (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; і Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-2 15); і hygR, що надає резистентність до гігromіцину (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Способи, загальновідомі у галузі застосування методики рекомбінантної ДНК, можуть бути звичайним 30 чином використані для селекції необхідного рекомбінантного клону, і такі способи описані, наприклад, в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); і у главах 12 і 13 у Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics. John Wiley and Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1, зазначені публікації включені у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі.

40 Рівні експресії молекули антитіла можуть бути підвищені за допомогою ампліфікації векторів (огляд див. у Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). У тому випадку, коли маркер у векторній системі, що експресує антитіло, ампліфікується, підвищення рівня інгібітору, присутнього у культурі клітин-хазяїнів, буде збільшувати кількість 45 копій маркерного гена. Оскільки ампліфікована область зв'язана з геном антитіла, продукування антитіла також буде зростати (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257).

Клітина-хазяїн може бути котрансфікована двома експресуючими векторами відповідно до винаходу, при цьому перший вектор кодує поліпептид, одержаний з важкого ланцюга, а другий вектор кодує поліпептид, одержаний з легкого ланцюга. Два вектори можуть містити ідентичні 50 маркери, що селектуються, які дають можливість в однаковій мірі експресувати поліпептиди важкого і легкого ланцюга. Альтернативно, можна використовувати один вектор, що кодує і здатний експресувати обидва поліпептиди з важкого і легкого ланцюга. У таких ситуаціях легкий ланцюг повинен бути вміщений перед важким ланцюгом, щоб уникнути надлишку токсичного вільного важкого ланцюга (Proudfoot, 1986, Nature 322: 52; і Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197-2199). Кодуючі послідовності важкого і легкого ланцюгів можуть містити кДНК або геномну ДНК.

Після одержання молекули антитіла відповідно до винаходу у результаті експресії рекомбінанту, вона може бути очищена будь-яким способом, відомим у даній галузі для очищення молекули імуноглобуліну, наприклад, з використанням хроматографії (наприклад, 60 іонообмінної, афінної, особливо на основі афінності стосовно специфічного антигену після білка

А, і хроматографії на колонці за розміром), центрифугування, диференціальної розчинності або будь-якого іншого стандартного способу очищення білків. Крім того, антитіла відповідно до даного винаходу можуть бути злиті з гетерологічними поліпептидними послідовностями, описаними у даній публікації або відомими у даній галузі для полегшення очищення.

5 НАБОРИ

Винахід також стосується фармацевтичної упаковки або набору, що містить одну або декілька ємностей, наповнених одним або декількома інгредієнтами фармацевтичних композицій відповідно до винаходу, такими як одне або декілька антитіл, пропонованих у даному винаході. Необов'язково разом з такою ємністю (ємностями) може додаватися інструкція у формі, встановленій державним органом, що регулює виробництво, застосування або продаж фармацевтичних препаратів або біологічних продуктів, і у такій інструкції наявний дозвіл стосовно введення людині, виданий органом, що регулює виробництво, застосування або продаж.

У даному винаході запропоновані набори, які можуть бути використані у зазначених вище способах. В одному варіанті набір містить антитіло відповідно до винаходу, переважно очищене антитіло, в одній або декількох ємностях. У конкретному варіанті набори відповідно до даного винаходу містять по суті ізольований антиген hLIGHT як контроль. Переважно набори відповідно до даного винаходу додатково містять контрольне антитіло, що не взаємодіє з антигеном hLIGHT. В іншому конкретному варіанті набори відповідно до даного винаходу містять засоби для реєстрації зв'язування модифікованого антитіла з антигеном hLIGHT (наприклад, антитіло може бути кон'юговане з субстратом, що реєструється, таким як флуоресціююча сполука, субстрат ферменту, радіоактивна сполука або люмінесціююча сполука, або друге антитіло, що впізнає перше антитіло, може бути кон'юговане з субстратом, що реєструється). У конкретних варіантах набір може містити рекомбінантно одержаний або хімічно синтезований антиген hLIGHT. Антиген hLIGHT, що постачається у наборі, також може бути зв'язаний з твердою основою. У більш конкретному варіанті засоби для реєстрації в описаному вище наборі включають тверду основу, з якою зв'язаний антиген hLIGHT. Такий набір також може містити незв'язане мічене репортером антитіло проти антитіла людини. У такому варіанті зв'язування антитіла з антигеном hLIGHT можна реєструвати на підставі зв'язування зазначеного міченого репортером антитіла.

Наведені далі приклади запропоновані з метою ілюстрації, а не з метою обмеження.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1 - ОДЕРЖАННЯ АНТИ-hLIGHT-АНТИТІЛ ЛЮДИНИ

У даному прикладі описане одержання моноклональних анти-hLIGHT-антитіл людини з використанням трансхромосомних мишей (KM-мишіTM) (WO 02/43478, WO 02/092812, Ishida and Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000); i Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002)), імунізованих розчинним рекомбінантним hLIGHT. Антитіла, описані у даній публікації, специфічно забарвлювали лінії клітин, стабільно трансфіковані hLIGHT (EL4-hLIGHT і HEK 293-hLIGHT), але не забарвлювали вихідні лінії клітин. Подібним чином вони зв'язуються з ендогенно експресованим hLIGHT на поверхні гібридами Т-клітин людини (IL-23.D7) (Ware et al. 1986 Lymphokine Res. 5: 313-24) при активації. Одержані дані, взяті разом, показують, що антитіла імуноспецифічно зв'язуються з hLIGHT. Ізольовані антитіла впізнають один з двох епітопів на hLIGHT, як визначено в експериментах з перехресного блокування, які описані нижче. Крім того, антитіла здатні блокувати зв'язування експресованого на клітинній поверхні hLIGHT з розчинними злитими формами рецептор-Fc як у випадку HVEM людини, так і у випадку LTβR. Розчинний hLIGHT індукуює секрецію хемокинів CCL20 і RANTES з лінії епітеліальних клітин ободової кишки людини HT29.14s (ATCC HTB-38) залежним від дози чином. Інкубація розчинного hLIGHT з анти-hLIGHT-антитілами блокує hLIGHT-опосередковану секрецію як CCL20, так і RANTES з клітин HT29.14s. Крім того, попередня інкубація експресованого на клітинній поверхні hLIGHT (EL4-hLIGHT) з такими анти-hLIGHT-антитілами блокує індуквану зв'язаним з мембранами hLIGHT секрецію хемокинів з клітин HT29. Одержані результати, взяті разом, ілюструють функціональні і структурні характеристики повністю людських моноклональних анти-hLIGHT-антитіл і є доказом їх застосовності для лікування hLIGHT-опосередкованих захворювань.

МАТЕРІАЛИ І СПОСОБИ

Одержання антигену: Антиген, використовуваний для імунізацій при одержанні повністю людських анти-hLIGHT-антитіл, являє собою розчинний варіант hLIGHT, укорочений так, щоб він містив тільки позаклітинну область, починаючи з гліцину у положенні амінокислоти 66 до валіну 240, і він містить FLAG-епітопну мітку на аміно-кінці білка (SEQ ID NO: 54). Одержання такої молекули описане раніше (Rooney et al. 2000 J. Biol. Chem. 275: 14307-15).

Нуклеїнову кислоту (SEQ ID NO: 51), що кодує повнорозмірну амінокислотну послідовність hLIGHT (SEQ ID NO: 52), клонували з активованих Т-клітинних гібридом II23.D7, використовуючи ПЛР зі зворотною транскриптазою (Mauri et al. 1998 Immunity 8: 21-30). Лінія клітин II-23 (субклон D7) є гібридом Т-клітин CD4+ людини (Ware et al. 1986 Lymphokine Res. 5: 313-24). ПЛР-продукт hLIGHT субклонували в експресуючому векторі ссавців pCDNA3.1(+), щоб створити pCDNA3.1-hLIGHT. Позаклітинний домен (що кодує Gly66-Val240) ампліфікували з pCDNA3-hLIGHT у ПЛР, використовуючи наведені нижче праймери з введеними сайтами рестрикції:

прямий, 5'-GTAGGAGAGATGGTCACCCGCCT-3' (SEQ ID NO: 80),

зворотний, 5'-GGAACGCGAATTCCCACGTGTCAGACCCCATGTCCAAT-3' (SEQ ID NO: 81).

Ампліфікований ПЛР-продукт hLIGHT розщеплювали EcoRI і лігували у сайти SnaB1 і EcoRI pCDNA3.1-VCAM-FLAG, що кодує лідерну послідовність VCAM1, за якою йде епітоп FLAG, для одержання FLAG-міченого на N-кінці білка, що секретується (SEQ ID NO: 52).

Щоб одержати стабільну лінію клітин для продукування розчинного hLIGHT, клітини HEK293 трансфікували, використовуючи спосіб на основі фосфату кальцію, і стабільні клони відбирали, використовуючи G418 (Invitrogen, Corp.), і піддавали скринінгу стосовно продукування hLIGHT шляхом ELISA. Розчинний hLIGHT очищали з надосадів культур клітин, вирощених у DMEM, що містить 1,0 % фетальної сироватки теляти (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Розчинний hLIGHT очищали афінною хроматографією з використанням анти-FLAG(M2)-антитіла, зв'язаного з агарозними кульками. Розчинний hLIGHT елюювали з колонки, використовуючи 20 мМ гліцин, 150 мМ NaCl, pH 3,0, і нейтралізували pH відразу після збирання у 50 мМ Tris, pH 7,4. Концентрацію білка визначали за оптичною густиною при 280 нм.

Нуклеотидна послідовність hLIGHT від кодону ініціації (ATG) до стоп-кодону (TGA) (SEQ ID NO: 51):

```

ATGGAGGAGA GTGTCGTACG GCCCTCAGTG TTTGTGGTGG ATGGACAGAC CGACATCCCA 60
TTCACGAGGC TGGGACGAAG CCACCGGAGA CAGTCGTGCA GTGTGGCCCG GGTGGGTCTG 120
GGTCTCTTGC TGTTCGTGAT GGGGGCCGGG CTGGCCGTCC AAGGCTGGTT CCTCCTGCAG 180
CTGCACTGGC GTCTAGGAGA GATGGTCACC CGCCTGCCTG ACGGACCTGC AGGCTCCTGG 240
GAGCAGCTGA TACAAGAGCG AAGGTCTCAC GAGGTCAACC CAGCAGCGCA TCTCACAGGG 300
GCCAACTCCA GCTTGACCGG CAGCGGGGGG CCGCTGTTAT GGGAGACTCA GCTGGGCCTG 360
GCCTTCCTGA GGGGCCTCAG CTACCACGAT GGGGCCCTTG TGGTCACCAA AGCTGGCTAC 420
TACTACATCT ACTCCAAGGT GCAGCTGGGC GGTGTGGGCT GCGCGCTGGG CCTGGCCAGC 480
ACCATCACCC ACGGCCTCTA CAAGCGCACA CCGGCTACC CCGAGGAGCT GGAGCTGTTG 540
GTCAGCCAGC AGTCACCCTG CGGACGGGCC ACCAGCAGCT CCCGGGTCTG GTGGGACAGC 600
AGCTTCCTGG GTGGTGTGGT ACACCTGGAG GCTGGGGAGG AGGTGGTCGT CCGTGTGCTG 660
GATGAACGCC TGGTTCGACT GCGTGATGGT ACCCGGTCTT ACTTCGGGGC TTTCATGGTG 720
TGA 780

```

Амінокислотна послідовність повнорозмірного hLIGHT з 240 амінокислот (SEQ ID NO: 52):

```

MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLMGAG LAVQGWFLQ 60
LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLIQERRSH EVNPAHLTG ANSSLTGSGG PLLWETQLGL 120
AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YYYISKVQLG GVGCPGLAS TITHGLYKRT PRYPEELELL 180
VSQQSPCGRA TSSSRVWWD SFLGGVVHLE AGEVVVRVL DERLVRLRDG TRSYFGAFMV 240

```

Нуклеотидна послідовність розчинного FLAG-міченого hLIGHT (показана лідерна послідовність VCAM з подальшою послідовністю, що кодує FLAG, що показана жирним шрифтом) (SEQ ID NO: 53)

```

ATGCCTGGGA AGATGGTCGT GATCCTTGA GCCTCAAATA TACTTTGGAT AATGTTTGCA 60
GCTTCTCAAG CTGACTACAA GGACGACGAT GACAAGTACG TAGGAGAGAT GGTACCCCGC 120
CTGCCTGACG GACCTGCAGG CTCCTGGGAG CAGCTGATAC AAGAGCGAAG GTCTCACGAG 180
GTCAACCCAG CAGCGCATCT CACAGGGGCC AACTCCAGCT TGACCGGCAG CGGGGGGCCG 240

CTGTTATGGG AGACTCAGCT GGGCCTGGCC TTCCTGAGGG GCCTCAGCTA CCACGATGGG 300
GCCCTTGTGG TCACCAAAGC TGGCTACTAC TACATCTACT CCAAGGTGCA GCTGGGCGGT 360
GTGGGCTGCC CGCTGGGCCT GGCCAGCACC ATCACCACG GCCTCTACAA GCGCACACCC 420
CGCTACCCCG AGGAGCTGGA GCTGTTGGTC AGCCAGCAGT CACCCTGCGG ACGGGCCACC 480
AGCAGCTCCC GGGTCTGGTG GGACAGCAGC TTCCTGGGTG GTGTGGTACA CCTGGAGGCT 540
GGGGAGGAGG TGGTCGTCCG TGTGCTGGAT GAACGCCTGG TTCGACTGCG TGATGGTACC 600
CGGTCTTACT TCGGGGCTTT CATGGTGTGA 660

```

- 5 Амінокислотна послідовність розчинного FLAG-міченого hLIGHT зі 183 амінокислот (FLAG показана жирним шрифтом) (SEQ ID NO: 54):

```

DYKDDDDKGE MVTRLPDGPA GSWEQLIQR RSHEVNPAAH LTGANSSLTG SGGPLLWETQ 60
LGLAFLRGLS YHDGALVVTG AGYYYIYSKV QLGVGCGPLG LASTITHGLY KRTPRYPEEL 120
ELLVSQQSPC GRATSSSRVW WDSSFLGGVV HLEAGEEVVV RVLDERLVRL RDGTRSIFGA 180
FMV 240

```

- 10 Клітини EL4 (ATCC TIB-39) стабільно трансдукували ретровірусом, що містить кДНК, що кодує повнорозмірний hLIGHT, для одержання клітинної лінії EL4-hLIGHT.
- Одержання злитого з Fc білка: Клонування, експресія і очищення розчинних злитих з рецептором білків, що містять Fc-область IgG1 людини і домени LTβR людини і HVEM людини, що зв'язують ліганд, описані раніше (Rooney et al. 2000 Methods Enzymol. 322: 345-63). Коротко, позаклітинні області HVEM і LTβR виділяли за допомогою полімеразних ланцюгових реакцій, використовуючи праймери з введеними сайтами рестрикції ендонуклеаз, і лігували у рамці з бакуловірусним вектором pVL1392 (Pharmingen), що містить Fc IgG1 людини. Клітини комарів *Trichoplusia ni* High-Five BTI-TN-5b1-4 (Tn5) (Invitrogen Corp.) інфікували рекомбінантними за LTβR:Fc або HVEM:Fc бакуловірусами для продукування білка (див. очищення антитіла і білка).
- 20 Миші: миші KMTM, які містять перенесені хромосоми людини (WO 02/43478, WO 02/092812, Ishida and Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000); і Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002)), які несуть фрагменти хромосом людини, що кодують область імуноглобуліну людини, одержували від Kirin Brewery Co., Ltd., Japan, і утримували у віварії у Gemini Science (La Jolla, CA). Огляд методики одержання антитіл людини наведений у Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93. Трансгенні тварини з одним або декількома генами імуноглобулінів людини (каппа або лямбда), які не експресують ендогенні імуноглобуліни, описані, наприклад, у патенті США № 5939598. Описані додаткові способи одержання антитіл людини і моноклональних антитіл людини (див., наприклад, WO 98/24893, WO 92/01047, WO 96/34096, WO 96/33735, патенти США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318, 5885793, 5916771 і 5939598). Створення великої рогатої худоби, яка несе гени імуноглобулінів людини, TC-корів, описане в Ishida and Lonberg (див. Ishida, 2000, 11th Antibody Engineering Meeting, Kuroiwa et al. 2004, Nat. Genet. 36: 775-80, Kuroiwa et al. 2002, Nat. Biotechnol. 20: 889-94).
- 30 Імунізація: FLAG-вічений розчинний рекомбінантний білок hLIGHT змішували з рівним об'ємом повного ад'юванту Фрейнда (CFA, Sigma) і одержували емульсію. Мишей імунізували 10-50 мкг білка підшкірно (п/ш) і піддавали бустер-імунізації п/ш 10-20 мкг білка, емульгованого у неповному ад'юванті Фрейнда (IFA, Sigma) з 2-3-тижневими інтервалами, використовуючи 2-3 бустер-імунізації. Кінцеву внутрішньовенну (в/в) ін'єкцію 10 мкг FLAG-міченого розчинного hLIGHT без ад'юванту здійснювали за 3 дні до злиття.
- 40 Одержання гібридом: Мишей, у сироватці яких виявляли найвищий титр специфічних hLIGHT-IgG-антитіл, при цьому титр визначали шляхом ELISA hLIGHT і FACS, використовуючи

hLIGHT-трансдуковані клітини EL4 у порівнянні з вихідними клітинами EL4, відбирали для одержання моноклональних антитіл. Збирали селезінки і суспензії окремих клітин зливали з лінією клітин мієломи SP2/O-Ag14 (ATCC, Manassas, VA) у співвідношенні 5:1, використовуючи 50 % поліетиленгліколь (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Злиття висівали у 96-ямкові планшети з плоским дном при оптимальній щільності (у цьому випадку 1×10^6 /мл) у повне середовище DMEM-10 (модифіковане Дульбеко середовище Ігла з 10 % фетальної сироватки теляти (FBS, Invitrogen, Corp.), 1 % замісних амінокислот, 2 мМ L-глутаміном, 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл сульфату стрептоміцину (всі реактиви від BioWhittaker, Walkersville, MD), домішкою НАТ (Sigma) і 10 % фактора клонування гібридом (HCF, Biovaris, San Diego, CA)) і культивували при 37°C в інкубаторі з 10 % CO₂. Приблизно 2800 ямок для 2 злиттів піддавали скринінгу шляхом ELISA стосовно hLIGHT-специфічних антитіл, що містять каппа-ланцюги людини. hLIGHT-IgG-антитіла людини підтверджували у проточно-цитометричному аналізі, використовуючи клітини hLIGHT-EL4 у порівнянні з вихідними клітинами EL4. Позитивні ямки також тестували стосовно активності, що блокує рецептори, за допомогою попередньої інкубації необробленого середовища росту розведеної культури гібридом з клітинами EL4-hLIGHT і забарвлювання напівнасичувальними HVEM:Fc або LTβR:Fc. Клітини з позитивних ямок розмножували і піддавали 3-5 раундам клонування способом лімітуючого розведення, щоб одержати моноклональні антитіла.

Очищення антитіл і білків: Для очищення антитіл гібридами культивували у 2-літрових обертових флаконах у 350 мілілітрах - 1 літрі/флакон або в 1-літровій системі Integra (INTEGRA Bioscience, Inc., Ijamsville, MD) з середовищем для гібридом-SFM (Invitrogen, Corp.) з додаванням фетальної сироватки теляти з дуже низьким вмістом IgG (Invitrogen, Corp.).

Про одержання рекомбінантних білків LTβR:Fc і HVEM:Fc миші і людини повідомлялося раніше (Rooney et al. 2000 Meth. Enzymol. 322: 345-63), і їх одержували у результаті інфікування 1 літра суспензії клітин Tn5 протягом 4 днів. Моноклональні антитіла людини і злиті Fc-білки очищали з культурального середовища, використовуючи гель рекомбінантний білок А-сефароза Fast Flow (Amersham Biosciences). Кондиціоноване середовище, одержане в обертових флаконах, спочатку концентрували, використовуючи систему з тангенціальним потоком Ultrasette (Pall Corp., East Hills, NY). Кондиціоноване середовище фільтрували, використовуючи вакуумну фільтрувальну установку з розміром пор 0,22 мкм (Millipore, Bedford, MA), і наносили на колонку, що містить білок А-сефарозу Fast Flow (Amersham Biosciences), що має придатний розмір для тієї кількості антитіла людини, яка є у середовищі. Колонку ретельно промивали 20 об'ємами колонки PBS, і антитіло елюювали, використовуючи 0,1M Gly-HCl, pH 3,6, 0,15M NaCl, і нейтралізували 1M Tris-HCl, pH 8,0. Фракції аналізували у SDS-PAGE і позитивні фракції об'єднували і концентрували у концентруючій центрифугі (Vivaspin, межа відсікання за молекулярною масою 50000: Sartorius, Gettingen, Germany).

Колонки для знесолення, що містять сефадекс G-25 (NAP, Amersham Biosciences), використовували для заміни буфера на PBS, pH 7,4. Нарешті, антитіло стерилізували фільтруванням, використовуючи шприцеві фільтри з діаметром пор 0,22 мкм, і концентрацію антитіл визначали способом Лоурі. Вміст пірогенів визначали, використовуючи аналіз лізату амебоцитів Limulus (LAL) (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Межа реєстрації у даному аналізі складала 0,06 EU/мг. Якщо тест був негативним, зразки вважали такими, що не містять ендотоксинів.

Кількісна оцінка IgG людини шляхом ELISA: Щоб визначити кількість антитіла людини, присутнього у надосадах і очищених вихідних розчинах, використовували наступний протокол. Специфічним антитілом кози проти Fc_γ людини (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) покривали 96-ямкові планшети (Nunc, Denmark) у карбонатному буфері по 0,5 мкг/ямку протягом 1 години при 37°C. Потім планшети блокували, використовуючи Super block (Pierce, Rockford, IL), протягом 30 хвилин з подальшим додаванням зразків у планшети. Одержували стандартні криві, використовуючи загальний IgG людини (Sigma) або очищений IgG1 або IgG4 людини (Kirin Brewery Co., Ltd). Планшети інкубували протягом 1 години при 37°C, промивали у PBS/1 % BSA/0,1 % твін-20 (Sigma), і зв'язане антитіло виявляли, використовуючи специфічне антитіло кози проти Fc_γ людини, кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratorie, West Grove, PA) протягом 1 години при 37°C. Додавали субстрат TMB (Sigma) на 10 хвилин, і реакцію зупиняли H₂SO₄ (LabChem, Pittsburgh, PA). OD вимірювали при 450 нм, використовуючи зчитувачий пристрій для мікропланшетів.

Культура клітин ссавців: Лінію клітин II-23 людини (субклон D7), лінію гібридами Т-клітин CD4+ (Ware et al. 1986 Lymphokine Res. 5: 313-24) підтримували у середовищі RPMI 1640, що містить 10 % FBS (HyClone Laboratories, Logan, UT) і 100 одиниць/мл пеніциліну/100 мкг/мл стрептоміцину (Life Technologies, Grand Island, NY). Лінію клітин HT29.14s людини, лінію клітин

EL4-hLIGHT і лінію клітин 293-hLIGHT підтримували у середовищі DMEM, що містить 10 % FBS (HyClone Laboratories, Logan, UT). Всі клітини ссавців культивували в інкубаторі з 5 % CO₂ і зволоженням при 37°C.

Виявлення анти-hLIGHT-антитіл шляхом ELISA: Титри, специфічність і продукування антитіл гібридомами визначали шляхом ELISA. Коротко, 96-ямкові планшети з плоским дном покривали 50 мкл FLAG-міченого розчинного hLIGHT у концентрації 5 мкг/мл у карбонатному буфері (pH 9,4) протягом ночі при 4°C або при 37°C протягом 1 години. Після промивання двічі PBS/0,1 % твін-20 планшети блокували PBS/1 % BSA/0,1 % твін-20 при 37°C протягом 1 години. Сироватку, надосад або очищене антитіло розбавляли блокуючим буфером, додавали в ямки і планшети інкубували протягом 1 години при 37°C. Планшети промивали 4 рази PBS/0,1 % твін-20 і додавали кон'юговане з пероксидазою антитіло вівці проти каппа людини для реєстрації (The Binding Site, Birmingham, UK) у розведенні 1:2000. Після 1-годинної інкубації при 37°C планшети промивали і додавали субстрат TMB (Sigma) та інкубували при кімнатній температурі протягом 10-30 хвилин. Реакцію зупиняли H₂SO₄ (LabChem) і вимірювали оптичну густину при 450 нм, використовуючи зчитувач пристрій для мікропланшетів.

