



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007114328/13, 16.09.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.09.2005

(30) Конвенционный приоритет:
17.09.2004 EP 04022158.2
23.12.2004 EP 04030546.8

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2008

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: NOHARA C. et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. J Immunol. 166(3), 2001, с.: 2108-2115. WANG Q. et al. Characterization and functional study of five novel monoclonal antibodies against human (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 17.04.2007

(86) Заявка РСТ:
EP 2005/009968 (16.09.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2006/029879 (23.03.2006)

Адрес для переписки:
101000, Москва, М.Златоустинский пер., 10,
кв.15, "Евромаркпат", пат.пов.
И.А.Веселицкой, рег.№ 11

(72) Автор(ы):

ЭНДЛЬ Йозеф (DE),
ЮГИ Элси (US),
ФЬЮНТЕС Мария (US),
ГРАУС Иво (NL),
ЛАБРИЙН Аран (NL),
ЛАНЦЕНДЁРФЕР Мартин (DE),
ПАРРЕН Паул (NL),
РЕБЕРС Франк (NL),
ШУМАХЕР Ральф (DE),
ЗЕБЕР Штефан (DE),
ВАН-ДЕ-ВИНКЕЛ Ян (NL),
ВАН-ВУГТ Мартине (NL)

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(54) АНТИТЕЛА К OX40L

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой антитело, которое связывается с OX40L, и варианты этого антитела, которые содержат определенные Fc-фрагменты, полученные из организма человека, и не связываются с фактором комплемента C1q. При этом моноклональное антитело продуцируется линией клеток, выбранной из

группы, включающей линии клеток, депонированные в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под инвентарными №№DSM ACC 2685, DSM ACC 2686, DSM ACC 2688, DSM ACC 2689. Также изобретение относится к способу получения такого антитела, к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела по изобретению. Кроме того, антитело по

изобретению используется в диагностической композиции для выявления OX40L in vitro, в фармацевтической композиции для профилактики и лечения воспалительных заболеваний, а также в приготовлении

лекарственного средства для профилактики и лечения воспалительных заболеваний. Антитела по изобретению обладают преимуществом для пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями. 9 н.п. ф-лы, 20 ил., 7 табл.

(56) (продолжение):

OX40L highlight reverse signalling: enhancement of IgG production of B cells and promotion of maturation of DCs. Tissue Antigens. 64(5), 2004, с.: 566-574. **TOTSUKA T. et al. Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis.** Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 284(4), 2003 г., стр.: G595-G603. **РОЙТ А. и др. Иммунология.** - М.: Мир, 2000, с.97-109.

RU 2 3 9 5 5 2 3 C 2

RU 2 3 9 5 5 2 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007114328/13, 16.09.2005**

(24) Effective date for property rights:
16.09.2005

(30) Priority:
17.09.2004 EP 04022158.2
23.12.2004 EP 04030546.8

(43) Application published: **27.10.2008**

(45) Date of publication: **27.07.2010 Bull. 21**

(85) Commencement of national phase: **17.04.2007**

(86) PCT application:
EP 2005/009968 (16.09.2005)

(87) PCT publication:
WO 2006/029879 (23.03.2006)

Mail address:
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., 10, kv.15,
"Evromarkpat", pat.pov. I.A.Veselitskoj, reg.№ 11

(72) Inventor(s):

EhNDL' Jozef (DE),
JuGI Ehlsi (US),
F'JuNTES Marija (US),
GRAUS Ivo (NL),
LABRIJN Aran (NL),
LANTsENDERFER Martin (DE),
PARREN Paul (NL),
REBERS Frank (NL),
ShUMAKhER Ral'f (DE),
ZEBER Shtefan (DE),
VAN-DE-VINKEL Jan (NL),
VAN-VUGT Martine (NL)

(73) Proprietor(s):

F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(54) OX40L ANTIBODY

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and is an antibody which bonds with OX40L and variants of this antibody which contain certain Fc-fragments obtained from the human body and do not bond with the complement factor Clq. The monoclonal antibody is produced by a cell line selected from a group which includes cell lines deposited in the German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ) under inventory numbers No. DSM ACC 2685, DSM ACC 2686, DSM ACC 2688, DSM ACC

2689. The invention also relates to a method of obtaining such antibody, to nucleic acid molecules which code the disclosed antibody. The disclosed antibody has an advantage for patients suffering from inflammatory diseases.

EFFECT: antibody is used in diagnostic composition for detecting OX40L in vitro, in a pharmaceutical composition for preventing and treating inflammatory diseases, as well as in preparing a medicinal agent for preventing and treating inflammatory diseases.

9 cl, 20 dwg, 7 tbl, 23 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящее изобретение относится в целом к антителам к OX40L и, в частности, к антителам к OX40L, которые не связываются с фактором комплемента C1q, фармацевтическим композициям и их применению. Предпочтительно эти антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела.

Человеческий OX40L (gp34, SwissProt P23510) экспрессируется на активированных В-клетках и дендритных клетках при связывании CD40/CD40L и на эндотелиальных клетках в воспалительной ткани (см. обзор: Weinberg A.D., Trends Immunol. 23, 2002, сс. 102-109). Этот гликопротеин впервые был выделен из зараженных Т-лимфотропным вирусом человека типа I (HTLV-1) человеческих лейкозных клеток (иммортализация этих Т-клеток путем образования аутокринной петли с OX40). OX40L и антитела к нему упомянуты в WO 95/12673; WO 95/21915; WO 99/15200; у Baum P.R. и др., EMBO J. 13, 1994, сс. 3992-4001; Imura A. и др., Blood 89, 1997, сс. 2951-2958; Imura A. и др., J.

Exp. Med. 183, 1996, cc. 2185-2195; Kjaergaard J. и др., J. Immunol. 167, 2001, cc. 6669-6677; Lane P., J. Exp. Med. 19, 2000, cc. 201-206; Mallett S. и Barclay A.N., Immunol. Today 12, 1991, cc. 220-223; Mallett S. и др., EMBO J. 9, 1990, cc. 1063-1068; Ndhlovu L.C. и др., J. Immunol. 167, 2001, cc. 2991-2999; Ohshima Y. и др., J. Immunol. 159, 1997, cc. 3838-3848; Rogers P.R. и др., Immunity 15, 2001, cc. 445-455; Stüber E. и Strober W., J. Exp. Med. 183, 1996, cc. 979-989; Stüber E. и др., Gastroenterology 115, 1998, cc. 1205-1215; Takahashi Y. и др., J. Virol. 75, 2001, cc. 6748-6757; Takasawa N. и др., Jpn. J. Cancer Res. 92, 2001, cc. 377-382; Taylor L. и Schwarz H., J. Immunol. Meth. 255, 2001, cc. 67-72; Weinberg A.D. и др., Nature Medicine 2, 1996, cc. 183-189; Weinberg A.D. и др., Semin. Immunol. 10, 1998, cc. 471-480; Weinberg A.D., Trends Immunol. 23, 2002, cc. 102-109; Wu T. и др., Transplant. Proc. 33, 2001, cc. 217-218; Higgins L.M. и др., J. Immunol. 162, 1999, cc. 486-493; и Yoshioka T. и др., Eur. J. Immunol. 30, 2000, cc. 2815-2823. Человеческий OX40L представляет собой лиганд человеческого OX40 (CD134), который в течение непродолжительного периода времени экспрессируется на активированных CD4⁺-Т-клетках. Контакт OX40 с его лигандом приводит к возникновению дополнительного стимулирующего (костимулирующего) сигнала Т-клеточной активации. Установлено, что взаимодействие OX40/OX40L создает двунаправленный сигнал (Matsumura Y. и др., J. Immunol. 163, 1999, cc. 3007-3011; Kotani A. и др., Immunol. Lett. 84, 2002, cc. 1-7). Кроме того, взаимодействие OX40/OX40L опосредует адгезию активированной Т-клетки с эндотелиальными клетками в воспалительных тканях. Поскольку для OX40L характерна лишь кратковременная экспрессия на активированных В-клетках, дендритных клетках (DC) и эндотелиальных клетках, антитела к OX40L должны избирательно блокировать Т-клеточную активацию и адгезию эндотелиальных клеток в процессе воспалительного ответа, но не оказывать воздействия на неактивированные периферические Т-клетки. У Yoshioka A. и др. (Eur. J. Immunol. 30, 2000, cc. 2815-2823) продемонстрирован терапевтический потенциал нейтрализующего МАт к мышинному OX40L (mOX40L) при моделировании ревматоидного артрита у мышей. Его введение в очень значительной степени облегчало серьезность заболевания. Установлено, что это антитело обладает аналогичной активностью при использовании моделей других родственных заболеваний, например, воспалительного кожного заболевания,

экспериментального аутоиммунного заболевания (EAE), GVHD (реакция «трансплантат против хозяина»), индуцируемого мочой воспалительного заболевания кишечника (Yoshioka A. и др., Eur. J. Immunol 30, 1999, сс. 2815-2823; Salek-Ardakani S. и др., J. Exp. Med. 198, 2003, сс. 315-324; Burgess J.K. и др., J. Allergy Clin. Immunol. 113, 2004, сс. 683-689; Hoshino A. и др., Eur. J. Immunol. 33, 2003, сс. 861-869; Arestides R.S. и др., Eur. J Immunol. 32, 2002, сс. 2874-2880; Nohara C. и др., J. Immunol. 166, 2001, сс. 2108-2115; Weinberg A.D. и др., J. Immunol. 162, 1999, сс. 1818-1826; Higgins L.M. и др., J. Immunol. 162, 1999, сс. 486-493; Humphreys I.R. и др., J. Exp. Med. 198, 2003, сс. 1237-1242; Akiba H. и др., J. Exp. Med. 191, 2000, сс. 375-380; Ishii N. и др., Eur. J. Immunol. 33, 2003, сс. 2372-2381; Blazar B.R. и др., Blood 101, 2003, 3741-3748; Tsukada N. и др., Blood 95, 2000, сс. 2434-2439; Akiba H., и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 1998, сс. 131-136.

Было изучено противовоспалительное действие антител к OX40L при моделировании различных заболеваний (Sugamura K. и др., Nat. Rev. Immunol. 4, 2004, сс. 420-431).

У Tanaka Y. и др, Int. J. Cancer 36, 1985, сс. 549-555; Tozawa H. и др., Int. J. Cancer 41, 1988, сс. 231-238; и Miura S. и др., Mol. Cell. Biol. 11, 1991, сс. 1313-1325 описаны мышинные моноклональные антитела, обозначенные как TARM-34 и TAG-34, которые вступают во взаимодействие с поверхностными антигенами линий человеческих лимфоцитов, несущих Т-лимфотропный вирус человека типа I (HTLV-I). Антитело TAG-34 поступает в продажу от фирмы MBL International Corporation. TAG-34 связывается также с OX40L.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу, предпочтительно моноклональному антителу, отличающемуся тем, что это антитело связывается с OX40L, содержит человеческий Fc-фрагмент и не связывается с человеческим фактором комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-рецептором на NK-клетках.

Изобретение относится также к антителу, предпочтительно моноклональному антителу, отличающемуся тем, что это антитело содержит человеческий Fc-фрагмент, связывается с OX40L и с денатурированным OX40L (при оценке методом Вестерн-блоттинга) при концентрации антитела 100 нг. Это антитело связывается с полипептидным эпитопом OX40L, аналогичным эпитопу,

с которым связывается моноклональное антитело LC.001. Такие антитела представляют собой, например, LC.001, LC.033 и LC.060. Эти антитела предпочтительно представляют собой человеческий иммуноглобулин IgG1-типа (дикого типа) или не связываются с человеческим фактором комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-рецептором на NK-клетках.

Изобретение относится также к антителу, связывающемуся с OX40L, отличающемуся тем, что оно содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, которые отличаются тем, что переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3, отличающиеся тем, что CDR3 выбирают из SEQ ID NO: 33-38. В наиболее предпочтительном варианте CDR1 выбирают из SEQ ID NO: 21-25, CDR2 выбирают из SEQ ID NO: 26-32 и CDR3 выбирают из SEQ ID NO: 33-38.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что оно содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, которые отличаются тем, что переменная область легкой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3, отличающиеся тем, что CDR3 выбирают из SEQ ID NO: 51-57. В наиболее предпочтительном варианте CDR1 выбирают из SEQ ID NO: 39-44, CDR2 выбирают из SEQ ID NO: 45-50 и CDR3 выбирают из SEQ ID NO: 51-57.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что оно содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, которые отличаются тем, что переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3, отличающиеся тем, что CDR3 тяжелой цепи выбирают из SEQ ID NO: 33-38 и CDR3 легкой цепи выбирают из SEQ ID NO: 51-57. В наиболее предпочтительном варианте переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO: 21-25, CDR2, выбранный из SEQ ID NO: 26-32, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO: 33-38, а переменная область легкой цепи содержит CDR1, выбранный из SEQ ID NO: 39-44, CDR2, выбранный из SEQ ID NO: 45-50, и CDR3, выбранный из SEQ ID NO: 51-57.

Все CDR выбирают каждый независимо друг от друга, но таким образом, чтобы сохранялась способность антитела связываться с OX40L. Таким образом, можно объединять CDR легкой и тяжелой цепей одного и того же антитела LC или CDR легкой цепи антитела LC.001 с CDR тяжелой цепи антитела LC.001,

LC.059 или LC.063. CDR каждой цепи разделены аминокислотами каркасного участка.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что антитело содержит CDR, которые независимо друг от друга выбирают из группы, включающей

а) CDR вариабельной области легкой цепи (V_L), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и CDR вариабельной области тяжелой цепи (V_H), имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:2;

б) CDR вариабельной области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, и CDR вариабельной области тяжелой цепи, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:4;

в) CDR вариабельной области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, и CDR вариабельной области тяжелой цепи, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:6;

г) CDR вариабельной области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и CDR вариабельной области тяжелой цепи, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:8;

д) CDR вариабельной области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, и CDR вариабельной области тяжелой цепи, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:10;

е) CDR вариабельной области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11 или 16, и CDR вариабельной области тяжелой цепи, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO:12;

ж) вариабельную область легкой цепи (V_L), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и вариабельную область тяжелой цепи (V_H), имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:17;

3) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:18, и вариабельную область тяжелой цепи (V_H), имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:19;

и) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и вариабельную область тяжелой цепи (V_H), имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:20; или его OX40L-связывающий фрагмент.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что это антитело содержит вариабельную область, независимо выбранную из группы, включающей

а) вариабельную область легкой цепи (V_L), которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область тяжелой цепи (V_H), которая имеет последовательность SEQ ID NO:2;

б) вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:4;

в) вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:6;

г) вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:8;

д) вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:10;

е) вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 или 16, и вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:12;

ж) переменную область легкой цепи (V_L), которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область тяжелой цепи (V_H), которая имеет последовательность SEQ ID NO:17;

з) переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и переменную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:19;

и) переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:20;

или ее OX40L-связывающий фрагмент.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что человеческая переменная область легкой цепи содержат аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 16 и 18.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что человеческая переменная область тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 19 и 20.

Последовательности CDR-участков тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NO:21-38 и 39-57.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что антитело содержит переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 переменную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:2, 17 или 20.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что человеческая константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:14 и 15, или константная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:58.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что антитело содержит константную область легкой к-цепи, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, или константную область

легкой цепи, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:61, 65 или 69.

Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что связывается с OX40L и относится к классу человеческого IgG1 (дикого типа) и содержит тяжелую γ -цепь, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:58, 62 или 66. Наиболее предпочтительным является антитело, содержащее в качестве

- а) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:58 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,
- б) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:62 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или
- в) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:66 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, связывающееся с OX40L, которое отличается тем, что продуцируется клеточной линией hu-Mab<hOX40L>LC.001, hu-Mab<hOX40L>LC.005, hu-Mab<hOX40L>LC.010, hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 или hu-Mab<hOX40L>LC.033.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно представляет собой химерное, человеческое или гуманизированное антитело.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что значение K_D , характеризующей его связывание с OX40L, составляет менее 10^{-8} М (от 10^{-12} до 10^{-8} М), более предпочтительно значение K_D составляет от 10^{-12} до 10^{-9} М при оценке с помощью BIAcore-анализа.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно ингибирует взаимодействие OX40L с OX40 при оценке с помощью ELISA с использованием иммобилизованного OX40L (предпочтительно биотинилированного OX40L, иммобилизованного на сенсibilизированной стрептавидином поверхности) при концентрации сенсibilизирующего агента 0,5 мкг/мл, при этом значение IC_{50} не превышает 4 нМ. Более предпочтительно значение IC_{50} составляет от 1 до 4 нМ.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что представляет собой антитело, не связывающееся с фактором комплемента C1q при анализе с помощью ELISA, по данным которого максимальное связывание (B_{max}) антитела в концентрации 10 мкг/мл с C1q составляет 30%

или менее, предпочтительно 20% или менее, по сравнению с V_{max} антитела LC.001.

Предпочтительно антитело не связывается с человеческим $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$ и/или $Fc\gamma RIIB$. В наиболее предпочтительном варианте антитело не связывается с человеческим $Fc\gamma$ -рецептором на эффекторных NK-клетках.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что представляет собой антитело, которое по данным анализа не связывается с $Fc\gamma$ -рецептором на NK-клетках, при этом максимальное связывание (V_{max}) антитела в концентрации 20 мкг/мл с NK-клетками составляет 20% или менее, предпочтительно 10% или менее, по сравнению с V_{max} антитела LC.001.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что не связывается с $Fc\gamma RI$. Это означает, что антитело отличается значением EC_{50} , которое в пять раз или более, предпочтительно в семь раз или более, например, в восемь раз или более, превышает значение EC_{50} LC.001 при оценке с использованием анализа связывания антитела в концентрации от 0,078 до 10 мкг/мл с клеткой В-клеточной лимфомы, лишенной $Fc\gamma RIIA$ и $Fc\gamma RIIB$, но экспрессирующей рекомбинантный $Fc\gamma RI$.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что представляет собой антитело подкласса IgG4 или антитело подкласса IgG1, несущее по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, предпочтительно в человеческом Fc-фрагменте, которая обуславливает отсутствие связывания с фактором комплемента C1q и/или отсутствие связывания с человеческим $Fc\gamma$ -рецептором на NK-клетках.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что оно не активирует фактор комплемента C3.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что оно представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG4. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело отличается тем, что представляет собой любое антитело класса IgG, предпочтительно IgG1 или IgG4, содержащее по меньшей мере одну мутацию E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 и/или P329 (нумерация согласно EU-индексу). Наиболее предпочтительными являются IgG1, несущие мутации PVA236, L234A/L235A и/или GLPSS331, а также IgG4,

несущий мутацию L235E. Предпочтительным является также антитело из подкласса IgG4, которое содержит мутацию S228P или мутацию S228P и L235E (Angal S. и др., Mol. Immunol. 30, 1993, сс. 105-108).

Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой антитело в виде человеческого иммуноглобулина подкласса IgG1, несущее одну или несколько мутацию(ий), которые представляют собой PVA236, GLPSS331 и/или L234A/L235A (нумерация согласно EU-индексу).

Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что связывается с OX40L, является представителем класса IgG1, который несет мутацию L234A/L235A и содержит в качестве тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:59, 63 или 67.

Наиболее предпочтительным является антитело, содержащее в качестве

- а) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:59 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,
- б) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:63 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или
- в) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:67 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, является представителем класса IgG4, который несет мутацию S228P, содержит в качестве тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:60, 64 или 68.

Наиболее предпочтительным является антитело, содержащее в качестве

- а) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:60 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,
- б) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:64 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или
- в) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:68 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что не обладает комплементзависимой цитотоксичностью (CDC).

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что не обладает антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

Таким образом, изобретение относится к антителам к OX40L или индивидуальным тяжелым или легким цепям, которые отличаются их CDR, переменными областями, полными аминокислотными последовательностями или гибридами и которые не содержат никакого Fc-фрагмента или любого типа Fc-фрагмента, предпочтительно Fc-фрагмента человеческого IgG1 или Fc-фрагмента человеческого IgG4, либо немодифицированного, либо

модифицированного по сравнению с человеческим фрагментом с помощью указанных выше мутаций.

Таким образом, изобретение относится также к антителам, предпочтительно моноклональным антителам, отличающимся тем, что эти антитела связываются с OX40L, содержат человеческий Fc-фрагмент и не связываются с фактором человеческого комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-рецептором на NK-клетках, которые относятся к человеческому IgG4 или человеческому IgG1 или человеческому IgG4, где оба типа модифицированы с помощью указанных выше мутаций.

Изобретение относится также к антителам, предпочтительно моноклональным антителам, отличающимся тем, что эти антитела связываются с OX40L и с денатурированным OX40L (при анализе методом Вестерн-блоттинга) при использовании концентрации антитела 100 нг. Это антитело связывается с тем же самым полипептидным эпитопом OX40L, с которым связывается моноклональное антитело LC.001. Антитела не содержат никакого Fc-фрагмента или любого типа Fc-фрагмента, предпочтительно человеческого IgG1 или человеческого IgG4, либо дикого типа, либо модифицированного с помощью указанных выше мутаций.

Антитела, предлагаемые в изобретении, обладают новыми и патентоспособными признаками, обладая преимуществом для пациента, который нуждается в лечении с помощью антител к OX40L, прежде всего для пациента, страдающего воспалительными заболеваниями, прежде всего ревматоидным артритом, аллергической астмой и GvHD при трансплантации (см. также Sugamura K. и др., Nat. Rev. Immunol. 4, 2004, сс. 420-431).

Следующим вариантом осуществления изобретения является молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу антитела, его вариабельную цепь или CDR-участок, предлагаемые в изобретении.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой Fab-, F(ab')₂- или одноцепочечный фрагмент.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, предлагаемую в изобретении.

Следующим вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор, предлагаемый в изобретении.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, которые позволяют синтезировать молекулу антитела, и выделяют молекулу антитела из культуры.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, предпочтительно фармацевтическая или диагностическая композиция антитела, предлагаемого в изобретении.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая антитело, предлагаемое в изобретении, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ лечения пациента, нуждающегося в такой терапии, отличающийся тем, что пациенту вводят в терапевтически эффективном количестве антитело, предлагаемое в изобретении.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является применение антитела, предлагаемого в изобретении, в терапии, предпочтительно для лечения воспалительных заболеваний, прежде всего для лечения и/или предупреждения ревматоидного артрита, астмы и GvHD (реакция «трансплантат против хозяина»).

Следующим вариантом осуществления изобретения является применение антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для профилактики и/или лечения воспалительных заболеваний, предпочтительно для лечения ревматоидного артрита, астмы и GvHD.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является диагностический набор, содержащий антитело, предлагаемое в изобретении, молекулу нуклеиновой кислоты, предлагаемую в изобретении, вектор, предлагаемый в изобретении, или клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении.

Подробное описание изобретения

Понятие «OX40L» относится к мембранному белку типа II, принадлежащему к семейству TNF-лигандов. Его обозначают также как АСТ-4-

рецептор, CD134L, gp34 или TNF4_Human. Он имеет молекулярную массу 34 кДа и хранится в SwissProt под регистрационным номером P23510.

Понятие «OX40» относится к рецептору, который связывается с OX40L. Он относится к мембранному белку типа I, который принадлежит к семейству TNF-рецепторов. Его обозначают также как АСТ-4, OX40L-рецептор, антиген CD134, антиген АСТ35, TNF4_Human. Он имеет молекулярную массу 50 кДа и хранится в SwissProt под регистрационным номером P43489.

Понятие «антитело» относится к различным формам антител, предпочтительно моноклональных антител, включая (но, не ограничиваясь ими) полные антитела, фрагменты антител, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и полученные с помощью генной инженерии антитела (варианты или мутантные антитела), если они сохраняют характерные свойства, предлагаемые в изобретении. Наиболее предпочтительными являются человеческие или гуманизированные моноклональные антитела, прежде всего рекомбинантные человеческие антитела.

Понятие «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» в контексте настоящего описания относится к препарату молекул антител, которые имеют одинаковый аминокислотный состав.

