РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 725 221** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
***A61K 39/395** (2019.08); **A61P 19/02** (2019.08); **A61P 29/00** (2019.08); **A61P 37/06** (2019.08)*

(21)(22) Заявка: **2017118985, 03.03.2016**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.03.2016

Дата регистрации:
30.06.2020

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
03.03.2015 GB PCT/GB2015/050614;
30.04.2015 US 14/700,896;
28.07.2015 US 14/811,163;
09.09.2015 GB 1516008.8;
09.11.2015 US 14/935,937;
01.12.2015 US 14/955,843

(43) Дата публикации заявки: **04.04.2019** Бюл. № **10**

(45) Опубликовано: **30.06.2020** Бюл. № **19**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **03.10.2017**

(86) Заявка PCT:
GB 2016/050565 (03.03.2016)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2016/139482 (09.09.2016)

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):
БЛЭНД-ВОРД Филип (GB),
КОСМАК Миха (GB),
ХОЛМС Стив (GB),
КИРБИ Иан (GB),
КЭМПБЕЛЛ Джейми (GB),
КИН Лесли Сьюзан (GB),
ТКАЧЕВ Виктор (GB)

(73) Патентообладатель(и):
КИМАБ ЛИМИТЕД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2006029879 A2, 23.03.2006. US 20140322132 A1, 30.10.2014. SIMPSON D. Drug therapy for acute graft-versus-host disease prophylaxis.J Hematother Stem Cell Res. 2000 Jun; 9(3): 317-25. US 20140170157 A1, 19.06.2014. CATLEY MC. et al. Monoclonal antibodies for the treatment of asthma.Pharmacol Ther. 2011 Dec; 132(3): 333-51. doi:** (см. прод.)

(54) АНТИТЕЛА, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с человеческим OX40L (hOX40L) и ингибируют связывание hOX40L с человеческим OX40 (hOX40). Группа изобретений также касается применения указанного антитела в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния; способа лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, включающего введение человеку терапевтически эффективного количества указанного антитела или его фрагмента; комбинации для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного

RU 2725221 C2

RU 2725221 C2

заболевания или состояния, содержащей указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и дополнительное терапевтическое средство, выбранное из ингибитора mTOR и иммуносупрессанта, который модулирует передачу сигнала IL-2; набора для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека. Группа изобретений обеспечивает лечение или предотвращение hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека. 10 н. и 23 з.п. ф-лы, 9 пр., 7 ил., 6 табл.

(56) (продолжение):
10.1016/j.pharmthera.2011.09.005. Epub 2011 Sep 12. JACOBSOHN DA. et al. Novel pharmacotherapeutic approaches to prevention and treatment of GVHD.Drugs. 2002; 62(6): 879-89.

RU 2725221 C2

RU 2725221 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 725 221** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 39/395 *(2019.08);* ***A61P 19/02*** *(2019.08);* ***A61P 29/00*** *(2019.08);* ***A61P 37/06*** *(2019.08)*

(21)(22) Application: **2017118985, 03.03.2016**

(24) Effective date for property rights:
03.03.2016

Registration date:
30.06.2020

Priority:
(30) Convention priority:
03.03.2015 GB PCT/GB2015/050614;
30.04.2015 US 14/700,896;
28.07.2015 US 14/811,163;
09.09.2015 GB 1516008.8;
09.11.2015 US 14/935,937;
01.12.2015 US 14/955,843

(43) Application published: **04.04.2019** Bull. № **10**

(45) Date of publication: **30.06.2020** Bull. № **19**

(85) Commencement of national phase: **03.10.2017**

(86) PCT application:
GB 2016/050565 (03.03.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/139482 (09.09.2016)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-PATENT"

(72) Inventor(s):
BLEND-VORD Filip (GB),
KOSMAK Mikha (GB),
KHOLMS Stiv (GB),
KIRBI Ian (GB),
KEMPBELL Dzhejmi (GB),
KIN Lesli Syuzan (GB),
TKACHEV Viktor (GB)

(73) Proprietor(s):
KIMAB LIMITED (GB)

RU 2725221 C2

RU 2725221 C2

(54) ANTIBODIES, THEIR APPLICATION AND METHODS OF APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to an antibody or its antigen-binding fragment, which specifically bind to human OX40L (hOX40L) and inhibit binding of hOX40L to human OX40 (hOX40). Group of inventions also relates to use of said antibody in producing a drug for treating or preventing OX40L-mediated disease or condition; a method of treating or preventing an OX40L-mediated disease or condition in a subject, comprising administering to a human a therapeutically effective amount of said antibody or fragment thereof; combination for treating or preventing an hOX40L-mediated disease or condition containing said antibody or antigen-binding fragment thereof and an additional therapeutic agent, selected from an mTOR inhibitor and an immunosuppressant which modulates IL-2 signaling; kit for treating or preventing hOX40L-mediated disease or condition in humans.

EFFECT: group of inventions provides treating or preventing the hOX40L-mediated disease or condition in humans.

33 cl, 9 ex, 7 dwg, 6 tbl

RU 2725221 C2

RU 2725221 C2

Настоящее изобретение относится к антителам к OX40L человека, инновационному применению их в медицине и способам применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лиганд OX40 (OX40L) - представитель семейства TNF; трансмембранный белок 2-го типа размером 34 кДа. Кристаллизованный комплекс OX40 и OX40L человека представляет собой тример, состоящий из одной молекулы OX40L (тример) и трех мономеров OX40. Внеклеточный домен OX40 человека на 42% гомологичен OX40L мыши.

OX40L характеризуется неконститутивной экспрессией, но его экспрессия может быть индуцирована на поверхности профессиональных АПК, таких как B-клетки, дендритные клетки (ДК) и макрофаги. Экспрессия OX40L может быть индуцирована на поверхности других типов клеток, таких как клетки Лангерганса, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, тучные клетки и натуральные киллеры (NK). T-клетки также могут экспрессировать OX40L. Рецептор OX40L, OX40, экспрессируется на активированных T-клетках (CD4 и CD8 T-клетках, Th2, Th1 и Th17 клетках) и $CD4^+Foxp3^+$ клетках, даже в отсутствие активации.

Взаимодействие между OX40 и OX40L осуществляется во время взаимодействия T-клеток и ДК через 2 или 3 суток после распознавания антигена. После отсоединения от ДК OX40-экспрессирующая T-клетка может взаимодействовать с OX40L-экспрессирующей клеткой, отличной от ДК, и получать сигнал OX40 от этой клетки, что может обеспечивать передачу сигналов, имеющих существенное значение для образования T-клеток памяти, усиления ответа Th2 и пролонгирования воспалительных реакций. Сигналы OX40, передаваемые в респондерные T-клетки, обеспечивают их устойчивость к Treg-опосредованной супрессии.

Болезнь «трансплантат против хозяина» - главная причина смертности после аллогенной трансплантации костного мозга. При острой форме заболевания зрелые T-клетки, содержащиеся в трансплантате костного мозга, помещенном в поврежденную ткань, распознают ткань донора как чужеродную, что через АПК хозяина вызывает активацию и пролиферацию T-клеток донора с последующей миграцией T-клеток в печень, селезенку, кишечник, кожу и легкие, вызывая повреждение тканей, обусловленное эффекторным ответом ЦТК и высвобождением провоспалительных цитокинов/хемокинов. Начало острой фазы заболевания обычно приходится на первые 100 суток после трансплантации (Hill-Ferrara, Blood May 1, 2000 vol. 95 no. 9 2754-275, Reddy-Ferrara Blood, Volume 17, Issue 4, December 2003).

Хроническая форма БТПХ обычно возникает через 100 суток после трансплантации, и считается, что в ее развитие вовлечено несколько факторов, включая повреждение тимуса, вызвынное предшествующей острой формой БТПХ, что приводит к снижению клиренса патогенных T-клеток (Zhang et al, September 1, 2007 vol. 179 no. 5 3305-3314), повышение продукции TGF-β, что вызывает развитие фиброза (McCormick et al J Immuno, November 15, 1999 vol. 163 no. 10 5693-5699), и B-клеточный компонент за счет повышения уровня фактора, активирующего B-клетки (BAFF) (Sarantopoulos et al, Clin Cancer Res October 15, 2007 13; 6107), а также аутоантитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (Svegliati et al. Blood July 1, 2007 vol. 110 no. 1 237-241).

Клинические исследования показали, что экспрессия OX40 повышается как при острой (Morante et al. Clinical and Experimental Immunology, 145: 36-43), так и хронической форме (Kotani et al, Blood November 15, 2001 vol. 98 no. 10 3162-3164) БТПХ. Введение антител-антагонистов к OX40L приводит к повышению выживаемости в мышиной модели острой БТПХ с летальным исходом, причем выживаемость в группе, получавшей

препарат, составляла 70% по сравнению с группой без применения препарата, все животные которой погибли к 43-им суткам (Tsukada et al, Blood, 1 April 2000, Volume 95, Number 7), тогда как введение Ат- агониста к OX40 приводило к ускорению развития заболевания и повышению смертности (Blazar et al Blood May 1, 2003 vol. 101 no. 9 3741-3748). Было показано, что блокировка взаимодействия OX40-OX40L была эффективной в случае нескольких других воспалительных заболеваний, причем Ат к OX40L Ab было использовано в мышиной модели колита (Totsuka et al., AJP - GI April 1, 2003 vol. 284 no. 4 G595-G603), и что Ат к OX40L может блокировать развитие сахарного диабета у мышей NOD (Pakala et al European Journal of Immunology Volume 34, Issue 11, pages 3039-3046, November 2004).

Литературные источники

Lamb, L.S., Abhyankar, S.A., Hazlett, L., O'Neal, W., Folk, R.S., Vogt, S., Parrish, R.S., Bridges, K., Henslee-Downey, P.J. and Gee, A.P. (1999), Expression ofCD134 (0X-40) on T-cells during the first 100 days following allogeneic bone marrow transplantation as a marker for lymphocyte activation and therapy-resistant graft-versus-host disease. Cytometry, 38: 238-243.

Xupeng Ge, Julia Brown, Megan Sykes, Vassiliki A. Boussiotis, CD134-Allodepletion Allows Selective Elimination of Alloreactive Human T-cells without Loss of Virus-Specific and Leukemia-Specific Effectors, Biology of Blood and Marrow Transplantation, Volume 14, Issue 5, May 2008, Pages 518-530.

Naoto Ishii, Takeshi Takahashi, Pejman Soroosh, Kazuo Sugamura, Chapter 3 - OX40-OX40 Ligand Interaction in T-Cell-Mediated Immunity and Immunopathology, In: Frederick W. Alt, Editor(s), Advances in Immunology, Academic Press, 2010, Volume 105, Pages 63-98.

Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P. (2009), The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. Immunological Reviews, 229: 173-191.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлены антитела к OX40L человека (hOX40L) и фрагменты, а также иновационное применение в медицине для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованных заболеваний или состояний у людей. С этой целью в настоящем изобретении представлены:

В первой конфигурации

Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L, для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека с использованием способа, при котором указанному человеку вводят антитело или фрагмент, причем антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния путем подавления одного, нескольких или всех процессов из:

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L.

Во второй конфигурации

Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L и конкурирует за связывание с указанным hOX40L с антителом, выбранным из группы, состоящей из 02D10, 10A07, 09H04 и 19H01.

В третьей конфигурации

Применение антитела или его фрагмента, который специфически связывается с hOX40L, в производстве лекарственного средства с целью введения человеку для лечения

или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека путем подавления одного, нескольких или всех процессов из:

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L.

В четвертой конфигурации

Способ лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека путем подавления одного, нескольких или всех процессов из:

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L;

причем способ включает введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента, который специфически связывается с hOX40L. В пятой конфигурации

Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L и конкурирует за связывание с указанным hOX40L с антителом 02D10, причем антитело или фрагмент содержат VH-домен, который содержит HCDR3, содержащий мотив VRGXYYY, где X представляет собой любую аминокислоту.

В шестой конфигурации

Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L и конкурирует за связывание с указанным hOX40L с антителом 02D10, причем антитело или фрагмент содержат VH-домен, который содержит последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40 или 46, или последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40, или 46, содержащую менее 5 аминокислотных замен.

В седьмой конфигурации

Антитело человека или его фрагмент, содержащий HCDR3, состоящий из 16-27 аминокислот и полученный при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6, который специфически связывается с hOX40L, для лечения или предотвращения аутоимунного заболевания, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния или отторжения трансплантата.

В восьмой конфигурации

Применение антитела человека или его фрагмента, содержащего HCDR3, который состоит из 16-27 аминокислот и получен при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, отличающийся тем, что сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6, который специфически связывается с hOX40L, в производстве лекарственного средства с целью введения человеку для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния или отторжения трансплантата.

В девятой конфигурации

Способ лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного

воспалительного заболевания или состояния или отторжения трансплантата, включающий введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела человека или его фрагмента, содержащего HCDR3, который состоит из 16-27 аминокислот и получен при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6, который специфически связывается с hOX40L, что и обеспечивает лечение или предотвращение OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, наборы, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: анализ профиля рекомбинантных антител к OX40L, полностью соответствующих человеческим, в анализе нейтрализации связывания лиганда/рецептора методом HTRF. Показанные данные соответствуют трем повторным экспериментам.

Фиг. 2: определение эффекта антител к OX40L в реакции смешанной культуры аллогенных МКПК/Т-лимфоцитов. Показанные данные соответствуют трем независимым парам доноров, причем предполагается, что каждый донор - это отдельный субъект.

Фиг. 3: экспансия Tscm-клеток после аллогенной HCT. Графики, построены по гейтам для CD4+ CD45RA+CCR7+ Т-клеток.

Фиг. 4: блокада OX40L ограничивает экспансию CD4+ Tscm-клеток, обеспечивая сохранение наивных CD4+ Т-клеток после аллогенной HCT. Абсолютное количество CD4+ Tscm-клеток периферической крови (слева) и наивных Т-клеток (справа) после аллогенной HCT у контрольного животного и животных, получавших 2D10 IgG4PE.

Фиг. 5: экспрессия OX40 на наивных CD4+ Т-клетках и стволовых Т-клетках памяти у репрезентативного животного после аллогенной HCT. На левых и средних графиках с данными FACS-анализа гейтинг клеток осуществляли по CD3+CD4+CD45RA+CCR7+. На гистограмме с правой стороны показана экспрессия OX40 в различных субпопуляциях CD4+ Т-клеток: наивные (CD45RA+CCR7+CD95-) клетки, стволовые клетки памяти (SCM: CD45RA+CCR7+CD95+), центральные клетки памяти (CM: CD45RA-CCR7+), эффекторные клетки памяти (EM: CD45RA-CCR7-) и окончательно дифференцированные эффекторные клетки памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (TEMRA: CD45RA+CCR7-).

Фиг. 6a: влияние блокировки OX40L на стволовые CD4+ Т-клетки памяти. Экспериментальные точки для 02D10 Ig4PE показаны с помощью кружочков, для рапамицина - с помощью заштрихованных квадратов и для такролимуса с метотрексатом (Tac/MTX) - с помощью незаштрихованных квадратов.

Фиг. 6b: влияние блокады OX40L на стволовые CD8+ Т-клетки памяти. Экспериментальные точки для 02D10 Ig4PE показаны с помощью кружочков, для рапамицина - с помощью заштрихованных квадратов и для Tac/MTX с помощью незаштрихованных квадратов.

Фиг. 7: кривая выживамости Каплана-Мейера для макак-резус, являющихся реципиентами трансплантиуемых гемопоэтических стволовых клеток, полученных из периферической крови гаплоидентичных доноров - единокровных/единоутробных братьев/сестер. Результаты показаны для животных, которые не получали посттрансплантационную профилактическую терапию (контрольная группа, не получавшая лечения; медиана выживаемости, MST=8 суток; n=4), и животных, получавших монотерапию рапамицином (MST=17 суток; n=4), монотерапию 2D10

(MST=19 суток; n=4) или рапамицином с 2D10 (MST>82 суток; n=3). Следует отметить, что на период составления черновой версии данной заявки продолжалось участие животных 2 и 3, указанных на данной фигуре, в исследованиях; ни у одного из этих животных не наблюдалось признаков БТПХ на 82-е или 41-е сутки после трансплантации, соответственно. Звездочкой * отмечены данные для контрольной группы, не получавшей лечения, и групп, получавших монотерапию рапамицином, взяты из Furlan et al., 2015, Science Translational Medicine, vol 7 (315), 315ra 191.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлены нижеследующие аспекты с 1 по 113.

Настоящее изобретение можно использовать, например, для лечения или предотвращения отторжения трансплантата, например, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) или отторжения аллогенного трансплантата. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения воспалительного заболевания кишечника, например, язвенного колита (ЯК) или болезни Крона (БК), или для лечения или предотвращения воспалительного заболевания или состояния дыхательных путей. В одном примере этот аспект можно использовать для лечения или предотвращения астмы. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения фиброза. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения сахарного диабета. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения увеита. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения гангренозной приодермии. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения гигантоклеточного артериита. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения синдрома Шницлера. Настоящее изобретение также можно использовать, например, для лечения или предотвращения неинфекционного склерита.

1. Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L, для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека с использованием способа, при котором указанному человеку вводят антитело или фрагмент, причем антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния путем подавления одного, нескольких или всех процессов из

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L.

Таким образом, авторы настоящего изобретения впервые установили, что подавление (a), (b) и (c), можно использовать в качестве способов лечения и/или предотвращения OX40L-опосредованных заболеваний и состояний у людей, и на это было направлено получение антител и фрагментов антител.

В одном примере секреция осуществляется лейкоцитами. В одном примере (a) отличается значительным повышением уровня цитокина(ов) в человеческое крови, плазме или сыворотке крови.

В одном примере цитокин выбирают из (i) ФНО-альфа, (ii) IL-2 и (iii) интерферона гамма. В одном примере цитокин представляет собой ФНО-альфа. В одном примере цитокин представляет собой IL-2. В одном примере цитокин представляет собой

интерферон гамма. В одном примере цитокины представляют собой (i) и (ii); или (i) и (iii); или (ii) и (iii); или (i)-(iii).

В одном примере подавление (a), (b) или (c), или любое другое подавление, раскрытое в данном документе, представляет собой подавление по меньшей мере на 10% или 20% по сравнению с уровнем у человека, подверженного риску развития или страдающего от hOX40L-опосредованного заболевания или состояния. В одном примере выше упомянутый человек соответствует человеку, приведенному в аспекте 1 до введения антитела или фрагмента; в другом примере выше упомянутый человек - другой человек. В одном примере указанное подавление составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60%.

(i) В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение секреции соответствующего цитокина лейкоцитами (например, Т-клетками человека) в анализе in vitro (что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению (a).

(ii) В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение пролиферации лейкоцитов (например, МКПК человека и/или Т-клеток человека) в анализе in vitro (что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению (b).

(iii) В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L, в анализе in vitro (что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению (c).

В одном примере применяется (i) и (ii); или (i) и (iii); или (ii) и (iii); или (i)-(iii).

В качестве дополнения или альтернативы, оценку указанного подавления можно провести с использованием образцов, полученных у человека, получавшего лечение. Например, приводится ссылка на J. Clin. Immunol., 2004 Jan, 24(1): 74-85; "Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease"; Kaser A et al. В этой публикации приведен пример общепринятого метода использования биоптатов ткани и определения уменьшения уровней цитокинов, свидетельствующего об уменьшении секреции цитокинов после лечения антителом in vivo. Аналогичные способы могут быть использованы для определения уменьшения секреции одного или более цитокинов у человека, получавшего антитело по настоящему изобретению. Специалисты в данной области знакомы с методами оценки содержания цитокинов в организме пациентов и в образцах пациентов, например, путем использования одного или более методов биопсии ткани, иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, окрашивания тканей, количественной оценки мРНК цитокинов (например, с использованием ПЦР, например, TaqmanTM PCR), выявления и количественного определения содержания цитокиновых белков (например, с использованием специфических диагностических антител к цитокинам и применения методов количественного анализа, например, ИФА или других стандартных методов количественного определения белков). Например, если заболевание или состояние относится к одному из заболеваний ЖКТ (например, ВЗК), можно провести биопсию соответствующей ткани кишечника пациента, который получал антитело по настоящему изобретению с последующим количественным определением содержания мРНК цитокинов и/или цитокиновых белков (например, с использованием количественной ПЦР). Результат можно сравнить с количественным определением содержания цитокинов в соответствующей ткани, полученной методом биопсии у того же пациента до введения антитела, или можно сравнить с другим

пациентом-человеком, страдающим от того же заболевания или состояния, но не получавшим никакого лечения антителом к OX40L или никакого лечения по поводу данного заболевания или состояния. Таким образом, специалист в данной области сможет определить, что антитело по настоящему изобретению способствует уменьшению секреции определенного цитокина у человека-реципиента. Вместо оценки содержания в тканях кишечника можно использовать другую ткань или образец, полученные у пациента-человека в зависимости от природы и локализации заболевания или состояния. Например, если заболевание или состояние представляет собой заболевание верхних дыхательных путей (например, легкого), для оценки содержания цитокинов можно взять образец легкого или образец другой ткани верхних путей. Специалистам в данной области понятно, что в альтеративном варианте можно использовать образец бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). В другом примере в случае некоторых заболеваний или состояний можно оценить уменьшение содержания цитокинов в образцах крови, сыворотки или плазмы крови, взятых у человека, который получал антитело по настоящему изобретению, и затем провести сравнение содержания до получения антитела или провести сравнение содержания у человека, не получавшего лечение, как отмечалось выше.

В данной области известно, что термин «лейкоциты» охватывает, например, один или более из лимфоцитов, полиморфоядерных лейкоцитов и моноцитов. Специалистам в данной области вполне понятно, что термин «моноциты» охватывает, например, мононуклеары периферической крови (МКПК) или клетки моноцитарного происхождения, например, дендритные клетки (ДК). См., например, Immunobiology, 2013 Nov, 218(11): 1392-401. doi: 10.1016/j.imbio.2013.07.005. Epub 2013 Jul 25; "Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes", Pfeiffer IA et al.

Пролиферацию лейкоцитов, например, лимфоцитов собственной пластинки (LPL), можно оценить с использованием биопсии ткани, окрашивания и гистологии, как понятно специалистам в данной области. В гистологии широко используется, например, окраска гематоксилином и эозином (окраска Г-Э или окраска ГЭ) для изучения инфильтрации лимфоцитами целого ряда человеческих тканей, и она является одним из главных окрашиваний в гистологии. Это наиболее широко используемое окрашевание в медицинской диагностике, и оно часто является золотым стандартом, в силу чего может быть использовано для оценки пролиферации лейкоцитов в соответствии с настоящим изобретением. Например, у человека, который страдает или подвержен риску развития hOX40L-опосредованного заболевания или состояния может быть получена ткань ЖКТ (например, ткань кишечника), окрашена и оценена на степень инфильтрации LPL. Можно провести сравнение между такой тканью, полученной у человека, который получал антитело по настоящему изобретению, со степенью инфильтрации в ткани, полученной у того же человека до введения антитела или у другого человека, который не получал лечения и подвержен риску развития или страдает от заболевания или состояния. Например, сравнение провидится между тканями кишечника, взятыми у одного и того же человека (или разных) людей, страдающих от ВЗК.

Например, можно определить, способны ли антитело или фрагмент к подавлению связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L, с использованием стандартных анализов связывания, знакомых специалисту в данной области, например, с использованием ИФА или ППР.

Воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) представляет собой хроническое воспалительное нарушение, поражающее желудочно-кишечный тракт, причем частота его возникновения явным образом постоянно увеличиватся и наблюдается тенденция к появлению более тяжелых клинических форм. Заболевание характеризуется чрезмерным иммунным ответом на микрофлору просвета кишечника, что указывает на причастность нарушения барьерной функции флоры кишечника, и эта точка зрения подтверждается следующими исследованиями (Cucchiara et al., 2012; Jostins et al., 2012; Manichanh et al., 2012; Salzman et al., 2007, all cited in Deuring et al., "The cell biology of the intestinal epithelium and its relation to inflammatory bowel disease ", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45 (2013) 798-806). ВЗК включает две главные группы: болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). У пациентов с БК очаги воспаления могут наблюдаться по всему желудочно-кишечному тракту, тогда как у пациентов с ЯК воспаление ограничено толстым кишечником. Также приводятся ссылки на Hisamatsu et al. ("Immune aspects of the патогенез of inflammatory bowel disease". Pharmacology & Therapeutics 137 (2013) 283-297) и документы, процитированные в упомянутом выше документе.

Образование гранулемы предсталяет собой один из наиболее выжных патологических признаков болезни Крона человека. Mizoguchi et al продемонстрировали, что F4/80-позитивные незрелые $CD11c^+$ дендритные клетки (ДК) продуцируют IL-23 и вносят вклад в образование гранулемы в мышиной модели колита (Mizoguchi et al., 2007). Th1-опосредованный иммунный ответ преобладает при болезни Крона. Фактически $CD4^+$ Т-клетки в собственной пластинке при болезни Крона экспрессировали T-bet и продуцировали большие количества интерферона (IFN)-γ (Matsuoka et al., 2004). Sakuraba et al продемонстрировали, что ДК в брыжеечных лимфатических узлах пациентов с болезнью Крона в значительной степени способствовали развитию Th1- и Th17-опосредованного иммунного ответа (Sakuraba et al., 2009). ДК брыжеечных лимфатических узлов вносят вклад в патогенез ВЗК, в частности, патогенез болезни Крона.

Роль цитокинов в развитии заболеваний и состояний

Приводится ссылка на Muzes et al, World J Gastroenterol 2012 November 7; 18(41): 5848-5861 ISSN 1007-9327 (печатная версия) ISSN 2219-2840 (он-лайн версия), "Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel Diseases".

Цитокины - незаменимые сигнальные молекулы иммунной системы слизистых оболочек, предназначнные для поддержания нормального гомеостаза кишечника. Дисбаланс их профиля в сторону инициации воспаления может приводить к таким статусам заболевания, которые, например, наблюдаются при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), например, болезни Крона (БК) и язвенном колите (ЯК). Роль провоспалительных цитокинов, таких как IL-1α, IL-1β, IL-2, -6, -8, -12, -17, -23, IFN-гамма или ФНО-альфа, при ВЗК ассоциирована с инициацией и прогрессированием ЯК и БК. БК часто описывается как прототип Т-хелпер (Th) 1-опосредованных заболеваний, поскольку первичные медиаторы воспаления представляют собой цитокины Th1, такие как интерлейкин (IL)-12, интерферон (IFN)-γ и фактор некроза опухолей (ФНО)-α.

Связывание ФНО-подобных лигандов с их рецепторами запускает пути внутриклеточной передачи сигнала, которые непосредственно вовлечены в пролиферацию, дифференциирование и выживаемость клеток. Большинство представителей суперсемейств ФНО/рецептор ФНО экспрессируются на иммунных клетках и играют ключевую роль в многих компонентах иммунного ответа. ФНО-α

представляет собой главный цитокин в патогенезе ВЗК. Он оказывает плейотропный эффект через экспрессию молекул адгезии, пролиферацию фибробластов прокоагулянтных факторов, а также инициацию цитотоксических, апоптотических и острофазных реакций. Источником ФНО-α при ВЗК частично являются клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги или моноциты, а также дифференцированные Th1-клетки. Уровни ФНО-α в сыворотке крови коррелируют с клинической активностью ЯК и БК [31]. Он играет ведущую роль в воспалении толстой кишки при ВЗК. Роль ФНО-α в БК была широко изучена. Связывание ФНО-α с растворимым рецептором ФНО 1 и 2 (рФНОР1 и 2) запускает передачу сигнала провоспалительных цитокинов. Уровни рФНОР1 и 2 повышены при БК.

Фактор, подобный фактору некроза опухолей (TL1A), другой представитель семейства ФНО, стимулирует секецию IFN-γ путем связывания с рецептором смерти 3 (DR3). DR3 экспрессируется большим количеством клеток из биоптатов слизистой оболочки больных с ЯК и БК, и отмечено увеличение уровня IFN-γ с увеличением активности заболевания у пациентов с ВЗК. Система TL1A/DR3 вовлечена в патогенез БК. Макрофаги собственной пластинки - основные продуценты TL1A, экспрессия которых значительно повышена при БК. Было установлено, что TL1A и IL-23 синергетически стимулирует выработку IFN-γ Т-клетками слизистой оболочки. FN-Y: вырабатывается TH1 Т-клетками. Как только запускается воспалительная реакция, вырабатывается IFN-γ и впоследствии действует через различные молекулы и пути иммунной системы для усиления воспалительного процесса. Имеется огромное число литратурных источников, в которых обширно рассмотрена провоспалительная природа IFN-γ, что привело к общепринятому мнению о том, что IFN-γ является основным провоспалительным цитокином при воспалении и аутоимунных заболеваниях. Интерферон-гамма является причиной экспериментального воспалительного заболевания кишечника у мышей (Ito et al. Clinical and Experimental Immunology (2006), 146: 330-338). В даном исследовании отчетливо было продемонстрировано, что у мышей линии IFN-γ-/-после стимуляции декстрансульфатом натрия (ДСН) развивались более легкие формы колита, что касается степени потери массы тела, индекса активности заболевания, гистологической шкалы и активности миелопероксидазы (МПО). Содержание IFN-γ, вырабатывающегося в клетках толстого кишечника, повышалось у мышей дикого типа, получавших ДСН, у которых отмечались сильно выраженные симптомы, характерные для ВЗК.

Интерлейкин-2 (IL-2) вырабатывается Т-клетками и играет важную роль главным образом в дифференциировании Т-клеток в эффекторные Т-клетки. IL-2 также играет важную роль в пролиферации Т-клеток. Он играет важную роль в развитии ВЗК, поскольку считается, что эффекторные Т-клетки являются основным типом клеток, которые вызывают поражение при ВЗК.

IL-8 (интерлейкин-8; aka CXCL8) главным образом опосредует активацию и миграцию нейтрофилов в ткани из периферической крови в очаги воспаления. Установлено, что содержание IL-8 в тканях выше при активной форме ЯК по сравнению со здоровой тканью толстого кишечника, а его концентрация в сыворотке крови связана со степенью тяжести ЯК, определяемой на основании эндоскопических и гистологических исследований. IL-8 играет важную роль в развитии воспалительного процесса и рака (См., например, "The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response", ISRN Oncol. 2013 Oct 9; 2013: 859154; Gales D et al., and Future Oncol., 2010 Jan; 6(1): 111-6. doi: 10.2217/fon.09.128; "CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis", Singh S et al.). В случае рака, в частности, считается, что IL-8 вносит вклад также путем

поддержания ангиогенеза.

В любой конфигурации, аспекте, концепции или примере в данном документе антитело или фрагмент подавляет связывание hOX40L с рецептором OX40.

В любой конфигурации, аспекте, концепции или примере в данном документе, антитело или фрагмент подавляет связывание hOX40L с OX40.

В любой конфигурации, аспекте, концепции или примере в данном документе, рецептор OX40L может представлять собой OX40 человека.

В любой конфигурации, аспекте, концепции или примере в данном документе у человека наблюдается астма или он подвержен риску ее развития, а антитело или фрагмент способствует уменьшению содержания IgE у человека.

В любой конфигурации, аспекте, концепции или примере в данном документе у человека наблюдается астма или он подвержен риску ее развития, а антитело или фрагмент предназначены для уменьшения содержания IgE у человека.

2. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 1, причем антитело или фрагмент способствует подавлению связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L, и уменьшению пролиферации Т-клеток человека; причем антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния путем уменьшения секреции цитокинов, выбранных из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферон гамма.

В одном примере цитокин выбирают из (i) ФНО-альфа, (ii) IL-2 и (iii) интерферона гамма. В одном примере цитокин представляет собой ФНО-альфа. В одном примере цитокин представляет собой IL-2. В одном примере цитокин представляет собой интерферон гамма. В одном примере цитокины представляют собой (i) и (ii); или (i) и (iii); или (ii) и (iii); или (i)-(iii).

3. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 1, причем лейкоциты выбирают из группы, состоящей из полиморфоядерных лейкоцитов, моноцитов, мононуклеаров периферической крови (МКПК), лимфоцитов, Т-клеток, антиген-презентирующих клеток (АПК), дендритных клеток (ДК-клеток) и натуральных киллеров (NK-клеток).

В одном варианте реализации изобретения лейкоциты представляют собой мононуклеары периферической крови (МКПК) и Т-клетки (например, МКПК).

4. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 3, причем лейкоциты включают лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки кишечника (LPL), а заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

5. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника и эпителиальных клеток дыхательных путей (например, легкого).

В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника, клеток тканей глаза и эпителиальных клеток дыхательных путей (например, легкого). В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника и клеток тканей глаза. В дополнительном варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки тканей глаза.

6. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом для

лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у указанного человека путем уменьшения пролиферации Т-клеток у указанного человека.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение пролиферации Т-клеток в анализе in vitro (например, в анализе in vitro на ДК/Т-клетках человека, например, что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению пролиферации Т-клеток у указанного человека.

7. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у указанного человека путем подавления взаимодействия между hOX40L и лейкоцитами человека, при этом наблюдается уменьшение пролиферации лейкоцитов.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение пролиферации лейкоцитов (например, мононуклеарных клеток) в анализе in vitro (например, по результатам анализа СКЛ in vitro, например, что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению пролиферации лейкоцитов у указанного человека.

8. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у указанного человека путем уменьшения пролиферации лейкоцитов человека посредством подавления у указанного человека взаимодействия OX40L и рецептора OX40L, опосредованного Т-клетками.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение пролиферации лейкоцитов (например, мононуклеарных клеток) в анализе in vitro, причем в указанном анализе антитело или фрагмент подавляет взаимодействие OX40L и рецептора OX40L, опосредованное Т-клетками, и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению пролиферации лейкоцитов у указанного человека.

9. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у указанного человека путем уменьшения секреции цитокинов, выбранных из ФНО-альфа, IL-2 и интерферона гамма у человека.

В одном примере антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток у указанного человека путем уменьшения секреции (i) IL-2 и интерферона гамма, (ii) IL-2 и ФНО-альфа или (iii) интерферона гамма и ФНО-альфа у человека.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение секреции цитокина, выбранного из IL-2, ФНО-альфа и интерферона гамма в анализе in vitro (например, по результатам анализа СКЛ in vitro, например, что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению секреции указанного(ых) выбранного(ых) цитокина (ов) у указанного человека.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение секреции IL-8 в анализе in vitro (например, по результатам анализа СКЛ in vitro, например, что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению секреции IL-8 у указанного человека.

10. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 9 для лечения или

предотвращения указанного заболевания или состояния путем уменьшения у человека секреции указанного цитокина, опосредованного взаимодействием дендритных клеток (ДК-клеток) с Т-клетками.

В одном примере антитело или фрагмент способны вызывать уменьшение секреции указанного(ых) цитокина(ов) в анализе in vitro на ДК/Т-клетках (например, что поясняется дополнительно ниже) и, таким образом, введение такого антитела или фрагмента человеку приводит к уменьшению секреции указанного(ых) цитокина(ов) у указанного человека.

11. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем повреждение клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника или клеток дыхательных путей (например, легкого) является симптомом или причиной указанного заболевания или состояния у людей.

В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника, клеток тканей глаза и эпителиальных клеток дыхательных путей (например, легкого). В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника и клеток тканей глаза. В дополнительном варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки тканей глаза.

12. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем у человека наблюдается или он подвержен риску развития воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), сахарного диабета или воспаления дыхательных путей, и указанный способ обеспечивает лечение или предотвращение ВЗК, отторжения аллогенного трансплантата, БТПХ, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей.

12a. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем у человека наблюдается или он подвержен риску развития воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), увеита, гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей, и указанный способ обеспечивает лечение или предотвращение ВЗК, отторжения аллогенного трансплантата, БТПХ, увеита, гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей.

В одном примере любого предшествующего аспекта у человека наблюдается или он подвержен риску развития воспалительного или аутоиммунного заболевания, или состояния, или у него они были диагностированы.

В одном примере аутоиммунное заболевание или состояние выбирают из следующих:

Острый рассеянный энцефаломиелит (ОРЭМ)

Болезнь Аддисона

Аллергический гранулематоз и ангиит или Синдром Чарга-Стросса (CSS)

Аллопеция или гнездная алопеция (ГА)

Анкилозирующий спондилит

Аутоиммунный хронический активный гепатит (ХАГ)

Аутоиммунная гемолитическая анемия

Аутоиммунный панкреатит (АИП)

Аутоиммунная ретинопатия (АР), см. ретинопатия
Аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура
Аутоиммунная нейтропения
Аутоиммунное заболевание внутреннего уха (АЗВУ)
Антифосфолипидный синдром (АФС)
Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС)
Синдром Бехчета
Буллезный пемфигоид
Целиакия
Синдром Чарга-Стросса (СЧС) или аллергический гранулематозный ангиит
Хроническая буллезная болезнь у детей
Хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия (ХВДП)
Рубцующийся пемфигоид (РП)
Васкулит центральной нервной системы
Болезнь Крона
Криоглобулинемия
Герпетиформный дерматит (ГД)
Дискоидная красная волчанка (ДКВ)
Энцефаломиелит
Приобретенный буллезный эпидермолиз (ПБЭ)
Гигантоклеточный артериит, см. темпоральный артериит
Болезнь «трансплантат против хозяина»
Болезнь Грейвса
Синдром Гийена-Барре
Синдром Ано, см. первичный биллиарный цирроз
Тиреоидит Хашимото также называемый аутоиммунным тиреоидитом и хроническим лимфоцитарным тиреоидитом
Васкулит гиперчувствительности (ВГ) или васкулит мелких сосудов
Иммунологическое бесплодие
Воспалительное заболевание кишечника
Инсулинозависимый сахарный диабет
Выделенный васкулит центральной нервной системы или васкулит ЦНС
Синдром Исаакса: нейромиотония
Болезнь Кавасаки (БК)
Миастенический синдром Ламберта-Итона (LEMS)
Линейный IgA-зависимый дерматоз
Волчанка - см. системная красная волчанка
Синдром Меньера
Микроскопический полиангиит (МПА)
Смешанное заболевание соединительной ткани или СЗСТ
Моноклональная гаммапатия
Миастения
Множественный склероз
Мультифокальная моторная невропатия
Нейромиотония или Синдром Исаакса
Нейтропения, см. аутоиммунная нейтропения
Оофорит
Опсо-миоклональный синдром

Орхит
Паранеопластический неврологические расстройства
Вульгарная пузырчатка
Листовидная пузырчатка (ЛП)
Пемфигоид беременных (ПБ)
Перниciозная анемия
Паранеопластическая пузырчатка (ПНП)
Полиангиит - см. микроскопический полиангиит
Узелковый полиартериит (УП)
Полимиозит/Дерматомиозит
Ревматическая полимиалгия
Первичный билиарный цирроз (ПБЦ) также называемый синдромом Ано
Первичный склерозирующий холангит (ПСХ)
Феномен Рейно
Рековерин-ассоциированная ретинопатия (RAR) см. ретинопатия
Реактивный артрит, ранее известный как Синдром Рейтера,
Ретинопатия
Ревматоидный артрит (RA)
Саркоидоз
Склерозирующий холангит см. первичный склерозирующий холангит
Синдром Шегрена
Системный некротизирующий васкулит
Синдром мышечной скованности или синдром Мерша-Вольтмена
Системной красной волчанки
Системный склероз (склеродермия)
Темпоральный артериит или гигантоклеточный артериит (GCV)
Артериит Такаясу
Облитерирующий тромбангиит или болезнь Бюргера
Тиреоидит с гипотиреозом
Тиреоидит с гипотиреозом
Аутоиммунный полигландулярный синдром 1-го типа (АПГС)
Аутоиммунный полигландулярный синдром 2-го типа
Васкулит
Синдром Вегенера

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации человек страдает от увеита. Например, увеит является неинфекционным и/или аутоиммунным по природе, т.е. представляет собой неинфекционный увеит или аутоиммунный увеит. Например, неинфекционный/аутоиммунный увеит вызван и/или ассоциирован с болезнью Бехчета, гетерохромным иридоциклитом Фукса, гранулематозом с полиангиитом, HLA-B27-ассоциированным увеитом, ювенильным идиопатическим артритом, саркоидозом, спондилоартритом, симпатической офтальмией, синдромом тубулоинтерстициального нефрита и увеита. В одном примере увеит является системным по природе, т.е. представляет собой системный увеит. Например, системный увеит вызван и/или ассоциирован с анкилозирующим спондилитом, болезнью Бехчета, хронической гранулематозной болезнью, энтезитом, воспалительным заболеванием кишечника, ювенильным ревматоидным артритом, болезнью Кавасаки, множественным склерозом, узелковым полиартериитом, псориатическим артритом, реактивным артритом, саркоидозом, системной красной волчанкой, синдромом Фогта-Коянаги-

Харада или болезнью Уиппла.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации человек страдает от гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера или неинфекционного склерита. В одном примере человек страдает от гангренозной приодермии. В одном примере человек страдает от гигантоклеточного артериита. В одном примере человек страдает от синдрома Шницлера. В одном примере человек страдает от неинфекционного склерита.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации человек страдает от hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоиммунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза, в частности, БТПХ. В другом варианте реализации изобретения человек страдает от отторжения трансплантированного органа при мультивисцеральной трансплантации или подвержен рисуку его развития.

13. Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с hOX40L и конкурирует за связывание с указанным hOX40L с антителом, выбранным из группы, состоящей из 02D10, 10A07, 09H04 и 19H01.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изучение конкурентного поведения осуществляют методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), причем такие методы известны специалистам в данной области. Для проведения ППР можно использовать BiacoreTM, ProteonTM или другой стандартный метод SPR. Такое конкурентное связывание может быть обусловлено тем, что, например, антитела/фрагменты связываются с идентичными или перекрывающимися эпитопами hOX40L. В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изучение конкурентного поведения осуществляют методом ИФА, причем такие методы известны специалистам в данной области. В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изучение конкурентного поведения осуществляют методом гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF), причем такие методы известны специалистам в данной области. В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изучение конкурентного поведения осуществляют методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), причем такие методы известны специалистам в данной области. В одном аспекте способы HTRF, ИФА и/или FACS осуществляют, как описано ниже в разделе «Примеры».

14. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 13, причем антитело или фрагмент соответствует любому из аспектов 1-12.

15. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее вариабельные домены легкой лямбда-цепи (которая опционально является человеческой).

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изобретения вариабельные домены антитела или фрагмента являются человеческими или гуманизированными. Кроме того, опционально антитело или фрагмент дополнительно содержит человеческие или гуманизированные константные области (например, Fc человека и/или CL человека). В одном примере любого аспекта настоящего

изобретения вариабельные домены антитела или фрагмента получают с использованием трансгенных животных (например, грызуна, мыши, крысы, кроликы, курицы, овцы, верблюдовых или акулы). В одном примере любого аспекта настоящего изобретения вариабельные домены антитела или фрагмента получают или идентифицируют с помощью фагового дисплея, рибосомного дисплея или дрожжевого дисплея.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изобретения антитело или фрагмент является рекомбинантным.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изобретения антитело или фрагмент получают в рекомбинантных клетках млекопитающих, бактерий, насекомых, растений или дрожжей. В одном примере клетки млекопитающих представляют собой клетки CHO или HEK293, а антитело или фрагмент подвергается гликозилированию в клетках CHO или HEK293.

В одном примере любого аспекта, конфигурации, концепции или варианта реализации изобретения антитело или фрагмент выделяют.

16. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VH-домен, который содержит последовательность HCDR1, выбранную из группы, состоящей из HCDR1:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01за связывание с указанным hOX40L.

17. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VH-домен, который содержит последовательность HCDR2, выбранную из группы, состоящей из HCDR2:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01 за связывание с указанным hOX40L.

18. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VH-домен, который содержит последовательность HCDR3, выбранную из группы, состоящей из HCDR3:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01 за связывание с указанным hOX40L.

19. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом,

содержащее VH-домен, который содержит (i) CDR1 и 2, (ii) CDR1 и 3, (iii) CDR2 и 3 или (iv) CDR1, 2 и 3 последовательности:

a. приведенные в (a) в соответствии с аспектами 16-18, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. приведенные в (b) в соответствии с аспектами 16-18, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. приведенные в (c) в соответствии с аспектами 16-18, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; или

d. приведенные в (d) в соответствии с аспектами 16-18, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01 за связывание с указанным hOX40L.

20. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, аминокислотных последовательностей VH-домена, изложенных в перечне последовательностей.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлено антитело к hOX40L или фрагмент (опционально в соответствии с любым другим аспектом, перечисленным в данном документе), содержащее VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей VH-домена, изложенных в перечне последовательностей. В одном аспекте VH-домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из Seq ID No: 2, Seq ID No: 34, Seq ID No: 66, Seq ID No: 94, Seq ID No: 122, Seq ID No: 124, Seq ID NO: 126, Seq ID No: 128, Seq ID No: 132 или Seq ID No: 134.

В другом примере по настоящему изобретению антитело или фрагмент содержат аминокислотную последовательность VH-домена, изложенную ниже в перечне последовательностей. В качестве дополнения или альтернативы антитело или фрагмент содержит аминокислотную последовательность домена HCDR1, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID No: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42). В качестве дополнения или альтернативы антитело или фрагмент содержит аминокислотную последовательность домена HCDR2, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 6, Seq ID No: 12, Seq ID No: 38, Seq ID No: 44, Seq ID No: 70, Seq ID No: 76, Seq ID No: 98 или Seq ID No: 104, в частности, Seq ID No: 38 или Seq ID No: 44). В качестве дополнения или альтернативы антитело или фрагмент содержат аминокислотную последовательность домена HCDR3, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 8, Seq ID No: 14, Seq ID No: 40, Seq ID No: 46, Seq ID No: 72, Seq ID No: 78, Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106, в частности, Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46).