Проточна цитометрія: Титри, специфічність і відносні афінності зв'язування антитіл визначали шляхом проточно-цитометричного аналізу, використовуючи стабільно трансдуковані hLIGHT лінії клітин EL4 або активовану протягом 6-15 годин PMA (40 нг/мл) + іономіцином (500 нг/мл) лінію Т-клітин II23.D7. Клітини промивали один раз у буфері для забарвлювання: PBS+2 % FBS+0,01 % NaN₃+10 мМ EDTA, потім ресуспендували у сироватці, надосаді або розчині очищених антитіл в об'ємі 50 мкл. Клітини інкубували з антитілами на льоді протягом 20 хвилин, двічі промивали у буфері для забарвлювання, потім ресуспендували у розчині другого міченого APC антитіла кози проти IgG людини (антитіло осла проти Ig людини-APC, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Після 20-хвилинної інкубації на льоді, клітини промивали один раз і фіксували протягом 10 хвилин в 1 % параформальдегіду або піддавали кінцевому промиванню, потім клітини ресуспендували у буфері для забарвлювання, і одержували дані для зразків, використовуючи проточні цитометри FACScan або FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA). Дані аналізували, використовуючи комп'ютерну програму CELLQUEST (Becton Dickinson Biosciences) або FLOW JO (TreeStar, Inc., San Carlos, CA).

Аналіз перехресного блокування анти-hLIGHT-антитіла: Використовували протокол ELISA, щоб визначити, чи зв'язують антитіла той самий епітоп hLIGHT. 96-ямкові планшети для ELISA NUNC з плоским дном покривали анти-hLIGHT-антитілом людини у карбонатному буфері у концентрації 2 мкг/мл протягом 1 години при 37 °C. Планшети промивали і потім блокували PBS/1 % BSA/твін-20. Потім анти-hLIGHT-антитіла людини попередньо інкубували з рекомбінантним FLAG-міченим розчинним hLIGHT людини протягом 30 хвилин при 4 °C. Комбінації антитіло-білок hLIGHT додавали у планшет та інкубували протягом 1 години при 4 °C. Після 3 промивань зв'язаний hLIGHT виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою Ig проти анти-FLAG-епітопної мітки миші M2 (Sigma). Інгібування у відсотках визначали, використовуючи OD кожного зразка у наступній формулі: % інгібування = (max - зразок/max)*100.

Аналіз цитокінів людини. Панель з 8 цитокінів людини у середовищі росту оброблених клітин HT29.14s вимірювали, використовуючи мультиплексну методику і дотримуючись інструкцій виробника (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Реєстрацію CCL20 у культуральному середовищі клітин HT29.14s здійснювали шляхом ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN), використовуючи інструкції виробника.

Аналіз in vitro опосередкованої антитілом блокади зв'язування експресованого на клітинній поверхні LIGHT з розчинними злитими білками рецептор-Fc. Клітини 1e5 EL4 hLIGHT інкубували з концентраціями, що ступінчасто змінюються, кожного антитіла протягом 30 хвилин при 4 °C. Потім до клітин додавали субнасичувальні кількості HVEM:Fc-біотин (3 мкг/мл) або LTβR:Fc-His (3 мкг/мл) (Alexis Biochemicals) та інкубували протягом 30 хвилин при 4 °C. Потім клітини промивали 2 рази 200 мкл FACS-буфера (1xPBS, 2 % FBS+0,02 % азида). HVEM:Fc-біотин або LTβR:Fc-His виявляли за допомогою 30-хвилинної інкубації або з SA-APC у концентрації 2,5 мкг/мл, або з анти-His-HRP, відповідно. Потім клітини аналізували у проточних цитометрах FACScaliber (Becton Dickinson). Мертві клітини виключали з аналізу на підставі графіку прямого розсіювання і бічного розсіювання, і обчислювали геометричні середні для кожної гістограми, використовуючи FLOWJO (TreeStar, San Carlos, CA, USA).

Виділення генів анти-hLIGHT-антитіл людини. Клітини гібридом, що культивуються (124E63, 124F23, 124E1, 124E13 і 124F19), які продукують антитіла E63 (IgG3), F23 (IgG4), E1 (IgG1), E13 (IgG1) і F19 (IgG1), відповідно, збирали центрифугуванням. З таких клітин очищали сумарну

РНК, використовуючи набір RNEASY (QIAGEN Inc., Valencia, CA), дотримуючись інструкцій виробника. Набір для ампліфікації кДНК SMART RACE (Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA) використовували для клонування кДНК, що кодує варіабельну область генів імуноглобулінів, на сумарній РНК клітин гібридом. Коротко, першу нитку кДНК одержували за допомогою зворотної транскриптази з 2 мікрограм РНК. Одержану кДНК використовували як матрицю для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), щоб ампліфікувати варіабельну область і частину константної області важкого і легкого ланцюгів (VH і VL, відповідно). 3'-праймери, використовувані для ампліфікації генів важкого і легкого ланцюга у реакціях 5'-RACE, являли собою HH-2 (SEQ ID NO: 64) (константна область Н-ланцюга) і HK-2 (SEQ ID NO: 65) (константна область легкого ланцюга), відповідно. Ампліфіковані послідовності також містили лідерні послідовності. Реакційна суміш складалася з наступних компонентів: 2,5 одиниці ДНК-полімерази PFU ULTRA (Stratagene, La Jolla, CA), 0,2 мкМ 3'-праймера (для важкого ланцюга: IgG1p, для легкого ланцюга: hk5, таблиця 2); 1X універсальної суміші праймерів А для 5'-кінця (суміш А праймерів UMP входить у набір SMART RACE), 200 мкМ суміші dNTP, 1 мМ MgCl₂, буфер Puff Ultra (кінцева концентрація 1×) і матриця кДНК.

Програма термоцикування складалася з 5 циклів: 94 °C x 30 секунд, 72 °C x 3 хвилини. 5 циклів: 94 °C x 30 секунд, 70 °C x 30 секунд, 72 °C x 3 хвилини. 25 циклів: 94 °C x 30 секунд, 68 °C x 30 секунд, 72 °C x 3 хвилини з подальшою елонгацією при 72 °C x 7 хвилин. Ампліфіковані фрагменти ДНК збирали із застосуванням електрофорезу в агарозному гелі і очищали, використовуючи набір для екстракції з гелю QIAQUICK (Qiagen Co., Ltd., Germany). Очищені фрагменти ДНК VH і LV інтегрували у вектор PCR 4 Blunt-TOPO, використовуючи набір для клонування Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), і кожною сконструйованою плазмідною трансформували *E. coli* і потім клонували. Нуклеотидні послідовності кожної вставки (HV і LV) у сконструйованих плазмідах аналізували, використовуючи специфічні універсальні праймери до вектора M13F (SEQ ID NO: 58) і M13R (SEQ ID NO: 59). На підставі послідовності, одержаної у випадку VH і VL, конструювали олігонуклеотидні праймери, щоб ампліфікувати відповідні VH і VL (див. таблицю 2).

кДНК, що кодують VH і VL E63, F23, E1 і F19, субклонували у ПЛР з векторів PCR4 Blunt-TOPO у вектор, що експресує IgG1. Оскільки E13 належав до підтипу IgG1 з одним каппа-ланцюгом (див. нижче), не було необхідності у субклонуванні кДНК E13 у векторі IgG1 для подальшого аналізу.

Спочатку конструювали олігонуклеотидні праймери, що містять сайти упізнання ферментами рестрикції 5'-SalI і 3'-NheI, щоб ампліфікувати варіабельну область важкого ланцюга (VH) у ПЛР. Наприклад, у випадку VH E63 реакцію ПЛР здійснювали, використовуючи як матрицю ДНК рТороЕ63VH mini-prep, як праймери E63HF85 (SEQ ID NO: 60) і E63HR38 (SEQ ID NO: 61) (див. таблицю 2) і ДНК-полімерази PFU ULTRA. Після розщеплення NheI і SalI ПЛР-продукт субклонували у векторі, що експресує IgG1 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KG1-Val Lark (модифікований вектор N5KG1 (патент США № 6001358)), що був попередньо розщеплений NheI і SalI (ДНК-фрагмент 8,9 тисяч пар основ). Наявність VH аналізували, використовуючи рестрикційне розщеплення.

Потім конструювали олігонуклеотидні праймери, що містять сайти упізнання ферментами рестрикції 5'BglII і 3'BsiWI, щоб ампліфікувати варіабельну область легкого ланцюга (VL) у ПЛР. Наприклад, після субклонування VH E63, як описано вище, VL E63 вбудовували у вектор N5KG1-Val Lark-VH за допомогою розщеплення ДНК-вектора BglII і BsiWI. Потім виділяли фрагмент ДНК довжиною 9,1 т.п.н. Подібно до конструкції VH конструювали набір праймерів для ПЛР VL так, щоб вони містили сайти упізнання 5'BglII і 3'BsiWI. Такі праймери, E63LF84 (SEQ ID NO: 62) і E63LR43 (SEQ ID NO: 63), використовували для ампліфікації VL з плазмідної ДНК рТороЕ63VL mini-prep. ПЛР-продукт розщеплювали BglII і BsiWI і виділяли, використовуючи електрофорез в агарозному гелі і очищення з гелю. Фрагмент, що містить E63VL, лігували з одержаним вектором довжиною 9,1 т.п.н. лігазою ДНК T4 і використовували для трансформації клітин Тор 10 (Invitrogen). Відбирали позитивні трансформанти *E. coli*. Такий експресуючий вектор, рG1K112E63, очищали, і присутність областей E63VL і E63VH підтверджували рестрикційним аналізом.

Створення векторів для одержання рекомбінантних антитіл F23G1, E1G1 і F19G1 здійснювали по суті так само, як у випадку E63G1. ПЛР-ампліфікацію F23VH здійснювали, використовуючи F23HF86 (SEQ ID NO: 66) і F23HR55 (SEQ ID NO: 67). Праймерами для ампліфікації F23VL були праймери F23LF36 (SEQ ID NO: 68) і F23LR43 (SEQ ID NO: 69). ПЛР-ампліфікацію E1VH здійснювали, використовуючи E1HFSalI (SEQ ID NO: 70) і E1HRNheI (SEQ ID NO: 71). ПЛР-ампліфікацію E1VL kappa(A), E1VL kappa(B) і E1VL kappa(C) здійснювали, використовуючи E1KF2+3BglII (SEQ ID NO: 74) у парі або з E1KR2BsiWI (SEQ ID NO: 75), або з

E1KR3BsiWI (SEQ ID NO: 76). ПЛР-ампліфікацію F19VH здійснювали, використовуючи F19HFSall (SEQ ID NO: 72) і F19HRNheI (SEQ ID NO: 73). ПЛР-ампліфікацію F19L kappa(A) і F19L kappa(B) здійснювали, використовуючи F19KR1+2BsiWI (SEQ ID NO: 77) і F19KF1+2+3BglII (SEQ ID NO: 79). ПЛР-ампліфікацію F19L kappa(C) здійснювали, використовуючи F19KR3BsiWI (SEQ ID NO: 78) і F19KF1+2+3BglII (SEQ ID NO: 79). Одержані вектори, pKLG1/F23, pKLG1/E1 і pKLG1/F19, також перевіряли, використовуючи розщеплення ферментами рестрикції і секвенування. F19L kappa(D) не ампліфікували у ПЛР внаслідок зсуву рамки зчитування, що виявили при аналізі послідовності, який давав С-кінцеву ділянку антитіла.

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області важкого ланцюга (VH) E63 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 43):

```

ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG
60
GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC
120
TGCATTGTCT CTGGTGGCTC CGTCAGCAGT GGTGGTТАCT ACTGGAGCTG GATCCGGCAG
180
CCCCCAGGGA AGGGAAGTGA GTGGATTGGG TATATCTATT ACAGTGGGAG CACCAACTAC
240
AACCCCTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC
300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCTGCGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATGGATT
360
ACTATGTTTC GGGGAGTTGG GTTCGACCCC TGGGGCCAGG GAACCCCTGGT CACCGTCTCC
420
TCA
480

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга kappa E63 (VL) (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 48):

```

ATGTCGCCAT CACAACATCAT TGGGTTTCTG CTGCTCTGGG TTCCAGCCTC CAGGGGTGAA 60
ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC CAAAGGAGAA AGTCACCATC 120
ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG CATTGGTAGT AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT 180
CAGTCTCCAA AGCTCCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG 240
TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTT ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA 300
GATGCTGCAG CATATTACTG TCATCAGAGT AGTAGTTTAC CTCTCACTTT CGGCGGAGGG 360
ACCAAGGTGG AGATCAAA 420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області важкого ланцюга F23 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 45):

```

ATGGACCTCC TGCACAAGAA CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCCTCCTCCT GGTGGCAGCT    60
CCCAGATGGG TCCTGTCCCA GGTGCAGCTA CAGCAGTGGG GCGCAGGACT GTTGAAGCCT    120
TCGGAGACCC TGTCCCTCAC CTGCGCTGTC TATGGTGGGT CCTTCAGTGG TTTACTACTGG    180
AACTGGATCC GCCAGCCCCC AGGGAAGGGG CTGGAGTGGG TTGGGGAAAT CAATCAGTAC    240
AACCCGTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC    300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGATA    360
GCAACAGCTG ATAAAGGGTA CTACGGTTTG GACGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC    420
GTCTCCTCA                                     480

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F23 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 50):

5

```

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC    60
AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA    120
GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG    180
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGA AAGTGGGGTC    240
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG    300
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC GCTCACTTTC    360
GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAAA                                     420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області важкого ланцюга E1 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 41):

10

```

ATGGAGTTGG GGCTGTGCTG GGTTTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT CCAGTGTGAG    60
GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC    120
TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTTCAGTAGA TTAAACATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA    180
GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTTATACCAT ATACTACGCA    240
GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGGATCTG    300
CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG GAGTATAGCA    360
GCAGCTTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAGCC CTGGTCACCG TCTCCTCA                                     420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №1 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 102):

15

```

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC    60
AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA    120
GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG    180
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGA AAGTGGGGTC    240
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG    300
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCG TACACTTTTG    360
GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAAA                                     420

```

20

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №2 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 46):

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAACCTGGTA CCAGCAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCAATGTA CACTTTTGGC 360
 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 420

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №3 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 103):

5

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTACA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA ACAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTG GACGTTCCGC 360
 CAAGGGACCA AGGTGGAAAT CAAA 420

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області важкого ланцюга E13 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 42):

10

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GATTTTCCTT GCTGCGATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG 60
 GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTAAAGCCTG GGGGGTCCCT TAGACTCTCC 120
 TGTGCAGCCT CTGGATTAC TCTCAGTAAC GCCTGGATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA 180
 GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGGCCGTATT AAAAGCAAAA TAGATGGTGG GACAACAGAC 240
 TACGCTGCAC CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AAACACGCTG 300
 TTTCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG TACCACAGCA 360
 ATGGCTGGTG CGTTTGGCTT TTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC CTCA 420

15

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E13 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 47):

```

ATGGAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA    60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC    120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA    180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA    240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG    300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCCAT GTACACTTTT    360
GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACGA                                420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області важкого ланцюга F19 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 44)

5

```

ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG    60
GTGCAGCTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC    120
TGCGCTGTCT ATGGTGGGTC STTCAGTGGT TACAACCTGGC ACTGGATCCG CCAGCCCCCA    180
GGGAAGGGGC TGGAGTGGAT TGGGGAAATC ACTCATAGTG GAAGCACCAA TTACAACCCG    240
TCCCTCAAGA GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG    300
CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGTGCGAGA GATTGCAGTG    360
GCTGGTACGG GCTACTACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC    420
TCA                                480

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 № 1 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 104):

10

```

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTAC TGCTCTGGGT CCCAGGTGCC    60
AGATGTGACA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA    120
GTCACCATCA CTTGCCGGGT GAGTCAGGGC ATTAGCAGTT ATTTAAATTG GTATCGGCAG    180
AAACCAGGGA AAGTTCCTAA GCTCCTGATC TATAGTGCAT CCAATTTGCA ATCTGGAGTC    240
CCATCTCGGT TCAGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACTAT CAGCAGCCTG    300
CAGCCTGAAG ATGTTGCAAC TTATTACGGT CAACGGACTT ACAATGCCCC TCCCACTTTC    360
GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA                                420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 №2 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 49):

15

```

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC    60
AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA    120
GTCACCATCA CTTGCAGGGC AAGTCGGGGC ATTAACAGTG CTTTTGCCTG GTATCAGCAG    180
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGA AAGTGGGGTC    240
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTACCAT CAGCAGCCTG    300
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC TCTCACTTTC    360
GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA                                420

```

Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області ланцюга каппа F19 №3 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 105):

20

```

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC      60
AGATGTGTCA TCTGGATGAC CCAGTCTCCA TCCTTACTCT CTGCATCTAC AGGAGACAGA      120

GTCACCATCA GTTGTCTGGAT GAGTCAGGGC ATTAGCAGTT ATTTAGCCTG GTATCAGCAA      180
AAACCAGGGA AAGCCCCTGA GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCACTTTGCA AAGTGGGGTC      240
CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCTGCCTG      300
CAGTCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTATT ATAGTTTCCC GTACACTTTT      360
GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAA                                     420

```

- 5 Нуклеотидна послідовність кДНК варіабельної області ланцюга каппа F19 №4 (від кодону ініціації (ATG) до кінця варіабельної області) (SEQ ID NO: 106):

```

ATGGAAGCCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA      60
GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC      120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GGGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT      180
GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC      240
AGGTTTCAGTG GCAGTGGGCC TGGGACAGAC TTTACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT      300
GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCATCCCGT TCGGCCAAGG      360
GACCAAGGTG GAGATTCAAA                                     420

```

- 10 Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга E63 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 3):

```

MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQESGPGI VKPSETLSLT CIVSGGSVSS GGYYSWIRQ      60
PPGKLEWIG YIYYSGSTNY NPSLKSRVTI SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARWI      120
TMFRGVGFDP WGQGLVTVS S                                     180

```

- 15 Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга каппа E63 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 8):

```

MSPSQLIGFL LLWVPASRGE IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQSIGS SLHWYQQKPD      60
QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGGTDF TLTINSLEAE DAAAYYCHQS SSLPLTFGGG      120
TKVEIK                                     180

```

- 20 Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга F23 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 5):

```

MDLLHKNMKN LWFFLLLVA PRWVLSQVQL QQWGAGLLKP SETLSLTCAV YGGSFSGYYW      60
NWIRQPPGKG LEWIGEINQY NPSLKSRVTI SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCAREI      120
ATADKGYGL DVWGQGTTVT VSS                                     180

```

- 25 Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга каппа F23 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 10):

```

MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDR VTITCRASQG ISSALAWYQQ      60
KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQFNSYPLTF      120
GGGTKVEIK                                     180

```


Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга E1 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 1):

5 **MELGLCWVFL VAILEGVQCE** VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSR FNMNWVRQAP 60
 GKGLEWVSYI SSSSYTIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLDL QMNSLRDEDT AVYYCARSIA 120
 AAFDYWGQGA LVTVSS 180

10 Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №1 (E1каппа(A)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 82):

MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SSLASVGDR VTITCRASQG ISSALAWYQQ 60
 KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQFNSYRTLL 120
 ARGPSWRS 180

15 Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №2 (E1каппа(B)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 6):

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLTWYQQK 60
 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSMYTFG 120
 QGTKLEIK 180

20 Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 №3 (E1каппа(C)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 83):

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSYRASQSVS SSYLAWYQQK 60
 PGQAPRLLIY GASNRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG 120
 QGTKVEIK 180

25 Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга E13 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 2):

MEFGLSWIFL AAILKGVQCE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTLSN AWMSWVRQAP 60
 GKGLEWVGRI KSKIDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL FLQMNSLKTE DTAVYYCTTA 120
 MAGAFGFWGQ GTLVTVSS 180

30 Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга каппа E13 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 7):

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK 60
 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPMYTF 120
 GQGTKLEIKR 180

35 Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга F19 (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 4)

 MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YNWHWIRQPP 60
 GKGLEWIGEI THSGSTNYPN SLKSRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCVREIAV 120
 AGTGYGMDV WQGTTTVTS S 180

Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 №1 (F19каппа(A)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 90):

5 **MDMRVPAQLL GLLLLWVPGA RCDIQLTQSP** SLSASVGDR VTITCRVSQG ISSYLNWYRQ 60
 KPGKVPKLLI YSASNLSQGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDVATYYG QRTYNAPPTF 120
 GGGTKVEIK 180

Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 №2 (F19каппа(B)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 9):

10 **MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP**
 KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG
 GGGTKVEIK
 SLSASVGDR VTITCRASQG INSAFAWYQQ 60
 TDFTLTISL QPEDFATYYC QQFNSYPLTF 120
 180

15 Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 №3 (F19каппа(C)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 91):

MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCVIWMQSP SLSASTGDR VTISCRMSQG ISSYLAWYQQ 60
 KPGKAPELLI YAASTLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISCL QSEDFATYYC QQYYSFPYTF 120
 GQGTKLEIK 180

20 Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 №4 (F19каппа(D)) (лідерна послідовність (жирним шрифтом) і варіабельна область) (SEQ ID NO: 92):

MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGV SYLAWYQQKP 60
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGPGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPVRPR 120
 DQGGDS 180

Таблиця 2

Синтезовані праймери ДНК

SEQ ID NO:	Назва	Послідовність 5' - 3'	Довжина
55	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22- мер
56	IgG1p	TCTTGTCACCTTGGTGTTGCTGGGCTTGTG	31- мер
57	HK5	AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC	30- мер
58	M13F	GTAACACGACGGCCAGTG	18- мер
59	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17- мер
60	E63HF85	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41- мер
61	E63HR38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37- мер
62	E63LF84	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGTCGCCATCACAACCTCATTG	42- мер
63	E63LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40- мер
64	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTG	25- мер
65	HK-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC	26- мер
66	F23HF86	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACCTCCTGCACAAGAAC	41- мер
67	F23HR55	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGT	34- мер
68	F23LF36	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42- мер
69	F23LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40- мер
70	E1HFSalI	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGG	41- мер
71	E1HRNheI	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGC	37- мер
72	F19HFSalI	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41- мер
73	F19HRNheI	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT	37- мер
74	E1KF2+3BglII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC	42- мер
75	E1KR2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTG	40- мер
76	E1KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG	40- мер
77	F19KR1+2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40- мер
78	F19KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTG	40- мер
79	F19KF1+2+3BglII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42- мер

- Миша KMTM описана, наприклад, в Fishwild et al. 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-51; Lonberg et al. 2005 Nat. Biotechnol. 9: 1117-1125; Tomizuka et al. 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-7; Tomizuka 1997 Nat Genet. 16: 133-43, кожна з публікацій включена у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі. Внаслідок природи миші KMTM (наприклад, більш ніж один ген каппа-ланцюга інтегрують у геном миші при створенні каппа-трансгенної лінії) можна одержати більш ніж одну кДНК легкого ланцюга каппа, експресовану клональною гібридомою. Щоб визначити, чи є так насправді, секвенують мінімум десять клонів кДНК. У тих випадках, коли

виділяють більш ніж одну кДНК легкого ланцюга каппа антитіла (наприклад, E1 і F19), створюють декілька конструкцій, що містять різні частини кДНК важкого ланцюга, об'єднані з кожною каппа-кДНК. Такі експресуючі конструкції трансфікують у клітини 293F, використовуючи 293FECTIN (Invitrogen, San Diego, CA). Потім надосади 72-годинної культури тестують стосовно активності антитіла, щоб ідентифікувати правильну пару (пари) важкого і легкого ланцюгів, що імуноспецифічно зв'язується з hLIGHT (наприклад, використовуючи Вестерн-блот, ELISA або інший подібний спосіб). У прикладі 3 нижче наведений ілюстративний спосіб характеристики антитіл (наприклад, E1 і F19), що мають різноманітні каппа-ланцюги.