Понятие «химерное антитело» относится к моноклональному антителу, содержащему вариabельную область, т.е. связывающую область, полученную из одного источника или из одних и тех же видов, и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или видов, которое, как правило, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, которые содержат мышиную вариabельную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами «химерных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания Clq и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела обозначают также как «антитела переключенного класса». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих

сегменты ДНК, которые кодируют переменные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, которые кодируют константные области иммуноглобулинов.

Методы получения химерных антител включают обычные методы

рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 и 5204244).

Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркасные или «гипервариабельные участки» (CDR) модифицированы так, что они содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью родительского иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения мышиный CDR трансплантируют в каркасный участок человеческого антитела для получения «гуманизированного антитела» (см., например, Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс. 323-327; и Neuberger M.S. и др., Nature 314, 1985, сс. 268-270). Особенно предпочтительные CDR соответствуют CDR, которые представляют собой последовательности, распознающие антигены, указанные выше для химерных и бифункциональных антител. Другими формами «гуманизированных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителам, переменные и константные области которых выведены из человеческой зародышевой линии последовательностей иммуноглобулина. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые в результате иммунизации могут продуцировать полный спектр, или путем селекции человеческих антител при отсутствии производства эндогенного иммуноглобулина. Перенос набора генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в такую мутантную зародышевую линию мышей должен приводить к производству человеческих антител после антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 2551-

2555; Jakobovits A. и др., Nature 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, сс. 33-40). Человеческие антитела можно получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom H.R. и Winter, G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388; Marks J.D. и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно использовать также методы Cole с соавторами и Boerner с соавторами (Cole и др., Моноклональный Антитела and Cancer Therapy, Alan R. Liss, с 77 (1985); и Boerner P., и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). Как уже было отмечено для химерных и гуманизированных антител, предлагаемых в изобретении, понятие «человеческое антитело» включает также такие антитела, константная область которых модифицирована с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания FcR, например, путем «переключения класса», т.е. замены или мутации Fc-фрагментов (например, IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутация). Изобретение относится также к моноклональным человеческим антителам к OX40L, которые связываются с C1q и/или FcR. Такие человеческие антитела отличаются высокой избирательностью в отношении человеческого OX40L по сравнению с мышиным OX40L (связывание с мышиным OX40L >30 раз ниже, чем с человеческим OX40L) и не характеризуются неспецифическим связыванием с TNF α или CD40L вплоть до концентрации 500нМ. Такие антитела можно применять для получения антител, которые не связываются с C1q и/или FcR.

Понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, такой как NS0- или CHO- клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным из-за присутствия человеческих генов иммуноглобулинов или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области, которые находятся в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, подвергают соматической гипермутации *in vivo*. Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей

рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из человеческой зародышевой линии последовательностей VH и VL и родственным им линий, могут не существовать в естественных условиях в спектре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*.

Понятие «вариабельная область» (вариабельная область легкой цепи (VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания относится к каждой из пары легких и тяжелой цепей, которые участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном. Домены вариабельных человеческих легких и тяжелых цепей имеют одинаковую общую структуру и каждый домен содержит четыре каркасных участка (FR), последовательности которых являются весьма консервативными, связанных тремя «гипервариабельными участками» (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к β -складчатой конформации, а CDR могут образовывать петли, соединяющие β -складчатую структуру. CDR в каждой цепи сохраняют их трехмерную структуру с помощью каркасных участков, а также CDR из других цепей антигенсвязывающего центра. CDR3-участки тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антител, предлагаемых в изобретении, и поэтому являются еще одним объектом изобретения.

Понятия «гипервариабельный участок» или «антигенсвязывающий центр антитела» в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывания антигена. Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность участков» или «CDR». «Каркасные» или «FR»-участки представляют собой участки вариабельной области, отличные от указанных в настоящем описании остатков гипервариабельного участка. Таким образом, легкие и тяжелые цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR каждой цепи разделены аминокислотами указанного каркасного участка. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляют собой участки, которые вносят наибольший вклад в связывание с антигеном. CDR- и FR-участки определяют с помощью стандартной номенклатуры Кэбота (Kabat и др., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 5-изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Понятие «нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты» в контексте настоящего описания относится к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

Нуклеиновую кислоту «функционально связывают», когда ее помещают под функциональную связь с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или лидера секреции функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде предбелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он помещен так, чтобы он облегчал трансляцию. Как правило, понятие «функционально связаны» означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидера секреции, смежными в рамке считывания. Однако не является необходимым, чтобы энхансеры были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то согласно общепринятой практике используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

В контексте настоящего понятия «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие определения включают потомство. Так, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» относятся к первичной клетке субъекта и полученным из нее культурам безотносительно к количеству переносов. Следует понимать также, что все потомство может не быть полностью идентичным по составу ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Под объем изобретения подпадает вариант потомства, имеющего такую же функцию или биологическую активность, которая обнаружена у исходной трансформированной клетки. Если используются другие определения, то это будет очевидно из контекста.

«Константные области» не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными

функциями. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела или иммуноглобулины подразделяют на следующие классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, некоторые из которых можно
 5 дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают α , ϵ , γ и μ соответственно.

10 Антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно относятся к IgG-типу.

Антитела, предлагаемые в изобретении, содержат в качестве Fc-фрагмента
 15 предпочтительно человеческий Fc-фрагмент и предпочтительно все другие части человеческих константных областей. Fc-фрагмент антитела принимает непосредственное участие в активации комплемента, связывании C1q, активации C3 и связывании Fc-рецептора. Хотя влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q обусловлено
 20 определенными сайтами связывания в Fc-фрагменте. Такие сайты связывания известны в данной области и описаны, например, у Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс. 2555-2560; Brunhouse R. и Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс. 907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс. 338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс. 995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000,
 25 сс. 4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, сс. 12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс. 319-324; и EP 0307434. Такие сайты связывания представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу, предложенному Кэботом, см. ниже).

Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обуславливают активацию комплемента, связывание C1q и активацию C3, в то время как IgG4 не
 40 активирует систему комплемента, не связывает C1q и не активирует C3. В контексте настоящего описания понятие «Fc-фрагмент, который имеет человеческое происхождение и не связывает человеческий фактор комплемента C1q и/или человеческий Fc γ -рецептор на NK-клетках» обозначает Fc-фрагмент,
 45 который представляет собой либо Fc-фрагмент человеческого антитела подкласса IgG4, либо Fc-фрагмент человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2 или IgG3, модифицированный таким образом, что он не связывается с C1q, ни
 50 активирует C3 и/или не связывается с FcR, как это будет описано ниже. Понятие

«Fc-фрагмент антитела» хорошо известно специалисту в данной области и его определяют на основе расщепления антител папаином. Предпочтительно Fc-фрагмент представляет собой человеческий Fc-фрагмент и особенно предпочтительно представляет собой либо фрагмент из человеческого иммуноглобулина подкласса IgG4, предпочтительно имеющего мутацию в шарнирной области (например, S228P и/или L235E), либо мутантный Fc-фрагмент человеческого иммуноглобулина подкласса IgG1. Наиболее предпочтительными являются Fc-фрагменты, которые имеют константные области тяжелой цепи, выбранные из областей, представленных в SEQ ID NO:14 и 15, или включенных в SEQ ID NO:58, 59, 60, SEQ ID NO: 14 с мутациями L234A и L235A или SEQ ID NO:15 с мутацией S228P или мутациями S228P и L235E.

Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с OX40L и не связывается с фактором комплемента C1q и/или Fc-рецептором. В предпочтительном варианте осуществления изобретения эти антитела не обладают комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) и/или антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC). Предпочтительно это антитело отличается тем, что оно связывает OX40L, содержит человеческий Fc-фрагмент и не связывает фактор комплемента C1q. Более предпочтительно такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело.

Понятие «эффекторные функции, опосредуемые Fc-фрагментом Fc-области антитела» относится к эффекторным функциям, которые проявляются после связывания антитела с антигеном (эти функции включают активацию каскада комплемента и/или клеточную активацию с помощью Fc-рецептора).

Функцию каскада комплемента можно оценивать с помощью анализа CH50. Овечьи эритроциты, сенсibilизированные антителами к эритроцитам (EA), добавляют в тестируемую сыворотку для активации классического пути, приводящего к гемолизу. Объем сыворотки, необходимый для лизиса 50% эритроцитов, соответствует величине CH₅₀ (титр комплемент, обуславливающий 50% гемолиз). AP-CH50 является критерием альтернативных и конечных путей. При создании изобретения использовали аналогичную процедуру за

исключением того, что применяли кроличьи эритроциты. Альтернативный путь активируют при добавлении тестируемой сыворотки.

5 C1q и две сериновых протеазы C1r и C1s образуют комплекс C1, первый компонент пути комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Для активации каскада комплемента C1q связывается по меньшей мере с двумя молекулами IgG1 или одной молекулой IgM, присоединенных к антигену-мишенит (Ward E.S. и Ghetie V., Ther. Immunol. 2, 1995, сс. 77-94). Burton D.R. установил (Mol. Immunol. 22, 1985, сс. 161-206), что область тяжелой цепи, содержащая аминокислотные остатки 318-337, участвует в фиксации комплемента. Duncan A.R. и Winter G. (Nature 332, 1988, сс.738-740) с помощью сатинаправленного мутагенеза установили, что Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys 322 в связывании C1q подтверждена способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать опосредуемый комплементом лизис.

Понятие «комплементзависимая цитотоксичность (CDC)» относится к лизису экспрессирующих OX40L человеческих эндотелиальных клеток антителом, предлагаемым в изобретении, в присутствии комплемента. CDC предпочтительно оценивают путем обработки экспрессирующих OX40L человеческих эндотелиальных клеток антителом, предлагаемым в изобретении, в присутствии комплемента. Клетки предпочтительно метят с помощью кальцеина. Считается, что имеет место CDC, если антитело индуцирует лизис 20% или более клеток-мишеней при его использовании в концентрации 30 мкг/мл. При создании изобретения было обнаружено, что важной является способность антител, предлагаемых в изобретении, снижать связывание с фактором комплемента C1q при анализе с помощью ELISA. В целом, при осуществлении такого анализа планшет для ELISA сенсibiliзируют серией концентраций антитела, после чего добавляют очищенный человеческий C1q или человеческую сыворотку. Связывание C1q выявляют с использованием антитела к C1q, а затем с использованием меченного с помощью пероксидазы конъюгата. Связывание (максимальное связывание B_{max}) оценивают по оптической плотности при 405 нм (ОП405) с использованием субстрата для пероксидазы ABTS® (2,2'-азиноди[3-этилбензтиазолин-6-сульфонат (6)]. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, отличающемуся тем, что оно

представляет собой антитело, не связывающееся с фактором комплемента C1q при анализе с помощью ELISA, где максимальное связывание (V_{max}) C1q с антителом, предлагаемым в изобретении, при использовании концентрации антитела 10 мкг/мл составляет 20% или менее по сравнению со значением V_{max}, полученным при использовании антитела LC.001, предпочтительно 10% или менее.

Предпочтительно также, чтобы антитело, предлагаемое в изобретении, обладало пониженной способностью активировать фактор комплемента C3 при анализе с помощью ELISA. Этот анализ осуществляют также как и при оценке C1q. В целом, при осуществлении такого анализа планшет для ELISA сенсibiliзируют серией концентраций антитела, затем добавляют человеческую сыворотку. Связывание C3 оценивают с использованием антитела к C3, а затем с использованием меченого с помощью пероксидазы конъюгата. Связывание (максимальное связывание V_{max}) оценивают по оптической плотности при 405 нм (ОП405) с использованием субстрата для пероксидазы ABTS®. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, отличающемуся тем, что оно представляет собой антитело, не связывающееся с фактором комплемента C3 при анализе с помощью ELISA, где максимальное связывание (V_{max}) C3 с антителом, предлагаемым в изобретении, при использовании концентрации антитела 10 мкг/мл составляет 10% относительно значения V_{max}, полученного при использовании антитела LC.001, предпочтительно 5% или менее.

«Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC)» является функцией, опосредуемой связыванием Fc-рецептора, и это понятие относится к лизису экспрессирующих OX40L клеток-мишеней антителом, предлагаемым в изобретении, в присутствии эффекторных клеток. ADCC предпочтительно оценивают путем обработки препарата экспрессирующих OX40L эритроидных клеток (например, клеток линии K562, которые экспрессируют рекомбинантный человеческий OX40L) антителом, предлагаемым в изобретении, в присутствии эффекторных клеток, таких как свежевыделенные PBMC (моноклеарные клетки периферической крови), или очищенных эффекторных клеток из лейкоцитарной пленки типа моноцитов или NK-клеток (естественные клетки-киллеры). Клетки-мишени метят с помощью ⁵¹Cr и затем инкубируют с антителами. Меченые клетки инкубируют с

эффекторными клетками и анализируют высвобождение в супернатант ^{51}Cr . Для получения контролей инкубируют эндотелиальные клетки-мишени с
 5 эффекторными клетками без антитела. Способность антител индуцировать начальные стадии, обуславливающие ADCC, оценивают путем анализа связывания с экспрессирующими Fcγ-рецептор клетками, такими как клетки, в
 10 которых в результате рекомбинации происходит экспрессия FcγRI и/или FcγRIIA, или NK-клетки (экспрессирующие в основном FcγRIIA). Предпочтительно оценивают связывание с FcγR на NK-клетках.

Эффекторные функции, связанные со связыванием Fc-рецептора, могут
 15 быть опосредованы взаимодействием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на гематопоэтических клетках. Fc-рецепторы принадлежат к
 20 суперсемейству иммуноглобулинов, и для них установлена способность опосредовать как удаление покрытых антителом патогенов путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных
 25 мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, посредством антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC) (Van de Winkel J.G. и Anderson C.L., J. Leukoc. Biol. 49, 1991, сс. 511-524). FcR определяют по их специфичности в отношении
 30 изотипов иммуноглобулинов; Fc-рецепторы, специфичные для антител типа IgG, обозначают как FcγR, для IgE как FcεR, для IgA как FcαR и т.д. Связывание Fc-рецептора описано, например, у Ravetch J.V. и Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492; Capel P.J. и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34; de Haas M. и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, сс. 330-341; и Gessner J.E. и др., Ann. Hematol. 76, 1998, сс. 231-248.

40 Перекрестное сшивание рецепторов Fc-фрагмента антител типа IgG (FcγR) запускает широкий спектр эффекторных функций, включая фагоцитоз, антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность и высвобождение
 45 медиаторов, а также клиренс иммунных комплексов и регуляцию производства антител. У человека охарактеризовано три класса FcγR, и они представляют собой:

50 - FcγRI (CD64), который связывается с мономерным IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и

эозинофилах. Модификация IgG, включающая по меньшей мере одну из
 следующих мутаций E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329, снижает
 связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233–236, замещенные в IgG1 и
 IgG4, снижали связывание с FcγRI в 10³ раз и элиминировали способность
 человеческих моноцитов реагировать на сенсibilизированные антителом
 эритроциты (Armour K.L. и др., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2613–2624).

- FcγRII (CD32), который связывается с входящим в комплекс IgG с
 аффинностью от средней до невысокой и экспрессируется на широком спектре
 клеток. Эти рецепторы можно подразделять на два важных типа, FcγRIIA и
 FcγRIIB. FcγRIIA обнаружен на многих клетках, участвующих в цитолизе
 (например, на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах), и он вероятно, обладает
 способностью активировать процесс цитолиза. FcγRIIB, вероятно, играет роль в
 процессах ингибирования, и он обнаружен на В-клетках, макрофагах и тучных
 клетках и эозинофилах. На В-клетках его функцией, вероятно, является
 подавление дополнительного производства иммуноглобулинов и переключение
 изотипа, например на IgE-класс. На макрофагах действие FcγRIIB заключается в
 ингибировании фагоцитоза, опосредуемого FcγRIIA. На эозинофилах и тучных
 клетках рецепторы b-формы могут способствовать подавлению активации этих
 клеток, оказывая воздействие на связывание IgE со специфичным только для
 него рецептором. Пониженное связывание с FcγRIIA обнаружено, например, для
 IgG, несущего по меньшей мере одну из следующих мутаций E233-G236, P238,
 D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414.

- FcγRIII (CD16), который связывается с IgG с аффинностью от средней до
 низкой и существует в виде двух типов. FcγRIIA обнаружен на НК-клетках,
 макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках и опосредует
 ADCC. Обнаружен высокий уровень экспрессии FcγRIIB на нейтрофилах.
 Пониженное связывание с FcγRIIA обнаружено для иммуноглобулинов,
 несущих по меньшей мере одну из следующих мутаций E233-G236, P238, D265,
 N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338
 и D376.

Картирование сайтов связывания с Fc-рецепторами на человеческом IgG1,
 сайтов указанных выше мутаций и методы оценки связывания с FcγRI и FcγRIIA
 описаны у Shields R.L. и др. JBC 276, 2001, сс. 6591-6604.

Понятие «Fc-рецептор» в контексте настоящего описания относится к активации рецепторов, отличающихся присутствием цитоплазматической последовательности ITAM, связанной с рецептором (см., например, Ravetch J.V. и Bolland S., *Annu. Rev. Immunol.* 19, 2001, сс. 275-290). Такие рецепторы представляют собой FcγRI, FcγRIIA и FcγRIIIA. Антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно обладают пониженной способностью связываться с Fcγ-рецепторами, предпочтительно с FcγIIIA. Предпочтительно понятие «отсутствие связывания с FcγR» означает, что при использовании концентрации антитела 10 мкг/мл связывание антитела, предлагаемого в изобретении, с NK-клетками составляет 10% или менее по сравнению со связыванием, характерным для антитела LC.001.

В то время как для IgG4 выявлено пониженное связывание с FcR, для антител из других подклассов IgG обнаружено сильное связывание. Однако установлено также, что Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (утрата Fc углевода), Pro329 и 234, 235, 236 и 237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435 представляют собой остатки, изменение которых снижает FcR-связывание (Shields R.L. и др. *J. Biol. Chem.* 276, 2001, сс. 6591-6604; Lund J. и др. *FASEB J.* 9, 1995, сс. 115-119; Morgan A. и др., *Immunology* 86, 1995, сс. 319-324; и EP 0307434). Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, из подкласса IgG1 или IgG2 несет мутацию PVA236, GLPSS331 и/или L234A/L235A. Антитело, предлагаемое в изобретении, из подкласса IgG4 предпочтительно несет мутацию L235E. Кроме того, предпочтительными мутациями IgG4 являются S228P или L235E и S228P (ср. таблицу 1).

Понятие «связывание с OX40L» в контексте настоящего описания относится к связыванию антитела с человеческим OX40L при оценке с помощью BIAcore-анализа (фирма Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция). Для дополнительного подтверждения связывания с OX40L можно использовать также ELISA, в котором очищенным OX40L сенсibiliзируют титрационные микропланшеты, или FACS-анализ, в котором меченое антитело непосредственно или косвенным образом связывают с K562-клетками, экспрессирующими OX40L.

При использовании BIAcore-анализа антитело связывают с поверхностью и связывание OX40L оценивают с помощью поверхностного плазмонного

резонанса (SPR). Аффинность связывания оценивают, используя в качестве критерия k_a (константа скорости ассоциации антитела с антигеном), k_d (константа диссоциации) и K_D (k_d/k_a). Для антител, предлагаемых в изобретении, установлено значение K_D , составляющее 10^{-8} или ниже, предпочтительно примерно от 10^{-12} до 10^{-9} М (см. примеры). Таким образом, настоящее изобретение относится к описанному выше антителу, где связывание антитела с OX40L характеризуется значением K_D ниже примерно 10^{-8} М при использовании ВΙΑcore-анализа, предпочтительно значением K_D от 10^{-12} до 10^{-9} М.

При осуществлении ELISA, специфического для OX40L-связывания, OX40L используют для сенсibilизации титрационных микропланшетов и связывание антитела с OX40L оценивают с помощью конъюгированного с HRP антитела к человеческому IgG и обычных стадий ELISA. Полученные с помощью этого анализа значения EC_{50} предпочтительно составляют от 3 до 8 нМ.

Понятие «ингибирование связывания OX40 с OX40L» в контексте настоящего описания относится к связыванию антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с человеческим OX40L, что приводит к ингибированию взаимодействия OX40 / OX40L и тем самым к ингибированию трансдукции индуцируемого OX40L сигнала.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, ингибируют взаимодействие hOX40L/OX40 предпочтительно

I) путем блокирования антителом, что установлено на уровне *in vitro* с помощью ELISA, взаимодействия биотинилированного иммобилизованного OX40L с растворимым OX40 при использовании концентрации биотинилированного OX40L в покрытии (твердая фаза) 0,5 мкг/мл, при этом значения IC_{50} составляют от 1 до 4 нМ,

II) путем блокирования антителом, что установлено на уровне *in vitro* с помощью ВΙΑcore-анализа, взаимодействия иммобилизованного OX40 с растворимым OX40L (10 нМ, предпочтительно в виде hOX40L-His) при использовании концентрации антитела 0,78 – 100 нМ, при этом значения IC_{50} составляют от 1 до 10 нМ,

III) путем блокирования антителом, что установлено на клеточном уровне с помощью FACS-анализа, в котором взаимодействия K562-клеток, экспрессирующих OX40L (K562_OX40L) в концентрации 2×10^5 клеток/образце, с OX40, при этом значения IC_{50} составляют от 4 до 20 нМ,

IV) путем блокирования антителом трансдукции сигнала OX40, индуцируемого K562_OX40L, что установлено при анализе трансдукции индуцируемого OX40 сигнала с использованием 3×10^4 HeLa-клеток, экспрессирующих OX40 на образец, что приводит к блокаде NFκB-активации, при этом значения IC_{50} составляют от 1 до 5 нМ,

V) путем блокирования антителом индуцируемой OX40L Т-клеточной активации, что установлено с помощью анализа Т-клеточной активации при использовании K562_OX40L в концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/образец и ФГА (фитогемагглютинин) в концентрации 0,75 мкг/мл, при этом значения IC_{50} составляют от 1 до 10 нМ, и/или

IV) путем блокирования антителом, что установлено с помощью анализа Т-клеточной активации, индуцируемой OX40L Т-клеточной активации активированными В-клетками или дендритными клетками (анализ столбняка (Tetanus)) при использовании концентрации антитела 10 мкг/мл, при этом ингибирование составляет 40 - 60%.

Предпочтительными являются антитела, для которых с помощью ELISA установлено, что они блокируют взаимодействие иммобилизованного OX40L с растворимым OX40 при использовании концентрации OX40L в покрытии 0,5 мкг/мл, что характеризуется значением IC_{50} от 1 до 4 нМ.

Таким образом, другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является антитело, отличающееся тем, что антитело ингибирует взаимодействие OX40 / OX40L и тем самым ингибирует трансдукцию индуцированного OX40L сигнала.

Также предпочтительно, чтобы антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, не обладало способностью к неспецифическому связыванию с TNFα и CD40L при использовании концентрации TNFα или CD40L вплоть до 500 нМ.

Также предпочтительно, чтобы связывание антитела, предлагаемого в изобретении, с мышинным OX40L было по меньшей мере в 30 раз ниже, чем связывание с человеческим OX40L.