В одном примере настоящего изобретения антитело или фрагмент содержат аминокислотную последовательность VL-домена, изложенную ниже в перечне последовательностей. В качестве дополнения или альтернативы антитело, или фрагмент содержат аминокислотную последовательность домена LCDR1, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56). В качестве дополнения или альтернативы антитело или фрагмент содержит аминокислотную последовательность домена LCDR2, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 20, Seq ID No: 26, Seq ID No: 52, Seq ID No: 58, Seq ID No: 84, Seq ID No: 90, Seq ID No: 112 или Seq ID No: 118, в частности, Seq ID No: 52 или Seq ID No: 58). В качестве дополнения или альтернативы антитело

или фрагмент содержит аминокислотную последовательность домена LCDR3, изложенную ниже в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 22, Seq ID No: 28, Seq ID No: 54, Seq ID No: 60, Seq ID No: 86, Seq ID No: 92, Seq ID No: 114 или Seq ID No: 120, в частности, Seq ID No: 54 или Seq ID No: 60).

В одном примере любого аспекта данного документа антитело или фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую константную область, выбранную из группы, состоящей из константной области тяжелой цепи Seq ID No в перечне последовательностей (т.е. любой Seq ID No: 126, 128, 132 или 134, в частности, константная область of Seq ID No: 128); и опционально VH-домена, перечисленного в аспекте 19 или 20. В одном примере антитело или фрагмент содержат две копии такой тяжелой цепи. В другом примере тяжелая цепь содержит константную область антитела грызуна, крысы, мыши, человека, кролика, курицы, верблюдовых, овцы, крупного рогатого скота, низшего примата или акулы (например, Fc), в частности, константная область антитела мыши.

В одном примере любого аспекта данного документа антитело или фрагмент содержат тяжелую цепь, включающую константную область гамма-цепи (например, гамма-цепи иммуноглобулина человека), например, константную область гамма-1-цепи иммуноглобулина человека. В другом примере любого аспекта в данном документе антитело или фрагмент содержат константную область гамма-4-цепи иммуноглобулина человека. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи не связывается с Fc-γ-рецепторами, и, например, включает мутацию Leu235Glu (т.е. мутации с заменой остатка лейцина в последовательности дикого типа на остаток глутаминовой кислоты). В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи включает мутацию Ser228Pro для повышения стабильности. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4, включающий как мутацию Leu235Glu, так и мутацию Ser228Pro. Эта константная область тяжелой цепи в данном документе обозначена «IgG4-PE».

В одном примере любого аспекта данного документа антитело или фрагмент является химерным, например, оно содержит вариабельные домены человеческого иммуноглобулина и константные области иммуноглобулина, отличного от человеческого (например, грызуна, мыши или крысы, как, например, мыши).

21. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 16-20, содержащее первую и вторую копии указанного VH-домена.

22. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VL-домен, который содержит последовательность LCDR1, выбранную из группы, состоящей из LCDR:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01за связывание с указанным hOX40L.

23. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VL-домен, который содержит последовательность LCDR2, выбранную из группы, состоящей из LCDR2:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с

указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01 за связывание с указанным hOX40L.

24. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VL-домен, который содержит последовательность LCDR3, выбранную из группы, состоящей из LCDR3:

a. 02D10, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. 10A07, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. 09H04, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; и

d. 19H01, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01за связывание с указанным hOX40L.

25. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VL-домен, который содержит последовательности (i) CDR1 и 2, (ii) CDR1 и 3, (iii) CDR2 и 3 или (iv) CDR1, 2 и 3:

a. приведенные в (a) в соответствии с аспектами 22-24, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 за связывание с указанным hOX40L;

b. приведенные в (b) в соответствии с аспектами 22-24, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 10A07 за связывание с указанным hOX40L;

c. приведенные в (c) в соответствии с аспектами 22-24, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 09H04 за связывание с указанным hOX40L; или

d. приведенные в (d) в соответствии с аспектами 22-24, и причем антитело или фрагмент конкурируют с 19H01 за связывание с указанным hOX40L.

26. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, содержащее VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности VL в перечне последовательностей.

В одном аспекте настоящего изобретения представлено антитело к hOX40L или фрагмент (опционально в соответствии с любым другим аспектом данного документа), содержащее VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности VL в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 16, Seq ID No: 48, Seq ID No: 80 или Seq ID No: 108, в частности, Seq ID No: 48).

В одном примере любого аспекта данного документа антитело или фрагмент содержат легкую цепь (например, легкую цепь лямбда), содержащую константную область, выбранную из группы, состоящей из последовательностей константной области легкой цепи в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 136, Seq ID No: 138, Seq ID No: 140, Seq ID No: 142, Seq ID No: 144, Seq ID No: 146, Seq ID No: 148, Seq ID No: 152, Seq ID No: 154, Seq ID No: 156, Seq ID No: 158, Seq ID No: 160, Seq ID No: 162, Seq ID No: 164 или Seq ID No: 166); и опционально VL-домен (например, VL-домен цепи лямбда), который приведен в аспекте 25 или 26. В одном примере антитело или фрагмент содержат две копии такой легкой цепи (опционально также две копии тяжелой цепи, описанной

выше). В другом примере легкая цепь содержит константную область антитела грызуна, крысы, мыши, человека, кролика, курицы, верблюдовых, овцы, крупного рогатого скота, низшего примата или акулы.

В одном примере любого аспекта данного документа антитело или фрагмент содержат легкую цепь (например, легкую цепь каппа), содержащую константную область, выбранную из группы, состоящей из последовательностей константной области легкой цепи в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 136, Seq ID No: 138, Seq ID No: 140, Seq ID No: 142, Seq ID No: 144, Seq ID No: 146, Seq ID No: 148, Seq ID No: 152, Seq ID No: 154, Seq ID No: 156, Seq ID No: 158, Seq ID No: 160, Seq ID No: 162, Seq ID No: 164 или Seq ID No: 166); и опционально VL-домен (например, VL-домен каппа-цепи), который приведен в аспекте 25 или 26. В одном примере антитело или фрагмент содержат две копии такой легкой цепи (опционально также две копии тяжелой цепи, описанной выше). В другом примере легкая цепь содержит константную область антитела грызуна, крысы, мыши, человека, кролика, курицы, верблюдовых, овцы, крупного рогатого скота, низшего примата или акулы.

В одном примере антитело или фрагмент содержат легкую цепь лямбда, содержащую константную область, выбранную из группы, состоящей из последовательностей константной области легкой цепи в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 146, Seq ID No: 148, Seq ID No: 152, Seq ID No: 154, Seq ID No: 156, Seq ID No: 158, Seq ID No: 160, Seq ID No: 162, Seq ID No: 164 или Seq ID No: 166); и опционально VL-домен цепи лямбд.

В одном примере антитело или фрагмент содержат легкую каппа-цепь, содержащую константную область, выбранную из группы, состоящей из последовательностей константной области легкой цепи в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 136, Seq ID No: 138, Seq ID No: 140, Seq ID No: 142 или Seq ID No: 144); и опционально VL-домен каппа-цепи.

В одном примере VL-домены антитела или фрагмента are вариабельные домены легкой лямбда-цепи. В одном примере VL-домены антитела или фрагмента представляю собой вариабельные домены легкой каппа-цепи.

27. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 22-26, содержащее первую и вторую копии указанного VL-домена.

28. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем hOX40L представляет сообой экспресированный на клеточной поверхности hOX40L человека, например, на эндотелиальных клетках (например, эндотелиальных клетках дыхательных путей или ЖКТ).

В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника, клеток тканей глаза и эпителиальных клеток дыхательных путей (например, легкого). В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника и клеток тканей глаза. В дополнительном варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки тканей глаза.

29. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствует уменьшению пролиферации МКПК или Т-клеток человека в присутствии hOX40L в анализе in vitro реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с пролиферацией МКПК или Т-клеток человека в присутствии hOX40L в контрольном

СКЛ-анализе in vitro в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L. Иллюстрация подходящего анализа представлена ниже в примерах.

30. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 29, причем hOX40L в указанном анализе экспрессирован на поверхности дендритных клеток человека (ДК-клеток). Иллюстрация подходящего анализа представлена ниже в примерах.

31. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют умеьшению активности NF-κB в клетках HT-1080 человека, экспрессирующих рецептор hOX40 in vitro в присутствии hOX40L.

В одном примере уменьшение активности NF-κB в результате использования антитела или фрагмента определяют по уменьшению секреции IL-8 клетками HT-1080 (ATCC® CCL-121) (опционально трансфецированных рецептором hOX40 в присутствии hOX40) in vitro.

32. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствует уменьшению секреции IL-8 клетками HT-1080 человека, экспрессирующими рецептор hOX40 in vitro в присутствии hOX40L.

33. Антитело или фрагмент в соответствии с аспектом 32, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции IL-8 по меньшей мере на 20, 30,40, 50 или 60% по сравнению с продукцией IL-8 клетками HT-1080, экспрессирующими рецептор hOX40 in vitro в присутствии hOX40L в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

34. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению hOX40L-стимулированной пролиферации Т-клеток человека in vitro.

35. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению hOX40L-стимулированной секреции IL-2 Т-клетками человека in vitro.

36. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции цитокинов, которая опосредована взаимодействием дендритных клеток (ДК-клеток) с Т-клетками человека, причем цитокин выбирают из одного, двух, более или всех цитокинов из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма.

Это можно оценить, например, с использованием анализа СКЛ in vitro (например, анализа СКЛ in vitro на ДК/Т-клетках). Иллюстрация подходящего анализа представлена ниже в примерах.

В одном примере ДК-клетки различаются по антигенам с Т-клетками, например, по антигенам ГКГС, что возможно, например, если ДК-клетки получены у человека, который отличается от источника Т-клеток человека. В одном примере ДК-клетки получают путем стимуляции in vitro моноцитов человека ГМКСФ и IL-4.

37. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции интерферона гамма по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией интерферона гамма, которая опосредована взаимодействием дендритных клеток (ДК-клеток) с Т-клетками человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

38. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции ФНО-альфа по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией ФНО-альфа, которая опосредована взаимодействием дендритных клеток (ДК-клеток) с Т-клетками человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

39. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции IL-2 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией IL-2, которая опосредована взаимодействием дендритных клеток человека (ДК-клеток) с Т-клетками человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

40. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции цитокинов (например, секреции цитокинов лейкоцитами) у человека в анализе смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) на мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), причем цитокин выбирают из одного, двух, более или всех цитокинов из ФНО-альфа, IL-2, IL-4, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, RANTES и интерферона гамма.

41. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствуют уменьшению секреции интерферона гамма по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией интерферона гамма по результатам анализа СКЛ на МКПК человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

В одном варианте реализации изобретения сравнивается продукция интерферона гамма по результатам анализа СКЛ на МКПК человека в отсутствие антитела.

42. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствует уменьшению секреции ФНО-альфа по меньшей мере на 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией ФНО-альфа по результатам анализа СКЛ на МКПК человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

43. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент способствует уменьшению секреции IL-2 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50 или 60% по сравнению с продукцией IL-2 по результатам анализа СКЛ на МКПК человека в отсутствие антитела, специфичного по отношению к hOX40L.

44. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 36-43, причем клетки представляют собой клетки первичной культуры.

Термин «клетки первичной культуры» обозначает клетки человека или такие клетки, которые получают у пациентов для связывания с антителом или фрагментом по настоящему изобретению in vitro (что может найти применение, например, в способе диагностики статуса OX40L или статуса заболевания/состояния у человека). В данном контексте, клетки первичной культуры отличаются от линий клеток человека, которые обычно подвергаются длительному культивированию in vitro. Способность антитела или фрагмента по настоящему изобретению специфически ингибировать связывание hOX40L с рецептором является преимуществом, поскольку это прямое свидетельство их пригодности к использованию для лечения пациентов-людей, страдающих от hOX40L-опосредованного заболевания или состояния или подверженных риску его развития.

45. Антитело или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем антитело или фрагмент ингибирует связывание hOX40L с рецептором hOX40L (например, hOX40) с IC_{50} 1×10^{-8} или меньше в анализе методом HTRF (гомогенной флуоресценции с временным разрешением).

В одном примере IC_{50} находится в диапазоне от 1×10^{-8} до 1×10^{-11} или в диапазоне от 1×10^{-9} до 1×10^{-10}.

46. Фармацевтическая композиция для лечения и/или предотвращения OX40L-опосредованного состояния или заболевания, причем композиция содержит антитело

или фрагмент в соответствии с любым предшествующим аспектом и разбавитель, вспомогательное вещество или носитель; и опционально дополнительно содержит противовоспалительное средство.

В одном примере противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона), антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба) или антител к TNFa/молекулам TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба, цертолизумаба пегола). В одном примере противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона) и антител к LFA1.

47. Фармацевтическая композиция или набор для лечения и/или предотвращения OX40L-опосредованного состояния или заболевания, причем композиция или набор содержат антитело или фрагмент по настоящему изобретению (и опционально противовоспалительное средство) опционально в сочетании с этикеткой или инструкциями по применению для лечения и/или предотвращения указанного заболевания или состояния у человека; причем листок-вкладыш или инструкции содержат номер регистрационного удостоверения (например, регистрационный номер, присвоенный FDA или EMA); причем опционально набор содержит устройство для внутривенного введения или инъекций, которое содержит антитело или фрагмент.

48. Нуклеиновая кислота, которая кодирует HCDR3 антитела, приведенные в любом из аспектов 1-45.

В одном варианте реализации изобретения нумерация HCDR в данном документе осуществляется по номенклатуре Kabat. В другом варианте реализации изобретения нумерация HCDR в данном документе осуществляется по номенклатуре IMGT.

49. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 48, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична последовательности HCDR3 в перечне последовательностей,

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует VH-домен антитела к hOX40L, причем нуклеотидная последовательность содержит последовательность HCDR3, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична последовательности HCDR3 в перечне последовательностей. Опционально антитело соответствует любому другому аспекту в данном документе.

В другом варианте реализации изобретения представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 48, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR3 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, причем каждая замена не приводит к аминокислотным заменам или приводит к консервативным аминокислотным заменам (т.е. нуклеотидная замена представляет собой синонимичную замену) в соответствующей белковой последовательности. Специалисту в данной области известны консервативные аминокислотные замены.

Аминокислотные замены включают изменения, при которых одна аминокислота замещается другим аминокислотным остатком природного происхождения. Такие замены можно отнеси к «консервативным», в случае чего аминокислотный остаток,

содержащийся в полипептиде, замещается другой аминокислотой природного происхождения со сходными свойствами, либо в отношении полярности, функциональных групп боковых цепей, либо размера. Такие консервативные замены хорошо известны в данной области. Замены, охваченные настоящим изобретением, также могут быть «неконсервативными», при этом аминокислотный остаток, который содержится в пептиде, заменен на аминокислоту, обладающую другими свойствами, как, например, на аминокислоту природного происхождения из другой группы (например, замена заряженной или гидрофобной аминокислоты на аланин), или в альтеративном варианте при этом аминокислоту природного происхождения заменяют на нестандартную аминокислоту.

В качестве дополнения или альтернативы представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 49, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR3 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 синонимичных нуклеотидных замен и 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам в соответствующей белковой последовательности.

50. Нуклеиновая кислота, которая кодирует HCDR2 антитела, приведенного в любом из аспектов 1-45; причем опционально нуклеиновая кислота соответствует аспекту 48 или 49.

51. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 50, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична последовательности HCDR2 в перечне последовательностей.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует VH-домен антитела к hOX40L, причем нуклеотидная последовательность содержит последовательность HCDR2, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична последовательности HCDR2 в перечне последовательностей. Опционально антитело соответствует любому другому аспекту в данном документе.

В другом варианте реализации изобретения представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 51, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR2 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, причем каждая замена не приводит к аминокислотным заменам или приводит к консервативным аминокислотным заменам (т.е. нуклеотидная замена представляет собой синонимичную замену) в соответствующей белковой последовательности. Специалисту в данной области известны консервативные аминокислотные замены.

В качестве дополнения или альтернативы представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 50, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR2 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 синонимичных нуклеотидных замен и 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам в соответствующей белковой последовательности.

52. Нуклеиновая кислота, которая кодирует HCDR1 антитела, приведенного в любом из аспектов 1-45; причем опционально нуклеиновая кислота соответствует любому из аспектов 48-51.

53. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 52, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%

идентична, или 100% идентична последовательности HCDR1 в перечне последовательностей.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует VH-домен антитела к hOX40L, причем нуклеотидная последовательность содержит последовательность HCDR1, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична последовательности HCDR1 в перечне последовательностей. Опционально антитело соответствует любому другому аспекту в данном документе.

В другом варианте реализации изобретения представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 52, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR1 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, причем каждая замена не приводит к аминокислотным заменам или приводит к консервативным аминокислотным заменам (т.е. нуклеотидная замена представляет собой синонимичную замену) в соответствующей белковой последовательности. Специалисту в данной области известны консервативные аминокислотные замены.

В качестве дополнения или альтернативы представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 52, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична последовательности HCDR1 в перечне последовательностей, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 синонимичных нуклеотидных замен и 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам в соответствующей белковой последовательности.

54. Нуклеиновая кислота, которая кодирует VH-домен и/или VL-домен антитела, приведенного в любом из аспектов 1-45.

55. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или 100% идентична нуклеотидной последовательности VH-домена в перечне последовательностей.

В другом варианте реализации изобретения представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична нуклеотидной последовательности VH-домена в перечне последовательностей за исключением 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, причем каждая замена не приводит к аминокислотным заменам или приводит к консервативным аминокислотным заменам (т.е. нуклеотидная замена представляет собой синонимичную замену) в соответствующей белковой последовательности. Специалисту в данной области известны консервативные аминокислотные замены.

В качестве дополнения или альтернативы представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична нуклеотидной последовательности VH-домена в перечне последовательностей за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 синонимичных нуклеотидных замен и 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам в соответствующей белковой последовательности.

56. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54 или 55, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, или на 100% идентична нуклеотидной последовательности VL-домена в перечне последовательностей.

В другом варианте реализации изобретения представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54 или 55, содержащая нуклеотидную последовательность,

которая на 100% идентична идентична нуклеотидной последовательности VL-домена в перечне последовательностей за исключением 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, причем каждая замена не приводит к аминокислотным заменам или приводит к консервативным аминокислотным заменам (т.е. нуклеотидная замена представляет собой синонимичную замену) в соответствующей белковой последовательности. Специалисту в данной области известны консервативные аминокислотные замены.

В качестве дополнения или альтернативы представлена нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 54 или 55, содержащая нуклеотидную последовательность, которая на 100% идентична идентична нуклеотидной последовательности VL-домена в перечне последовательностей за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 синонимичных нуклеотидных замен и 0, 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, которые приводят к консервативным аминокислотным заменам в соответствующей белковой последовательности.

57. Нуклеиновая кислота, которая кодирует тяжелую цепь или легкую цепь антитела, приведенного в любом из аспектов 1-45.

58. Нуклеиновая кислота в соответствии с аспектом 57, содержащая нуклеотидную последовательность, которая приведена в любом из аспектов 48-56.

59. Вектор (например, вектор для экспрессии в клетках млекопитающих), содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из аспектов 48-58; причем опционально вектор представляет собой вектор для экспрессии в клетках CHO или HEK293. В одном примере вектор представляет собой вектор для экспрессии в клетках дрожжей, например, вектор для экспрессии в клетках Saccharomyces или Pichia.

60. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из аспектов 48-58 или вектор в соответствии с аспектом 59. В одном примере клетка-хозяин представляет собой линию клеток млекопитающих (например, человека, например, CHO или HEK293) или линию клеток дрожжей или линию клеток бактерий.

61. Применение антитела или его фрагмента, который специфически связывается с hOX40L, в производстве лекарственного средства с целью введения человеку для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека путем подавления одного, нескольких или всех процессов из:

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L.

Признаки любого из предшествующих аспектов, конфигураций, концепций, примеров или вариантов реализации изобретения могут опционально использоваться с необходимыми изменениями.

В одном примере у человека наблюдается астма или он подвержен риску ее развития, и антитело или фрагмент предназначены для уменьшения содержания IgE у человека, что обеспечивает лечение, предотвращение или облегчение симпомов астмы у человека.

62. Способ лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека путем подавления одного, нескольких или всех процессов из:

a. секреции цитокина, выбранного из ФНО-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES и интерферона гамма у человека;

b. пролиферации лейкоцитов человека; и

c. связывания рецептора hOX40, экспрессируемого Т-клетками человека, с эндотелиальными клетками, экспрессирующими hOX40L;

причем способ включает введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента, которые специфически связывается с hOX40L.

Признаки любого из предшествующих аспектов, примеров или вариантов реализации изобретения могут опционально использоваться с необходимыми изменениями в этом способе.

Способ по настоящему изобретению обеспечивает лечение или предотвращение указанного заболевания или состояния у человека. «Терапевтически эффективное количество» антитела или фрагмента - это количество (введение может осуществляться однократно или многократно с разделением во времени, например, по существу, раз в месяц), которое является эффективным для проведения указанного лечения или предотвращения. Оно вполне очевидно специалисту в данной области и может изменяться в зависимости от конкретного пациента-человека и заболевания или состояния, по поводу которого проводят лечение.

В одном примере у человека наблюдается астма или он подвержен риску ее развития, и антитело или фрагмент способствуют уменьшению содержания IgE у человека, что обеспечивает лечение, предотвращение или облегчение симпомов астмы у человека.

63. Способ или применение в соответствии с аспектами 61 или 62 для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток у указанного человека путем уменьшения пролиферации Т-клеток у указанного человека.

64. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-63 для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток у указанного человека путем подавления взаимодействия между hOX40L и лейкоцитами человека, при этом наблюдается уменьшение пролиферации лейкоцитов.

65. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-64 для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток у указанного человека путем уменьшения пролиферации лейкоцитов человека посредством подавления у указанного человека взаимодействия OX40L и рецептора OX40L, опосредованного Т-клетками.

66. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-65 для лечения или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток у указанного человека путем уменьшения секреции IL-8 цитокин у человека,

67. Способ в соответствии с аспектом 66 для лечения или предотвращения указанного заболевания, состояния или повреждения эпителиальных клеток путем уменьшения секреции указанного IL-8, опосредованного взаимодействием дендритных клеток (ДК-клеток) с Т-клетками у человека.

68. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-67, причем повреждение клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника или клеток дыхательных путей (например, легкого) является симптомом или причиной указанного заболевания или состояния у людей.

В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого кишечника, клеток тканей глаза и эпителиальных клеток дыхательных путей (например, легкого). В другом варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток желудочно-кишечного тракта, клеток толстого кишечника, клеток тонкого

кишечника и клеток тканей глаза. В дополнительном варианте реализации изобретения эпителиальные клетки включают клетки тканей глаза.

69. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-68, причем у человека наблюдается или он подвержен риску развития воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), сахарного диабета или воспаления дыхательных путей, и указанный способ обеспечивает лечение или предотвращение ВЗК, отторжения аллогенного трансплантата, БТПХ, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей.

69a. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-68, причем у человека наблюдается или он подвержен риску развития воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), увеита, гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей, и указанный способ обеспечивает лечение или предотвращение ВЗК, отторжения аллогенного трансплантата, БТПХ, увеита, гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита, сахарного диабета или воспаления дыхательных путей.

В любом аспекте, конфигурации, концепции или варианте реализации изобретения у человека наблюдается или он подвержен риску развития hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоиммунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза, в частности, БТПХ.

70. Способ или применение в соответствии с любым из аспектов 61-69a, причем антитело или фрагмент соответствует любому из аспектов 1-45 или любому примеру, конфигурации, концепции, аспекту или варианту реализации, описанных в данном документе.

71. Антитело, фрагмент, композиция, набор, способ или применение в соответствии с любым предшествующим пунктом для лечения или предотвращения воспалительного или аутоиммунного заболевания или состояния у человека, или для уменьшения, или предотвращения ангиогенеза у человека.

72. Антитело, фрагмент, композиция, набор, способ или применение в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), Болезни Крона, ревматоидного артрита, псориаза, бронхиолита, гингивита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), астмы, респираторного дистресс-синдрома взрослых (РДСВ), септического шока, язвенного колита, синдрома Шегрена, воспаления дыхательных путей, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза.

72a. Антитело, фрагмент, композиция, набор, способ или применение в соответствии с любым предшествующим аспектом, причем заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), Болезни Крона,

ревматоидного артрита, псориаза, бронхиолита, гингивита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), астмы, респираторного дистресс-синдрома взрослых (РДСВ), септического шока, язвенного колита, синдрома Шегрена, воспаления дыхательных путей, системной красной волчанки (СКВ), увеита, гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита, сахарного диабета, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза.

В любом аспекте, конфигурации, концепции или варианте реализации изобретения у человека наблюдается или он подвержен риску развития hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза, в частности, БТПХ.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой OX40L-опосредованное заболевание или состояние, раскрытое в US 7812133 или EP 1791869.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой воспалительное или аутоимунное заболевание или состояние. В одном примере заболевание или состояние представляет собой отторжение трансплантата.

В данном контексте воспалительное заболевание или состояние обозначают патологические состояния, приводящие к воспалению, например, вызванному химиотаксисом нейтрофилов. Примеры таких нарушений включают воспалительные заболевания кожи, включая псориаз; реакции, ассоциированные с воспалительным заболеванием кишечника (такие как болезнь Крона и язвенный колит); ишемию-реперфузию; респираторный дистресс-синдром взрослых; дерматит; менингит; энцефалит; увеит; аутоимунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, синдром Шегрена, васкулит; заболевания, характеризующиеся диапедезом лейкоцитов; воспалительное нарушение центральной нервной системы (ЦНС), синдром полиорганной недостаточности на фоне сепсиса или травмы; алкогольный гепатит, бактериальную пневмонию, заболевания, опосредованные комплексами антиген-антитело; воспаления легкого, включая плеврит, альвеолит, васкулит, пневмонию, хронический бронхит, бронхоэктаз и муковисцидоз; и т.д. Предпочтительными показаниями к применению является наличие бактериальной пневмонии и воспалительного заболевания кишечника, как, например, язвенного колита. Таким образом, в одном примере описано применение настоящего изобретения для лечения или предотвращения любого одного или более из таких состояний.

В одном примере заболевание или состояние представляет собой рак.

В одном примере заболевание представляет собой увеит, как, например, системный увеит или аутоиммунный/неинфекционный увеит.

73. Антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с hOX40L и конкурируют за связывание с указанным hOX40L с антителом 02D10, причем антитело или фрагмент содержат VH-домен, который содержит HCDR3, содержащий мотив VRGXYYY, где X представляет собой любую аминокислоту.

Признаки антител, предсталенные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе,

опционально применимы с необходимыми изменениями к этим антителам, например, антитело может представлять собой антитело человека или химерное антитело, обладающее функциональными признаками, которые описаны в данном документе. Конкурентное связывание можно определить, как описано в любом аспекте, варианте реализации изобретения, примере, концепции или конфигурации, описанных в данном документе, например, как установлено методом ППР, ИФА, HTRF или FACS.

В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с вариабельным участком 02D10 (т.е. конкурируют с антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID No: 34 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID No: 48). В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 IgG4-PE, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID No: 62 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID No: 64.

В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент в качестве дополнения или альтернативы конкурируют с 10A7. В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с вариабельными областями 10A7 (например, конкурирует с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID No: 2 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID No: 16). В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 IgG4-PE, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID No: 30 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID No: 32.

В одном варианте реализации изобретения аминокислота представляет собой любую аминокислоту природного происхождения.

74. Антитело или фрагмент по аспекту 73, где X представляет собой нейтральную аминокислоту, опционально P или G.

В одном варианте реализации изобретения X представляет собой P или G. В одном варианте реализации изобретения X выбирают из P, N, A или G. В другом варианте реализации изобретения X выбирают из P, G или N. В другом варианте реализации изобретения X выбирают из P, G или A.

75. Антитело или его фрагмент, опционально по аспекту 73 или 74, которые специфически связываются с hOX40L и конкурируют за связывание с указанным hOX40L с антителом 02D10, причем антитело или фрагмент содержат VH-домен, который содержит последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40 или 46, или последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40, или 46, содержащую менее 5 аминокислотных замен.

Признаки антител, предсталенные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе, опционально применимы с необходимыми изменениями к этим антителам, например, антитело может представлять собой антитело человека или химерное антитело, обладающее функциональными признаками, которые описаны в данном документе. Конкурентное связывание можно определить, как описано в любом аспекте, варианте реализации, концепции, примере или конфигурации, описанных в данном документе, например, как установлено методом ППР, ИФА, HTRF или FACS.

В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40 или 46 содержит менее 4 аминокислотных замен (т.е. 3 или меньше). В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40 или 46 содержит менее 3 аминокислотных замен (т.е. 2 или 1 замену). В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 40 или 46 содержит менее 2 аминокислотных замен (т.е. одну замену).

В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с вариабельным участком 02D10 (т.е. конкурируют с антителом, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID No: 34 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID No: 48). В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 IgG4-PE, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID No: 62 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID No: 64.

В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент в качестве дополнения или альтернативы конкурируют с 10A7. В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с вариабельными областями 10A7 (например, конкурирует с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи of SEQ ID No: 2 и вариабельную область легкой цепи SEQ ID No: 16). В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент конкурируют с 02D10 IgG4-PE, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID No: 30 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID No: 32.

76. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-75, причем VH-домен содержит HCDR, состоящий из 16-27 аминокислот и полученный при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02).

В одном варианте реализации изобретения сегмент гена JH человека выбирают из IGHJ6*01, IGHJ6*02, IGHJ6*03 и IGHJ6*04. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JH человека выбирают из IGHJ6*01, IGHJ6*02 и IGHJ6*04. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JH представляет собой IGHJ6*02.

В дополнительном варианте реализации изобретения сегмент гена VH представляет собой IGHV3-23, например, выбранный из IGHV3-23*01, IGHV3-23*02, IGHV3-23*03, IGHV3-23*04 или IGHV3-23*05. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена VH представляет собой IGHV3-23*01 или IGHV3-23*04, в частности, IGHV3-23*04.

В дополнительном варианте реализации изобретения сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10, например, выбранный из IGHD3-10*01 или IGHD3-10*02. В одном варианте реализации изобретения сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10*01. В одном варианте реализации изобретения сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10*02.

77. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-76, причем VH-домен содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 36 или 42, или последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 36 или 42, содержащую менее 4 аминокислотных замен.

В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 36 или 42 содержит менее 3 аминокислотных замен (т.е. 2 или 1 замену). В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 36 или 42 содержит менее 2 аминокислотных замен (т.е. одну замену).

78. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-77, причем VH-домен содержит последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 38 или 44, или последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 38 или 44, содержащую менее 5 аминокислотных замен.

В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 38 или 44 содержит менее 4 аминокислотных замен (т.е. 3 или меньше). В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 38 или 44 содержит

менее 3 аминокислотных замен (т.е. 2 или 1 замену). В одном варианте реализации изобретения последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 38 или 44 содержит менее 2 аминокислотных замен (т.е. одну замену).

79. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-78, причем VH-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере 85%) идентична SEQ ID NO: 34.

В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 34.

80. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-79, содержащее первую и вторую копии указанного VH-домена.

81. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-80, содержащее VL-домен, который содержит последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 54 или 60, или последовательность LCRD3 SEQ ID NO: 54, или 60, содержащую менее 5 аминокислотных замен.

В одном варианте реализации изобретения последовательность LCRD3 SEQ ID NO: 54 или 60 содержит менее 4 аминокислотных замен (т.е. 3 или меньше). В одном варианте реализации изобретения последовательность LCRD3 SEQ ID NO: 54 или 60 содержит менее 3 аминокислотных замен (т.е. 2 или 1 замену). В одном варианте реализации изобретения последовательность LCRD3 SEQ ID NO: 54 или 60 содержит менее 2 аминокислотных замен (т.е. одну замену).

82. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-81, содержащее а или указанный VL-домен, причем VL-домен содержит последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 52 или 58, или последовательность LCRD2 SEQ ID NO: 52 или 58, содержащую менее 2 аминокислотных замен.

83. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-82, содержащее а или указанный VL-домен, причем VL-домен содержит последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 54 или 60, или последовательность LCRD1 SEQ ID NO: 54 или 60, содержащую менее 4 аминокислотных замен.

В одном варианте реализации изобретения последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 54 или 60 содержит менее 3 аминокислотных замен (т.е. 2 или 1 замену). В одном варианте реализации изобретения последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 54 или 60 содержит менее 2 аминокислотных замен (т.е. одну замену).

84. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-83, содержащее а или указанный VL-домен, причем VL-домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No: 48 или аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере 85%) идентична SEQ ID NO: 48.

В одном варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 48.

85. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 81-84, содержащие первую и вторую копии указанного VL-домена.

86. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 81-85, причем антитело или фрагмент содержат легкую каппа-цепь.

В другом варианте реализации изобретения VL-домен представляет собой VL-домен каппа-цепи. В одном варианте реализации изобретения VL-домен каппа-цепи получен при помощи рекомбинации сегмента гена VL человека и сегмента гена JL человека, причем сегмент гена VL человека представляет собой IGKV1D-39. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена VL представляет собой IGKV1D-39*01.

В дополнительном варианте реализации изобретения сегмент гена JL человека представляет собой IGKJ1 или IGKJ3. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JL представляет собой IGKJ1*01. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JL представляет собой IGKJ3*01.

87. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 75-86, причем аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены, причем опционально консервативные замены относятся к одной из шести групп (при этом каждая группа содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга), выбранных из:

1) Аланина (A), Серина (S), Треонина (T);

2) Аспарагиновой кислоты (D), Глутаминовой кислоты (E);

3) Аспарагина (N), Глутамина (Q);

4) Аргинина (R), Лизина (K);

5) Изолейцина (I), Лейцина (L), Метионина (M), Валина (V); и

6) Фенилаланина (F), Тирозина (Y), Триптофана (W)

В одном варианте реализации изобретения консервативные аминокислотные замены соответствуют описанным в данном документе. Например, замена может представлять собой Y на F, T на S или K, P на A, E на D или Q, N на D или G, R на K, G на N или A, T на S или K, D на N или E, I на L или V, F на Y, S на T или A, R на K, G на N или A, K на R, A на S, K или P. В другом варианте реализации изобретения могут быть использованы консервативные аминокислотные замены, где Y заменяется на F, T на A или S, I на L или V, W на Y, M на L, N на D, G на A, T на A или S, D на N, I на L или V, F на Y или L, S на A или T и A на S, G, T или V.

88. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-87, причем антитело или фрагмент содержат константную область, например, константную область IgG4, причем опционально константная область представляет собой IgG4-PE (Seq ID No: 128).

В другом примере любого аспекта в данном документе антитело или фрагмент содержат константную область гамма-4-цепи иммуноглобулина человека. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи не связывается с Fc-γ-рецепторами, и, например, включает мутацию Leu235Glu (т.е. мутацию с заменой остатка лейцина на остаток глутаминовой кислоты). В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи включает мутацию Ser228Pro для повышения стабильности.

89. Антитело в соответствии с любым из аспектов 73-88, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из последовательности SEQ ID No: 62, а аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из последовательности SEQ ID No: 64.

90. Антитело или фрагмент, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102, для применения в лечении или предотвращении hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона,

ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ.

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, как описано в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями.

91. Применение антитела или фрагмента, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102, в производстве лекарственного средства с целью введения человеку для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата организмом хозяина; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ.

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, как описано в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями.

92. Способ лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ у человека, включающий введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102, что и обеспечивает лечение или предотвращение OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, как описано в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями в этом способе. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально

использоваться с необходимыми изменениями в этом способе.

93. Антитело или фрагмент по аспекту 90, применение по аспекту 91, или способ по аспекту 92, причем hOX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ.

В другом варианте реализации изобретения антитело или фрагмент способны обеспечивать лечение или предотвращение БТПХ.

94. Антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-93, причем антитело вводят в профилактических целях.

В одном варианте реализации изобретения профилактика предотвращает начало развития заболевания или состояния или симптомов заболевания или состояния. В одном варианте реализации изобретения профилактическое лечение предотвращает усугубление или начало развития заболевания или состояния. В одном варианте реализации изобретения профилактическое лечение предотвращает усугубление заболевания или состояния.

В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг). В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе, выбранной из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг, около 60 мг/кг, около 70 мг/кг, около 80 мг/кг около 90 мг/кг или около 100 мг/кг, в частности, около 1 мг/кг, или около 3 мг/кг.

В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят за 1-4 суток до трансплантации, например, за 1-3 суток до трансплантации или за 1-2 суток до трансплантации. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц после трансплантации, например, раз в две недели. В дополнительном варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно в профилактических целях за 1-3 суток до трансплантации в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг), а затем внутривенно, раз в две недели в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг).

В другом варианте реализации изобретения за состоянием пациента после трансплантации периодически наблюдают на предмет наличия прогностического биомаркера, характерного для развития БТПХ (например, острой БТПХ), а антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят тогда, когда уровни биомаркера являются таковыми, что согласно определению, пациент подвержен риску развития БТПХ (например, острой БТПХ). Применение данной стратегии позволит избежать излишнего введения лекарственного препарата и излишней супрессии иммунной системы. Примеры биомаркеров, которые можно использовать в качестве прогностических биомаркеров острой БТПХ, могут относиться к тем, что идентифицированы в Levine et al., "A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study". Lancet Haematol 2015; 2: e21-29. Эти биомаркеры включают, в том числе, TNFR1, ST-2, элафин и IL2Rα, а также Reg3α.

95. Антитело человека или его фрагмент, содержащий HCDR3, состоящие из 16-27 аминокислот и полученные при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02), который специфически связывается с hOX40L, для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например,

воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ (например, при этом антитело предназначено для предотвращения БТПХ).

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения могут опционально использоваться с необходимыми изменениями. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями.

96. Применение антитела человека или его фрагмента, содержащих HCDR3, который состоит из 16-27 аминокислот и получен при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02), который специфически связывается с hOX40L, в производстве лекарственного средства с целью введения человеку для лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ.

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения могут опционально использоваться с необходимыми изменениями. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями.

97. Способ лечения или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза или атеросклероза, в частности, БТПХ у человека, включающий введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела человека или его фрагмента, содержащих HCDR3, который состоит из 16-27 аминокислот и полученный при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, отличающийся тем, что сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02), который специфически связывается с hOX40L, что и обеспечивает лечение или предотвращение OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

Признаки антител и hOX40L-опосредованные заболевания, представленные в любых

аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения могут опционально использоваться с необходимыми изменениями в этом способе. Любые композиции, режимы дозирования или способы введения, которые описаны в любом аспекте, конфигурации, концепции, примере или варианте реализации изобретения в данном документе, могут опционально использоваться с необходимыми изменениями в этом способе.

В одном варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена JH человека выбирают из IGHJ6*01, IGHJ6*02, IGHJ6*03 и IGHJ6*04. В другом варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена JH человека выбирают из IGHJ6*01, IGHJ6*02 и IGHJ6*04. В другом варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена JH представляет собой IGHJ6*02.

В дополнительном варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена VH представляет собой IGHV3-23, например, выбранный из IGHV3-23*01, IGHV3-23*02, IGHV3-23*03, IGHV3-23*04 или IGHV3-23*05. В другом варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена VH представляет собой IGHV3-23*01 или IGHV3-23*04, в частности, IGHV3-23*04.

В дополнительном варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10, например, выбранный из IGHD3-10*01 или IGHD3-10*02. В одном варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10*01. В одном варианте реализации любого из аспектов 95-97 сегмент гена DH человека представляет собой IGHD3-10*02.

В одном варианте реализации любого из аспектов 90-97 антитело способно обеспечивать лечение или предотвращение БТПХ. В другом варианте реализации любого из аспектов 90-97 антитело или фрагмент используется для лечения или предотвращения заболевания, отличного от БТПХ, но антитело или фрагмент способны обеспечивать лечение или предотвращение БТПХ.

98. Антитело или фрагмент по аспекту 86, или антитело или фрагмент по аспекту 95, применение по аспекту 96, или способ по аспекту 97, причем антитело или фрагмент содержат легкую каппа-цепь, например, при этом VL-домен легкой цепи получен при помощи рекомбинации сегмента гена VL человека и сегмента гена JL человека, причем сегмент гена VL человека представляет собой IGKV1D-39 (например, IGKV1D-39*01), и опционально сегмент гена JL человека представляет собой IGKJ1 (например, IGKJ1*01) или IGKJ3 (например, IGKJ3*01).

В другом варианте реализации изобретения VL-домен представляет собой VL-домен каппа-цепи. В одном варианте реализации изобретения VL-домен каппа-цепи получен при помощи рекомбинации сегмента гена VL человека и сегмента гена JL человека, причем сегмент гена VL человека представляет собой IGKV1D-39. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена VL представляет собой IGKV1D-39*01.

В дополнительном варианте реализации изобретения сегмент гена JL человека представляет собой IGKJ1. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JL представляет собой IGKJ1*01. В дополнительном варианте реализации изобретения сегмент гена JL человека представляет собой IGKJ3. В другом варианте реализации изобретения сегмент гена JL представляет собой IGKJ3*01.

99. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-89, 98, 101 или 102, или антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-98, причем применение антитела или фрагмента позволяет достичь уровня донорского химеризма стволовых клеток более 80% на 12-е сутки в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макак-резус,

причем опционально антитело предназначено для предотвращения БТПХ.

В одном аспекте представлено антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 95-98, причем антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения отторжения трансплантата (например, БТПХ) у человека путем достижения уровня донорского химеризма стволовых клеток более 80% на 12-е сутки у указанного человека после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека-донора.

В другом варианте реализации изобретения представлены антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-89, 98, 101 или 102, причем применение антитела или фрагмента позволяет достичь уровня донорского химеризма стволовых клеток более 80% на 12-е сутки в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макак-резус.

В одном варианте реализации изобретения химеризм представляет собой химеризм Т-клеток (CD3+/CD20-). В другом варианте реализации изобретения химеризм представляет собой химеризм клеток периферической крови. В другом варианте реализации изобретения химеризм представляет собой химеризм клеток периферической крови или Т-клеток (CD3+/CD20-).

В одном варианте реализации изобретения донорский химеризм стволовых клеток (например, химеризм клеток периферической крови или Т-клеток (CD3+/CD20-)) определяют с использованием дивергентных донор- и реципиент-специфических ассоциированных с антигенами ГКГС микросателлитных маркеров путем сравнения высоты пиков донор- и реципиент-специфических ампликонов. В другом варианте реализации изобретения донорский химеризм стволовых клеток определяют, как описано в Kean, LS, et al., "Induction of chimerism in rhesus macaques through stem cell transplant and costimulation blockade-based immunosuppression", Am J Transplant. 2007 Feb; 7(2):320-35. В другом варианте реализации изобретения донорский химеризм стволовых клеток определяют, как описано в Примере 7.

В одном варианте реализации изобретения модель гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макаки-резус реализуют путем трансплантации (ТГСК) животным-реципиентам, подвергающимся процедуре подготовки наряду с введением антитела к OX40L, с последующей инфузией препарата клеток периферической крови, выделенных из крови доноров-животных - единокровных/единоутробных братьев/сестер, после чего животные продолжают получать раз в неделю дозы антитела к OX40L по настоящему изобретению, а образцы крови берут и анализируют на химеризм.

В другом варианте реализации изобретения в модели ТГСК животные-реципиенты получают на этапе подготовки дозу радиоактивного излучения 1020 сГр за 4 разовые дозы в течение 2 суток (экспериментальный День -2 и День -1) для подавления гематопоэтической системы хозяина до внутривенного введения антитела к OX40L по настоящему изобретению (День -2 с последующим внутривенным введением на Дни 5, 12, 19, 26, 33, 40, 47) и трансплантации клеток периферической крови, обогащенных лейкоцитами и стволовыми клетками животных-доноров, полуидентичных по антигенам MHC (единокровные/единоутробные братья/сестры) для восстановления иммунной системы реципиента наряду с проведением продолжительной поддерживающей терапии, получением образцов крови и мониторингом признаков БТПХ.

В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент, применение или способ предназначены для предотвращения БТПХ.

В одном варианте реализации изобретения антитело к hOX40L по настоящему

изобретению вводят в профилактических целях. В одном варианте реализации изобретения профилактическое лечение предотвращает усугубление или начало развития заболевания или состояния.

В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг). В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг). В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе, выбранной из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 40 мг/кг, около 50 мг/кг, около 60 мг/кг, около 70 мг/кг, около 80 мг/кг около 90 мг/кг или около 100 мг/кг, в частности, около 1 мг/кг, или около 3 мг/кг.

В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят за 1-4 суток до трансплантации, например, за 1-3 суток до трансплантации или за 1-2 суток до трансплантации. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц после трансплантации, например, раз в две недели. В дополнительном варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно в профилактических целях за 1-3 суток до трансплантации в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг), а затем внутривенно, раз в две недели в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг).

В другом варианте реализации изобретения за состоянием пациента после трансплантации периодически наблюдают на предмет наличия прогностического биомаркера, характерного для развития БТПХ (например, острой БТПХ), а антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят, когда уровни биомаркера являются таковыми, что согласно определению, пациент подвержен риску развития БТПХ (например, острой БТПХ). Применение данной стратегии позволит избежать излишнего введения лекарственного препарата и излишней супрессии иммунной системы. Примеры биомаркеров, которые можно использовать в качестве прогностических биомаркеров острой БТПХ, могут относиться к тем, что идентифицированы в Levine et al., "A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study", Lancet Haematol 2015; 2:e21-29. Эти биомаркеры включают, в том числе, TNFR1, ST-2, элафин и IL2Rα, а также Reg3α.

В дополнительном варианте реализации изобретения модель ТГСК реализуют, как описано в Miller, Weston P., et al. "GVHD after haplo идентична transplantation: a novel, MHC-defined rhesus macaque model identifies $CD28^{-}$ $CD8^{+}$ T cells as a reservoir of breakthrough T-cell proliferation during costimulation blockade and sirolimus-based immunosuppression." Blood, 116, 24(2010):5403-5418. В дополнительном варианте реализации изобретения модель ТГСК реализуют, как описано описано в Примере 7.

100. Антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 95-99, причем антитело соответствует определению, приведенному в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102.

101. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-89, 98, 99 или 102, или антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-100, где экспрессия антитела или фрагмента осуществляется в виде пула, стабильно трансфецированного в систему Lonza GS-XceedTM на уровне, превышающем 1,5 г/л в культуре с подпиткой, характеризующейся избыточным клеточным ростом, с использованием системы питания Lonza версии 8 с периодом избыточного роста 14

суток.

В одном варианте реализации изобретения уровень экспрессии составляет более чем 1,0 г/л, более чем 1,1 г/л, более чем 1,2 г/л, более чем 1,3 г/л или более чем 1,4 г/л.

102. Антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-89, 98, 99 или 101, или антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-101, причем антитело или фрагмент способствуют поддержанию популяции наивных CD4+ Т-клеток на уровне >20% от общей популяции Т-клеток на 12-е сутки в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макак-резус.

В одном аспекте представлено антитело или фрагмент в соответствии с любым из аспектов 73-89, 98, 99 или 101, или антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-101, причем антитело или фрагмент предназначены для лечения или предотвращения отторжения трансплантата у человека путем поддержания популяции наивных CD4+ Т-клеток донора на уровне >20% от общей популяции Т-клеток на 12-е сутки у указанного человека после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека-донора.

В одном варианте реализации изобретения модель ТГСК соответствует модели, которая описана в любом варианте реализации, предусмотренном в данном документе выше, например, в связи с аспектом 99.

В другом варианте реализации изобретения содержание наивных клеток определяют путем оценки относительной доли клеток с фенотипом специфических Т-клеток с использованием проточной цитометрии, причем субпопуляции клеток идентифицируют путем окрашивания антителами, мечеными флуоресцентным красителем, и вследствие этого наивные CD4 или CD8 Т-клетки метятся как $CD4^+/CD28^+/CD95^-$ или $CD8^+/CD28^+/CD95^-$, соответственно, центральные CD4 or CD8 Т-клетки памяти метятся как $CD4^+/CD28^+/CD95^+$ или $CD8^+/CD28^+/CD95^+$, соответственно, и эффекторные CD4 или CD8 Т-клетки памяти метятся как $CD4^+/CD28^-/CD95^+$ или $CD8^+/CD28^-/CD95^+$, соответственно.

103. Антитело или фрагмент, применение или способ в соответствии с любым из аспектов 90-102, которые дополнительно включают введение человеку дополнительного терапевтического средства, которое при этом может быть независимо выбрано из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, в частности, рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52

(например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противовоспалительное средство. В другом варианте реализации изобретения противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона), антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба) или антител к TNFa/ молекулам TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба, цертолизумаба пегола). В одном примере противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона) и антител к LFA1.

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и дополнительные терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из ингибиторов кальциневрина (например, такролимуса, циклоспорина), ингибиторов mTOR (например, рапамицина (сиролимуса)) и антипролиферативных средств (например, мофетила микофенолата, циклофосфамида).

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и дополнительные терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из иммуносупрессантов, которые модулирут передачу сигнала IL-2 (например, такролимуса, циклоспорина, рапамицина (сиролимуса) и антител к CD25 (например, базиликсимаба, даклизумаба).

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и рапамицин (сиролимус). В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и такролимус. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и такролимус, а также метотрексат. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин, а также метотрексат. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и мофетила микофенолата.

104. Антитело или фрагмент, применение или способ по аспекту 103, причем дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно или одновременно с антителом к hOX40L или фрагментом.

105. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель, и опционально дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство, независимо выбранное из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к

CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, в частности, рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52 (например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители или носители, которые описаны в данном документе, могут использоваться с необходимыми изменениями в этих композициях.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противовоспалительное средство. В другом варианте реализации изобретения противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона), антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, антител к компоненту C 5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба) или антител к TNFa/ молекулам TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба, цертолизумаба пегола). В одном примере противовоспалительное средство независимо выбирают из группы, состоящей из кортикостероидов (например, метилпреднизолона) и антител к LFA1.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из группы, состоящей из ингибиторов кальциневрина (например, такролимуса, циклоспорина), ингибиторов mTOR (например, рапамицина (сиролимуса)) и антипролиферативных средств (например, мофетила микофенолата, циклофосфамида).

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из группы, состоящей из иммуносупрессантов, которые модулирут передачу сигнала IL-2 (например, такролимуса, циклоспорина, рапамицина (сиролимуса) и антител к CD25 (например, базиликсимаба, даклизумаба).

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат.

106. Фармацевтическая композиция по аспекту 105 или набор, содержащий фармацевтическую композицию согласно определению в аспекте 105, причем композиция

предназначена для лечения и/или предотвращения hOX40L-опосредованного состояния или заболевания, выбранного из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза, в частности, БТПХ.

Эта комбинация с необходимыми изменениями опционально может использоваться для лечения HOX40L-опосредованных заболеваний, представленных в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения.

107. Фармацевтическая композиция по аспекту 105 или аспекту 106 в комбинации с, или набор по аспекту 106, содержащий листок-вкладыш или инструкции по применению для лечения и/или предотвращения указанного заболевания или состояния у человека; причем опционально листок-вкладыш или инструкции содержат номер регистрационного удостоверения (например, регистрационный номер, присвоенный FDA или EMA); устройство для внутривенного введения или инъекций, которое содержит антитело или фрагмент.

Листки-вкладыши, инструкции, hOX40L-опосредованные заболевания и состояния, представленные в любых аспектах, конфигурациях, концепциях, примерах или вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе, опционально могут использоваться с необходимыми изменениями в случае этой комбинации.

108. Нуклеиновая кислота, которая кодирует HCDR3 антитела или фрагмента, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99,101 или 102.

109. Нуклеиновая кислота, которая кодирует VH-домен и/или VL-домен антитела или фрагмента, как определено в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102.

110. Нуклеиновая кислота по аспекту 109, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 33 и/или SEQ ID NO: 47.

В одном примере нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 85% идентична, по меньшей мере 90% идентична, по меньшей мере 95% идентична, по меньшей мере 96% идентична, по меньшей мере 97% идентична, по меньшей мере 98% идентична или по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 33 и/или SEQ ID NO: 47.

111. Нуклеиновая кислота, которая кодирует тяжелую цепь или легкую цепь антитела, приведенного в любом из аспектов 73-89, 98, 99, 101 или 102.

112. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из аспектов 108-111; причем опционально вектор представляет собой вектор для экспрессии в клетках CHO или HEK293.

ИЗ. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из аспектов 108-111 или вектор в соответствии с аспектом 112.

Кроме того, настоящее изобретение относится к следующим концепциям:

Концепция 1. Способ уменьшения доли (например, истощения популяции или уменьшения содержания) CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ стволовых Т-клеток памяти (Tscm), включающий комбинацию указанных клеток со средством (как, например, антителом к OX40 или антителом к OX40L, или его фрагментом), которая способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которая способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), и в результате чего уменьшается

доля указанных клеток Tscm (например, в результате этого уменьшается содержание указанных Tscm-клеток или истощается их популяция).

Считается, что CO45RA+CCR7+CD95+OX40+ стволовые Т-клетки памяти (Tscm) - недавно идентифицированная субпопуляция стволовых Т-клеток памяти, которые характеризуются продолжительной жизнью и обладают способностью к самообновлению. Таким образом, эти клетки могут оказывать негативное воздействие при различных заболеваниях, таких как БТПХ и аутоиммунные нарушения, поскольку они являются источником пополняющейся и мультипотентной популяции потенциально аутореактивных эффекторных Т-клеток. Известно, что Т-клетки развиваются по определенному пути, начиная с наивных Т-клеток (Tn), через стволовые Т-клетки памяти (Tscm), через центральные Т-клетки памяти (Tcm) и эффекторные Т-клетки памяти (Tem) до превращения в короткоживущие эффекторные Т-клетки (Teff), которые описаны в Gattinoni and Restifo (2013), Inside Blood, 121 (4), 567-568. На этих различных этапах на поверхности Т-клеток экспрессируются различные маркеры, которые отражают статус активации Т-клеток, их тканевую локализацию и их чувствительность к различным стимулам, таким как воспалительные цитокины.

Tscm-клетки, как определено в данном документе, характеризуются как CD45RA+ CCR7+CD95+OX40+. Для ознакомления с альтернативными классификациями предшествующего уровня техники различных типов Т-клеток см. фиг. в Gattinoni и Restifo (2013). Другие маркеры могут присутствовать или отсутствовать, но Tscm-клетки должны быть как минимум CD45RA+CCR7+CD95+OX40+. Различные маркеры клеточной поверхности в одном варианте реализации изобретения идентифицировали с использованием проточной цитометрии с применением способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. В одном варианте реализации изобретения Tscm-клетки могут дополнительно быть CD8+. В другом варианте реализации изобретения Tscm-клетки могут дополнительно быть CD62L+. Методы проточной цитометрии хорошо известны специалистам в данной области. Средства, которые могут использоваться в методах проточной цитометрии, описаны ниже в Примере 7 в данном документе. В одном варианте реализации изобретения проточную цитометрию проводят, как описано ниже в Примере 7 в данном документе. В другом варианте реализации изобретения проточную цитометрию проводят, как описано в Baumgarth & Roederer (2000), Journal of Immunological Methods, 243, 77-97. (см. концепцию 25 приведенную ниже в данном документе).

В конкретном варианте реализации изобретения Tscm-клетки характеризуются как CD4+CD45RA+CCR7+CD95+OX40+.

Не ограничиваясь теорией, считается, что уменьшение этой популяции Tscm-клеток будет обладать рядом преимуществ при различных заболеваниях, как изложено в данном документе. В одном варианте реализации изобретения Tscm-клетки являются активными Tscm-клетками.

Для концепций 1-83 в данном документе долю или содержание Tscm-клеток можно уменьшить в образце или фактически в (образце) крови субъекта. Долю или содержание Tscm-клеток можно определить относительно всей популяции Т-клеток в образце. В одном варианте реализации изобретения долю или содержание Tscm-клеток определяют относительно других Т-клеток в образце. Т-клетки обычно идентифицируют как CD3+, и они могут включать в себя Tn-клетки, Tscm-клетки, Tcm-клетки, Tem-клетки и Teff-клетки. В конкретном варианте реализации изобретения долю или содержание Tscm-клеток определяют относительно Tn-клеток (как определено ниже) в образце. Долю или содержание Tscm-клеток можно изменить путем истощения или уменьшения. В

одном варианте реализации изобретения соотношение типов Т-клеток может быть таким же, как доля Tscm-клеток (например, что касается концепции 2 ниже в данном документе). В другом варианте реализации изобретения содержание типов Т-клеток может быть таким же, как доля Tscm-клеток. В одном варианте реализации изобретения соотношение или доля Tscm и Tn-клеток больше, чем 50:50. Конкретные соотношения и доли соответствуют таковым, что описаны в концепциях 23 и 24 в данном документе.

Используемые в концепциях 1-83 в данном документе термины «истощение» и «истощает» служат для описания активного эффекта после комбинации со средством (таким как антитело) на заданной мишени для уничтожения или удаления клеток-мишеней (например, Tscm-клеток). Если средство представляет собой антитело, то это обычно достигается посредством эффекторных функций, таких как АЗК, АЗКЦ или КЗЦ. В альтернативном варианте мишень может быть уничтожена или удалена токсином, который может быть конъюгирован с лекарственным веществом или нацеливающим фрагментом (таким как антитело к OX40 или антитело к OX40L). Такие токсины будут избирательно уничтожать или удалять клетку, на которую они нацелены. Подходящие иммуноконъюгаты описаны на странице 90 и на страницах 114-118 и 134 (в частности, 114-116) в данном документе.

Термины «уменьшение» или «уменьшать», используемые в концепциях 1-83 в данном документе, относятся к механизму, отличающемуся от истощения, посредством которого абсолютное число клеток в данной популяции уменьшается. Этого можно достигнуть косвенно, например, с применением блокирующего или нейтрализующего средства (такого как антитело) против мишени, что косвенно приводит к уничтожению клетки-мишени (такой как Tscm-клетка) или предотвращению экспансии или роста клеток-мишеней, что приводит к явному уменьшению долей по сравнению с другим типом клеток (таких как Tn-клетки).

Используемый в концепциях 1-83 в данном документе термин «содержание» клеток в популяции Т-клеток может обозначать абсолютное число или относительную долю Т-клеток.

На протяжении различных концепций 1-83, описанных в данном документе, средство, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток, может представлять собой, например, антитело или его фрагмент, короткую интерферирующую РНК (SiRNA), цинковый палец, DARPin, аптамер, шпигельмер, антикалин, слитый рецептор Fc-фрагмент, слитый лиганд Fc-фрагмент или небольшую молекулу. В одном варианте реализации изобретения средство нацелено взаимодейсвует с OX40 (например, человеческим OX40) или лигандами OX40. В другом варианте реализации изобретения средство нацелено взаимодейсвует с OX40L (например, человеческим OX40L) или рецепторами OX40L. В одном примере средство может представлять собой слитый белок OX40-Fc (например, слитый белок hOX40-Fc) или может представлять собой слитый белок OX40L-Fc (например, слитый белок h0X40L-Fc), причем оба белка включают функциональные фрагменты OX40 и OX40L. Эти типы конструкций известны специалистам в данной области. В другом варианте реализации изобретения средство нацелено взаимодейсвует с OX40 (например, человеческим OX40). В другом варианте реализации изобретения средство нацелено взаимодейсвует с OX40L (например, человеческим OX40L).

В конкретном варианте реализации изобретения средство представляет собой антитело или его фрагмент. Форматы и структуры антител и фрагментов описаны в других разделах в данном документе и могут применяться в отошении любой из концепций, раскрытых в данном документе. Антитело или фрагмент могут представлять

собой любую из конструкций, описанных в данном документе (например, как в любой из концепций 52-64 в настоящем документе). В конкретном варианте реализации изобретения средство представляет собой антитело к OX40 человека или его фрагмент. В другом конкретном варианте реализации изобретения средство представляет собой антитело к OX40 человека, как, например, антитело, содержащее аминокислотную последовательность 02D10, описанную в данном документе, или антитело, содержащее аминокислотную последовательность окселумаба.

Концепция 2. Способ изменения соотношения типов клеток в популяции Т-клеток в образце, включающий:

a. обеспечение популяции, причем популяция содержит смесь различных типов Т-клеток, при этом популяция содержит CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клетки,

b. обеспечение средства которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (или обеспечение антитела к OX40 или антитела к OX40L, или его фрагмента); и

c. объединение указанной популяции клеток с количеством указанного средства (например, антитела или его фрагмента), эффективным для изменения соотношения (например, для уменьшения доли) Tscm-клеток в указанной популяции.

На протяжении концепций 1-83, описанных в данном документе, сооотношение типов Т-клеток можно изменить в образце, например, путем увеличения доли наивных Т-клеток (Tn-клеток, как определено ниже в данном документе). В другом варианте реализации изобретения отношение типов Т-клеток можно изменить путем уменьшения доли Tscm-клеток. Соотношение Tscm-клеток можно определить относительно всего образца. В одном варианте реализации изобретения сооотношение Т-клеток определяют путем сравнения доли наивных Т-клеток или Tscm-клеток по сравнению с другими Т-клетками в образце. Т-клетки обычно идентифицируют как CD3+, и они включают в себя Tn-клетки, Tscm-клетки, Tcm-клетки, Tem-клетки и Teff-клетки. В конкретном варианте реализации изобретения соотношение Т-клеток определяется как соотношение Tscm-клеток относительно наивных Т-клеток в образце. Соотношение Т-клеток можно изменить путем истощения или уменьшения содержания Tscm-клеток. Соотношение Т-клеток можно изменить путем увеличения количества или экспансии наивных Т-клеток.

Концепция 3. Способ в соответствии с концепцией 2, причем на стадии a) популяция дополнительно содержит CD45RA+CCR7+CD95- наивные Т-клетки (Tn).

Наивные Т-клетки (Tn) в соответствии с определениями в концепциях 1-83 в данном документе классифицируют как CD45RA+CCR7+CD95-. Дополнительные маркеры могут присутствовать или отсутствовать, но Tn-клетки как минимум должны быть CD45RA+CCR7+CD95-. В одном варианте реализации изобретения Tn-клетки дополнительно могут быть CD8+ или CD4+, в частности, CD4+. Считается, что Tn-клетки оказывают благоприятное воздействие, поскольку ими представлен весь пул Т-клеток, которые способствуют развитию адаптивных Т-клеточных ответов для защиты субъекта при воздействии потенциально опасных патогенов и злокачественных клеток.

Концепция 4. Способ в соответствии с концепцией 3, причем соотношение Tscm-клеток и Tn-клеток в популяции стадии a) составляет более, чем 50:50.

Концепция 5. Способ в соответствии с любой из концепций 1-4, причем способ осуществляют ex vivo с использованием образца крови, взятого у человека-донора.

Концепция 6. Способ в соответствии с концепцией 5, причем кровь, полученную по указанному способу, повторно вводят человеку-реципиенту.

В одном варианте реализации изобретения человек-реципиент - это тот же самый человек-донор, у которого был взят образец. В другом варианте реализации изобретения человек-реципиент отличается от человека-донора. Если реципиент отличается от

донора, предпочтительно, чтобы донор был одного пола с человеком-реципиентом. В другом варианте реализации изобретения донор может быть аналогичного возраста и этнической принадлежности, что и человек-реципиент. В другом варианте реализации изобретения аллотипические маркеры донорского иммуноглобулина могут быть одинаковыми или сходными с маркерами человека-реципиента.

В другом варианте реализации изобретения человеку-реципиенту может быть проведено несколько переливаний донорской крови в зависимости тяжести заболевания, по поводу которого проводят лечение.

Концепция 7. Способ в соответствии с любой из концепций 1-4, причем способ применяют in vivo к человеку.

Концепция 8. Способ в соответствии с концепцией 7, причем у субъекта наблюдается или субъект подвержен риску развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

В данном контексте субъект может рассматриваться как «подверженный риску развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния», если клеточный состав популяции Т-клеток начал изменяться, но у субъекта еще не проявляются симптомы, или если у субъекта не диагностируется такое заболевание любым стандартным способом. Таким образом, использование способов и областей применения, раскрытых в данном документе, позволяет своевременно выявить пациентов, у которых развивается такое заболевание. В одном варианте реализации изобретения развитие заболевания предотвращается (т.е. лечение носит профилактический характер).

В конкретном варианте реализации изобретения субъект подвержен риску развития БТПХ или отторжения трансплантата, если в предоперационный период у него развиваются заболевания, о которых говорится выше. Потенциальные методы трансплантационной терапии рассматриваются далее в концепции 78.

В любой из концепций 1-83, описанных в данном документе, Tscm-опосредованное заболевание может соответствовать определению, приведенному далее в любой из концепций 71-80.

Концепция 9. Способ лечения или уменьшения риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, причем способ включает добавление к популяции Т-клеток средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), и в результате этого в популяции уменьшается доля CD45RA+CCR7+CD95+ OX40+ Tscm-клеток (например, в результате этого в указанной популяции уменьшается содержание указанных Tscm-клеток или происходит истощение их популяции).

Используемый в концепциях 1-83 в данном документе термин «лечение» Tscm-опосредованного заболевания охватывает уменьшение одного или более симптома(ов) указанного Tscm-опосредованного заболевания. Термин «предотвращение» Tscm-опосредованного заболевания охватывает предотвращение одного или более симптома (ов) указанного Tscm-опосредованного заболевания.

Концепция 10. Способ в соответствии с любой из концепций 7-9, причем средство (например, антитело или его фрагмент) комбинируют путем введения указанного средства (например, антитела или фрагмента) в терапевтически эффективном количестве указанному субъекту, что обеспечивает лечение указанного Tscm-опосредованного заболевания или состояния, или уменьшение риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у указанного субъекта.

В одном варианте реализации изобретения введение является профилактическим для

уменьшения риска развития Tscm-опосредованного заболевания.

В любой из концепций, описанных в данном документе, терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество антитела или фрагмента соответствует тому, что описано в других разделах (см. страницу 29, 73, 105-107, что касается терапии, и страницы 72 и 102-103, что касается профилактики). В любой из концепций, описанных в данном документе, способы введения и композиции для введения могут соответствовать тем, что описаны в других разделах (см. страницы 118-142 в данном документе). В одном варианте реализации изобретения антитело или фрагмент вводят с помощью болюсной инъекции (например, внутривенно).

Концепция 11. Способ лечения или уменьшения риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), и в результате этого в популяции уменьшается доля CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток (например, в результате этого уменьшается содержание указанных Tscm-клеток или истощается их популяция), при этом обеспечивается лечение указанного Tscm-опосредованного заболевания или состояния, или уменьшение риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у указанного субъекта.

Концепция 12a. Средство (например, антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), для применения в лечении или уменьшении риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта; или концепция 12b. Антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент для применения в лечении или уменьшении риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта.

Концепция 13a. Применение средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта; или концепция 13b. Применение антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта.

Концепция 14a. Применение средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта; или концепция 14b. Применение антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта.

Концепция 15a. Композиция, содержащая средство (например, антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта; или концепция 15b. Композиция,

содержащая антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент для лечения или предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта.

Концепция 16. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

a. проведение анализа для измерения количества CD45RA+CCR7+CD95-Tn-клеток и количества CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток в образце, полученном у субъекта; и

b. введение средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), как, например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, субъекту, если в указанном анализе установлено, что соотношение Tscm- и Tn-клеток в образце составляет более, чем 50:50.

Концепция 17a. Средство (например, антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), для применения в лечении субъекта, причем средство назначают субъекту, у которого имеется или предположительно имеется соотношение CD45RA+CCR7+CD95+ OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток более, чем 50:50; или концепция 17b. Антитело к OX40 или антитело к OX40L, или его фрагмент для применения в лечении субъекта, причем антитело или его фрагмент назначают субъекту, у которого имеется или предположительно имеется соотношение CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток составляет более, чем 50:50.

Концепция 18a. Применение средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), для лечения субъекта у которого соотношение CD45RA+ CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток составляет более, чем 50:50, или это соотношение было установлено; или концепция 18b. Применение антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов для лечения субъекта у которого соотношение CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+ CD95- Tn-клеток составляет более, чем 50:50, или это соотношение было установлено.

Концепция 19a. Применение средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), в производстве лекарственного средства для применения в лечении субъекта, причем средство необходимо вводить субъекту у которого соотношение CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток составляет более, чем 50:50, или это соотношение было установлено; или концепция 19b. Применение антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов в производстве лекарственного средства для применения в лечении субъекта, причем антитело или его фрагмент необходимо вводить субъекту, у которого соотношение CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток составляет более, чем 50:50, или это соотношение было установлено.

В любой из концепций 17-19 соотношение определяют в образце, например, в образце крови, полученном у указанного субъекта.

Концепция 20. Способ в соответствии с концепцией 16a или b, средство или антитело, или фрагмент для применения в соответствии с концепцией 17a или b или применение

в соответствии с концепцией 18a или b, или концепцией 19a или b, причем терапия заключается в лечении или предотвращении Tscm-опосредованного заболевания или состояния, предпочтительно, при этом терапия заключается в лечении Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

В другом варианте реализации изобретения у субъекта наблюдается или субъект подвержен риску развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния. Tscm-опосредованное заболевание или состояние может соответствовать любому определению из концепций 71-80 в данном документ ниже.

Концепция 21. Способ классификации субъекта как имеющего или подверженного риску Tscm-опосредованного заболевания или состояния (например, такое заболевание или состояние подходит для лечения с использованием антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), включающий:

a. проведение анализа, с помощью которого выявляют (i) CD45RA+CCR7+CD95+ OX40+ Tscm-клетки и (ii) CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клетки в образце, полученном у указанного субъекта; и

b. классификацию субъекта как имеющего или подверженного риску Tscm-опосредованного заболевания или состояния, если соотношение Tscm-клеток и Tn-клеток в образце является большим, чем 50:50.

Концепция 22. Способ в соответствии с концепцией 21, дополнительно включающий стадию:

c. введения указанному субъекту антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, который способствует уменьшению доли указанных Tscm-клеток в крови указанного субъекта (например, что способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), если указанный субъект классифицируется как имеющий или подверженный риску Tscm-опосредованного заболевания или состояния на стадии b)

Tscm-опосредованные заболевания или состояния, которые могут быть пригодны для лечения с использованием антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, соответствуют тем, что описаны в любой из приведенных ниже концепций 71-80 в данном документе.

Концепция 23. Способ в соответствии с любой из концепций 4, 16 или 20-22, средство или антитело, или фрагмент для применения в соответствии с концепцией 17 или 20 или применение в соответствии с любой из концепций 18-20, причем соотношение Tscm и Tn-клеток (либо согласно определению, либо классификации) составляет более чем 60:40, или более чем 70:30, или более чем 75:25, например, более чем 70:30.

В другом варианте реализации изобретения соотношение (либо согласно определению, либо классификации) составляет более чем 55:45. В другом варианте реализации изобретения соотношение (либо согласно определению, либо классификации) составляет более чем 65:35.

Концепция 24. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения или применение в соответствии с концепцией 23, причем соотношение Tscm и Tn-клеток (либо согласно определению, либо классификации) составляет более чем 80:20, или более чем 85:15, например, более чем 90:10, например, более чем 95:5.

Концепция 25. Способ в соответствии с любой из концепций 4, 16 или 20-24, средство или антитело, или фрагмент для применения в соответствии с любой из концепций 17, 20, 23 или 24, или применение в соответствии с любой из концепций 18-20, 23 или 24, причем соотношение Tscm-клеток и Tn-клеток определяют (или поддается определению) при помощи проточной цитометрии.

Методы проточной цитометрии хорошо известны специалистам в данной области, как обсуждалось выше. Средства, которые можно использовать в методах проточной цитометрии, определены в Примере 7 ниже в данном документе. В одном варианте реализации изобретения проточную цитометрию осуществляют, как описанно в Примере 7 ниже в данном документе. В другом варианте реализации изобретения проточную цитометрию осуществляют, как описанно в Baumgarth & Roederer (2000).

Концепция 26. Способ лечения или уменьшении риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния с использованием средства (например, антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или с использованием антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, включающий этапы:

a. определения того, является ли субъект кандидатом для лечения, путем обнаружения наличия OX40 на поверхности CD45RA+CCR7+CD95+ Tscm-клеток, полученных из образца, взятого у субъекта; и

b. введения указанного средства, как, например, указанное антитело или фрагмент, субъекту, если субъект идентифицирован как кандидат для лечения.

Концепция 27. Способ в соответствии с концепцией 26, причем наличие OX40 на поверхности Tscm-клеток определяют с использованием проточной цитометрии.

В одном варианте реализации изобретения субъект представляет собой человека, а OX40 представляет собой OX40 человека.

Концепция 28. Способ, включающий:

a. получение по меньшей мере двух образцов Т-клеток, полученных у субъекта, у которого наблюдается или который подвержен риску развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния, причем по меньшей мере указанные два образца включают первый образец и второй образец,

b. определение содержания CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток в указанных первом и втором образцах;

c. лечение указанного субъекта для уменьшения доли CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток (например, для истощения или уменьшения содержания Tscm-клеток) путем введения средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или путем введения антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, если содержание Tscm-клеток в указанном втором образце повышено по сравнению с указанным первым образцом для лечения или уменьшения риска развития указанного Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

Содержание Tscm-клеток в указанных первом и втором образцах на стадии b. может быть либо абсолютным числом Tscm-клеток, либо относительными долями Tscm-клеток (например, сооотношение Tscm-клеток и Tn-клеток или Tacm-клеток и общее количество Т-клеток). Содержание Tscm-клеток можно увеличить во втором образце, если оно статистически значимо выше содержания в первом образце.

Концепция 29. Способ в соответствии с концепцией 28, причем указанный первый образец:

i. до начала указанного заболевания или состояния; или

ii. после начала заболевания или состояния; и

при этом опционально указанный второй образец получают не позже одного месяца, например, не позже чем через одну неделю после первого образца.

В контексте концепций данного документа можно определить состояние субъекта

«до начала Tscm-опосредованного заболевания или состояния», если у субъекта не проявляются никакие симптомы, которые обычно ассоциированы с указанным заболеванием или состоянием, или если у субъекта не диагностируется такое заболевание или состояние любым стандартным способом. Например, признаки и симптомы острой БТПХ можно классифицировать по уровню или степени на разных стадиях в соответствии со стандартизированной шкалой, как, например, описанной в работе Przepiorka et ah (1995), 1994 Consensus Conference on Acute GvHD Grading Bone Marrow Transplant 1995; 15, 825-828. Подобные шкалы оценивания заболевания также часто применяются в клинической практике в случае других соответствующих заболеваний, таких как ревматоидный артрит и воспалительные заболевания кишечника.

Концепция 30. Способ в соответствии с концепцией 28 или концепцией 29, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние лечат с использованием трансплантации, и причем на стадии c) лечение заключается в уменьшении риска развития отторжения трансплантата, при этом опционально первый образец берут перед трансплантацией, а второй образец берут после трансплантации.

Первый образец можно взять до операции, например, после того как было установлено, что субъект является кандидатом для лечения. Второй образец берут после трансплантации, и его может использовать врач в качестве метода наблюдения за приживлением трансплантата. Таким образом, может возникнуть ситуация, когда врач может взять несколько образцов после трансплантации, например, ежедневно образец крови для наблюдения у субъекта изменений соотношения Tscm-клеток и Tn-клеток или содержания Tscm-клеток в образце. Образцы можно брать через день, раз в неделю, раз в месяц или дольше (включая раз в год) в зависимости от вероятности отторжения трансплантата. Например, если трансплантат является аутологичным, то вероятность отторжения трансплантата может быть снижена по сравнению с аллогенной трансплантацией, и поэтому интервал времени между забором образцов после трансплантации может быть более продолжительным, чем в случае аллогенной трансплантацией, при которой риск отторжения трансплантата выше.

Концепция 31. Способ в соответствии с концепцией 30, причем на стадии a) получают первый образец не позже, чем за неделю, например, не позже, чем за 6 дней, не позже, чем за 5 дней, не позже, чем за 4 дня или не позже, чем за 3 дня, например, не позже, чем за 2 дня до трансплантации.

Концепция 32. Способ в соответствии с любой из концепций 28-31, причем второй образец получают не позже, чем через 6 дней, не позже, чем через 5 дней, не позже, чем через 4 дня или не позже, чем через 3 дня, например, не позже, чем через 2 дня после первого образца или после указанной трансплантации.

Концепция 33. Способ в соответствии с любой из концепций 28-32, причем на стадии c) содержание Tscm-клеток в указанном втором образце больше чем в два раза по сравнению с содержанием в первом образце, например, более чем в три раза, или предпочтительно более чем в 4 раза выше по сравнению с указанным первым образцом.

В одном варианте реализации изобретения на стадии c) содержание Tscm-клеток в указанном втором образце больше чем в 4 раза (например, больше чем в 4,5 раза) по сравнению с указанным первым образцом. В другом варианте реализации изобретения на стадии c) содержание Tscm-клеток в указанном втором образце больше чем в 5 раз выше, по сравнению с указанным первым образцом.

Концепция 34. Способ в соответствии с любой из концепций 30-33, причем субъекту вводят профилактическую дозу средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению

содержания указанных Tscm-клеток), или вводят профилактическую дозу антитела к OX40 или антитела к OX40L или их фрагментов перед указанной трансплантацией, и первый образец получают перед введением указанного средства или антитела или его фрагмента, а второй образец берут после трансплантации или после введения средства или антитела, или его фрагмента (предпочтительным является забор второго образца после трансплантации).

В одном варианте реализации изобретения профилактическое средство представляет собой эффективное профилактическое средство. Под «эффективной» подразумевается, что доза является эффективной для уменьшения доли или содержания Tscm-клеток, как описано в данном документе, или эффективной для предотвращения или уменьшения риска развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

Способы, описанные в данном документе, можно использовать для коррекции уже нарушенного содержания Tscm-клеток путем введения средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или путем введения антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов перед трансплантацией, чтобы уменьшить риск отторжения трансплантата после трансплантации. Таким образом, несколько образцов могут быть получны после введения средства (или антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов), но до трансплантации. Можно провести сравнение между полученными образцами и образцом, полученным у здорового донора.

Концепция 35. Способ в соответствии с любой из концепций 30-33, причем субъекту вводят терапевтическую дозу средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или вводят терапевтическую дозу антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов после трансплантации, и при этом первый образец берут перед указанной трансплантацией, а второй образец берут после трансплантации.

В одном варианте реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой эффективное профилактическое средство. Под «эффективной» подразумевается, что доза является эффективной для уменьшения доли или содержания Tscm-клеток, как описано в данном документе, или эффективной для предотвращения Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

В одном варианте реализации изобретения второй образец берут после введения средства или антитела, или его фрагмента. Это дает возможность врачу проверить, что содержание или доля Tscm-клеток остаются «нормальными», то есть по сравнению с первым образцом или с образцом, полученным у здорового донора.

Концепция 36. Способ в соответствии с любой из концепций 30-33, причем субъекту вводят терапевтическую дозу средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или вводят терапевтическую дозу антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов после трансплантации, и при этом первый образец берут перед указанной трансплантацией, а второй образец берут после введения указанного средства или указанного антитела или его фрагмента.

Концепция 37. Способ в соответствии с любой из концепций 34-36, дополнительно включающий этапы:

d. получение третьего образца, полученного у указанного субъекта;

e. определение содержания CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клеток в указанном третьем образце;

f. лечение указанного субъекта для уменьшения доли CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток (например, для истощения или уменьшения содержания) Tscm-клеток путем введения средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или путем введения антитела к OX40 или антитела к OX40L, или их фрагментов, если уровни Tscm-клеток в указанном третьем образце повышены по сравнению со вторым или указанным первым образцом.

Содержание считается «повышенным», как описано выше в данном документе (например, для концепции 28 или 33).

Концепция 38. Способ в соответствии с концепцией 37, причем этапы от d) до f) повторяют по мере необходимости до тех пор, пока содержание Tscm-клеток не будет терапевтически эффективным или на профилактически эффективным, например, пока оно не останется, по существу, на постоянном уровне у указанного субъекта.

Используемый в концепциях в данном документе термин «по существу, постоянное содержание» может быть описан, как содержание, находящиеся в пределах 30% от вариации между образцами. В одном варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание находится в пределах 20% от вариации между образцами. В другом варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание находится в пределах 15% вариации между образцами, например, в пределах 10% вариации между образцами, например, в пределах 5% вариации между образцами.

Концепция 39. Способ в соответствии с любой из концепций 28-38, причем второй образец берут не позже, чем через месяц после первого образца, например, не позже, чем через одну неделю, не позже, чем через 6 дней, не позже, чем через 5 дней, не позже, чем через 4 дня или не позже, чем через 3 дня, например, не позже, чем через 2 дня после первого образца и, при этом опционально третий образец берут не позже, чем через один месяц после второго образца, например, не позже, чем через одну неделю, не позже, чем через 6 дней, не позже, чем через 5 дней, не позже, чем через 4 дня или не позже, чем через 3 дня, например, не позже, чем через 2 дня после второго образца.

Временные точки для забора любого из образцов, описанных в этих концепциях, будут зависеть от ряда факторов, таких как вероятность того, что у субъекта наблюдается или он подвержен риску развития Tscm-опосредованного заболевания (например, БТПХ или отторжения трансплантата), содержания, установленного в предыдущем образце, типа трансплантации и т.д. Специалист в данной области сможет определить соответствующие временные точки при необходимости или желании. При желании в качестве временных точек может быть использовано введение раз в месяц, раз в два месяца, раз в три месяца, раз в полгода или раз в год.

Концепция 40. Применение CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клеток in vitro в качестве диагностического средства для Tscm-опосредованного заболевания или состояния у субъекта (например, такое заболевание или состояние поддается лечению или предотвращению с использованием средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или с использованием антитела к OX40 или антитела к OX40L или их фрагментов у субъекта).

В одном варианте реализации изобретения представлен биомаркер аутоиммунного заболевания, ВИЧ-1 и Т-клеточной злокачественной опухоли, причем в качестве биомаркера используется CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клетка. В другом варианте реализации изобретения биомаркер представляет собой любое из заболеваний, описанных в концепциях 71-80 ниже. В другом варианте реализации изобретения Tscm-

клетка представляет собой CD4+CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клетку.

Концепция 41. Применение биомаркера Tscm-опосредованного заболевания или состояния, причем в качестве биомаркера используются CD45RA+CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клетки in vitro в качестве диагностического средства для Tscm-опосредованного заболевания или состояния (например, такое заболевание или состояние поддается лечению или предотвращению с использованием средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или с использованием антитела к OX40 или антитела к OX40L. или их фрагментов у субъекта).

В одном варианте реализации изобретения Tscm-опосредованные заболевания относятся к любым из заболеваний, описанных в концепциях 71-80 ниже в данном

Концепция 42. Способ поддержания CD45RA+CCR7+CD95-Tn-клеток, при одновременном уменьшении количества CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клеток в популяции Т-клеток в образце, причем указанный способ включает осуществление контакта указанного образца с эффективным количеством средства, которое способствует уменьшению доли Tscm-клеток (например, которое способствует истощению популяции или уменьшению содержания указанных Tscm-клеток), или антителом к OX40 или антителом к OX40L, или их фрагментами.

Используемые в концепциях 1-83 в данном документе термины «поддерживать» или «поддержание» в отношении содержания или доли могут быть описаны как, по существу, постоянные. По существу, постоянное содержание может находиться в пределах 30% от вариации между образцами. В одном варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание находится в пределах 20% от вариации между образцами. В одном варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание находится в пределах 15% от вариации между образцами, например, в пределах 10% от вариации между образцами, например, в пределах 5% от вариации между образцами. В другом варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание представляет собой то содержание, которое статистически значимо не изменяется. В одном варианте реализации изобретения, по существу, постоянное содержание представляет собой то количество, которое достигает 95% степени достоверности (например, более 97% или более 99%). Термин «статистически значимый» может соответствовать определению, приведенному выше в концепции 28 в данном документе.

Концепция 43. Способ в соответствии с концепцией 42, причем содержание указанных Tn-клеток по меньшей мере поддерживается, в то время как содержание указанных Tscm-клеток уменьшается в указанном образце, при этом опционально образец получают у субъекта.

Концепция 44. Способ в соответствии с любой из концепций 2-8, 10, 16, 20, 21, 23-39, 42 или 43, средство или антитело, или его фрагмент для применения в соответствии с любой из концепций 12, 17, 20, 21 или 23-25, применение в соответствии с любой из концепций 13, 14, 18-20 или 23-25 или композиция в соответствии с концепцией 15, причем средство (например, антитело или его фрагмент) способствует уменьшению доли CD45RA+CCR7+CD95+OX40+Tscm-клеток (например, способствует истощению популяции или уменьшению содержания Tscm-клеток).

Концепция 45. Способ или фрагмент в соответствии с любой из концепций 1-8, 10, 16, 20, 21, 23-39 или 42-44, средство или антитело, или его фрагмент для применения в соответствии с любой из концепций 12, 17, 20, 21, 23-25 или 44, применение в соответствии с любой из концепций 13, 14, 18-20 или 23-25, или 44, или композиция в соответствии с концепцией 15 или концепцией 44, причем средство (например, антитело или его

фрагмент) обеспечивает поддержание CD45RA+CCR7+CD95-Tn-клеток.

Концепция 46. Способ в соответствии с концепцией 42 или 45, средство или антитело, или его фрагмент для применения в соответствии с концепцией 45, применение в соответствии с концепцией 45 или композиция в соответствии с концепцией 45, причем содержание Tn-клеток поддерживается на уровне не ниже 50% от указанного содержания Tn-клеток в образце, полученном у здорового донора или у указанного субъекта до наступления болезни.

Здоровый донор предпочтительно относится к одному и тому же виду, что и субъект, например, при этом субъект представляет собой человека, донор наиболее предпочтительно также представляет собой человека. Донор также предпочтительно имеет тот же пол, что и субъект. Донор предпочтительно имеет аналогичный возраст и этническую принадлежность, что и субъект.

Концепция 47. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 46, причем содержание Tn-клеток поддерживается на уровне не ниже 55% (как, например, не ниже 60%, например, не ниже 65%, например, не ниже 70%).

Концепция 48. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 47, причем содержание Tn-клеток поддерживается на уровне не ниже 75% (как, например, не ниже 80%, например, не ниже 85%, например, не ниже 90%).

Концепция 49. Способ в соответствии с любой из концепций 1-8 или 42-48, средство или антитело, или его фрагмент для применения в соответствии с любой из концепций 44-48, применение в соответствии с любой из концепций 38-41 или композиция в соответствии с любой из концепций 44-48, причем происходит истощение или уменьшение популяции Tscm-клеток до уровня, ниже, чем 50% от количества указанных Tscm-клеток в образце, полученном у здорового донора или у указанного субъекта до начала развития заболевания.

Концепция 50. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 49, причем происходит истощение или уменьшение популяции Tscm-клеток до уровня, ниже, чем 45% (как, например, ниже, чем 40%, например, ниже, чем 35%, например, ниже, чем 30% или ниже, чем 25%).

Концепция 51. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 50, причем происходит истощение или уменьшение популяции Tscm-клеток до уровня, ниже чем 20% (как, например, ниже чем 15%, например, ниже чем 10%.

Концепция 52. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или фрагмент представляет собой антитело, обеспечивающее исощение, или фрагмент, который специфически связывается с OX40 (в частности, OX40 человека), при этом опционально антитело сконструировано для увеличения ADC, АЗКЦ и/или КЗЦ.

Эффективность Fc-опосредованных эффектов может быть повышена путем конструирования Fc-домена различными разработанными методами. Такие методы обеспечивают увеличение сродства к определенным Fc-рецепторам, в результате чего создаются потенциальные разнообразные профили, характеризующиеся повышенной активностью. Это может быть достигнуто путем модификации одного или нескольких аминокислотных остатков (например, которые описаны в Lazar et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Mar 14; 103(11):4005-10.) или путем изменения естественного профиля гликозилирования Fc-домена, например, путем создания вариантов с низкой степенью

фукозилирования или дефукозилированных вариантов (как описано в Natsume et al., 2009, Drug Des Devel Ther., 3:7-16). Например, для увеличения АЗКЦ, остатки в шарнирной области могут быть изменены для увеличения связывания с Fc-гамма RIII (См., например, Shields et al, 2001, J Biol Chem., Mar 2; 276(9):6591-604.).

В равной степени усиление КЗЦ можно достичь за счет аминокислотных замен, что увеличивает сродство к C1q, первому компоненту классического каскада активации комплемента (См. в Idusogie et al., J. Immunol., 2001; 166:2571-2575). Другой подход заключается в создании химерного Fc-домена, состоящего из IgG1 человека и сегментов IgG3 человека, которые харакеризуются более высоким сродством IgG3 к C1q (Natsume et al., 2008, Cancer Res., 68: 3863-3872).

Антитело может представлять собой нацеливающее антитело (как, например, антитело к OX40 или антитело к OX40L), которое реализует свои эффекты через токсин, к которому может быть конъюгировано антитело. Такие токсины обеспечивают избирательное уничтожение или удаление клетки, на которую они нацелены. Подходящие иммуноконъюгаты описаны на стр. 90 и на страницах 114-118 и 134 (в частности, 114-116) в данном документе.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент является дефукозилированным. В другом варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент включает одну или более мутаций в шарнирной или Fc-области, способствующих повышению АЗКЦ и/или КЗЦ.

Могут использоваться способы определения истощения и/или повышения АЗКЦ и/или КЗЦ, описанные в данном документе или хорошо известные специалистам в данной области.

Антитела к OX40 могут соответствовать тем, что описаны в документе WO 2014/148895 (Biocerox Products & Janssen Pharmaceuticals; см. формулу изобретения на страницах 138-139, что касается специфических последовательностей, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2013/068563 (Biocerox Products & Janssen Pharmaceuticals; см. формулу изобретения на страницах 138-139, что касается специфических последовательностей, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2013/130102 и WO 2013/119202 (Providence Health & Services - Oregon, см. mAb 9B12, которые описаны в Weinberg, A.D., et al., J. Immunother., 29, 575-585 (2006), и последовательности, слитые с IL-2, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2013/038191 (Bioceros B.V.; см. пункты 4-11 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2013/028231 (Board of Regents, the University of Texas System; см. пункты 1-12 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2013/008171 (Glenmark Pharmaceuticals S.A.; см. пункты 1, 2, 5-12, 16-21 и 28-29, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2012/027328 (Board of Regents, the University of Texas System; см. пункты 1-11 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2010/096418 (UCB Pharma S.A.; см. пункты 1-9 и 11-14 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2009/079335 (Medarex, Inc & Pfizer, Inc; см. пункты 1-9 и 14-17 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2008/106116 (Genentech, Inc; см. пункты 1-12 формулы изобретения, что касается специфических

последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 2007/062245 (Kirin Beer Kabushiki Kaisha & La Jolla Institute for Allergy and Immunology; см. пункт 12 формулы изобретения, что касается номеров депозитов специфических антител, и п. 16 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки), WO 03/106498 (Crucell Holland B.V.; см. пункты 3 и 4 формулы изобретения, что касается специфических последовательностей антител, которые включены в данный документ посредством ссылки).

Более конкретно, антитела к OX40 описаны в документах WO 99/42585, WO 95/21251, WO 95/21915 и WO 95/12673.

Концепция 53. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой антагонистическое или блокирующее антитело.

Способы определения антагонистической или блокирующей функции антител могут соответствовать таковым, которые описаны в данном документе или хорошо известны специалистам в данной области. Например, методы in vitro включают ППР и/или ИФА, которые описаны в других разделах в данном документе.

Концепция 54. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 53, причем антитело специфически связывается с OX40L (в частности, OX40L человека).

К антителам к OX40L может относиться любое антитело или фрагмент, которые описаны в данном документе. В одном варианте реализации изобретения антитело к OX40L представляет собой антагонистическое антитело к OX40L (gp34) человека ik-1, описанные Matsumura et al., J Immunol. (1999), 163:3007.