Одержання рекомбінантного анти-hLIGHT-антитіла людини з клітин 293F: Суспензійні культури клітин 293F підтримували у середовищі для експресії Freestyle 293 при струшуванні ~120 об./хв. в інкубаторі з 8 % CO₂ і зволоженням при 37°C. Для тимчасової експресії рекомбінантних антитіл 3×10⁷ клітин 293F трансфікували 30 мкг кожної плазмиди, що кодує рекомбінантні IgG1-варіанти анти-hLIGHT-антитіл або E63, або F23, використовуючи 293-фектин (Invitrogen, Carlsbad, CA), дотримуючись інструкцій виробника. Трансфектантам давали можливість рости у суспензії у 30 мл середовища для експресії FREESTYLE 293 протягом 5 днів у нормальних умовах росту. Середовище росту збирали і клітини витягували центрифугуванням зі швидкістю 300 г з подальшим фільтруванням через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Концентрацію антитіл, присутніх у такому неочищеному матеріалі, визначають за допомогою ELISA hlgG і використовують для аналізу in vitro, щоб оцінити функціональні властивості антитіл підкласу, що виробляється після переключення.

РЕЗУЛЬТАТИ

Мишей KMTM імунізували розчинним рекомбінантним FLAG-міченим hLIGHT у CFA/IFA. Декілька мишей виробляли специфічні анти-hLIGHT-антитіла, при цьому діапазон hLIGHT-специфічних титрів IgG людини вимірювали, використовуючи ELISA і забарвлювання клітин hLIGHT-EL4 у FACS-аналізі. Спленоцити з організму мишей, у яких виявляли найбільш високу відповідь, зливали з клітинами мієломи, щоб одержати гібридами, які продукують анти-hLIGHT-антитіла людини. Продуктування анти-hLIGHT-антитіл окремими гібридами визначали у початковому скринінгу, використовуючи ELISA анти-hLIGHT. У такому скринінгу анти-FLAG-антитілом покривали планшет для уловлювання FLAG-міченого рекомбінантного hLIGHT, щоб спробувати успішно замаскувати FLAG-епітоп і запобігти виділенню гібридом, що продукують анти-FLAG-антитіло. Середовище з позитивних в ELISA клонів використовували для другого скринінгу за допомогою проточної цитометрії забарвленої лінії клітин hLIGHT-EL4, щоб підтвердити виявлення антитіл, які імуноспецифічно зв'язуються з нативною формою hLIGHT.

Позитивні гібридами тестували стосовно антагоністичної активності, ранжуючи здатність антитіл, які продукуються гібридомою, блокувати зв'язування HVEM:Fc і LTβR:Fc з клітинами hLIGHT-EL4. Таку блокуючу активність нормалізували стосовно концентрації антитіл, що визначається шляхом ELISA IgG людини. 15 переважних кандидатів клонували, використовуючи лімітуюче розведення, щоб одержати моноклональні гібридами, тоді як іншу частину заморозували. Зазначені 15 антитіл очищали у невеликому масштабі з розведених культур (<1 мг) для подальшої характеристики і ранжування на підставі наступних критеріїв: відносна афінність зв'язування hLIGHT, здатність блокувати зв'язування HVEM:Fc і LTβR:Fc людини з клітинами hLIGHT-EL4, перехресне блокування один одного і здатність блокувати опосередковану розчинним і експресованим на клітинній поверхні hLIGHT секрецію хемокіну з епітеліальних клітин ободової кишки лінії HT29.14s. На підставі таких досліджень одержані властивості 5 переважних відібраних кандидатів (E1, E13, E63, F23 і F19), які представлені на фіг. 3.

Кожне з моноклональних анти-hLIGHT-антитіл E1, E13, E63, F23 і F19 специфічно зв'язується з лінією активованих Т-клітин людини (II23.D7) і лінією клітин hLIGHT-EL4, що стабільно експресує hLIGHT, але не зв'язується з вихідними клітинами EL4 або спочиваючими клітинами II23.D7 (фіг. 1A). Зв'язування таких анти-hLIGHT-антитіл людини досягало насичення (фіг. 1B). Функціональну афінність рівноважного зв'язування кожного антитіла визначали титруванням кількості антитіла, необхідної для мічення клітин hLIGHT-EL4 (фіг. 2A і 2B). Здійснювали нелінійний регресійний аналіз, щоб визначити функціональну афінність зв'язування або EC50 для кожного кандидату (фіг. 3). Виявляли визначений діапазон функціональної афінності. Вважають, що низьке значення EC50, а також високий рівень забарвлювання (середня інтенсивність флуоресценції (MFI)) при насиченні є ідеальними для процесу ранжування і відбору.

Антитіла тестували шляхом ELISA, щоб визначити, чи конкурують вони один з одним за зв'язування з розчинним hLIGHT (фіг. 4). У даному аналізі ідентифікували дві групи епітопів hLIGHT. "Е-антитіла" (E1, E13 і E63) перехресно блокують один одного, і "F-антитіла" (F19 і F23)

перехресно блокують один одного. Однак, "Е-антитіла" не здатні перехресно блокувати "F-антитіла" і навпаки. Як передбачалося, всі антитіла у такому аналізі блокували самі себе.

Здатність E1, E13, E63, F23 і F19 блокувати зв'язування злитих білків HVEM:Fc і LT β R:Fc людини з експресованим на клітинній поверхні hLIGHT, досліджена в аналізах, що базуються на проточній цитометрії, показана на фіг. 5A і 5B і фіг. 6A і 6B, відповідно. У зазначених експериментах ступінчасто змінювані кількості кожного антитіла додавали до лінії клітин EL4-hLIGHT з подальшим додаванням субнасичувальної кількості злитого білка рецептора. Злиті білки рецепторів виявляли або з використанням анти-His-антитіл у випадку His-міченого LT β R:Fc, або з використанням стрептавідин-PE у випадку біотинільованого HVEM:Fc. Як показано, кожне з антитіл блокувало зв'язування будь-якого злитого білка рецептора з hLIGHT, на відміну від контрольного повністю людського антитіла проти вірусу грипу M2, яке не здійснювало впливу на зв'язування будь-якого білка Fc-рецептор. У кожному експерименті всі антитіла блокували зв'язування рецептора залежним від дози чином, що дозволяло проводити аналіз нелінійної регресії, щоб визначити дозу IC₅₀ (фіг. 3). Одержані значення враховували при ранжуванні потенційних кандидатів.

Щоб безпосередньо підтвердити, що антагоністичні антитіла відповідно до винаходу блокують hLIGHT-опосередковану передачу сигналу, розробили аналіз для вимірювання hLIGHT-опосередкованої передачі сигналів *in vitro*. З цією метою лінію епітеліальних клітин ободової кишки HT29.14s, які експресують і LT β R, і HVEM, обробляли ступінчасто змінюваними кількостями розчинного hLIGHT, і середовище росту аналізували стосовно наявності секретованих цитокінів протягом декількох днів. Використовуючи стандартні аналізи ELISA і мультиплексний аналіз серії суспензій, визначили, що hLIGHT індукує CCL20, IL-8 і RANTES залежним від дози чином (фіг. 7 і фіг. 8A і 8B). На фіг. 7 показане титрування дозою розчинного hLIGHT, при цьому збір здійснювали на 3 день. Рекombінантний TNF використовували як позитивний контроль для індукції хемокинів, опосередкованої рецепторами TNF, тоді як лімфотоксин (LT $\alpha_1\beta_2$) використовували як позитивний контроль передачі сигналу, опосередкованої LT β R. FLAG-мічену бактеріальну лужну фосфатазу (FLAG-BAP) використовували як негативний контроль у вигляді міченого нерелевантного білка. Як передбачалося, рівні хемокинів, що продукуються при контакті клітин з hLIGHT, були еквівалентні рівням хемокинів, індукованих LT $\alpha\beta$, тоді як TNF був більш ефективним в індукції CCL20 і IL-8, але індуквав подібні рівні RANTES. Такий аналіз клітинної відповіді використовували для вимірювання передачі сигналу hLIGHT і оцінки здатності антитіл відповідно до винаходу блокувати hLIGHT-опосередковані події передачі сигналів *in vitro*.

В аналізі hLIGHT-опосередкованої індукції CCL20 HT29.14s ступінчасто змінювані кількості анти-hLIGHT-антитіл попередньо інкубували з незмінною кількістю рекombінантного розчинного hLIGHT, потім додавали до клітин HT29.14s (фіг. 9). Рівні хемокинів аналізували на 3 або 4 день після обробки і порівнювали з рівнями, індукованими розчинним hLIGHT окремо або розчинним hLIGHT, попередньо інкубованим з нерелевантним повністю людським антитілом проти білка вірусу грипу M2 як контроль ізотипу. У зазначених аналізах тестовані антитіла відповідно до винаходу блокували опосередковану розчинним hLIGHT індукцію CCL20 залежним від дози чином. У деяких випадках за допомогою нелінійного регресійного аналізу можна було одержати значення IC₅₀.

Не маючи наміру бути пов'язаними з яким-небудь конкретним механізмом або теорією, припускають, що передача сигналу, що ініціюється зв'язуванням hLIGHT на клітинній поверхні з його рецепторами на інших клітинах, може бути необхідною для прояву коstimулюючої активності Т-клітин, що спостерігається, опосередкованої взаємодіями HVEM, або для підвищеного продукування хемокинів, опосередкованого LT β R, експресованим на клітинах стромального або епітеліального походження у кишечнику, селезінці або лімфатичних вузлах. Індукція CCL20 у кишечнику, очевидно, більшою мірою регулюється експресією лігандів LT β R на клітинах, які контактують з епітеліальними клітинами, ніж розчинними факторами (Rumbo et al. 2004, Gastroenterology 127: 213-23). Тому розробили аналіз передачі сигналу hLIGHT клітинної поверхні, щоб оцінити здатність одержаних авторами антитіл блокувати hLIGHT клітинної поверхні. У такому аналізі використовували фіксовані формаліном клітини hLIGHT-EL4, щоб індукувати хемокини за допомогою їх інкубації з клітинами HT29.14s так само, як в аналізі розчинного hLIGHT. Зазначені клітини індукували CCL20 і RANTES до рівнів, еквівалентних рівням, індукованим розчинним hLIGHT. У тому випадку, коли ступінчасто змінювані кількості анти-hLIGHT-антитіл попередньо інкубували з фіксованими клітинами hLIGHT-EL4, індукція RANTES була блокована до рівнів, які спостерігаються без додавання клітин, що експресують hLIGHT (фіг. 10). В ідентичних експериментах CCL20 був інгібований подібним чином. Одержані

дані, взяті разом, показують, що антитіла відповідно до винаходу можуть блокувати передачу сигналу *in vitro* як розчинного, так і зв'язаного з мембранами hLIGHT.

ПРИКЛАД 2 - ХАРАКТЕРИСТИКА КОМЕРЦІЙНО ДОСТУПНИХ МИШАЧИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ПРОТИ БІЛКА ЛЮДИНИ

Перехресне блокування антитіл. Експерименти з перехресного блокування проводили, як описано у прикладі 1, використовуючи мишачі моноклональні анти-hLIGHT-антитіла, доступні з R&D Systems ("мАт миші R&D") і Abnova ("мАт миші Abnova"), а також моноклональні анти-hLIGHT-антитіла людини, охарактеризовані у прикладі 1, щоб оцінити, який епітоп hLIGHT зв'язується антитілами. Результати представлені на фіг. 11.

Результати показують, що мАт миші R&D зв'язується з таким же епітопом, що і моноклональні антитіла E1, E13 і E63 людини ("Е-антитіла людини"), а також з таким же епітопом, що і моноклональні антитіла людини F19 і F23 ("F-антитіла людини"). Таким чином, на відміну від моноклональних анти-hLIGHT-антитіл людини Е і F, ідентифікованих у прикладі 1, які, як виявлено, імуноспецифічно зв'язуються тільки з одним з двох окремих епітопів, мАт миші R&D зв'язуються з обома групами епітопів hLIGHT. Тобто, Е-антитіла людини і F-антитіла людини, ідентифіковані у прикладі 1, перехресно не блокують один одного. Е-антитіла людини перехресно блокували інші Е-антитіла людини, а F-антитіла людини перехресно блокували інші F-антитіла людини; тоді як всі Е-антитіла людини і F-антитіла людини здатні перехресно блокували мАт миші R&D. Подібним чином, мАт миші R&D перехресно блокували Е-антитіла людини, а також F-антитіла людини.

Результати також показують, що мАт миші Abnova не зв'язують жодний з епітопів, які зв'язуються Е-антитілами людини і F-антитілами людини. Тобто, мАт миші Abnova перехресно не блокувалися антитілами E1, E13, E63, F19 або F23 людини, і мАт миші Abnova не були здатні блокувати антитіла E1, E13, E63, F19 або F23 людини.

Активність антитіл, що блокує зв'язування HVEM:Fc з клітинами 293 hLIGHT. Моноклональні анти-hLIGHT-антитіла E1, E13 і F19 людини, мАт миші R&D, комерційно доступні поліклональні анти-hLIGHT-антитіла кози (R&D Systems) і кролячі поліклональні анти-hLIGHT-антитіла (eBioscience) тестували стосовно їх здатності блокувати зв'язування HVEM:Fc з клітинами 293, що експресують hLIGHT, як описано у прикладі 1. Результати показані на фіг. 12 і фіг. 14В. Всі чотири моноклональних антитіла здатні інгібувати зв'язування залежним від дози чином, як визначено в аналізі FACS. Поліклональні антитіла кози R&D, на відміну від кролячого поліклонального антитіла eBioscience, також здатне інгібувати зв'язування HVEM:Fc.

Активність антитіл, що блокує зв'язування LTβR:Fc з клітинами 293 hLIGHT. Моноклональні анти-hLIGHT-антитіла E1 і E13 людини, мАт миші R&D, комерційно доступні поліклональні анти-hLIGHT-антитіла кози (R&D Systems) і кролячі поліклональні анти-hLIGHT-антитіла (eBioscience) тестували стосовно їх здатності блокувати зв'язування LTβR:Fc з клітинами 293, що експресують hLIGHT, як описано у прикладі 1. Результати показані на фіг. 13 і на фіг. 14В. Всі чотири моноклональних антитіла здатні інгібувати зв'язування залежним від дози чином, як визначено в аналізі FACS. Поліклональні антитіла кози R&D, на відміну від кролячого поліклонального антитіла eBioscience, також здатне інгібувати зв'язування LTβR:Fc.

Зв'язування з нативним і денатурованим hLIGHT. П'ять мікрограмів розчинного LIGHT людини або кип'ятили у 2 x буфері для зразків з SDS (денатурований), або не піддавали обробці (нативний), і потім в обох випадках серійно розводили, щоразу 6-кратно. 5 мкл кожного розведення hLIGHT одночасно наносили плямами на гідратовані мембрани PVDF з порами 0,2 мкм (Invitrogen, Carlsbad, CA), використовуючи 8-канальну піпетку. Блотам давали можливість висохнути на повітрі, потім повторно гідратували, блокували (1xTBST (Тріс-сольовий буфер з твіном-20) + 2,5 % знежиреного молока + 0,02 % азиду натрію). Кожний блот аналізували, використовуючи як зонд 5 мкг/мл кожного першого антитіла (див. нижче). Блоти 3 рази промивали в 1xTBST, потім додавали біотинільовані другі Ат (біотин-антитіло кози проти Ig людини (Vector Labs, Burlingame, CA), біотин-антитіло кози проти Ig миші (Jackson labs, Bar Harbor, ME), біотин-антитіло миші проти Ig кози (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, MO)) у концентрації 5 мкг/мл. Блоти 3 рази промивали в 1xTBST, потім додавали super-SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Для реєстрації застосовували хемілюмінесценцію, використовуючи набір для реєстрації ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), і сигнал визуалізували, експонуючи з визуалізуючою плівкою X-OMAT AR (Kodak, Rochester, New York).

Першими антитілами, що тестуються, були антитіла анти-hLIGHT-мАт людини E1, E13, E63, F19, F23 (див. приклад 1), мишачі моноклональні анти-hLIGHT-антитіла, комерційно доступні з R&D Systems ("мАт миші R&D") і Abnova ("мАт миші Abnova"), препарат поліклональних анти-hLIGHT-антитіл кози (R&D Systems "пАт кози R&D") і два препарати кролячих поліклональних

анти-hLIGHT-антитіл (eBioscience ("пАт кролика eBioscience") і Peprotech ("пАт кролика Peprotech"))).

Результати показані на фіг. 15 і фіг. 16. Моноклональні анти-hLIGHT-«Е-антитіла» людини відповідно до винаходу (Е1, Е13 і Е63), тестовані у такому аналізі, імуноспецифічно зв'язуються як з нативними, так і денатурованими формами розчинного hLIGHT (фіг. 15А і фіг. 16). Антитіло Е63 імуноспецифічно зв'язується з більш низькими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 3,9 нг нативного hLIGHT), ніж з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 139 нг денатурованого hLIGHT). Антитіло Е1 також імуноспецифічно зв'язується з більш низькими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 23 нг нативного hLIGHT) у порівнянні з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 139 нг денатурованого hLIGHT). Антитіло Е13 імуноспецифічно зв'язується як з нативною, так і з денатурованою формами hLIGHT з найменшою межею реєстрації 0,64 нг у випадку обох форм hLIGHT.

На відміну від моноклональних анти-hLIGHT-«Е-антитіл» людини моноклональні анти-hLIGHT-«F-антитіла» людини відповідно до винаходу (F19 і F23), тестовані у даному аналізі, імуноспецифічно зв'язуються з нативною формою розчинного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 23 нг нативного hLIGHT), але не з денатурованою формою навіть при найвищих (>5000 нг) концентраціях денатурованого hLIGHT (фіг. 15А і фіг. 16).

Кожне з комерційно доступних моноклональних анти-hLIGHT-антитіл миші (мАт миші R&D і мАт миші Abnova), тестованих у даному аналізі, імуноспецифічно зв'язується як з нативною, так і денатурованою формами розчинного hLIGHT. мАт миші R&D імуноспецифічно зв'язується з більш низькими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 23 нг нативного hLIGHT) у порівнянні з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 139 нг денатурованого hLIGHT). мАт миші Abnova імуноспецифічно зв'язується приблизно з рівними концентраціями як нативної, так і денатурованої форми розчинного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,64 нг нативного або денатурованого hLIGHT, відповідно).

Кожне з трьох комерційно доступних препаратів поліклональних анти-hLIGHT-антитіл (пАт кози R&D, пАт кролика eBioscience і пАт кролика Peprotech) зв'язується як з нативною, так і з денатурованою формами розчинного hLIGHT. пАт кози R&D імуноспецифічно зв'язується з трохи меншими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,04 нг нативного hLIGHT) у порівнянні з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,13 нг денатурованого hLIGHT). пАт кролика eBioscience також імуноспецифічно зв'язується з трохи меншими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,4 нг нативного hLIGHT) у порівнянні з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 1,2 нг денатурованого hLIGHT). Подібним чином пАт кролика Peprotech також імуноспецифічно зв'язується з трохи меншими концентраціями нативного hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,04 нг нативного hLIGHT) у порівнянні з денатурованим hLIGHT (найменша межа реєстрації складає 0,13 нг денатурованого hLIGHT).

Інгібування біологічної активності клітин, що експресують рецептор hLIGHT. Також проводили експерименти, які описані у прикладі 1, щоб визначити, чи здатні комерційно доступні моноклональні анти-hLIGHT-антитіла миші конкурентно блокувати зв'язування розчинного hLIGHT з експресованим на клітинній поверхні LTβR і HVEM на клітинах HT29.14s. Результати представлені на фіг. 17 (CCL20) і фіг. 18 (RANTES) і показують, що ні мАт миші R&D, ні мАт миші Abnova не здатні інгібувати LIGHT-опосередковане продукування хемокинів CCL20 або RANTES такими клітинами, тоді як мАт Е13 людини і F23 людини здатні зменшувати секрецію цитокінів до вихідних рівнів.

ПРИКЛАД 3 - ХАРАКТЕРИСТИКА КАППА-ЛАНЦЮГІВ АНТИ-hLIGHT-АНТИТІЛ ЛЮДИНИ F19 І Е1

Способи, обговорювані у прикладі 1, використовували для того, щоб знайти переважну пару каппа ланцюг - важкий ланцюг антитіл, що продукуються гібридами Е1 і F19. На підставі результатів таких експериментів показали, що Е1каппа(В) (SEQ NO: 6) є переважним легким ланцюгом каппа hLIGHT-антитіл, що продукуються гібридом Е1, і F19каппа(В) (SEQ NO: 9) є переважним легким ланцюгом каппа hLIGHT-антитіл, що продукуються гібридом F19.

Рекомбінантні каппа-однотанцюжкові антитіла одержували у результаті тимчасової трансфекції експресуючих векторів ссавців, що містять гени важкого ланцюга, спарені з одним з окремих генів ланцюга каппа, які існували у вихідних клітинах гібридом. Потім одержаний матеріал тестували паралельно з очищеними антитілами, одержаними з відповідних вихідних гібридом.

Аналізи зв'язування антитіл здійснювали, як описано у прикладі 1. Пара каппа-ланцюг - важкий ланцюг, що містить Е1каппа(В) або F19каппа(В), специфічно забарвлювала лінії клітин,

стабільно трансфіковані hLIGHT (НЕК 293-hLIGHT), у такому ж ступені, як і відповідні антитіла, що продукуються вихідною гібридомою (фіг. 19).

Експерименти з перехресного блокування на основі ELISA здійснювали, як зазначено у прикладі 1, і результати показали, що такі рекомбінантні антитіла упізнають ті самі епітопи на hLIGHT, що і Ат вихідних гібридом (фіг. 20).

Потім каппа-одноланцюжкові рекомбінантні антитіла тестували, як описано у прикладі 1, стосовно їх здатності блокувати зв'язування експресованого на клітинній поверхні hLIGHT з розчинними злитими формами рецептор-Fc як HVEM, так і LT β R людини (фіг. 21). Рівні блокади не були ідентичні вихідним Ат.

Нарешті, рекомбінантні каппа-одноланцюжкові антитіла тестували стосовно їх здатності інгібувати LIGHT-опосередковану секрецію CCL20 з епітеліальних клітин ободової кишки HT29, як описано у прикладах 1 і 2 (фіг. 22 і фіг. 23). У таких експериментах інкубація розчинного hLIGHT з анти-hLIGHT-антитілами блокує опосередковану hLIGHT секрецію CCL20 з клітин HT29.14s, подібно до вихідних гібридом.

Крім того, каппа-одноланцюжкові рекомбінанти також зберігають специфічність антитіл, що продукуються вихідними гібридомами, у дот-блот-аналізі з використанням нативного LIGHT у порівнянні з денатурованим LIGHT (дані не показані).

Одержані результати, взяті разом, свідчать, що E1каппа(B) (SEQ ID NO: 6) є переважним легким ланцюгом каппа для застосування у комбінації з важким ланцюгом E1 (SEQ ID NO: 1), і F19каппа(B) (SEQ ID NO: 9) є переважним легким ланцюгом каппа для застосування у комбінації з важким ланцюгом F19 (SEQ ID NO: 4).

ПРИКЛАД 4 - ЗВ'ЯЗУВАННЯ АНТИТІЛ І ОПОСЕРЕДКОВАНА АНТИТІЛАМИ БЛОКАДА ЗВ'ЯЗУВАННЯ HVEM:Fc І LT β R:Fc З ВАРІАНТАМИ LIGHT, ОБУМОВЛЕНИМИ ОДНОНУКЛЕОТИДНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ (SNP)

Існують, щонайменше, два несинонімічних варіанти, обумовлених одонуклеотидним поліморфізмом (SNP), для LIGHT людини (фіг. 24). Один SNP-варіант кодує або глутамінову кислоту (E), або лізин (K) у положенні амінокислоти 214, а інший SNP-варіант кодує або серин (S), або лейцин (L) у положенні амінокислоти 32. Як показано на фіг. 24A-24B, частота алелей кожного SNP-варіанту серед різних етнічних популяцій варіює. Відповідно, hLIGHT-антитіла, які зв'язують даний SNP-варіант, можуть бути більш ефективними для лікування або профілактики hLIGHT-опосередкованого захворювання або його симптому у тих етнічних популяціях, в яких більш часто зустрічається даний SNP-варіант.