Также предпочтительно, чтобы антитело, предлагаемое в изобретении, в концентрации 10 мкг/мл не индуцировало понижающую регуляцию экспрессии OX40L на клетках линии HUVEC.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, отличаются тем, что они содержат комбинацию переменных областей, независимо выбранную из группы, включающей следующие комбинации

а) переменная область легкой цепи антитела LC.001, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.001, которая имеет последовательность SEQ ID NO:2;

б) переменная область легкой цепи антитела LC.005, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.005, которая имеет последовательность SEQ ID NO:4;

в) переменная область легкой цепи антитела LC.010, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.010, которая имеет последовательность SEQ ID NO:6;

г) переменная область легкой цепи антитела LC.029, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.029, которая имеет последовательность SEQ ID NO:8;

д) переменная область легкой цепи антитела LC.019, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.019, которая имеет последовательность SEQ ID NO:10;

е) переменная область легкой цепи антитела LC.033, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 или 16, и переменная область тяжелой цепи антитела LC.033, которая имеет последовательность SEQ ID NO:12;

ж) переменная область легкой цепи (V_L), имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменная область тяжелой цепи (V_H), имеющая последовательность SEQ ID NO:17;

з) переменная область легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и переменная область тяжелой цепи, имеющая последовательность SEQ ID NO:19;

и) переменная область легкой цепи, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменная область тяжелой цепи, имеющая последовательность SEQ ID NO:20.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, отличаются тем, что они содержат константную область, независимо выбранную из группы, включающей

к) легкую/каппа-цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO:13;

л) тяжелую/гамма-цепь изотипа IgG1, имеющую последовательность SEQ ID NO:14 с одной или несколькими мутациями, выбранными из L234A и L235A, PVA236 или GLPSS331;

м) тяжелую/гамма-цепь изотипа IgG4, имеющую последовательность SEQ ID NO:15;

н) тяжелую/гамма-цепь изотипа IgG4, имеющую последовательность SEQ ID NO:15 с мутацией S228P или мутациями S228P и L235E;

о) константную область легкой цепи, имеющую последовательность, которая входит в SEQ ID NO:61, 65 или 69;

п) константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, которая входит в SEQ ID NO:58, 59, 60, 62, 63, 64, 66, 67 или 68.

Предпочтительными являются также все комбинации каждой из переменных областей антител, представленные в подпунктах а) – и), в сочетании с гамма-цепью, представленной в подпункте л), м), н) или п), и предпочтительно с каппа-цепью, представленной в подпункте к) или о).

Особенно предпочтительными являются антитела, содержащие переменные цепи антитела LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 или LC.063, каждая в сочетании с каппа-цепью, которая имеет

последовательность SEQ ID NO:13, или константной областью легкой цепи, последовательность которой входит в SEQ ID NO:61, 65 или 69, и

тяжелой/гамма-цепью изотипа IgG1, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:14 с мутациями L234A и L235A, или константной областью тяжелой

цепи, последовательность которой входит в SEQ ID NO:59, 63 или 67; антитела, содержащие переменные цепи антитела LC.001, LC.005, LC.010; LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 или LC.063, каждая в сочетании с каппа-цепью, которая имеет последовательность SEQ ID NO:13, или константной областью тяжелой цепи, последовательность которой входит в SEQ ID NO:59, 63 или 67, и тяжелой/гамма-цепью изотипа IgG4, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:15, или константной областью тяжелой цепи, последовательность которой входит к SEQ ID NO:60, 64 или 68, где все три цепи не несут мутацию S228P; антитела, содержащие переменные цепи антитела LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060 или LC.063, каждая в сочетании с каппа-цепью, которая имеет последовательность SEQ ID NO:13, или константной областью легкой цепи, последовательность которой входит в SEQ ID NO:61, 65 или 69, и тяжелой/гамма-цепью изотипа IgG4, последовательность которой представлена в SEQ ID NO:15, с мутацией S228P, или константной областью тяжелой цепи, последовательность которой входит в SEQ ID NO:60, 64 или 68.

Предпочтительно антитела содержат CDR переменной области легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и CDR переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:2, 17 или 20, или CDR переменной области легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, и CDR переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:19.

Предпочтительные антитела отличаются тем, что эти антитела относятся к подклассу человеческих IgG4 или другому человеческому подклассу (предпочтительно IgG1), и они несут по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, приводящую к отсутствию связывания с фактором комплемента C1q и/или утрате связывания с FcR. Такие предпочтительные варианты антител содержат, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 с мутациями L234A и L235A или SEQ ID NO:15 с мутацией S228P или без этой мутации.

Согласно изобретению предпочтительными являются антитела, обозначенные как IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331, характеризующаяся как E233P;

L234V; L235A; дельта G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) и IgG4v1 (S228P; L235E) и IgG4x (S228P).

Линия клеток гибридомы hu-Mab<hOX40L>LC.001, предлагаемая в изобретении, была депонирована в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентования в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)), Германия, 27 июля 2004 г. под регистрационным номером DSM ACC 2672.

Линии клеток гибридомы hu-Mab<hOX40L>LC.005 (DSM ACC 2685), hu-Mab<hOX40L>LC.010 (DSM ACC 2686), hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 (DSM ACC 2688) и hu-Mab<hOX40L>LC.033 (DSM ACC 2689), предлагаемые в изобретении, были депонированы в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентования в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ)), Германия, 02 сентября 2004 г.

Антитела, которые можно получать с использованием этих клеточных линий, являются предпочтительными вариантами осуществления изобретения и являются особенно приемлемыми в качестве промежуточных субстанций для получения антител, предлагаемых в изобретении, которые не связываются с фактором комплемента C1q и/или не связываются с человеческим Fcγ-рецептором.

Кроме того, предпочтительными вариантами осуществления изобретения являются выделенные антитела к OX40L, которые связываются с OX40L и связываются с тем же самым эпитопом OX40L, с которым связываются также моноклональные антитела LC.005, LC.010 или LC.029, продуцируемые депонированными клеточными линиями гибридомы.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела к OX40, которое не связывается с человеческим фактором комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-рецептором, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, связывающегося с OX40L, где связывание характеризуется значением KD ниже 10^{-8} М, модифицируют таким образом, чтобы это модифицированное тело не связывалось с фактором комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-

рецептором на NK-клетках, встраивают указанную модифицированную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, в экспрессионный вектор, встраивают вектор в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, экспрессируют и выделяют кодируемый белок из клетки-хозяина или супернатанта.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела, предлагаемого в изобретении, которое не связывается с фактором комплемента C1q и/или не связывается с человеческим Fcγ-рецептором, отличающийся тем, что антитело, которое можно получать из одной из указанных клеточных линий, модифицируют путем «переключения класса», т.е. замены или мутации Fc-фрагмента (например, с IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутации), предпочтительно обозначенное как IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331, характеризующаяся как E233P; L234V; L235A; дельта G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) и IgG4v1 (S228P; L235E) и IgG4x (S228P).

Согласно следующему предпочтительному варианту осуществления изобретения эти антитела содержат также фрагменты антител, выбранные из группы, включающей Fab-, F(ab')₂- и одноцепочечные фрагменты.

Понятие «вариант» антитела к OX40L в контексте настоящего описания относится к молекуле, аминокислотная последовательность которой отличается от «родительской» (исходной) аминокислотной последовательности антитела к OX40L в результате добавления, делеции и/или замены одного или нескольких аминокислотного(ых) остатка(ов) в последовательности родительского антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вариант несет одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н) в одной или нескольких константной(ых) или вариабельной(ых) области(ях) родительского антитела, предпочтительно в константной области. Например, вариант может нести по меньшей мере одну, например, от примерно одной до примерно десяти, и предпочтительно от примерно двух до примерно пяти замен в одной или нескольких вариабельных областях родительского антитела. Как правило, вариант должен иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотным последовательностям константной и/или вариабельной области родительского антитела, более

предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99%.

В изобретении предложен способ модификации начальной аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи родительского антитела, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:21-38, и/или CDR легкой цепи антитела, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:39-57, отличающийся тем, что получают нуклеиновую кислоту, которая кодирует начальную аминокислотную последовательность, модифицируют нуклеиновую кислоту так, чтобы модифицировать одну аминокислоту в CDR1 тяжелой цепи, модифицировать 1-2 аминокислоты в CDR2 тяжелой цепи, модифицировать 1-2 аминокислоты в CDR3 тяжелой цепи, модифицировать 1-3 аминокислоты в CDR1 легкой цепи, модифицировать 1-3 аминокислоты в CDR2 легкой цепи и/или модифицировать 1-3 аминокислоты в CDR3 легкой цепи, экспрессируют модифицированную аминокислотную последовательность CDR в структуре антитела, оценивают способность антитела связываться с OX40L, так чтобы значение K_D составляло менее 10^{-8} М, и отбирают модифицированный CDR, если связывание антитела с OX40L характеризуется значением K_D ниже 10^{-8} М. Предпочтительно такие модификации представляют собой консервативные модификации последовательности.

Идентичность или гомологию последовательности в контексте настоящего описания определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (рассматриваемой последовательности), идентичных остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Нельзя конструировать никакие N-концевые, С-концевые или внутренние удлинения, делеции или инсерции в последовательности антитела, которые влияют на идентичность или гомологию последовательностей. Вариант сохраняет способность связываться с человеческим OX40L и предпочтительно обладает свойствами, превышающими свойства родительского антитела. Например, может оказывать меньшее побочное действие при лечении ревматоидного артрита и астмы, поскольку OX40L не только кратковременно экспрессируется на В-клетках, дендритных клетках и макрофагах, но также и на эндотелиальных

клетках (Kotani A. и др., Immunol. Lett. 84, 2002, сс. 1-7), гладкомышечных
клетках дыхательных путей (ASM) (Burgess J.K., J. Allergy Clin. Immunol 113,
2004, сс. 683-689) и клетках микроглии (Weinberg A.D. и др., J. Immunol. 162,
1999, сс. 1818-1826). Связывание антител к OX40L с эндотелиальными клетками,
ASM и клетками микроглии может приводить к повреждению клеток, при этом
повреждение эндотелиальных клеток приводит к просачиванию сосудов, ASM-
клеток приводит к легочной деструкции, клеток микроглии приводит к
поражениям микроглии.

В контексте настоящего описания понятие «родительское антитело»
относится к антителу, которое имеет аминокислотную последовательность,
применяемую для получения варианта. Предпочтительно родительское антитело
имеет человеческий каркасный участок и, если она(и) присутствует(ют),
человеческую(ие) константную(ые) область(и) антитела. Например,
родительское антитело может представлять собой гуманизированное или
человеческое антитело, предпочтительно IgG1-типа.

Антитела, предлагаемые в изобретении, включают также антитела, которые
несут «консервативные модификации последовательности», модификации
нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не влияют или не
изменяют указанные выше характеристики антитела, предлагаемого в
изобретении. Модификации можно интродуцировать с помощью стандартных
методов, известных в данной области, таких как сайтнаправленный мутагенез и
опосредуемый ПЦР мутагенез. Консервативные аминокислотные замены
представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют
аминокислотным остатком, который имеет аналогичную боковую цепь. Семейства
аминокислотных остатков, которые имеют аналогичные боковые цепи,
известным в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с
основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин),
кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая
кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин,
аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан),
неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин,
пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями
(например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями

(например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Так, предварительно выбранный (предсказанный) заменимый аминокислотный остаток в человеческом антителе к ОХ40L можно предпочтительно заменять другой аминокислотный остаток из семейства с такими же боковыми цепями.

Аминокислотные замены можно осуществлять с помощью мутагенеза, основанного на молекулярном моделировании, согласно подходу, описанному у Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс. 323-327 и Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033.

Изобретение относится также к способу получения антитела, отличающемуся тем, что последовательность первой нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, связывающегося с ОХ40L, где связывание характеризуется значением KD ниже 10^{-8} М, модифицируют таким образом, чтобы модифицированное антитело не связывалось с фактором комплемента C1q и/или человеческим Fcγ-рецептором на НК-клетках, указанную модифицированную первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, которая кодирует легкую цепь антитела, встраивают в экспрессионный вектор, вектор встраивают в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, культивируют клетку-хозяина в условиях, позволяющих синтезировать антитело, и выделяют антитело из культуры.

Изобретение относится также к способу получения антитела, предлагаемого в изобретении и содержащего человеческий Fc-фрагмент, который заключается в том, что а) трансформируют клетку-хозяина нуклеотидной последовательностью, которая кодирует легкую цепь родительского человеческого антитела, предлагаемого в изобретении, и второй последовательностью ДНК, которая кодирует тяжелую цепь родительского человеческого антитела, Fc-фрагмент которого модифицирован так, что Fc-фрагмент не связывается с фактором комплемента C1q и/или Fc-рецептором; б) экспрессируют первую и вторую последовательность ДНК с получением тяжелых и легких цепей антитела и в) выделяют антитело из клетки-хозяина или культуры клетки-хозяина.

Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют указанное выше антитело, соответствующим векторам, содержащим эти нуклеиновые кислоты, и к соответствующей клетке-хозяину

этих векторов. Изобретение относится к способу получения антител, заключающемуся в том, что культивируют соответствующие клетки-хозяева в условиях, которые позволяют синтезировать молекулы антитела, и выделяют антитела из культуры, например, путем экспрессии нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь, и нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь, в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине, и выделения полипептида из клетки.

Под объем изобретения подпадает диагностическое и терапевтическое применение антитела. Касательно одного из вариантов диагностического применения изобретение относится к способу выявления присутствия белка OX40L, заключающемуся в том, что обрабатывают образец, для которого ожидается, что он содержит OX40L, антителом к OX40L и определяют связывание антитела с образцом. Белок OX40L можно встраивать в клеточную мембрану экспрессирующих OX40L клеток в виде их трансмембранного домена, или он может присутствовать в виде растворимого внеклеточного домена в общей воде организма, высвобождаясь с помощью механизмов типа просачивания или протеолитического высвобождения. Для такого применения в изобретении предложен набор, содержащий антитело и инструкции по применению антитела для обнаружения белка OX40L.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для предупреждения и/или лечения воспалительных заболеваний у млекопитающего, предпочтительно у пациента, у которого предполагается возникновение такого заболевания или который страдает им. Такие заболевания представляют собой аллергические реакции, такие как астма. Другие варианты применения включают лечение аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

Изобретение относится также к способу лечения млекопитающего, страдающего вышеуказанными воспалительными заболеваниями, прежде всего астмой и ревматоидным артритом.

Предпочтительно антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для лечения серьезной персистентной астмы у пациентов, у которых симптомы не контролируются соответствующим образом ингаляционными кортикостероидами. Популяция пациентов включает взрослых и молодых людей (возрастом 12 лет и старше), страдающих не контролируемой соответствующим

образом серьезной персистентной астмой. Антитело можно предпочтительно вводить подкожно один или два раза в месяц. Основным критерием предпочтительно является снижение острых обострений заболевания. Другие критерии включают максимальное количество выделяющейся жидкости, проявление симптомов астмы в дневное время, ночные пробуждения, качество жизни, посещения кабинета неотложной помощи, количество дней, в которые не проявляются симптомы астмы, применение агониста beta-2, снижение или сужение спектра стероидов и воздействие на гипер-реактивность.

Предпочтительным является также применение антител, предлагаемых в изобретении, для монотерапии или в сочетании с метотрексатом или другими DMARD (модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства) для лечения взрослых людей, страдающих активным ревматоидным артритом от средней до серьезной степени тяжести. Их можно вводить в виде подкожной инъекции каждые 2 или 4 недели. Их можно применять для длительного лечения пациентов, для которых не обладают эффективностью одно или несколько DMARD. Критерии должны включать снижение признаков и симптомов и ингибирование развития структурного повреждения у взрослых пациентов, страдающих активным ревматоидным артритом. Предупреждение нетрудоспособности, улучшение признаков и симптомов, оценивают на основе ACR-критерия (ACR20 >60%, ACR50 > 35%, ACR70 > 15%; индекс, предложенный Американским колледжем ревматологии (American College of Rheumatology); www.rheumatology.com).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является применение антител, предлагаемых в изобретении, для приготовления лекарственных средств, предназначенных для лечения указанных заболеваний.

Изобретение относится также к применению указанных выше антител для приготовления фармацевтической композиции, в частности фармацевтической композиции, содержащей антитело, предлагаемое в изобретении, в фармацевтически эффективном количестве, необязательно в сочетании с буфером и/или адъювантом, который можно применять для получения препаративной формы антител для фармацевтических целей.

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела в фармацевтически приемлемом носителе. В

одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию можно включать в изделие или набор.

Антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно получают методами рекомбинации. Такие методы широко известны в данной области и представляют собой экспрессию белков в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очистку до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, встраивают в экспрессионные векторы стандартными методами. Экспрессию осуществляют в пригодных прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах типа CHO-клеток, NS0-клеток, SP2/0-клеток, HEK293-клеток, COS-клеток, клеток дрожжей или клеток *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (супернатант или клетки после лизиса).

Рекомбинантное получение антител хорошо известно в данной области и описано, например, в обзорных статьях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс. 151-161; Werner R.G. и др., Arzneimittelforschung 48, 1998, сс. 870-880.

Антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или полностью очищенной форме. Очистку осуществляют для удаления других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, которые включают обработку щелочью/ДСН, хроматографию на колонках и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в Current Protocols in Molecular Biology, под ред. Ausubel F., и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Экспрессия в NS0-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., Cytotechnology 32, 2000, сс. 109-123; и Barnes L.M. и др., Biotech. Bioeng. 73, 2001, сс. 261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., Nucl. Acids. Res. 30, 2002, с. E9. Клонирование вариабельных областей описано у Orlandi R. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 3833-3837; Carter P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс. 4285-4289; и Norderhaug L. и др., J. Immunol. Methods 204, 1997, сс. 77-87. Предпочтительная система

кратковременной экспрессии (НЕК 293) описана у Schlaeger E.-J. и Christensen K., в Cytotechnology 30, 1999, сс. 71-83 и у Schlaeger E.-J. в J. Immunol. Methods 194, 1996, сс. 191-199.

Контролирующие последовательности, которые можно применять для прокариот, представляют собой, например, промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания. Известно, что эукариотические клетки могут использовать промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она помещена под функциональный контроль другой нуклеотидной последовательности. Например, ДНК предпоследовательности или лидера секретирующей функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде предбелка, который участвует в секретирующей полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он помещен так, чтобы он облегчал трансляцию. Как правило, «функционально связаны» означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидера секретирующей, смежными в рамке считывания. Однако не требуется, чтобы энхансеры должны быть смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то согласно общепринятой практике используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

Моноклональные антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых методов очистки иммуноглобулинов, таких, например, как, хроматография на протеин А-сефарозе, хроматография на гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК и РНК, которые кодируют моноклональные антитела, можно выделять и секвенировать с помощью общепринятых методов. Клетки гибридом могут служить источником таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как клетки НЕК 293, СНО-клетки или клетки миеломы, которые

иначе не могут продуцировать белок иммуноглобулина, для синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты аминокислотной последовательности (или мутанты) человеческого антитела к ОХ40L получают путем интродукции соответствующих нуклеотидных замен в ДНК антитела или путем синтеза нуклеотидов. Однако такие модификации можно осуществлять только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не должны изменять вышеуказанные характеристики антитела, такие как изотип IgG и связывание с эпитопом, но могут повышать выход продукта рекомбинации, стабильность белка или облегчать очистку.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании соответствующей конформации антитела к ОХ40L, можно также заменять, как правило, на серин, для повышения стабильности при окислении молекулы и предупреждения аномального перекрестного сшивания. И наоборот, цистеиновую(ые) связь(и) можно добавлять в антитело для повышения его стабильности (прежде всего, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотных последовательностей антител к ОХ40L, получают с помощью различных известных в данной области методов. Эти методы включают (но, не ограничиваясь ими) выделение из естественного источника (в случае встречающихся в естественных условиях вариантов аминокислотных последовательностей) или получение путем опосредуемого олигонуклеотидом (или сайтнаправленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или невариантной версии гуманизированного антитела к ОХ40L.

Изобретение относится также к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, предлагаемое в изобретении, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, токсин, (например, обладающий ферментативной активностью токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты), радиоактивный изотоп (т.е., радиоконъюгат). Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием широкого разнообразия бифункциональных связывающих белки

агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP),
 иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров
 (такие как диметиладипимидат×HCL), активные сложные эфиры (такие как
 5 дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид),
 бисазидопроизводные (такие как бис(*para*-азидобензоил)гександиамин),
 производные бисдиазония (такие как бис(*para*-
 10 диазониумбензоил)этилендиатнин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-
 диизоцианат), и обладающие двойной активностью фторсодержащие соединения
 (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин
 15 можно получать согласно методу, описанному у Vitetta E.S. и др., Science 238,
 1987, сс. 1098-1104). Меченная с помощью C¹⁴ 1-изотиоцианатбензил-3-
 метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером
 20 хелатирующего агента, применяемого для конъюгации радионуклеотида с
 антителом (см. WO 94/11026).

Другим типом ковалентной модификации антитела является связывание
 25 антитела с одним из широкого разнообразия небелковых полимеров, таким,
 например, как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или
 полиоксиалкилены, с использованием метода, описанного в US 4640835;
 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Другим объектом изобретения являются В-клетки, выделенные из
 трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, в
 которой экспрессируются человеческие антитела к ОХ40L (например,
 35 родительские антитела, которые продуцируются клеточной линией, выбранной
 из группы, включающей клетки гибридом, которые продуцируют антитела,
 предлагаемые в изобретении). Предпочтительно выделенные В-клетки получают
 40 из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши,
 которую иммунизировали очищенной рекомбинантной формой антигена ОХ40L
 и/или клетками, экспрессирующими ОХ40L. Предпочтительно трансгенное
 45 животное кроме человека, например, трансгенная мышь, имеет геном, который
 содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой
 цепи, которые кодируют все антитело, предлагаемое в изобретении, или его
 часть. Выделенные В-клетки затем immortalizуют для создания источника
 50 (например, гибридомы) человеческих антител к ОХ40L. Таким образом,

настоящее изобретение относится также к гибридоме, обладающей способностью продуцировать человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения гибридома включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, геном которой содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, которые кодируют все антитело, предлагаемое в изобретении, или его часть, слитые с immortalized клеткой.

В конкретном варианте осуществления изобретения трансгенное животное кроме человека представляет собой трансгенную мышь, геном которой содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, которые кодируют все антитело, предлагаемое в изобретении, или его часть. Трансгенное животное кроме человека можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена OX40L и/или клеток, экспрессирующих OX40L. Предпочтительно трансгенное животное кроме человека, например, трансгенная мышь, обладает способностью продуцировать изотипы человеческих моноклональных антител к OX40L.

Человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать путем иммунизации трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, геном которой содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, которые кодируют все антитело, предлагаемое в изобретении, или его часть, очищенным или обогащенным препаратом антигена OX40L и/или клеток, экспрессирующих OX40L. Затем получают В-клетки (например, селезеночные В-клетки) животного и сливают с клетками миеломы с получением immortalized клеток гибридомы, которые секретируют человеческие моноклональные антитела к OX40L.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела к OX40L можно создавать с использованием трансгенных мышей, несущих части человеческой иммунной системы вместо мышинной системы. Такие трансгенные мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как мыши линии «HuMAb», содержат минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, который кодирует

неперегруппированные гены человеческих иммуноглобулинов, включая гены тяжелой (μ - и γ -цепи) и легкой κ -цепи (гены константной области), в сочетании с целенаправленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и κ -цепей (Lonberg N. и др., Nature 368, 1994, сс. 856-859). В результате для мышей характерен пониженный уровень экспрессии мышинового IgM или IgK, и в ответ на иммунизацию интродуцированные трансгены человеческой тяжелой и легкой цепи подвергаются переключению класса и соматическим мутациям для создания обладающих высокой аффинностью человеческих моноклональных антител типа IgG (Lonberg N. и др., Nature 368, 1994, сс. 856-859; см. обзор у Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 1994, сс. 49-101; Lonberg N. и Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25, 1995, сс. 65-93; и Harding F. и Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764, 1995, сс. 536-546). Получение HuMAb-мышей описано у Taylor L. и др., Nucleic Acids Res. 20, 1992, сс. 6287-6295; Chen J. и др., Int. Immunol. 5, 1993, сс. 647-656; Tuaillon N. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 3720-3724; Choi T.K. и др., Nat. Genet. 4, 1993, сс. 117-123; Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, сс. 821-830; Tuaillon N. и др., J. Immunol. 152, 1994, сс. 2912-2920; Lonberg N. и др., Nature 368, 1994, сс. 856-859; Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 1994, сс. 49-101; Taylor L. и др., Int. Immunol. 6, 1994, сс. 579-591; Lonberg N. и Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25, 1995, сс. 65-93; Harding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546; Fishwild D.M. и др., Nat. Biotechnol. 14, 1996, сс. 845-851, содержание всех указанных публикаций полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки (см. также US 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5545807; 5770429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; и WO 92/03918).