Концепция 55. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 56, отличающийся тем, что антитело подавляет специфическое связывание OX40 с OX40L, например, при оценке методом ППР или ИФА.

Могут быть использованы методы ППР и ИФА, которые описаны в данном документе.

Концепция 56. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой гуманизированное, человеческое или полностью соответствующее человеческому антитело.

Другие конструкции антител могут соответствовать таковым, которые описаны в данном документе.

Концепция 57. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из списка, состоящего из мультиспецифических антител (например, биспецифических антител), интраантител, одноцепочечных Fv антител (scFv), камелизированных антител, Fab-фрагментов, F(ab') -фрагментов, Fv, связаных дисульфидной связью (sdFv), антиидиотипических (анти-Id) антител и их эпитоп-связывающих фрагментов.

Концепция 58. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем применение антитела или фрагмента позволяет достичь уровня донорского химеризма стволовых клеток более 80% на 12-е сутки в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макаки-резус.

Концепция 59. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем экспрессия антитела или фрагмента осуществляется в виде пула, стабильно трансфецированного в систему Lonza GS-XceedTM на уровне, превышающем 1,5 г/л в культуре с подпиткой, характеризующейся избыточным клеточным ростом, с использованием системы питания Lonza версии 8 с периодом избыточного роста 14 суток.

Концепция 60. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит HCDR3, состоящий из 16-27 аминокислот и полученный при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02).

Концепция 61. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит HCDR3, выбранный из:

a. HCDR3 антитела 2D10 (Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46);

b. HCDR3 антитела 10A7 (Seq ID No: 8 или Seq ID No: 14);

c. HCDR3 антитела 09H04 (Seq ID No: 72 или Seq ID No: 78);

d. HCDR3 антитела 19H01 (Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106);

e. CDR3 любого из нанотел, раскрытых в WO 2011/073180 (Ablynx, Seq ID No: 161-167 в упомянутом выше документе, который включен в данный документ посредством ссылки);

f. HCDR3 любого из антител, раскрытых в WO 2006/029879 (Roche/Genentech, Seq ID No: 33-38 в упомянутом выше документе, который включен в данный документ посредством ссылки); или

g. HCDR3 любого из антител, раскрытых в US 7812133 (Genentech, Seq ID No: 11-12 в упомянутом выше документе, который включен в данный документ посредством ссылки).

Концепция 62. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит:

a. CDR антитела 2D10 (Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46 для CDRH3, SEQ ID No: 38 или Seq ID No: 44 для CDRH2, SEQ ID No: 36 или Seq ID No: 42 для CDRH1, SEQ ID No: 50 или Seq ID No: 56 для CDRL1, SEQ ID No: 52 или Seq ID No: 58 для CDRL2 и SEQ ID No: 54 или Seq ID No: 60 для CDRL3);

b. CDR антитела 10A7 (Seq ID No: 8 или Seq ID No: 14 для CDRH3, SEQ ID No: 6 или Seq ID No: 12 для CDRH2, SEQ ID No: 4 или Seq ID No: 10 для CDRH1, SEQ ID No: 18 или Seq ID No: 24 для CDRL1, SEQ ID No: 20 или Seq ID No: 26 для CDRL2 и SEQ ID No: 22 или Seq ID No: 28 для CDRL3);

c. CDR антитела 09H04 (Seq ID No: 72 или Seq ID No: 78 для CDRH3, SEQ ID No: 70 или Seq ID No: 76 для CDRH2, SEQ ID NO:68 или Seq ID No: 74 для CDRH1, SEQ ID No: 82 или Seq ID NO: 88 для CDRL1, SEQ ID No: 84 или Seq ID No: 90 для CDRL2 и SEQ ID NO:86 или Seq ID No: 92 для CDRL3);

d. CDR антитела 19H01 (Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106 для CDRH3, SEQ ID No: 98 или Seq ID No: 104 для CDRH2, SEQ ID No: 96 или Seq ID No: 102 для CDRH1, SEQ ID No: 110 или Seq ID No: 116 для CDRL1, SEQ ID No: 112 или Seq ID No: 118 для CDRL2 и SEQ ID No: 114 или Seq ID No: 120 для CDRL3);

e. CDR любого из нанотел, раскрытых в WO 2011/073180 (Ablynx: Seq ID No: 161-167

в упомянутом выше документе для CDR3; Seq ID No: 147-153 в упомянутом выше документе для CDR2; и Seq IDNo: 133-139 в упомянутом выше документе для CDR1, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки);

f. CDR любого из антител, раскрытых в WO 2006/029879 (Roche/Genentech: Seq ID No: 33-38 в упомянутом выше документе для CDRH3; Seq ID No: 21-25 в упомянутом выше документе для CDRH1 и Seq ID No: 26-32 в упомянутом выше документе для CDRH2; Seq ID No: 39-44 в упомянутом выше документе для CDRL1; Seq ID No: 45-50 в упомянутом выше документе для CDRL2; и Seq ID No: 51-57 в упомянутом выше документе для CDRL3, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки); или

g. CDR любого из антител, раскрытых в US7812133 (Genentech: Seq ID No: 11 или 12 в упомянутом выше документе для CDRH3; Seq ID No: 7 или 8 в упомянутом выше документе для CDRH1 и Seq ID NO: 9 или 10 в упомянутом выше документе для CDRH2; Seq ID No: 1 или 2 в упомянутом выше документе для CDRL1; Seq ID No: 3 или 4 в упомянутом выше документе для CDRL2; и Seq ID No: 5 или 6 в упомянутом выше документе для CDRL3, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки).

Концепция 63. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит VH- и/или VL-домены, выбранные из следующих:

a. VH- и/или VL-доменов антитела 2D10 (Seq ID No: 34 для VH и/или Seq ID No: 48 для VL);

b. VH- и/или VL-доменов антитела 10A7 (Seq ID No: 2 для VH и/или Seq ID No: 16 для VL);

c. VH- и/или VL-доменов антитела 09H04 (Seq ID NO:66 для VH и/или Seq ID No: 80 для VL);

d. VH- и/или VL-доменов антитела 19H01 (Seq ID No: 94 для VH и/или Seq ID No: 108 для VL);

e. VH-доменов любого из нанотел, раскрытых в WO 2011/073180 (Ablynx, Seq ID No: 177-185, 199-226 в упомянутом выше документе, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки [представлены в данном документе как Seq ID No: 177-213]);

f. VH- и/или VL-доменов любого из антител, раскрытых в WO 2006/029879 (Roche/Genentech, Seq ID No: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 19 и 20 в упомянутом выше документе для VH-доменов; и Seq ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 16 и 18 для VL-доменов, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки [представлены в данном документе как Seq ID No: 214-230]); или

g. VH- и/или VL-домены любого из антител, раскрытых в US7812133 (Genentech, Seq ID No: 15 и 16 в упомянутом выше документе для VH-доменов; и Seq ID No: 13 и 14 для VL-доменов, последовательности которых включены в данный документ посредством ссылки [представлены в данном документе как Seq ID No: 231-234]).

Концепция 64. Способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой окселумаб.

Концепция 65. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем Tscm-клетки и/или Tn-клетки представляют собой CD4+.

В другом варианте реализации изобретения Tscm-клетки и/или Tn-клетки

представляют собой CD8+.

Концепция 66. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 64, причем Tscm-клетки и/или Tn-клетки представляют собой циркулирующие Т-клетки.

Концепция 67. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 65, причем Tscm-клетки и/или Tn-клетки содержатся в образце крови, например, периферической крови.

Несмотря на то, что Т-клетки, содержащиеся в крови, относительно просто выделить и охарактеризовать, Т-клетки, которые содержатся в тканях субъекта, обычно более сложно выделить. В связи с этим представляется возможным выделение Т-клеток из различных тканей (таких как кожа, ткани ЖКТ, например, кишечник, и из воспаленных суставов, например, синовиальная оболочка).

Концепция 68. Способ в соответствии с любой из концепций 9-11, 16, 20-39 или 43-67, средство или антитело, или фрагмент для применения в соответствии с любой из концепций 12, 17, 20, 21, 23-25 или 44-67, применение в соответствии с любой из концепций 13, 14, 18-20 или 23-25, или 44-67, или композиция в соответствии с любой из концепций 15 или 44-67, причем субъект представляет собой человека.

Концепция 69. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 68, причем субъект подвержен риску развития Tscm-опосредованного заболевания или состояния.

Концепция 70. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 68, причем у субъекта наблюдается Tscm-опосредованное заболевание или состояние.

Концепция 71. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние опосредовано CD45RA+CCR7+ CD95+OX40+ Tscm-клетками.

Концепция 72. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой из концепций 68-70, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние характеризуется соотношением CD45RA+ CCR7+CD95+OX40+ Tscm-клеток и CD45RA+CCR7+CD95- Tn-клеток более чем 50:50.

В другом варианте реализации изобретения заболевание или состояние характеризуется соотношением Tscm-клеток и Tn-клеток, которое изложено в любой из концепций 23-25.

Концепция 73. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 72, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние характеризуется соотношением Tscm и Tn более чем 60:40, или более чем 70:30, или более чем 75:25, как, например, более чем 70: 30.

Концепция 74. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 73, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние характеризуется соотношением Tscm и Tn более чем 80:20, или более чем 85:15, например, более чем 90:10, например, более чем 95:5.

Концепция 75. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние выбирают из аутоимунного заболевания, ВИЧ-1 и Т-клеточной злокачественной опухоли.

Концепция 76. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 75, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние выбирают из БТПХ, отторжения трансплантата, псориаза, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, множественного склероза, юношеского дерматомиозита, Т-клеточной лимфомы и Т-клеточного лейкоза.

Концепция 77. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 76, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата.

Концепция 78. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 76, причем трансплантация представляет собой трансплантацию клеток, тканей или органов (например, печени, легкого, сердца, почек и кишечника) или трансплантацию клеток крови (например, аутологичных или аллогенных), причем клетки крови, например, представляют собой клетки костного мозга, клетки кордовой (пуповинной) крови или клетки периферической крови.

В одном варианте реализации изобретения трансплантация относится к трансплантации CAR Т-клеток (химерный антигенный рецептор).

Концепция 79. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 76, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние представляет собой Т-клеточную лимфому, выбранную из Т-клеточной неходжкинской лимфомы, периферической Т-клеточной лимфомы (PTCL), анапластической крупноклеточной лимфомы (ALCL), ангиоиммунобластной лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых, бластной NK-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы типа энтеропатии, гепатоспленической гамма-дельта Т-клеточной лимфомы, лимфобластной лимфомы (T-LBL) и NK/T - клеточной лимфомы назального типа.

Концепция 80. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с концепцией 76, причем Tscm-опосредованное заболевание или состояние представляет собой Т-клеточный лейкоз, выбранный из лейкоза крупных гранулярных лимфоцитов (LGLL), Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (T-PLL), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL) и синдрома Сезари.

Концепция 81. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку дополнительного терапевтического средства, которое при этом может быть независимо выбрано из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например,

базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, в частности, рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52 (например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из группы, состоящей из ингибиторов кальциневрина (например, такролимуса, циклоспорина), ингибиторов mTOR (например, рапамицина (сиролимуса)) и антипролиферативных средств (например, мофетила микофенолата, циклофосфамида).

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из группы, состоящей из иммуносупрессантов, которые модулируют передачу сигнала IL-2 (например, такролимуса, циклоспорина, рапамицина (сиролимуса) и антител к CD25 (например, базиликсимаба, даклизумаба).

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат.

Концепция 82. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества рапамицина.

Концепция 83. Способ, средство или антитело, или фрагмент для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества такролимуса.

Авторы настоящего изобретения неожиданным образом обнаружили, что антитело к OX40L может оказывать синергическое действие при введении в ходе комбинированной терапии с дополнительным терапевтическим средством. С этой целью ниже приведены дополнительные концепции:

Концепция 101. Антитело к OX40L или его фрагмент для применения в лечении или уменьшении риска развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, независимо выбранным из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к

LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

Концепция 102. Применение антитела к OX40L или его фрагмента для лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, независимо выбранным из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

Концепция 103. Применение антитела к OX40L или его фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, независимо выбранным из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

Концепция 104. Композиция, содержащая антитело к OX40L или его фрагмент, для лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, независимо выбранным из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к

LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

Концепция 105. Способ лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, включающий введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антител к OX40L или его фрагмента в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, независимо выбранным из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, что и обеспечивает лечение или предотвращение OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В любой из концепций, описанных в настоящем документе, комбинация может быть использована для предотвращения OX40L-опосредованного заболевания. В любой из концепций комбинация может быть использована для уменьшения риска развития OX40L-опосредованного заболевания. В любой из концепций комбинация может быть использована для лечения OX40L-опосредованного заболевания.

Термин «комбинация», как описано в данном документе, может соответствовать определению, представленному в других разделах данного документа, например, на странице 100, на страницах 105-107 и на страницах 119-120. В одном варианте реализации изобретения заболевание представляет собой ревматоидный артрит или псориаз, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к IL-17 (как, например, бродалумаб, секукинумаб и иксекизумаб). Комбинации можно вводить одновременно или последовательно. Введение может производиться любым из способов, раскрытых в данном документе, например, как обсуждалось в разделе под названием «Способы введения и дозировка», начиная со страницы 130 данного документа.

Используемый в любой из концепций в данном документе термин «лечение» OX40L-опосредованного заболевания охватывает уменьшение одного или более симптома(ов) указанного OX40L-опосредованного заболевания. Лечение можно интепретировать, как описано в других разделах данного документа, например, на странице 107 и в разделе под названием «Наборы» (начиная со страницы 149, в частности, на странице 152)

Воздействие иммуносупрессивными препаратами при ведении БТПХ, ассоциированной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), можно применять для лечения пациентов с подтвержденным заболеванием. Шкала оценки

БТПХ может быть установлена, как описано ниже.

В одном варианте реализации изобретения введение является профилактическим для уменьшения риска развития OX40L-опосредованного заболевания. Используемый в концепциях в данном документе термин «предотвращение» (или «предотвращать», или «предотвращение» и тому подобное) OX40L-опосредованного заболевания охватывает предотвращение одного или более симптома(ов) указанного OX40L-опосредованного заболевания. Предотвращение может обозначать полное или частичное подавление развития, рецидива, начала или распространения OX40L-опосредованного заболевания и/или связанных с ним симптомов, в результате применения комбинации терапевтических средств, представленных в данном документе (например, комбинация профилактических и/или терапевтических средств). Предотвращение можно интепретировать, как раскрыто в других разделах данного документа.

Воздействие иммуносупрессивными препаратами при ведении БТПХ, ассоциированной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), можно применять для предотвращения развития заболевания у пациентов, которые подвержены риску его развития.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения профилактически эффективную дозу вводят до начала развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния. Используемый в концепциях в данном документе термин «субъект» может, согласно определению, означать субъекта «до начала OX40L-опосредованного заболевания или состояния», если у субъекта не проявляются никакие симптомы, которые обычно ассоциированы с указанным заболеванием или состоянием, или если у субъекта не диагностируется такое заболевание или состояние любым стандартным методом. В другом варианте реализации изобретения введение, которое производится до начала развития заболевания, может называться «предупреждающим лечением», что обозначает применение дополнительных терапевтических средств (как, например, иммунодепрессивных средств) и/или антитела к OX40L настоящего изобретения, у субъектов, подверженных риску развития заболевания и при потенциальном наличии ранних признаков, свидетельствующих о том, что появлние клинически значимой БТПХ является неминуемым. Например, экспериментальный или прогностический сывороточный или клеточный биомаркер может определять оптимальное время для инициации предупреждающего лечения БТПХ.

Например, признаки и симптомы острой БТПХ у человека могут быть классифицированы по уровню или степени в соответствии со стандартизированной шкалой, как, например, описано в работе Przepiorka et al. У приматов, как, например, макаки-резус, признаки и симптомы острой БТПХ могут быть классифицированы по уровню или степени на разных стадиях в соответствии со стандартизированной шкалой, которая описана в Примере 7 данного документа. Подобные шкалы оценивания заболевания также часто используются в клинической практике в случае других соответствующих заболеваний, таких как ревматоидный артрит и воспалительные заболевания кишечника.

Термины «предотвращение» или «профилактика» могут соответствовать тем, что описаны в аспекте 94 в данном документе, причем дозировки и интервалы введения антитела к OX40L соответствуют описанным. Профилактическое средство может быть использовано в любом из способов, описанных на странице 102-103.

OX40L-опосредованные заболевания или состояния могут представлять сообой любые из заболеваний или состояний, упомянутых в данном документе, включая те, что указаны в других разделах данного документа, как Tscm-опосредованные

заболевания или состояния (см. концепции 75-80 выше). В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованные заболевания или состояния соответствуют описанным в любом из аспектов 12, 12a, 69, 69a, 71, 72, 72a, 90-93, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованные заболевания или состояния соответствуют описанным в любом из аспектов 12, 12a, 69, 69a, 71, 72, 72a, 90-93, как описано в данном документе. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой hOX40L-опосредованное заболевание или состояние, которые описаны в данном документе, например, на страницах 103-104 или на странице 131. В другом варианте реализации изобретения OX40L-опосредованные заболевания или состояния соответствуют описанным в разделе под названием «Способы введения и дозировка», начиная со страницы 130 данного документа. В предпочтительном варианте реализации изобретения заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. В другом варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой болезнь Крона. В другом варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). В другом варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой язвенный колит. В другом варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой псориаз.

В любой из концепций, описанных в данном документе, субъекту вводят антитело к OX40L и/или дополнительное терапевтическое средство. Введение может осуществляться любым описанным в данном документе способом, например, как описано на странице 93 или в разделах под названием «Фармацевтические композиции» и «Способы введения», начиная на страницах 118 и 130, соответственно. В одном варианте реализации изобретения антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят внутривенно. В одном варианте реализации изобретения антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят подкожно.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус) и вводится перорально. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус и вводится перорально. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой метотрексат и вводится перорально и/или внутривенно. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин и вводится внутривенно и/или перорально. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид и вводится внутривенно и/или перорально. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой метилпреднизолон и вводится перорально и/или внутривенно.

Концепция 106. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой из концепций 101-105, отличающиеся тем, что время выживаемости субъекта после лечения или профилактики составляет по меньшей мере 14 суток или по меньшей мере 21 сутки, или по меньшей мере 28 суток, или по меньшей мере 40 суток, или по меньшей мере 50 суток, или по меньшей мере 60 суток.

Концепция 107. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из концепций 101-105, отличающиеся

тем, что выживаемость субъекта после профилактики составляет по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14 суток, или по меньшей мере 21 сутки, или по меньшей мере 28 суток, или по меньшей мере 40 суток, или по меньшей мере 50 суток, или по меньшей мере 60 суток

Концепция 108. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из концепций 101- 105, отличающийся тем, что выживаемость субъекта без прогрессирования заболевания после лечения составляет по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14 суток, или по меньшей мере 21 сутки, или по меньшей мере 28 суток, или по меньшей мере 40 суток, или по меньшей мере 50 суток, или по меньшей мере 60 суток.

Концепция 109. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из концепций 106-108, отличающиеся тем, что число суток выживаемости, число суток выживаемости при полном отсутствии заболевания или число суток выживаемости без прогрессирования заболевания составляет по меньшей мере 2 месяца или по меньшей мере 3 месяца, или по меньшей мере 4 месяца, например, по меньшей мере 5 месяцев, как, например, по меньшей мере 6 месяцев.

Концепция 110. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с концепцией 109, отличающиеся тем, что число суток выживаемости, число суток выживаемости при полном отсутствии заболевания или число суток выживаемости без прогрессирования заболевания составляет по меньшей мере 9 месяцев, или по меньшей мере один год.

Концепция 111. Способ предотвращения начала OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта путем введения профилактически эффективного количества антител к OX40L и введения профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, отличающиеся тем, что предотвращается начало OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

Под «профилактически эффективной» подразумевается, что доза является эффективной для предотвращения или уменьшения риска развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В одном варианте реализации изобретения комбинация может быть использована для уменьшения риска развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния. В концепции 111 антитело к OX40L по настоящему изобретению и дополнительное терапевтическое средство могут быть введены пациенту в целях профилактики, причем введение может быть последовательным или совместным. Для введения дополнительного

терапевтического средства могут быть использованы схемы и способы введения, которые стандартно или традиционно применяются врачами. Для введения антител к OX40L по настоящему изобретению могут быть использованы схемы и способы введения, которые стандартно или традиционно применяются врачами. Однако предполагается, что сопутствующее применение обоих лекарственных средств обеспечит улучшенное профилактическое действие по сравнению с каждым из лекарственным средств, применяемым в виде монотерапии.

Концепция 112. Способ лечения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта путем введения профилактически эффективного количества антител к OX40L и введения терапевтически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, что обеспечивает лечение OX40L-опосредованного заболевания или состояния на начальной стадии.

Под «терапевтически эффективной» подразумевается, что доза является эффективной для лечения OX40L-опосредованного заболевания или состояния. Термин «эффективный» может соответствовать определению, приведенному на страницах 96-97, или на странице 152 в данном документе, и может обозначать концентрации в сыворотке крови, как описано в разделе под названием «Фармацевтические композиции», начиная со страницы 118 в данном документе.

В концепции 112 пациенту можно вводить антитело к OX40L по настоящему изобретению, но OX40L-опосредованное заболевание или состояние начинается независимо от профилактических мер (начало заболевания может быть отсрочено на несколько дней или недель по сравнению с пациентом, который не получал антитело по настоящему изобретению). В этом случае для лечения заболевания или состояния можно вводить терапевтически эффективное количество дополнительного терапевтического средства.

Концепция 113. Способ лечения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антител к OX40L и введения профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных

глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, что обеспечивает лечение OX40L-опосредованного заболевания или состояния на начальной стадии.

В концепции 113 пациенту можно вводить антитело к OX40L по настоящему изобретению, но OX40L-опосредованное заболевание или состояние начинается независимо от профилактических мер (начало заболевания может быть отсрочено на несколько дней или недель по сравнению с пациентом, который не получал антитело по настоящему изобретению). В этом случае для лечения заболевания или состояния можно вводить терапевтически эффективное количество антител к OX40L по настоящему изобретению.

Концепция 114. Способ лечения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антител к OX40L и введения терапевтически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, что обеспечивает лечение OX40L-опосредованного заболевания или состояния на начальной стадии.

В концепции 114 как антитело к OX40L по настоящему изобретению, так и дополнительное терапевтическое средство не вводят до тех пор, пока отмечаются клинические признаки OX40L-опосредованного заболевания или состояния. Комбинированное лечение обоими средствами может оказывать дополнительное благоприятное воздействие по сравнению с каждым из лекарственным средств, применяемым в виде монотерапии.

Концепция 115. Способ в соответствии с концепцией 111 или концепцией 113, отличающийся тем, что дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, комбинации такролимуса и метотрексата, циклофосфамида, циклоспорина, и комбинации циклоспорина и метотрексата.

В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата,

в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат.

В одном варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает рапамицин (сиролимус). В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает такролимуса. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает комбинацию такролимуса и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает комбинацию циклоспорина и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L вводят пациенту, который уже получает мофетил микофенолата.

Эти дополнительные терапевтические средства могут быть использованы в профилактических целях при лечении OX40L-опосредованных заболеваний или состояний. Например, при БТПХ превентивную терапию (профилактику) обычно применяют во время проведения ТГСК и продолжают в течение некоторого периода времени после трансплантации для поддержания иммуносупрессии на протяжении периода наибольшего риска развития острой БТПХ. Конкретные схемы приема лекарственных средств отличаются в зависимости от центров трансплантации, но в качестве примера профилактическое лечение ингибиторами кальциневрина такими как, например, циклоспорином или такролимусом, или рапамицином (сиролимусом) можно начать в течение 7-дневного периода перед трансплантацией (как, например, День -3 или День -1 перед ТГСК) или сразу непосредственно после процедуры ТГСК (например, в День 0 или Day +1 после трансплантации). Мофетил микофенолата обычно вводят в профилактических дозах после ТГСК, например, начиная со Дня +1 до Дня +5 после трансплантации. Профилактическое лечение этими средствами можно продолжить, например, от 28 до 180 суток или дольше после трансплантации, причем суточные дозировки рассчитываются с целью поддержания уровеней в сыворотке крови в диапозене, позволяющем достигнуть эффективной иммуносупрессии без ограничения побочных эффектов. Помимо ингибиторов кальциневрина метотрексат часто используют в качестве дополнительного профилактического средства, которое обычно вводят в Дни +1, +3, +6 и +11 после трансплантации.

Антитело к OX40L по настоящему изобретению можно использовать в качестве профилактического средства в комбинации с такролимусом, циклоспорином, комбинацией такролимуса и метотрексата, комбинацией циклоспорина и метотрексата, циклофосфамидом, мофетилом микофенолата или рапамицином, причем профилактическое лечение любым из этих средств начинают до или во время проведения ТГСК, или сразу же после процедуры трансплантации, например, в период со дня за 7 суток до трансплантации. Впоследствии такролимус или циклоспорин, или рапамицин можно вводить в терапевтически эффективной дозе и с терапевтически эффективной частотой, например, раз в сутки в течение вплоть до 180 суток после трансплантации. Антитело к OX40L по настоящему изобретению можно вводить параллельно, начиная с периода до ТГСК или во время проведения ТГСК, или сразу же после процедуры трансплантации, например, в период со дня за 7 суток до трансплантации до дня спустя 7 суток после трансплантации. Впоследствии антитело к OX40L можно вводить в терапевтически эффективной дозе и с терапевтически эффективной частотой, например, раз в две недели или раз в месяц в течение вплоть до 180 суток после трансплантации. При таких обстоятельствах можно предполагать, что сопряженное действие антитела к OX40L и дополнительного профилактического средства будет оказывать синергическое действие на предотвращение начала и/или тяжести БТПХ.

Концепция 116. Способ в соответствии с концепцией 112 или концепцией 114, отличающийся тем, что дополнительное терапевтическое средство представляет собой кортикостероид (например, метилпреднизолон).

В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой метилпреднизолон.

В случаях, когда происходит обострение БТПХ (например, даже несмотря на профилактику), лечение можно начать сразу же после подтверждения БТПХ II-й степени или выше. Кортикостероиды для системного применения, как, например, метилпреднизолон, относятся к лечению первой линии, которое можно осуществлять параллельно с профилактикой, например, ингибиторами кальциневрина, как, например, циклоспорином или такролимусом.

Если лечение или профилактика первой линии не обеспечивает подавление БТПХ, можно прибегнуть к «терапии спасения», в случае чего можно применять дополнительные ранее неиспользованные иммуносупрессоры, такие как рапамицин или мофетил микофенолата. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективное количество антител к OX40L по настоящему изобретению вводят пациенту, невосприимчивому к профилактике или лечению любым из средств: рапамицин, такролимус, такролимус в комбинации с метотрексатом, циклофосфамид, циклоспорин, циклоспорин в комбинации с метотрексатом или кортикостероиды (например, метилпреднизолон). В другом варианте реализации изобретения терапевтически эффективное количество антител к OX40L по настоящему изобретению вводят пациенту, невосприимчивому к профилактике или лечению любым из дополнительных терапевтических средств, упомянутых в данном документе. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L по настоящему изобретению применяют в качестве терапии спасения.

Концепция 117. Способ пролонгирования выживаемости субъекта с наличием OX40L-

опосредованного заболевания или состояния, или риском его развития путем введения терапевтической или профилактической комбинации антитела к OX40L и дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

В одном варианте реализации изобретения в таком случае OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. На тяжесть и прогрессирование заболевания в случае БТПХ влияет целый ряд факторов, как, например, режим подготовки пациента к трансплантации (например, миелоабляция путем облучения, химиотерапия лекарственными препаратами), степень гистотипирования донора и реципиента (HLA-типирование и/или родство донора и реципиента) и режимы терапевтического или профилактического лечения.

Однако, в целом, у приматов, таких как макаки-резус, которым была произведена гаплоидентичная трансплантация стволовых клеток, среднее время выживаемости (СВВ) после трансплантации и в отсутствие терапии составляет 8 суток.

Концепция 118. Способ в соответствии с концепцией 117, отличающийся тем, что выживаемость увеличивают по меньшей мере на 7 суток или по меньшей мере на 14 суток, или по меньшей мере на 20 суток, или по меньшей мере на 30 суток, или по меньшей мере на 40 суток, или по меньшей мере на 50 суток, или по меньшей мере на 60 суток, или по меньшей мере на 70 суток.

Концепция 119. Способ увеличения числа суток, в течение которых заболевание отсутствует или не развивается у субъекта с наличием OX40L-опосредованного заболевания или состояния или риском его развития, путем введения терапевтической или профилактической комбинации антитела к OX40L и дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например,

этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

В одном варианте реализации изобретения в таком случае OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. У людей признаки и симптомы острой БТПХ могут быть классифицированы по уровню или степени на разных стадиях в соответствии со стандартизированной шкалой, такой как, например, описанной в работе Przepiorka et al. У приматов, таких как макак-резус, признаки и симптомы острой БТПХ могут быть классифицированы по уровню или степени на разных стадиях в соответствии со стандартизированной шкалой, которая описана в примере 7 данного документа.

Таким образом, число суток выживаемости при полном отсутствии заболевания может определяться по отсутствию клинически проявлямых симптомов. Число суток выживаемости в отсутствие прогрессирования заболевания может быть определено как число суток, в течение которых значения оценки клинического состояния не изменяются.

Концепция 120. Способ в соответствии с концепцией 119, отличающийся тем, что число суток, в течение которых заболевание отсутствует или не развивается, составляет по меньшей мере 7 суток или по меньшей мере 14 суток, или по меньшей мере 21 сутки, или по меньшей мере 28 или по меньшей мере 40 суток, или по меньшей мере 50 суток, или по меньшей мере 60 суток, или по меньшей мере 70 суток.

Концепция 121. Способ в соответствии с концепцией 120, отличающийся тем, что число суток, в течение которых заболевание отсутствует или не развивается, составляет по меньшей мере 90 суток, по меньшей мере 180 суток или по меньшей мере 365 суток.

Концепция 122. Способ лечения или уменьшения риска отторжения трансплантата или БТПХ у субъекта путем введения терапевтической или профилактической комбинации антитела к OX40L и дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата, отличающийся тем, что применение комбинации приводит к повышенной выживаемости в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макаки-резус по сравнению либо с антителом, либо дополнительным терапевтическим средством в качестве монотерапии.

В одном варианте реализации изобретения способ представляет собой способ предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание

или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности, БТПХ, а дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат.

Модель гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макаки-резус может соответствовать модели, которая описана в аспекте 99 в данном документе.

Концепция 123. Способ в соответствии с любой из концепций 106, 109, 110, 117, 119 или 122, отличающийся тем, что выживаемость увеличивают по меньшей мере на 7 суток или по меньшей мере на 14 суток, или по меньшей мере на 21 сутки, или по меньшей мере на 28 суток, или по меньшей мере на 40 суток, или по меньшей мере на 50 суток, или по меньшей мере на 60 суток, или по меньшей мере на 70 суток по сравнению либо с антителом, либо дополнительным терапевтическим средством в качестве монотерапии.

Концепция 124. Способ в соответствии с любой из концепций 106, 109, 110, 117, 119 или 122, отличающийся тем, что выживаемость увеличивают по меньшей мере в два раза, например, три раза, по сравнению либо с антителом, либо дополнительным терапевтическим средством в качестве монотерапии.

Концепция 125. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из предшествующих концепций, отличающийся тем, что антитело специфически связывается с OX40L (hOX40L) человека.

HOX40L может соответствовать тому, что описано в аспекте 28 или аспекте 30, описанных в данном документе.

В любой из концепций, представленных в данном документе, антитело к OX40L может быть таким, как описано в других разделах данного документа. В одном варианте реализации изобретения антитело к OX40L является таким, как описано в любом из аспектов 1-11, 13-27, 29, 31-43 или 45, описанных в данном документе. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L является таким, как описано в аспектах 73-89, или как в любом из аспектов 95-102, описанных в данном документе. В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L является таким, как описано в любой из концепций 53-66 в данном документе выше. Другие свойства антител к OX40L описаны на страницах 86-89, в разделе под названием «Биспецифические антитела», начиная со страницы 90 данного документа, в разделе под названием «Антитела»,

начиная со страницы 108 данного документа и в разделе под названием «Способы введения и дозировка», начиная со страницы 130 данного документа.

Концепция 126. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 125, при которых наблюдается конкуренция за связывание с указанным hOX40L с антителом, выбранным из группы, состоящей из 02D10, 10A07, 09H04 и 19H01.

Конкуренцию между антителами можно определить, как описано в аспекте 13 или аспекте 73, например, при оценке методами ППР, ИФА, HTRF или FACS. Способы, связанные со способами измерения, раскрытыми в данном документе, в том числе в разделе «Примеры».

Концепция 127. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с концепцией 126, при которых наблюдается конкуренция за связывание с указанным hOX40L с антителом 02D10, причем антитело или фрагмент содержит VH-домен, который содержит HCDR3, содержащий мотив VRGXYYY, где X представляет собой любую аминокислоту.

Концепция 128. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой из предшествующих концепций, причем антитело подавляет специфическое связывание OX40 с OX40L, например, при оценке методом ППР или ИФА.

Антагонизм и ингибирование могут быть обеспечены, как определено на страницах 94-95.

Концепция 129. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой гуманизированное, человеческое или полностью соответствующее человеческому антитело.

Концепция 130. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из списка, состоящего из мультиспецифических антител (например, биспецифических антител), интраантител, одноцепочечных Fv антител (scFv), камелизированных антител, Fab-фрагментов, F(ab')-фрагментов, Fv, связаных дисульфидной связью (sdFv), антиидиотипических (анти-Id) антител и их эпитоп-связывающих фрагментов.

Концепция 131. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем применение антитела или фрагмента позволяет достичь уровня донорского химеризма стволовых клеток более 80% на 12-е сутки в модели гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток макаки-резус.

Концепция 132. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, где экспрессия антитела или фрагмента осуществляется в виде пула, стабильно трансфецированного в систему Lonza GS-XceedTM на уровне, превышающем 1,5 г/л в культуре с подпиткой, характеризующейся избыточным клеточным ростом, с использованием системы питания Lonza версии 8 с периодом избыточного роста 14 суток.

Концепция 133. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит HCDR3 из 16-27 аминокислот и полученный при помощи рекомбинации сегмента гена VH человека, сегмента гена D человека и

сегмента гена JH человека, причем сегмент гена JH человека представляет собой IGHJ6 (например, IGHJ6*02).

Концепция 134. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит CDR, выбранную из:

a. HCDR3 антитела 2D10 (Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46);

b. HCDR3 антитела 10A7 (Seq ID No: 8 или Seq ID No: 14);

c. HCDR3 антитела 09H04 (Seq ID No: 72 или Seq ID No: 78);

d. HCDR3 антитела 19H01 (Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106);

e. CDR3 любого из нанотел, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области Seq ID No: 177-213;

f. HCDR3 любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области Seq ID No: 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 или 230; или

g. HCDR3 любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области Seq ID No: 232 или 234.

Концепция 135. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит:

a. CDR антитела 2D10 (Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46 для CDRH3, SEQ ID No: 38 или Seq ID No: 44 для CDRH2, SEQ ID No: 36 или Seq ID No: 42 для CDRH1, SEQ ID No: 50 или Seq ID No: 56 для CDRL1, SEQ ID No: 52 или Seq ID No: 58 для CDRL2 и SEQ ID No: 54 или Seq ID No: 60 для CDRL3);

b. CDR антитела 10A7 (Seq ID No: 8 или Seq ID No: 14 для CDRH3, SEQ ID No: 6 или Seq ID No: 12 для CDRH2, SEQ ID No: 4 или Seq ID No: 10 для CDRH1, SEQ ID No: 18 или Seq ID No: 24 для CDRL1, SEQ ID No: 20 или Seq ID No: 26 для CDRL2 и SEQ ID No: 22 или Seq ID No: 28 для CDRL3);

c. CDR антитела 09H04 (Seq ID No: 72 или Seq ID No: 78 для CDRH3, SEQ ID No: 70 или Seq ID No: 76 для CDRH2, SEQ ID No: 68 или Seq ID No: 74 для CDRH1, SEQ ID No: 82 или Seq ID No: 88 для CDRL1, SEQ ID No: 84 или Seq ID No: 90 для CDRL2 и SEQ ID No: 86 или Seq ID No: 92 для CDRL3);

d. CDR антитела 19H01 (Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106 для CDRH3, SEQ ID No: 98 или Seq ID No: 104 для CDRH2, SEQ ID No: 96 или Seq ID No: 102 для CDRH1, SEQ ID No: 110 или Seq ID No: 116 для CDRL1, SEQ ID No: 112 или Seq ID No: 118 для CDRL2 и SEQ ID No: 114 или Seq ID No: 120 для CDRL3);

e. CDR любого из нанотел, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области Seq ID No: 177-213;

f. CDR тяжелой цепи любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи Seq ID No: 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 или 230, и CDR легкой цепи любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи Seq ID No: 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226 или 228; или

g. CDR тяжелой цепи любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи Seq ID No: 232 или 234, и CDR легкой цепи любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи Seq ID No: 231 или 233.

Концепция 136. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело или его фрагмент содержит VH- и/или VL-домены, выбранные из

следующих:

a. VH- и/или VL-доменов антитела 2D10 (Seq ID No: 34 для VH и/или Seq ID No: 48 для VL);

b. VH- и/или VL-доменов антитела 10A7 (Seq ID No: 2 для VH и/или Seq ID No: 16 для VL);

c. VH- и/или VL-доменов антитела 09H04 (Seq ID No: 66 для VH и/или Seq ID No: 80 для VL);

d. VH- и/или VL-доменов антитела 19H01 (Seq ID No: 94 для VH и/или Seq ID No: 108 для VL);

e. VH-домена любого из нанотел, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области Seq ID No: 177-213;

f. VH-домена любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи Seq ID No: 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 или 230, и VL-домена любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи Seq ID No: 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226 или 228; или

g. VH-домена любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи Seq ID No: 232 или 234, и VL-домена любого из антител, имеющих аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи Seq ID No: 231 или 233.

Концепция 137. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем антитело представляет собой окселумаб.

Концепция 138. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем субъект представляет собой примата.

Термин «субъект» может обозначать других субъектов, которые описаны в данном документе, например, которые описаны на странице 104. В одном варианте реализации изобретения примат представляет собой макак-резус.

Концепция 139. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем субъект представляет собой человека.

В одном варианте реализации изобретения субъект представляет собой человека.

Концепция 140. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем субъект подвержен риску развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В одном варианте реализации изобретения субъект может быть идентифицирован, как «подверженный риску развития OX40L-опосредованного заболевания или состояния», если субъекта ранее идентифицировали как подверженного повышенному риску, например, путем генотипирования и/или фенотипирования, но у субъекта еще не проявляются симптомы или диагностируется такое заболевание или состояние любым стандартным способом. Таким образом, способы и области применения, описанные в данном документе, можно использовать для своевременного выявления пациентов, у которых будут развиваться такие заболевания или состояния. В одном варианте реализации изобретения обеспечивается предотвращение заболевания или состояния (то есть лечение является профилактическим).

В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или

состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности БТПХ. В конкретном варианте реализации изобретения субъект подвержен риску развития БТПХ или отторжения трансплантата, если они развиваются в предоперационный период. В частности, субъект подвержен риску развития БТПХ или отторжения трансплантата после начала режима подготовки пациента к трансплантации (например, миоаблации путем облучения, химиотерапии лекарственными препаратами) и когда степень гистотипирования донора и реципиента (HLA-типирование и/или родство донора и реципиента) не составляет 100%. Потенциальная трансплантационная терапия предусматривается в концепции 78 выше данном документе.

Концепция 141. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 40, причем указанный способ, антитело или фрагмент для применения, применение или композиция предназначены для предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

Концепция 142. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из концепций 101-139, причем у субъекта наблюдается OX40L-опосредованное заболевание или состояние.

У субъекта наблюдается OX40L-опосредованное заболевание или состояние, если у субъекта проявляются симптомы, которые обычно ассоциированы с указанным заболеванием или состоянием, или если у субъекта диагностируется такое заболевание или состояние любым стандартным способом. В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности БТПХ, и у субъекта может быть выявлено заболевание любым из способов, упомянутых в концепциях 101-105 и 119 в данном документе выше.

Концепция 143. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 142, причем указанные способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение предназначены для лечения OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

В одном варианте реализации изобретения лечение начинают, когда OX40L-опосредованное заболевание или состояние было диагностировано как подтвержденное заболевание или состояние.

В одном варианте реализации изобретения OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляет собой БТПХ или отторжение трансплантата, в частности БТПХ. Шкалу оценки БТПХ можно определить, как описано в данном документе (См. Концепции 101-105 и 119 выше). В одном варианте реализации изобретения субъектом является человеком с клиническими симптомами БТПХ 2-й степени.

Концепция 144. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем OX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из аутоимунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата.

Концепция 145. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 144, причем OX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности,

множественного склероза и атеросклероза.

Концепция 146. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 145, причем OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляеет собой БТПХ или отторжение трансплантата.

Концепция 147. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 146, причем OX40L-опосредованное заболевание или состояние представляеет собой БТПХ.

Концепция 148. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 146, причем трансплантация представляет собой трансплантацию клеток, тканей или органов (например, печени, легкого, сердца, почек и кишечника), или трансплантацию клеток крови (например, аутологичных или аллогенных), причем клетки крови, например, представляют собой клетки костного мозга, клетки кордовой (пуповинной) крови или клетки периферической крови.

Концепция 149. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с любой из концепций 146-148, причем антитело к OX40L или его фрагмент вводят перед трансплантацией.

Концепция 150. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, или применение в соответствии с любой из концепций 146 to 148, причем антитело к OX40L или его фрагмент вводят после трансплантации.

Концепция 151. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 149 или концепцией 150, причем дополнительное терапевтическое средство вводят после трансплантации.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой метилпреднизолон.

Концепция 152. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения или применение в соответствии с концепцией 149 или концепцией 150, причем дополнительное терапевтическое средство вводят перед трансплантацией.

В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус). В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой такролимус. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию такролимуса и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклофосфамид. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой циклоспорин. В одном варианте

реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой комбинацию циклоспорина и метотрексата. В одном варианте реализации изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолат.

Концепция 153. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к OX40L или его фрагмент и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель, которая дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство, независимо выбранное из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата.

В одном варианте реализации изобретения предложена композиция или набор для лечения и/или предотвращения OX40L-опосредованного состояния или заболевания, причем композиция или набор содержат антитело или фрагмент по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством опционально в комбинации с листком-вкладышем или инструкциями по применению для лечения и/или предотвращения указанного заболевания или состояния у человека; при этом опционально листок-вкладыш или инструкции содержат номер регистрационного удостоверения (например, регистрационный номер, выданный FDA или EMA); опционально при этом набор содержит устройство для внутривенного введения или инъекций, которое содержит антитело или фрагмент.

Композиция может соответствовать той, что описана в аспекте 105, 106 или 107 в данном документе. Вспомогательные вещества для применения в фармацевтических препаратах хорошо известны специалисту в данной области и могут соответствовать определению на странице 97 в данном документе, или в разделе под названием «Фармацевтические композиции», начиная со страницы 118 в данном документе, или в разделе под названием «Способы введения и дозировка», начиная со страницы 130 данного документа.

Концепция 154. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем дополнительное терапевтическое средство независимо выбирают из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52 (например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

Предусмотрены другие комбинации с противовоспалительными средствами, описанными в аспекте 46 в данном документе, или, которые описаны в аспекте 103. Другие комбинации соответствуют описанным в концепциях 81-83 в данном документе выше или в любой из концепций 101-153 в данном документе выше.

Концепция 155. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина, такролимуса, циклоспорина, циклофосфамида, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата или мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта) и антитимоцитарных глобулинов.

Концепция 156. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина, такролимуса, циклоспорина, циклофосфамида, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата и мофетила микофенолата.

Концепция 157. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из иммунодепрессанта, который модулирует передачу сигнала IL-2 (например, такролимуса, циклоспорина, рапамицина (сиролимуса)), и антител к CD25 (например, базиликсимаба, даклизумаба).

Концепция 158. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества дополнительного терапевтического средства, независимо выбранного из группы, состоящей из ингибиторов кальциневрина (например, такролимуса, циклоспорина), ингибиторов mTOR (например, рапамицина (сиролимуса)) и антипролиферативных средств (например, мофетила микофенолата, циклофосфамида).

Концепция 159. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества рапамицина.

Концепция 160. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества такролимуса.

Концепция 161. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества такролимуса и метотрексата.

Концепция 162. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей

концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества циклоспорина.

Концепция 163. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества циклоспорина и метотрексата.

Концепция 164. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества циклофосфамида.

Концепция 165. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества мофетила микофенолата.

Концепция 166. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, которые дополнительно включают введение человеку терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества кортикостероида (например, метилпреднизолона).

Концепция 167. Способ, антитело или фрагмент для применения, композиция для применения, применение или композиция в соответствии с любой предшествующей концепцией, причем дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно или одновременно с антителом к hOX40L или фрагментом.

Как поясняется в примерах, авторы настоящего изобретения разработали набор критериев, которые обладают особой ценностью для идентификации антител и фрагментов по настоящему изобретению, причем эти критерии включают:

(a) способность антитела или фрагмента связывать hOX40L на клеточной поверхности клеток CHO-S (опционально трансфецированных полноразмерным человеческим OX40L) и/или связывать рекомбинантный hOX40L в анализе методом HTRF;

(b) способность антитела или фрагмента нейтрализовать OX40 человека (например, нейтрализовать связывание OX40L человека с рецептором OX40 человека) в анализе нейтрализации рецепторов методом HTRF и/или анализе нейтрализации рецептора методом проточной цитометрии; а также

(c) способность антитела или фрагмента специфически связывать OX40L как макаки-резус, так и человека (что дает возможнось оценки PK, PD, эффективности и других параметров антитела или фрагмента в модели на макаке-резус, замещающей человека).

Таким образом, в одном примере настоящего изобретения антитело или фрагмент соответствуют критериям (a), (b) и (c).