У даному прикладі показано, що hLIGHT-антитіла, запропоновані у даному винаході, зв'язують несинонімічні SNP-варіанти hLIGHT, які присутні у позаклітинних і цитоплазматичних доменах hLIGHT. Зв'язування таких антитіл з SNP-варіантами також корелює зі здатністю антитіла ефективно блокувати зв'язування HVEM:Fc і LT β R:Fc з SNP-варіантом hLIGHT, а також ефективно блокувати біологічну активність клітин, що експресують рецептор hLIGHT.

Зв'язування антитіл. Титрування дозами антитіл F23 і E1каппа(B) здійснювали, як описано у прикладі 1, щоб визначити, чи зв'язують такі антитіла експресовані на клітинній поверхні SNP-варіанти hLIGHT. У таких експериментах використовували лінію клітин EL4, яку одержували, по суті, як описано у прикладі 1, і яка стабільно експресувала на поверхні відповідний SNP-варіант hLIGHT. Як показано на фіг. 25A і 25C, відповідно, кожне з антитіл F23 і E1каппа(B) зв'язувало SNP-варіанти 214E-32S і 214E-32L. Однак, як показано на фіг. 25B, тільки F23, але не антитіло E1каппа(B), упізнавало SNP-варіант 214K-32S.

Також тестували антитіла F23 (IgG1), F19, E63 і E1каппа(B), щоб визначити, чи існує відмінність у здатності "F-антитіл" і "E-антитіл" упізнавати яку-небудь форму SNP-варіанту. Як показано на фіг. 26A і 26B, антитіла F23 і F19 зв'язують обидві SNP-форми, 214E і 214K, hLIGHT. Однак, антитіла E63 і E1каппа(B) зв'язують тільки переважну форму LIGHT 214E, і не зв'язують 214K (фіг. 26A і 26B).

Блокуюча активність антитіл стосовно зв'язування HVEM:Fc і LT β R:Fc з SNP-варіантом LIGHT 214K-32S. Оскільки антитіло F23 зв'язує і переважну форму (214E), і менш поширену форму (214K) варіантів LIGHT, потім визначали, чи може антитіло F23 блокувати зв'язування HVEM:Fc або LT β R:Fc. Опосередковану антитілом блокаду злитих з рецепторами білків здійснювали, як описано у прикладі 1. Коротко, лінію клітин EL4-214K-32S інкубували зі зростаючими кількостями анти-LIGHT-антитіл з подальшим додаванням або HVEM:Fc, або LT β R:Fc. Вплив попередньої інкубації на зв'язування рецепторів оцінювали за допомогою реєстрації або HVEM:Fc, або LT β R:Fc, як описано у прикладі 1. Як показано на фіг. 25D, антитіло F23 ефективно блокувало зв'язування як HVEM:Fc, так і LT β R:Fc, з 214K-32S-варіантом LIGHT.

Інгібування опосередкованої SNP-варіантом LIGHT, експресованим на клітинній поверхні, біологічної активності клітин, що експресують рецептор LIGHT. Дане дослідження було почато для визначення здатності моноклональних анти-hLIGHT-антитіл людини, які, як показано раніше, зв'язуються з обома SNP-варіантами 214K і 214E hLIGHT, також ефективно блокувати секрецію RANTES в епітеліальних клітинах ободової кишки людини, HT29.14s, які експресують як LT β R, так і HVEM, або за допомогою експресованого на клітинній поверхні SNP-варіанту hLIGHT 214E або 214K, або за допомогою розчинних SNP-варіантів hLIGHT. У дослідженні індукції RANTES HT29.14s, опосередкованої LIGHT, експресованим на клітинній поверхні, ступінчасто змінювані кількості анти-hLIGHT-антитіл попередньо інкубували з постійною кількістю клітин, які експресують SNP-варіанти hLIGHT (214K або 214E). Рівні хемокинів аналізували на 3 день після обробки і порівнювали з рівнями, індукованими розчинним hLIGHT окремо, клітинами, що експресують hLIGHT, окремо або клітинами, попередньо інкубованими з нерелевантним IgG людини як білка, що є контролем ізотипу.

У таких аналізах антитіла, пропоновані у даному винаході (F19 і F23), блокували опосередковану розчинним hLIGHT і обома експресованими на клітинній поверхні SNP-варіантами hLIGHT (214E або 214K) індукцію RANTES залежним від дози чином. Комерційно доступне моноклональне анти-hLIGHT-антитіло миші, доступне з R&D systems (мАт миші R&D, що описане у прикладі 1), було не здатне блокувати опосередковану або розчинним, або експресованим на клітинній поверхні hLIGHT секрецію хемокинів незалежно від SNP-варіанту. Обидва позитивних контролю, і експресовані на клітинній поверхні варіанти hLIGHT, і розчинний рекомбінантний hLIGHT, індукували еквівалентні рівні RANTES, і попередня інкубація негативного контролю ізотипу hIgG або з експресованими на клітинній поверхні варіантами hLIGHT, або з розчинним рекомбінантним hLIGHT, значимо не знижувала рівні RANTES.

Обговорення. З тридцяти одонуклеотидних поліморфних варіантів (SNP) у геномному локусі hLIGHT, існують, щонайменше, два несинонімічних hLIGHT, дані про частоту зустрічей яких наведені на фіг. 24. Один кодує глутамінову кислоту (~0,9) або лізин (0,1) у положенні амінокислоти 214 hLIGHT, і залишки позаклітинної області hLIGHT. Інший кодує або серин (0,99), або лейцин (0,011) в амінокислотному залишку 32 і залишки цитоплазматичної області hLIGHT. Геномний локус hLIGHT знаходиться в області хромосоми ch19p13.3, яка містить локус схильності до запального захворювання кишечника (Rioux et al. (2000) Am. J. Hum. Genet. 66: 1863-70), і відповідно це свідчить про те, що SNP може корелювати з частотою захворювання IBD. Тому було цікаво визначити, чи здатні антагоністичні анти-hLIGHT-антитіла, пропоновані у даному винаході, упізнавати несинонімічні SNP-варіанти hLIGHT.

У даному прикладі автори тестували здатність анти-hLIGHT-антитіл зв'язувати SNP-варіанти hLIGHT, стабільно експресовані на поверхні ліній клітин EL4. Як показано на фіг. 25A і 25B, F23 зв'язує обидва SNP-варіанти, 214E і 214K, тоді як E1каппа(B) зв'язує тільки переважну форму 214E. Подібним чином F23 блокує зв'язування або HVEM:Fc, або LT β R:Fc з такими клітинами (фіг. 25D). Як припускалося, цитоплазматичний SNP, очевидно, не впливає на зв'язування будь-якого з антитіл (фіг. 25C). У тому випадку, коли тестували "Е-антитіла" і "F-антитіла", тільки F-антитіла були здатні зв'язуватися з обома SNP-варіантами, 214K і 214E (фіг. 26A і 26B). Комерційне мАт миші R&D також було здатне зв'язувати обидва SNP-варіанти (дані не показані).

Крім блокування анти-hLIGHT-антитілами зв'язування розчинних варіантів рецепторів з SNP-варіантами LIGHT in vitro, індукція хемокинів, опосередкована експресованим на клітинній поверхні SNP hLIGHT, також інгібувалася анти-hLIGHT-антитілами відповідно до винаходу. У даному аналізі лінії клітин EL4, що експресують SNP-варіанти 214E або 214K LIGHT, фіксували формаліном і використовували для обробки лінії епітеліальних клітин ободової кишки HT29. Як показано на фіг. 27, такі лінії клітин окремо індукували подібні рівні RANTES у порівнянні з 1 мкг розчинного LIGHT. Анти-hLIGHT-«F-антитіла» тестували, попередньо інкубуючи лінії клітин, що експресують hLIGHT, зі ступінчасто змінюваними кількостями антитіл і порівнювали з контролем ізотипу або комерційно доступним мАт миші R&D. Обидва антитіла F23 і F19каппа(B) інгібували секрецію RANTES, опосередковану лінією клітин, що експресують будь-який з SNP-варіантів. Однак, мАт миші R&D і негативний контроль ізотипу людини не інгібували секрецію RANTES, опосередковану будь-яким з SNP-варіантів LIGHT. Зазначені результати одержані, незважаючи на той факт, що мАт миші R&D здатне зв'язувати обидва SNP-варіанти. Такі результати не тільки демонструють, що антитіла F23 і F19каппа(B) відповідно до даного винаходу блокують передачу сигналу SNP-варіантом LIGHT, але також перевершують комерційне мАт миші R&D.

ПРИКЛАД 5 - ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ IN VIVO 124F23 У МОДЕЛІ ГОСТРОГО ЗАХВОРЮВАННЯ "КСЕНОГЕННИЙ ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИ ХАЗЯЇНА"

У даному прикладі оцінювали ефективність *in vivo* анти-hLIGHT-антитіла, пропонованого у даному винаході, у мишачій моделі гострого захворювання "ксеногенний трансплантат проти хазяїна" (GVHD). У такій моделі показано, що антитіло F23 знижує загальну макроскопічну патологію (діарею, запалення очеревини і асцити, і запалення кишечника) і гістопатологію (тяжкість запалення, об'єм запалення, ушкодження/атрофію ворсинок і відсоток ураження), а також знижує кількість Т-клітин у селезінці.

Очищення PBMC людини з цільної крові: Цільну кров збирали від здорових донорів у віці 18-50 років за звичайною програмою донорів крові у Scripps Green Hospital (La Jolla, CA), і додавали гепарин, щоб запобігти згортанню. Расу, етнічну належність або стать не вказували. Кров розбавляли у PBS і потім нашаровували на FICOLL-PLAQUE Plus (Amersham Biosciences). Мононуклеарні клітини відділяли від сироватки і тромбоцитів центрифугуванням при 1800 об./хв. без гальмування. Шар на межі поділу, що містить PBMC, потім збирали і промивали два рази PBS.

Модель гострого захворювання "трансплантат проти хазяїна" *in vivo*: Модель гострого захворювання "ксеногенний трансплантат проти хазяїна" використовували для тестування терапевтичних можливостей антитіла людини проти LIGHT людини F23 (124F23G1) *in vivo* (Watanabe et al. 2006 1006. Clin. Immunol. 120: 247-59), по суті, як зображено на фіг. 28. Коротко, самцям мишей з тяжким комбінованим імунodefіцитом (SCID) 5-10-тижневого віку ін'єктували у -2 день 20 мкг антитіла щура проти бета-ланцюга рецептора IL2 миші (IL2R β) (TM β 1, Tanaka et al. 1993 J. Exp. Med. 178: 1103), щоб виснажити ендogenous клітини-природні кілери миші. Наступного дня (день -1) миші одержували сублетальну дозу опромінення 2,5 Гр, використовуючи цезієве джерело, щоб забезпечити міграцію клітин людини у кишковий тракт. Наступного дня (день 0) миші одержували 10 мільйонів сумарних мононуклеарних клітин периферичної крові людини у PBS за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції, після якої відразу ж проводили внутрішньовенну ін'єкцію антитіла людини проти LIGHT людини (124F23G1) або негативного контрольного hlgG1-антитіла (антитіла проти динітрофенолу (анти-DNP), Kirin Brewery Co. Ltd.) у дозі 100 мкг у 100 мкл PBS. Т-клітини людини розмножували та індукували хворобу, подібну до захворювання "трансплантат проти хазяїна" і її симптоми, що приводять, наприклад, до втрати маси, гематурії, асцити, запальних клітинних інфільтратів у печінці і кишечнику і, у кінцевому результаті, до загибелі. Захворювання головним чином опосередковане Т-клітинами людини, тому що перенесення Т-клітин окремо індукує подібні симптоми. Маса тіла визначали кожні 3-4 дні, і миші одержували анти-IL2R β -антитіло щотижня. На 12 день мишей умертвляли і аналізували макроскопічну патологію і симптоми захворювання, спленоцити збирали для проточно-цитометричного аналізу, сліпі кишки для гістології і сироватку збирали для аналізу цитокінів і антитіл людини (Watanabe et al. 1006. Clin. Immunol. 120: 247-59).

Функціональний аналіз *in vivo* моноклональних антитіл людини проти LIGHT людини. Макроскопічну патологію, що спостерігається на 12 день, оцінювали наступним чином: діарея (0 або 1), крововилив у кишечнику і черевній порожнині і перитоніт (кожний оцінюється 0, 1, 2 або 3, що означає відсутність, слабку, помірну або тяжку патологію, відповідно). Суму всіх симптомів захворювання використовують для визначення загальної оцінки макроскопічної патології. Як показано на фіг. 29, у всіх мишей, які одержували контрольне антитіло або окремо PBMC (без ін'єкції антитіла), спостерігали симптоми GVHD з більш високими оцінками патології, ніж у мишей, які одержували анти-LIGHT-антитіло 124F23G1.

Гістопатологічний аналіз здійснювали на зрізах сліпої кишки, забарвлених гематоксиліном-еозином, і оцінювали наступним чином: тяжкість запалення, об'єм запалення, ушкодження/атрофія ворсинок і відсоток ураження (кожна категорія оцінюється 0, 1, 2 або 3, як відсутність, слабка, помірна або тяжка патологія, відповідно). Кінцева оцінка являла собою суму оцінок для кожної категорії, при цьому максимальна оцінка для кожної миші складала 12. Як показано на фіг. 30, миші, які одержували або контрольне антитіло, або PBMC окремо (без ін'єкції антитіла), мали подібну гістопатологію, тоді як миші, яким ін'єктували 124F23G1, не мали гістологічних ознак захворювання. Приклад гістології сліпої кишки, що спостерігається у тварин, оброблених анти-LIGHT, наведений на фіг. 31A, де показана однорідна структура ворсинок, підслизова оболонка і м'язовий шар, а також відсутність асцити або крові. Навпаки, гістологія сліпої кишки тварини, обробленої контрольним антитілом, мала явні ознаки захворювання, включаючи підслизову оболонку, заповнену асцитом, ознаки кишкової кровотечі, про яку свідчать скупчення еритроцитів, і помітні інфільтрати лімфоцитів (фіг. 31B).

Дані аналізів селезінок відповідали макроскопічній патології і гістопатології. Т-клітини людини були присутні у селезінках мишей, оброблених контрольними антитілами, але кількість

Т-клітин людини у тварин, оброблених 124F23G1, була значно нижчою, ніж кількість Т-клітин у контрольних тварин (фіг. 32).

У подальших дослідженнях обидва варіанти анти-hLIGHT-антитіл, що виснажують Т-клітини (IgG1) і/або не виснажують Т-клітини (IgG4PE), можуть бути використані для оцінки механізму ослаблення захворювання, наприклад, оцінки того, чи блокуються Т-клітини антитілом або замість цього піддаються апоптозу.

Обговорення: Гостре захворювання "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) є основним ускладненням, пов'язаним з трансплантацією алогенних гематопоетичних стовбурових клітин. GVHD звичайно визначають як велику атаку Т-клітинами донора, направлену проти тканин хазяїна. Сучасним способом запобігання GVHD після трансплантації є системна імуносупресія, однак, це може приводити до інфекцій опортуністичними патогенами і рецидиву лейкозу. Відповідно, блокада костимулюючих сигналів Т-клітин є однією з багатообіцяючих альтернатив імунодепресантам. Нещодавні повідомлення свідчать, що костимуляція Т-клітин LIGHT-HVEM відіграє найважливішу роль у патогенезі GVHD (Xu et al. (2007) 109: 4097-4104). Таким чином, антагоністичні анти-LIGHT-антитіла можуть мати терапевтичну ефективність у випадку GVHD. Ефективність *in vivo*, показана у моделі гострого ксеногенного GVHD, свідчить про такі потенційні можливості.

У гострій ксеногенній моделі GVHD, PBMC людини ін'єктують сублетально опроміненим мишам SCID, виснаженим по NK-клітинах (фіг. 28). У такій моделі опромінення ініціює ушкодження кишечника і Т-клітини опосередковують кишкове запалення при такому захворюванні. У тварин спостерігають тяжкі ознаки захворювання приблизно протягом 12 днів після ін'єкції PBMC. Ознаки захворювання включають запалення кишечника, що проявляється у кровотечі, асциті і атрофії ворсинок. На початковій стадії лікування мишей 100 мікрограмами анти-LIGHT-антитіла (124F23G1) знижувало макроскопічну патологію у кишечнику, що спостерігається (фіг. 29). Подібним чином таке зниження підтверджується більш тонким аналізом гістопатології сліпої кишки, що показує, що обробка анти-LIGHT-антитілом приводила до відсутності ознак захворювання, що виявляються (фіг. 30). На фіг. 31А показаний типовий забарвлений гематоксиліном і еозином зріз сліпої кишки тварини, обробленої анти-LIGHT. Навпаки, у сліпій кишці тварини, обробленої контрольним антитілом, спостерігаються ознаки тяжкого запалення у кишечнику, включаючи червоні плями клітин, що вказують на наявність кровотечі, піддана сильній інволюції заповнена рідиною підслизова оболонка та інфільтрат лімфоцитів (фіг. 31В). У такій моделі перенесені Т-клітини людини головним чином відповідальні за індукцію захворювання, і спостерігається тенденція кореляції кількості Т-клітин у селезінці з тяжкістю захворювання. Обробка анти-LIGHT-антитілами значно знижувала загальну кількість Т-клітин людини у селезінці (фіг. 32). Таким чином, одержані дані, взяті разом, свідчать про те, що анти-LIGHT-антитіла у даній моделі проявляли ефективність *in vivo*, значимо знижуючи ознаки захворювання у порівнянні з негативним контролем.

ПРИКЛАД 6 - РЕНТГЕНІВСЬКИЙ КРИСТАЛОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ LIGHT ЛЮДИНИ/АНТИТІЛО ПРОТИ LIGHT ЛЮДИНИ (F23)

Антитіло F23G1 (або його Fab-фрагмент) використовували для оцінки природи переважного упізнання нативного тримерного hLIGHT. Структурний аналіз дозволяє ідентифікувати специфічні амінокислотні залишки, що беруть участь у контакті між анти-hLIGHT-антитілом і молекулою hLIGHT, щоб додатково визначити конформаційний епітоп, що упізнається антитілом. Кристалізацію комплексів LIGHT-анти-LIGHT-Fab здійснюють стандартними способами дифузії і осадження крапель з парової фази (див., наприклад, McRee 1993, у: Practical Protein Crystallography (Academic Press, San Diego, CA) на стор. 1-23; Rhodes 1993, у: Crystallography Made Crystal Clear (Academic Press, San Diego, CA) на стор. 8-10, 29-38). Кристали аналізували, використовуючи SYNCHROTRON, і дані аналізували, використовуючи пакет комп'ютерних програм CCP4 (Science and Technology Facilities Council, Computational Science and Engineering Department), що являє собою набір різних програм, які охоплюють більшість розрахунків, необхідних для макромолекулярної кристалографії. Як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі, інші hLIGHT-антитіла, пропоновані у даному винаході, можуть бути використані подібним чином для визначення зв'язування епітопу hLIGHT і контактних амінокислотних залишків.

ПРИКЛАД 7 - ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ IN VIVO 124F23 НА МОДЕЛІ ЗАХВОРЮВАННЯ КОЛІТОМ

Модель коліту на основі перенесення Т-клітин людини. Аналогічно моделі коліту мишей на основі перенесення CD4+/CD45Rbhi, описаній у Morrissey et al. (1993) J. Exp. Med. 178 237, мишам RAG-/- ін'єктували не піддані впливу Т-клітини людини (CD45RA+CD45RO-). У даній моделі трансгенну за HLA лінію (C57BL/6NTac-[KO]Abb-[Tg]DR-4), що співпадає з HLA-типом

людини донора, зворотно схрещували з фоном RAG-/(B6.129S6-Rag2^{tm1Fwa}N12), щоб забезпечувати можливість презентації антигену, що відбувається між APC миші-реципієнта і Т-клітинами людини-донора. Така взаємодія необхідна для упізнання Т-клітинами мікрофлори кишечника, що, як вважають, відповідає за активацію і хомінг Т-клітин у кишечник. Тварини відчують втрату маси і хворобу, що викликає виснаження, поряд із запаленням кишечника, яке не спостерігається у мишей RAG-/-.

У деяких групах анти-hLIGHT-антитіло людини (наприклад, F23) вводять у дозі 100 мкг (або, наприклад, у діапазоні 2 мкг - 500 мкг) на тварину за допомогою внутрішньовенної ін'єкції одночасно з введенням Т-клітин людини-донора. У деяких групах анти-hLIGHT-антитіло вводять з різними часовими інтервалами до і/або після введення Т-клітин людини-донора. Оскільки анти-LIGHT-антитіла, що зв'язують LIGHT, експресовані на поверхні активованих Т-клітин, відбувається запобігання і/або лікування симптомів захворювання. У подальших дослідженнях обидва варіанти анти-hLIGHT-антитіл, що виснажують Т-клітини (IgG1) і/або не виснажують Т-клітини (IgG4PE), можуть бути використані для оцінки механізму ослаблення захворювання. Наприклад, IgG4-анти-LIGHT-антитіла здатні блокувати стимуляцію і життєздатність Т-клітин.

ПРИКЛАД 8 - МОДЕЛЬ ЗАХВОРЮВАННЯ IBD ЛЮДИНИ У МИШЕЙ З ЦІЛЕСПРЯМОВАНО ВБУДОВАНИМ (KNOCK-IN) LIGHT ЛЮДИНИ

Як обговорюється у даному описі, раніше було показано, що LIGHT залучене до патології захворювання IBD (див., наприклад, Wang et al. 2005 J. Immunol. 174: 8173-82; Wang et al. 2004 J. Clin. Invest. 113: 826-35; Cohavy et al. 2005 J. Immunol. 174: 646-53). У даному прикладі створювали модель IBD на основі цілеспрямованого вбудовування (knock-in) hLIGHT, і тварині вводили моноклональні анти-hLIGHT-антитіла людини відповідно до винаходу, щоб оцінити ефективність таких антитіл in vivo при лікуванні IBD. Оскільки раніше було показано, що такі антитіла блокують зв'язування рецептора hLIGHT, блокуючи біологічну активність hLIGHT (див., наприклад, приклади 1-4) і дозволяючи лікувати GVHD (приклад 5), припускається, що hLIGHT-антитіла відповідно до винаходу також ефективні для лікування IBD.

Здійснення цілеспрямованого вбудовування LIGHT. Мишей з порушеним геном LIGHT миші, які також мали цілеспрямовану інсерцію гена LIGHT людини, створювали, використовуючи стандартні способи цілеспрямованого введення генів за допомогою гомологічної рекомбінації. Коротко, ES-клітини миші з цілеспрямовано зміненим геном одержували електропорацією конструкції для таргетингу гена в ES-клітині дикого типу. Гомологічна рекомбінація між геномом ES-клітини і двома областями гомології у наведеному до мішені векторі, які фланкують ген LIGHT людини, приводить до заміни мишачого гена LIGHT геном LIGHT людини. Потім бластоцисти імплантують псевдогагітним самкам, що приводить до одержання химерної миші. Розмноження давало гомологічних тварин з цілеспрямовано вбудованим LIGHT.

IBD-моделі захворювання людини. Тварин з цілеспрямовано вбудованим hLIGHT використовують у розроблених моделях IBD. Одна розроблена модель IBD полягає у введенні натрієвої солі сульфату декстрану (DSS) у питну воду (див., наприклад, Mahler et al. 1998 Am. J. Physiol. 274G544-51). Коротко, експериментальний коліт індукують, даючи 3,5 % (мас./об.) DDS (M.m. 36100-45000; TbD Consultancy, Uppsala, Sweden) у підкисленій питній воді ad libitum протягом 5 днів. Потім введення DDS припиняють, і мишам дають тільки підкислену питну воду протягом 16 днів аж до розтину на 21 день. Така доза індукує коліт від помірного до важкого ступеню, при цьому мінімізуючи смертність, хоча можна використовувати й інші дози. Потім збирають товстий кишечник і сліпу кишку відділяють від ободової кишки. Потім здійснюють стандартну фіксацію тканин і забарвлювання гематоксиліном і еозином, щоб визначити тяжкість запалення і ушкоджень. У мишей оцінюють патологію, гістопатологію, синдром виснаження і/або загибель.