Для создания полностью человеческих моноклональных антител к OX40L HuMAb-мышей можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена OX40L и/или клетками, экспрессирующими OX40L, согласно общему методу, описанному у Lonberg N. и др., Nature 368, 1994, сс. 856-859; Fishwild D.M. и др., Nat. Biotechnol. 14, 1996, сс. 845-851 и в WO 98/24884. Предпочтительно к моменту иммунизации мыши должны быть 6-16-недельного возраста. Например, для внутрибрюшинной иммунизации HuMAb-мышей можно использовать очищенный или обогащенный препарат

растворимого антигена ОХ40L (например, очищенного из экспрессирующих ОХ40L клеток), сшитый с KLH или в ЗФР. Для усиления иммунных ответов можно осуществлять объединенную альтернативную иммунизацию выделенным белком ОХ40L и клетками, экспрессирующими ОХ40L, например, линией опухолевых клеток. С помощью кумулятивного опыта с использованием различных антигенов установлено, что трансгенные NuMAb-мыши дают наиболее хороший ответ, когда осуществляют начальную внутрибрюшинную иммунизацию (i.p.) с использованием антигена в полном адьюванте Фрейнда с последующими i.p.-иммунизациями каждую вторую неделю (например, в целом вплоть до шести) антигеном в неполном адьюванте Фрейнда. Иммунный ответ можно оценивать в процессе протокола иммунизации с использованием образцов плазмы, получаемых из ретроорбитального сплетения. Плазму можно анализировать с помощью ELISA, и мышей, у которых обнаружены достаточные по уровню титры человеческого иммуноглобулина к ОХ40L, можно использовать для создания immortalized линии соответствующих В-клеток. Мышей можно подвергать бустер-инъекциям антигеном внутривенно за 3-4 дня до умерщвления и удалять у них селезенку и лимфатические узлы. Каждым антигеном можно иммунизировать несколько мышей. Например, можно иммунизировать всего 12 NuMAb-мышей линий HCo7 и HCo12.

Мыши линии HCo7 несут JKD-нарушение в генах эндогенной легкой цепи (каппа) (описанное у Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, сс. 821-830), CMD-нарушение в генах эндогенной тяжелой цепи (описанное в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой каппа-цепи (описанный у Fishwild D.M. и др., Nat. Biotechnol. 14, 1996, сс. 845-851) и трансген HCo7 человеческой тяжелой цепи (описанный в US 5770429).

Мыши линии HCo12 несут JKD-нарушение в генах эндогенной легкой цепи (каппа) (описанное у Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, сс. 821-830), CMD-нарушение в генах эндогенной тяжелой цепи (описанное в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой каппа-цепи (описанный у Fishwild D.M. и др., Nat. Biotechnol. 14, 1996, сс. 845-851) и трансген HCo12 человеческой тяжелой цепи (описанный в примере 2 WO 01/14424). Мышинные лимфоциты можно выделять и сливать с линией клеток мышинной миеломы с помощью основанных на применении ПЭГ стандартных протоколов получения

гибридом. Затем образовавшиеся гибридомы подвергают скринингу в отношении производства специфических для антигена антител. Например, суспензионные культуры полученных из селезенки и лимфатических узлов иммунизированных мышей лимфоцитов сливают с 1/6 по количеству мышинных клеток SP 2/0, несекретирующих миелому (ATCC, CRL 1581) с 50% ПЭГ. Клетки высевают с плотностью примерно 2×10^5 в плоскодонный титрационный микропланшет, затем инкубируют в течение примерно 2 недель в избирательной среде.

Затем индивидуальные лунки подвергают скринингу с помощью ELISA в отношении человеческих моноклональных антител к OX40L типа IgM и IgG. На стадии интенсивного роста гибридомы среду анализируют, как правило, через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы пересевают, вновь подвергают скринингу, и если они еще остаются позитивными в отношении человеческих моноклональных антител IgG к OX40L, то их можно субклонировать по меньшей мере дважды путем ограничивающего разведения. Затем стабильные субклоны культивируют *in vitro* для производства антитела в среде для культуры тканей с целью оценки их характеристик.

В целом, схема анализа включает неспецифический анализ в отношении IgG («IgG-ELISA») с последующим специфическим ELISA и точный FACS-анализ для определения связывания антигена либо с очищенным белком, либо с экспрессирующими OX40 клетками. Следующая стадия включает функциональные анализы, при которых определяют конкуренцию антитела к OX40L с ее встречающимся в естественных условиях партнером по взаимодействию, например, растворимым, очищенным OX40, либо очищенным OX40L, либо OX40L, экспрессируемым на клетках, например, с помощью конкурентного ELISA или FACS. Следующая стадия включает функциональный анализ, с помощью которого определяют способность антитела к OX40L блокировать связанную с OX40 трансдукцию сигнала, например NFκB-активацию («NFκB-анализ»). Следующая стадия включает функциональные анализы, с помощью которых определяют способность антитела к OX40L блокировать Т-клеточную активацию («анализ Т-клеточной активации» или «ТТ-анализ»).

Поскольку последовательности CDR ответственны за взаимодействия антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, предлагаемые в изобретении, путем конструирования экспрессионных векторов, которые содержат последовательности CDR, предлагаемые в изобретении, в последовательностях каркасного участка из другого человеческого антитела (см., например, Riechmann L. и др., Nature 332, 1998, сс. 323-327; Jones P. и др., Nature 321, 1986, сс. 522-525; и Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033). Такие последовательности каркасного участка можно получать из опубликованных баз данных ДНК, которые включают последовательности генов зародышевых линий человеческих антител. Эти последовательности зародышевых линий могут отличаться от последовательностей зрелых генов антител, поскольку они не содержат полностью собранные гены переменных областей, которые образуются с помощью V(D)J-слияния в процессе созревания В-клеток. Последовательности генов зародышевых линий могут отличаться также от последовательностей обладающего высокой аффинностью антитела вторичного набора по индивидуальным параметрам переменной области.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для диагностики ОХ40L *in vitro*, предпочтительно с помощью иммунологического анализа, позволяющего определять связывание между ОХ40L (либо растворимым, либо связанным с мембраной) образца и антителом, предлагаемым в изобретении.

Следующим объектом настоящего изобретения является композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая одно или комбинацию человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предлагаемых в настоящем изобретении, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Более конкретно композиция представляет собой фармацевтическую или диагностическую композицию и еще более конкретно фармацевтическая композиция содержит антитело, как оно определено выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. Композиция должна быть стерильной и в достаточной степени жидкой, чтобы ее можно было вводить с помощью шприца.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому и ко всем растворителям, диспергирующим средам, покрытиям, антибактериальным и противогрибным агентам, регулирующим изотоничность и замедляющим абсорбцию агентам и подобным веществам, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель должен быть пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). Предпочтительно такой носитель представляет собой водный рН-забуферивающий раствор (например, ацетат, цитрат, фосфат или гистидин), предпочтительно изотонический, предпочтительно содержащий также неорганическую соль, сахар, полиол и/или поверхностно-активное вещество. Фармацевтически приемлемые носители представляют собой также соединения, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-ое изд., под ред. Osol A. (1980).

Концентрация антитела предпочтительно составляет от 0,1 до 50 мг/мл. Предпочтительно значение рН забуферивающего раствора составляет от 4,0 до 8,0 при концентрации буфера от 1 до 200мМ. Предпочтительными солями являются хлорид натрия и/или фосфат натрия в концентрации от 1 до 200мМ. Предпочтительными сахарами являются сахароза и/или трегалоза в концентрации от 1 до 15% (мас./об.). Предпочтительными полиолами являются глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и/или т.п. в концентрации от 1 до 15% (мас./об.). Поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат (например полисорбат 20 или 80) и/или полоксамер в концентрации от 0,001 до 0,5% (мас./об.). Предпочтительная фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации от 0,1 до 50 мг/мл и забуференный фосфатом физиологический раствор в концентрации от 1 до 200мМ, рН от 4,0 до 8,0.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить различными методами, известными в данной области, пациенту, который нуждается в этом. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или метод введения должен варьироваться в зависимости от требуемых результатов.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители представляют собой стерильные водные растворы или стерильные порошки для получения не

изготовленных заранее стерильных инъеклируемых растворов или дисперсии.

Применение таких сред и агентов для фармацевтических действующих веществ известно в данной области.

Фразы «парентеральное введение и «введение парентеральным путем» в контексте настоящего описания относится к путям введения, отличным от энтерального и местного применения, как правило, с помощью инъекции, и включают (но, не ограничиваясь ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриболоочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, подпаутинную, интраспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, могут варьироваться так, чтоб получать количество действующего вещества, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при использовании композиции и пути введения, которые не являются токсичными для пациента.

Выбранный уровень доз может зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций, применяемых согласно настоящему изобретению, или их сложных эфиров, солей или амидов, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения или других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными указанными композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни пациента, подлежащего лечению, и других подобных факторов, которые хорошо известны в данной области. Как правило, недельная доза может составлять от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов.

Следующие примеры, ссылки, перечень последовательностей даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, полный объем которого представлен в приведенной ниже формуле изобретения. Очевидно, что могут

быть сделаны модификации в изложенных процедурах без отклонения от сути изобретения.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1а – данные, полученные с помощью «связывающего ELISA», для TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033;

на фиг. 1б – данные, полученные с помощью «блокирующего ELISA» + данные о значения IC_{50} , для TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033;

на фиг. 2 – данные, полученные с помощью «блокирующего FACS» для TAG-34, LC.001, LC.005;

на фиг. 3 – данные, полученные с помощью «NF κ B-анализа» для TAG-34, LC.001, LC.019 и LC.024 (несвязывающее антитело);

на фиг. 4 и 5 – данные, полученные с помощью «анализа Т-клеточной активации», и данные о значениях IC_{50} для TAG-34, LC.001 и LC.005 (фиг. 4 - высвобождение IL-2, фиг. 5 - ингибирование);

на фиг. 6 - данные, полученные с помощью «ТТ-анализа» для TAG-34, LC.001 и LC.033;

на фиг. 7 – данные о перекрестной реактивности антител, предлагаемых в изобретении, с мышинным OX40L. А) контроль для экспрессии hOX40L на трансфектированных клетках и клетках дикого типа (WT), Б) связывание антител с экспрессирующими hOX40L K562-клетками, В) контроль для экспрессии mOX40L на трансфектированных и WT-клетках, Г) связывание антител с экспрессирующими mOX40L K562-клетками, и Д) связывание антител с K562-клетками дикого типа (WT) (n=3);

на фиг. 8 – данные о способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с C1q (n=3);

на фиг. 9 – данные о способности антител, предлагаемых в изобретении, активировать C3c (n=3);

на фиг. 10 - данные о способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с Fc γ RI (n=4), Fc γ RIIa (n=4) и Fc γ RIIb (n=4);

на фиг. 11 - данные о способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с FcγRIIIa (CD16) на NK-клетках (среднее значение \pm СКО для 6 доноров);

на фиг. 12 - данные, полученные с помощью Вестерн-блоттинга; полосы 1, 4, 7: маркеры; полосы 2, 5, 8: 100 нг OX40L; полосы 3, 6, 9: 40 нг OX40L.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO:1 легкая каппа-цепь, переменная область LC.001
 SEQ ID NO:2 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.001
 SEQ ID NO:3 легкая каппа-цепь, переменная область LC.005
 SEQ ID NO:4 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.005
 SEQ ID NO:5 легкая каппа-цепь, переменная область LC.010
 SEQ ID NO:6 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.010
 SEQ ID NO:7 легкая каппа-цепь, переменная область LC.029
 SEQ ID NO:8 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.029
 SEQ ID NO:9 легкая каппа-цепь, переменная область LC.019
 SEQ ID NO:10 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.019
 SEQ ID NO:11 легкая каппа-цепь, переменная область LC.033
 SEQ ID NO:12 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.033
 SEQ ID NO:13 легкая каппа-цепь, константная область
 SEQ ID NO:14 тяжелая γ 1-цепь, константная область
 SEQ ID NO:15 тяжелая γ 4-цепь, константная область
 SEQ ID NO:16 легкая каппа-цепь, мутантная переменная область LC.033
 SEQ ID NO:17 легкая каппа-цепь, переменная область LC.059
 SEQ ID NO:18 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.059
 SEQ ID NO:19 легкая каппа-цепь, переменная область LC.060
 SEQ ID NO:20 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.060
 SEQ ID NO:21 легкая каппа-цепь, переменная область LC.063
 SEQ ID NO:22 тяжелая γ -цепь, переменная область LC.063
 SEQ ID NO:23-57 CDR-последовательности
 SEQ ID NO:58 тяжелая γ -цепь LC.001 (человеческий IgG1-тип)
 SEQ ID NO:59 тяжелая γ -цепь LC.001 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)
 SEQ ID NO:60 тяжелая γ -цепь LC.001 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

SEQ ID NO:61 легкая каппа-цепь LC.001

SEQ ID NO:62 тяжелая γ -цепь LC.005 (человеческий IgG1-тип)

SEQ ID NO:63 тяжелая γ -цепь LC.005 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)

SEQ ID NO:64 тяжелая γ -цепь LC.005 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

SEQ ID NO:65 легкая каппа-цепь LC.005

SEQ ID NO:66 тяжелая γ -цепь LC.060 (человеческий IgG1-тип)

SEQ ID NO:67 тяжелая γ -цепь LC.060 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)

SEQ ID NO:68 тяжелая γ -цепь LC.060 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

SEQ ID NO:69 легкая каппа-цепь LC.060

Сокращения:

Аминокислоты сокращенно обозначают либо трехбуквенным (Leu), либо однбуквенным (L) кодом.

S228P обозначает замену серина на пролин в положении 228 тяжелой цепи IgG4.

L234 обозначает аминокислоту лейцин в положении 234 согласно EU-нумерации (Кэбот).

L234A обозначает, что аминокислота лейцин в положении 234 заменена на аланин.

L235A обозначает, что аминокислота лейцин в положении 235 заменена на аланин.

PVA236 обозначает, что в положении 236 область ELLG IgG1 или EFLG IgG4 заменена на PVA.

GLPSS331 означает, что в положении 331 область ALPAP IgG1 или GLPAP IgG2 заменена на GLPSS.

Дельта G236 означает, что аминокислота в положении 236 удалена в результате делеции.

IgG4 \times означает мутацию S228P в IgG4.

LC2010-001 является синонимом LC.001

Fcg является синонимом Fсгамма(Fcy)

Аналогично обозначены другие замены в последовательностях антител.

	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40L, слитый с гистиридиновой меткой	hOX40L-His
5	Рекомбинантный растворимый мышинный OX40L, слитый с гистиридиновой меткой	mOX40L-His
	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40L, слитый с Flag-меткой	hOX40L-Flag
	Рекомбинантный растворимый мышинный OX40L, слитый с Flag-меткой	mOX40L-Flag
10	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40, слитый с человеческим Fcγ	hOX40 -hFc
	Кроличье моноклональное антитело к мышинному Fcγ	анти-mFc
	Козье моноклональное антитело к человеческому Fcγ	анти-hFc
	Мышиное моноклональное антитело к гистидину	анти-His
15	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40, слитый с мышинным Fcγ	hOX40 -mFc
	Мышиное моноклональное антитело к TNFα	анти-TNFα
	Мышиное моноклональное антитело к CD40L	анти-CD40L
	Фактор некроза опухоли альфа	TNFα
20	CD40-лиганд	CD40L
	Крысиное моноклональное антитело к человеческому OX40L	TAG34
25	Человеческие моноклональные антитела к человеческому OX40L	LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060, LC.063
	фитогемагглютинин	ФГА

Примеры

Пример 1

Получение клеточной линии гибридомы, продуцирующей антитела к OX40L

Культура гибридом

Гибридомы NuMab культивировали в среде IMDM (фирма Cambrex), содержащей фетальную телячью сыворотку, клон 1 (фирма Perbio Science), сайт инициации клонирующего фактора гибридомы (фирма Igen), пируват натрия, пенициллин/стрептомицин, 2-меркаптоэтанол, ГАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин) (фирма Sigma-Aldrich) и канамицин (фирма Invitrogen) при 37°C и 5% CO₂.

Процедура иммунизации трансгенных мышей

LC2010-001: Шесть HCo7-мышей (2 самца и 4 самки), линия GG2201 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) и четыре HCo12-мышей (4

самца), штамм GG2198 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) подвергали альтернативной иммунизации с использованием 1×10^6 клеток линии НЕК293, кратковременно трансфектированных экспрессионным вектором, несущим человеческий ОХ40L (hOX40L), и 20 мкг растворимого внеклеточного домена hOX40L. Осуществляли всего 8 иммунизаций, 4 внутрибрюшинные (i.p.) иммунизации с использованием клеток, экспрессирующих hOX40L, и 4 подкожные (s.c.) иммунизации в область хвоста с использованием рекомбинантного белка. Для первой иммунизации 100 мкл 1×10^6 НЕК293-hOX40L-клеток смешивали с 100 мкл полного адъюванта Фрейнда (CFA; фирма Difco Laboratories, Детройт, США). Для всех других иммунизаций использовали 100 мкл клеток в ЗФР или смешивали рекомбинантный белок с 100 мкл неполного адъюванта Фрейнда (ICFA; фирма Difco).

Когда было установлено, что титры в сыворотке антител к hOX40L являются достаточными, мышей дополнительно подвергали бустер-инъекции дважды с использованием 15 мкг внеклеточного домена hOX40L в 200 мкл ЗФР, внутривенно (i.v.) за 4 и 3 дня до слияния.

LC2010-001, LC.059, LC.060 и LC.063 получали из HCo12-мышей.

LC2010-005, -010, -019, -029 и -033: Пять HCo7-мышей (4 самца и 1 самка) линии GG2201 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) иммунизировали с использованием 20 мкг растворимого внеклеточного домена hOX40L. Осуществляли всего 7 иммунизаций, 4 внутрибрюшинных (i.p.) и 3 подкожные (s.c.) иммунизации в область хвоста. Для первой иммунизации 100 мкл рекомбинантного белка смешивали с 100 мкл полного адъюванта Фрейнда (CFA; фирма Difco Laboratories, Детройт, США). Для всех других иммунизаций 100 мкл рекомбинантного белка смешивали с 100 мкл неполного адъюванта Фрейнда (ICFA; фирма Difco).

Когда было установлено, что титры в сыворотке антител к hOX40L являются достаточными, мышей дополнительно подвергали бустер-инъекции дважды с использованием 15 мкг внеклеточного домена hOX40L в 200 мкл ЗФР, внутривенно (i.v.) за 4 и 3 дня до слияния.

Создание гибридом

Мышей умерщвляли и изымали селезенку и лимфатические узлы, примыкающие к брюшной области аорты и полую вену. Осуществляли слияние

спленоцитов и клеток лимфатических узлов с партнерами по слиянию, клетками линии SP 2.0, согласно стандартному методу.

Специфический для антигена ELISA

5 Титры антител к OX40L в сыворотке иммунизированных мышей определяли с помощью специфического для антигена ELISA. Планшет (плоскодонный 96-луночный планшет для ELISA, фирма Greiner) 10 сенсibilizировали с использованием 0,1 мкг/мл очищенного OX40L, растворенного в ЗФР и осуществляли сенсibilизацию в течение ночи при комнатной температуре. Затем лунки блокировали с помощью ЗФРТС (ЗФР, 15 содержащий 0,05% Твин 20 (фирма Sigma-Aldrich Chemie BV) и 2% сыворотки цыпленка (фирма Gibco) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Тестируемые образцы сыворотки разводили в соотношении 1:50 в ЗФРТС и 20 добавляли в лунки. Сыворотку, полученную из организма мышей до иммунизации, разводили в соотношении 1:100 в ЗФРТС и использовали в качестве отрицательного контроля. Мышиное антитело к человеческому OX40L 25 разбавляли в соотношении 1:50 в ЗФРТС и использовали в качестве положительного контроля. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали дважды ЗФРТ (ЗФР, 30 содержащий 0,05% Твин 20). Gt- α -huIgG-HRP (фирма Jackson) разбавляли в соотношении 1:5000 в ЗФРТС и добавляли в лунки, содержащие тестируемые образцы и отрицательный контроль. Rb- α -mIgG (фирма Jackson) разводили в соотношении 1:3000 в ЗФРТС и добавляли в лунки, содержащие положительный 35 контроль. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. И, наконец, планшеты отмывали трижды с помощью ЗФРТ и оценивали в присутствии свежеприготовленного раствора ABTS[®] (1 мг/мл) (ABTS: 2,2'- 40 азинобис(3-этил этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота) в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте. Абсорбцию определяли при 405 нм.

ELISA для каппа-цепи

45 Для определения способности полученных в результате слияния гибридом образовывать человеческие антитела осуществляли ELISA для каппа-цепи. Планшеты для ELISA сенсibilizировали крысиным антителом к легкой каппа-цепи человеческого IgG (фирма DAKO), разведенным в соотношении 1/10000 в 50 ЗФР, осуществляя инкубацию в течение ночи при 4°C. После удаления покрытия

с лунок планшеты блокировали, инкубируя с ЗФРТС (ЗФРС, дополненный 0,05% Твин-20 (ЗФРТС)) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем лунки инкубировали с супернатантом культуры гибридомы, разведенным в соотношении 1/2 в ЗФРТС. Культуральную среду, разведенную в соотношении 1/2 в ЗФРТС, использовали в качестве отрицательного контроля, а позитивная по легкой каппа-цепи мышиная сыворотка, разведенная в соотношении 1/100 в ЗФРТС, служила в качестве положительного контроля. Затем лунки отмывали трижды и инкубировали с конъюгированным с HRP крысиным антителом к F(ab')₂-фрагменту человеческого IgG (фирма DAKO), разведенным в соотношении 1/2000 в ЗФРТС в течение 1 ч при 37°C. Лунки отмывали трижды и анализировали в присутствии свежеприготовленного раствора ABTS[®] (1 мг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте. Абсорбцию определяли при 405 нм с использованием планшет-ридера для ELISA.

Пример 2

Клонирование и анализ последовательностей переменных областей

HuMAт к OX40L

(Легкая каппа-цепь и тяжелая γ 1-цепь)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие переменную область легкой цепи V_L и переменную область тяжелой цепи V_H HuMAт к OX40L выделяли с помощью стандартных методов синтеза кДНК/ПЦР.

Общую РНК получали из $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ клеток гибридомы с помощью набора GeneRacer[™] (фирма Invitrogen). Полученную из гибридомы РНК применяли в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК и лигировали с олиго-дТ-праймером GeneRacer[™]. Синтез второй цепи кДНК и дальнейшую ПЦР-амплификацию кодирующих V_L и V_H кДНК-фрагментов осуществляли с использованием обратных праймеров легкой и тяжелой цепи, комплементарных нуклеотидным последовательностям легкой каппа-цепи и константной области тяжелой γ 1-цепи, и 5'-специфических праймеров GeneRacer[™] соответственно. ПЦР-продукты клонировали с помощью набора для клонирования TOPO[™] TA фирмы Invitrogen[™] Life Technologies и pCR4-TOPO[™] в качестве клонирующего вектора. Клонированные ПЦР-продукты идентифицировали путем рестрикционного картирования соответствующих плазмид с использованием

расщепления с помощью EcoRI и на основе ожидаемых/рассчитанных данных о размерах ДНК-фрагментов, составляющих примерно 740 и 790 пар оснований для V_L и V_H соответственно.

Последовательность ДНК клонированных ПЦР-фрагментов определяли путем секвенирования двух цепей.