В одном примере критерий (a) задается таким образом, что антитело или фрагмент характеризуются <70% связывания рецептора с hOX40L, экспрессированным клетками CHO-S, по результатам FACS.

В одном примере критерий (a) задается таким образом, что антитело или фрагмент характеризуются <90% связывания рецептора с OX40L в анализе методом HTRF.

В одном примере критерий (a) задается таким образом, что антитело или фрагмент характеризуются по меньшей мере 20%-ным эффектом в анализе методом HTRF.

В одном примере OX40 используется в критерии (b).

В одном варианте реализации изобретения оценку или тестирование антитела или фрагмента по настоящему изобретению проводят при pH 7 или, по существу, при pH 7 (например, в случае in vitro тестов и анализов) и при комнатной температуре или, по существу, при комнатной температуре.

Антитело или фрагмент опционально специфически связываются с hOX40L с аффинностью (кажущаяся аффинность, Kd) менее чем 1 микроМ, от 1000 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 1000 пМ до 500 пМ, 500 пМ До 200 пМ, менее, чем 200 пМ, от 200 пМ до 150 пМ, от 200 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ, например, в диапазоне от 1 мМ до 1 пМ (например, от 1 мМ до 100 пМ; 10 нМ до 100 пМ; от 1 нМ до 10 пМ; или от 100 пМ до 1 пМ) при оценке методом SPR, например, при условиях проведения ППР, описанных в данном документе). В дополнительном или альтернативном варианте антитело или фрагмент специфически связывает OX40L макаки-резус с аффинностью (кажущаяся аффинность, Kd) менее чем 1 микроМ, от 1000 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 нМ, от 1000 пМ до 500 пМ, от 500 пМ до 200 пМ, менее чем 200 пМ, от 200 пМ до 150 пМ, от 200 пМ до 100 пМ, от 100 пМ до 10 пМ, от 10 пМ до 1 пМ, например, в диапазоне от 1 мМ до 1 пМ (например, 1 мМ до 100 пМ, от 10 нМ до 100 пМ, от 1 нМ до 10 пМ или от 100 пМ до 1 пМ), при оценке методом ППР, например, при условиях проведения ППР, описанных в данном документе. Такие измерения связывания можно провести с использованием различных анализов связывания, известных в данной области, например, с использованием поверхностного плазменного резонанса (ППР), как, например, с помощью BiacoreTM или с использованием ProteOn XPR36TM (Bio-Rad®), с использованием KinExA® (Sapidyne Instruments, Inc) или с использованием ForteBio Octet (Pall ForteBio Corp.).

Связывающую способность OX40L, специфичность и аффинность (Kd, K_{off} и/или Kon) можно определить любым стандартным способом, известным в данной области, например, посредством поверхностного плазменного резонанса (ППР). Используемый в данном документе термин «Kd» предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

В одном варианте реализации изобретения поверхностный плазменный резонанс (ППР) осуществляют при 25°C. В другом варианте реализации изобретения ППР осуществляют при 37°C.

В одном варианте реализации изобретения ППР осуществляют при физиологическом pH, таком как pH 7 или при pH 7,6 (например, используя буферный солевой раствор Hepes с pH 7,6 (также называемый HBS-EP)).

В одном варианте реализации изобретения ППР осуществляют при физиологическом содержании солей, например, 150 мМ NaCl.

В одном варианте реализации изобретения ППР осуществляют при содержании поверхностно-активного вещества не более 0,05% от объема, например, в присутствии P20 (полисорбат 20, например, Tween-20TM) при 0,05% и ЭДТА при 3 мМ.

В одном примере ППР осуществляют при 25°C или 37°C в буфере при pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества (например, P20) и 3 мМ ЭДТА. Буфер может содержать 10 мМ Hepes. В одном примере ППР осуществляют при 25°C или 37°C в HBS-EP. HBS-EP можно приобрести в Teknova Inc (Калифорния, номер по каталогу H8022).

В одном примере аффинность антитела или фрагмента определяют с использованием ППР путем

1. присоединения антитела к IgG мыши (например, BiacoreTM BR-1008-38) (или другого соответствующего IgG человека, крысы или не относящегося к человеку позвоночного с константной областью антитела совместимого вида животных) к чипу биосенсора (например, чипу GLM), таким как, например, путем присоединения по первичному амину;

2. экспозиции антитела IgG мыши (или другого антитела совместимого вида животных) с исследуемым антителом IgG для захвата исследуемого антитела на чипе;

3. пропускания исследуемого антигена по захватывающей поверхности чипа при 1024 нМ, 256 нМ, 64 нМ, 16 нМ, 4 нМ с 0 нМ (например, только буфер); а также

4. определения аффинности связывания исследуемого антитела с исследуемым антигеном с использованием поверхностного плазменного резонанса, например, при условиях проведения ППР, описанных выше (например, при 25°C в физиологическом буфере). ППР может проводиться с использованием любого стандартного устройства для осуществления ППР, такого как, например, BiacoreTM или с использованием ProteOn XPR36TM (Bio-Rad®).

Регенерацию поверхности захвата можно проводить с использованием 10 мМ глицина при pH 1,7. Это обеспечивает удаление захваченного антитела и использование поверхности для другого взаимодействия. Данные связывания можно апроксимировать к модели для связывания 1:1 с использованием стандартных методов, например, с использованием модели, характерной для аналитического программного обеспечения ProteOn XPR36TM.

В одном примере антитело или фрагмент по настоящему изобретению содержится в медицинском контейнере, например, флаконе, шприце, емкости или устройстве для внутривенного введения или инъекций (например, устройстве для внутриглазных или интравитреальных инъекций). В одном примере антитело или фрагмент применяется in vitro, например, в стерильной емкости. В одном примере в настоящем изобретении представлен набор, содержащий антитело или фрагмент по настоящему изобретению, упаковку и инструкции по применению в лечении или предотвращении, или диагностике у человека OX40L-опосредованного заболевания или состояния. В одном примере в инструкциях указано, что человек должен быть генотипирован по варианту последовательности OX40L по настоящему изобретению перед введением ему антитела или фрагмента. В одном примере инструкции в инструкциях указано, что человек должен быть фенотипирован по варианту последовательности OX40L до введения антитела или фрагмента человеку. В одном примере человек по этнической принадежности является китайцем (например, китаец хань или CHS), и инструкции представлены на китайском языке (например, Мандарин).

В одном примере сайт (сайты) связывания антитела или фрагмента выбирают из множества (например, библиотеки) сайтов связывания. Например, множество сайтов связывания содержит или состоит из множества 4-цепочечных антител или их фрагментов, например, dAb, Fab или scFv. Подходящие способы получения множества сайтов связывания для скрининга включают в себя фаговый дисплей (создание библиотеки сайтов связывания антител методом фагового дисплея), рибосомный дисплей (создание библиотеки сайтов связывания антител методом рибосомного дисплея), дрожжевой дисплей (создание библиотеки сайтов связывания антител методом дрожжевого дисплея) или иммунизацию позвоночного, отличного от человека (например, грызуна, например, мыши или крысы, например, VelocimouseTM, KymouseTM, XenomouseTM, Aliva MouseTM, HuMab MouseTM, OmnimouseTM, OmniratTM или MeMo MouseTM) эпитопом hOX40L или hOX40L и выделение репертуара

антителопродуцирующих клеток (например, репертуар В-клеток, плазматических клеток или плазмопластов) и/или репертуара выделенных антител, фрагментов или сайтов связывания.

Термин «эпитоп» - это область антигена, с которой связывается антитело или фрагмент. Эпитопы можно разделить на структурные или функциональные. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно вносят вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группы таких молекул, как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, а в определенных вариантах реализации изобретения могут обладать специфическими свойствами, определяемыми трехмерной структурой, и/или специфическими свойствами заряда.

Термин «выделенный» касательно любого аспекта настоящего изобретения, например, антитела или фрагмента, означает, что исследуемое антитело или фрагмент и т.д. (1) не содержат по меньшей мере некоторых других белков, с которыми они обычно всречаются (2) по существу, не содержат других белков из одного и того же источника, например, из одного и того же вида, (3) экспрессируются клетками другого вида, (4) были отделены по меньшей мере от около 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми они связаны в природе, (5) функционально связаны (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым они не связаны а природе, или (6) не встречаются в природе. Как правило, «выделенное» антитело, фрагмент и т.д. составляет по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 25% или по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 85% 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или >99% заданного образца. Геномная ДНК, кДНК, мРНК или другая РНК синтетического происхождения или любая их комбинация могут кодировать такое выделенное антитело, фрагмент и т.д. Предпочтительно выделенное антитело, фрагмент и т.д., по существу, не содержит белков или полипептидов или других примесей, присходящих из естественной среды, которые мешают применению антител в терапевтических, диагностических, профилактических, исследовательских и других целях.

Например, «выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или отделено от компонентов, происходящих из среды его получения (например, естественным образом или методами генной инженерии). Выделенный полипептид предпочтительно не связан ни с какими другими компонентами, происходящими из среды его получения, например, в результате чего антитело было выделено в соответствии со стандартами, одобряемыми или одобренными FDA. Примеси из среды его производства, которые, например, возникают в результате жизнедеятелности рекомбинантных трансфецированных клеток, представляют собой вещества, которые обычно мешают применению антител в исследовательских, диагностических или терапевтических целях и могут включать ферменты, гормоны и другие растворенные вещества белковой или небелковой природы. В предпочтительных вариантах реализации изобретения полипептид очищен: (1) до более чем 95% от массы антитела при оценке, например, методом Лоури, а в некоторых вариантах реализации изобретения - более чем 99% от массы; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом или (3)

до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих или восвосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или предпочтительно серебра. Выделенное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент, происходящий из естественной среды антитела, отсутствует. Однако обычно выделенный полипептид или антитело получают по меньшей мере за одну стадию очистки.

Иммуноконъюгаты

Изобретение охватывает антитело или фрагмент, конъюгированный с терапевтическим компонентом («иммуноконъюгатом»), таким как цитотоксин, химиотерапевтический лекарственный препарат, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксины включают любое средство, которое оказывает неблагоприятное воздействие на клетки. Примеры подходящих цитотоксинов и химиотерапевтических средств для формирования иммуноконъюгатов известны специалистам в данной области, см., например, WO 05/103081, который включен посредством ссылки в данный документ.

Биспецифические антитела

Антитела и фрагменты по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические мАТ могут быть специфичными по отношению к разным эпитопам одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные по отношению к более чем одному полипептиду-мишени. См., например, Tutt et al., (1991) J. Immunol. 147: 60-69. Антитела или фрагменты к hOX40L человека могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством химической связи, слияния генов, нековалентной связи или иным образом) с одним или более другими молекулярными компонентами, такими как другое антитело или фрагмент антитела для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Пример биспецифического формата антитела, который может быть использован в контексте настоящего изобретения, включает использование первого CH3-домена иммуноглобулина (Ig) и второго H3-домена иммуноглобулина (Ig), где первый и второй CH3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и где по меньшей мере одно отличие по аминокислотам уменьшает связывание биспецифического антитела с белком A, по сравнению с биспецифическим антителом в отсутствие отличия по аминокислотам. В одном варианте реализации изобретения первый CH3-домен Ig связывает белок A, а второй CH3-домен Ig включает мутацию, которая уменьшает или блокирует связывание с белком A, как, например, модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT, H435R согласно нумерации EC). Второй CH3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F - EC). Другие модификации, которые могут быть обнаружены во втором CH3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V821 (по IMGT, D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I EC) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I EC) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N3845, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I EC) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанных выше, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, связывающийся с OX40L, содержит менее шести CDR. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит

из одного, двух, трех, четырех или пяти CDR, выбранных из группы, состоящей из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит или состоит из одного, двух, трех, четырех или пяти CDR, выбранных из группы, состоящей из последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID No: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42 for HCDR1; Seq ID No: 6, Seq ID No: 12, Seq ID No: 38, Seq ID No: 44, Seq ID No: 70, Seq ID No: 76, Seq ID No: 98 или Seq ID No: 104, в частности, Seq ID No: 38 или Seq ID No: 44 for HCDR2; Seq ID No: 8, Seq ID No: 14, Seq ID No: 40, Seq ID No: 46, Seq ID No: 72, Seq ID No: 78, Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106, в частности, Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46 for HCDR3; Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56 для LCDR1; Seq ID No: 20, Seq ID No: 26, Seq ID No: 52, Seq ID No: 58, Seq ID No: 84, Seq ID No: 90, Seq ID No: 112 или Seq ID No: 118, в частности, Seq ID No: 52 или Seq ID No: 58 для LCDR2; и Seq ID No: 22, Seq ID No: 28, Seq ID No: 54, Seq ID No: 60, Seq ID No: 86, Seq ID No: 92, Seq ID No: 114 или Seq ID No: 120, в частности, Seq ID No: 54 или Seq ID No: 60 для LCDR3).

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело по настоящему изобретению представляет собой полностью соответствующее человеческому антитело, моноклональное антитело, рекомбинантное антитело, антагонистическое антитело, нейтрализующее hOX40L антитело или любую их комбинацию, или в настоящем изобретении представлен их hOX40L-связывающий фрагмент. В одном примере антитело представляет собой химерное антитело, содержащее вариабельные домены человека и константные домены, не относящиеся к человеку (например, мыши или крысы, или кролика). В конкретных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полностью соответствующее человеческому антитело, как, например, полностью соответствующее человеческому моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с hOX40L. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой антагонистическое антитело. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой нейтрализующее антитело.

В одном примере антитело или фрагмент представляет собой антитело или фрагмент лямбда-типа (то есть, вариабельные домены являются лямбда-вариабельными доменами). Опционально антитело или фрагмент также содержат лямбда-константные домены.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело конкурирует (например, в зависимости от дозы) с OX40 или его слитым белком (например, Fc: OX40) для связывания с hOX40L, например, с экспрессируемым на клеточной поверхности hOX40L или растворимым hOX40L. Примеры конкурентных блокирующих проб приведены в разделе «Примеры» в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлены, выделение нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом hOX40L (например, клеточно-экспрессируемым или растворимым hOX40L), фрагментом полипептида hOX40L или эпитопом hOX40L. В определенных вариантах настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует VH-цепь, VL-цепь, домен VH, домен VL, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как описано в списке последовательностей (т.е. Seq ID No: 30 или Seq ID No: 62 для цепей VH; Seq ID No: 32

или Seq ID No: 64 для цепей VL; Seq ID No: Seq ID No: 2, Seq ID No: 34, Seq ID No: 66 или Seq ID No: 94, в частности Seq ID No: 34 для доменов VH, Seq ID No: 16, Seq ID No: 48, Seq ID No: 80 или Seq ID No: 108, в частности Seq ID No: 48 для доменов VL; Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID No: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42 for HCDR1; Seq ID No: 6, Seq ID No: 12, Seq ID No: 38, Seq ID No: 44, Seq ID No: 70, Seq ID No: 76, Seq ID No: 98 или Seq ID No: 104, в частности, Seq ID No: 38 или Seq ID No: 44 for HCDR2; Seq ID No: 8, Seq ID No: 14, Seq ID No: 40, Seq ID No: 46, Seq ID No: 72, Seq ID No: 78, Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106, в частности, Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46 for HCDR3; Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56 for LCDR1; Seq ID No: 20, Seq ID No: 26, Seq ID No: 52, Seq ID No: 58, Seq ID No: 84, Seq ID No: 90, Seq ID No: 112 или Seq ID No: 118, в частности, Seq ID No: 52 или Seq ID No: 58 for LCDR2; и Seq ID No: 22, Seq ID No: 28, Seq ID No: 54, Seq ID No: 60, Seq ID No: 86, Seq ID No: 92, Seq ID No: 114 или Seq ID No: 120, в частности, Seq ID No: 54 или Seq ID No: 60 for LCDR3).

В одном аспекте в данном документе представлены векторы и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или фрагменты согласно изобретению.

В определенных вариантах реализации изобретения антитело специфически связывается с одним или несколькими вариантами одиночного нуклеотидного полиморфизма (SNP) hOX40L. В примере любого аспекта настоящего изобретения hOX40L представляет собой тример мономеров.

В аспекте, представленном в данном документе, представлен способ снижения (например, по меньшей мере 20, 30, 40-50 или 60% или 70%, 80%, 90%, 95% или >90%) или полное ингибирование связывания hOX40L с OX40 у субъекта (например, человека), включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которое специфически связывается с hOX40L (например, клеточно-экспрессируемым или растворимым hOX40L).

В одном аспекте в данном документе представлен, способ лечения или предупреждения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта (например, человека), причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которые специфически связываются с hOX40L (например, клеточно-экспрессируемым или растворимым hOX40L), причем заболевание или состояние лечат или предотвращают антителом или фрагментом. В одном из примеров способ включает в себя уменьшение или ингибирование биологической активности hOX40L, такой как секреция одного, более или всех IL-2, IL-8, TNF-альфа и интерферона гамма, у субъекта. В примере биологическая активность выбирается из секреции одного, более или большего количества IL-2, TNF-альфа и интерферона гамма. В примере биологическая активность выбирается из секреции одного, более или всех IL-8, CCL20 и RANTES.

В аспекте, представленном в данном документе, представлен способ уменьшения или ингибирования биологической активности hOX40L, такой как секреция одного, более или всех IL-2, IL-8, TNF-альфа и интерферона гамма, у субъекта (например, субъект человека), причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или его фрагмента по настоящему изобретению, которые специфически связываются с hOX40L (например, клеточно-экспрессируемым или растворимым hOX40L), причем биологическая активность hOX40L снижается антителом или фрагментом. В примере биологическая активность выбирается из секреции одного,

более или большего количества IL-2, TNF-альфа и интерферона гамма. В примере биологическая активность выбирается из секреции одного, более или всех ИЛ-8, CCL20 и RANTES.

Термин «около» или «приблизительно» означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% (или 4%, или 3%, или 2%, или, например, 1% или менее) заданного значения или диапазона.

Используемый здесь термин «вводить» или «введение» относится к акту инъекции или иного способа физической доставки вещества, которое существует вне организма (например, антитело к hOX40L, представленное здесь), пациенту, например, доставки кслизистой оболочке, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной доставке и/или любому другому способу физической доставки, описанному в данном документе или известному в данной области. Когда заболевание или его симптомы лечатся, введение этого вещества обычно происходит после начала заболевания или его симптомов. Когда болезнь или ее симптомы предотвращаются, введение этого вещества обычно происходит до наступления заболевания или его симптомов.

Чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты, последовательности выравнивают для оптимальных целей сравнения (например, промежутки можно вводить в последовательности первой аминокислоты или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй аминокислотой или последовательности нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято одним и тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом в качестве соответствующего положения во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций, разделяемых последовательностями (то есть, % идентичности = количество идентичных перекрывающихся позиций/общее количество позиций × 100%). В одном варианте реализации изобретения две последовательности имеют одинаковую длину.

Определение процентной идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) также можно выполнить с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264 2268, модифицированный, как в Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873 5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403. Поиск нуклеотидов BLAST можно осуществлять с набором параметров программы нуклеотида NBLAST, например, для оценки = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты настоящего изобретения. Поиск BLAST-белка может выполняться с помощью набора параметров программы XBLAST, например, для оценки 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка настоящего изобретения. Для получения сопоставленных выравниваний для целей сравнения Gapped BLAST может использоваться, как описано в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 3402. В качестве альтернативы PSI BLAST может использоваться для выполнения повторного поиска, который определяет дистанционные

отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (См., например, Национальный центр информации по биотехнологии (NCBI) на всемирной сети ncbi.nlm.nih.gov). Другим предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11 17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного обеспечения выравнивания последовательности GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей может использоваться таблица весовых остатков PAM120, штраф за разрыв в размере 12 и штраф за разрыв в 4.

Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить, используя методы, аналогичные описанным выше, с или без допустимых пробелов. При вычислении процента идентичности обычно учитываются только точные совпадения.

Используемый в данном документе термин «антагонист» или «ингибитор» hOX40L относится к лиганду (например, антителу или фрагменту), который способен ингибировать или иным образом уменьшать одну или несколько биологических активностей hOX40L, например, в клетке, экспрессирующей hOX40L, или в клетке, экспрессирующей лиганд hOX40L. Например, в определенных вариантах реализации изобретения Антитела по настоящему изобретению представляют собой антагонистические антитела, которые ингибируют или иным образом уменьшают секрецию CCL20, IL-8 и/или RANTES из клетки, имеющей экспрессируемый на клеточной поверхности OX40, когда указанное антитело контактирует с указанной клеткой. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист hOX40L (например, антагонистическое антитело по настоящему изобретению) может, например, действовать, ингибируя или иным образом уменьшая активацию и/или сигнальные пути, экспрессирующей OX40L, тем самым ингибируя hOX40L-опосредованную биологическую активность клетки относительно hOX40L-опосредованной биологической активности в отсутствие антагониста. В определенных вариантах реализации изобретения антитела, представленные в данном документе, являются полностью человеческими антагонистическими антителами к hOX40L, предпочтительно полностью человеческими моноклональными антагонистическими антителами к hOX40L.

Термин «антитело» и «иммуноглобулин» или «Ig» используются в данном документе взаимозаменяемо. Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с антигеном hOX40L, может быть перекрестно-реактивным с родственными антигенами. Предпочтительно антитело или его фрагмент, который специфически связывается с антигеном hOX40L, не перекрестно реагирует с другими антигенами (но может необязательно перекрестно реагировать с OX40L другого вида, например, резуса или мыши). Антитело или его фрагмент, который специфически связывается с антигеном hOX40L, можно идентифицировать, например, методами иммуноанализа, BIAcoreTM или другими методами, известными специалистам в данной области. Антитело или его фрагмент специфически связывается с антигеном hOX40L, когда они связываются с антигеном hOX40L с более высоким сродством, чем с любым перекрестно-реактивным антигеном, как определено с использованием экспериментальных методов, таких как радиоиммуноанализы (RIA) и иммуноферментные анализы (ELISA). Обычно конкретная или избирательная реакция будет по меньшей мере в два раза выше фонового сигнала или шума и более типично более чем в 10 раз выше фона. См., например, Paul, ed., 1989,

Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336 для обсуждения относительно специфичности антител.

Антитела по настоящему изобретению включают в том числе синтетические антитела, моноклональные антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, внутриклеточные антитела, одноцепочечные Fv (scFv) (например, моноспецифические, биспецифические и т.д.), камелированные антитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), связанные с дисульфидом Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В частности, антитела по настоящему изобретению включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с антигеном hOX40L (например, одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR) антитела к hOX40L). Антитела по настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, в частности IgG4), или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитела hOX40L являются полностью человеческими, такими как полностью человеческие моноклональные hOX40L антитела. В определенных вариантах реализации изобретения антитела по настоящему изобретению представляют собой IgG-антитела или класс (например, человеческий IgG1 или IgG4), или его подкласс. В определенных вариантах реализации изобретения антитела по настоящему изобретению содержат константную область гамма-4 человека. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи не связывает Fc-γ-рецепторами и, например, включает мутацию Leu235Glu. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутацию Ser228Pro для повышения стабильности. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4-PE.

Термин «антигенсвязывающий домен», «область связывания антигена», «антигенсвязывающий фрагмент» и подобные термины относятся к той части антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном, и придают связывающему агенту его специфичность и сродство к антигену (например, области, определяющие комплементарность (CDR)). Область связывания антигена можно получить из любых видов животных, таких как грызуны (например, кролик, крыса или хомяк) и люди. Предпочтительно, область связывания антигена, будет иметь человеческое происхождение.

Используемый в данном документе термин «композиция» предназначен для охвата продукта, содержащего указанные ингредиенты (например, антитело по настоящему изобретению), в необязательном порядке, указанные количества, а также любой продукт, который прямо или косвенно приводит к комбинации указанных ингредиентов в, необязательно, указанных количествах.

В контексте полипептида, как используется настоящем документе, термин «производное» относится к полипептиду, который содержит аминокислотную последовательность полипептида hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или антитело, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L, который был изменен путем введения замещения аминокислотных остатков, делеций или вставок. Используемый в данном документе термин «производное» также относится к

полипептиду hOX40L, фрагменту полипептида hOX40L или антителу, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L, который химически модифицирован, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к полипептиду. Например, но не ограничиваясь этим, полипептид hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или антитело hOX40L могут быть химически модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защищающими/блокирующими группами протеолитического расщепления, объеденения с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Производные модифицируют способом, который отличается от естественного для исходного пептида или полипептидов, либо по типу, либо по месту присоединения молекул. Производные также включают делецию одной или нескольких химических групп, которые изначально присутствуют в пептиде или полипептиде. Производные полипептида hOX40L, фрагмента полипептида hOX40L или антитела hOX40L могут быть химически модифицированы химическими модификациями с использованием методов, известных специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, конкретное химическое расщепление, ацетилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Дополнительно, производное полипептида hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или антитело hOX40L могут содержать одну или несколько неклассических аминокислот. Полипептидное производное обладает аналогичной или идентичной функцией, как и полипептид hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или антитело hOX40L, описанные в данном документе.

Термин «эффективное количество», используемый в данном документе, относится к количеству терапии (например, в отношении содержащегося антитела или фармацевтической композиции), которое является достаточным для уменьшения и/или улучшения тяжести и/или продолжительности данного заболевания и/или симптома, связанного с ним. Этот термин также охватывает количество, необходимое для уменьшения или улучшения развития или прогрессирования данного заболевания, уменьшения или улучшения рецидива, развития или начала данного заболевания и/или улучшения или усиления профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии (например, терапия, отличная от антитела к hOX40L, представленная в данном документе). В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество антитела по настоящему изобретению составляет от примерно 0,1 мг/кг (мг антитела на кг массы тела субъекта) до примерно 100 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество содержащегося антитела составляет приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 60 мг/кг, около 70 мг/кг, около 80 мг/кг, около 90 мг/кг или около 100 мг/кг (или диапазон в нем). В некоторых вариантах реализации изобретения «эффективное количество», как используется в данном документе, также относится к количеству антитела по настоящему изобретению, необходимому для достижения определенного результата (например, ингибирования биологической активности hOX40L клетки, такой как ингибирование секреции CCL20, IL-8 или RANTES, или INF-γ, TNF-α или IL-2, в частности inf-γ из клетки).

Термин «эпитоп», используемый в данном документе, относится к локализованной области на поверхности антигена, такого как полипептид hOX40L или фрагмент полипептида hOX40L, которая способна связываться с одной или несколькими антигенсвязывающими областями антитела и имеет антигенную или иммуногенную

активность у животного, предпочтительно млекопитающего и наиболее предпочтительно у человека, и которая способена вызывать иммунный ответ. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой часть полипептида, которая вызывает реакцию антитела у животного. Эпитоп, имеющий антигенную активность, представляет собой часть полипептида, с котором антитело специфически связывается, как определено любым способом, хорошо известным в данной области, например, описанными в данном документе способами иммуноанализа. Антигенные эпитопы необязательно должны быть иммуногенными. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Область полипептида, составляющая эпитоп, может быть непрерывной последовательностью аминокислот полипептида, или же эпитоп может образовываться из двух или более несмежных областей полипептида. Эпитоп может быть или не быть трехмерным свойством поверхности антигена. В некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп hOX40L представляет собой трехмерное свойство поверхности полипептида hOX40L (например, в тримерной форме полипептида hOX40L). В других вариантах реализации изобретения эпитоп hOX40L является линейным свойством полипептида hOX40L (например, в тримерной форме или мономерной форме полипептида hOX40L). Антитела, представленные в данном документе, могут специфически связываться с эпитопом мономерной (денатурированной) формы hOX40L, эпитопом тримерной (нативной) формы hOX40L или как мономерной (денатурированной) формы, так и тримерной (нативной) формы hOX40L. В конкретных вариантах реализации изобретения антитела, представленные в данном документе, специфически связываются с эпитопом тримерной формы hOX40L, но конкретно не связывают мономерную форму hOX40L.

Термин «вспомогательные вещества», используемый в данном документе, относится к инертным веществам, которые обычно используются в качестве разбавителя, носителя, консервантов, связующих веществ или стабилизирующего средства для лекарственных средств и включают, в том числе, белки (например, сывороточный альбумин и т.д.), аминокислоты (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин, аргинин, глицин, гистидин и т.д.), жирные кислоты и фосфолипиды (например, алкилсульфонаты, каприлат и т.д.), поверхностно-активные вещества (например, SDS, полисорбат, неионное поверхностно-активное вещество и т.д), сахариды (например, сахароза, мальтоза, трегалоза и т.д.) и полиолы (например, маннит, сорбит и т.д.). См. также Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, штат Пенсильвания, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В контексте настоящего документа термин «фрагмент», используемый в данном документе, пептида или полипептида, относится к пептиду или полипептиду, который содержит менее чем полную длинну аминокислотной последовательности. Такой фрагмент может возникать, например, за счет обрезания на аминоконце, обрезания на карбоксильном конце и/или внутренней делеции остатка(ов) из аминокислотной последовательности. Фрагменты могут, например, быть результатом альтернативного сплайсинга РНК или активности протеазы in vivo. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты hOX40L включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность по меньшей мере из 5 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 10 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 15 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 20 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 25 непрерывных аминокислотных

остатков, по меньшей мере из 40 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 50 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 60 непрерывныхнепрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 70 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 80 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 90 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 100 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 125 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 150 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 175 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере из 200 непрерывных аминокислотных остатков или по меньшей мере из 250 непрерывных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности полипептида hOX40L или антитела, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L. В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент полипептида hOX40L или антитело, которое специфически связывается с антигеном hOX40L, сохраняет по меньшей мере 1, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 функции полипептида или антитела.

Термины «полностью соответствующее человеческому антитело» или «человеческое антитело» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к антителу, которое содержит вариабельную область человека и, наиболее предпочтительно, константную область человека. В конкретных вариантах реализации изобретения термины относятся к антителу, которое содержит вариабельный участок и константную область человеческого происхождения. «Полностью человеческие» антитела к hOX40L в определенных вариантах реализации изобретения могут также охватывать антитела, которые связывают полипептиды hOX40L и кодируются последовательностями нуклеиновой кислоты, которые являются естественными соматическими вариантами последовательности нуклеиновой кислоты иммуноглобулина человека генеративной линии. В конкретном варианте реализации изобретения антитела к hOX40L, представленные в данном документе, являются полностью человеческими антителами. Термин «полностью соответствующее человеческому антитело» включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, соответствующие последовательностям иммуноглобулина человека генеративной линии, как описано Kabat et al. (См., Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Типичные способы получения полностью человеческих антител представлены, например, в разделе «Примеры» в данном документе, но можно использовать любой способ известный специалистам в данной области.

Фраза «рекомбинантное человеческое антитело» включает человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфецированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, антитела выделенные из животного (например, мыши или коровы), которое является трансгенными и/или трансхромосомным для генов человеческого иммуноглобулина (См., например, Taylor, LD et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) или полученные антитела, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностям ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела могут иметь вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека (См., Kabat,

EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Однако, в некоторых вариантах реализации изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу in vitro (или, когда используется трансгенное животное для человеческих Ig-последовательностей, соматическому мутагенезу in vivo) и, следовательно, аминокислотные последовательности VH и VL-областей рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, будучи производными и связанными с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать естественным образом в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела in vivo.

Используемый в данном документе термин «слитый белок» относится к полипептиду, который содержит аминокислотную последовательность антитела и аминокислотную последовательность гетерологичного полипептида или белка (то есть полипептида или белока, обычно не являющихся частью антитела (например, антитело к антигену hOX40L)). Термин «слияние» при использовании по отношению к hOX40L или к антителу к hOX40L относится к соединению пептида или полипептида, или их фрагментов, и/или его производного с гетерологичным пептидом или полипептидом. Предпочтительно слитый белок сохраняет биологическую активность hOX40L или антитела к hOX40L. В некоторых вариантах реализации изобретения слитый белок содержит домен VH hOX40L VH, домен VL, VH CDR (один, два или три VR CDR) и/или VL CDR (один, два или три VL CDR), причем слитый белок специфически связывается с эпитопом hOX40L.

Термин «тяжелая цепь», используемый в отношении антитела, относится к пяти различным типам: альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ε), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. Эти различные типы тяжелых цепей хорошо известны и приводят к образованию пяти классов антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG1, IgG3 и IgG4. Предпочтительно тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь человека. В одном примере тяжелая цепь представляет собой выделенный изотип IgG, например, выделенный IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему изобретению содержат константную область гамма-4 человека. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи не связывает Fc-γ-рецепторы и, например, включает мутацию Leu235Glu. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутацию Ser228Pro для повышения стабильности. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4-PE.

Используемый в данном документе термин «хозяин» относится к животному, предпочтительно к млекопитающему и наиболее предпочтительно человеку.

Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к конкретной предметной клетке, трансфецированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки не может быть идентично родительской клетке, трансфецированной молекулой нуклеиновой кислоты из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях или встраивания молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин «иммуномодулирующее средство» и его варианты, включает, но не ограничивается этим, иммуномодулирующие средства, используемые в данном документе, относятся к средствам, которые модулируют иммунную систему хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуномодулирующим средством является иммунодепрессант. В некоторых других вариантах реализации изобретения

иммуномодулирующим средством является иммуностимулирующее средство. В соответствии с изобретением иммуномодулирующее средство, используемое в комбинированных терапевтических средствах настоящего изобретения, не включает антитело к hOX40L или антигенсвязывающий фрагмент. Иммуномодулирующие средства включают в том числе небольшие молекулы, пептиды, полипептиды, белки, слитые белки, антитела, неорганические молекулы, миметические средства и органические молекулы.

В контексте настоящего документа термин «в комбинации» введения других терапий относится к использованию более чем одной терапии. Использование термина «в сочетании» не ограничивает порядок, в котором терапия вводится субъекту с заболеванием. Первую терапию можно вводить до (например, 1 минуты, 45 минут, 30 минут, 45 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 недели, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, 1 минуты, 45 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения вторай терапии субъекту, который был, есть или восприимчив к hOX40L-опосредованному заболеванию. Любая дополнительная терапия может вводиться в любом порядке с другими дополнительными терапиями. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одной или несколькими терапиями (например, терапиями, которые не являются антителами настоящего изобретения, которые в настоящее время вводят для профилактики, лечения, коррекции и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболеванием. Неограничивающие примеры методов лечения, которые можно вводить в сочетании с антителом настоящего изобретения, включают анальгетики, анестетики, антибиотики или иммуномодулирующие средства или любые другие средства, перечисленные в Фармакопее США и/или справочнике врача.

«Выделенное» или «очищенное» антитело, например, как правило, не содержит клеточного материала или других примесей белков клеточного или тканевого источника, из которого получено антитело, или химических предшественников и других химических веществ при химическом синтезе. Формулировка «как правило, свободный от клеточного материала» включает препараты антитела, в которых антитело отделяется от компонентов клеток, из которых оно выделено или получено рекомбинантно. Таким образом, препараты антитела, которое, как правило, не содержат клеточного материала, содержат менее чем 30%, 20%, 10% или 5% (по сухой массе) постороннего белка (также упоминаемый в данном документе как «загрязняющий белок»). При рекомбинантной продукции антитела оно также практически не содержит культуральной среды, то есть культуральная среда составляет менее чем 20%, 10% или 5% от объема белкового препарата. При получении антитела путем химического синтеза оно практически не содержит химических предшественников или других химических веществ, то есть оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела содержат менее чем 30%, 20%, 10%, 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В предпочтительном варианте реализации изобретения антитела по настоящему изобретению выделяют или очищают.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, выделенную из других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в естественном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, «выделенная»

молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть практически свободна от другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или от химических исходных веществ и других химических веществ при химическом синтезе. В определенном варианте реализации изобретения молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по настоящему изобретению, выделяют или очищают.

Термин «OX40L человека», «hOX40L» или «полипептид hOX40L» и подобные термины относятся к полипептидам («полипептиды», «пептиды» и «белки» используются в данном документе взаимозаменяемо), включающим аминокислотную последовательность в перечне последовательностей и связанных с ней полипептидов, включая их варианты SNP. Связанные полипептиды включают аллельные варианты (например, варианты SNP); варианты сплайсинга; фрагменты; производные; варианты замены, удаления и вставки; слитные полипептиды; а также межвидовые гомологи, предпочтительно, которые сохраняют активность hOX40L и/или являются достаточными для вызова иммунного ответа против hOX40L. Также включены растворимые формы hOX40L, которые достаточны для вызова иммунного ответа против hOX40L. Специалистам в данной области известно, что антитело к hOX40L настоящего изобретения может связываться с полипептидом hOX40L, полипептидным фрагментом, антигеном и/или эпитопом, поскольку эпитоп является частью более крупного антигена, который является частью большего полипептидного фрагмента, который, в свою очередь, является частью более крупного полипептида hOX40L, может существовать в тримерной (нативной) или мономерной (денатурированной) форме.

Термины «нумерация Kabat» и подобные термины известны специалистам в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными) по сравнению с другими аминокислотными остатками в вариабельных областях тяжелой цепи антитела, или антиген связывающих областях (Kabat et al., 1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 and, Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication №91-3242). Для вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область обычно находится в пределах от 31 до 35 аминокислот для CDR1, от 50 до 65 аминокислот для CDR2 и от 95 до 102 аминокислот для CDR3.

Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции гомогенных или главным образом гомогенных антител, и каждое моноклональное антитело обычно распознает один эпитоп на антигене. В предпочтительных вариантах реализации изобретения «моноклональное антитело», в контексте данного документа, представляет собой антитело, продуцируемое одной гибридомой или другой клеткой, где антитело специфически связывается только с эпитопом hOX40L, что определено, например, с помощью ИФА или другого антигенсвязывающего или конкурентного анализа связывания, известных специалистам в данной области или в приведенных в данном документом в разделе «Примеры». Термин «моноклональный» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела по настоящему изобретению можно получить с помощью гибридомного способа, как описано Kohler et al.; Nature, 256: 495 (1975) или можно выделить из фаговых библиотек с использованием способов, описанных в данном документе. Другие способы получения клональных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных таким образом, широко известны специалистам в данной области (См., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.,

Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York). Другие примеры способов получения других моноклональных антител представлены в разделе «Примеры» в данном документе.

Термин «естественный» или «нативный» при употреблении относительно биологических материалов, таких как молекулы нуклеиновых кислот, полипептиды, клетки-хозяева и тому подобное, относится к материалам, находящимся в природе и не подвергавшимся обработке человеком.

Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в данном документе, означает одобрение регулирующим органом федерального правительства или правительства США или перечисленным в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека.

Термин «поликлональные антитела», используемый в данном документе, относятся к популяции антител, образующейся при иммуногенном ответе на белок, имеющий много эпитопов, и, таким образом, включает в себя множество различных антител, направленных на одни и те же и на различные эпитопы в белке. Методы получения поликлональных антител известны специалистам в данной области (См., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

Используемый в данном документе термин «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты» и другие подобные термины используются взаимозаменяемо и включают ДНК, РНК, мРНК и тому подобное.

Используемый в данном документе термин «препятствовать», «предотвращать» и «предотвращение» относятся к полному или частичному ингибированию развития, рецидива, начала или распространения hOX40L-опосредованного заболевания и/или симптома, связанного с ним, в результате введения терапии или комбинации предлагаемых в данном документе способов (например, комбинация профилактических или терапевтических средств, таких как антитело по настоящему изобретению).

Используемый в данном документе термин «профилактическое средство» относится к любому препарату, который может полностью или частично ингибировать развитие, рецидив, начало или распространение hOX40L-опосредованного заболевания и/или связанного с ним симптома у субъекта. В определенных вариантах реализации изобретения термин «профилактическое средство» относится к антителу настоящего изобретения. В других определенных вариантах реализации изобретения термин «профилактическое средство» относится к средству, отличному от антитела по настоящему изобретению. Предпочтительно, профилактическое средство представляет собой средство, которое, как известно, полезно использовалось или используется в настоящее время для предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания и/или связанного с ним симптома или препятствует возникновению, развитию, прогрессированию и/или тяжести hOX40L-опосредованного заболевания и/или связанного с ним симптома. В конкретных вариантах реализации изобретения профилактическое средство представляет собой полностью соответствующее человеческому антитело к hOX40L, такое как полностью соответствующее человеческому моноклональное антитело к hOX40L.

В одном из вариантов реализации изобретения профилактика предотвращает начало заболевания, состояния или симптомов заболевания или состояния. В одном из вариантов реализации изобретения профилактическое лечение предотвращает ухудшение или начало заболевания или состояния. В одном из вариантов реализации изобретения

профилактическое лечение предотвращает ухудшение заболевания или состояния.

В другом варианте реализации изобретения антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят внутривенно (например, до или одновременно с трансплантацией, например, трансплантацией крови или органа). В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг). В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят в дозе, выбранной из около 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/ кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг или из около 100 мг/кг, в частности из около 1 мг/кг или из около 3 мг/кг.

В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят за 1-4 дня до трансплантации (например, крови или органов), например, за 1-3 дня до трансплантации или за 1-2 дня до трансплантации. В другом варианте реализации изобретения указанное антитело вводят еженедельно, раз в две недели или ежемесячно после трансплантации, например, два раза в неделю. В дополнительном варианте реализации изобретения указанное антитело вводят внутривенно профилактически за 1-3 дня до трансплантации в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг), а затем внутривенно раз в две недели в дозе около 5-10 мг/кг (например, около 8 мг/кг).

В другом варианте реализации изобретения пациента контролируют через определенные промежутки времени после трансплантации на предмет присутствия биомаркера, прогнозирующего развитие отторжения трансплантата или БТПХ (например, острой БТПХ), а антитело к OX40L по настоящему изобретению вводят после того, как уровни биомаркера позволяют установить, что пациент подвержен риску развития отторжения трансплантата или БТПХ (например, острой БТПХ). Данная стратегия позволяет избежать излишнего дозирования препарата и излишнего подавления иммунной системы. Примерами биомаркеров, которые могут быть эффективны в качестве прогностических биомаркеров действующей БТПХ, могут быть указанные в Levine et al., «A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study», Lancet Haematol 2015; 2: e21-29. Эти биомаркеры включают (в том числе) TNFR1, ST-2, элафин, IL2Rα и Reg3α.

Участок hOX40L, составляющий эпитоп, может быть непрерывной последовательностью аминокислот полипептида или эпитоп может состоять из двух или более несмежных участков полипептида. Эпитоп может быть или не быть трехмерным свойством поверхности антигена. Локализованный участок на поверхности антигена hOX40L, способный вызывать иммунный ответ, представляет собой эпитоп hOX40L. Эпитоп может быть или не быть трехмерным свойством поверхности антигена.

Термины «hOX40L-опосредованное заболевание» и «hOX40L-опосредованное состояние» используются взаимозаменяемо и относятся к любому заболеванию или состоянию, которое полностью или частично вызвано или является результатом нарушения hOX40L. В определенных вариантах реализации изобретения hOX40L аберрантно (например, слишком много) экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения hOX40L может быть аберрантно повышен в клетках определенного типа. В других вариантах реализации изобретения нормальная, аберрантная или избыточная сигнализация клеток вызвана связыванием hOX40L с лигандом hOX40L. В определенных вариантах реализации изобретения лиганд hOX40L представляет собой, например, OX40, который экспрессируется на поверхности клетки, такой как эпителиальная клетка кишечника. В определенных вариантах реализации изобретения hOX40L-опосредованное заболевание является воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), таким как болезнь Крона (БК) или язвенный колит

(ЯК). В других вариантах реализации изобретения hOX40L-опосредованное заболевание представляет собой болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ). В других вариантах реализации изобретения hOX40L-опосредованное заболевание выбрано из гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера, неинфекционного склерита и увеита (неинфекционных/аутоиммунных и/или системных). В других вариантах реализации изобретения hOX40L-опосредованное заболевание или состояние, выбранное из аутоиммунного заболевания или состояния, системного воспалительного заболевания или состояния, или отторжения трансплантата; например, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона, ревматоидный артрит, отторжение трансплантата, отторжение аллогенного трансплантата, боезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенный колит, системная красная волчанка (СКВ), диабет, увеит, анкилозирующий спондилит, контактная гиперчувствительность, рассеянный склероз и атеросклероз, в частности БТПХ.

Термины «рецептор hOX40L» или «рецептор связывания hOX40L» в контексте настоящего документа взаимозаменяемы и относятся к рецепторному полипептиду, который связывается с hOX40L. В конкретных вариантах реализации изобретения рецептор hOX40L представляет собой Hox40. В некоторых вариантах реализации изобретения рецептор hOX40L экспрессируется на поверхности клетки, такой как эпителиальная клетка кишечника; или на ткани трансплантата или хозяина.

Используемые в данном документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо. В контексте настоящего документа субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, не примата (например, корову, свинью, лошадь, кошку, собаку, крысу и т.д.) или примата (например, обезьяну и человека), наиболее предпочтительно человека. В одном из вариантов реализации изобретения субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, с опосредованным hOX40L заболеванием. В другом варианте реализации изобретения субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, подверженное риску развития опосредованного hOX40L заболевания.

Используемый в данном документе термин «по существу, все», относится по меньшей мере к примерно 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% по меньшей мере около 98%, 99% или около 100%.

Термин «главным образом, свободный от поверхностно-активного вещества», используемый в данном документе, относится к композиции антитела, которая специфически связывается с антигеном hOX40L, причем указанная композиция содержит менее чем 0,0005%, 0,0003% или 0,0001% поверхностно-активных веществ и/или менее чем 0,0005%, 0,0003% или 0,0001% поверхностно-активных веществ.

Термин «главным образом, свободный от соли», используемый в данном документе, относится к композиции антитела, которое специфически связывается с антигеном hOX40L, причем указанная композиция содержит менее чем 0,0005%, 0,0003% или 0,0001% неорганических солей.

Термин «поверхностно-активное вещество», используемый в данном документе, относится к органическим веществам, имеющим амфипатические структуры; а именно, они состоят из групп противоположных тенденций растворимости, как правило, жирорастворимой углеводородной цепи и водорастворимой ионной группы. В зависимости от заряда поверхностно-активного фрагмента поверхностно-активные вещества можно классифицировать на анионные, катионные и неионные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества часто используются в качестве смачивающих, эмульгирующих, солюбилизирующих и диспергирующих средств для

различных фармацевтических композиций и препаратов биологических материалов.