Друга розроблена модель IBD полягає у ректальному введенні тринітробензолсульфонової кислоти (TNBS) (див., наприклад, Neurath, et al. 1995 J. Exp. Med. 182: 1281-90). Коротко, щоб індукувати коліт, мишей короткочасно анестезували метофаном, і потім обережно вводили катетер 3,5F в ободову кишку на відстані приблизно 4 см від анального отвору. Щоб індукувати коліт, 0,5 мг гаптеновий реагент TNBS (Sigma, St. Louis, MO) у 50 % етанолі (з порушенням кишкового бар'єру) вводять у просвіт ободової кишки через катетер, з'єднаний зі шприцом об'ємом 1 мл. У контрольних експериментах миші одержують 50 % етанол окремо. Загальний об'єм ін'єкції складає 100 мкл в обох групах, що дозволяє TNBS або етанолу поширитися по всій ободовій кишці, включаючи сліпу кишку і апендикс. Потім тварин утримували у вертикальному положенні протягом 30 секунд і повертали у клітини. Або використовують модель коліту у мишей на основі перенесення CD4+/CD45Rbhi (див., наприклад, Morrissey, et al. 1993 J. Exp. Med. 178: 237-44). Потім анти-LIGHT-антитіла можна використовувати для лікування і профілактики розвиненого захворювання, наприклад, у дозах 2-500 мкг на тварину, по суті, як

описано вище. Потім збирають товстий кишечник і сліпу кишку відділяють від ободової кишки. У різних часових точках після цього витягують кишку, і потім здійснюють стандартну фіксацію тканини і забарвлювання гематоксиліном і еозином, щоб визначити тяжкість запалення і ушкодження. У мишей оцінюють патологію, гістопатологію, синдром виснаження і/або загибель.

5 Третя розроблена модель IBD являє собою модель коліту мишей на основі перенесення CD4+/CD45RBhi (див., наприклад, Morrissey, et al. 1993, J. Exp. Med. 178: 237-44). Коротко, очищені Т-клітини CD4+ з лімфатичних вузлів сортують стосовно експресії CD45RB та ін'єктують мишам з цілеспрямовано вбудованим геном hLIGHT. Потім здійснюють стандартну
10 фіксацію тканини і забарвлювання гематоксиліном і еозином, щоб визначити тяжкість запалення і ушкодження. У мишей оцінюють патологію, гістопатологію, синдром виснаження і/або загибель.

Анти-LIGHT-антитіла (наприклад, у дозах 2-500 мкг на тварину) можна використовувати у будь-якій моделі IBD, такий як описані вище моделі, щоб оцінити ефективність для лікування або профілактики IBD, по суті як описано вище. Оскільки раніше було показано, що такі антитіла
15 блокують зв'язування рецептора hLIGHT, блокуючи біологічну активність hLIGHT (див., наприклад, приклади 1-4) і дозволяючи лікувати GVHD (приклад 5), припускається, що hLIGHT-антитіла відповідно до винаходу також ефективні для лікування IBD.

Варіанти здійснення даного винаходу, описані вище, призначені тільки для ілюстрації, і фахівцям у даній галузі будуть зрозумілі, або вони можуть встановити, використовуючи тільки
20 звичайні експерименти, численні еквіваленти конкретним способам, описаним у даній публікації. Передбачається, що такі еквіваленти входять в обсяг даного винаходу і включені у додану формулу винаходу. Крім того, у використовуваному у даному описі і формулі винаходу значенні, форми однини включають форми множини, якщо у контексті явно не зазначено інше. Таким чином, наприклад, вказівка "антитіло" включає суміш двох або більше антитіл і тому подібне.
25 Крім того, фахівцям у даній галузі буде зрозуміло, що послідовність операцій повинна бути зазначена у визначеному конкретному порядку з метою пояснення і складання формули винаходу, але даний винахід охоплює різні зміни крім такого конкретного порядку.

Зміст всіх публікацій, зазначених у даному описі, включений у даний опис у вигляді посилання.

30 Інші варіанти входять в обсяг наведеної далі формули винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Kirin Pharma Kabushiki Kaisha (Tokyo, Japan)
La Jolla Institute for Allergy & Immunology (La Jolla, CA)

5

<120> Антагоністичні моноклональні антитіла людини, специфічні у відношенні LIGHT людини

10

<130> 7505-049-228

<140>

<141>

15

<150> 60/840,774

<151> 2006-08-28

<150> 60/897,875

<151> 2007-01-25

20

<160> 106

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

25

<210> 1

<211> 136

<212> Білок

<213> Homo sapiens

30

<220>

<223> Варіабельна область важкого ланцюга E1

<400> 1

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

35

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ile Ala Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 2
 <211> 138
 <212> Білок
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Варіабельна область важкого ланцюга E13

 10 <400> 2

 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu
 35 40 45
 Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ala Met Ala Gly Ala Phe Gly Phe Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

 15 <210> 3
 <211> 141
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 <220>
 20 <223> Варіабельна область важкого ланцюга E63

 <400> 3

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1           5           10           15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
          20           25           30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Gly Ser Val
        35           40           45
Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
       50           55           60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
65           70           75           80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
          85           90           95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
          100          105          110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ile Thr Met Phe Arg Gly Val Gly Phe
          115          120          125
Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          130          135          140

```

5 <210> 4
 <211> 141
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Варіабельна область важкого ланцюга F19
 <400> 4

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1           5           10           15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
          20           25           30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
        35           40           45
Ser Gly Tyr Asn Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
       50           55           60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Thr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65           70           75           80

```

15


```

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      85                      90                      95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      100                    105                    110
Tyr Cys Val Arg Glu Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Gly Met
      115                    120                    125
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130                    135                    140

```

<210> 5
 <211> 143
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Варіабельна область важкого ланцюга F23
 <400> 5

```

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
  1                      5                      10                      15
Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
      20                    25                    30
Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
      35                    40                    45
Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg
      50                    55                    60
Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Gln Tyr
      65                    70                    75                    80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
      85                      90                      95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
      100                    105                    110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Ala Thr Ala Asp Lys Gly Tyr Tyr
      115                    120                    125
Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130                    135                    140

```

<210> 6
 <211> 128
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа E1 #2 (E1 каппа(B))

<400> 6

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
          20           25           30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35           40           45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50           55           60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65           70           75           80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          85           90           95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
          100          105          110
Gly Ser Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115          120          125

```

<210> 7

<211> 130

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа E13

<400> 7

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
          20           25           30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35           40           45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50           55           60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65           70           75           80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          85           90           95

```

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg
 130

<210> 8
 <211> 126
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа E63

<400> 8

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
 20 25 30
 Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
 50 55 60
 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
 85 90 95
 Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
 100 105 110
 Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 9
 <211> 129
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа F19 #2

<400> 9

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
          20           25           30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35           40           45
Gln Gly Ile Asn Ser Ala Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
      50           55           60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65           70           75           80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
          85           90           95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      100           105           110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
      115           120           125
Lys

```

5 <210> 10
 <211> 129
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа F23
 <400> 10

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
          20           25           30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
        35           40           45
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
      50           55           60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65           70           75           80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
          85           90           95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      100           105           110

```

15

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys

5 <210> 11
<211> 5
<212> Білок
<213> Homo sapiens

10 <220>
<223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга E1
<400> 11

Arg Phe Asn Met Asn
1 5

15 <210> 12
<211> 17
<212> Білок
<213> Homo sapiens

20 <220>
<223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга E1
<400> 12

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 Gly
<210> 13
<211> 7
<212> Білок
30 <213> Homo sapiens

<220>
<223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга E1
35 <400> 13

Ser Ile Ala Ala Phe Asp Tyr
1 5

40 <210> 14
<211> 5
<212> Білок
<213> Homo sapiens

45 <220>
<223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга E13
<400> 14

	Asn	Ala	Trp	Met	Ser	
	1				5	
	<210> 15					
	<211> 19					
5	<212> Білок					
	<213> Homo sapiens					
	<220>					
10	<223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга E13					
	<400> 15					
	Arg	Ile	Lys	Ser	Lys	Ile
	1				5	
						10
						15
	Val	Lys	Gly			
15	<210> 16					
	<211> 8					
	<212> Білок					
	<213> Homo sapiens					
20	<220>					
	<223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга E13					
	<400> 16					
	Ala	Met	Ala	Gly	Ala	Phe
25	1				5	
	<210> 17					
	<211> 7					
	<212> Білок					
30	<213> Homo sapiens					
	<220>					
	<223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга E63					
35	<400> 17					
	Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Trp
	1				5	
	<210> 18					
40	<211> 16					
	<212> Білок					
	<213> Homo sapiens					
	<220>					
45	<223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга E63					
	<400> 18					
	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly
	1				5	
						10
						15
50						

<210> 19
 <211> 12
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга E63
 <400> 19
 10
 Trp Ile Thr Met Phe Arg Gly Val Gly Phe Asp Pro
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 5
 15 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))
 20
 <400> 20
 Gly Tyr Asn Trp His
 1 5
 25 <210> 21
 <211> 16
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))
 <400> 21
 Glu Ile Thr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 35 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 14
 <212> Білок
 40 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))
 45 <400> 22
 Glu Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 50 <210> 23
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга F23
 5 <400> 23
 Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5
 10 <210> 24
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга F23
 <400> 24
 Glu Ile Asn Gln Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10
 20 <210> 25
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга F23
 <400> 25
 30 <210> 26
 <211> 12
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга E1 #2 (E1 каппа(B))
 40 <400> 26
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10
 45 <210> 27
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга E1 #2 (E1 каппа(B))
 <400> 27
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

5 <210> 28 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга E1 #2 (E1 каппа(B))
 <400> 28
 10 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met Tyr Thr
 1 5
 <210> 29
 <211> 12
 15 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга E13
 20 <400> 29
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 25 <210> 30
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга E13
 <400> 30
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 35 1 5
 <210> 31
 <211> 10
 <212> Білок
 40 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга E13
 45 <400> 31
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
 1 5 10
 50 <210> 32
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга E36

 <400> 32
 5 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 7
 10 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга E63 <400> 33
 15 Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
 1 5

 <210> 34
 <211> 9
 20 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга E63
 25 <400> 34

 His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

 30 <210> 35
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 35 <220>
 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))

 <400> 35

 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Ala Phe Ala
 1 5 10
 40

 <210> 36
 <211> 7
 <212> Білок
 45 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))
 50 <400> 36

 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> Білок
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга F19 #2 (F19 каппа(B))

 10 <400> 37

 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 15 <210> 38
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 20 <220>
 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга F23

 <400> 38

 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

 25 <210> 39
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 30 <220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга F23

 <400> 39

 35 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

 40 <210> 40
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 45 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга F23

 <400> 40

 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5 \

50 <210> 41
 <211> 408
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> кДНК варіабельної області важкого ланцюга E1

5 <400> 41

```
atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctatth tagaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaga tttaacatga actgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagta gttataccat atactacgca 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actggatctg 300
caaatgaaca gcctgagaga cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag gagtatagca 360
gcagcttttg actactgggg ccaggagacc ctggtcaccg tctcctca 408
```

<210> 42

10 <211> 414

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

15 <22 3> кДНК варіабельної області важкого ланцюга E13

<400> 42

```
atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgcgatth taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtaaagcctg gggggtcctt tagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tctcagtaac gcctggatga gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt tggccgtatt aaaagcaaaa tagatgggtg gacaacagac 240
tacgctgcac ccgtgaaagg cagattcacc atctcaagag atgattcaaa aaacacgctg 300
tttctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacagccg tgtattactg taccacagca 360
```

20

```
atggctgggtg cgtttggctt ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 414
```

<210> 43

<211> 423

25 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> кДНК варіабельної області важкого ланцюга E63

30

<400> 43

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcattgtct ctggtggctc cgtcagcagt ggtggttact actggagctg gatccggcag 180
ccccagggg agggactgga gtggattggg tatatctatt acagtgggag caccaactac 240
aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgctgcggac acggcctgtg attactgtgc gagatggatt 360
actatgtttc ggggagttgg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tca 423

```

5 <210> 44
 <211> 423
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> кДНК варіабельної області важкого ланцюга F19
 <400> 44

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggg tacaactggc actggatccg ccagccccca 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc actcatagtg gaagcaccaa ttacaacccg 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtgtattact gtgtgcgaga gattgcagtg 360
gctggtacgg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggg caccgtctcc 420
tca 423

```

15 <210> 45
 <211> 429
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> кДНК варіабельної області важкого ланцюга F23
 <400> 45

```

atggacctcc tgcacaagaa catgaaacac ctgtggttct tctcctcctt ggtggcagct 60
cccagatggg tctgtccca ggtgcagcta cagcagtggg gcgcaggact gttgaagcct 120
tcggagacct tgtccctcac ctgctgtgtc tatggtgggt ccttcagtgg ttactactgg 180
aactggatcc gccagcccc agggaagggg ctggagtgga ttggggaaat caatcagtac 240
aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcggac acggctgtgt attactgtgc gagagagata 360
gcaacagctg ataaagggtg ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420
gtctcctca 429

```

25 <210> 46
 <211> 384

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга E1 #2 (E1 каппа(B))

<400> 46

```

atggaaaacc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact taacctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaatgta cacttttggc 360
caggggacca agctggagat caaaa                                     384

```

10

<210> 47

<211> 390

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга E13

<400> 47

20

```

atggaaaacc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccat gtacactttt 360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga                                     390

```

25

<210> 48

<211> 378

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

30

<220>

<223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга E63

<400> 48

```

atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
cagtctccaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
ttcagtgcca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
gatgctgcag catattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa 378

```

5 <210> 49
 <211> 387
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> кДНК варіабельної області легкого ланцюга F19 #2 (F19 kappa(B))
 <400> 49

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
agatgtgcc a tccagttgac ccagtcctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attaacagtg cttttgcttg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc tctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

```

15 <210> 50
 <211> 387
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> кДНК варіабельної області легкого ланцюга F23
 <400> 50

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
agatgtgcc a tccagttgac ccagtcctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

```

25 <210> 51
 <211> 723
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <223> Нуклеотидна послідовність hLIGHT

<400> 51

```

atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgagggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
gggtctcttgc tgttgctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggctgggt cctcctgcag 180
ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgctgcctg acggacctgc aggtcctgg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360
gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggcccttg tggtcaccaa agctggctac 420
tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgctggg cctggccagc 480
accatcacc acggcctcta caagcgcaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggacggggc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600
agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggagg aggtggctgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggctct acttcggggc tttcatggtg 720
tga 723

```

5

<210> 52

<211> 240

<212> Білок

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> повнорозмірний hLIGHT

<400> 52

15

```

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
 1           5           10           15
Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
          20           25           30
Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Gly
          35           40           45
Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
          50           55           60
Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65           70           75           80

```


Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
 85 90 95
 His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
 100 105 110
 Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
 115 120 125
 His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
 130 135 140
 Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
 145 150 155 160

 Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
 165 170 175
 Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
 180 185 190
 Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
 195 200 205
 Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
 210 215 220
 Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
 225 230 235 240

5 <210> 53
 <211> 630
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> Розчинний FLAG-мічений hLIGHT (240 а.к.)

 <400> 53

15 atgcctggga agatggctgt gatccttggg gcctcaaata tactttggat aatgtttgca 60
 gcttctcaag ctgactacaa ggacgacgat gacaagtacg taggagagat ggtcacccgc 120

 ctgcctgacg gacctgcagg ctccctgggag cagctgatac aagagcgaag gtctcacgag 180
 gtcaaccacg cagcgcatct cacagggggc aactccagct tgaccggcag cgggggggccc 240
 ctgttatggg agactcagct gggcctggcc ttcctgaggg gcctcagcta ccacgatggg 300
 gcccttgtgg tcaccaaagc tggctactac tacatctact ccaaggtgca gctgggcccgt 360
 gtgggctgcc cgctgggcct ggccagcacc atcaccacg gcctctacaa gcgcacaccc 420
 cgctaccccg aggagctgga gctgttggtc agccagcagt caccctgcgg acgggccacc 480
 agcagctccc gggctctggtg ggacagcagc ttcctgggtg gtgtggtaca cctggaggct 540
 ggggaggagg tggctgtccg tgtgctggat gaacgcctgg ttcgactgcg tgatggtacc 600
 cggctctact tcggggcttt catggtgtga 630

<210> 54
 <211> 183
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Розчинний FLAG-мічений hLIGHT (183 а. к.)

<400> 54

10

```

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro
 1             5             10             15
Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser
          20             25             30
His Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu
      35             40             45
Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala
      50             55             60
Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys
65             70             75             80
Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly
          85             90             95

Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg
          100             105             110
Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser
          115             120             125
Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser
          130             135             140
Phe Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val
145             150             155             160
Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser
          165             170             175

Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
          180
    
```

<210> 55
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <223> Праймер RACEUPS5'

20

<400> 55

ctaatacgac tcactatagg gc

25

22

<210> 56
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> Праймер IgGlp
 <400> 56
 10
 tcttgtccac cttggtgttg ctgggcttgt g 31
 <210> 57
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Праймер НК5
 20
 <400> 57
 aggcacasaа саgaggcagt tccagatttc 30
 <210> 58
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25
 <220>
 <223> Праймер M13F
 30
 <400> 58
 gтаааасgас ggccagtг 18
 35
 <210> 59
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 40
 <220>
 <223> Праймер M13R
 <400> 59
 45
 саggааасаg ctatgac 17
 <210> 60
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> Праймер E63HF85
 55
 <400> 60
 agagagagag gtcgaccacc atgaaacacc tgtgggttctt c 41

5	<p><210> 61 <211> 37 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
10	<p><220> <223> Праймер E63HR38</p>	
	<p><400> 61</p> <p>gagagagaga gctagctgag gagacggtga ccaggggt</p>	37
15	<p><210> 62 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
20	<p><220> <223> Праймер -E63LF84</p>	
	<p><400> 62</p> <p>agagagagag atctctcacc atgtcgccat cacaactcat tg</p>	42
25	<p><210> 63 <211> 40. <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
30	<p><220> <223> Праймер E63LR4 3</p>	
35	<p><400> 63</p> <p>agagagagag cgtacgtttg atctccacct tgggtccctcc</p>	40
40	<p><210> 64 <211> 25 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
45	<p><220> <223> Праймер НН-2</p>	
	<p><400> 64</p> <p>gctggagggc acggtcacca cgctg</p>	25
50	<p><210> 65 <211> 26 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p>	
55	<p><220> <22 3> Праймер НК-2</p>	
	<p><400> 65</p>	

	gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc	26
5	<210> 66 <211> 41 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Праймер F23HF86 <400> 66	
	agagagagag gtcgaccacc atggacctcc tgcacaaga c	41
15	<210> 67 <211> 34 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
20	<220> <223> Праймер F23HR55 <400> 67	
25	agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgt	34
30	<210> 68 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
35	<220> <223> Праймер F23LF36 <400> 68	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tc	42
40	<210> 69 <211> 40 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
45	<220> <223> Праймер F23LR43 <400> 69	
50	agagagagag cgtacgtttg atctccacct tggtcacctcc	40
55	<210> 70 <211> 41 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Праймер E1HFSa1l <400> 70	

	agagagagag gtcgaccacc atggagttgg ggctgtgctg g	41
5	<210> 71 <211> 37 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
10	<220> <223> Праймер E1HRNheI <400> 71	
15	agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggc	37
20	<210> 72 <211> 41 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Праймер F19HFSa1I <400> 72	
	agagagagag gtcgaccacc atgaaacacc tgtggttctt c	41
30	<210> 73 <211> 37 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
35	<220> <22 3> Праймер F19HRNhe1 <400> 73	
40	agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt	37
45	<210> 74 <211> 42 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Праймер E1KF2+3Bg1II <400> 74	
50	agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc	42
55	<210> 75 <211> 40 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
	<220>	

	<223> Праймер E1KR2BsiW1	
	<400> 75	
5	agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg	40
	<210> 76	
	<211> 40	
10	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер E1KR3BsiW1	
15	<400> 76	
	agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg	40
	<210> 77	
20	<211> 40	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
25	<223> Праймер F19KR1+2BsiWI	
	<400> 77	
	agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg	40
30	<210> 78	
	<211> 40	
	<212> ДНК	
35	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер F19KR3BsiWI	
	<400> 78	
40	agagagagag cgtacgtttg atctccagct tggccccctg	40
	<210> 79	
	<211> 42	
45	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер F19KF1+2+3Bg1II	
50	<400> 79	
	agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc	42
55	<210> 80	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	

<220>

<223> Прямий праймер

5 <400> 80

gtaggagaga tggtcacccg cct

23

<210> 81

10 <211> 37

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

15 <223> Зворотний праймер

<400> 81

ggaacgcgaa ttcccacgtg tcagacccat gtccaat

37

20

<210> 82

<211> 128

<212> Білок

<213> Homo sapiens

25

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа EI #1 (EI каппа(A))

<400> 82

30

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Ala Arg Gly Pro Ser Trp Arg Ser

115 120 125

35

<210> 83

<211> 128

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 #3 (E1 каппа(C))

<400> 83

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
          20           25           30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gln Ser
          35           40           45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50           55           60
10 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
   65           70           75           80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          85           90           95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
          100          105          110
Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115          120          125

```

<210> 84

<211> 11

15 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга E1 #1 (E1 каппа(A))

<400> 84

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1           5           10

```

25 <210> 85

<211> 12

<212> Білок

<213> Homo sapiens

30 <220>

<223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга E1 #3 (E1 каппа(C))

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 86

<211> 7

5 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга E1 #1 (E1 каппа(A))

<400> 86

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

15 <210> 87

<211> 7

<212> Білок

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга E1 #3 (E1 каппа(C))

<400> 87

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

25 1

5

<210> 88

<211> 8

<212> Білок

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга E1 #1 (E1 каппа(A))

35 <400> 88

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Arg Thr

1

5

<210> 89

40 <211> 9

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

45 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга E1 #3 (E1 каппа(C))

<400> 89

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

50

<210> 90

<211> 129
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа F19 #1 (F19 каппа(A))

<400> 90

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1              5              10              15
Val Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      20              25              30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser
      35              40              45
Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys
      50              55              60
Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val
65              70              75              80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      85              90              95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg
      100             105             110
Thr Tyr Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
      115             120             125

```

10 Lys

<210> 91
 <211> 129
 <212> Білок
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Варіабельна область легкого ланцюга каппа F19 #3 (F19 каппа(C))

20 <400> 91

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1              5              10              15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu
      20              25              30

```

```

Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser
      35              40              45
Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
      50              55              60
Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
      65              70              75              80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
              85              90              95
Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
              100              105              110
Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
              115              120              125
Lys

```

<210> 92

<211> 126

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислотна послідовність κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19

#4 (F19 каппа(Б))