Для полной обработки данных применяли пакет программ GCG (фирма Genetics Computer Group, Мэдисон, шт. Висконсин), версия 10.2 и вектор Vector-NTI 8 (фирма InforMax, Inc). Последовательности ДНК и белка линейаризировали с помощью модуля CLUSTALW GCG. Осуществляли сравнительный анализ последовательностей с помощью программы GENEDOC (версия 2.1).

Пример 3

Конструирование экспрессионных плазмид для HuMAт к OX40L IgG1-изотипа

Гены, кодирующие легкую и тяжелую цепь HuMAт к OX40L, собирали по отдельности в экспрессионных векторах, предназначенных для клеток млекопитающих.

При этом сегменты генов, кодирующих вариабельную область легкой цепи (V_L) HuMAт к OX40L и константную область человеческой легкой каппа-цепи (C_L , SEQ ID NO:13 или выбранная из SEQ ID NO: 61, 65 или 69), соединяли с сегментами генов, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи (V_H) HuMAт к OX40L и константную область человеческой тяжелой $\gamma 1$ -цепи (C_{H1} -шарнир- C_{H2} - C_{H3} , SEQ ID NO:14, или выбранная из SEQ ID NO:58, 62 или 66).

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей человеческих легких и тяжелых цепей, из которых можно выводить наиболее часто встречающиеся кодоны, дана у: Kabat E.A., и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., NIH Publication No. 91-3242 (1991).

Единица транскрипции легкой каппа-цепи HuMAт к OX40L состоит из следующих элементов:

- немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса (HCMV),
- синтетический 5'-UT, включающий последовательность Козака,

- сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, включающая интрон сигнальной последовательности,

- клонированная кДНК вариабельной области легкой цепи HuMAт к OX40L, содержащая уникальный сайт рестрикции BsmI на 5'-конце и сайт донора сплайсинга и уникальный сайт рестрикции NotI на 3'-конце,

- человеческий ген константной области каппа-цепи, включающий интрон 2 мышинового энхансера Ig-каппа [Picard D. и Schaffner W., Nature 307, 1984, сс. 80-82], и

- сигнальная последовательность полиаденилирования («поли-А») каппа-цепи человеческого иммуноглобулина.

Единица транскрипции тяжелой $\gamma 1$ -цепи HuMAт к OX40L состоит из следующих элементов:

- немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса (HCMV),

- синтетический 5'-УТ, включающий последовательность Козака, - модифицированная сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, включающая интрон сигнальной последовательности,

- клонированная кДНК вариабельной области тяжелой цепи HuMAт к OX40L, содержащая уникальный сайт рестрикции BsmI на 5'-конце и сайт донора сплайсинга и уникальный сайт рестрикции NotI на 3'-конце,

- человеческий ген константной области тяжелой $\gamma 1$ -цепи, включающий μ -энхансер мышинового Ig (Neuberger M.S., EMBO J. 2, 1983, сс. 1373-1378),

- сигнальная последовательность полиаденилирования («поли-А») $\gamma 1$ -цепи человеческого иммуноглобулина.

Функциональные элементы экспрессионных плазмид легкой каппа-цепи и тяжелой $\gamma 1$ -цепи HuMAт к OX40L, содержат: помимо легкой каппа-цепи и тяжелой $\gamma 1$ -цепи HuMAт к OX40L:

ген, обуславливающий устойчивость к гигромицину, сайт инициации репликации, oriP, вируса Эпштейна-Барра (EBV), сайт инициации репликации из вектора pUC18, обеспечивающий репликацию этой плазмиды в *E. coli*, и

ген β -лактамазы, который придает устойчивость *E. coli* к ампициллину.

Пример 4

Конструирование экспрессионных плазмид для HuMAт к OX40L IgG4-изотипа

Прототип экспрессионной плазмиды тяжелой $\gamma 4$ -цепи антитела к OX40L получали из экспрессионной плазмиды тяжелой $\gamma 1$ -цепи антитела к OX40L, заменяя константную область $\gamma 1$ -цепи и сигнальную последовательность полиаденилирования («поли А») $\gamma 1$ -иммуноглобулина из человеческого генома на константную область $\gamma 4$ -цепи из человеческого генома (SEQ ID NO:15 или последовательность, выбранная из последовательностей немутантных константных областей $\gamma 4$ -цепи, представленных в SEQ ID NO:60, 64 или 68) и сигнальную последовательность полиаденилирования $\gamma 4$ -иммуноглобулина.

Для экспрессии HuMAт к OX40L применяли такие же экспрессионные плазмиды легких каппа-цепей, которые описаны для IgG1 (см. выше).

Пример 5

Конструирование экспрессионных плазмид для мутантных (вариантных) плазмид антител к OX40L IgG1- и IgG4-изотипа на основе LC.001

Экспрессионные плазмиды, кодирующие мутантные тяжелые $\gamma 1$ - и $\gamma 4$ -цепи антитела к OX40L, создавали путем сайтнаправленного мутагенеза экспрессионных плазмид дикого типа с использованием набора для сайтнаправленного мутагенеза типа QuickChangeTM (фирма Stratagene).

Нумерация аминокислот соответствует EU-нумерации (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс. 78-85; Kabat E.A., и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991)).

Таблица 1

Изотип	Сокращение	Мутации	Описание
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331, характеризующаяся как E233P; L234V; L235A; дельта G236; A327G; A330S; P331S	Аминокислотную последовательность Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ человеческой тяжелой $\gamma 1$ -цепи заменяют аминокислотной последовательностью Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ человеческой тяжелой $\gamma 2$ -цепи. Аминокислотную последовательность Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ человеческой тяжелой $\gamma 1$ -цепи

Изотип	Сокращение	Мутации	Описание
			заменяют аминокислотной последовательностью Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ человеческой тяжелой γ4-цепи.
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	Аминокислотную последовательность Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ человеческой тяжелой γ1-цепи заменяют аминокислотной последовательностью Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E	Ser ₂₂₈ человеческой тяжелой γ4-цепи заменяют Pro ₂₂₈ и Leu ₂₃₅ человеческой тяжелой γ4-цепи заменяют Glu ₂₃₅
IgG4	IgG4x	S228P	Ser ₂₂₈ человеческой тяжелой γ4-цепи заменяют Pro ₂₂₈

Пример 6

Получение рекомбинантных HuMAт к ОХ40L

Рекомбинантные HuMAт получали путем кратковременной трансфекции прикрепленных клеток HEK293-EBNA (ATTC CRL-10852), которые культивировали в среде DMEM (фирма Gibco), дополненной 10% ультранизкого IgG FCS (фирма Gibco), 2мМ глутамином (фирма Gibco), 1 об.% заменимых аминокислот (фирма Gibco) и 250 мкг/мл G418 (фирма Roche). Для трансфекции использовали трансфекционный реагент Fugene™ 6 (фирма Roche) в соотношении реагент (мкл): ДНК (мкг) от 3:1 до 6:1. Легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессировали в двух различных плазмидах, используя молярное соотношение плазмид, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь, от 1:2 до 2:1. Содержащие HuMAт супернатанты клеточной культуры собирали через 4-11 дней после трансфекции. Супернатанты хранили при -20°C до очистки.

Общую информацию, касающуюся рекомбинантной экспрессии человеческого антитела, например, HEK293, можно почерпнуть из публикации: Meissner P. и др., Biotechnol. Bioeng. 75, 2001, сс. 197-203.

Пример 7

Анализ аффинности антител TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Инъекцию анализируемого образца (аналит) осуществляли с использованием 7 концентраций от 0,78 до 100нМ в течение 3 мин и промывали HBS-P в течение 5 мин. Регенерацию поверхности (карбоксиметилированная декстрановая поверхность, CM) осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъектируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице. Кинетические данные рассчитывали путем подгонки кинетических данных к Лэнгмюровской модели связывания 1:1.

Таблица 2

Чип	Иммобилизирующее антитело	Лиганд	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
CM5	анти-mFcγ	TAG34	hOX40L-His	$8,84 \times 10^4$	$3,32 \times 10^{-5}$	$3,75 \times 10^{-10}$
CM5	анти-hFcγ	LC.001	hOX40L-His	$9,01 \times 10^4$	$7,16 \times 10^{-9}$	$< 1,1 \times 10^{-11}$
CM5	анти-hFcγ	LC.005	hOX40L-His	$6,84 \times 10^4$	$2,02 \times 10^{-7}$	$< 1,5 \times 10^{-11}$
CM5	анти-hFcγ	LC.010	hOX40L-His	$6,25 \times 10^4$	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-10}$
CM5	анти-hFcγ	LC.019	hOX40L-His	$7,89 \times 10^4$	$7,53 \times 10^{-8}$	$< 1,2 \times 10^{-11}$
CM5	анти-hFcγ	LC.029	hOX40L-His	$1,41 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-8}$	$< 7,1 \times 10^{-12}$
CM5	анти-hFcγ	LC.033	hOX40L-His	$7,01 \times 10^4$	$2,09 \times 10^{-7}$	$< 1,4 \times 10^{-11}$

Не обнаружено взаимодействие TAG34 с mOX40L.

Оценка данных и обобщение данных всех Biacore-анализов

Данные, полученные для отрицательного контроля (например, кривые, полученные с использованием буфера) вычитали из приведенных на графиках данных для образцов для коррекции системного внутреннего сдвига основного уровня и снижения шумового сигнала. Для анализа сенсограмм и для оценки аффинности использовали программное обеспечение BiaEvaluation, версия 4.01.

Пример 8

Ингибирующий конкурентный анализ антител к hOX40L, ингибирующих взаимодействие hOX40L с иммобилизованным hOX40

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Перед инъекцией аналит (10нМ) и конкурент (8 концентраций от 0,78 до 100нМ) предварительно инкубировали в течение по меньшей мере 20 мин при 22°C. Инъекцию аналита +/- конкурента осуществляли в течение 3 мин и промывали HBS-P в течение 3 мин. Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице 3.

Таблица 3

Чип	Лиганд	Аналит	Конкурент	IC ₅₀ (М)
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	TAG34	7×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.001	4×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.005	3×10^{-9}

Все антитела ингибировали связывание OX40L с OX40 в растворе (аффинность в растворе). Для LC.001 и LC.005 обнаружены более низкие значения IC₅₀, чем для TAG34.

Пример 9

Характеристика эпитопов антител к OX40L TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.060

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Группы эпитопов определяли путем оценки перекрестной конкуренции перечисленных антител. Перед инъекцией аналит (50нМ) и конкурент (100нМ) предварительно инкубировали по меньшей мере в течение 20 мин при 22°C. Инъекцию аналита +/- конкурента осуществляли в течение 2 мин и промывали HBS-P в течение 3 мин. Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице 4.

Таблица 4

Чип	Иммобилизирующее антитело	Лиганд	Аналит	Конкурент	Эпитоп
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	TAG34	A
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.001	A
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.005	B
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.010	B
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.019	A/B
CM5	анти-hFcγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.029	B
CM5	анти-hFCγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.033	A
CM5	анти-hFCγ	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.060	A

Эпитоп OX40L, распознаваемый TAG34, был обозначен как эпитоп A.

Однако TAG34 не связывается с денатурированным OX40L (при анализе методом Вестерн-блоттинга) при концентрации антитела 100 нг. Для антител, распознающих одну группу эпитопов (A или B), обнаружена перекрестная ингибирующая активность, в то время как для антител из различных групп обнаружены сигналы, свидетельствующие об аддитивном связывании. LC.019 нейтрализует другие антитела из группы A, а также из группы B.

Пример 10

Специфичность связывания TAG34, LC.001 и LC.005 с CD40L и TNFα

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Инъекцию аналита осуществляли в течение 3 мин и промывали HBS-P в течение 2 мин.

Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъектируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице 5.

Таблица 5

Чип	Иммобилизирующее антитело	Лиганд	Аналит
CM5	анти-mFcg анти-hFcg	TAG34 LC.001 LC.005 анти-TNF α анти-CD40L	TNF α CD40L OX40L

В этих анализах обнаружено, что для CD40L характерен определенный уровень неспецифического связывания со всеми антителами или с поверхностью чипа, но после вычитания фоновых сигналов этот анализ позволил установить, что отсутствовало неспецифическое связывание TNF α и CD40L (при концентрации вплоть до 500нМ) с иммобилизованными антителами TAG34, LC.001 и LC.005.

Пример 11

Анализ аффинности антител LC.001-IgG1 и LC.001-IgG4x

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Инъекцию аналита осуществляли с использованием 8 концентраций от 0,78 до 100нМ в течение 3 мин и промывали HBS-P в течение 5 мин. Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице. Кинетические данные рассчитывали путем подгонки кинетических данных к Лэнгмюровской модели связывания 1:1.

Таблица 6

Чип	Иммобилизирующее антитело	Лиганд	Аналит	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
CM5	анти-mFcg	LC.001	hOX40 L-His	$4,27 \times 10^4$	$3,46 \times 10^{-8}$	$< 2,3 \times 10^{-11}$
CM5	анти-mFcg	LC.001-IgG4x	hOX40 L-His	$4,85 \times 10^4$	$7,72 \times 10^{-8}$	$< 2,06 \times 10^{-11}$

У LC.001 и LC.001-IgG4x обнаружена одинаковая аффинность к связыванию с hOX40L-His.

Пример 12ELISA для обнаружения связывания антител с OX40L

Сенсибилизированные SA планшеты (плоскодонные 96-луночные
 5 планшеты для ELISA, фирма Microcoat) сенсибилизировали с использованием
 0,5 мкг/мл биотинилированного OX40L, растворенного в буфере для инкубации
 (ИБ = 3ФР, содержащий 0,1% Твин 20 (фирма Serva) и 1% блокирующего белка)
 10 в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали дважды
 буфером для отмывки (ОБ = соляной раствор, содержащий 0,1% Твин 20).

Образцы (супернатанты клеточной культуры или очищенные антитела)
 15 подвергали серийному разведению в ИБ и вносили в лунки. Планшеты
 инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты
 отмывали дважды ОБ. После чего конъюгат козьего антитела к человеческому
 20 IgG и POD (фирма Dianova) разводили до концентрации 50 нг/мл в ИБ и вносили
 в лунки. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. И,
 наконец, планшеты отмывали трижды, используя ОБ, и оценивали в присутствии
 25 готового к применению раствора ABTS[®] (фирма Roche) при комнатной
 температуре (КТ) в темноте. Абсорбцию оценивали при 405 нм после того, как
 при использовании самой высокой концентрации достигалась достаточная
 30 величина ОП (фиг. 1а). Было установлено, что значения EC₅₀ составляют от 3 до
 8 нМ.

Пример 13

ELISA для обнаружения ингибирования антителами взаимодействия
 35 человеческий OX40/ человеческий OX40L

Сенсибилизированные SA планшеты (плоскодонные 96-луночные
 планшеты для ELISA, фирма Microcoat, Германия) сенсибилизировали с
 40 использованием 0,5 мкг/мл биотинилированного OX40L, растворенного в ИБ, в
 течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали дважды ОБ
 (3ФР-буфер, содержащий 0,1% Твин[™] 20).

Образцы разводили в ИБ до концентрации 1 мкг/мл и добавляли в лунки в
 45 виде серийных разведений. Для достижения максимального связывания OX40 с
 OX40L в некоторые лунки вносили только ИБ. Затем в каждую лунку добавляли
 50 раствор человеческого OX40, конъюгированного с дигоксигенином (фирма
 Roche Diagnostics GmbH, Германия) в концентрации 0,2 мкг/мл. Планшеты

инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали дважды, используя ОБ. Конъюгат овечьё антитело<дигоксигенин>-

POD (фирма Roche) разводили до 50 мед./мл в ИБ и добавляли в лунки

Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. И. наконец, планшеты отмывали дважды, используя ОБ, и планшеты оценивали в присутствии готового к применению раствора ABTS[®] (фирма Roche) при комнатной температуре (КТ) в темноте. Абсорбцию оценивали при 405 нм через 1-20 мин (фиг. 1б) Было установлено, что значения IC₅₀ составляют от 1 до 4нМ.

Пример 14

FACS-анализ для выявления NuMAт, ингибирующих взаимодействие человеческого OX40 с человеческим OX40L, экспрессируемым на K562-клетках (K562_OX40L-клетки)

Цель: Анализ для выявления способности NuMAт к hOX40L блокировать взаимодействие меченного с помощью Dig слитого белка hOX40:hFc с экспрессирующей hOX40L клеточной линии K562_hOX40L.

Метод: Анализ осуществляли с использованием меченного с помощью Dig hOX40:hFc в качестве «реагента для анализа» и NuMAт к hOX40L в качестве «конкурента».

Реагент для анализа: маточный раствор концентрации 0,5 мкл/мкг (разведенный в соотношении 1:10 в ЗФР), 100 мкл антитела к дигоксигенину-FLUOS, разведенного в соотношении 1:25 в ЗФР /0,5% БСА /1% блокирующего реагента (фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия).

2×10^5 клеток K562_OX40L (выращенных в ISF-0) отмывали в 2 мл ЗФР и ресуспендировали в 100 мкл ЗФР. После этого добавляли конкурент в ЗФР (конкурент/реагент в соотношении 0:1 / 1:1 / 1.5:1 / 2:1 / 2.5:2 / 5:1). Затем инкубировали в течение 30 мин, при КТ и при дневном свете. Затем добавляли реагент (в ЗФР); время инкубации: 30 мин, КТ, при дневном свете. Клетки промывали с помощью 2 мл ЗФР и пеллетировали центрифугированием.

Добавляли вторичное антитело для окрашивания (антитело к дигоксигенину-флуоресцеину, Fab-фрагменты (Roche, 1207741)) и инкубировали в течение 30 мин, 4°C, в темноте. Клетки отмывали с помощью 2 мл ЗФР и пеллетировали центрифугированием. После чего клетки ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР. Оценку образцов осуществляли с помощью устройства FACS-Scan (фиг.2).

Пример 15

Функциональный анализ для определения ингибирующей способности антител в отношении передачи hOX40/hOX40L-сигнала («NFκB-анализ»)

Клетки линии HeLa дикого типа (wt) и клетки линии HeLa, экспрессирующие человеческий OX40 (HeLa_OX40), выращивали в минимальной поддерживающей среде (MEM), 1× Na-пируват, 1× заменимые аминокислоты (фирма Gibco), 10% FCS и в случае рекомбинантных клеток + 600 мкг/мл G418. K562-клетки и K562-клетки, экспрессирующие OX40L, выращивали в ISF-О-среде, и в случае рекомбинантных клеток добавляли 200 мкг/мл G418.

Клетки линии HeLa_wt или HeLa_OX40 высевали с плотностью 3×10^4 клеток/100 мкл в 96-луночные планшеты без G418 и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе. Клетки линии K562_wt или K562_OX40L вносили, исходя из соотношения клетка-клетка 1:1. Фиксированные в формалине или не фиксированные в формалине клетки K562, экспрессирующие OX40L (замороженные при -70°C), подвергали оттаиванию и разводили в соотношении 1:10 в MEM/10%FCS; клетки линии K562_OX40L предварительно инкубировали с антителом к OX40L в течение 30 мин при КТ. Время стимуляции с использованием клеток линии K562_OX40L составляло от 30 до 150 мин. Экстракцию белка из клеточных ядер осуществляли согласно инструкции поставщика к NE-набору от фирмы Active Motif. Для определения передачи OX40-сигнала, приводящего к активации NFκB, использовали TransAM NFκB-ELISA от фирмы Active Motif (анализ осуществляли согласно инструкциям поставщика). Измерения осуществляли по абсорбции при длине волны 450/620 нм с помощью Тесан МТР-ридера (фиг.3). Установлено, что значения IC₅₀ для всех антител LC составляют от 0,6 до 5 нМ.

Пример 16Анализ Т-клеточной активации

Принцип анализа:

Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBL, лимфоциты периферической крови) активировали с использованием субоптимальной концентрации Т-клеточного митогена фитогемагглютинаина (ФГА) и совместно стимулировали с помощью клеток K562,

сверхэкспрессирующих OX40L. В таких условиях анализа активированные Т-клетки при инкубации в течение 24 ч при 37°C продуцировали IL-2. Цитокин определяли в супернатанте с помощью ELISA. Для выявления блокирующего действия МАт клетки линии K562_OX40L предварительно до совместного культивирования с PBL инкубировали в течение 1 ч с соответствующими разведениями антитела.

Метод:

Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBL) отделяли из гепаринизированной цельной крови путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque®-1077 (фирма Sigma). После отмывки раствором Хэнкса подсчитывали количество клеток с использованием раствора Турка и клетки ресуспендировали при концентрации 10^6 /мл в среде RPMI 1640 (фирма Gibco), дополненной пенициллином, стрептомицином и глутамином (Gibco 10378-016) и 10% FBS. Контрольные клетки K562 (дикий тип) поддерживали в такой же аналогично дополненной среде RPMI. Клетки K562, трансфектированные OX40L, поддерживали в такой же среде, дополненной генетицином (G418, фирма Gibco) в конечной концентрации 50 мг/мл. Клетки K562 (либо WT, либо OX40L+) разводили такой же средой из расчета $1,5 \times 10^5$ клеток/мл и вносили в каждую лунку 96-луночного планшета для культуры ткани по 50 мкл/лунку ($0,75 \times 10^4$ /лунку). К клеткам добавляли соответствующие разведения МАт в объеме 20 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Каждое разведение тестировали в двух лунках. Добавляли PBL в объеме 100 мкл/лунку (10^5 клеток/лунку). Конечное соотношение PBL и клеток K562 составляло ~13:1. ФГА (10×) (Sigma L-9132) добавляли из расчета 20 мкл/лунку (конечная концентрация 0,75 мкг/мл). Общий объем на лунку доводили до 200 мкл с помощью RPMI/10% FCS. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажняющем 5% CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. После центрифугирования планшетов супернатанты собирали и определяли IL-2 с помощью ELISA (BD, Сан-Диего, шт. Калифорния, кат. №2627KI) согласно спецификациям производителя (фиг. 4). Для расчета значений IC₅₀ (концентрация МАт, блокирующая на 50% высвобождение IL-2 стимулированными OX40L PBL) фоновую концентрацию IL-2, обнаруженную в контрольных культурах

(PBL+ФГА+K562WT), вычитали из общей концентрации IL-2, которая продуцировалась PBL, стимулированными клетками K562×OX40L+ (фиг. 5). IC₅₀ TAG34: 0,07мкМ; LC.001: 2нМ; LC.005: 10нМ. Значения IC₅₀ составляли от 2 до 10нМ.

Пример 17

Оценка с помощью токсоида столбняка («ТТ-анализ»). Оценка ингибирующего действия антител на лимфоциты периферической крови, стимулированные токсоидом столбняка

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из гепаризированной крови с помощью фиколл-пака. В большинстве случаев для этого анализа применяли свежевыделенные РВМС. В некоторых случаях применяли также криогенно законсервированные РВМС. Среда для этого анализа представляла собой RPMI, содержащую 10% мужской АВ-сыворотки (фирма Sigma-Aldrich); 2мМ глутамин и Pen/Strep (готовая к применению смесь антибиотика пенициллина и стрептомицина (фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия); лиофилизат восстанавливали в 20 мл; применяли 2 мл на 1000 мл среды).

Для обеспечения адгезии с пластиком 300000 РВМС на лунку предварительно инкубировали в течение ночи в 96-луночных плоскодонных планшетах.

На следующий день в лунки добавляли токсоид столбняка (ТТ) (фирма Chiron Behring) в конечной концентрации от 2 до 5 мкг/мл. Применяемые в качестве положительного контроля лунки (максимум пролиферации/стимуляции) содержали только ТТ, во все остальные лунки добавляли антитела (в виде очищенного IgG) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В анализ включали мышинное МАт TAG-34 (конечная концентрация 10 мкг/мл). В качестве контроля нестимулированного фона использовали только среду. Все анализы осуществляли в трех повторностях.