Используемый в данном документе термин «тег» относится к любому типу фрагмента, который присоединен, например, к полипептиду и/или полинуклеотиду, который кодирует антитело hOX40L или hOX40L, или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, полинуклеотид, который кодирует антитело hOX40L, hOX40L или его антигенсвязывающий фрагмент, может содержать одну или несколько дополнительных нуклеотидных последовательностей, кодирующих тегов, которые кодируют, например, детектируемый фрагмент или фрагмент, который способствует аффинной очистке. Во время трансляции тег и антитело могут быть в форме слитного белка. Термин «обнаруживаемый» или «обнаружение» со ссылкой на тег относится к любому тегу, который может быть визуализирован, или в котором может быть определено и/или измерено присутствие тега (например, путем количественного определения). Неограничивающим примером детектируемого тега является флуоресцентная метка.

Используемый в данном документе термин «терапевтическое средство» относится к любому средству, которое можна использовать для лечения, коррекции или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания и/или связанного с ним симптома. В определенных вариантах реализации изобретения термин «терапевтическое средство» относится к антителу настоящего изобретения. В определенных других вариантах реализации изобретения термин «терапевтическое средство» относится к средству, отличному от антитела настоящего изобретени. Предпочтительно, терапевтическое средство является средством, которое, как известно, полезно или использовалось, или используется в настоящее время для лечения, коррекции или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания или одного или нескольких связанных с ним симптомов. В конкретных вариантах реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой полностью соответствующее человеческому антитело к hOX40L, такое как полностью соответствующее человеческому моноклональное антитело к hOX40L.

Комбинированная терапия (например, использование профилактических или терапевтических средств), которые более эффективны, чем аддитивные эффекты любой из двух или более одиночных терапий. Например, синергический эффект комбинации профилактических и/или терапевтических средств позволяет использовать более низкие дозы одного или нескольких препаратов и/или менее частое введение указанных препаратов субъекту с hOX40L-опосредованным заболеванием. Возможность использовать более низкие дозы профилактических или терапевтических мер и/или менее частое введение указанных препаратов уменьшает токсичность, связанную с назначением указанных препаратов субъекту, без снижения их эффективности при профилактике, коррекции, лечении или улучшении состояния при hOX40L-опосредованном заболевании. Кроме того, синергический эффект может привести к повышению эффективности терапии при профилактике, коррекции, лечении или улучшении состояния при hOX40L-опосредованном заболевании. В заключение, синергический эффект комбинированной терапии (например, профилактических или терапевтических средств) может предотвращать или уменьшать побочные или нежелательные эффекты, связанные с использованием любой монотерапии.

В одном из вариантов реализации изобретения комбинация включает антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, выбранные независимо из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба),

молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаба), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52 (например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из ингибиторов кальциневрина (например, такролимуса, циклоспорина), ингибиторов mTOR (например, рапамицин (сиролимус)) и антипролиферативных средств (например, микофенолята мофетил, циклофосфамид).

В дополнительных вариантах реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из иммунодепрессантов, которые модулируют передачу сигналов IL-2 (например, такролимус, циклоспорин, рапамицин (сиролимус) и антител к CD25 (например, базиликсимаб, даклизумаб).

Не ограничиваясь теорией, считается, что механизм действия антитела к OX40L настоящего изобретения дополняет дополнительные терапевтические средства, которые модулируют иммунную функцию. В частности, средства, которые модулируют передачу сигналов IL-2 или ингибируют IL-2/IL-2R-опосредованную пролиферацию Т-клеток, можна синергически сочетать с антителом к OX40L, что приводит к большей иммунной модуляции, чем это наблюдается с одним только средством. Как показано в Примерах 7 и 9 в данном документе ниже, как такролимус, так и рапамицин проявляют иммуномодулирующую активность. Такролимус и рапамицин являются средствами, которые, как известно, модулируют сигнализацию IL-2. В частности, рапамицин, как известно, действует как ингибитор mTOR, который уменьшает транскрипцию IL-2 и IL2R и ингибирует прогрессирование клеточного цикла, вызванного активацией IL2R, но могут быть и другие механизмы влияния на пролиферацию Т-клеток, с помощью которых могут функционировать ингибиторы mTOR (Thomson et al., Nat. Rev. Immunol., 2009, 9 (5), 324-337; Scheffert & Raza, J. Thorac. Dis., 2014, 6 (8), 1039-1053). Фиг. 6 в данном документе показывает, что механизм влияния антител к OX40L на популяцию Tscm отличается от обоих этих средств, а Фиг. 7 показывает синергетический эффект антитела к OX40L настоящего изобретения в комбинации с рапамицином на выживаемость. Поэтому считается, что другие средства, имеющие сходный механизм действия с рапамицином и/или такролимусом, также приведут к синергетическому эффекту при использовании в комбинации с антителом к OX40L настоящего изобретения.

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и рапамицин (сиролимуса).

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L

по настоящему изобретению и такролимус. В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и комбинацию такролимуса и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин и метотрексат. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и мофетил микофенолат.

Используемый в данном документе термин «терапия» относится к любому протоколу, способу и/или средству, который можно использовать для профилактики, корреции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания (например, ВЗК или БТПХ). В некоторых вариантах реализации изобретения термины «терапия» и «лечение» относятся к биологической терапии, поддерживающей терапии и/или другим способам лечения, полезным для профилактики, управления, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, известного специалистам в данной области, таким как медицинский персонал.

Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» и «проводить лечение» относятся к снижению или улучшению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности hOX40L-опосредованного заболевания (например, ВЗК или БТПХ) в результате введения одной или нескольких терапий (включая, но не ограничиваясь этим, введение одного или нескольких профилактических или терапевтических средств, таких как антитело по настоящему изобретению). В конкретных вариантах реализации изобретения такие термины относятся к уменьшению или ингибированию связывания hOX40L с OX40, уменьшению или ингибированию выработки или секреции CCL20 из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, уменьшению или ингибированию выработки или секреции IL-8 из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, уменьшению или ингибированию выработки или секреции RANTES из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, и/или ингибированию или уменьшению одного или более симптомов, связанных с hOX40L-опосредованным заболеванием, таким как ВЗК или БТПХ. В конкретных вариантах реализации изобретения такие термины относятся к уменьшению или ингибированию связывания hOX40L с OX40, уменьшению или ингибированию выработки или секреции INF-γ из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, уменьшению или ингибированию выработки или секреции TNF-α из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, уменьшению или ингибированию выработки или секреции IL-2 из клетки, экспрессирующей hOX40 или hOX40L, и/или ингибирование или уменьшение одного или нескольких симптомов, связанных с hOX40L-опосредованного заболевания, такого как ВЗК или БТПХ (в частности, БТПХ). В примере клетка представляет собой человеческую клетку. В конкретных вариантах реализации изобретения профилактическое средство представляет собой полностью соответствующее человеческому антитело к hOX40L, такое как полностью соответствующее человеческому моноклональное антитело к hOX40L.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к части OX40L и тяжелых цепей, обычно около аминотерминальных от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и примерно от 100 до 110 аминокислот в легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности между антителами и задействованы при связывании и для обеспечания специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельность в последовательности сосредоточена в тех участках, которые

называются участками определяющие комплементарность (CDR), тогда как более высококонсервативные участки в вариабельном домене называются каркасными участками (FR). CDR OX40L и тяжелые цепи в первую очередь ответственны за взаимодействие антитела с антигеном. Нумерация позиций аминокислот, используемых в данном документе, соответствует индексу EC, как в Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed. ("Kabat et al."). В предпочтительных вариантах реализации изобретения вариабельная область представляет собой вариабельную область человека.

Антитела

Антитела данного изобретения включают в том числе синтетические антитела, моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, мультиспецифические антитела (например, включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, внутриклеточные антитела, одноцепочечные Fvs (scFv) (например, включая моноспецифические, биспецифические и т.д.), камелизированные антитела, Fab-фрагменты, фрагменты F (ab'), связаных дисульфидной связью Fvs (sdFv), анти-идиотипические антитела (анти-Id) и эпитоп-связывающие фрагменты любых из вышеперечисленных.

В частности, антитела представленные в данном документе, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть молекулы, которые содержат сайт связывания антигена, который специфически связывается с антигеном hOX40L. Молекулы иммуноглобулина, представленные в данном документе, могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. В специфическом варианте реализации изобретения антитело, представленное в данном документе, представляет собой антитело IgG, предпочтительно IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела данного изобретения содержат константную область гамма-4 человека. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи не связывает с Fc-γ-рецептором и, например, включает мутацию Leu235Glu. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутацию Ser228Pro для повышения стабильности. В другом варианте реализации изобретения константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4-PE.

Варианты и производные антител включают фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с эпитопом. Предпочтительные фрагменты включают фрагменты Fab; Fab' (фрагмент антитела, содержащий единственное антитело к связывающему домену, содержащий Fab и дополнительную часть тяжелой цепи через шарнирную область); $F(ab')_2$ (две молекулы Fab', соединенные межцепочечными дисульфидными связями в шарнирных областях тяжелых цепей; молекулы Fab' могут быть направлены на одни и те же или разные эпитопы); биспецифической Fab (молекулу Fab, имеющую два антигенсвязывающих домена, каждая из которых может быть направлена на другой эпитоп); одноцепочечной Fab-цепи, содержащая вариабельную область, также известную как sFv; дисульфидсвязанные Fv или dsFv; камелизированной VH (вариабельная, антигенсвязывающая определяющая область одной тяжелой цепи антитела, в которой некоторые аминокислоты на границе VH представляют собой те, которые находятся в тяжелой цепи встречающихся в природе камелизированных антител); биспецифической sFv (молекулу sFv или dsFv, имеющее два антигенсвязывающих домена, каждый из которых может быть направлен на другой эпитоп); диатело (димеризованный sFv, образований, когда VH-домен первого sFv

объединяется с VL-доменом второго sFv и VL-домен первого sFv объединяется с VH-доменом второго sFv, причем две антигенсвязывающие области диатела могут направляться к тем же или различным эпитопам); и триатело (тримеризованный sFv, образованый способом, подобным способу образования диатела, но в котором три антигенсвязывающих домена объединяются в одном комплексе, причем три антигенсвязывающие домена могут быть направлены на одни и те же или разные эпитопы). Производные антител также включают одну или несколько CDR-последовательностей сайта объединения антител. Последовательности CDR могут быть объединены вместе, если присутствуют две или более последовательности CDR. В определенных вариантах реализации изобретения антитело, которое должно использоваться с изобретением, содержит одноцепочечный Fv («scFv»). ScFvs представляют собой фрагменты антител, содержащие VH и VL-домены антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать желаемую структуру для связывания антигена. Для обзора scFvs см. Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Антитела, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Антитела данного изобретения могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих (например, человека, мышь, осла, овцу, кролика, козу, морскую свинку, верблюда, лошадь или курицы). В определенных вариантах реализации изобретения антитела данного изобретения представляют собой человеческие или гуманизированные моноклональные антитела. Как используется в данном документе, «человеческие» антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулина человека или из мышей, которые экспрессируют антитела из генов человека.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитела данного изобретения представляют собой полностью человеческие антитела, такие как полностью человеческие антитела, которые специфически связывают полипептид hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или эпитоп hOX40L. Такие полностью человеческие антитела были бы выгодны по сравнению с полностью мышиными (или другими полными или частичными антителами не человеческих видов), гуманизированными антителами или химерными антителами для минимизации развития нежелательных или ненужных побочных эффектов, таких как иммунные ответы, направленные на не полностью человеческие антитела (например, антитела против hOX40L, полученные от других видов) при введении субъекту.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или с большей мультиспецифичностью. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими для различных эпитопов полипептида hOX40L или могут быть специфическими как для полипептида hOX40L, так и для гетерологичного эпитопа, такого как гетерологичный полипептид или твердый материал носителя. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитела представленные в данном документе являются моноспецифическими для данного эпитопа полипептида hOX40L и не специфически связываются с другими эпитопами.

Также в данном документе представлена B-клетка (например, иммортализованная B-клетка) или гибридома, которая продуцирует антитело к hOX40L или его фрагмент, описанные в данном документе.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе

представленно выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом hOX40L, в котором связывание эпитопа hOX40L с антителом конкурентно блокируется (например, дозозависимым образом) антителом или фрагментом данного изобретения. Антитело может быть или не быть полностью антителом человека. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полностью моноклональное антитело человека против hOX40L и еще более предпочтительно полностью моноклональное антагонистическое антитело человека против hOX40L. Примеры анализов конкурентного блокирования, которые могут быть использованы, приведены в разделе «Примеры» данного документа.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент согласно данному изобретению конкурируют (например, дозозависимым образом) с рецептором OX40 (или его слитым белком) за связывание с клеточно-экспрессируемым hOX40L. В других вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент согласно данному изобретению конкурируют (например, дозозависимым образом) с рецептором OX40 (или его слитым белком) за связывание с растворимым hOX40L. Примеры анализов связывания, которые могут быть использованы, приведены в разделе «Примеры» данного документа. В одном варианте реализации изобретения антитело или его фрагмент частично или полностью ингибируют связывание hOX40 с экспрессируемым на клеточной поверхности OX40L, таким как hOX40L. В другом варианте реализации изобретения антитело частично или полностью ингибирует связывание hOX40 с растворимым hOX40L. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент частично или полностью ингибируют секрецию CCL20, IL-8 и/или RANTES, или INF-γ, TNF- или IL-2, в частности INF-γ, из клетки, экспрессирующей OX40 на клеточной поверхности. В определенных вариантах реализации изобретения клетка, экспрессирующая OX40, представляет собой эпителиальную клетку кишечника.

Предпочтительно, антитела данного изобретения являются полностью человеческими, моноклональными антителами, такими как полностью человеческие, моноклональные антагонистические антитела, которые специфически связываются с hOX40L.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его фрагмент, приведенные в данном документе, связываются с эпитопом hOX40L, который представляет собой трехмерное свойство полипептида hOX40L (например, в тримерной форме полипептида hOX40L). Область полипептида hOX40L, составляющая эпитоп, может быть непрерывной последовательностью аминокислот полипептида, или эпитоп может состоять из двух или более несмежных областей полипептида A, hOX40L может присутствовать в (a) трехмерной форме hOX40L («трехмерный hOX40L эпитоп»), (b) мономерной форме hOX40L («мономерный hOX40L эпитоп»), (c) как трехмерной, так и мономерной форме hOX40L, (d) трехмерной форме, но не в мономерной форме hOX40L эпитопа или (e) мономерной форме, но не в трехмерной форме hOX40L.

Например, в некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп только присутствует или доступен для связывания в трехмерной (нативной) форме, но не присутствует или не доступен для связывания в мономерной (денатурированной) форме антитела к hOX40L. В других вариантах реализации изобретения эпитоп hOX40L является линейным свойством полипептида hOX40L (например, в трехмерной форме или мономерной форме полипептида hOX40L). Антитела, представленные в данном документе, могут специфически связываться с (a) эпитопом мономерной формы hOX40L, (b) эпитопом трехмерной формы hOX40L, (c) эпитопом мономерной, но не трехмерной формы hOX40L, (d) эпитопом трехмерной, но не мономерной формы hOX40L, или (e) как с мономерной формой, так и с трехмерной формой hOX40L. В предпочтительных

вариантах реализации изобретения антитела, представленные в данном документе, специфически связываются с эпитопом трехмерной формы hOX40L, но не связываются специфически с эпитопом мономерной формы hOX40L.

Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфически связываются с эпитопом hOX40L, антителами, содержащими производные доменов VH, домены VH CDR, VL и VL CDR, описанные в данном документе, которые специфически связываются с антигеном hOX40L. В настоящем изобретении также представлены антитела, содержащие производные антител, описанные в разделе «Примеры» данного документа, где указанные антитела специфически связываются с эпитопом hOX40L. Стандартные методы, известные специалистам в данной области, могут использоваться для введения мутаций в нуклеотидные последовательности, кодирующее молекулу данного изобретения, включая, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез, что приводит к аминокислотным заменам. Предпочтительно, производные включают менее чем 25 аминокислотных замен, менее чем 20 аминокислотных замен, менее чем 15 аминокислотных замен, менее чем 10 аминокислотных замен, менее чем 5 аминокислотных замен, менее чем 4 аминокислотных замен, менее чем 3 аминокислотные замены или замена менее чем 2 аминокислотные замены относительно исходной молекулы. В другом варианте реализации изобретения производные имеют консервативные аминокислотные замены. В предпочтительном варианте реализации изобретения производные имеют консервативные аминокислотные замены, полученные в одном или нескольких предсказанных незаменимых аминокислотных остатках. Альтернативно, мутации можно вводить случайным образом по всей или части кодирующей последовательности, например, путем мутагенеза насыщения, и полученные мутанты можно скринировать на биологическую активность для идентификации мутантов, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать и можно определить активность белка.

В другом варианте реализации изобретения антитело, которое специфически связывается с эпитопом hOX40L, содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена, которая по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности вариабельного домена из перечня последовательностей.

В конкретных вариантах реализации изобретения антитело является полностью человеческим антителом, таким как полностью моноклональное антитело человека. Полностью человеческие антитела можно получить любым способом, известным в данной области. Типичные способы включают иммунизацию антигеном hOX40L (любой полипептид hOX40L, способный вызывать иммунный ответ и необязательно конъюгированный с носителем) трансгенных животных (например, мышей), которые способны продуцировать репертуар человеческих антител в отсутствие эндогенного производства иммуноглобулина; См., например, Jakobovits et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., 90:2551; Jakobovits et al., (1993) Nature, 362:255 258 (1993); Bruggermann et al., (1993) Year in Immunol., 7:33. Другие способы получения полностью человеческих антител к hOX40L можно найти в приведенных в разделе «Примеры» данного документа.

Альтернативно, полностью человеческие антитела могут быть получены посредством in vitro скрининга библиотек антител фагового дисплея; См., например, Hoogenboom et

al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991), включенную в данный документ посредством ссылки. Описаны различные библиотеки антителосодержащего фагового дисплея, которые могут быть в полной мере использованы специалистами в данной области. Библиотеки могут содержать множество последовательностей антител человека, таких как фрагменты Fab, Fv и scFv человека, которые могут быть скринированы против соответствующей мишени.

Антитела и фрагменты данного изобретения включают антитела и фрагменты, которые химически модифицированы, то есть путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу. Например, но не ограничиваясь этим, производные антитела включают антитела, которые были химически модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защищающими/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другого белка и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлить известными способами в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, конкретное химическое расщепление, ацетилирование, рецептуру, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитело может содержать одину или несколько не классических аминокислоты.

Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, который содержит каркасную область, известную специалистам в данной области (например, человеческий или нечеловеческий фрагмент). Каркасная область может, например, быть каркасной областью естественного происхождения. Наиболее предпочтительная каркасная область антитела данного изобретения - человеческая (См., например, Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol., 278: 457-479 перечисление каркасных областей человека, публикацмя включена посредством ссылки в данный документ во всей их полноте). См. также Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, причем указанные антитела содержат аминокислотную последовательность одного или нескольких CDR в списке последовательностей (т.е. в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID No: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42 for HCDR1; Seq ID No: 6, Seq ID No: 12, Seq ID No: 38, Seq ID No: 44, Seq ID No: 70, Seq ID No: 76, Seq ID No: 98 или Seq ID No: 104, в частности, Seq ID No: 38 или Seq ID No: 44 for HCDR2; Seq ID No: 8, Seq ID No: 14, Seq ID No: 40, Seq ID No: 46, Seq ID No: 72, Seq ID No: 78, Seq ID No: 100 или Seq ID No: 106, в частности, Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46 for HCDR3; Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56 for LCDR1; Seq ID No: 20, Seq ID No: 26, Seq ID No: 52, Seq ID No: 58, Seq ID No: 84, Seq ID No: 90, Seq ID No: 112 или Seq ID No: 118, в частности, Seq ID No: 52 или Seq ID No: 58 for LCDR2; и Seq ID No: 22, Seq ID No: 28, Seq ID No: 54, Seq ID No: 60, Seq ID No: 86, Seq ID No: 92, Seq ID No: 114 или Seq ID No: 120, в частности, Seq ID No: 54 или Seq ID No: 60 for LCDR3) и каркасные области человека с одной или несколькими заменами аминокислот на один, два, три или более из следующих остатков: (a) редкие каркасные остатки, которые отличаются от каркаса антитела мыши (т.е. каркаса донорных антител) и каркаса антитела человека (т.е., каркас акцепторных антител); (b) остатки зоны Верньера при различии между

каркасом донорных антител и каркасом акцепторных антител; (c) межцепочечные остатки упаковки на границе VH/VL, которые отличаются между каркасом донорных антител и каркасом акцепторного антитела; (d) канонические остатки, которые отличаются между каркасом донорного антитела и каркасными последовательностями акцепторного антитела, особенно каркасные области, имеющие решающее значение для определения канонического класса пептидов CDR антитела мыши; (e) остатки, которые смежны с CDR; (g) остатки, способные взаимодействовать с антигеном; (h) остатки, способные взаимодействовать с CDR; и (i) контактные остатки между доменом VH и доменом VL.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, содержащим каркасные области человека с одной или несколькими аминокислотными заменами на один, два, три или более из вышеуказанных остатков, являются антагонистическими антителами hOX40L.

Настоящее изобретение охватывает антитела, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, причем указанные антитела содержат аминокислотную последовательность домена VH и/или домена VL в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 2, Seq ID No: 34, Seq ID No: 66 или Seq ID No: 94, в частности Seq ID No: 34 для доменов VH, Seq ID No: 16, Seq ID No: 48, Seq ID No: 80 или Seq ID No: 108, в частности Seq ID No: 48 для доменов VL), но с мутациями (например, одной или несколькими аминокислотными заменами) в каркасных областях. В опредленных вариантах реализации изобретения антитела, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, содержат аминокислотную последовательность домена VH и/или VL-домена или их антигенсвязывающий фрагмент антитела, раскрытые в разделе «Примеры» данного документа, с одним или несколькими аминокислотными остатками в каркасных областях доменов VH и/или VL.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, представленные в данном документе, уменьшают или ингибируют связывание hOX40L hOX40 и/или уменьшают или ингибируют биологическую активность hOX40L, такую как секреция CCL20, IL8 и/или RANTES, или INF-γ, TNF- или IL-2, в частности INF-γ, у субъекта (например, человека). В определенных вариантах реализации изобретения антитела, представленные в данном документе, такие как моноклональные антитела человека к hOX40L, уменьшают или ингибируют связывание растворимого или клеточно-экспрессируемого hOX40L с hOX40 и/или уменьшают или ингибируют секрецию CCL20 и/или RANTES, или INF-γ, TNF-α или IL-2, в частности INF-γ после контакта с растворимым или клеточно-экспрессируемым hOX40L у субъекта. Блокирующую связывание hOX40L с hOX40 активность антитела, представленную в данном документе,, можно определить, используя анализ, как описано в разделе «Примеры» данного документа. Ингибирование биологической активности клеток, экспрессирующих OX40 антителом hOX40L, представленным в данном документе, можно определить с использованием анализа, как описано в разделе «Примеры» данного документа.

В настоящем изобретении также представлены слитые белки, содержащие антитело, представленное в данном документе, которое специфически связывается с антигеном hOX40L и гетерологичным полипептидом. В некоторых вариантах реализации изобретения гетерологичный полипептид, с которым объеденено антитело, применяется для мечения антитела на клетках, экспрессирующих hOX40L на клеточной поверхности.

Конъюгаты антител и слитые белки

Следующее обсуждение конъюгатов и слитых белков также относится к фрагментам, так что выявление упомянутых антител, указанных в описании, также можно применять

mutatis mutandis к фрагментам в изобретении.

В некоторых вариантах реализации изобретения, антитела по настоящему изобретению конъюгированы или рекомбинантно слиты с диагностическим, детектируемым или терапевтическим средством или любой другой молекулой. Конъюгированные или рекомбинантно слитые антитела могут быть полезными, например, для мониторинга или прогнозирования начала развития, прогрессирования и/или тяжести hOX40L-опосредованного заболевания, как части клинической процедуры тестирования, такой как определение эффективности конкретной терапии.

Такую диагностику и обнаружение можно выполнить, например, путем связывания антитела с обнаруживаемыми веществами, включая, но не ограничиваясь этим, различные ферменты, такие как, но не ограничиваясь этим, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; протеазные группы, такие как, но не ограничиваясь этим, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь этим, умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцинат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь этим, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь этим, люцифераза, люциферин и аэкорин; радиоактивные материалы, такие как, но не ограничиваясь этим, йод (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Ti), галлий (^{68}Ga, ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), 153Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142}Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}Mn, ^{75}Se, ^{113}Sn и ^{117}Sn; и позитрон излучающие металлы, с использованием различных томограмм эмиссии позитронов и нерадиоактивных парамагнитных ионов металлов.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает использование антител настоящего изобретения, конъюгированных или рекомбинантно слитых с терапевтическим фрагментом (или одного или нескольких терапевтических фрагментов). Антитело может быть конъюгировано или рекомбинантно слито с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, например, цитостатическое или цитоцидное средство, терапевтическое средство или ион радиоактивного металла, например, альфа-излучатели. Цитотоксины или цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для клеток. Терапевтические фрагменты включают, но не ограничиваясь ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин); алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BCNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цисдихлориамин платина (II) (DDP) и цисплатин); антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин); антибиотики (например, d-актиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)); молекулы ауристатина (например, ауристатин PHE, бриостатин 1 и соластатин 10, см. Woyke et al., Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3802-8 (2002), Woyke et al., Antimicrob. Агенты Chemother 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., Anticancer Drugs 12: 735-40 (2001), Wall et al., Biochem. Biophys. Res. Commun 266: 76-80 (1999), Mohammad et al., Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999), все из которых включены в данный документ посредством ссылки); гормоны (например, глюкокортикоиды, прогестины, андрогены и эстрогены), ингибиторы фермента ДНК-востановления (например, этопозид или топотекан), ингибиторы киназы (например,

соединение ST1571, мезилат иматиниба (Kantarjian et al., Clin Cancer Res., 8 (7): 2167-76 (2002)), цитотоксические средства (например, паклитаксел, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и аналоги или его гомологи и те соединения, которые описаны в патенте США No. 6245759, 6399633, 6383790, 6335156, 6271242, 6242196, 6218410, 6218372, 6057300, 6034053, 5985877, 5958769, 5925376, 5922844, 5911995, 5872223, 5863904, 5840745, 5728868, 5648239, 5587459); ингибиторы фарнезилтрансферазы (например, R 115777, BMS-214662 и те, которые описаны, например, в патентах США 6458935, 6451812, 6440974, 6436960, 6432959, 6420387, 6414145, 6410541, 6410539, 6403581, 6399615, 6387905, 6372747, 6369034, 6362188, 6342765, 6342487, 6300501, 6268363, 6265422, 6248756, 6239140, 6232338, 6228865, 6228856, 6225322, 6218406, 6211193, 6187786, 6169096, 6159984, 6143766, 6133303, 6127366, 6124465, 6124295, 6103723, 6093737, 6090948, 6080870, 6077853, 6071935, 6066738, 6063930, 6054466, 6051582, 6051574 и 6040305); ингибиторы топоизомеразы (например, камптотецин, иринотекан, SN-38, топотекан, 9-аминокамптотецин, GG-211 (GI 147211), DX-8951f, IST-622, рубитекан, пиразолоакридин, XR-5000, сантипин, UCE6, UCE1022, TAN - 1518 A, TAN 1518 B, KT6006, KT6528, ED-110, NB-506, ED-110, NB-506 и ребекамицин); булгареин; ДНК-второстепенные связки, такие как краситель Hoescht 33342 и краситель Hoechst 33258; нитидин; фагаронин; эпиберберин; коралин; бета-лапакон; BC-4-1; бисфосфонаты (например, алендронат, цимадронт, клодронат, тилудронат, этидронат, ибандронат, неридронат, олпандронат, ризедронат, пиридронат, памидронат, золендронат), ингибиторы HMG-CoA редуктазы (например, ловастатин, симвастатин, аторвастатин, правастатин, флувастатин, статин, церивастатин, лескол, люпитор, розувастатин и аторвастатин); антисмысловые олигонуклеотиды (например, те, которые описаны в патентах США №№6277832, 5998596, 5885834, 5734333 и 5618709); ингибиторы аденозиндезаминазы (например, фосфат флударабина и 2-хлордезоксиаденозин); ибритумомаб тиуксетан (Zevalin®); тозитумибаб (Bexxar®)) и их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты и пролекарства.

Дополнительно, антитело по настоящему изобретению может быть конъюгировано или рекомбинантно слито с терапевтическим фрагментом или лекарственным фрагментом, который модифицирует данный биологический ответ. Терапевтические фрагменты или лекарственные фрагменты не должны истолковываться как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, лекарственный фрагмент может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин A, экзотоксин псевдомонад, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли, γ-интерферон, α-интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, активатор тканевого плазминогена, апоптотический агент, например, TNF-γ, AIM I (см. Международную публикацию №WO 97/33899), AIM II (см. Международную публикацию №WO 97/34911), Fas Ligand (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567-1574) и VEGF (см. Международную публикацию №WO 99/23105), антиангиогенный агент, например, ангиостатин, эндостатин или компонент коагуляционного пути (например, тканевой фактор); или, модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин (например, интерферон гамма, интерлейкин-1 («IL-1»), интерлейкин-2 («IL-2»), интерлейкин-5 («IL-5), интерлейкин-6 («IL-6»), интерлейкин-7 («IL-7»), интерлейкин 9 («IL-9»), интерлейкин-10 («IL-10»),

интерлейкин-12 («IL-12»), интерлейкин-15 («IL-15»), интерлейкин-23 («IL-23»), гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор («GM-CSF») и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор («GM-CSF")) или фактор роста (например, гормон роста ("GH")) или коагуляционное средство (например, кальций, витамин K, тканевые факторы, такие как, но не ограничиваясь этим, фактор Хагемана (фактор XII), высокомолекулярный кининоген (HMWK), прекалликреин (ПК), коагуляционные белки-факторы II (протромбин), фактор V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, фосфолипид и мономер фибрина).

Настоящее изобретение охватывает антитела изобретения, рекомбинантно слитые или химически конъюгированные (ковалентные или нековалентные конъюгации) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно с полипептидом около 10, около 20, около 30, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90 или около 100 аминокислот) для получения слитых белков. В частности, в настоящем изобретении представлены слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению (например, фрагмент Fab, фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент F(ab)2, домен VH, VH CDR, VL домен или VL CDR) и гетерологичный белок, полипептид или пептид. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный белок, полипептид или пептид, с которыми сливается антитело, применим для нацеливания антитела на конкретный тип клеток, такой как клетка, которая экспрессирует hOX40L или рецептор hOX40L. Например, антитело, которое специфически связывается с рецептором клеточной поверхности, экспрессируемым конкретным типом клетки (например, иммунной клеткой), может быть слито или конъюгировано с модифицированным антителом настоящего изобретения.

Конъюгированный или слитый белок настоящего изобретения включает любое антитело по настоящему изобретению, описанное в данном документе, и гетерологичный полипептид. В одном варианте реализации изобретения конъюгированный или слитый белок содержит вариабельные домены антитела, раскрытые в разделе «Примеры» данного документа, и гетерологичный полипептид.

Кроме того, антитело данного изобретения может быть конъюгировано с терапевтическими фрагментами, такими как ион радиоактивного металла, такой как альфа-излучатели, такие как ^{213}Bi или макроциклическими хелаторами, пригодными для конъюгации радиометаллических ионов, включая, но не ограничиваясь этим, ^{131}In, ^{131}Lu, ^{131}Y, ^{131}Ho, ^{131}Sm, к полипептидам. В некоторых вариантах реализации изобретения макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N",N'"-тетрауксусную кислоту (DOTA), которые могут быть присоединены к антителу через молекулу линкер. Такие молекулы-линкеры широко известны специалистам в данной области и описаны в Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; и Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol., 26 (8): 943-50, каждый из которых включен посредством ссылки во всей их полноте.

Более того, антитела данного изобретения могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептид, способствующий очистке. В предпочтительных вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность маркера представляет собой гексагистидиновый пептид, такой как метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc.), многие из которых являются коммерчески доступными. Гексагистидин, например, обеспечивает удобную очистку

слитого белка, как описано в Gentz et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824. Другие пептидные метки, используемые для очистки, включают, в том числе, метку гемагглютинина («HA»), которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина гриппа (Wilson et al., 1984, Cell 37:767), и метку "FLAG".

Способы слияния или конъюгации терапевтических фрагментов (включая полипептиды) с антителами хорошо известны специалистам в данной области, См., например, Arnon et al, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в моноклональных антителах и терапии рака, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe et al, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; Патент США No. 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851, 5723125, 5783181, 5908626, 5844095 и 5112946; EP 307344; EP 367166; EP 394827; публикации PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 и WO 99/04813; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Traunecker et al., Nature, 331:84-86, 1988; Zheng et al., J. Immunol., 154: 5590-5600, 1995; Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11337-11341, 1992, которые включены в данной документ посредством ссылки во всей их полноте.

Слитые белки можно получить, например, с помощью методов перетасовки гена, перетасовки мотивов, перетасовки экзона и/или перетасовки кодона (в совокупности называемых «перетасовки ДНК»). ДНК-перетасовка может быть использована для изменения активности антител данного изобретения (например, антител с более высокой аффинностью и более низкими скоростями диссоциации). См., как правило, патент США. No. 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, и 5837458; Patten et al, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313 (каждый из этих патентов и публикаций полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки). Антитела или кодированные антитела можно изменять путем воздействия на случайный мутагенез методом ПЦР с внесением ошибок, случайной нуклеотидной вставкой или другими способами до рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело данного изобретения, можно рекомбинировать с одним или несколькими компонентами, мотивами, участками, частями, доменами, фрагментами и т.д., с одной или более гетерологичными молекулами.

Антитело данного изобретения также можно конъюгировать со вторым антителом с образованием гетероконъюгата антитела, как описано в патенте США No. №4676980, который включен в настоящее изобретение посредством ссылки во всей его полноте.

Терапевтический фрагмент или лекарственное средство, конъюгированное или рекомбинантно слитое с антителом данного изобретения, которое специфически связывается с антигеном hOX40L, должно быть выбрано для достижения желаемого профилактического или терапевтического эффекта (эффектов). В определенных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой модифицированное антитело. Практикующий врач или другой представитель медицинского персонал должен учитывать следующее при принятии решения о том, какой терапевтический фрагмент или лекарственное средство должны быть конъюгированы или рекомбинантно слиты с антителом данного изобретения: характер заболевания, тяжесть заболевания

и состояние субъекта.

Антитела данного изобретения также могут быть прикреплены к твердым носителям, которые особенно полезны для иммунологических анализов или очистки меченного антигена. Такие твердые носители включают, в том числе, стекло, целлюлозу, полиакриламид, найлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Фармацевтические композиции

Следующее обсуждение касательно композиций также относится к фрагментам, так что раскрытие упоминающихся антител может также подходить mutatis mutandis к фрагментам настоящего изобретения.

Терапевтические композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения, представленные в данном документе, можно получить для хранения путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с произвольными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутил или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше чем 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN TM, PLURONICS TM или полиэтиленгликоль (PEG).

Антитела по настоящему изобретению, представленые в данном документе, могут также, например, быть составлены в липосомах. Липосомы, содержащие интересующую молекулу, получают способами, известными специалистам в данной области, такими как описанные в Epstein et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; и U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции, раскрыты в патенте США No. 5013556.

Особенно полезные иммунолипосомы можно получить методом обратного фазового испарения с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ПЭ). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы с требуемым диаметром. Fab' фрагменты антитела, представленые в данном документе, могут конъюгироваться с липосомами, как описано в Martin et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:286-288, через реакцию дисульфидного обмена. Химиотерапевтическое средство (такой как Доксорубицин) опционально содержится внутри липосомы; См. Gabizon et al., (1989) J. National Cancer Inst. 81(19):1484.

Препараты, такие как те, что описанны в данном документе, могут также содержать более одного активного соединения, если необходимо, для конкретного показания,

которое лечиться. В определенных вариантах реализации изобретения препараты содержат антитело данного изобретения и одно или несколько активных соединений с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Например, антитело по настоящему изобретению можно комбинировать с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. Такая комбинированная терапия может вводиться пациенту поочередно или одновременно, или последовательно.

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и дополнительные терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, антител к IL12/IL-23 (например, устекинумаба), антител к CD20 (например, ритуксимаба), антител к CD30 (например, брентуксимаба), молекул CTLA4-FC (например, абатацепта), антагонистов рецептора CCR5 (например, маравирока), антител к CD40L, антител к VLA4 (например, натализумаба), антител к LFA1, флударабина, антител к CD52 (например, алемтузумаба), антител к CD45, циклофосфамида, антитимоцитарных глобулинов, антител к компоненту C5 системы комплемента (например, экулизумаб), антител к a4b7-интегрину (например, ведолизумаба), антител к IL6 (например, тоцилизумаба), антител к IL2R (например, базиликсимаба), антител к CD25 (например, даклизумаба), молекул, специфичных по отношению к TNFa/TNFa-Fc (например, этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба или цертолизумаба пегола), и Вориностата. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и дополнительные терапевтические средства, независимо выбранного из группы, состоящей из рапамицина (сиролимуса), такролимуса, циклоспорина, кортикостероидов (например, метилпреднизолона), метотрексата, мофетила микофенолата, антител к CD28, молекул CTLA4-Fc (например, абатацепта), антител к CD40L, антител к LFA1, антител к CD52 (например, алемтузумаба), циклофосфамида и антитимоцитарных глобулинов.

В некоторых вариантах реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, независимо выбранные из группы, включающей ингибиторы кальциневрина (например, такролимус, циклоспорин), ингибиторы mTOR (например, рапамицин (сиролимус)) и антипролиферативные средства (например, микофенолат мофетил, циклофосфамид).

В дополнительных вариантах реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и другие терапевтические средства, независимо выбранные из группы, состоящей из иммунодепрессантов, которые модулируют передачу сигналов IL-2 (например, такролимус, циклоспорин, рапамицин (сиролимус) и антител к CD25 (например, базиликмам, даклизумаб).

В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и рапамицин (сиролимус). В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и такролимус. В одном варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и комбинацию такролимуса и метотрексата. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклоспорин

и метотрексат. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и циклофосфамид. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит антитело к OX40L по настоящему изобретению и мофетил микофенолята.

Антитело по настоящему изобретению можно также быть заключено в микрокапсулу, полученную, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозу или желатиновую микрокапсулу и поли-(метилметакрилатную) микрокапсулу соответственно в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методы раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Препараты, используемые для in vivo введения, могут быть стерильными. Этого легко достичь путем фильтрации через, например, мембраны стерильного фильтра.

Также можно готовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антагонист, причем матрицы находятся в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США №3777919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамат, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT TM (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождать молекулы в течение более 100 дней, некоторые гидрогели выделяют белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Рациональные стратегии могут быть разработаны для стабилизации в зависимости от задействованного механизма. Например, если обнаружено, что механизмом агрегации является межмолекулярное образование связи S-S путем обмена тио-дисульфида, стабилизации можно достичь путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги с использованием соответствующих добавок и разработки конкретной полимерной матрицы композиции.

Представленные в данном документе фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективные количества одного или нескольких антител настоящего изобретения, представленных в данном документе, и опционально одно или несколько дополнительных профилактических терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. Такие фармацевтические композиции полезны для профилактики, лечения, коррекции или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, такого как воспалительное заболевание кишечника, отторжение трансплантата, БТПХ или один или несколько из его симптомов.

Фармацевтические носители, подходящие для введения представленных в данном документе соединений, включают любые такие носители, известные специалистам в данной области, подходящие для конкретного способа введения.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут быть составлены в виде

единственного фармацевтически активного ингредиента в композиции или могут быть объединены с другими активными ингредиентами (такими как одно или несколько других профилактических или терапевтических средств).

Композиции могут содержать одно или несколько антител настоящего изобретения. В одном варианте реализации изобретения антитела формулируются в подходящие фармацевтические препараты, такие как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, препараты с замедленным высвобождением или эликсиры для перорального введения, или в стерильные растворы или суспензии для парентерального введения, а также трансдермальный пластырь и сухие порошковые ингаляторы. В одном варианте реализации изобретения антитела, описанные выше, формулируются в фармацевтические композиции с использованием методов и процедур, хорошо известных специалистам в данной области (См., например, Ansel (1985) Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th Ed., p. 126).

В композициях, эффективные концентрации одного или нескольких антител или их производных является (являются) смешивание с подходящим фармацевтическим носителем. Концентрации соединений в композициях эффективны для доставки такого количества, при введении, которое лечит, предотвращает или улучшает hOX40L-опосредованное заболевание или его симптом.

В одном варианте реализации изобретения, композиции готовят для одноразового введения дозы. Для того, чтобы сформулировать состав, массовую долю соединения растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают в выбранном носителе эффективную концентрацию, такую которая облегчает состояние лечения, предотвращает, облегчают один или несколько симптомов.

Антитело по настоящему изобретению входит в фармацевтически приемлемый носитель в эффективно достаточном количестве, чтобы оказывать полезный терапевтический эффект при отсутствии нежелательных побочных эффектов на пациенте, подвергающийся лечению. Терапевтически эффективная концентрация может быть установлена эмпирическим путем тестирования соединений в in vitro и in vivo системах с использованием обычных способов и затем экстраполировали отдуда дозировки для людей.

Концентрация антитела в фармацевтической композиции будет зависеть, например, от физико-химических характеристик антитела, от графика дозировок и количества, а также от других факторов, известных специалистам в данной области.

В одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективная дозировка дает концентрацию антител в сыворотке от около 0,1 нг/мл до около 50-100 мкг/мл. Фармацевтические композиции в другом варианте реализации изобретения обеспечивают дозировку от около 0,001 мг до около 2000 мг антитела на килограмм массы тела в день. Фармацевтические лекарственные формы могут быть приготовлены для обеспечения от около 0,01 мг, 0,1 мг или от 1 мг до около 500 мг, 1000 мг или 2000 мг и в одном варианте реализации изобретения от около 10 мг до около 500 мг антитела и/или комбинации других оптиональных основных ингредиентов на единицу дозированной формы.

Антитело можно вводить за один раз или его можно разделить на несколько меньших доз, вводимых с интервалами времени. Понятно, что точная дозировка и продолжительность курса лечения являются функцией заболевания, которое подвергается лечению, и могут определяться эмпирически с использованием известных протоколов испытаний или экстраполяции из опытных данных in vivo или in vitro. Следует отметить, что концентрации и величина дозировки могут также варьироваться

в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта специфические режимы дозировки можно корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным заключением человека, управляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентрации указанные в данном документе приведены в качестве примера и не предназначены для ограничения области применимости или практики заявленных композиций.

При смешивании или добавлении антитела полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или тому подобное. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или носителе. Эффективная концентрация достаточна для улучшения симптомов заболевания, расстройства или состояния, которые могут быть установлены эмпирически.

Фармацевтические композиции предназначены для введения людям и животным в виде еденичных лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии и растворы или суспензии для полости рта, а также масляно-водяные эмульсии, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Антитело в одном варианте реализации изобретения составленно и введенно в виде единичных лекарственных форм или в виде множественных лекарственных форм. Единичные лекарственные формы, используемые в данном документе, относятся к физически дискретным единицам, подходящим для субъктов человека и животного и упаковываются индивидуально, как известно специалистам в данной области. Каждая единица дозы содержит предопределенное количество антитела, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем, растворителем или разбавителем. Примеры форм с одной дозой включают ампулы и шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Форму с одной дозой можно вводить фракциями или их множественными дозами. Форма с множественной дозой представляет собой множество идентичных единичных лекарственных форм, упакованных в один контейнер, который вводится в разовой форме с одной дозой. Примеры форм с множественной дозой включают флаконы, бутылки таблеток или капсул или бутылки пинтов или галлонов. Следовательно, форма с множественной дозой кратна формам с одной дозой, которые не разделены в упаковке.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения одно или более антител к hOX40L настоящего изобретения находятся в жидкой фармацевтической композиции. Жидкие фармацевтически приемлемые композиции могут быть получены, например, путем растворения, диспергирования или иного смешивания активного соединения, как определено выше, и необязательных фармацевтических адьювантов в носителе, таких как, например, вода, физиологический раствор, водная декстроза, глицерин, гликоли, этанол и тому подобное, чтобы тем самым образовать раствор или суспензию. При необходимости, фармацевтическая композиция, подлежащая введению, может также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие средства, эмульгаторы, солюбилизирующие средства, буферные pH средства и тому подобное, например, ацетат, цитрат натрия, производные циклодекстрина, монолаурат сорбитана, триэтаноламин ацетат натрия, триэтаноламин-олеат и другие подобные средства.

Действующие способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны для специалистов в данной области; например, См. Remington's Pharmaceutical

Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Можно приготовить лекарственные формы или композиции, содержащие антитела в диапазоне от 0,005% до 100%, с балансом, составленным из нетоксичного носителя. Способы получения этих композиций известны специалистам в данной области.

Пероральные фармацевтические лекарственные формы являются либо твердыми, либо гелевыми, либо жидкими. Твердые лекарственные формы представляют собой таблетки, капсулы, гранулы и объемные порошки. Типы пероральных таблеток включают сжатые, жевательные таблетки и таблетки, которые могут быть покрыты энтеросолюбильной оболочкой, покрыты сахаром или покрыты пленкой. Капсулы могут быть твердыми или мягкими желатиновыми капсулами, тогда как гранулы и порошки могут быть представленными в не шипучей или шипучей форме с сочетанием других ингредиентов, известных специалистам в данной области.