<400> 92

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1              5              10              15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
              20              25              30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly
              35              40              45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
              50              55              60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
      65              70              75              80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
              85              90              95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
              100              105              110
Asn Trp His Pro Val Arg Pro Arg Asp Gln Gly Gly Asp Ser
              115              120              125

```

<210> 93

<211> 11

<212> Білок
<213> Homo sapiens

<220>
5 <223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга F19 #1 (F19 каппа(A))

<400> 93

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

10 <210> 94
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

15 <220>
<223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга F19 #3 (F19 каппа(C))

<400> 94

20 Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25 <210> 95
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

30 <220>
<223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга F19 #4 (F19 каппа(D))

<400> 95

Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

35 <210> 96
<211> 7
<212> Білок
<213> Homo sapiens

40 <220>
<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга F19 #1 (F19 каппа(A))

<400> 96

45 Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

50 <210> 97
<211> 7
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга F19 #3 (F19 каппа(C))

<400> 97

5 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 98
 <211> 7
 10 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга F19 #4 (F19 каппа(D))

15 <400> 98

 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

20 <210> 99
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга F19 #1 (F19 каппа(A))

<400> 99

 Gln Arg Thr Asn Ala Pro Pro Thr
 1 5

30 <210> 100
 <211> 9
 <212> Білок
 35 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга F19 #3 (F19 каппа(C))

40 <400> 100

 Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
 1 5

45 <210> 101
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга F19 #4 (F19 каппа(D))

<400> 101

Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Pro

1

5

<210> 102

<211> 386

5 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 #1 (E1 каппа(A))

<400> 102

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgccca tccagttgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccagggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtgggggc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccg tacacttttg 360
gccaggggac caagctggag atcaaa 386

15

<210> 103

<211> 384

<212> ДНК

20 <213> Homo sapiens

<220>

<223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа E1 #3 (E1 каппа(O))

<400> 103

25

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcttaca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggt cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttctctc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 360
caagggacca aggtggaaat caaa 384

<210> 104

<211> 387

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> κДНК варіабельної області легкого ланцюга каппа F19 #1 (F19 каппа(A))

<400> 104

35

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctac tgctctgggt cccaggtgcc 60
agatgtgaca tccagttgac ccagtcctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggt gagtcagggc attagcagtt atttaaattg gtatcggcag 180
aaaccaggga aagttcctaa gctcctgac tatagtgcac ccaatttgca atctggagtc 240
ccatctcggg tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcactat cagcagcctg 300
cagcctgaag atgttgcaac ttattacggg caacggactt acaatgcccc tcccactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

```

5 <210> 105
 <211> 387
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> κДНК варіабельної області ланцюга каппа F19 #3 (F19 каппа(C))
 <400> 105

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
agatgtgtca tctggatgac ccagtcctcca tccttactct ctgcatctac aggagacaga 120
gtcaccatca gttgtcggat gagtcagggc attagcagtt atttagcctg gtatcagcaa 180
aaaccaggga aagccccga gctcctgac tatgctgcac ccactttgca aagtggggtc 240
ccatcaagggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagctgcctg 300
cagtctgaag attttgcaac ttattactgt caacagtatt atagtttccc gtacactttt 360
ggccaggggga ccaagctgga gatcaaa 387

```

15 <210> 106
 <211> 380
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> κДНК варіабельної області ланцюга каппа F19 #4 (F19 каппа(D))
 <400> 106