После дополнительной стимуляции в течение 6 дней (37°C, 5%CO₂, 95% влажность) добавляли ³Н-тимидин в конечной концентрации 1 мКи/мл и после дополнительного 16-часового периода инкубации планшеты собирали и определяли включенный ³Н-тимидин с помощью счетчика бета-лучей (фиг.6).

Пример 18

Перекрестная реактивность антител к OX40L и мышинному OX40L

Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, давать перекрестную реакцию с мышинным OX40L, серийные разведения антитела и контрольные антитела инкубировали с клетками K562-mOX40L, стабильно экспрессирующими mOX40L. Оценивали также связывание с клетками линии K562 WT и K562-hOX40L, стабильно экспрессирующими hOX40L. В качестве отрицательного контроля использовали антитело NuMAт к гемоцианину лимфы улитки (альфа-KLN). В качестве положительного контроля экспрессии OX40L использовали антитело RM134L, крысиное антитело к mOX40L (фирма eBioscience, Сан-Диего, шт. Калифорния). В качестве положительного контроля экспрессии hOX40L использовали антитело TAG-34, мышинное антитело к hOX40L (фирма MBL, Нагоя, Япония). Для обнаружения связывания человеческих антител использовали конъюгированное с флуоресцеином (ФИТЦ)- козье антитело к человеческому IgG. Для обнаружения связывания RM134L использовали биотинилированное кроличье антитело к крысиному IgG (фирма DAKO, Глоструп, Дания) в сочетании со стрептавидином, конъюгированным с фикоэритрином (ФЭ) (фирма DAKO). Для обнаружения связывания TAG-34 использовали конъюгированное с ФИТЦ кроличье антитело к мышинному IgG. Расчеты значений EC_{50} или максимального связывания при 20 мкг/мл (B_{max}) изученных NuMAт проводили на основе нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость реакции от дозы с переменным наклоном) с помощью программы Graphpad Prism.

Результаты:

LC.001, предлагаемое в изобретении, обладало способностью связываться с hOX40L, что характеризовалось значением EC_{50} $5,16 \pm 2,93$ мкг/мл и B_{max} (MFI, средняя интенсивность флуоресценции) 385,22, но не обладало способностью связываться с mOX40L или WT-клетками, о чем свидетельствуют значения B_{max} (MFI) 11,41 и 9,67 соответственно. Кроме того, LC.001(IgG4), предлагаемое в изобретении, также обладало способностью эффективно связываться с hOX40L, о чем свидетельствует значение EC_{50} $8,19 \pm 1,05$ мкг/мл и значение B_{max} (MFI) 311,30, но не обладало способностью связываться с mOX40L или WT-клетками, о чем свидетельствуют значения B_{max} (MFI) 13,47 и 9,58 соответственно. Как и ожидалось, применяемый в качестве отрицательного контроля альфа-KLN не

связывался ни с какими клетками (фиг.7). Таким образом, антитела к OX40L, предлагаемые в изобретении, обладали по меньшей мере в 30 раз более низкой способностью к связыванию с мышинным OX40L по сравнению с человеческим OX40L.

Пример 19

Способность HuMAт к OX40L активировать систему комплемента

Оценка с помощью C1q- C3с-связывающего ELISA

Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, индуцировать связывание C1q и активацию C3, планшет для ELISA сенсibilizировали серийно разведенным антителом и контрольными антителами. В качестве отрицательного контроля использовали человеческий IgG4 (фирма The Binding Site, Бирминген, Великобритания), который очень слабо связывается с C1q. Человеческий IgG1 (фирма The Binding Site) и альфа-KLH (IgG1) применяли в качестве положительных контролей. Затем сенсibilizирующие антитела инкубировали с рекомбинантным C1q или пулом человеческой сыворотки в качестве источника C3. Для выявления связывания C1q использовали кроличье антитело к C1q (фирма DAKO) в сочетании со свиным антителом к кроличьему IgG, конъюгированным с пероксидазой из хрена (HRP) (фирма DAKO). Для выявления активированного C3с (полученного в результате активации C3) применяли мышинное антитело к человеческому C3с (фирма DAKO) в сочетании с кроличьим антителом к мышинному IgG, конъюгированным с HRP (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест Гров, шт. Пенсильвания). Для оценки различий в эффективности сенсibilизации, сенсibilizирующие антитела визуализировали с помощью козьего антитела к человеческому IgG, конъюгированного с HRP. Расчеты значений EC₅₀ или максимального связывания при 10 мкг/мл (V_{max}) изученных HuMAт проводили на основе нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость реакции от дозы с переменным наклоном) с помощью программы Graphpad Prism.

Результаты:

LC.001, предлагаемое в изобретении, обладало способностью эффективно связываться с C1q, о чем свидетельствует значение EC₅₀ 2,19±0,42 мкг/мл и значение V_{max} (ОП405) 3,089. Кроме того, установлено, что оба применяемые в

качестве положительного контроля антитела, т.е. человеческий IgG1 и антитело к KLN, обладали способностью эффективно связываться с C1q, о чем свидетельствуют значения EC_{50} , составляющие $4,17 \pm 1,08$ мкг/мл и $2,57 \pm 1,51$ мкг/мл соответственно, и значения V_{max} (ОП405), составляющие 2,685 и 3,306 соответственно. Как и ожидалось, применяемый в качестве отрицательного контроля человеческий IgG4 не обладал способностью связываться с C1q, что видно из значения V_{max} при ОП405, составляющего 0,353. Кроме того, LC.001IgG4x, предлагаемое в изобретении, обладало пониженной способностью связываться с C1q, что видно из значения V_{max} при ОП405, составляющего 0,357.

В свете способности связываться с C1q, обнаружено, что отложение C3с при использовании LC.001 зависит от концентрации антитела, при этом значение EC_{50} составляло $2,67 \pm 0,16$ мкг/мл и значение V_{max} (ОП405) 2,614. Кроме того, оба применяемые в качестве положительного контроля антитела, т.е. человеческий IgG1 и антитело к KLN, могли эффективно вызывать отложение C3с, о чем свидетельствуют значения EC_{50} , составляющие $5,45 \pm 0,36$ мкг/мл и $2,16 \pm 0,26$ мкг/мл соответственно и значения V_{max} (ОП405), составляющие 2,543 и 2,633 соответственно. Как и ожидалось, применяемый в качестве отрицательного контроля человеческий IgG4, не вызывал отложения C3с, о чем свидетельствует значение V_{max} при ОП405, составляющее 0,095. Кроме того, LC.001IgG4x, предлагаемое в изобретении, обладало пониженной способностью вызывать отложения C3с, о чем свидетельствует значение V_{max} при ОП405, составляющее 0,090. (фиг.8 и 9).

Пример 20

Способность HuMAт к ОХ40L связываться с Fcγ-рецепторами I, IIa и IIb

Индукцируемая IgG антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) опосредуется Fcγ-рецепторами (FcγR) на эффекторных клетках. Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с FcγR клетки линии IIА1.6 (полученные путем ограничивающего разведения из клеток линии IIА1; Jones В. и др., J. Immunol. 136, 1986, сс. 348-356), стабильно трансфектированные человеческими FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, и клетки дикого типа инкубировали с серийно разведенным антителом и контрольными антителами. В качестве отрицательных контролей использовали

человеческий IgG2 (фирма The Binding Site, Великобритания), который не связывается с FcγRI, и человеческий IgG4 (фирма The Binding Site), который не связывается с FcγRII. В качестве положительных контролей в эксперимент включали человеческий IgG1 (фирма The Binding Site), связывающийся с FcγRI, и человеческий IgG3 (фирма The Binding Site), связывающийся с FcγRII. Обнаружение связанных антител осуществляли с помощью FACS-анализа с использованием антитела к человеческому IgG, конъюгированное с фикоэритрином (ФЭ). Расчеты значений EC₅₀ или максимального связывания при 10 мкг/мл (Vmax) изученных HuMAт проводили на основе нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость реакции от дозы с переменным наклоном) с помощью программы Graphpad Prism.

Установлено, что LC.001 обладает способностью эффективно связываться с FcγRI (эффективность сопоставима с контрольным антителом IgG1), о чем свидетельствуют значение EC₅₀ 0,11±0,03 мкг/мл и значение Vmax (MFI) 8041,54, но не обладает способностью связываться с FcγRIIa и FcγRIIb, о чем свидетельствуют значения Vmax (MFI) 25,06 и 21,18 соответственно.

Для LC.001IgG4х характерна более низкая эффективность в отношении связывания с FcγRI по сравнению с LC.001, и по эффективности это антитело сопоставимо с контрольным антителом IgG4, значение EC₅₀ 0,86±0,12 мкг/мл и значение Vmax (MFI) 6030,07. Обнаружено отсутствие связывания LC.001 IgG4х с FcγRIIa и FcγRIIb (при этом значения Vmax (MFI) составляли 21,40 и 19,27 соответственно), в то время как контрольное антитело IgG3 обладало способностью связываться с этими рецепторами (значения Vmax (MFI) 536,65 и 418,59 соответственно) (фиг.10). Таким образом, значение EC₅₀, характеризующее связывание с FcγRI, для LC.001IgG4х в 8 раз выше, чем значение EC₅₀ антитела LC.001.

Пример 21

Способность HuMAт к ОХ40L связываться с FcγRIIa на НК-клетках

Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с FcγRIIa (CD16) на естественных клетка-киллерах (NK), выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и инкубировали с 20 мкг/мл антитела HuMAт и контрольных антител в присутствии 20 мкг/мл

блокирующего мышиного антитела к FcγRIIIa (анти-CD16, клон 3G8, RDI, Фландерс, Нидерланды) или без этого антитела, для подтверждения связывания с FcγRIIIa. В качестве отрицательных контролей использовали человеческие IgG2 и IgG4 (фирма The Binding Site), которые не связываются с FcγRIIIa. В качестве положительных контролей в эксперимент включали человеческие IgG1 и IgG3 (фирма The Binding Site), связывающиеся с FcγRIIIa. Связанные с NK-клетками антитела определяли с помощью FACS-анализа с использованием меченного с помощью ФЭ мышиного антитела к человеческому CD56 (маркер поверхности NK-клеток) (фирма BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, шт. Калифорния) в сочетании с меченым ФИТЦ козьим F(ab)₂-фрагментом к человеческому IgG (Fc) (фирма Protos immunoresearch, Берлингейм, шт. Калифорния). Определяли максимальное связывание при 20 мкг/мл (V_{max}) изучаемого HuMat.

Установлено, что LC.001 обладает способностью эффективно связываться с FcγRIIIa (эффективность сопоставима с контрольным антителом IgG1), о чем свидетельствует значение V_{max} (MFI), составляющее 641,37. Добавление блокирующего антитела к FcγRIIIa приводило к отсутствию связывания LC.001 с NK-клетками (значение V_{max} (MFI) 194,61, ср. со значением фонового окрашивания 145,38). LC.001 IgG4х не связывалось с FcγRIIIa и по этой характеристике сопоставимо с контрольным антителом IgG4, значение V_{max} (MFI) 170,52, т.е. значение V_{max} LC.001 IgG4х составляет примерно только 10% от значения V_{max} LC.001. Добавление блокирующего антитела к FcγRIIIa не оказывало воздействие на связывание LC.001 IgG4х, значение (V_{max} (MFI) 174,26) (фиг.11).

Пример 22

Воздействие hMat₁ hOX40L и МАТ TAG-34 на связывание с HUVEC (первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека/ фирма PromoCell)

Известно, что эндотелиальные клетки экспрессируют hOX40L (Kotani A. и др., Immunol. Lett. 84, 2002, сс. 1-7). Эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC) в естественных условиях экспрессируют hOX40L и поэтому их можно применять в качестве «модельных эндотелиальных клеток». Целью данного исследования было определение «судьбы» hOX40L на клетках линии HUVEC после связывания с антителами TAG-34 и LC.001.

Клетки линии HUVEC подвергали оттаиванию и размножали в среде ECG-M, дополненной 2% FCS, в течение 4 дней в T175-колбах (фирма Sarstedt).

Клетки высевали в 24-луночные планшеты (10000 клеток/лунку).

Через 3 дня среду заменяли на ECG-M + 0,5% FCS. Добавляли антитело (<KLH> (антитело к гемоцианину лимфы улитки), TAG-34 или LC.001 для индукции понижающей модуляции) в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 2,5 или 24 ч. Повторно окрашивали клетки линии HUVEC с помощью TAG-34 или LC.001. Осуществляли FACS-окрашивание вторичным антителом к мышиному IgG, меченным с помощью Alexa488 (<m>), или к человеческому IgG, меченным с помощью Alexa488 (<h>), каждое в концентрации 10 мкг/мл. Оценку с помощью FACS осуществляли с использованием сканирующего устройства FACS-scan (фирма Becton Dickinson) и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Антитело <KLH> использовали в качестве неспецифического отрицательного контроля.

Из данных, приведенных в таблице 7, видно, что добавление LC.001 не приводило к понижающей модуляции OX40L, экспрессируемого на клетках линии HUVEC, ни через 2,5, ни через 24 ч (ср. строку 4 со строками 5 и 6). Однако добавление TAG 34 приводило к значительной (примерно 3-кратной) понижающей модуляции hOX40L на клетках линии HUVEC как через 2,5, так и через 24 ч (ср. строку 10 со строками 11 и 12).

Антитела, предлагаемые в изобретении, в концентрации 10 мкг/мл не индуцируют понижающую регуляцию OX40L, экспрессируемого на клетках линии HUVEC.

Таблица 7

МАт, применяемое для понижающей модуляции	МАт, применяемое для окрашивания	Вторичное МАт для FACS	MFI	
			2,5 ч	24 ч
1. Контрольная среда	-	<h>	5,17	5,39
2. Контрольная среда	LC.001	<h>	28,52	24,99
3. <KLH>	-	<h>	4,76	4,74
4. <KLH>	LC.001	<h>	31,44	23,07

МАТ, применяемое для понижающей модуляции	МАТ, применяемое для окрашивания	Вторичное МАТ для FACS	MFI	
5. LC.001	-	<h>	36,52	30,78
6. LC.001	LC.001	<h>	38,58	38,69
7. Контрольная среда	-	<m>	3,66	3,18
8. Контрольная среда	TAG-34	<m>	31,81	25,32
9. <KLH>	-	<m>	3,68	3,43
10. <KLH>	TAG-34	<m>	30,79	31,58
11. TAG-34	-	<m>	9,44	7,39
12. TAG34	TAG-34	<m>	8,97	14,89

Пример 23

Анализ методом Вестерн-блоттинга TAG34, LC.001 и LC.005

Подготавливали для анализа с помощью гель-электрофореза 40 и 100 нг hOx40L-His (фирма R&D Systems, теоретический размер 28-34 кДа) и маркер молекулярной массы Magik Mark XP (фирма Invitrogen; 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 220 кДа). Для этой цели смешивали «х» мкл белка, 2,5 мкл буфера для образца NuPage ЛДС (литиевая соль додецилсульфата) (4×), 1 мкл восстановителя NuPage (10×) и H₂O до 10 мкл и денатурировали в течение 10 мин при 70°C. После внесения образцов в гель NuPage gel (фирма Novex; 10% Бис-Трис) осуществляли анализ в течение 1 ч при 150 В в 1× буфере для погона MOPS (фирма Novex).

Гель блоттировали с помощью системы Semi-Dry-Blot на ПВДФ-мембрану (фирма Millipore; активация мембраны путем 5-минутной инкубации в метаноле и 100-минутной инкубации в 1×буфере для переноса), используя 1× буфер для переноса NuPage (1× буфер, 0,1% антиоксиданта, 10% метанола) в течение 1 ч/при 50 мА в полусухой камере. Мембрану блокировали в 1×3ФР/5% молока/0,5% Твин при встряхивании в течение 1 ч при КТ. Первичное антитело (пАт) разводили в 1×3ФР/1% молока/0,5% Твин, добавляли и инкубировали в течение ночи при 4°C.

LC.001 : 1,9 мкл (1,6 мкг) в общем объеме 4 мл

LC.005 : 1,1 мкл (1,6 мкг)/ 4 мл

TAG34: 1,6 мкл (1,6 мкг)/ 4 мл

Мембрану отмывали 3× по 10 мин в 1×3ФР/0,5% Твин. Вторичное антитело (вАт) разводили в 1×3ФР/1% молока /0,5% Твин, добавляли и инкубировали в течение 1,5 ч при КТ. Для LC.001 и LC.005 в качестве вАт использовали поликлональное антитело к человеческому IgG (фирма Pierce) в разведении 1:10000; для TAG34 в качестве вАт использовали поликлональное антитело к мышинному IgG из набора Lumi-Light Western Blotting (фирма Roche) в разведении 1:40. Мембрану отмывали 2× по 30 мин в 1×3ФР/0,5% Твин. Для обнаружения использовали набор для вестерн-блоттинга типа Lumi-Light (фирма Roche) согласно инструкции производителя. Результаты, полученные с помощью Вестерн-блоттинга, представлены на фиг. 12. LC.001 обладает способностью обнаруживать (додecilсульфат) денатурированное OX40L, в то время как LC.005 и TAG34 не связывается с денатурированным OX40L.

Перечень ссылок

- Akiba H. и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 1998, сс. 131-136
 Akiba H. и др., J. Exp. Med. 191, 2000, сс. 375-380
 Angal S. и др., Mol. Immunol. 30, 1993, сс. 105-108
 Aplin J.D. и Wriston J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10, 1981, сс. 259-306
 Arestides R.S. и др., Eur. J Immunol. 32, 2002, сс. 2874-2880
 Armour K.L. и др., Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2613-2624
 Current Protocols in Molecular Biology, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987
 Barnes L.M. и др., Biotech. Bioeng. 73, 2001, сс. 261-270
 Barnes L.M. и др., Cytotechnology 32, 2000, сс. 109-123
 Baum P.R. и др., EMBO J. 13, 1994, сс. 3992-4001
 Blazar B.R. и др., Blood 101, 2003, сс. 3741-3748
 Boerner P. и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95
 Bruggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, сс. 33-40
 Brunhouse R. и Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс. 907-917
 Burgess J.K. и др., J. Allergy Clin. Immunol. 113, 2004, сс. 683-689
 Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс. 338-344
 Burton D.R., Mol. Immunol. 22, 1985, сс. 161-206
 Capel P.J. и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34
 Carter P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, сс. 4285-4289

- Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, cc. 821-830
- Chen J. и др., Int. Immunol. 5, 1993, cc. 647-656
- Choi T.K. и др., Nat. Genet. 4, 1993, cc. 117-123
- 5 Cole и др., Monoclonal Antibody and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, с. 77
- de Haas M. и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, cc. 330-341
- Duncan A.R. и Winter G., Nature 332, 1988, cc. 738-740
- 10 Durocher Y. и др., Nucl. Acids. Res. 30, 2002, cc. E9
- Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, cc. 78-85
- Edge A.S. и др., Anal. Biochem. 118, 1981, cc. 131-137
- 15 EP 0307434
- Fishwild D.M. и др., Nat. Biotechnol. 14, 1996, cc. 845-851
- Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, cc. 271-282
- Gessner J.E. и др., Ann. Hematol. 76, 1998, cc. 231-248
- 20 Harding F. и Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764, 1995, cc. 536-546
- Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, cc. 12161-12168
- Higgins L.M. и др., J. Immunol. 162, 1999, cc. 486-493
- 25 Hoogenboom H.R. и Winter G., J. Mol. Biol. 227, 1992. cc. 381-388
- Hoshino A. и др., Eur. J. Immunol. 33, 2003, cc. 861-869
- Humphreys I.R. и др., J. Exp. Med. 198, 2003, cc. 1237-1242
- 30 Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, cc. 4178-4184
- Imura A. и др., Blood 89, 1997, cc. 2951-2958
- Imura A. и др., J. Exp. Med. 183, 1996, cc. 2185-2195
- 35 Ishii N. и др., Eur. J. Immunol. 33, 2003, cc. 2372-2381
- Jakobovits A. и др., Nature 362, 1993, cc. 255-258
- Jakobovits A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, cc. 2551-2555
- 40 Jones B. и др., J. Immunol. 136, 1986, cc. 348-356
- Jones P. и др., Nature 321, 1986, cc. 522-525
- Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во
Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991
- 45 Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, cc. 151-161
- Kjaergaard J. и др., J. Immunol. 167, 2001, cc. 6669-6677
- Kotani A. и др., Immunol. Lett. 84, 2002, cc. 1-7
- 50 Lane P., J. Exp. Med. 191, 2000, cc. 201-206

- Lonberg N. и Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25, 1995, сс. 65-93
- Lonberg N. и др., Nature 368, 1994, сс. 856-859
- Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 1994, сс. 49-101
- 5 Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс. 2555-2560
- Lund J. и др. FASEB J. 9, 1995, сс. 115-119
- Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс. 183-202
- 10 Mallett S. и Barclay A.N., Immunol. Today 12, 1991, сс. 220-223
- Mallett S. и др., EMBO J. 9, 1990, сс. 1063-1068
- Marks J.D. и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597
- 15 Matsumura Y. и др., J. Immunol. 163, 1999, сс. 3007-3011
- Meissner P. и др., Biotechnol. Bioeng. 75, 2001, сс. 197-203
- Miura S. и др., Mol. Cell. Biol. 11, 1991, сс. 1313-1325
- 20 Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс. 319-324
- Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855
- Ndhlovu L.C. и др., J. Immunol. 167, 2001, сс. 2991-2999
- Neuberger M.S., EMBO J. 2, 1983, сс. 1373-1378
- 25 Neuberger M.S. и др., Nature 314, 1985, сс. 268-270
- Nohara C. и др., J. Immunol. 166, 2001, сс. 2108-2115
- Norderhaug L. и др., J. Immunol. Methods 204, 1997, сс. 77-87
- 30 Ohshima Y. и др., J. Immunol. 159, 1997, сс. 3838-3848
- Orlandi R. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 3833-3837
- Picard D. и Schaffner W., Nature 307, 1984, сс. 80-82
- 35 Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033
- Ravetch J.V. и Bolland S., Annu. Rev. Immunol. 19, 2001, сс. 275-290
- Ravetch J.V. и Kinet J.P., Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492
- 40 Riechmann L. и др., Nature 332, 1988, сс. 323-327
- Rogers P.R. и др., Immunity 15, 2001, сс. 445-455
- Salek-Ardakani S. и др., J. Exp. Med. 198, 2003, сс. 315-324
- Schlaeger E.-J. и Christensen K., Cytotechnology 30, 1999, сс. 71-83
- 45 Schlaeger E.-J., J. Immunol. Methods 194, 1996, сс. 191-199
- Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604
- Sojahr H.T. и Bahl O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259, 1987, сс. 52-57
- 50 Stüber E. и Strober W., J. Exp. Med. 183, 1996, сс. 979-989

- Stüber E. и др., Gastroenterology 115, 1998, сс. 1205-1215
- Sugamura K. и др., Nat. Rev. Immunol. 4, 2004, сс. 420-431
- Takahashi Y. и др., J. Virol. 75, 2001, сс. 6748-6757
- 5 Takasawa N. и др., Jpn. J. Cancer Res. 92, 2001, сс. 377-382
- Tanaka Y. и др., Int. J. Cancer 36, 1985, сс. 549-555
- Taylor L. и Schwarz H., J. Immunol. Meth. 255, 2001, сс. 67-72
- 10 Taylor L. и др., Int. Immunol. 6, 1994, сс. 579-591
- Taylor L. и др., Nucleic Acids Res. 20, 1992, сс. 6287-6295
- Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс. 995-1004
- 15 Thotakura N.R. и Bahl O.P., Meth. Enzymol. 138, 1987, сс. 350-359
- Tozawa H. и др., Int. J. Cancer 41, 1988, сс. 231-238
- Tsukada N. и др., Blood 95, 2000, сс. 2434-2439
- 20 Tuailon N. и др., J. Immunol. 152, 1994, сс. 2912-2920
- Tuailon N. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 3720-3724
- US 4179337
- US 4301144
- 25 US 4496689
- US 4640835
- US 4670417
- 30 US 4791192
- US 5202238
- US 5204244
- 35 US 5545806
- US 5545807
- US 5569825
- 40 US 5625126
- US 5633425
- US 5661016
- US 5770429
- 45 US 5789650
- US 5814318
- US 5874299
- 50 US 5877397