В определенных вариантах реализации изобретения составы представляют собой твердые лекарственные формы. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции представляют собой капсулы или таблетки. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать один или несколько из следующих ингредиентов или соединений аналогичного характера: связующее вещество; смазывающее вещество; разбавитель; вещество способствующее скольжению; разрыхлитель; краситель; подсластитель; ароматизатор; смачивающее средство; эметическая оболочка; и пленочная оболочка. Примеры связующих веществ включают микрокристаллическую целлюлозу, трагакант смолы, раствор глюкозы, алациевый раствор, раствор желатина, меласс, полиинилпирролидин, повидон, кросповидоны, сахарозу и крахмальную пасту. Смазывающие вещества включают тальк, крахмал, стеарат магния или кальция, ликоподий и стеариновую кислоту. Разбавители включают, например, лактозу, сахарозу, крахмал, каолин, соль, маннит и дикальцийфосфат. Вещества способствующие скольжению включают, в том числе, коллоидный диоксид кремния. Разрыхлители включают транскармеллозу натрия, натрийкрахмалгликолят, альгиновую кислоту, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, бентонит, метилцеллюлозу, агар и карбоксиметилцеллюлозу. Красители включают, например, любой из одобренных сертифицированных водорастворимых FD и C-красителей, их смесей; и нерастворимые в воде FD и C-красители, суспендированные на гидрате оксида алюминия. Подслащивающие вещества включают сахарозу, лактозу, маннит и искусственные подслащивающие агенты, такие как сахарин, и любое количество ароматизаторов, высушенных распылением. Ароматизаторы включают натуральные ароматизаторы, экстрагированные из растений, таких как фрукты и синтетические смеси соединений, которые дают приятное ощущение, такое как, но не ограничиваясь этим, перечная мята и метилсалицилат. Смачивающие средства включают моностеарат пропиленгликоля, моноолеат сорбитана, монолаурат диэтиленгликоля и полиоксиэтилен-лауральный эфир. Эметические оболочки включают жирные кислоты, жиры, воски, шеллак, аммониевые шеллак и ацетат фталаты целлюлозы. Пленочные оболочки включают гидроксиэтилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль 4000 и ацетатфталат целлюлозы.

Антитела по настоящему изобретению могут быть представлены в композиции, которые защищают его/их от кислой среды желудка. Например, композиция может быть составлена в оболочкрастворимой в кишечнике е, которая сохраняет свою целостность в желудке и высвобождает активное соединение в кишечнике. Композицию можно также приготовить в комбинации с антацидом или другим таким ингредиентом.

Когда лекарственная форма для однократного введения представляет собой капсулу,

она может содержать, помимо материала вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как жирное масло. Кроме того, лекарственные формы для однократного введения могут содержать различные другие материалы, которые изменяют физическую форму для однократного введения, например, покрытие сахара и других кишечных средств. Соединения также можно вводить в виде компонента эликсира, суспензии, сиропа, пластины, обсыпки, жевательной резинки или тому подобного. Сироп может содержать, помимо активных соединений, сахарозу в качестве подслащивающего средства и определенные консерванты, контрастные вещества и красители, и ароматизаторы.

Антитело также можно смешивать с другими активными веществами, которые не ухудшают желаемое действие, или с материалами, которые дополняют желаемое действие, такими как антациды, блокаторы H2 и диуретики. Активный ингредиент представляет собой антитело или его фармацевтически приемлемое производное, как описано в данном документе. Могут быть включены более высокие концентрации, вплоть до примерно 98% от массы активного ингредиента.

Во всех вариантах реализации изобретения таблетки и капсулы могут быть покрыты, как известно специалистам в данной области, для модификации или поддержания растворения активного ингредиента. Таким образом, например, они могут быть покрыты обычным растворимым в кишечнике, усваиваемым покрытием, таким как фенилсалицилат, воски и ацетатфталат целлюлозы.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения композиции представляют собой жидкие лекарственные формы. Жидкие пероральные лекарственные формы включают водные растворы, эмульсии, суспензии, растворы и/или суспензии, восстановленные из нешипучих гранул и шипучих препаратов, восстановленные из шипучих гранул. Водные растворы включают, например, эликсиры и сиропы. Эмульсии - это масло-в-воде или вода-в-масле.

Эликсиры - прозрачные, подслащенные, водно-спиртовые препараты. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эликсирах, включают растворители. Сиропы представляют собой концентрированные водные растворы сахара, например, сахарозы, и могут содержать консервант. Эмульсия представляет собой двухфазную систему, в которой одна жидкость диспергируется в виде маленьких глобул в другой жидкости. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эмульсиях, представляют собой неводные жидкости, эмульгаторы и консерванты. Суспензии используют фармацевтически приемлемые суспендирующие средства и консерванты.

Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в нешипучих гранулах, восстановленные в жидкой пероральной лекарственной форме, включают разбавители, подсластители и смачивающие вещества. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в шипучих гранулах, восстановленные в жидкой пероральной лекарственной форме, включают органические кислоты и источник двуокиси углерода. Окрашивающие и ароматизирующие средства используются во всех вышеуказанных лекарственных формах.

Растворители включают глицерин, сорбит, этиловый спирт и сироп. Примеры консервантов включают глицерин, метил и пропилпарабен, бензойную кислоту, бензоат натрия и спирт. Примеры неводных жидкостей, используемых в эмульсиях, включают минеральное масло и хлопковое масло. Примеры эмульгирующих средств, включают желатин, аравийскую камедь, трагакант, бентонит и поверхностно-активные вещества, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. Суспендирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, пектин, трагакант, вигум и аравийскую камедь.

Подслащивающие средства включают сахарозу, сиропы, глицерин и искусственные подслащивающие средства, такие как сахарин. Смачивающие средства включают моностеарат пропиленгликоля, моноолеат сорбитана, монолаурат диэтиленгликоля и полиоксиэтилен-лауриловый эфир. Органические кислоты включают лимонную и винную кислоту. Источниками углекислого газа являются бикарбонат натрия и карбонат натрия. Красители включают любые одобренные сертифицированные водорастворимые FD и C-красители и их смеси. Ароматизаторы включают натуральные ароматизаторы, экстрагированные из подобных плодов растений, и синтетические смеси соединений, которые приносят приятное ощущение вкуса.

Для твердой лекарственной формы раствор или суспензия, например, пропиленкарбонат, растительные масла или триглицериды в одном варианте реализации изобретения инкапсулированы в желатиновую капсулу. Такие растворы, а также их получение и их инкапсуляция раскрыты в патенте США №4328245; 4409239; и 4410545. Для жидкой лекарственной формы как, например, раствор, например, полиэтиленгликоля, может быть разбавлен достаточным количеством фармацевтически приемлемого жидкого носителя, например, воды, для легкого дозирования для введения.

Альтернативно, жидкие или полутвердые пероральные препараты могут быть получены путем растворения или диспергирования активного соединения или соли в растительных маслах, гликолях, триглицеридах, эфирах пропиленгликоля (например, пропиленкарбонате) и других таких носителях и инкапсулирование этих растворов или суспензий в твердые или мягкие оболочки желатиновых капсул. Другие полезные составы включают те, которые указаны в патентах США №28819 и 4358603. Вкратце, такие препараты включают, в том числе, соединения, содержащие представленные в данном документе композицию, диалкилированный моно- или полиалкиленгликоль, включая, но не ограничиваясь этим, 1,2-диметоксиметан, диглим, триглим, тетраглим, полиэтиленгликоль-350-диметиловый эфир, полиэтиленгликоль-550-диметиловый эфир, полиэтиленгликоль-750-диметиловый эфир, где 350, 550 и 750 относятся к приблизительной средней молекулярной массе полиэтиленгликоля и одному или нескольким антиоксидантам, таким как бутилированный гидрокситолуол (BHT), бутилированный гидроксианизол (BHA), пропилгаллат, витамин E, гидрохинон, гидроксикумарины, этаноламин, лецитин, цефалин, аскорбиновая кислота, яблочная кислота, сорбит, фосфорная кислота, тиодипропиновая кислота и ее сложные эфиры и дитиокарбаматы.

Другие препараты включают, в том числе, водные спиртовые растворы, включающие фармацевтически приемлемый ацеталь. Спирты, используемые в этих составах, представляют собой любые фармацевтически приемлемые смешивающиеся с водой растворители, имеющие одну или несколько гидроксильных групп, включая, но не ограничиваясь этим, пропиленгликоль и этанол. Ацетаты включают, в том числе, диацетали (низший алкил) низших алкилдегидов, такие как диэтилацеталь ацетальдегида.

Парентеральное введение, в одном варианте реализации изобретения, представляет собой инъекцию, либо подкожно, лтбд внутримышечно или внутривенно, что также рассматривается в данном документе. Инъекции могут быть приготовлены в обычных формах либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, твердых форм, пригодных для растворения или суспензии в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Инъекции, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании фармацевтические композиции, которые должны вводиться, могут также содержать незначительные количества

нетоксичных вспомогательных материалов, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, pH буферные средства, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие средства, такие как, например, натрий ацетат, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

Также предполагается в данном документе внедрение системы замедленного высвобождения или пролонгированного высвобождения, такой, чтобы поддерживать постоянный уровень дозировки (См., например, патент США №3710795). Вкратце, представленное в данном докумете соединение диспергируется в твердой внутренней матрице, такой как, например, полиметилметакрилат, полибутилметакрилат, пластифицированный или непластифицированый поливинилхлорид, пластифицированный нейлон, пластифицированный полиэтилентерефталат, натуральный каучук, полиизопрене, полиизобутилен, полибутадиен, полиэтилен, этиленвинилацетатные сополимеры, силиконовые каучуки, полидиметилсилоксаны, силиконовые карбонатные сополимеры, гидрофильные полимеры, такие как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот, коллаген, сшитый поливиниловый спирт и сшитый частично гидролизованный поливинилацетат, который окружен внешней полимерной мембраной, например, полиэтиленом, полипропиленом, этилено/пропилен сополимеры, сополимеры этилена и этилакрилата, сополимеры этилена и винилацетата, силиконовые каучуки, полидиметилсилоксаны, неопреновый каучук, хлорированный полиэтилен, поливинилхлорид, винилхлоридные сополимеры с винилацетатом, винилиденхлорид, этилен и пропилен, иономерные полиэтилентере фталат, бутилкаучук, эпихлоргадриновые каучуки, сополимер этилена и винилового спирта, терполимер этилена/винилацетата/винилового спирта и сополимер этилена/винилоксиэтанола, который нерастворим в биологических жидкостях. Антитело диффундирует через внешнюю полимерную мембрану на стадии контроля скорости высвобождения. Количество антител, содержащихся в таких парентеральных композициях, сильно зависит от его специфической природы, а также от активности соединения и потребностей субъекта.

Приготовления для парентерального введения включают в себя стерильные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к смешиванию с растворителем непосредственно перед использованием, включая подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые к инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к применению, в сочетании с транспортным средством непосредственно перед использованием и стерильными эмульсиями. Растворы могут быть либо водными, либо неводными.

При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и растворы, содержащие загущающие и солюбилизирующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль и их смеси.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают в себя водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества.

Примеры водных носителей включают в себя инъекцию хлорида натрия, инъекцию рингеров, инъекцию изотонической декстрозы, инъекцию стерильной воды, инъекцию декстрозы и инъекцию лактат-рингеров. Неводные парентеральные транспортные средства включают в себя неподвижные масла растительного происхождения, хлопковое

масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены к парентеральным препаратам, упакованным в контейнеры с несколькими дозами, которые включают фенолы или крезолы, ртуть, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил и пропил-п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующее или хелатирующее средство ионов металлов включает ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой транспортных средств; и гидроксид натрия, хлористоводородная кислота, лимонная кислота или молочная кислота для регулирования pH.

Концентрацию фармацевтически активного соединения регулируют так, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество для получения желаемого фармакологического эффекта. Точная доза зависит от возраста, веса и состояния пациента или животного, как известно в данной области.

Парентеральные пиготовления с единичной дозой могут быть упакованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все приготовления для парентерального введения могут быть стерильными, как известно и практикуется в данной области.

Иллюстративно, внутривенная или внутриартериальная инфузия стерильного водного раствора, содержащего активное соединение, является эффективным способом введения. Другим вариантом настоящего изобретения является стерильный водный или масляный раствор или суспензия, содержащая активный материал, вводимый по мере необходимости для получения желаемого фармакологического эффекта.

Инъекции предназначены для местного и системного введения. В одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективное дозировка составлена так, чтобы она содержала концентрацию по меньшей мере от около 0,1% мас./мас. до около 90% мас./мас. или более, в некоторых вариантах реализации изобретения более 1% мас./мас. активного соединения к обработанной ткани (ей).

Антитело можно суспендировать в микронизированной или другой подходящей форме. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или растворителя. Эффективная концентрация достаточна для улучшения симптомов состояния и может быть определена эмпирически.

В других вариантах реализации изобретения фармацевтические препараты представляют собой лиофилизированные порошки, которые можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Они также могут быть восстановлены и составлены в виде твердых веществ или гелей.

Лиофилизированный порошок получают путем растворения антитела представленного в данном документе или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое улучшает стабильность или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Вспомогательные вещества, которые используются, включают, в том

числе, декстрозу, сорбитал, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель может также содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в данной области, в одном варианте реализации изобретения, относительно нейтрального pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дает желаемый состав. В одном варианте реализации изобретения полученный раствор распределяют во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например, при температуре от около 4°C до комнатной температуры.

Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций дает препарат для применения в парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

Местные смеси готовят, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или тому подобное и может быть приготовлена как кремы, гели, мази, эмульсии, растворы, эликсиры, лосьоны, суспензии, настойки, пасты, пены, аэрозоли, орошения, спреи, суппозитории, бинты, дермальные пластыри или любые другие препараты, подходящие для местного применения.

Антитела по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, например, путем ингаляции (См., например, патенты США №4044126, 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для доставки стероида, пригодного для лечения воспалительных заболеваний, особенно астмы). Эти препараты для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя или в виде порошка микронапряжения для инсуффляции, отдельно или в сочетании с инертным носителем, таким как лактоза. В этом случае частицы препарата в одном варианте реализации изобретения имеют диаметры менее 50 микрон, в одном варианте реализации изобретения менее 10 микрон.

Соединения могут быть приготовлены для локального или местного нанесения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, например, в глаз, в виде гелей, кремов и лосьонов и для нанесения в глаз или для внутрисуставного или внутрисуставного нанесения. Местное введение предназначено для внутрикожной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку, или для ингаляционной терапии. Также можно вводить носовые растворы активного соединения отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Эти растворы, особенно те, которые предназначены для офтальмологического применения, могут быть приготовлены в виде 0,01%-10% изотонических растворов, pH около 5-7, с соответствующими солями.

Другие способы введения, такие как трансдермальные пластыри, включая ионтофоретические и электрофоретические приспособления и ректальное введение, также рассматриваются в данном документе.

Трансдермальные пластыри, включая иотофоретические и электрофоретические приспособления, хорошо известны специалистам в данной области. Например, такие патчи описаны в патенте США №6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957.

Например, фармацевтические лекарственные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки для системного эффекта. Ректальные суппозитории используются в данном документе в виде средних твердых тел для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или несколько фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных суппозиториях, являются основаниями или растворителями и средствами для повышения температуры плавления. Примеры оснований включают масло какао (масло теобромы), глицерин-желатин, карбакс (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Могут использоваться комбинации различных оснований. Средства для повышения температуры плавления суппозиториев включают спермацети и воск. Ректальные суппозитории можно получить либо способом прессования либо формованием. Вес ректального суппозитория в одном варианте реализации изобретения составляет от 2 до 3 г.

Таблетки и капсулы для ректального введения могут быть изготовлены с использованием того же фармацевтически приемлемого вещества и теми же методами, что и для препаратов для перорального введения.

Антитела и другие композиции, представленные в данном документе, можно также составить так, чтобы нацелить их на конкретную ткань, рецептор или другую область тела пациента, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области. Все такие способы нацеливания рассматриваются в данном документе для использования в мгновенных композициях. Для неограничивающих примеров способов нацеливания См., например, патент США №6636652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139895, 6131705, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к hOX40L по настоящему изобретению направлены (или иным образом нацеливаются) на ободочную кишку, например, у пациента, имеющего или имеющего риск наличия ВЗК. В некоторых вариантах реализации изобретения антитела к hOX40L по настоящему изобретению направлены (или иным образом нацелены) на глаз, например, у пациента, имеющего или имеющего риск возникновения увеита.

В одном варианте реализации изобретения липосомные суспензии, включая липосомы нацеленные на ткани, такие как липосомы нацеленные на опухоль, также могут подходить в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Например, липосомные препараты можно получить, как описано в патенте США №4522811. Вкратце, липосомы, такие как многослойные везикулы (MLV), можно получить путем высушивания яичного фосфатидилхолина и фосфатидилсерина головного мозга (молярное соотношение 7:3) внутри колбы. Добавляют раствор соединения, представленного в данном документе в забуференном фосфатом физиологическом растворе, лишенном двухвалентных катионов (PBS), и колбу перемешивают до тех пор, пока липидная пленка не диспергируется. Полученные везикулы промывают для удаления неинкапсулированного соединения, осаждают путем центрифугирования и затем ресуспендируют в PBS.

Способы введения и дозирования

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим одно или несколько антител или фрагментов настоящего изобретения для использования в

профилактике, коррекции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания (или его симптома). Обсуждение в отношении антител также применяется mutatis mutandis к фрагментам антител изобретения. В альтернативном варианте настоящее изобретение дополнительно предусматривает композиции, содержащие одно или несколько антител или фрагментов настоящего изобретения для использования в профилактике, коррекции, лечении и/или улучшении OX40L-опосредованного заболевания (или его симптома) у субъекта, где OX40L не является человеческим (например, собаки, кошки, лошади, крупного рогатого скота, овцы или свиньи), и субъект - это собака, кошка, лошадь, корова, овца или свинья.

В некоторых вариантах реализации изобретения, представленных в данном документе, являются композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения для использования в профилактике, коррекции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания, такого как ВЗК (например, язвенный колит или болезнь Крона) или его симптом. Симптомы ВЗК могут варьироваться от легкой до тяжелой формы и обычно зависят от части вовлеченного кишечного тракта. Примерами симптомов ВЗК являются колики в животе и боль, кровавая диарея, острая потребность в дефекации, лихорадка, снижение аппетита, потеря в весе, анемия, утомляемость и/или язвы на голенях, голеностопных суставах, задней части голенях, бедрах и руках. Примерные кишечные осложнения ВЗК включают профузное кровотечение из язв, перфорация или разрыв кишки, стеноз и окклюзия, фистулы (аномальное прохождение) и перианальное заболевание, токсический мегаколон (например, острое необструктивное расширение толстой кишки) и/или злокачественность (например, рак толстой кишки или тонкой кишки). Типичные внекишечные осложнения ВЗК включают артрит, кожная патология, воспаление глаз, заболевания печени и почек и/или остеопороз. Любую комбинацию этих симптомов можно предотвратить, откоррелировать, пролечить и/или улучшить с использованием представленных в данном документе композиций и способов.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе представлены композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения для использования в профилактике, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания, такого как БТПХ, или его симптома. БТПХ обычно возникает после аллогенных или неродственных по сочетанию трансплантатов костного мозга (BMT).

В некоторых вариантах реализации изобретения VHD представляет собой острый БТПХ. Симптомы острого БТПХ могут происходить быстро и могут быть мягкими или тяжелыми. В некоторых случаях острая БТПХ развивается в течение примерно трех месяцев после трансплантации, например, когда количество крови восстанавливается после трансплантации. В некоторых случаях острая БТПХ поражает кожу, желудочно-кишечный тракт и/или печень. Например, у некоторых пациентов острая кожная БТПХ начинается с сыпи, например, на ладонях рук пациента, подошвах ног или плеч. Однако, сыпь может стать широко распространенной и может быть зудящей и болезненной и/или может вспыхнуть и шелушиться. Острая печеночная БТПХ может влиять на нормальные функции печени, такие как ферменты печени, и, в свою очередь, может вызвать желтуху. Острая печеночная БТПХ может также привести к тому, что живот пациента станет опухшим и болезненным, если печень будет увеличена. Наконец, симптомы острой кишечной БТПХ (или БТПХ пищеварительной системы) могут включать диарею, слизь или кровь в стуле, спазмы или боли в животе, расстройство желудка, тошноту и/или потерю аппетита. Другие общие симптомы острой

БТПХ включают анемию, слабое проявление лихорадки и/или более склонными к инфекциям. Любую комбинацию этих симптомов острой БТПХ можно предотвратить, откорректировать, пролечить и/или улучшить с использованием представленных в данном документе композиций и способов.

В других вариантах реализации изобретения БТПХ представляет собой хроническую БТПХ. Хроническая БТПХ происходит от трех месяцев до примерно года или дольше после трансплантации. Хроническая БТПХ может быть легкой или тяжелой и обычно включает симптомы, сходные с симптомами острой БТПХ. Хроническая БТПХ влияет на кожу и пищеварительную систему, включая печень, но также может включать в себя другие органы и иммунную систему (например, делая пациента более склонным к инфекциям) и/или соединительные ткани. Симптомы хронической кожной БТПХ включают сыпь, сухость кожи, натянутость кожи, зудящую кожу, потемнение цвета кожи, уплотнение кожи и/или воздействие на волосы (например, потерю волос, седину) или ногти (например, жесткие или ломкие ногти). Хроническая кишечная БТПХ влияет на пищеварительную систему, рот, пищевод, слизистую оболочку желудка и/или лизистую оболочку кишечника, а симптомы могут включать диарею, ксеростомию или стоматтит, болезненное глотание, низкое всасывание питательных веществ в желудке, вздутие живота, желудочные колики. Хроническая печеночная БТПХ может вызвать повреждение и рубцевание печени (цирроз). Хроническая БТПХ глаз может влиять на железы, которые вырабатывают слезы, вызывая высыхание глаз, жжение и боль или непереносимость яркого света. Хроническая БТПХ легких может вызвать одышку, бронхолегочную обструкцию, непрекращающийся кашель и/или высокую подверженность инфекциям дыхательных путей. Хроническая БТПХ поражает сухожилия (например, воспаление), которые соединяют мышцы с костью, вызывая трудности с выпрямлением или сгибанием рук и ног. Любую комбинацию этих симптомов хронической БТПХ можно предотвратить, откоррелировать, пролечить и/или улучшить с использованием представленных в данном документе композиций и способов.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе, представлены композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения для применения в профилактике, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания, такого как увеит, или его симптома.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе, представлены композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения для применения в профилактике, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания, такого как гангренозной приодермии, гигантоклеточного артериита, синдрома Шницлера или неинфекционного склерита.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе, представлены композиции, содержащие одно или несколько антител настоящего изобретения для применения в профилактике, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, выбранного из системного воспалительного заболевания или состояния или отторжения трансплантата; например, воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, ревматоидного артрита, отторжения трансплантата, отторжения аллогенного трансплантата, болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ), язвенного колита, системной красной волчанки (СКВ), сахарного диабета, увеита, анкилозирующего спондилита, контактной гиперчувствительности, множественного склероза и атеросклероза, в частности, БТПХ.

В конкретном варианте реализации изобретения композиция, применяемая для

профилактики, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболевания, содержит сайты связывания OX40L Антитела по настоящему изобретению, например, антитело, раскрытое в разделе «Примеры» данного документа.

В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит одно или несколько антител, содержащих один или несколько VH-доменов, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH-доменов в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 2, Seq ID No: 34, Seq ID No: 66 или Seq ID No: 94, в частности Seq ID No: 34). В другом варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащих один или несколько VH CDR1, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDR1 в перечне последовательности (т.е. Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID Нет: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42). В другом варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащих один или несколько VH CDR2, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDR2 в перечне последовательности (т.е. Seq ID No: 6, Seq ID No: 12, Seq ID No: 38, Seq ID No: 44, Seq ID No: 70, Seq ID No: 76, Seq ID No: 98 или Seq ID No: 104, в частности Seq ID No: 38 или Seq ID No: 44). В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащих один или несколько VH CDR3, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDR3 в перечне последовательности (т.е. Seq ID No: 8, Seq ID No: 14, Seq ID No: 40, Seq ID No: 46, Seq ID No: 72, Seq ID No: 78, Seq ID No: 100 или Seq ID Нет: 106, в частности Seq ID No: 40 или Seq ID No: 46).

В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит один или несколько VL-доменов, содержащие один или несколько VL-доменов, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL-доменов в списке последовательностей (т.е. Seq ID No: 16, Seq ID No:48, Seq ID No: 80, или Seq ID No: 108, в частности, Seq ID No: 48) (Опционально содержащие также родственный VL-домен, указанный в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 2/16, Seq ID No: 34/48, Seq ID No: 66/80 или Seq ID No: 94/108, в частности, Seq ID No: 34/48). В другом варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащие одно или несколько VL CDR1s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR1s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56). В другом варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащие одно или несколько VL CDR2s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR2s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 20, Seq ID No: 26, Seq ID No: 52, Seq ID No: 58, Seq ID No: 84, Seq ID No: 90, Seq ID No: 112 или Seq ID No: 118, в частности, Seq ID

No: 52 или Seq ID No: 58). В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция применяется для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания содержит одно или несколько антител, содержащие одно или несколько VL CDR3s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR3s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 22, Seq ID No: 28, Seq ID No: 54, Seq ID No: 60, Seq ID No: 86, Seq ID No: 92, Seq ID No: 114 или Seq ID No: 120, в частности, Seq ID No: 54 или Seq ID No: 60).

В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит одно или несколько антител, содержащие один или несколько VH-доменов, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH-доменов в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 2, Seq ID No: 34, Seq ID No: 66 или Seq ID No: 94, в частности, Seq ID No: 34) и один или несколько VL-доменов, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL-доменов в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 16, Seq ID No: 48, Seq ID No: 80, или Seq ID No: 108, в частности, Seq ID No: 48).

В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит одно или несколько антител, содержащие один или несколько VH CDR1s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDRls в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 4, Seq ID No: 10, Seq ID No: 36, Seq ID No: 42, Seq ID No: 68, Seq ID No: 74, Seq ID No: 96 или Seq ID No: 102, в частности, Seq ID No: 36 или Seq ID No: 42), и один или несколько VL CDR1s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR1s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No: 18, Seq ID No: 24, Seq ID No: 50, Seq ID No: 56, Seq ID No: 82, Seq ID No: 88, Seq ID No: 110 или Seq ID No: 116, в частности, Seq ID No: 50 или Seq ID No: 56). В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит одно или несколько антител, содержащие один или несколько VH CDR1s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDR1s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No:4, Seq ID No:10, Seq ID No:36, Seq ID No:42, Seq ID No:68, Seq ID No:74, Seq ID No:96 или Seq ID No:102, в частности, Seq ID No:36 или Seq ID No:42), и один или несколько VL CDR2s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR2s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No:20, Seq ID No:26, Seq ID No:52, Seq ID No:58, Seq ID No:84, Seq ID No:90, Seq ID No: 112 или Seq ID No:118, в частности, Seq ID No:52 или Seq ID No:58). В другом варианте реализации изобретения композиция, применяемая для профилактики, корреляции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания, содержит одно или несколько антител, содержащие один или несколько VH CDR1s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VH CDR1s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No:4, Seq ID No:10, Seq ID No:36, Seq ID No:42, Seq ID No:68, Seq ID No:74, Seq ID No:96 или Seq ID No:102, в частности, Seq ID No:36 или Seq ID No:42), и один или несколько VL CDR3s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR3s, имеющих аминокислотную последовательность любого из VL CDR3s в перечне последовательностей (т.е. Seq ID No:22, Seq ID No:28, Seq ID No:54, Seq ID No:60, Seq ID No:86, Seq ID No:92, Seq ID No: 114 или Seq ID No:120, в частности, Seq ID No:54 или Seq ID No:60).

Как обсуждалось более подробно в других разделах в данном документе, композиция

по настоящему изобретению может использоваться как отдельно, так и в сочетании с другими соединениями или композициями. Более того, антитела могут дополнительно быть рекомбинантно слиты с гетерологичным полипептидом по N- или C-концу или химически конъюгированы (включая ковалентно и нековалентно-конъюгации) с полипептидами или другими композициями. Например, антитела по настоящему изобретению могут быть рекомбинантно слиты или конъюгированы с молекулами, полезными в качестве меток в анализах обнаружения и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные средства, радионуклеотиды или токсины. См., например, публикации PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США №5314995; и EP 396387.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе представлены способы снижения или ингибирования связывания hOX40L с рецептором OX40L или родственным лигандом (например, OX40) у субъекта (например, человека), включающий введение субъекту эффективного количества антитела, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L (например, экспрессируемым клеточной поверхностью или растворимым hOX40L). В некоторых вариантах реализации изобретения биологическая активность hOX40L, такая как секреция CCL20, IL8 и/или RANTES, или INF-γ, TNF- или IL-2, в частности INF-γ или другого цитокина, раскрытого в данном документе, также снижается у субъекта, например, снижается, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50 или 60%, или 70%, или 80%, или 90% или 95% или >95%.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе представлены способы снижения или ингибирования hOX40L биологической активности, такой как секреция интерферон гамма, IL-2, CCL20, IL8 и/или RANTES или другой цитокин, или INF-γ, TNF-α или IL-2, в частности, INF-γ у субъекта (например, субъект человек), которые включают введение субъекту эффективного количества антитела, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L (например, клеточно-экспресируемый hOX40L), причем биологическая активность hOX40L снижается антителом.

В других вариантах реализации изобретения в данном документе представлены способы снижения или ингибирования связывания hOX40L с рецептором OX40L или родственным лигандом (например, OX40) в клетке, экспрессирующей hOX40L на клеточной поверхности, путем контакта клетки с эффективным количеством антитела, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L (например, клеточно-экспресируемым или растворимым hOX40L), таким как полипептид hOX40L, фрагмент полипептида hOX40L или эпитоп hOX40L. В некоторых вариантах реализации изобретения биологическая активность hOX40L, такая как секреция гамма-интерферона, IL-2, CCL20, IL8 и/или RANTES, или INF-γ, TNF- или IL-2, в частности INF-γ или другого цитокина, раскрытых в данном документе, также снижается в клетке.

В определенных вариантах реализации изобретения в данном документе представлены способы снижения или ингибирования связывания hOX40L биологической активности, такой как секреция интерферон гамма, IL-2, CCL20, IL8 и/или RANTES или другого цитокина, раскрытого в данном документе, в клетке, имеющей рецептор hOX40L, экспрессируемый на клеточной поверхности (такой как OX40), путем контакта клетки с эффективным количеством антитела, которое специфически связывается с полипептидом hOX40L (например, клеточно-экспресируемым или растворимым hOX40L), причем биологическая активность hOX40L снижается антителом.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать, например, для очистки, обнаружения и мечения hOX40L-антигенов как в in vitro, так и in vivo диагностических и терапевтических способах. Например, модифицированные антитела используют в

иммунологических анализах для качественного и количественного измерения уровней hOX40L в биологических образцах. Смоти, например, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (включенной в данном документе посредством ссылки).

В настоящем изобретении также представлены способы предотвращения, коррекции, лечения и/или облегчения hOX40L-опосредованного заболевания путем введения субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению. В одном аспекте антитело по существу очищается (то есть практически не содержит веществ, которые ограничивают его действие или приводят к нежелательным побочным эффектам). В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полностью соответствующее человеческому моноклональное антитело, такое как антитело к человеческому моноклональному антагонисту. Субъект, которому вводится терапия, предпочтительно является млекопитающим, таким как не примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, грызуны, мыши или крысы) или примат (например, обезьяны, такой как макак-резус или яванский макак, или человек). В предпочтительном варианте реализации изобретения субъект является человеком. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения субъектом является ребенок или ребенок, рожденный преждевременно. В другом варианте реализации изобретения субъектом является человек с hOX40L-опосредованным заболеванием.

Известны различные системы доставки, которые могут использоваться для введения профилактического или терапевтического средства (например, антитело по настоящему изобретению), включая, но не ограничиваясь этим, инкапсуляцию в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело, рецептор (См., например, Wu and Wu, J. Biol., Chem. 262: 4429-4432 (1987)), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения профилактического или терапевтический средства (например, антитела по настоящему изобретению) или фармацевтической композиции включают, в том числе, парентеральное введение (например, внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные и подкожные инъекции), эпидуральное введение и доставка к слизистой (например, интраназальные и оральные пути). В конкретном варианте реализации изобретения профилактическое или терапевтическое средство (например, антитело по настоящему изобретению) или фармацевтическая композиция вводят интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно. Профилактические или терапевтические средства или композиции можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистой оболочки полости рта, интраназальной слизистой оболочки, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, легочное введение также можно использовать, например, с использованием ингалятора или распылителя, приготовленные с аэрозольным средством. См., например, патенты США. №6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064,5855913,5290540 и 4880078; и в публикациях PCT WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен посредством ссылки во всей их полноте.

В конкретном варианте реализации изобретения можно по желанию вводить профилактическое или терапевтическое средство или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению на локальном уровне в область, нуждающуюся в лечении.

Этого можно достичь, например, не путем ограничения, локальной инфузии, путем местного применения (например, путем интраназального спрея), путем инъекции или с помощью имплантата, причем указанный имплантат имеет структуру пористую, непористую, или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как сиалластические мембраны или волокна. Предпочтительно, при введении антитела по настоящему изобретению следует проявлять осторожность при использовании материалов, с которыми антитело не поглощается.

В другом варианте реализации изобретения профилактическое или терапевтическое средство или композиция по настоящему изобретению могут быть помещены в везикулу, в частности в липосому (См., Langer, 1990, Science 249: 1527-1533, Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp.353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; См. в целом там же).

В другом варианте реализации изобретения профилактическое или терапевтическое средство или композиция по настоящему изобретению могут быть помещены в систему с контролируемым высвобождением или с замедленным высвобождением. В одном варианте реализации изобретения насос может использоваться для достижения контролируемого или длительного высвобождения (См., Langer, Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed, Eng. 14:20, Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). В другом варианте реализации изобретения полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого или длительного высвобождения профилактического или терапевтического средства (например, антител настоящего изобретения) или композиции настоящего изобретения (См., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); патент США. №. 5679377; патент США. №. 5916597; патент США. №. 5912015; патент США. №. 5989463; патент США. №. 5128326; PCT Publication No. WO 99/15154; и PCT Publication No. WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в препаратах с замедленным высвобождением, включают, в том числе, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат), поли-(метилметакрилат), поли-(акриловую кислоту), поли-(этилен-винилацетат), поли-(метакриловый Кислота), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли-(N-винилпирролидон), поливиниловый спирт, полиакриламид, поли-(этиленгликоль), полилактиды (PLA), поли-(лактид-со-гликолиды) (PLGA) и полиортоэфиры. В предпочтительном варианте реализации изобретения полимер, используемый в композиции с замедленным высвобождением, является инертным, без выщелачиваемых примесей, стабилен при хранении, стерильный и биологически разрушаемый. В еще одном варианте реализации изобретения контролируемая или пролонгированная система высвобождения может быть размещена вблизи терапевтической мишени, то есть носовых проходов или легких, что требует лишь доли системной дозы (См., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Любой способ, известный специалисту в данной области, можно использовать для получения композиций с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько антител настоящего изобретения. См., например, патент США. №4526938, публикация PCT WO 91/05548, публикация PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:

179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

В конкретном варианте реализации изобретения, где композиция по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую профилактическое или терапевтическое средство (например, настоящего изобретения), нуклеиновая кислота может быть введена in vivo для содействия экспрессии кодируемого ею профилактического или терапевтического средства, путем конструирования ее как части подходящего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его таким образом, чтобы он становился внутриклеточным, например, с использованием ретровирусного вектора (См. патент США №4980286) или путем прямой инъекции, или путем бомбардировки микрочастицами (например, генный пистолет, Biolistic, Dupont), или покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности, или трансфекцирующими средствами, или путем введения его в соединение с гомеобоксподобным пептидом, который, как известно, входит в ядро (См., например, Joliot et Al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновую кислоту можно вводить внутриклеточно и вводить в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

В конкретном варианте реализации изобретения, композиция по настоящему изобретению содержит одно, два или более антител или фрагментов настоящего изобретения. В другом варианте реализации изобретения композиция по настоящему изобретению содержит одно, два или более антител или фрагментов настоящего изобретения и профилактическое или терапевтическое средство, отличное от Антитела по настоящему изобретению. Предпочтительно, что средства, как известно, полезны или использовались или были использованы в настоящее время для профилактики, коррекции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания. В дополнение к профилактическим или терапевтическим средствам композиции настоящего изобретения могут также содержать носитель.

Композиции настоящего изобретения включают в себя массовые лекарственные композиции, пригодные для изготовления фармацевтических композиций (например, композиции, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать при приготовлении стандартных лекарственных форм. В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одного или нескольких профилактических или терапевтических средств (например, антитела по настоящему изобретению или другого профилактического или терапевтического средства) и фармацевтически приемлемого носителя. Предпочтительно, чтобы фармацевтические композиции были пригодны для способа введения субъекту.

В конкретном варианте реализации изобретения термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному)), эксципиенту или растворителю, с которым вводится терапия. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяной продукт, животного, растительного или синтетического происхождения, такое как

арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическая композиция вводится внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция, при желании, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или pH буферных средств pH. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и тому подобного. Пероральная композиция может включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa. Такие композиции будут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество антитела, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для правильного введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения.

В предпочтительном варианте реализации изобретения композиция составлена в соответствии с обычными процедурами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также включать солюбилизирующее средство и местный анестетик, такой как лигнокамн, для облегчения боли в месте инъекции. Однако такие композиции можно вводить по другому пути, нежели внутривенно.

Как правило, ингредиенты композиций настоящего изобретения поставляются либо отдельно, либо смешиваются вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или концентрата без воды в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывающая количество активного средства. Там, где композиция должна вводиться путем инфузии, ее можно распределить в бутылку для инфузии, содержащей стерильную фармацевтическую воду или физиологический раствор. Когда композицию вводят путем инъекции, можно предусмотреть ампулу стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, так что бы ингредиенты можно смешать до введения.

Изобретение также предусматривает, что антитело по настоящему изобретению упаковывают в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества антитела. В одном варианте реализации изобретения антитело поставляется в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или концентрата без воды в герметично закрытом контейнере и может быть восстановлено, например, водой или физиологическим раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно антитело поставляется в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметически закрытом контейнере при стандартной дозировке, по меньшей мере 0,1 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 2 мг или по меньшей мере 3 мг и более предпочтительно по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по

меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 60 мг, по меньшей мере 75 мг, по меньшей мере 80 мг, по меньшей мере 85 мг, по меньшей мере 90 мг, по меньшей мере 95 мг или по меньшей мере 100 мг. Лиофилизированное антитело можно хранить при температуре от 2 до 8°C в исходном контейнере и антитело можно вводить в течение 12 часов, предпочтительно в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после восстановления. В альтернативном варианте реализации изобретения антитело поставляется в жидкой форме в герметически закрытом контейнере, с указанием количества и концентрации антитела. Предпочтительно, чтобы жидкая форма антитела подавалась в герметично закрытом контейнере, по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл или по меньшей мере 1 мг/мл и более предпочтительно по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 60 мг/мл, по меньшей мере 70 мг/мл по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

Композиции настоящего изобретения могут быть составлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соединения, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и те, которые образованы катионами, такими как соединения, полученные из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Количество профилактического или терапевтического средства (например, антитела по настоящему изобретению) или композиции по настоящему изобретению, которое будет эффективной при профилактике, корреляции, лечении и/или улучшении hOX40L-опосредованного заболеванием, можно определить стандартными клиническими методами.

Соответственно, дозировку антитела или композиции, которая приводит к титру в сыворотке от примерно 0,1 мкг/мл до примерно 450 мкг/мл, а в некоторых вариантах реализации изобретения, по меньшей мере 0.1 мкг/мл, по меньшей мере 0.2 мкг/мл, по меньшей мере 0.4 мкг/мл, по меньшей мере 0.5 мкг/мл, по меньшей мере 0.6 мкг/мл, по меньшей мере 0.8 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 1.5 мкг/мл, and preferably по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 30 мкг/мл, по меньшей мере 35 мкг/мл, по меньшей мере 40 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 75 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 400 мкг/мл, или по меньшей мере 450 мкг/мл можно вводить человеку для профилактики, коррекции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания. Кроме того, in vitro анализы могут быть необязательно использованы для определения оптимальных диапазонов доз. Точная доза, которая будет использоваться в препарате, также будет зависеть от способа введения и от серьезности hOX40L-опосредованного заболевания и должна определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельств каждого пациента.

Эффективные дозы можно экстраполировать из кривой зависимости "доза-эффект", полученных из тест-систем in vitro или животных.

Для антител настоящего изобретения дозировка, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента. В некоторых вариантах

реализации изобретения дозировка, вводимая пациенту, составляет примерно от 1 мг/кг до примерно 75 мг/кг веса тела пациента. Предпочтительно дозировка, вводимая пациенту, составляет от 1 мг/кг до 20 мг/кг веса тела пациента, более предпочтительно от 1 мг/кг до 5 мг/кг веса тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полувыведения в организме человека, чем антитела от других видов из-за иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, неоднократно допустимы более низкие дозы человеческих антител и менее частое введение. Кроме того, дозировка и частота введения антител настоящего изобретения могут быть снижены за счет усиления поглощения и проникновения ткани антител посредством модификаций, таких как, например, липидация.

В одном варианте реализации изобретения, приблизительно 100 мг/кг или менее, приблизительно 75 мг/кг или менее, приблизительно 50 мг/кг или менее, приблизительно 25 мг/кг или менее, приблизительно 10 мг/кг или менее, приблизительно 5 мг/кг или менее, приблизительно 1 мг/кг или менее, приблизительно 0,5 мг/кг или менее или приблизительно 0,1 мг/кг или менее антитела или фрагмента, настоящего изобретения вводят 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза или, предпочтительно, 1 раз для лечения hOX40L-опосредованной болезни. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело по настоящему изобретению вводят примерно 1-12 раз, причем дозы можно вводить по необходимости, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, раз в три месяца и т.д., как определено врачом. В некоторых вариантах реализации изобретения более низкая доза (например, 1-15 мг/кг) может вводиться более часто (например, в 3-6 раз). В других вариантах реализации изобретения более высокую дозу (например, 25-100 мг/кг) можно вводить реже (например, 1-3 раза). Однако, как будет очевидно для специалистов в данной области, другие дозировочные количества и графики легко определить и в пределах объема настоящего изобретения.

В конкретном варианте реализации изобретения приблизительно 100 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг или менее, приблизительно 50 мг/кг или менее, приблизительно 25 мг/кг или менее, приблизительно 10 мг/кг или менее, приблизительно 5 мг/кг или менее, приблизительно 1 мг/кг или менее, приблизительно 0,5 мг/кг или менее, приблизительно 0,1 мг/кг или менее антитела или его фрагмента по настоящему изобретению в композиции с замедленным высвобождением вводят субъекту, предпочтительно человеку, для предотвращения, коррекции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания. В другом конкретном варианте реализации изобретения приблизительно 100 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг или менее, приблизительно 50 мг/кг или менее, приблизительно 25 мг/кг или менее, приблизительно 10 мг/кг или менее, приблизительно 5 мг/кг или менее, приблизительно 1 мг/кг или менее, приблизительно 0,5 мг/кг или менее или приблизительно 0,1 мг/кг или меньше болюса антитела по настоящему изобретению не в составе с замедленным высвобождением вводят субъекту, предпочтительно человеку, для предотвращения, корреляции, лечения и/или улучшать hOX40L-опосредованного заболевания и через определенный промежуток времени приблизительно 100 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг или менее, приблизительно 50 мг/кг или менее, приблизительно 25 мг/кг или менее приблизительно 10 мг/кг или менее, приблизительно 5 мг/кг или менее, приблизительно 1 мг/кг или менее, приблизительно 0,5 мг/кг или менее или приблизительно 5 мг/кг или менее Антитела по настоящему изобретению в пролонгированное высвобождение вводят указанному субъекту (например, интраназально или внутримышечно) два, три или четыре раза (предпочтительно один раз). В соответствии с этим вариантом реализации изобретения определенный период времени может составлять от 1 до 5

дней, недели, двух недель или месяца.

В некоторых вариантах реализации изобретения пациенту вводится единичная доза антитела или его фрагмента по настоящему изобретению для профилактики, коррекции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать раз, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять или двадцать шесть раз в две недели (например, около 14 дней) в течение года, где дозу выбирают из группы, состоящей из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг, около 100 мг/кг или их комбинацию (т.е. каждая доза ежемесячной дозы может быть или не быть идентичной).

В другом варианте реализации изобретения пациенту вводится одна доза антитела по настоящему изобретению для профилактики, лечения, коррекции и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать раз в течение примерно одного месяца (например, около 30 дней) в течение года, где доза выбирается из группы, состоящей из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг, около 100 мг/кг или их комбинацию (т.е. каждая доза ежемесячной дозы может быть или не быть идентичной).

В одном варианте реализации изобретения пациенту вводится единичная доза антитела или его фрагмента по настоящему изобретению для профилактики, коррекции, лечения, и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания два, три, четыре, пять или шесть раз около двух месяцев (например, около 60 дней) в течение года, где доза выбирается из группы, состоящей из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг, около 100 мг/кг или их комбинации (т.е. каждая двухмесячная доза может быть или не быть идентичной).

В некоторых вариантах реализации изобретения пациенту вводится единичная доза антитела или его фрагмента по настоящему изобретению для профилактики, коррекции, лечения, и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания два, три или четыре раза примерно через три месяца (например, около 120 дней) в течение года, где доза выбирается из группы, состоящей из около 0,1 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около 95 мг/кг, около 100 мг/кг или их комбинацию (т.е. каждая трехмесячная доза может быть или не быть идентичной).

В определенных вариантах реализации изобретения способ введения для дозы антитела или его фрагмента по настоящему изобретению пациенту является интраназальным, внутримышечным, внутривенным или их комбинацией, но также

приемлемы другие пути, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения способ введения является внутриглазным. Каждая доза может или не может быть введена с помощью идентичного способа введения. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или фрагмент по настоящему изобретению можно вводить несколькими путями введения одновременно или впоследствии в другие дозы того же или другого антитела или фрагмента по настоящему изобретению.