```

atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca ggggtgtagc agctacttag cctggtagca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggac tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcattccgt tcggccaagg 360
gaccaagggt gagattcaaa 380

```

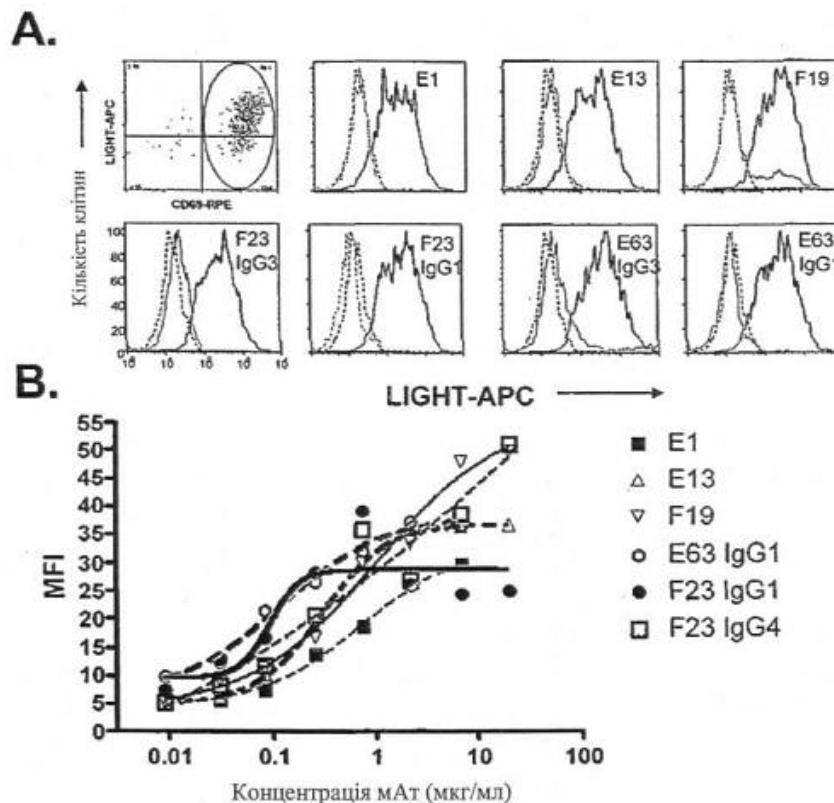
25

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

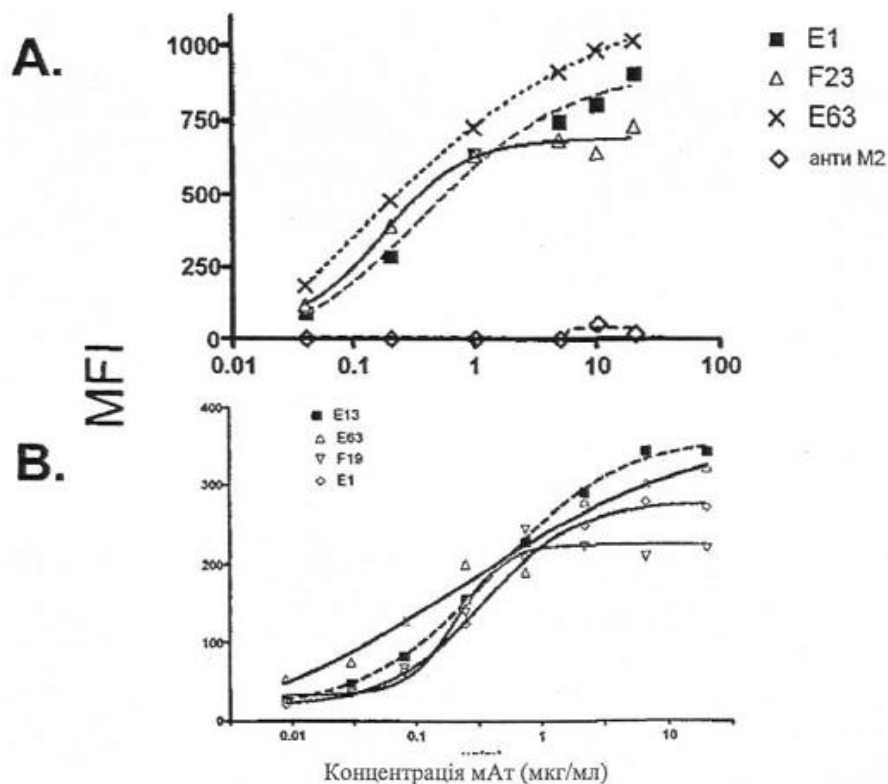
30 1. Ізольоване антитіло, що імуноспецифічно зв'язується з LIGHT людини (hLIGHT), де антитіло містить: область, що визначає комплементарність (CDR), 1 варіабельної області важкого ланцюга (VH), яка містить амінокислотну послідовність GYNWH (SEQ ID NO: 20), VH CDR2, яка містить амінокислотну послідовність EITHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 21); і VH CDR3, яка

містить амінокислотну послідовність EIAVAGTGYGMDV (SEQ ID NO: 22); і CDR1 варіабельної області легкого ланцюга (VL), яка містить амінокислотну послідовність RASQGINSFA (SEQ ID NO: 35); VL CDR2, яка містить амінокислотну послідовність DASSLES (SEQ ID NO: 36); і VL CDR3, яка містить амінокислотну послідовність QQFNSYPLT (SEQ ID NO: 37).

- 5 2. Антитіло за п. 1, де антитіло містить домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4.
3. Антитіло за п. 1, де антитіло містить домен VL, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.
4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що містить константний домен IgG1 або IgG4.
- 10 5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що є повністю людським антитілом.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що є химерним або гуманізованим антитілом.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що є моноклональним антитілом.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що є рекомбінантним антитілом.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що являє собою антигензв'язувальний фрагмент.
- 15 10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, що являє собою Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, одностанцюжковий Fv (sFv), діантитіло, триантитіло або міні-антитіло.
11. Композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-10.
12. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-10.
13. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 12.
- 20 14. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 13.
15. Спосіб одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-10, де спосіб включає культивування клітини-хазяїна за п. 14 в умовах, які стимулюють продукування антитіла.
16. Спосіб ослаблення одного або більше симптомів запального захворювання кишечника (IBD) у людини, яка потребує такого ослаблення, що включає введення людині ефективної кількості композиції за п. 11.
- 25 17. Спосіб ослаблення одного або більше симптомів хвороби "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) у людини, яка потребує такого ослаблення, що включає введення людині ефективної кількості композиції за п. 11.
18. Набір, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-10.
- 30 19. Набір, що містить композицію за п. 11.



Фіг. 1



Фіг. 2

Назва	Зв'язування з HuLIGHT на клітинах EL4GFP HuLIGHT		Блокування зв'язування LIGHT на клітинній поверхні з HVEM:Fc				Блокування зв'язування LIGHT на клітинній поверхні з LTβR:Fc				Блокування CCL20	Ізотип	Група епітопу
	відносна афінність	EC50 (мкг/мл)	Людина	IC50 (мкг/мл)	Миша	IC50 (мкг/мл)	Людина	IC50 (мкг/мл)	Миша	IC50 (мкг/мл)			