- van de Winkel J.G. и Anderson C.L., J. Leukoc. Biol. 49, 1991, cc. 511-524
- van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, cc. 368-374
- Vitetta E.S. и др., Science 238, 1987, cc. 1098-1104
- 5 Ward E.S. и Ghetie V., Ther. Immunol. 2, 1995, cc. 77-94
- Weinberg A.D. и др., J. Immunol. 162, 1999, cc. 1818-1826
- Weinberg A.D. и др., Nature Medicine 2, 1996, cc. 183-189
- 10 Weinberg A.D. и др., Semin. Immunol. 10, 1998, cc. 471-480
- Weinberg A.D., Trends Immunol. 23, 2002, cc. 102-109
- Werner R.G. и др., Arzneimittelforschung 48, 1998, cc. 870-880
- 15 WO 01/14424
- WO 87/05330
- WO 92/03918
- 20 WO 92/22645
- WO 93/1227
- WO 94/11026
- WO 94/25585
- 25 WO 95/12673
- WO 95/21915
- WO 98/24884
- 30 WO 99/15200
- Wu T. и др., Transplant. Proc. 33, 2001, cc. 217-218
- Yoshioka T. и др., Eur. J. Immunol. 30, 2000, cc. 2815-2823

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ

<120> Антитела к OX40L

<130> 22672 WO

<150> EP 04022158

<151> 2004-09-17

<150> EP 04030546

<151> 2004-12-23

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> искусственная

<220>

<223> легкая цепь, переменная область LC.001, LC.059 и LC.063

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 2

<211> 120

<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь, переменная область LC.001

<400> 2

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> легкая цепь, переменная область LC.005

<400> 3

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 5
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 10
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe
 85 90 95
 15
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105
 20
 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> искусственная
 25
 <220>
 <223> тяжелая цепь, переменная область LC.005
 30
 <400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 35
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60
 40
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 45
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50
 Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5
<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> искусственная

10
<220>
<223> легкая цепь, переменная область LC.010

<400> 5

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

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

20
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

25
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

30
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

35
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

40
<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> искусственная

45
<220>
<223> тяжелая цепь, переменная область LC.010

<400> 6

50
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

5

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ala Tyr Tyr Val
50 55 60

10

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

15

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

20

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

25

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 58
<212> PRT
<213> искусственная

30

<220>
<223> легкая цепь, переменная область LC.029

<400> 7

35

Met Leu His Pro Leu Cys Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Val Ala
1 5 10 15

40

Val Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu
20 25 30

Lys Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
35 40 45

45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
50 55

50

<210> 8
<211> 120

<212> PRT

<213> искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь, переменная область LC.029

<400> 8

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 57

<212> PRT

<213> искусственная

<220>

<223> легкая цепь, переменная область LC.019

<400> 9

Met Pro Pro Val Trp Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Ala Ala Val
1 5 10 15

Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Lys
20 25 30

Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr Phe
35 40 45

5 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
50 55

10 <210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь, переменная область LC.019

15 <400> 10

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

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

25 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

40 Thr Val Ser Ser
115

45 <210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
50 <223> легкая цепь, переменная область LC.033 (a)

<400> 11

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

5

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

10

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

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

15

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

20

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

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

25

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

30

<213> искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь, переменная область LC.033

<400> 12

35

Gln Lys Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

40

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

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

45

Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

50

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

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

Ala Arg Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

10

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> искусственная

20

<220>
<223> легкая цепь, константная область

<400> 13

25

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

35

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

40

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

45

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

50

<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь, константная область (гамма 1)

<400> 14

5

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

10

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

15

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

20

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

25

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

30

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

35

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

40

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

45

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

50

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

5

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

10

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

15

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

20

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

25

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

30

<210> 15
<211> 327
<212> PRT
<213> искусственная

35

<220>
<223> тяжелая цепь, константная область (гамма 4)
<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

40

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

45

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

50

	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	65	70	75	80
5	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
10	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125	
15	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140	
20	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155	160
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175	
25	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190	
30	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205	
	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220	
35	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	225	230	235	240
40	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	245	250	255	
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	260	265	270	
45	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	275	280	285	
50	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	290	295	300	

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

5 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

10 <210> 16
<211> 104
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> легкая цепь, переменная область LC.033 (b)
15 <400> 16

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100

40 <210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> искусственная

45 <220>
<223> тяжелая цепь, переменная область LC.059

50

<400> 17

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> искусственная

<220>

<223> легкая цепь, переменная область LC.060

<400> 18

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

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

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

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

15 <213> искусственная

<220>

<223> тяжелая цепь, переменная область LC.060

<400> 19

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

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

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

30 Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

40 Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 120

50

<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь, переменная область LC.063

<400> 20

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> CDR / фрагмент антитела

<400> 21

Ser Tyr Thr Met His
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 22
 5
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> искусственная
 10
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 15
 <400> 23
 Asn Phe Gly Met His
 1 5
 20
 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> искусственная
 25
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 24
 30
 Asn Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> искусственная
 35
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 40
 <400> 25
 Ser Tyr Ala Met Asn
 1 5
 45
 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> искусственная
 50
 <220>

<223> CDR / фрагмент антитела

<400> 26

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

Gly

10

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> искусственная

15

<220>

<223> CDR / фрагмент антитела

<400> 27

20 Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> искусственная

30

<220>

<223> CDR / фрагмент антитела

<400> 28

35

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ala Tyr Tyr Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> искусственная

45

<220>

<223> CDR / фрагмент антитела

<400> 29

50

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 Gly

10 <210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> CDR / фрагмент антитела

15 <400> 30

Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> CDR / фрагмент антитела

30 <400> 31

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

35 Gly Arg

40 <210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> CDR / фрагмент антитела

45 <400> 32

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

50

Gly Arg

5 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> искусственная

10 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 33

15 Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

25 <400> 34

 Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

35 <400> 35

 Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe
 1 5

40 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> искусственная

45 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 36

50 Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> искусственная

5

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 37

10

Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> искусственная

15

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 38

20

Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

25

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> искусственная

30

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 39

35

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

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> искусственная

40

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 40

45

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

50

<210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> искусственная
 5
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 41
 10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 20 <400> 42
 Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10
 25 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> искусственная
 30 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 43
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 35 1 5 10
 <210> 44
 <211> 24
 40 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 45 <400> 44
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 1 5 10 15
 50 Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 20

5
 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 45
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 10
 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 20
 <400> 46
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 25
 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 30
 <400> 47
 Met Pro Pro Val Trp Lys Val
 1 5
 35
 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 40
 <400> 48
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 45
 50

5
 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 49
 10
 Leu His Pro Leu Cys Lys Val
 1 5
 15
 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 20
 <400> 50
 Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 25
 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> искусственная
 30
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 <400> 51
 Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr
 35 1 5
 40
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела
 45
 <400> 52
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 50
 <210> 53

5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 53

 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
 1 5
 10

 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> искусственная
 15

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 54
 20

 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Gln Tyr Thr
 1 5
 25

 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> искусственная

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 55
 30

 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Thr
 1 5
 35

 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> искусственная
 40

 <220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

 <400> 56
 45

 Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
 1 5
 50

 <210> 57
 <211> 9

<212> PRT
 <213> искусственная

<220>
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Trp Thr Phe
 1 5

<210> 58
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> искусственная

<220>
 <223> тяжелая цепь LC.001 (человеческий IgG1-тип)

<400> 58

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
5	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170						175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
10					180					185						190	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
					195					200						205	
15	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
					210					215						220	
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
20						225										230	240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250						255	
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					260					265						270	
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
30					275					280						285	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
35					290					295						300	
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
					305					310						315	320
40	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330						335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
45					340					345						350	
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
50					355					360						365	

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

5 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

10 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

15 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

20

<210> 59
<211> 450
<212> PRT
25 <213> искусственная

<220>
<223> тяжелая цепь LC.001 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)

<400> 59

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

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

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

40 Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

50

	Ala	Lys	Asp	Arg	Leu	Val	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
5	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
10		130					135					140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
15	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
20				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
25	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
30		225				230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
35	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
40			275					280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
45		290					295					300					
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305				310						315					320	
50	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325						330					335		

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 5 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 10 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 15 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 20 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 25 Gly Lys
 450
 30 <210> 60
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 35 <223> тяжелая цепь LC.001 (S228P, человеческий IgG4-мутант)
 <400> 60
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 45 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 50

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

5

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

10

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

15

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

20

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

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

25

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

30

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

35

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

40

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

45

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

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

50

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

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

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

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

15 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

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

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

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

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

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

35 <210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> искусственная

40 <220>
 <223> легкая цепь LC.001

<400> 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

50

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 5 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 20 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 25 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 30 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 35 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 40 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 45 <210> 62
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> искусственная
 <220>
 50 <223> тяжелая цепь LC.005 (человеческий IgG1-тип)

<400> 62

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

5

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

10

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60

15

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

20

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

25

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

30

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

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

35

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

40

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

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

45

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

50

	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	225	230	235	240
5	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255	
10	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	260	265	270	
15	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285	
20	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	290	295	300	
25	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	305	310	315	320
30	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	325	330	335	
35	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350	
40	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355	360	365	
45	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	370	375	380	
50	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	385	390	395	400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	405	410	415	
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	420	425	430	
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435	440	445	
	Gly Lys	450			

<210> 63
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> искусственная

5

<220>
 <223> тяжелая цепь LC.005 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)

<400> 63

10

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

15

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

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

20

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60

25

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

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

30

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

35

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

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

40

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

45

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

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

50

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

5

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

10

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

15

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

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

20

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

25

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

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

50

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

5 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

10

<210> 64
<211> 447
<212> PRT
<213> искусственная

15

<220>
<223> тяжелая цепь LC.005 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

<400> 64

20

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

25

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

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

30

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
50 55 60

35

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

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

40

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

45

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

50

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

	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
5	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170						175	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
10					180					185						190	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	
					195					200						205	
15	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	
							215									220	
	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
20							230									240	
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
						245					250					255	
25	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	
						260					265					270	
	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
30						275					280					285	
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
						290					295					300	
35	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
						310					315					320	
40	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
						325					330					335	
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
45						340					345					350	
	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
						355					360					365	
50																	

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

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

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

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

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

<210> 65
<211> 214
20 <212> PRT
<213> искусственная

<220>
<223> легкая цепь LC.005

25 <400> 65

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

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

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

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

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

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

50 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

20 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

25 <210> 66
<211> 449
<212> PRT
<213> искусственная

30 <220>
<223> тяжелая цепь LC.060 (человеческий IgG1-тип)
<400> 66

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

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

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

45 Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

50

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
5	Ala	Lys	Asp	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105						110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
10				115				120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
15	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
20					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
25				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
30			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
35	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
40				245						250					255		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
45	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275						280					285				
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
50		290					295					300					

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

35

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> искусственная

40

<220>
<223> тяжелая цепь LC.060 (L234A, L235A, человеческий IgG1-мутант)

<400> 67

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

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

50

	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
5	Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Leu Tyr	
10	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
15	Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	
20	115 120 125	
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	
	130 135 140	
25	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	
	145 150 155 160	
30	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	
	165 170 175	
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	
35	180 185 190	
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	
	195 200 205	
40	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	
	210 215 220	
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro	
45	225 230 235 240	
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	
	245 250 255	
50		

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

5

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

10

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

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

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

35

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

40

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

Lys

45

<210> 68
<211> 446
<212> PRT
<213> искусственная

50

<220>

<223> тяжелая цепь LC.060 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

<400> 68

5

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

10

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

15

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

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

20

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

25

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

30

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

35

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

40

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

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

45

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

50

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

	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	
	210						215					220					
5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
10					245					250					255		
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				260					265					270			
15	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280					285				
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
20						295						300					
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	305				310						315					320	
25	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				325						330					335		
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
30				340					345					350			
	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
				355				360					365				
35	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
		370					375					380					
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
40						390					395					400	
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
45				405					410						415		
	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
				420					425					430			
50																	

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

5

<210> 69
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> искусственная

10

<220>
 <223> легкая цепь LC.060

<400> 69

15

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

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

20

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

25

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

30

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

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

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

Формула изобретения

1. Антитело, которое связывается с OX40L человека, отличающееся тем, что содержит комбинацию переменных областей, независимо друг от друга
15 выбранных из группы, включающей следующие комбинации:

а) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:2;

20 б) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:4;

в) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:6;

25 г) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:8;

д) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:10;

е) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 или 16, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:12.

35 2. Антитело, которое связывается с OX40L человека, отличающееся тем, что оно продуцируется линией клеток, выбранной из группы, включающей линии клеток hu-Mab<hOX40L>LC.001, hu-Mab<hOX40L>LC.005, hu-Mab<hOX40L>LC010, hu-Mab<hOX40L>LC.019, hu-Mab<hOX40L>LC.029 и hu-Mab<hOX40L>LC.033.

45 3. Антитело, которое связывается с OX40L, отличающееся тем, что относится к классу человеческого IgG1 и содержит в качестве

а) тяжелой γ-цепи SEQ ID NO:58 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,

б) тяжелой γ-цепи SEQ ID NO:62 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или

в) тяжелой γ-цепи SEQ ID NO:66 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

50 4. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу антитела, отличающаяся тем, что указанное антитело связывается с OX40L человека и содержит комбинацию переменных областей, независимо друг от друга выбранных из группы, включающей следующие комбинации:

а) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:2;

б) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:4;

в) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:6;

г) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:8;

д) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:10;

е) переменная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 или 16, и переменная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:12.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, которое связывается с OX40L человека, отличающаяся тем, что она кодирует антитело, включающее:

а) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:58 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,

б) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:62 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или

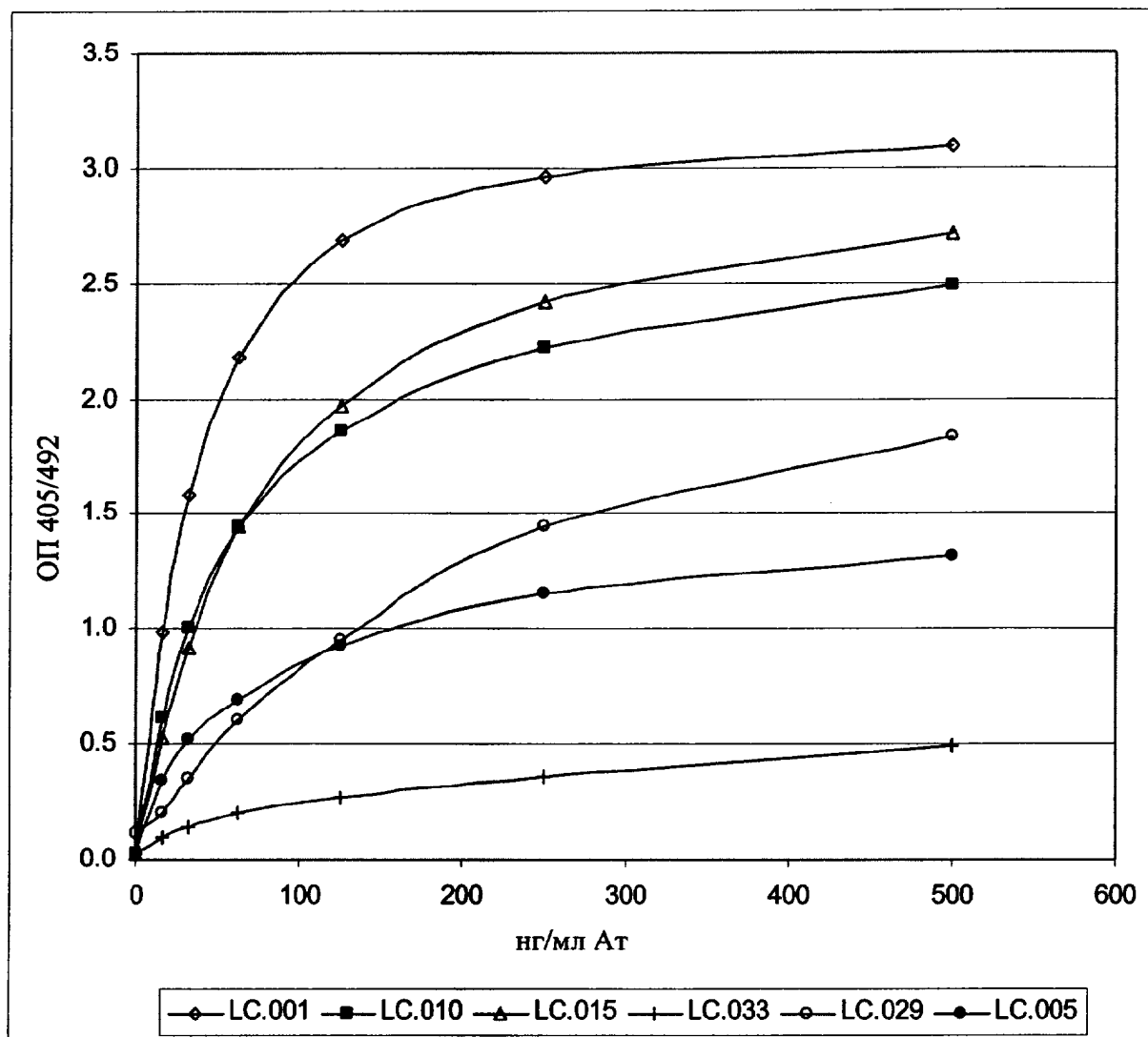
в) тяжелой γ -цепи SEQ ID NO:66 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

6. Способ получения антитела, которое связывается с OX40L и содержит Fc фрагмент, полученный из организма человека, отличающийся тем, что культивируют клетку-хозяина, включающую вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.4 или 5 в условиях, которые обеспечивают синтез антитела и выделяют антитело из культуры.

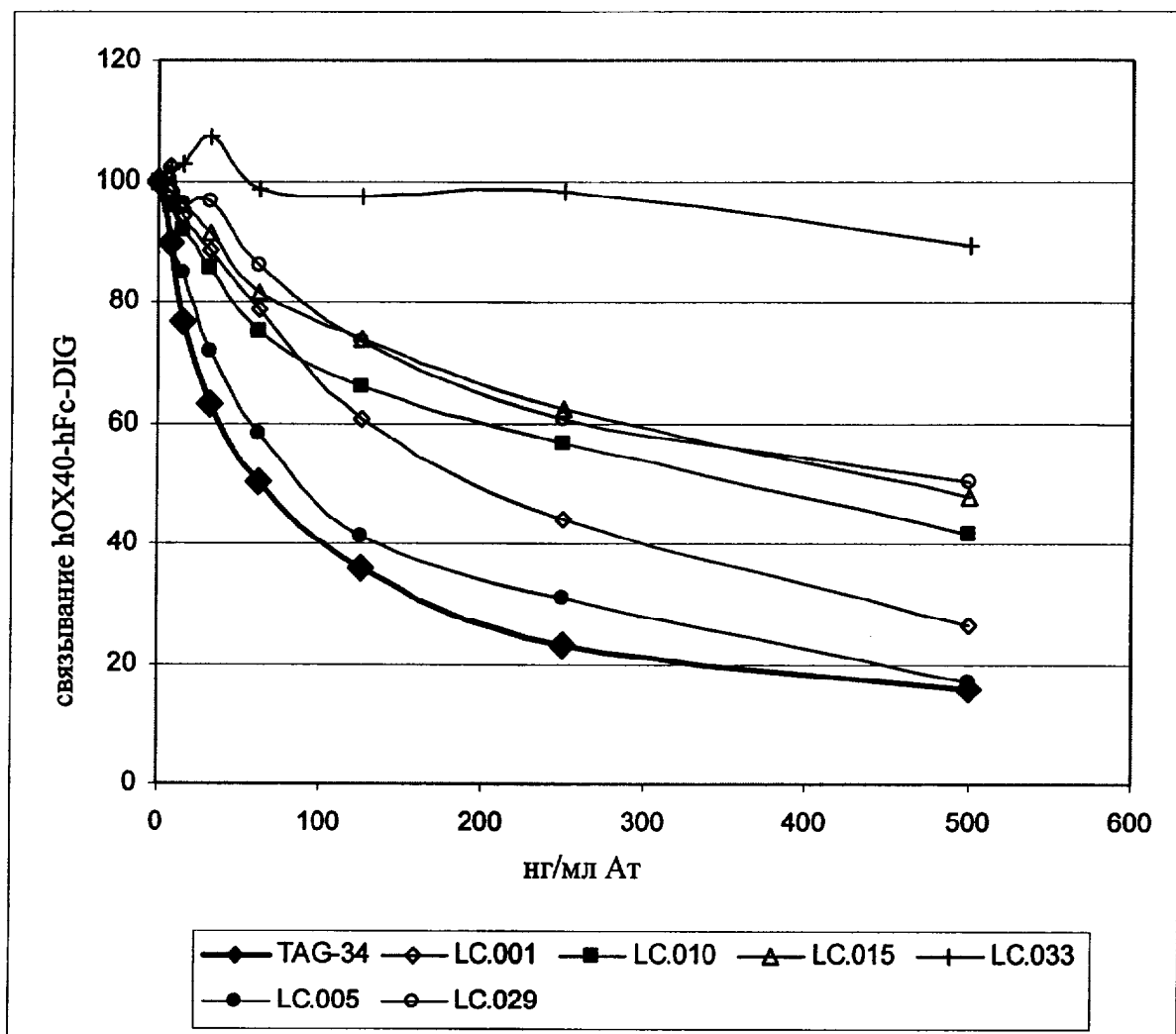
7. Диагностическая композиция, для выявления OX40L in vitro содержащая молекулу антитела по любому из пп.1-3 в дозовом количестве 0,1 мг/кг и, по меньшей мере, один диагностически приемлемый эципиент.

8. Фармацевтическая композиция, предназначенная для профилактики или лечения воспалительных заболеваний, содержащая молекулу антитела по любому из пп.1-3 в дозовом количестве 0,1 мг/кг и, по меньшей мере, один диагностически приемлемый эципиент.

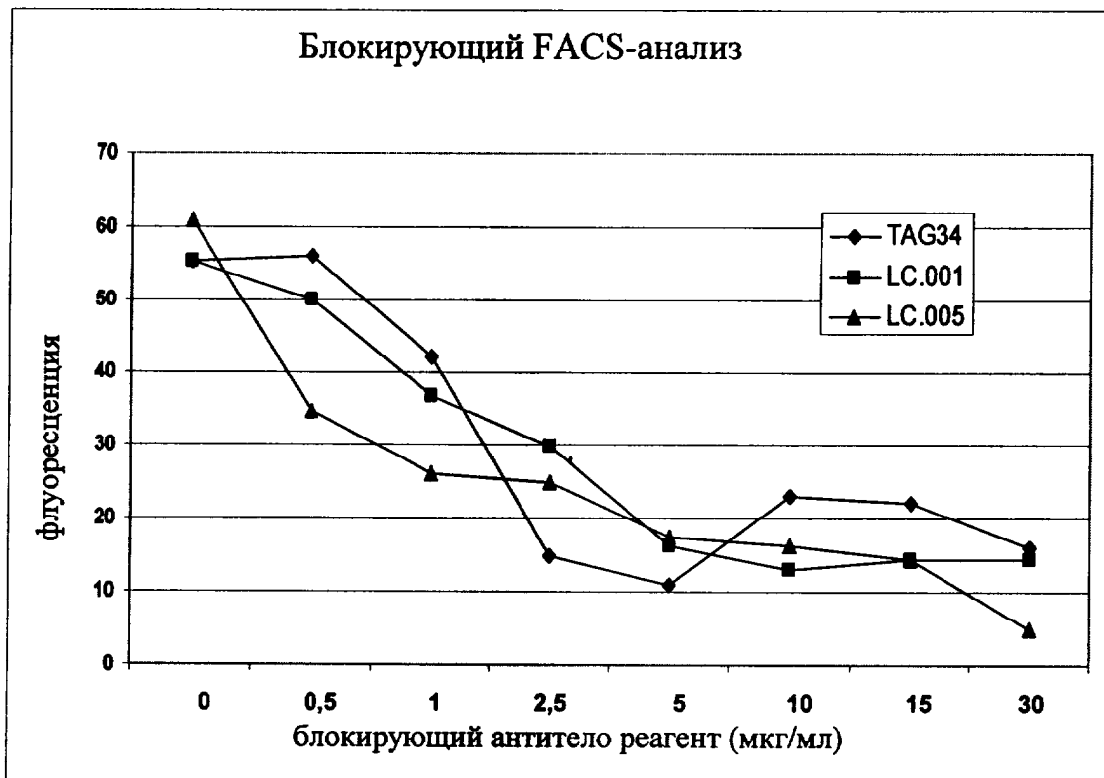
9. Применение антитела по любому из пп.1-3 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для профилактики и лечения воспалительных заболеваний.