124E 63	+++	0.1	++++	0.19	-	-	++++	1.3	+++	0.43	+	IgG3	A
124E 1	+++	0.32	++++	0.2	+++	0.64	+++	1.7	+++	2.8	+	IgG1	A
124E 23	+++	0.18	+++	0.29	-	-	+++	2.1	-	-	+	IgG4	B
124E 13	+++	0.3	++	0.41	NA	NA	+++	1.8	+++	NA	+	IgG1	A
124E 19	+++	0.21	NA	NA	NA	NA	++	4.2	++	3.9	+	IgG1	B

Фіг. 3

мАт для покривання

мАт для попередньої інкубації	<u>E1</u>	<u>E13</u>	<u>E63</u>	<u>F19</u>	<u>F23</u>
E1	95	82	89	0	0
E13	98	97	98	0	0
E63	87	90	84	0	22
F19	0	0	0	98	98
F23	0	0	0	53	87

Епітоп	hLIGHT №1 ("Е-антитіла")	E1, E13, E63
Епітоп	hLIGHT №2 ("F-антитіла")	F19, F23

Фіг. 4

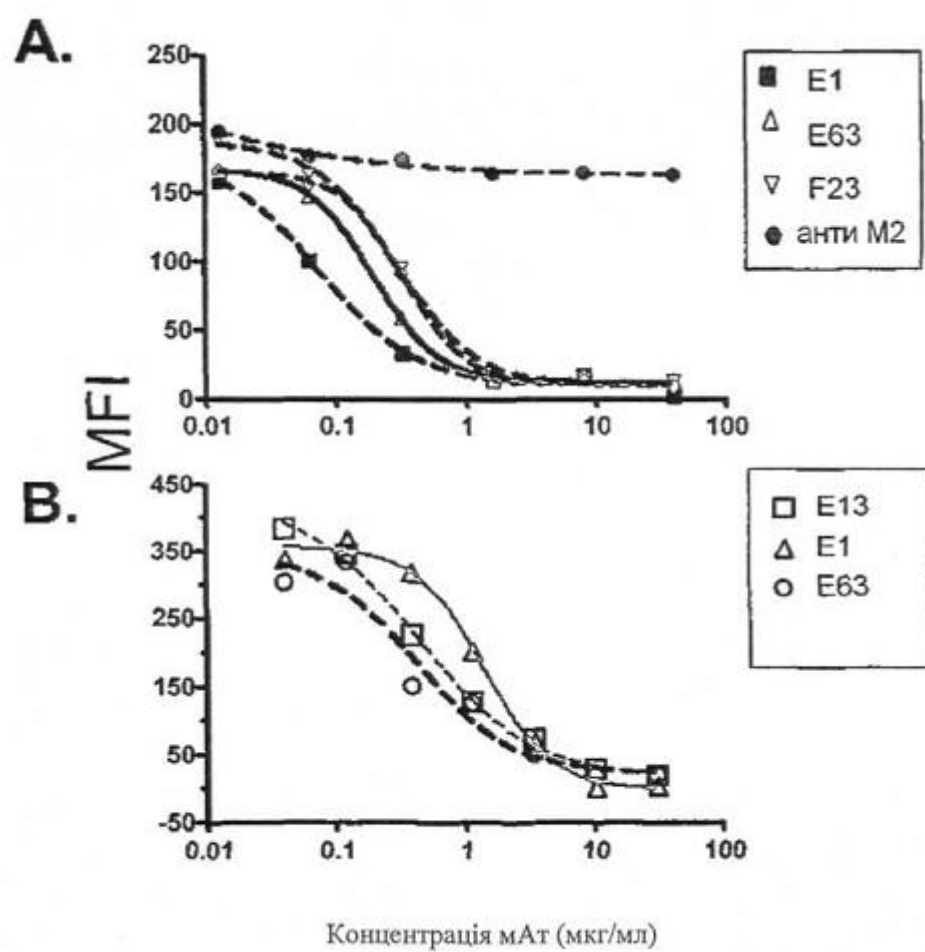


Fig.5

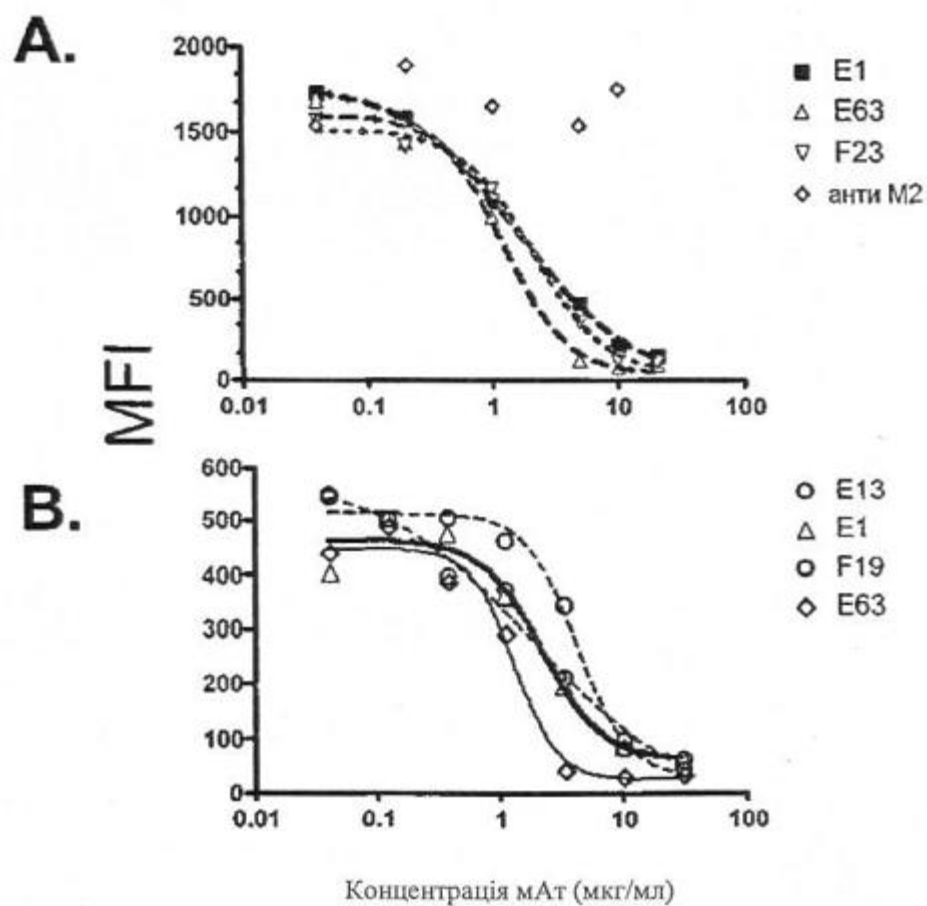


Fig. 6

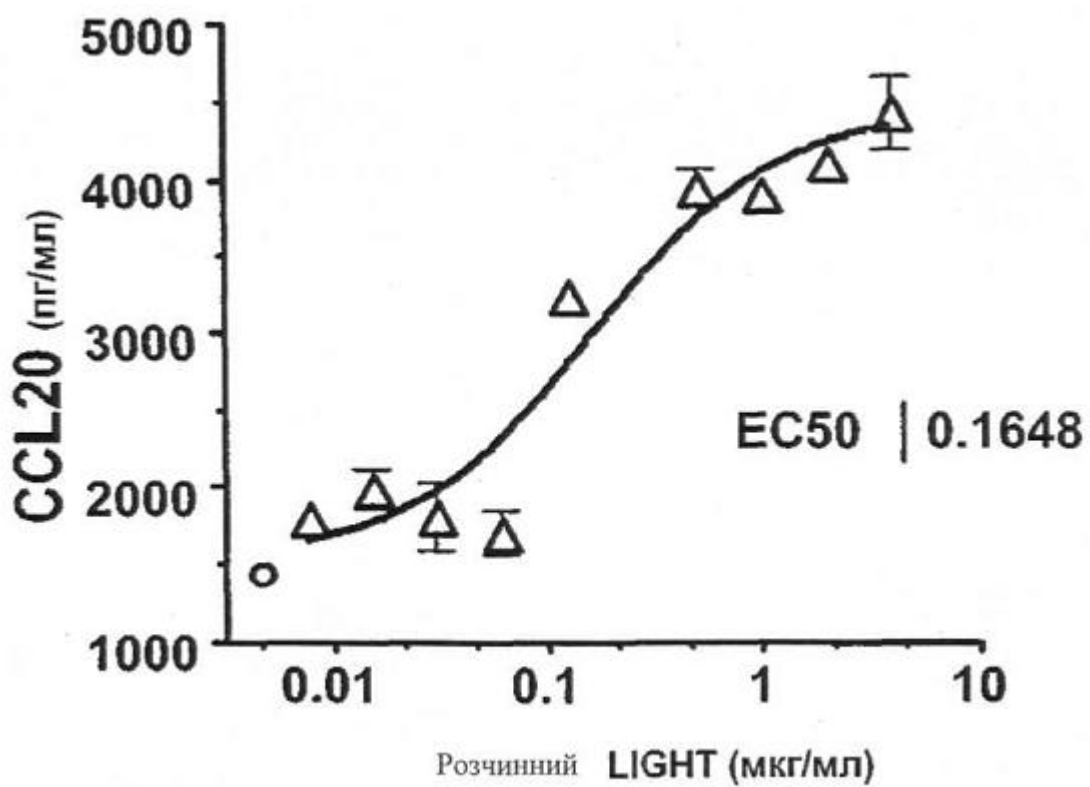
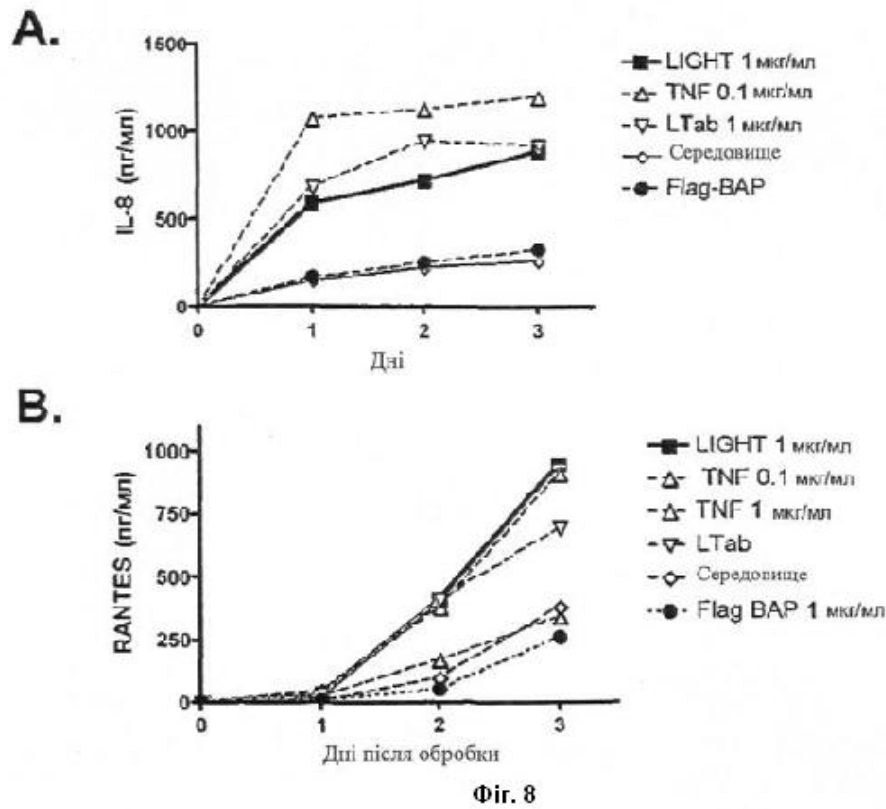
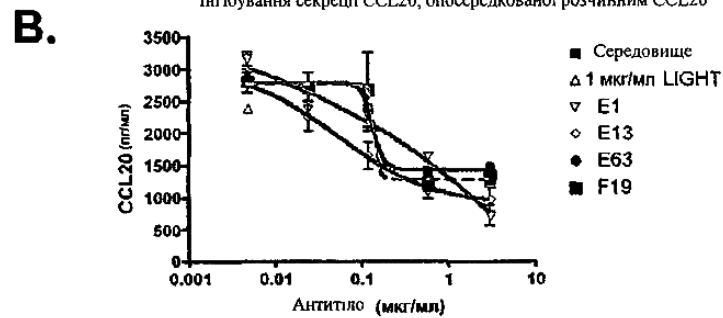
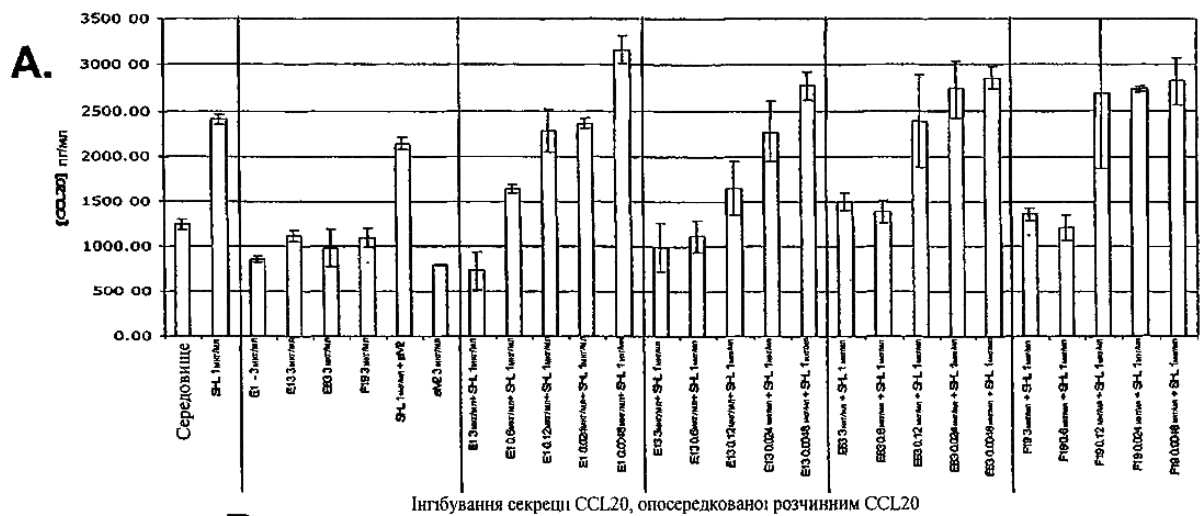


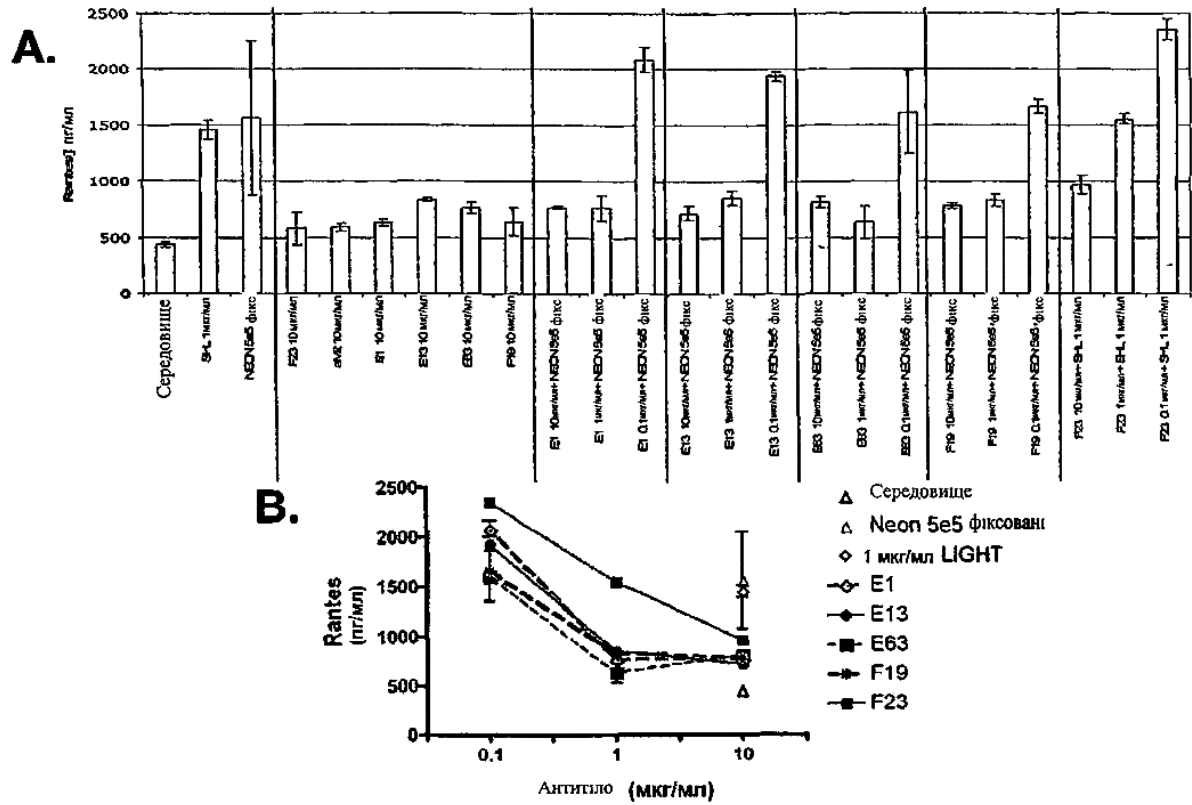
Fig. 7



Фіг. 8



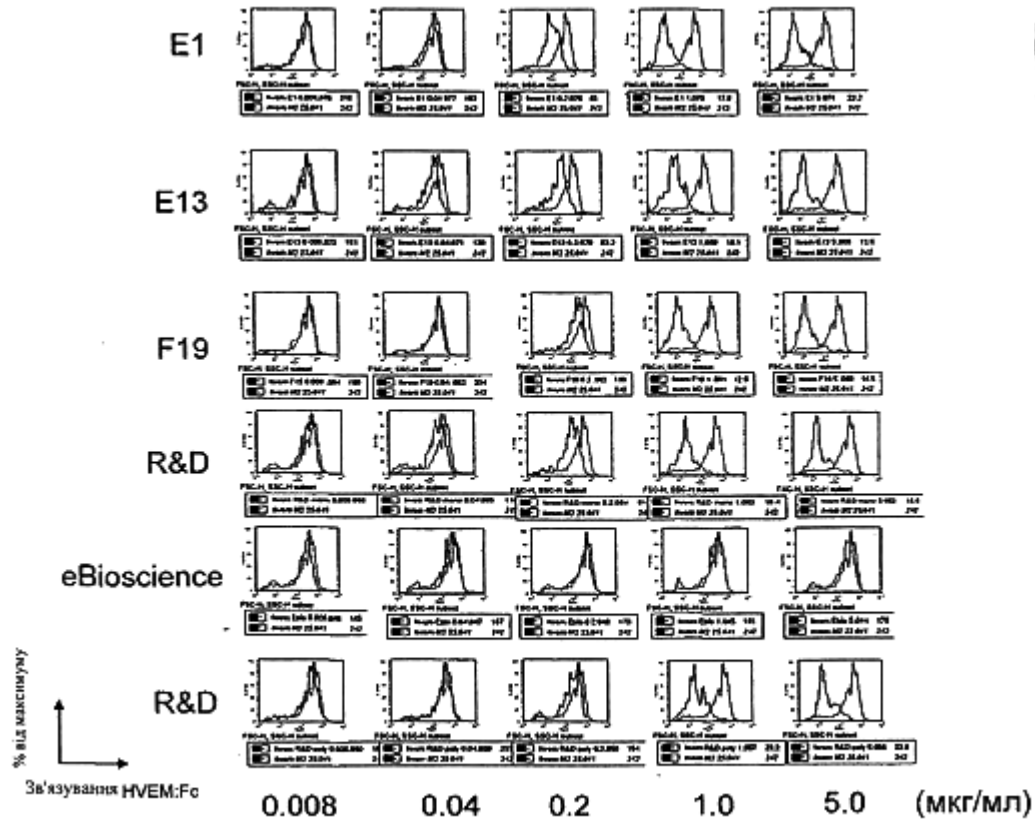
Фіг. 9



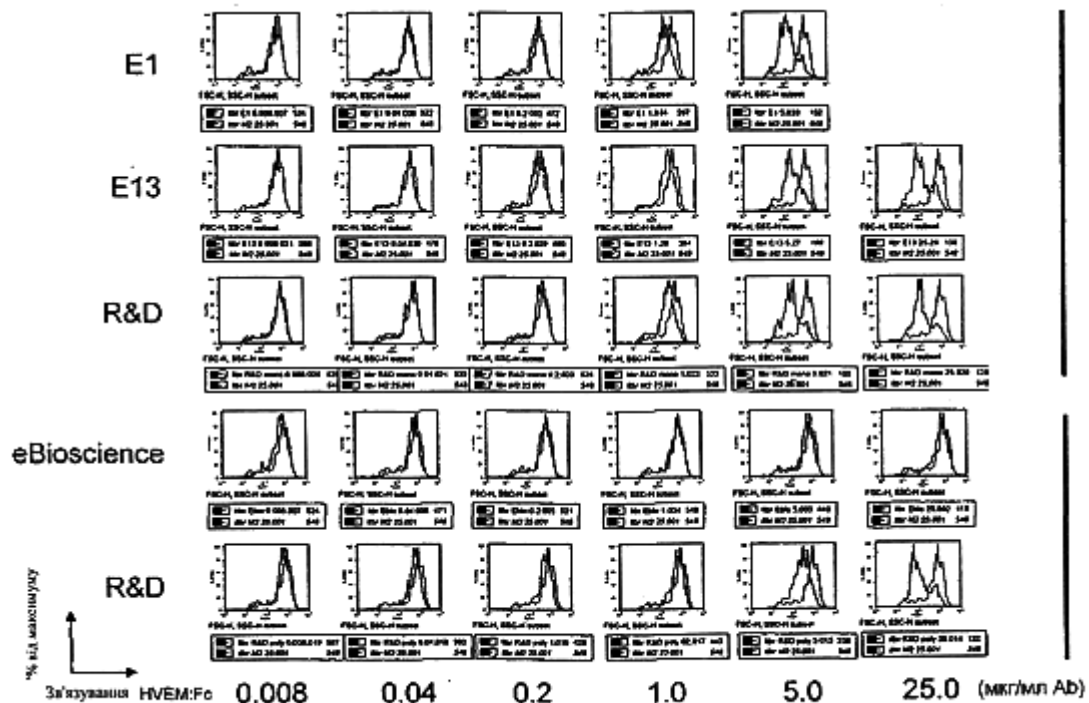
Фіг. 10

Ат для покриття						
Розчинне Ат	E1	B12	F19	мАт R&D	Abnova	E45
E1	94	22	15	99	0	99
B12	17	97	16	0	61	11
F19	4	0	99	99	0	7
мАт R&D	47	0	86	92	0	78
Abnova	30	97	15	38	89	64
E45	60	5	8	99	64	98
анти M2	0	0	0	0	0	0

Фіг. 11

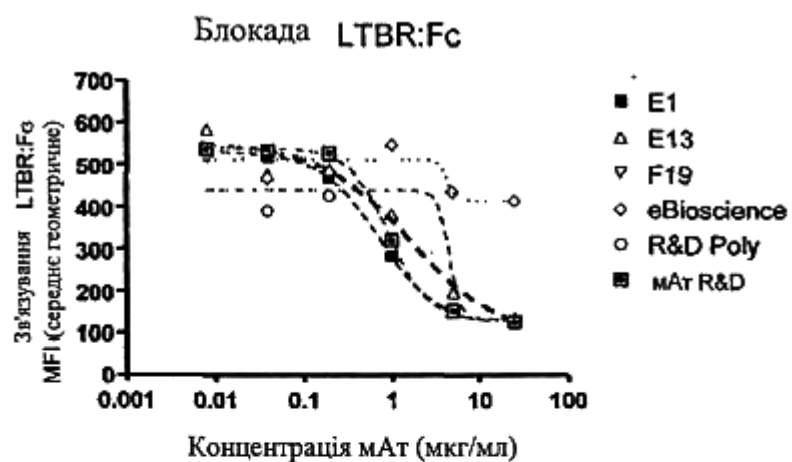


Фіг. 12



Фіг. 13

A



B

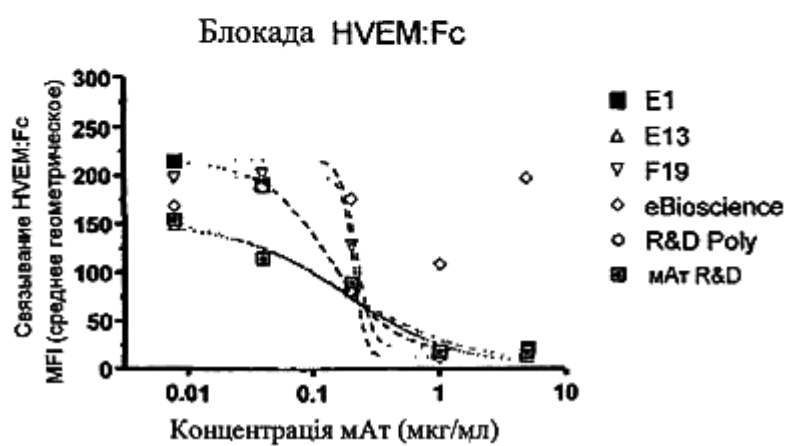
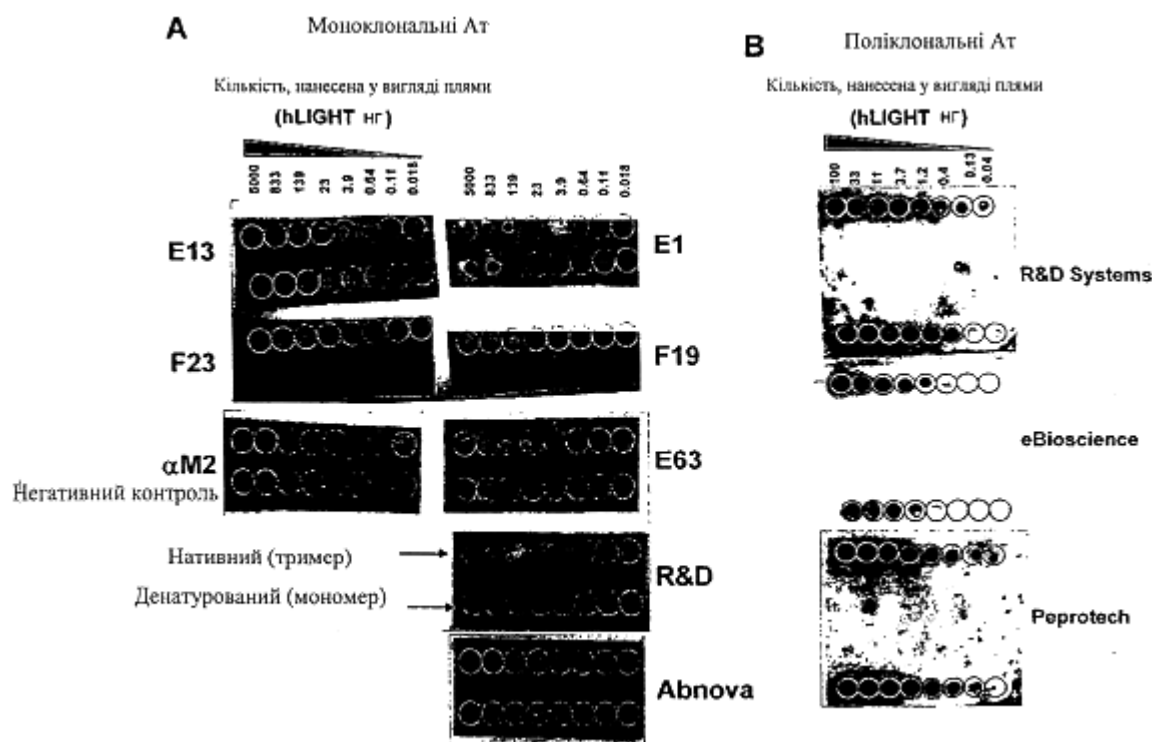


Fig. 14

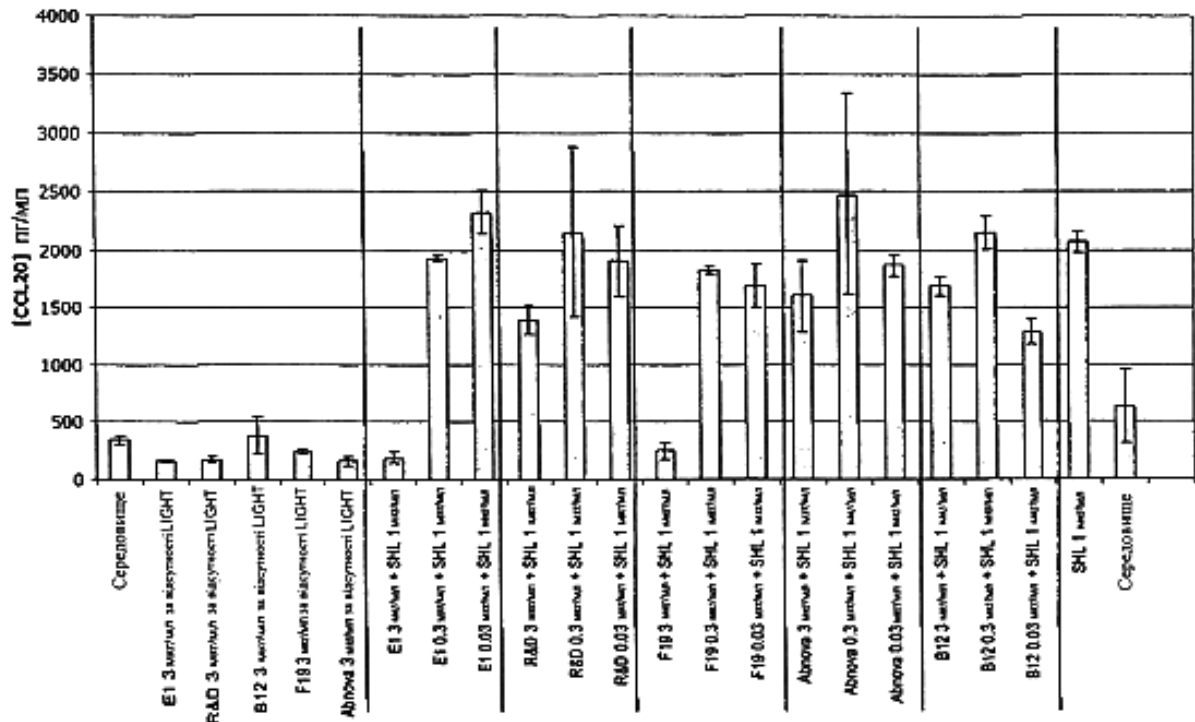


Фіг. 15

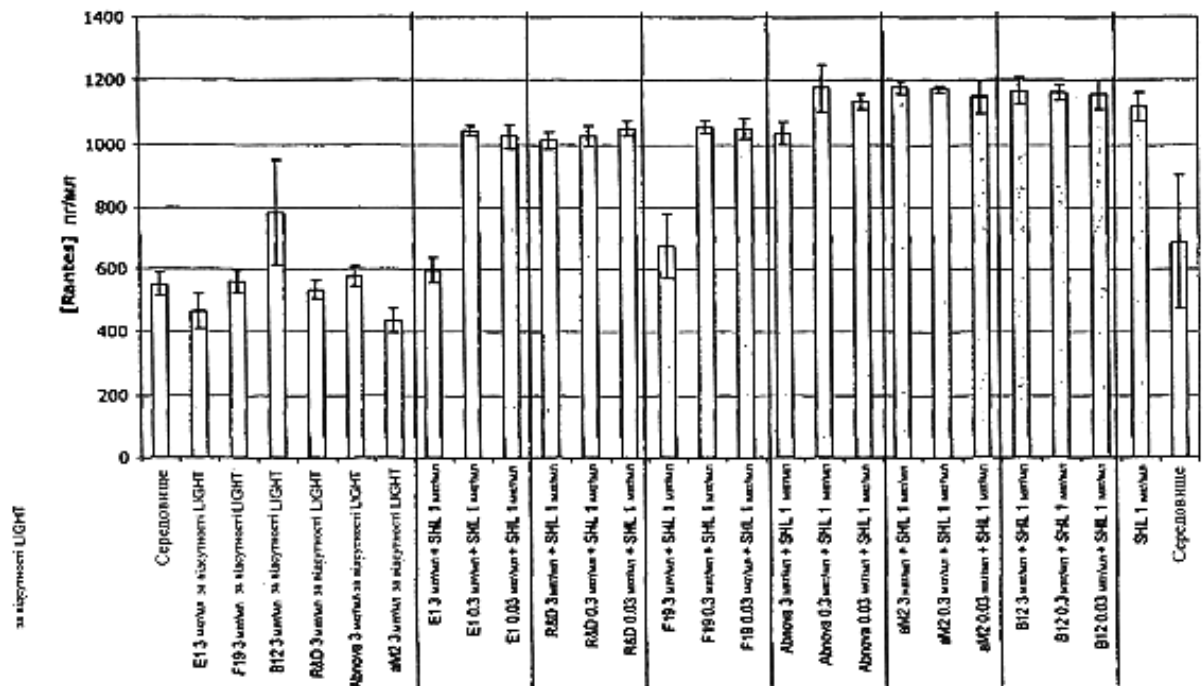
	Антитіло	Кількість, нанесена у вигляді плями (hLIGHT нг)	
		Нативний - тример*	Денатурований - мономер*
Моноклональні	E1 (мАт людини)	23	139
	E13 (мАт людини)	0.64	0.64
	E63 (мАт людини)	3.9	139
	F19 (мАт людини)	23	>5000
	F23 (мАт людини)	23	>5000
	Abnova (мАт миші)	0.64	0.64
	R&D systems (мАт миші)	23	139
Поліклональні	R&D systems (пАт кози)	0.04	0.13
	eBiosciences (пАт кролика)	0.4	1.2
	Peprotech (пАт кролика)	0.04	0.13

*межа реєстрації (найменша кількість LIGHT, що виявляється (нг))

Фіг. 16

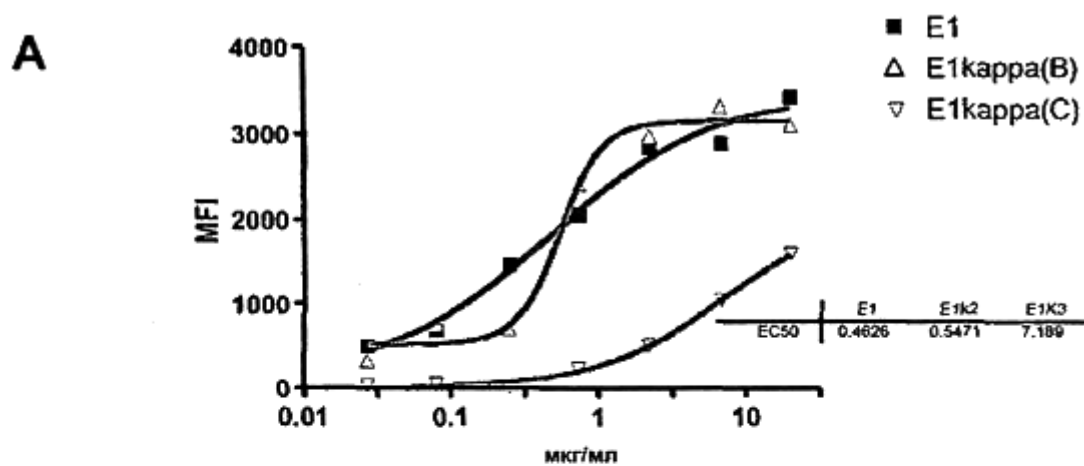


Фиг. 17

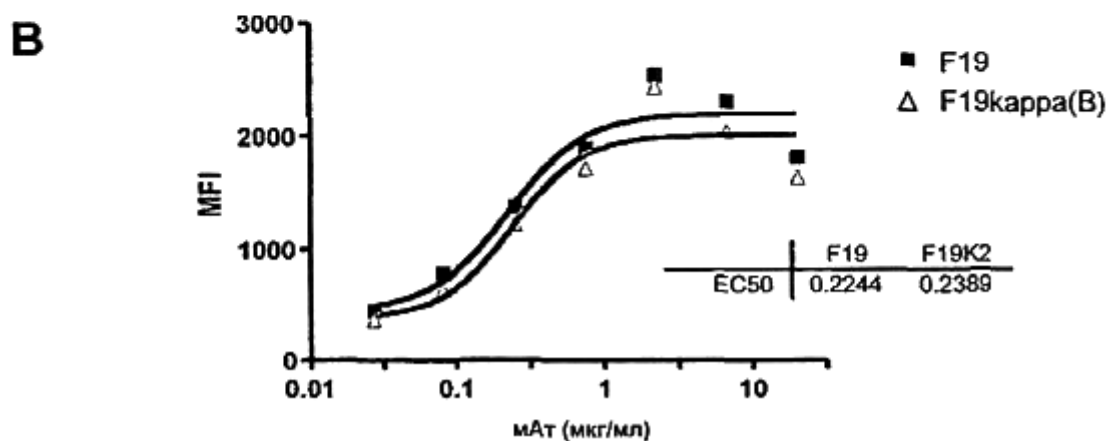


Фиг. 18

Каппа-одноланцюжкові E1, скориговані відносно каналу живих клітин



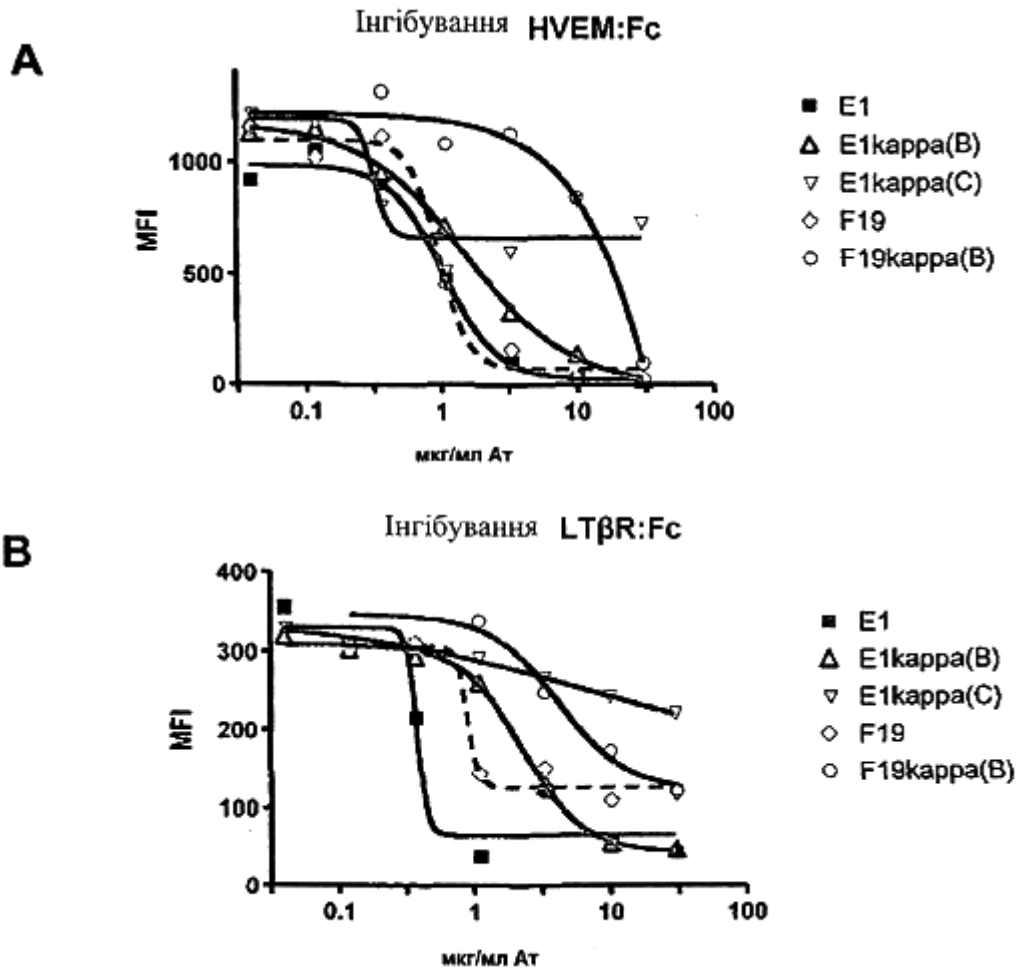
F19, скориговані відносно каналу живих клітин



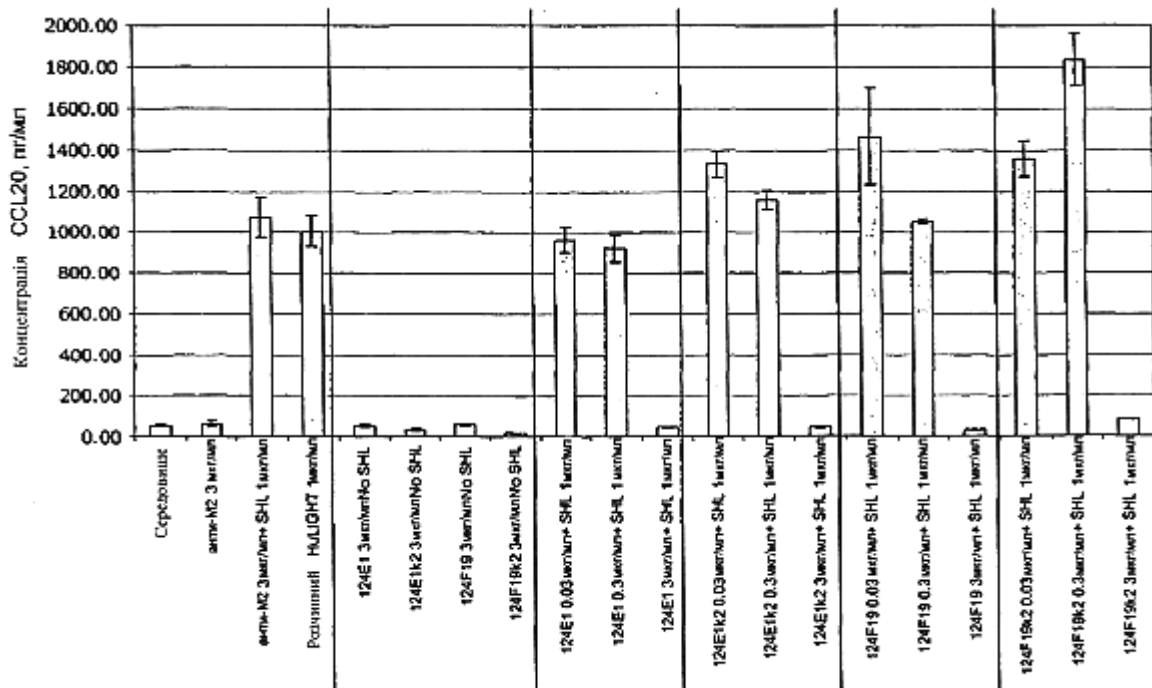
Фиг. 19

Розчинне Ат	Ат для покриття			
	E1	E1kappa(B)	F19	F19kappa(B)
E1	90	91	0	0
E1kappa(B)	92	92	0	0
F19	0	0	98	98
F19kappa(B)	0	24	98	98
анти-M2	0	0	0	0

Фиг. 20



Фіг. 21



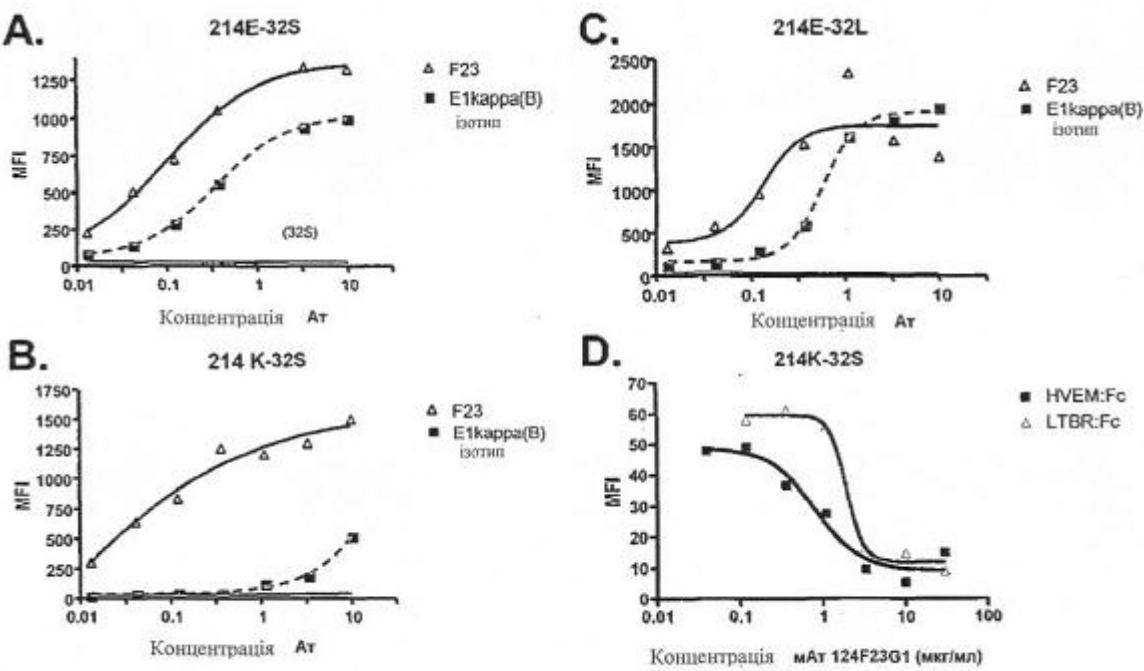


B.

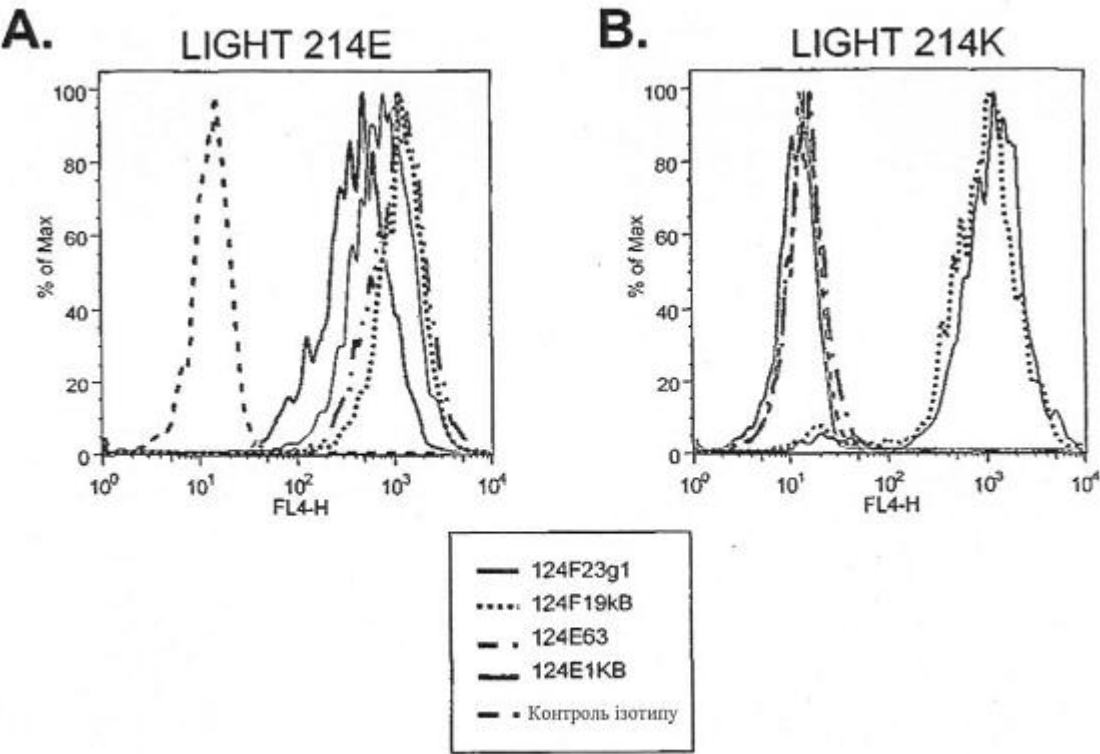
Цитоплазматичний: амінокислота **32**Цільність популяції **TNFSF14 SNP** амінокислота 32

Популяція	Окрема група	Частота алелю
<u>AFR EUR PANEL</u>	Європейцями	1.000
<u>AFR AFR PANEL</u>	Популяції з Африки, які живуть в Європі	1.000
<u>AFR CHN PANEL</u>	Азіати	0.979 0.021
<u>HasMap-CEU</u>	Європейцями	1.000
<u>HasMap-HCB</u>	Азіати	0.989 0.011
<u>HasMap-JPT</u>	Азіати	1.000
<u>HasMap-YRI</u>	Африканці, які живуть на півдні на Східно	1.000

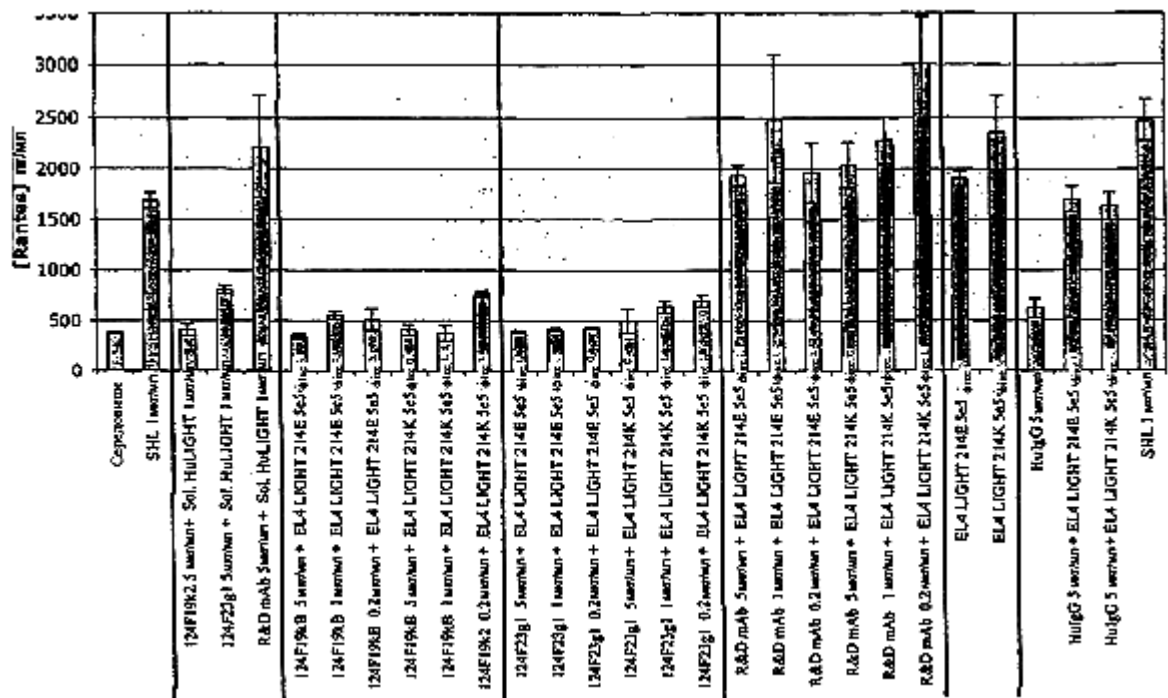
Fig. 24



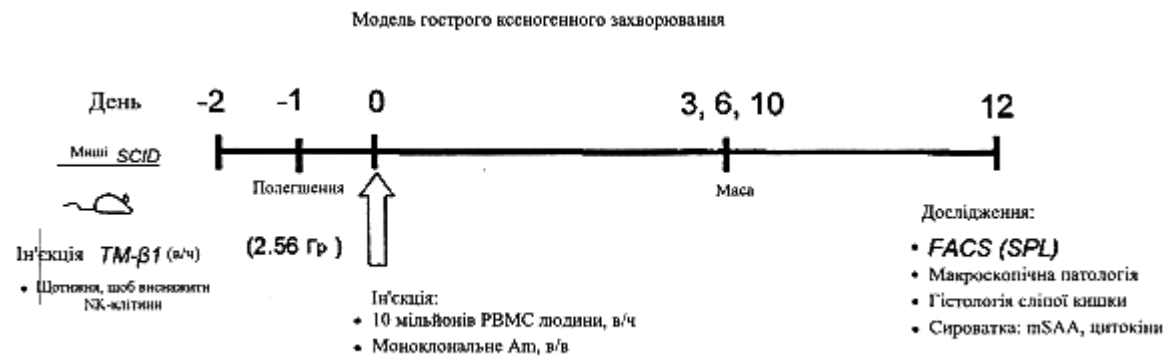
Фиг. 25



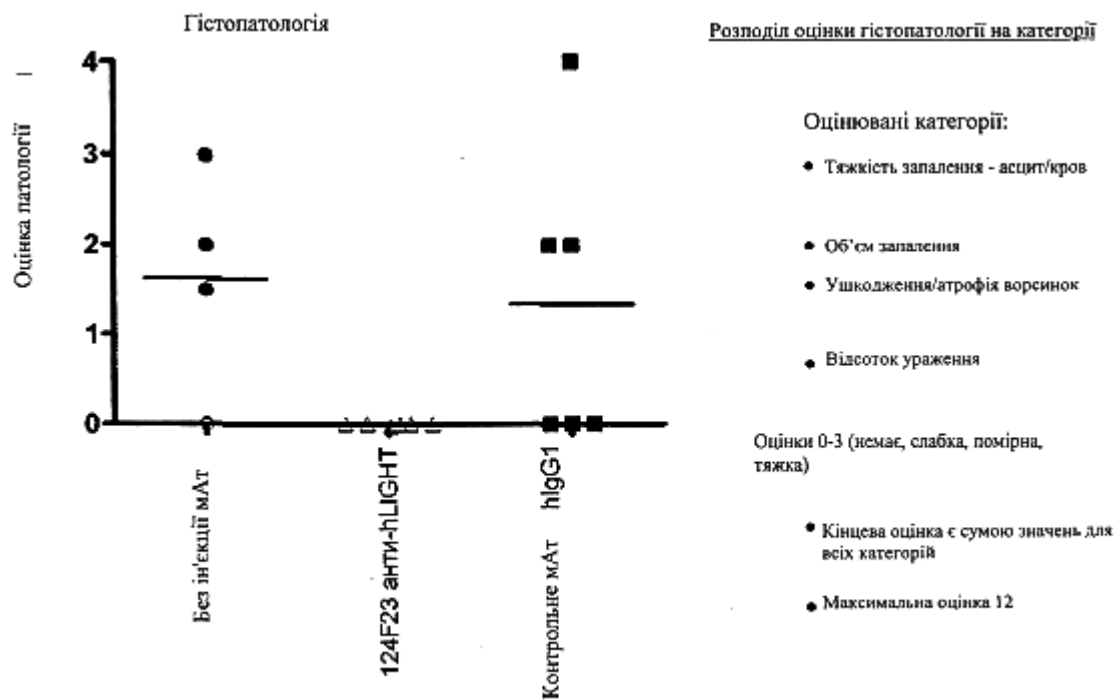
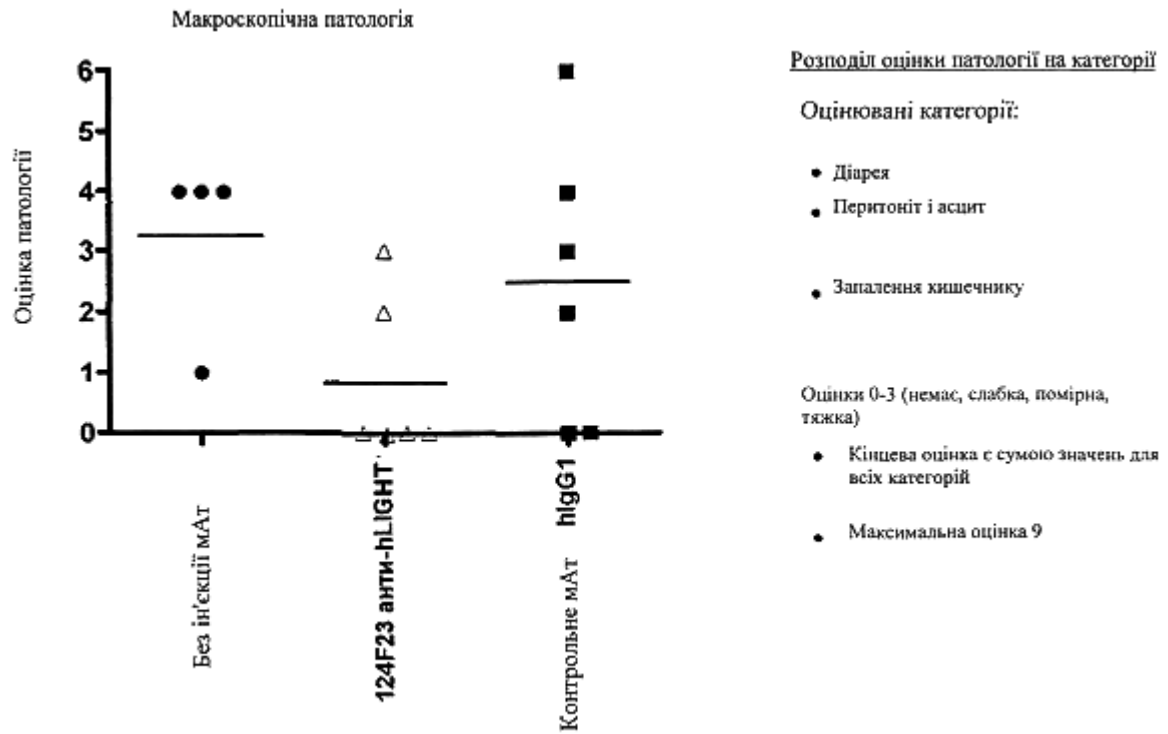
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



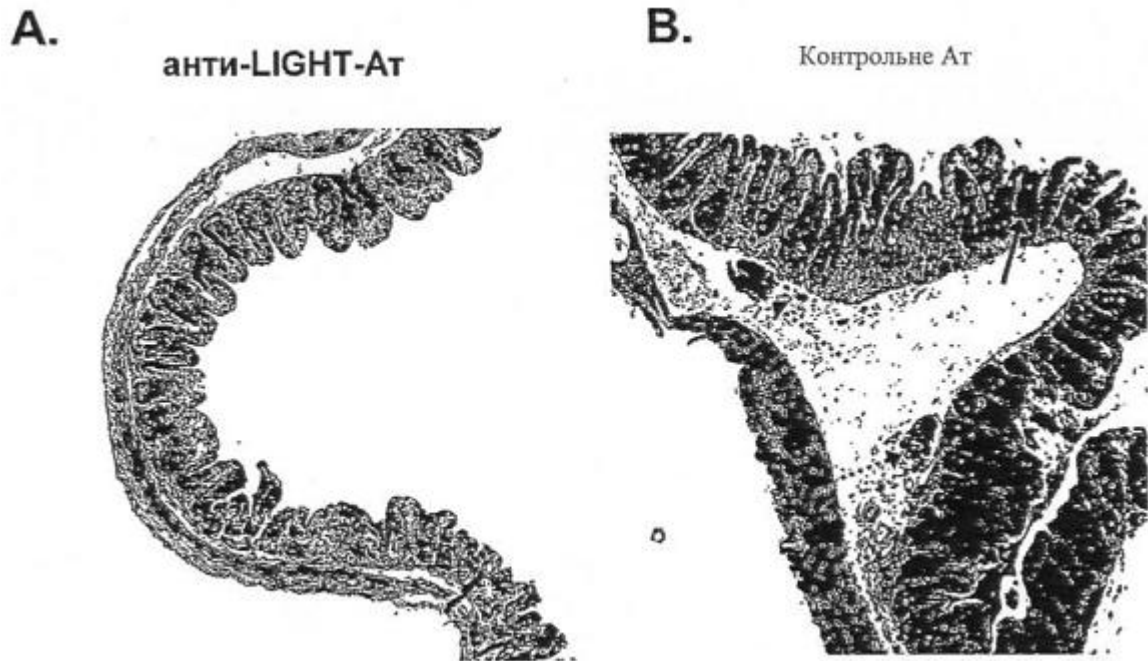


Fig. 31

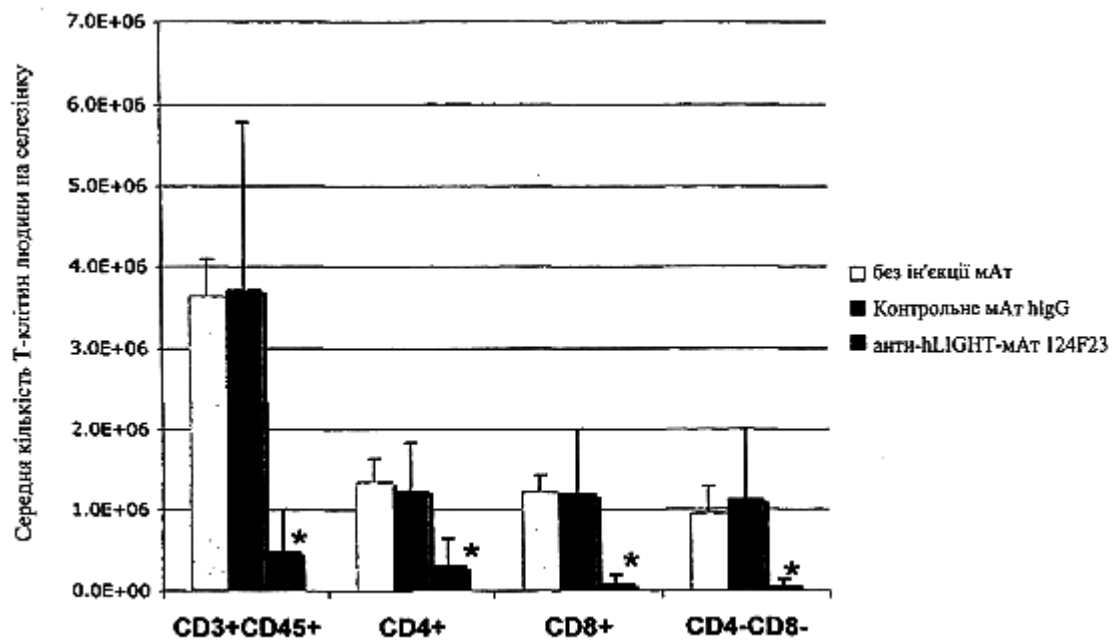


Fig. 32

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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