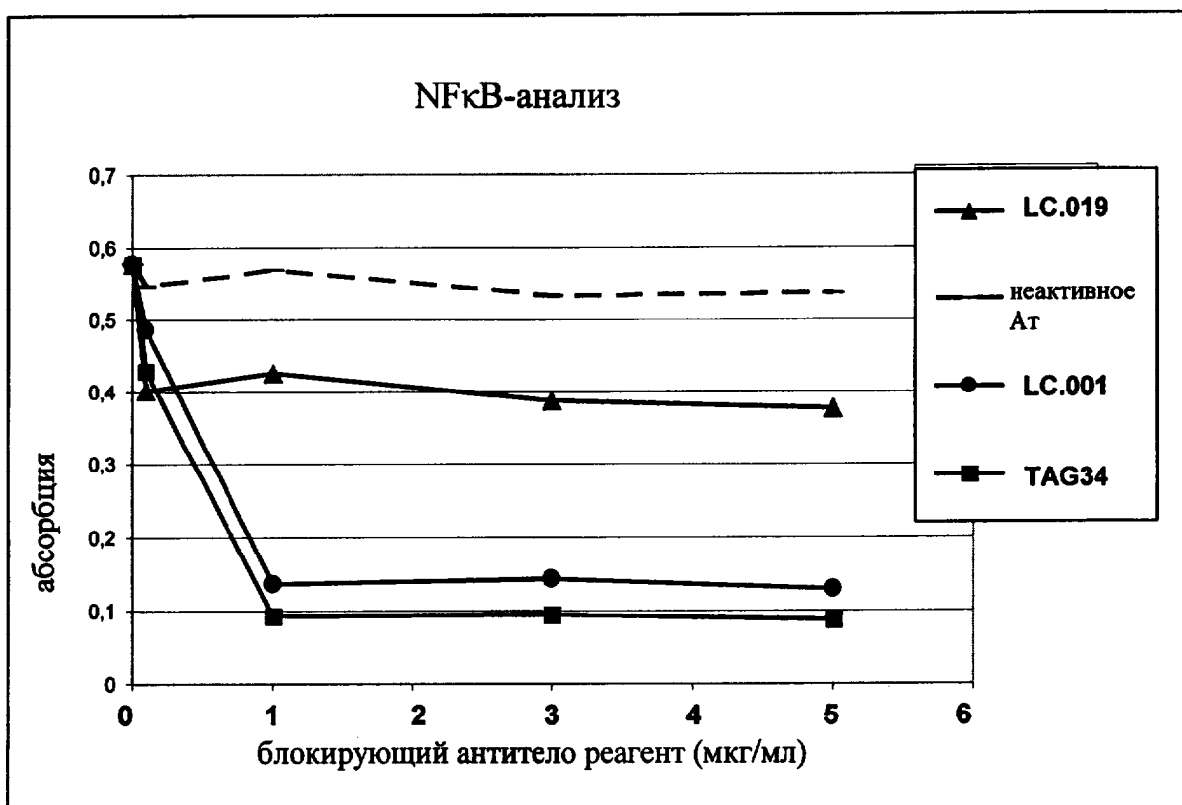
Фиг. 1а



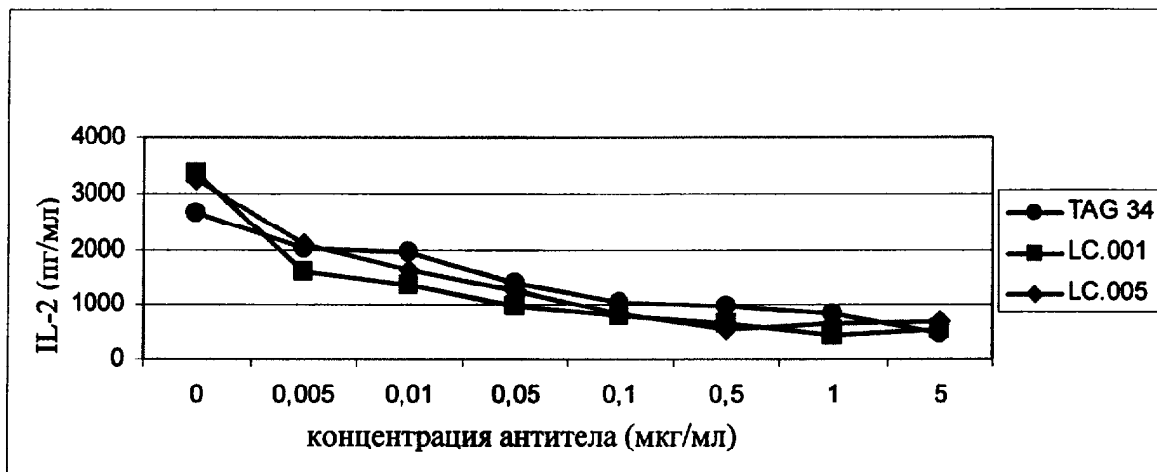
Фиг. 16



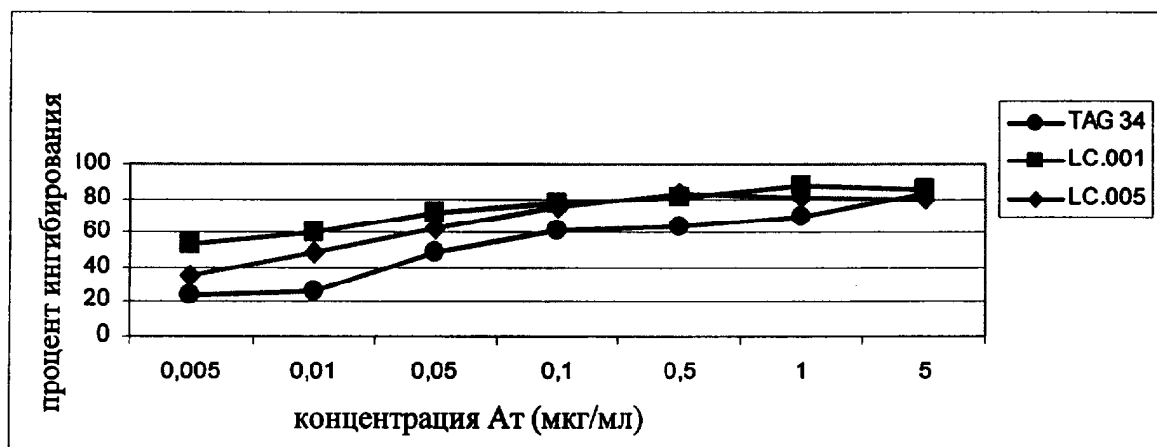
Фиг. 2



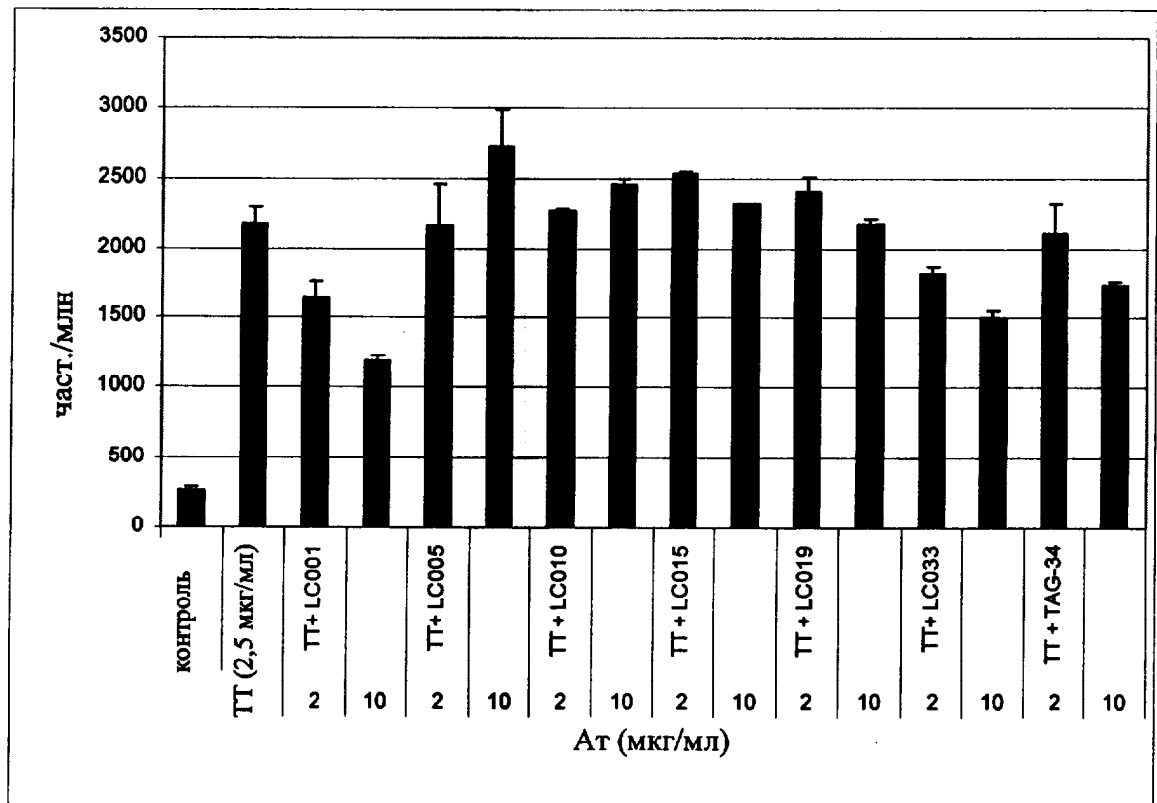
Фиг. 3



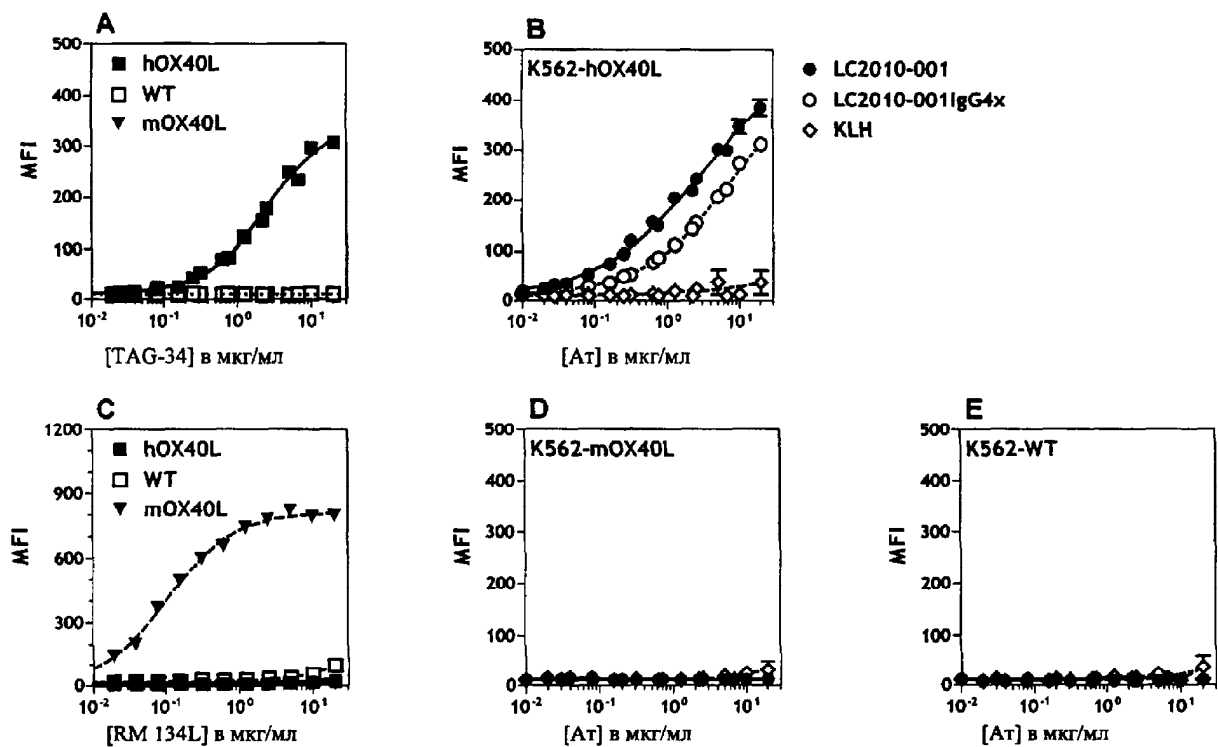
Фиг. 4



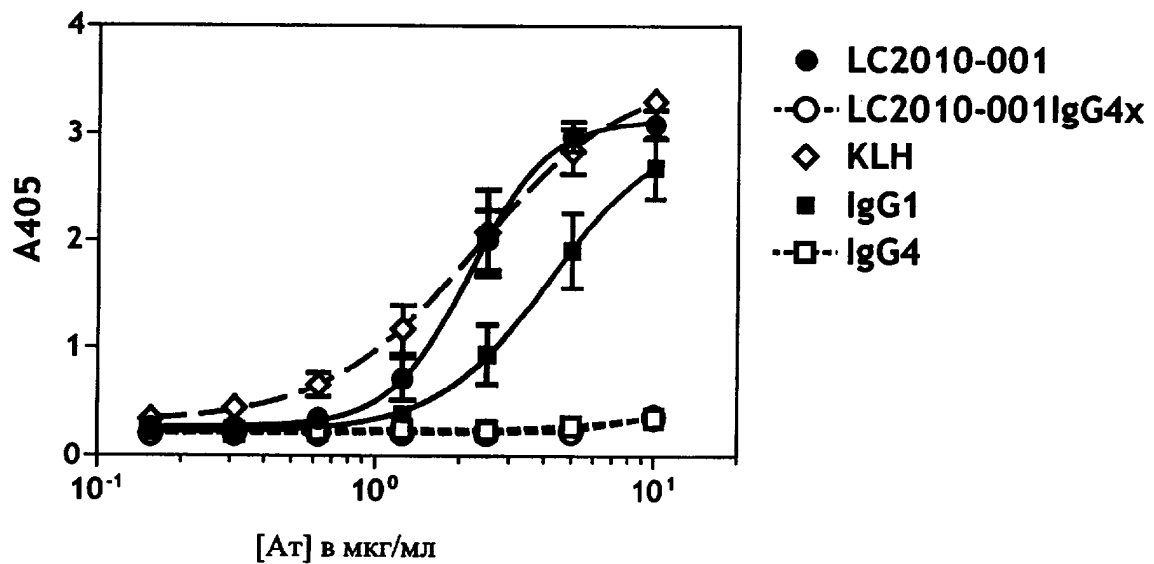
Фиг. 5



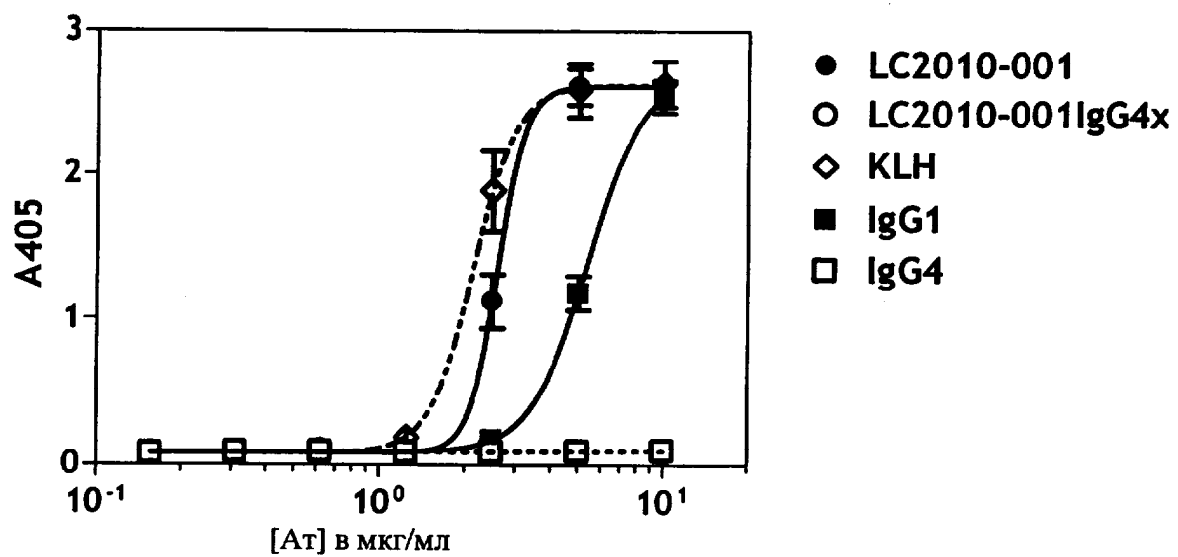
Фиг. 6



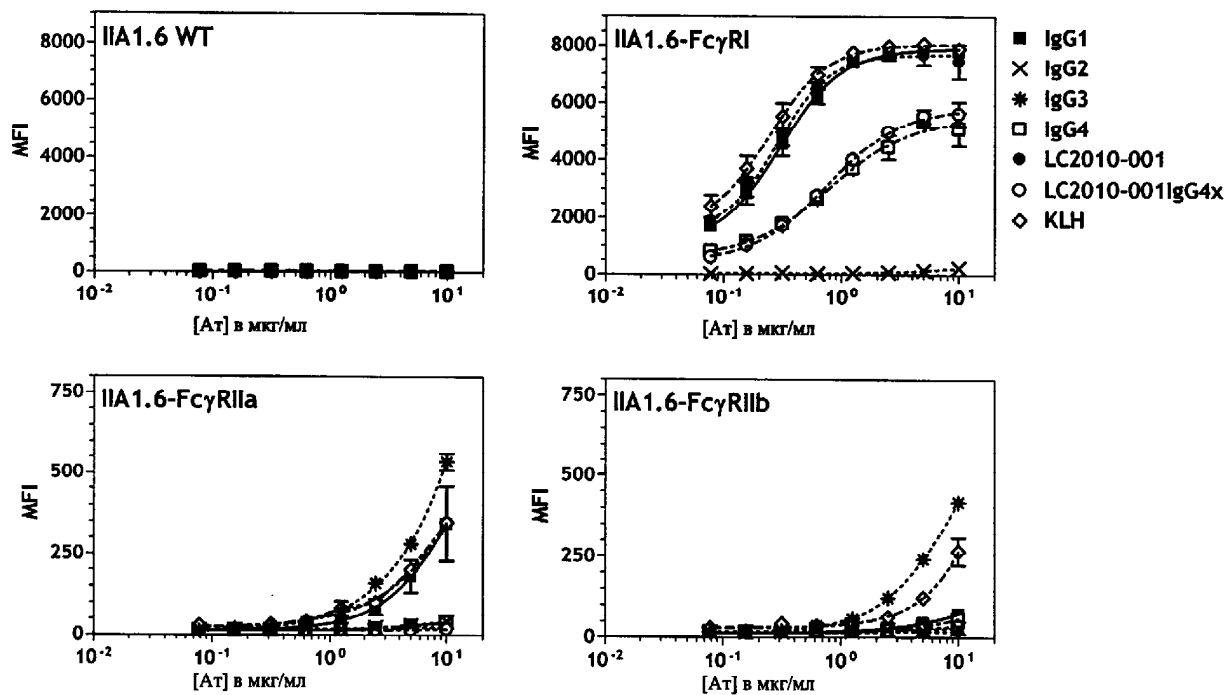
Фиг. 7



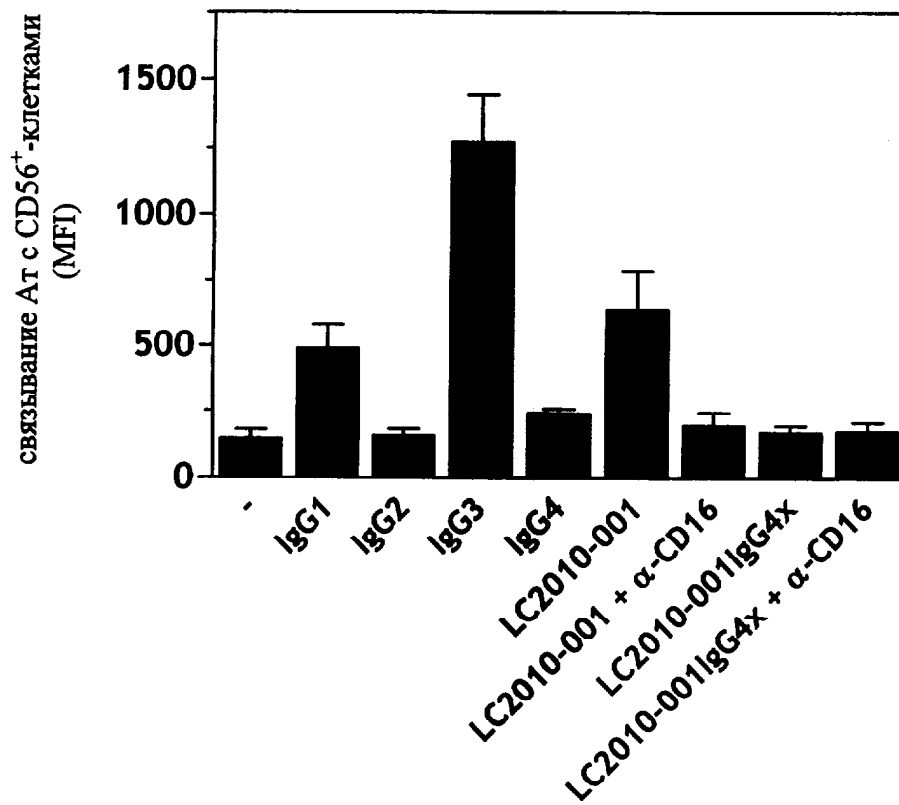
Фиг. 8



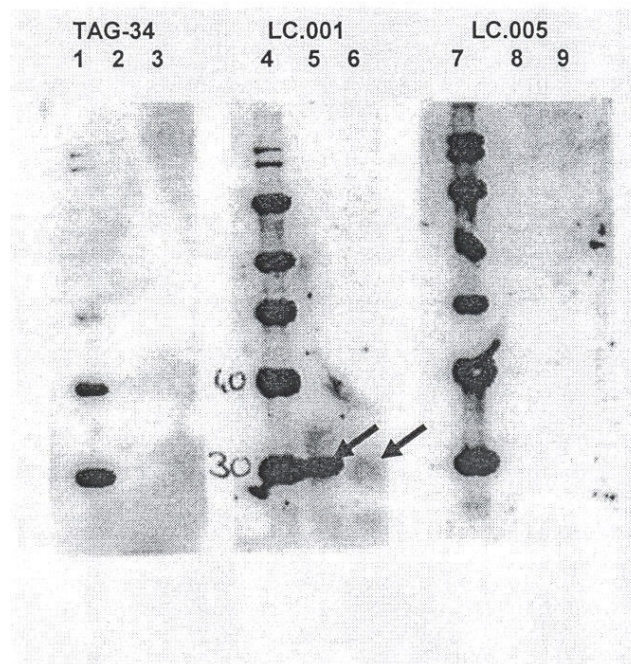
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12