В определенных вариантах реализации изобретения антитела или фрагменты по настоящему изобретению вводят профилактически или терапевтически субъекту. Антитела или фрагменты по настоящему изобретению можно вводить профилактически или терапевтически субъекту, чтобы предотвратить, уменьшить или облегчить hOX40L-опосредованное заболевание или его симптомы.

Генная терапия

В конкретном варианте реализации изобретения нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности настоящего изобретения вводят для предотвращения, коррекции, лечения и/или улучшения hOX40L-опосредованного заболевания путем генной терапии. Генная терапия относится к терапии, проводимой введением субъекту экспрессируемой или экспрессирующейся нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации изобретения нуклеиновые кислоты продуцируют кодируемое ими антитело, и антитело опосредует профилактический или терапевтический эффект.

Любой из способов генной терапии, доступных в данной области, можно использовать в соответствии с настоящим изобретением.

Диагностическое использование антител

Несмотря на то, что антитела упоминаются в отношении диагностического применения, это открытие следует рассматривать также с применением соответствующих поправок к их фрагментам в изобретении.

Вследствие этого маркированные антитела согласно изобретению, а также их производные и аналоги, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, могут использоваться в диагностических целях для обнаружения, диагностики или мониторинга hOX40L-опосредованного заболевания. Изобретение предлагает способы для обнаружения hOX40L-опосредованного заболевания, включающие: (a) анализ экспрессии антигена hOX40L в клетках или образце ткани субъекта с использованием одного или нескольких антител настоящего изобретения, которые специфически связываются с антигеном hOX40L; и (b) сравнение уровня антигена hOX40L с уровнем контроля, например, уровней в образцах нормальной ткани (например, у пациента, не имеющего hOX40L-опосредованного заболевания, или у одного и того же пациента до начала заболевания), в результате чего увеличение анализируемого уровня антигена hOX40L по сравнению с контрольным уровнем антигена hOX40L указывает на hOX40L-опосредованное заболевание.

Изобретение обеспечивает диагностический анализ для диагностики hOX40L-опосредованного заболевания, включающий: (a) анализ на уровень антигена hOX40L в клетках или образце ткани индивидуума с использованием одного или нескольких антител настоящего изобретения, которые специфически связываются с антигеном hOX40L; и (b) сравнение уровня антигена hOX40L с контрольным уровнем, например, уровней в образцах нормальной ткани, в результате чего увеличение уровня антигена hOX40L по сравнению с контрольным уровнем антигена hOX40L указывает на hOX40L-опосредованное заболевание. Более окончательный диагноз hOX40L-опосредованного заболевания может позволить специалистам здравоохранения использовать профилактические меры или агрессивное лечение ранее, тем самым предотвращая

развитие или дальнейшее прогрессирование опосредованного hOX hOX40L-опосредованного 40L заболевания.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать для анализа уровней антигена hOX40L в биологическом образце с использованием классических иммунопатологических методов, описанных в данном документе или известных специалистам в данной области (См., например, Jalkanen et al, 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985, Jalkanen et al, 1987, J. Cell, Biol., 105: 3087-3096). Другие методы на основе антител, применимые для обнаружения экспрессии белка, включают иммунологические анализы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммуноанализ (РИА). Подходящие метки для анализа антител известны в данной области и включают метки ферментов, такие как глюкозооксидаза, радиоизотопы, такие как йод (^{125}I, ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин, родамин и биотин.

Одним из аспектов изобретения является обнаружение и диагностирование hOX40L-опосредованного заболевания у человека. В одном из вариантов реализации изобретения диагноз включает: a) введение (например, парентерально, подкожно или внутрибрюшинно) субъекту эффективного количества меченого антитела, которое специфически связывается с антигеном hOX40L; b) ожидание временного интервала после введения для того, чтобы позволить меченому антителу предпочтительно концентрироваться в местах тела субъекта, где экспрессируется hOX40L-антиген (и для несвязанной меченой молекулы, подлежащей очистке до фонового уровня); c) определение фонового уровня; и d) обнаружение меченого антитела у субъекта, при этом обнаружение меченого антитела выше фонового уровня указывает на то, что у субъекта присутствует hOX40L-опосредованное заболевание. Фоновый уровень может быть определен различными методами, включая сравнение количества обнаруженной меченой молекулы со стандартным значением, определенным ранее для конкретной системы.

Из графических материалов будет понятно, что размер субъекта и используемой системы визуализации будет определять количество требуемых визуализирующих частиц, необходимых для создания диагностических изображений. В случае радиоизотопной составляющей для субъекта-человека количество вводимой радиоактивности обычно составляет примерно от 5 до 20 милликюри ^{99}Tc. Затем меченое антитело предпочтительно накапливается в месте расположения клеток, которые содержат специфический белок. Формирование опухоли in vivo описано в S. W. Burchiel et al, «Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments.» (глава 13 в Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel и B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

В зависимости от нескольких переменных, включая тип используемой метки и способ введения, временной интервал, последующий за введением для того, чтобы позволить меченому антителу преимущественно концентрироваться в местах тела субъекта, и для несвязанного меченого антитела, подлежащего очистке до фонового уровня, составляет от 6 до 48 часов, или от 6 до 24 часов, или от 6 до 12 часов. В другом варианте реализации изобретения временной интервал после введения составляет от 5 до 20 дней или от 5 до 10 дней.

В одном из вариантов реализации изобретения мониторинг hOX40L-опосредованного заболевания проводится путем повторения метода диагностики hOX40L-опосредованного заболевания, например, через месяц после первоначального диагноза,

через шесть месяцев после первоначального диагноза, через год после первоначального диагноза и т.д.

Наличие у субъекта меченой молекулы может быть обнаружено с использованием способов, известных специалистам в данной области техники для сканирования in vivo. Данные способы зависят от типа используемой метки. Для обнаружения конкретной метки квалифицированные специалисты смогут определить подходящий способ. Способы и устройства, которые могут быть использованы в диагностических способах настоящего изобретения, включают (в том числе) компьютерную томографию (КТ), сканирование всего тела, такое как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) и сонография.

В конкретном варианте реализации изобретения молекула маркируется радиоизотопом и обнаруживается у пациента с использованием хирургического инструмента, чувствительного к излучению (Thurston et al., патент США №5445050). В другом варианте реализации изобретения молекула помечена флуоресцентным соединением и обнаруживается у пациента с использованием прибора для сканирования флуоресценции. В другом варианте реализации изобретения молекула маркируется позитрон-излучающим металлом и обнаруживается у пациента с использованием позитронно-эмиссионной томографии. В еще одном из вариантов реализации изобретения молекула маркируется парамагнитной меткой и обнаруживается у пациента с использованием магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Способы получения антител

Антитела и фрагменты по настоящему изобретению, которые специфически связываются с антигеном (OX40L), могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области для синтеза антител, в частности химическим синтезом или, предпочтительно, рекомбинантными способами экспрессии. Практика настоящего изобретения использует, если не указано иное, стандартные способы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в пределах компетентности в определенной области. Данные способы описаны в цитированных в данном документе ссылках и полностью объяснены в литературе. См., например, Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren et al. (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Поликлональные антитела, которые специфически связываются с антигеном, могут быть получены различными способами, широко известными специалистами в данной области. Например, с целью индуцирование получения сывороток, содержащих поликлональные антитела, специфические для антигена человека, человеческий антиген можно вводить различным животным-хозяевам, включая (но, не ограничиваясь этим) кроликов, мышей, крыс и т.д. Для увеличения иммунологического ответа могут быть использованы различные адъюванты, в зависимости от вида хозяев, которые включают (в том числе) магниевые гели Freund (полные и неполные), такие как гидроксид

алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плюронические полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные адъюванты для человека, такие как БЦЖ (бацил Кальметта-Герена) и коринебактерии parvum. Такие адъюванты также широко известны специалистам в данной области.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием широкого спектра способов, известных специалистам в данной области, включая использование гибридомных, рекомбинантных и техник фагового отображения или их комбинацию. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных способов, включая те, которые известны специалистам в данной области, и изучены, например, в Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., In: Monoclonal Antibodies и T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981) (включены посредством ссылки во всей их полноте). Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, продуцируемыми с помощью гибридомной техники. Другие примеры способов получения моноклональных антител, например, использование KM MouseTM, обсуждаются в данном документе в другом месте. Дополнительные примеры методов получения моноклональных антител приведены в данном документе в разделе «Примеры».

Способлы получения и скрининга специфических антител с использованием гибридомной техники являются стандартными и широко известны специалистам в данной области. Вкратце, мыши могут быть иммунизированы антигеном hOX40L и как только обнаружен иммунный ответ, например, в сыворотке мыши обнаружены антитела, специфичные к hOX40L-антигену, селезенку мыши изымают и выделяют спленоциты. Затем спленоциты соединяются широко известными методами с любыми подходящими клетками миеломы, например, клетками из клеточной линии SP20, доступными из ATCC. Гибридомы отбирают и клонируют путем ограниченного разведения.

Кроме того, для иммунизации животного можно использовать способ RIMMS (повторная иммуннизация нескольких органов) (Kilptrack et al., 1997 Hybridoma 16: 381-9, включена посредством ссылки во всей ее полноте). Затем клоны гибридомы анализируют известными специалистам в данной области методами для клеток, которые секретируют антитела, способные связывать полипептид настоящего изобретения. Асцитная жидкость, которая обычно содержит высокие уровни антител, может быть получена путем иммунизации мышей положительными гибридомными клонами.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способам получения антител путем культивирования гибридомной клетки, секретирующей модифицированное антитело по изобретению, где гибридома образуется предпочтительно путем слияния выделенных у мыши спленоцитов, иммунизированных антигеном hOX40L, с клетками миеломы, а затем скрининга гибридом, полученных в результате слияния гибридомных клонов, которые секретируют антитело, способное связываться с антигеном hOX40L.

Фрагменты антител, которые распознают специфические антигены hOX40L, могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области. Например, Fab и $F(ab')_2$ фрагменты по настоящему изобретению могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения фрагментов $F(ab')_2$). $F(ab')_2$ фрагменты содержат вариабельный участок, константный участок легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи. Кроме того, Антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с использованием различных методов

фагового отображения, известных специалистам в данной области.

Например, антитела также могут быть получены с использованием различных способов фагового дисплея. В способах фагового дисплея на поверхности фаговых частиц отображаются функциональные домены антител, которые переносят полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, человеческих или мышиных библиотек кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующую домены VH и VL, рекомбинируют вместе с scFv-линкером с помощью ПЦР и клонируют в фагемидный вектор. Вектор электропорируется в E. coli, а E. coli инфицирован вспомогательным фагом. Фаг, используемый в данных способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, включающий fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с фаговым геном III или с геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с использование антигенов, например, с использованием меченых антигенов или антигенов, связанных с твердой поверхностью или заключенных в шарик. Примеры способов фагового дисплея, которые могут быть использованы для получения антител настоящего изобретения, включают те, которые описаны в Brinkman et al, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al, 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al, 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al, 1997, Gene 187:9-18; Burton et al, 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT Application No. PCT/GB91/01134; международные публикации №WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, и WO 97/13844; и патент США №5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108; каждый из которых включен в данном документе посредством ссылки во всей их полноте.

Как описано в приведенных выше ссылках, после выбора фага участки кодирования антитела могут быть выделены из фага и использованы для создания целых антител, включая антитела человека, или любого другого желаемого антигенсвязывающего фрагмента и экспрессируемого в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Методы рекомбинантного производства фрагментов Fab, Fab и F $(ab')_2$ также могут применяться с использованием способов, известных специалистам в данной областик, такие как раскрыты в публикации PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al, 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al, 1995, AJRI 34:26-34; и Better et al, 1988, Science 240:1041-1043 (включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте).

С целью создания целых антител для амплификации последовательностей VH или VL в scFv-клонах, можно использовать ПЦР-праймеры, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, участок рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты участка рестрикции. Используя методы клонирования, известные специалистам в данной области, ПЦР-амплифицированные домены VH могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие константный участок VH, например, константный участок гамма-4 человека, а ПЦР-амплифицированные VL-домены могут быть клонированы в векторы, экспрессирующие VL, например, каппа или лямбда константные участки человека. Домены VH и VL могут также клонироваться в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи трансформируют в клеточные линии для получения стабильных или транзиторных клеточных линий, которые экспрессируют

полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области.

В некоторых вариантах применения, в том числе in vivo использовании антител у людей и анализов на выявление in vitro, может быть предпочтительным использовать человеческие или химерные антитела. Для терапевтического лечения человека особенно желательны полностью человеческие антитела. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными специалистам в данной области, включая способы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. См. также патент США №4444887 и 4716111; и международные публикации № WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, и WO 91/10741; каждый из которых включен в данный документе посредством ссылки во всей их полноте.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения получают антитела человека. Антитела человека и/или полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием любого способа, известного специалистам в данной области, включая раздел «Примеры», приведенный в данном документе. Например, трансгенные мыши, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека. Например, комплексы генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Или же дополнительно к генам тяжелой и легкой цепи человека в эмбриональные стволовые клетки мыши могут быть введены вариабельный участок, константный участок и отличающийся участок цепи иммуноглобулина человека. Гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулина мыши могут быть нефункциональными порознь или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция участка JH предотвращает образование эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки увеличивают в объеме и микроинъективно вводят в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей разводят для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела человека. Трансгенных мышей иммунизируют стандартным образом с помощью выбранного антигена, например, всего или части полипептида настоящего изобретения. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены из иммунизированных трансгенных мышей с использованием традиционной гибридомной техники. Трансгены иммуноглобулина человека, полученные от трансгенных мышей, перегруппируются во время дифференцировки В-клеток, а затем подвергаются переключению класса и соматической мутации. Таким образом, используя данный метод, можно получить терапевтически эффективные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор данного метода для получения антител человека См. Lonberg и Huszar (1995, Int. Rev. Immunol., 13: 65-93). Подробное обсуждение этого метода для получения антител человека и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител См., например, в публикациях PCT № WO 98/24893, WO 96/34096, и WO 96/33735; и патент США №5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806,5814318, и 5939598, которые включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте. Другие способы подробно описаны в разделе «Примеры» в данном документе. Кроме того, с целью снабжения антителами человека, направленными против выбранного антигена по способу, аналогичному описанному выше, могут быть использованы антитела таких компаний, как Abgenix, Inc/Amgen. (Thousand Oaks, Калифорния), OMT (Paolo Alto, Калифорния.), Argen-x (Breda,

Нидерланды), Ablexis (Сан-Франциско, Калифорния) или Harbour Antibodies (Cambridge, Mass.).

Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные участки антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Способы получения химерных антител известны специалистам в данной области. См., например, Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; и патент США №5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте.

Гуманизированное антитело представляет собой антитело, а также его разновидность или его фрагмент, которые обладают способностью связываться с заданным антигеном и которые содержат каркасный участок, содержащий главным образом аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека и CDR, содержащий главным образом аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело содержит главным образом все или по меньшей мере один, а как правило, два вариабельных домена (Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv), в которых все или практически все участки CDR соответствуют нечеловеческому иммуноглобулину (т.е., донорное антитело) и все или практически все каркасные участки представляют собой консенсусную последовательность иммуноглобулина человека. Предпочтительно гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Обычно антитело будет содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать CH1, шарнир, CH2, CH3 и CH4-участки тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgGl, IgG2, IgG3 и IgG4. Как правило, константный домен является комплиментсвязывающим константным доменом, при этом желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, а класс, как правило, представляет собой IgG1. Если цитотоксическая активность нежелательна, константный домен может быть класса IgG2. В определенных вариантах реализации изобретения Антитела по настоящему изобретению содержат константный участок гамма-4 человека. В другом варианте реализации изобретения константный участок тяжелой цепи не связывает Fc-γ-рецепторы и, например, включает мутацию Leu235Glu. В другом варианте реализации изобретения константный участок тяжелой цепи содержит мутацию Ser228Pro для повышения стабильности. В другом варианте реализации изобретения константный участок тяжелой цепи представляет собой IgG4-PE. Примеры константных доменов VL и VH, которые могут использоваться в некоторых вариантах реализации изобретения изобретения, включают (в том числе) C-каппа и C-гамма-1 (nGlm), описанные в Johnson et al. (1997) J. Infect. Дис. 176, 1215-1224 и те, которые описаны в патенте США №5824307. Гуманизированное антитело может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в пределах выбора специалиста обычной квалификации в данной области. Каркасный и CDR-участки гуманизированного антитела не должны точно соответствовать родительским последовательностям, например, CDR донора или обобщенный каркасный участок могут подвергаться мутагенезу путем замещения, вставки или разрушения по меньшей мере одного остатка, так что CDR или остаток каркасного участка при этом не соответствует ни консенсусу, ни импортированому антителу. Однако, такие мутации не будут обширными. Как правило по меньшей мере 75% остатков гуманизированного антитела будут соответствовать

по меньшей мере 75% исходным последовательностям FR и CDR, чаще 90%, а наиболее предпочтительно более 95%. Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных специалистам в данной области, включая (но не ограничиваясь этим) CDR-прививку (Европейский патент №EP 239 400; международная публикация №WO 91/09967; и патенты США №5225539, 5530101, и 5,585,089), венирование или перекладывание (европейские патенты №EP 592106 и EP 519596, Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; and Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973), перетасовка цепи (патент США №5565332) и техники, описанные, например, в патенте США №6407213, в патенте США №5766886, WO 9317105, Tan et al., J. Immunol. 169.T 119 25 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60 (2000), Morea et al, Methods 20(3):267 79 (2000), Baca et al, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895 904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J.S., Gene 150(2):409-10 (1994), и Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994). См. также патент США Pub. №US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), которые включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте. Часто каркасные остатки в каркасных участках заменяются соответствующим остатком от CDR донорского антитела перекладыванием, предпочтительно улучшить связывание антигена. Эти каркасные замены идентифицируются с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков с целью выявления каркасных остатков, важных для связывания антигена и сравнения последовательностей, для идентификации необычных каркасных остатков в определенных положениях. (См., например, Queen et al., патент США №5585089 и Reichmann et al., 1988, Nature 332: 323, которые включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте.).

Однодоменные антитела, например, антитела, лишенные легких цепей, могут быть получены способами, широко известными специалистам в данной области. См., Riechmann et al, 1999, J. Immunol. 231:25-38; Nuttall et al, 2000, Curr. Pharm. Biotechnol. 1(3):253-263; Muylderman, 2001, J. Biotechnol. 74(4):277302; патент США №6005079; и международную публикацию №WO 94/04678, WO 94/25591, и WO 01/44301, которые включены в данном документе посредством ссылки во всей их полноте.

Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном hOX40L, могут, в свою очередь, использоваться для получения антител против идиотипов, которые «имитируют» антиген, с использованием способов, широко известных специалистам в данной области. (См., например, Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7 (5): 437.444 и Nissinoff, 1991, J. Immunol., 147 (8): 2429-2438).

Наборы

Изобретение также предусматривает фармацевтический или диагностический набор или набор, содержащий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций настоящего изобретения, такими как одно или несколько антител или их фрагментов, представленных в данном документе. Необязательно связанным с таким контейнером (контейнерами) может быть уведомление в форме, предписанной регуляторным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает одобрение агентства по производству, использование или продажу для руководства, например, номер авторизации.

В настоящем изобретении предлагаются наборы, которые могут быть использованы в вышеуказанных способах. В одном из вариантов реализации изобретения набор

содержит антитело по настоящему изобретению, предпочтительно очищенное антитело, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном варианте реализации изобретения наборы настоящего изобретения содержат в качестве контроля главным образом выделенный антиген hOX40L. Предпочтительно, комплекты настоящего изобретения дополнительно содержат контрольное антитело, которое не вступает в реакцию с антигеном hOX40L. В другом конкретном варианте реализации изобретения комплекты настоящего изобретения содержат средство для обнаружения связывания модифицированного антитела с антигеном hOX40L (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В конкретных вариантах реализации изобретения набор может включать рекомбинантный или химически синтезированный антиген hOX40L. Антиген hOX40L, поставляемый в комплекте, также может быть прикреплен к твердой подложке. В более конкретном варианте реализации изобретения средство обнаружения вышеописанного набора включает твердую подложку, к которой прикреплен антиген hOX40L. Такой набор может также включать не присоединенное репортер-меченное античеловеческое антитело. В этом варианте реализации изобретения связывание антитела с антигеном hOX40L можно обнаружить путем связывания указанного репортер-меченого антитела.

«Консервативные аминокислотные замены» являются результатом замены одной аминокислоты другой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства, такие как замена лейцина изолейцином или валином, аспартата - глутаматом, или треонина - серином. Таким образом, «консервативная замена» конкретной аминокислотной последовательности относится к замещению тех аминокислот, которые не являются критическими для полипептидной активности или замещения аминокислот другими аминокислотами, имеющими сходные свойства (например, кислотные, основные, положительно или отрицательно заряженные, полярные или неполярные и т.д.), так что замена даже критических аминокислот не снижает активность пептида (т.е. способность пептида проникать через гематоэнцефалический барьер (BBB)). Консервативные таблицы замещения, в которых указаны функционально сходные аминокислоты, широко известны специалистам в данной области. Например, следующие шесть групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), серии (S), треонин (T); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W). (См. также Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984), включенные посредством ссылки во всей их полноте). В некоторых вариантах реализации изобретения отдельные замены, удаления или добавления, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот, также могут рассматриваться как «консервативные замены», если изменение не снижает активность пептида. Вставки или удаления обычно находятся в диапазоне от 1 до 5 аминокислот. Отбор консервативных аминокислот может быть сделан на основе расположения аминокислоты, подлежащей замещению в пептиде, например, если аминокислота находится снаружи пептида и экспонируется в растворителях или на внутренней поверхности и не подвергается воздействию растворителя.

В альтернативных вариантах реализации изобретения можно выбрать аминокислоту, которая заменит существующую аминокислоту на основании местоположения

существующей аминокислоты, то есть воздействия на нее растворителем (то есть, если аминокислота подвергается воздействию растворителей или присутствует на внешней поверхности пептида или полипептида по сравнению с внутренне локализованными аминокислотами, не подверженными воздействию растворителей). Отбор таких консервативных аминокислотных замещений широко известен специалистам в данной области, например, как описано в Dordo et al., J. Mol Biol, 1999, 217, 721-739 и Taylor et al., J. Theor. Biol. 119 (1986), 205-218 и S. French and B. Robson, J. Mol. Evol., 19 (1983) 171. Соответственно, можно выбрать консервативные аминокислотные замены, подходящие для аминокислот на внешней стороне белка или пептида (т.е. аминокислоты, подвергнутые воздействию растворителя), например, (но не ограничиваясь этим), могут быть использованы следующие замены: замена Y на F, T та S или K, P на A, E на D или Q, N на D или G, R на K, G на N или A, T на S или K, D на N или E, I на L или V, F на Y, S на T или A, R на K, G на N или A, K на R, A на S, K или P.

В альтернативных вариантах реализации изобретения также можно выбирать консервативные аминокислотные замены, которые могут быть использованы в отношении аминокислот внутри белков или пептидов, например, можно использовать подходящие консервативные замены для аминокислот во внутренней части белка или пептида (т.е. аминокислоты не подвергаются воздействию растворителя), например, (но не ограничиваясь ими), можно использовать следующие консервативные замены: где Y замещен F, T на A или S, I на L или V, W на Y, M на L, N на D, G на A, T на A или S, D на N, I на L или V, F на Y или L, S на A или T и A на S, G, T или V. В некоторых вариантах реализации изобретения неконсервативные аминокислотные замены также охватываются в течение срока действия вариантов.

Используемый в данном документе термин «антитело» относится к молекулам IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их антигенспецифическим фрагментам (включая, но не ограничиваясь ими, Fab, $F(ab')_2$, Fv, дисульфид, связанный Fv, ScFv, однодоменное антитело, мультиспецифическое антитело с закрытой конформацией, связанное с дисульфидом scfv, diabody), независимо от того, от какого вида они получены, продуцируется ли антитело естественным образом или создается с помощью технологии рекомбинантной ДНК; независимо от того, выделены они из сыворотки, B-клеток, гибридомы, трансфектомы, дрожжей или бактерий. Антитела могут быть гуманизированы с использованием стандартных технологий.

Как описано в данном документе, «антиген» представляет собой молекулу, которая связывается с помощью участка связывания с антителом. Как правило, антигены связываются лигандами антител и способны повышать ответ антитела in vivo. Антиген может быть полипептидом, белком, нуклеиновой кислотой или другой молекулой или ее частью. Термин «антигенная детерминанта» относится к эпитопу на антигене, распознаваемом антигенсвязывающей молекулой a, более конкретно, антигенсвязывающим участком указанной молекулы.

Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» относится к полипептиду, который включает по меньшей мере один вариабельный домен иммуноглобулина или последовательность вариабельного домена иммуноглобулина и который специфически связывает данный антиген. Фрагмент антитела может содержать антитело или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела может содержать моноклональное антитело или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен моноклонального антитела. Например, антитело может включать в себя вариабельный участок тяжелой (H) цепи (сокращенно обозначенный здесь как VH) и вариабельный

участок цепи OX40L (L) (сокращенно обозначенный здесь как VL). В другом примере антитело включает два вариабельных участка тяжелой (H) цепи и два вариабельных участка цепи OX40L (L). Термин «фрагмент антитела» охватывает антигенсвязывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab и sFab, фрагменты $F(ab')_2$, Fd, фрагменты Fv, scFv и доменные антитела (dAb) (см., например, de Wildt et al., Eur J. Immunol., 1996; 26 (3): 629-39, которая включена в данном документе посредством ссылки)), а также полные антитела. Антитело может иметь структурные особенности IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также подтипы и их комбинации). Антитела могут быть из любого источника, включая мышь, кролика, свинью, крысу и приматов (человек и нечеловеческий примат) и приматизированные антитела. Антитела также включают в себя мидитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и тому подобное.

Используемый в данном документе термин «вариабельный домен антитела» относится к частям OX40L и тяжелым цепям молекул антител, которые включают в себя аминокислотные последовательности антигенсвязывающих участков (CDRs, то есть CDR1, CDR2 и CDR3) и каркасных участков (FR). VH относится к вариабельному домену тяжелой цепи. VL относится к вариабельному домену легкой цепи. Согласно способам, используемым в настоящем изобретении, положения аминокислот, заданные для CDR и FR, могут быть определены в соответствии с номенклатурой Kabat (последовательности протеинов иммунологического интереса (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991)) или согласно номенклатуре IMGT.

Используемый в данном документе термин «участок связывания с антителом» относится к полипептиду или домену, который содержит один или несколько CDR антител и способен связывать антиген. Например, полипептид содержит CDR3 (например, HCDR3). Например, полипептид включает CDR 1 и 2 (например, HCDR1 и 2) или CDR 1-3 вариабельного домена антитела (например, HCDRs1-3). В примере участок связывания антитела снабжен одним вариабельным доменом (например, доменом VH или VL). В другом примере участок связывания содержит пару VH/VL или две и более таких пар.

Используемый в данном документе термин «генотипирование» относится к процессу определения специфической аллельной композиции клетки и/или субъекта в одном или нескольких положениях в геноме, например, путем определения последовательности нуклеиновой кислоты в данном положении. Генотипирование относится к анализу нуклеиновой кислоты и/или анализу на уровне нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин «фенотипирование» относится к процессу определения идентичности и/или композиции продукта экспрессии клетки и/или субъекта, например, путем определения полипептидной последовательности продукта экспрессии. Фенотипирование относится к анализу белка и/или анализу на уровне белка.

Используемые в данном документе термины «лечить», «терапия», «лечение» или «улучшение» относятся к терапевтическим воздействиям, в которых объектом является изменение, облегчение, улучшение, подавление, замедление или остановка прогрессирования или тяжести состояния, связанного с заболеванием или нарушением. Термин «лечение» включает в себя уменьшение или облегчение по меньшей мере одного нежелательного эффекта или симптома состояния, заболевания или нарушения. Лечение, как правило «эффективно», если снижается проявление одного или нескольких симптомов или клинических маркеров. Или же лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания уменьшается или прекращается. То есть «лечение» включает не только положительную динамику симптомов или маркеров, но также прекращение или, по крайней мере, замедление, прогрессирования или усугубления

симптомов по сравнению с тем, что можно было бы ожидать при отсутствии лечения. Эффективные или желаемые клинические результаты включают (в том числе) облегчение одного или нескольких симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (то есть, не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление состояния заболевания, ремиссии (будь то частичная или полная) и/или снижение смертности, независимо от того, обнаруживается или не обнаруживается. Термин «лечение» заболевания также включает в себя предоставление помощи при симптомах или нежелательных эффектах заболевания (включая паллиативное лечение). Для эффективного лечения полное излечение не предусмотрено. В некоторых аспектах способ также может включать лечение.

Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к активному средству в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, например, носитель, обычно используемый в фармацевтической промышленности. Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для использования при контакте с тканями человека и животных без чрезмерного токсического влияния, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений, соизмеримых с допустимым соотношением пользы/риска.

Используемый в данном документе термин «введение» относится к помещению соединения, заявленного в данном документе, в субъект с помощью способа или метода, который приводит по меньшей мере к частичной доставке агента в желаемое место. Фармацевтические композиции, содержащие заявленные в данном документе соединения, могут вводиться любым подходящим путем, который приводит к эффективному лечению субъекта.

Вводить отдельно или одновременно можно несколько композиций. Отдельное введение относится к двум композициям, которые вводят в разное время, например, не менее чем через 10, 20, 30 или 10-60 минут, или через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 часов. Можно также вводить композиции через 24 часа или даже с большим перерывом. Или же две или более композиции могут вводиться одновременно, например, менее чем через 10 или 5 минут. Композиции, вводимые одновременно, в некоторых случаях могут вводиться в виде смеси, не зависимо от того, аналогичный или разный механизм высвобождения во времени характерен для каждого из компонентов.

Используемый в данном документе термин «номер авторизации» или «номер разрешения на продажу» относится к номеру, выданному регулирующим органом в учреждении, определяющем, что конкретный медицинский продукт и/или композиция могут продаваться и/или предлагаться к продаже в области компетенции ведомства. Используемый в данном документе термин «регулирующий орган» относится к одному из учреждений, ответственных за оценку, например, безопасности и эффективности медицинского продукта и/или состава, а также контроля продаж/ маркетинга таких продуктов и/или композиций в данной области. Управление по контролю продуктов и лекарственных средств (FDA) в США и Европейское агентство по лекарственным средствам (EPA) в Европе представляют всего лишь два примера таких регулирующих органов. Другими, но не ограничиваясь этим, примерами могут быть SDA, MPA, MHPRA, IMA, ANMAT, Гонконгский отдел по медико-санитарному надзору, CDSCO, Medsafe и KFDA.

Используемый в данном документе термин «инъекционное устройство» относится

к устройству, предназначенному для осуществления инъекций, включая инъекцию с поэтапным временным жидкостным соединением инъекционного устройства с тканями человека, обычно подкожной клетчаткой. Инъекция дополнительно включает введение количества жидкого лекарственного средства в ткань и разъединение или удаление инъекционного устройства из ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения инъекционное устройство может быть внутривенным устройством или устройством IV, которое является типом инъекционного устройства, используемого, когда ткань-мишень является кровью в системе кровообращения, например, кровью вены. Обычным, но не ограничиваясь этим, примером инъекционного устройства является игла и шприц.

Используемый в данном документе термин «буфер» относится к химическому средству, которое способно поглощать определенное количество кислоты или основания без значительного изменения pH.

Используемый в данном документе термин «упаковка» относится к тому, как компоненты организованы и/или укомплектованы в единицу, пригодную для распространения и/или использования. Упаковка может включать, например, коробки, пакеты, шприцы, ампулы, флаконы, трубки, раскладную упаковку, барьеры и/или контейнеры для поддержания стерильности, маркировки и т.д.

Используемый в данном документе термин «инструкции» относятся к отображению письменного, напечатанного или графического материала на непосредственном контейнере изделия, например, письменный материал, отображаемый на флаконе, содержащем фармацевтически активное средство, или подробности о составе и использовании продукта, включенного в комплект, содержащего интересующую композицию. В инструкциях излагается способ лечения, который предполагается ввести или выполнить.

Используемый в данном документе термин «содержащий» или «содержит» используется в отношении антител, их фрагментов, применений, композиций, способов и их соответствующих компонентов, которые являются существенными для способа или композиции, но все же открыты для включения неуточненных элементов, важных или нет.

Термин «состоящий из» относится к антителам, фрагментам, применениям, композициям, способам и их соответствующим компонентам, как описано здесь, которые не содержат какого-либо элемента, не указанного в данном описании варианта реализации изобретения.

Используемый здесь термин «состоящий в основном из» относится к тем элементам, которые необходимы для данного варианта реализации изобретения. Данный термин допускает наличие элементов, которые не оказывают существенного влияния на основную и новую или функциональную характеристику (характеристики) данного варианта осуществления.

Особые термины «a», «an» и «the» включают множественные референты, если контекст явно не указывает иначе. Точно так же слово «или» включает «и», если в контексте не указано иначе. Несмотря на то, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике или тестировании данного заявления, подходящие способы и материалы описаны ниже. Аббревиатура «напр.» получена из латинского примера, и используется в данном документе для обозначения нелимитированного примера. Таким образом, аббревиатура «напр.» является синонимом термина «например».

Определения общих терминов в клеточной биологии и молекулярной биологии можно найти в «The Merck Manual of Diagnosis and Therapy», 19-е издание, опубликованном

Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, опубликованной Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Benjamin Lewin, Genes X., опубликованной Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, опубликованной VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) и Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds

Если не указано иное, настоящее изобретение было выполнено с использованием стандартных процедур, как описано, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, США (2012); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Нью-Йорк, США (1995); или Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S.L. Berger и A.R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., Сан-Диего, США (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., Ed., John Wiley и Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et al., Ed., John Wiley и Sons, Inc.) и «Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique» Ian Freshney, издательство: Wiley-Liss; 5-е издание (2005), «Animal Cell Culture Methods» (Methods in Cell Biology, Vol. 57, под ред. Jennie P. Mather и David Barnes, Academic Press, 1-е издание, 1998), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Другие термины определены в данном документе в описании различных аспектов изобретения.

Все патенты и другие публикации, включая литературные ссылки, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и совместные заявки на патент, приведенные на протяжении данной заявки, включены сюда в виде ссылки с целью описания и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут использоваться в связи с технологией, описанной в данном документе. Данные публикации предоставляются исключительно для их открытия до даты подачи настоящей заявки. Это не означает, что изобретатели не имеют права приводить такое открытие по причине предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления о дате или представлении сведений в отношении содержания этих документов основаны на информации, доступной для заявителей, и не означают правильность дат или содержания этих документов.

Описание вариантов реализации изобретения открытия не является исчерпывающим или ограничивающим в отношении точной формы открытия. Хотя конкретные варианты реализации изобретения и примеры для открытия описаны в данном документе для иллюстративных целей, в рамках открытия возможны различные эквивалентные модификации, как признают специалисты в данной области. Например, несмотря на то, что этапы или функции метода представлены в данном порядке, в альтернативных вариантах реализации изобретения функции могут выполняться в другом порядке или практически одновременно. Обучения открытию, представленные в данном документе, при необходимости могут быть применены к другим процедурам или методам. Различные варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, для обеспечения дополнительных вариантов могут быть объединены. При необходимости аспекты открытия могут быть изменены при использования композиций, функций и концепций вышеупомянутых ссылок и приложений для предоставления дополнительных вариантов реализации изобретения открытия. Кроме того, в связи с биологической функциональной эквивалентностью в структуру белка могут быть внесены некоторые изменения, не влияющие на биологическое или химическое действие в натуральном виде или количестве. Эти и другие изменения могут быть внесены в открытие в

детальном описании OX40L. Все такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

Определенные элементы любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения могут быть объединены или заменены элементами в других вариантах реализации изобретения. Кроме того, несмотря на преимущества, связанные с определенными вариантами осуществления открытия, описанные в контексте данных вариантов реализации изобретения, другие варианты реализации изобретения также могут иметь такие преимущества, и не все варианты реализации изобретения обязательно должны иметь такие преимущества, чтобы подпадать под объем открытия.

Понятно, что конкретные конфигурации, концепции, аспекты, примеры, положения и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, приведены в качестве иллюстрации, а не как предел применения изобретения. Основные признаки настоящего изобретения могут быть использованы в различных вариантах реализации изобретения без отхода от объема изобретения. Специалистам в данной области известны или они с использованием стандартного исследования смогут установить многочисленные эквиваленты конкретных процедур, описанных здесь. Такие эквиваленты считаются входящими в объем настоящего изобретения и охватываются формулой изобретения. Все публикации и патентные заявки, упомянутые в описании, показывают уровень квалификации специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая из них специально и индивидуально указывалась для включения в качестве ссылки. Использование слов «a» или «an» при использовании в сочетании с термином «содержащий» в формуле изобретения и/или спецификации может означать «один», но оно также согласуется со значением «один или несколько», «по крайней мере, один» и «один или более». Использование термина «или» в формуле изобретения используется для обозначения «и/или», если явно не указано только на альтернативы, или альтернативы являются взаимоисключающими, несмотря на то, что в открытии поддерживается определение, которое относится только к альтернативам и «и/или». На протяжении данного приложения термин «около» используется для указания того, что значение включает в себя неотъемлемую вариацию ошибки с учетом устройства, способа, используемого для определения значения, или вариацию, существующую среди субъектов исследования.

Используемые в настоящей спецификации и патентной формуле(ах) слова «содержащий» (и любые его формы, такие, как «содержат» и «содержит»), «имеющий» (и любые его формы, например, «иметь» и «имеет»), «включающий» (и любые его формы, такие как «включает» и «включают») или «содержащий в себе» (и любые его формы, такая как «содержит» и «содержать») являются открытыми или ничем не ограниченными, и не исключают дополнительных изменений, не перечисленных элементов или этапов способа.

Любая часть данного открытия можно прочитать в сочетании с любой другой частью открытия, если в контексте не указано иное.

Все композиции и/или способы, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть изготовлены и выполнены в настоящем открытии без излишних экспериментов относительно OX40L. Несмотря на то, что композиции и способы настоящего изобретения описаны с точки зрения предпочтительных вариантов реализации изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что к композициям и/или способам и на отдельных этапах или в последовательности этапов, описанного в данном документе способа, могут применяться вариации, не отступая от концепции, сущности

и объема изобретения. Все подобные аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Приготовление антигена, процедуры иммунизации и получение гибридомы

В следующем примере представлено подробное описание получения и идентификации панели моноклональных антител человека OX40L с использованием системы KyMouseTM (см., например, WO 2011/004192). С этой целью генетически модифицированные мыши, содержащие большое количество генов иммуноглобулина человека, иммунизировали растворимым рекомбинантным OX40L человека (коммерческим или собственным продуктом) или поверхностно экспрессированным OX40L человека, показанные на клетках эмбриональных фибробластах мыши (MEF). Были созданы различные режимы иммунизации, включая обычные интраперитонеальные инъекции, а также режим быстрой иммунизаци множественных участков, проводя реиммунизацию животных в течение нескольких недель. В конце каждого режима удаляли вторичную лимфоидную ткань, такую как селезенка, а в некоторых случаях и лимфатические узлы. Ткани готовили в суспензии с одной клеткой и проводили сливание с клетками SP2/0 для получения стабильной клеточной линии гибридомы.

Материалы и способы

Клонирование экспрессии и очищение рекомбинантного резуса и OX40L человека

кДНК, кодирующую внеклеточный домен OX40L человека, клонировали в экспрессирующую плазмиду pREP4 (Invitrogen) с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Конструкции также содержали пептидный мотив FLAG для помощи в очищении и мотив «изолейциновой молнии» для помощи в тримеризации. Конструкции имели последовательность, чтобы обеспечить их правильную композицию последовательности.

Резус (Macaca mulatta) OX40L создали с использованием плазмиды человека OX40L, созданной выше в качестве матрицы, и с использованием сайта направленного мутагенеза для введения изменений аминокислоты.

Человеческий OX40L, а также OX40L макаки-резус, экспрессировали кратковременно для получения рекомбинантного белка с использованием суспензии адаптированной клеточной линии Invitrogen FreeStyleTM CHO-S. Плазмиды трансфецировали в клетки с использованием PEI (полиэтиленимин MW 40000) и оставляли для переливания в течение 13 дней до сбора супернатанта для очистки. Клетки питались, во время процесса перерастания, с помощью ActiCHO TM Feeds A и B от GE Healthcare, чтобы повысить производительность и повысить долговечность клеток. Во время процесса перерастания образцы регулярно собирали для контроля роста и жизнеспособности клеток.

FLAG-маркированные белки OX40L очищали в двухэтапном процессе; сначала, очищенные супернатанты культуры от экспрессии CHO-S, очищали с использованием аффинной хроматографии с M2 антитела FLAG. Элюированные фракции, содержащие белок OX40L, затем сортировали по размеру с помощью эксклюзионной хроматографии и оценивали по чистоте с помощью анализа SDS-PAGE и определяли количественно с помощью спектрофотометра, при длинне волны 280 нм.

Клонирование экспрессии и очищение рекомбинантного рецептора OX40 человека

кДНК, кодирующая внеклеточный домен человеческого рецептора OX40, клонировали в плазмиду экспрессии pREP4 (Invitrogen) с использованием стандартного

расщепления рестрикционного фермента и лигирования. Конструкция содержала часть Fc человека для помощи очистки. Конструкции были последовательны, чтобы обеспечить их правильную последовательность композиции.

Рецептор человека OX40 временно экспрессировали для получения рекомбинантного белка с использованием суспензии адаптированной клеточной линии Invitrogen FreeStyleTM CHO-S. Плазмиды трансфецировали в клетки с использованием PEI (полиэтиленимин MW 40000) и оставляли для переливания в течение 13 дней до сбора супернатанта для очищения. Клетки питались во время процесса перерастания с помощью ActiCHO™ Feeds A и B от GE Healthcare, чтобы повысить производительность и повысить долговечность клеток. Во время процесса перерастания образцы регулярно собирали для контроля роста и жизнеспособности клеток.

Fc-меченный белковый рецептор OX40 очищали в двухэтапном процессе; сначала очищенные супернатанты культуры от экспрессии CHO-S очищали с использованием аффинной хроматографии с белком G. Элюированные фракции, содержащие белок-рецептор OX40, затем сортировали по размеру с помощью эксклюзионной хроматографии и оценивали по чистоте с помощью анализа SDS-PAGE и определяли количественно с помощью спектрофотометра, при длинне волны 280 нм.

Получение стабильных трансфецированных MEF и CHO-S клеток, экспрессирующих OX40L человека

Полные последовательности OX40L человека кодон-оптимизированны (Seq ID No: 173) для экспрессии млекопитающих и клонированы в вектор экспрессии под промотором CMV, фланкированным 3'- и 5'-piggyback специфическими терминальными повторными последовательностями, способствующими стабильное встраивание в геном клетки (См.: «A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications)); Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Jan 25). Дополнительно, вектор экспрессии содержит кассету для выбора пуромицина либо неомицина, способствуя получению стабильной клеточной линии. Экспрессионную плазмиду hOX40L ко-трансфектировали с плазмидой, кодирующей транспозазу piggyBac, в клеточную линию эмбрионального фибробласта мыши (MEF) (эмбрионы, используемые для получения этой линии, получены из мышинной линии 129S5, скрещенного с самкой мышинной линии C57BL6) и CHO-S клетки с использованием реагента для трансфекции FreeStyle Max (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Через 24 часа после трансфекции в среду добавили G418 или неомицин и выращивали в течение по меньшей мере 2 недель, среду меняли каждые 3-4 дня, чтобы выбрать стабильную клеточную линию. Экспрессию hOX40L человека оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием конъюгированного антитела OX40L-PE к рецептору человека (eBioscience). Полная среда MEF состояла из модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (Gibco), дополненной 10% об./об. фетальной бичьей сыворотки (Gibco).

Получение HT1080, экспрессирующих OX40R и NF-Kappa репортерный ген

Полная последовательность рецептора OX40L человека кодон-оптимизированна (Seq ID No: 173) для экспрессии млекопитающих и клонирована в вектор экспрессии под промотором CMV, фланкированным 3'- и 5'-piggyBac специфическими терминальными повторными последовательностями, способствующие стабильное встраивания в геном клетки (См.: «A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications»; Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Jan 25). Более того, вектор экспрессии содержит кассету для выбора пуромицина, способствуя создание стабильной клеточной линии. Рецептор hOX40 экспрессионной

плазмиды hOX40 ко-трансфектировали с плазмидой, кодирующей транспозазу piggyBac, в HT1080 клетки (ATCC® CCL-121), с использованием реагента для трансфекции FreeStyle Max (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Через 24 часа после трансфекции в среду добавили пуромицин и выращивали в течение по меньшей мере 2 недель, среду меняли каждые 3-4 дня, чтобы выбрать стабильную клеточную линию. Экспрессию рецептора оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием конъюгированного антитела OX40-PE к рецептору человека OX40 (R & D, клон 443318). После получения стабильной клеточной линии экспрессирующего рецептора OX40, клетки трансфецировали с плазмидой pNiFty-2-SEAP (invivogen), содержащей 5 повторных сайтов связывания фактора транскрипции NFkB с последующим выделением щелочной фосфатазой. Стабильные клетки отбирали с добавлением зеоцина в среду, причем свежые среды добавляли каждые 3-4 дня. Полная среда HT1080 состояла из MEM, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой.

Приготовление MEF клеток для мышиных иммунизации:

Слой культуры клеток удаляли и клетки промывали один раз с 1×PBS. Клетки обрабатывали в течение 5 минут трипсином, для ослабления клеток на поверхности культуры ткани. Клетки собирали и нейтрализовали трипсином путем добавления к полной среде, содержащей 10% об./об. фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Затем клетки центрифугировали при 300 об/мин в течение 10 минут и промывали по 25 мл 1×PBS. Клетки подсчитывали и ресуспендировали при соответствующей концентрации в 1×PBS.

Процедура иммунизации:

Трансгенных мышей линии Kymice иммунизировали hOX40L в любой растворимой рекомбинантной форме, экспрессируемой клетками CHO-S, или мембраносвязаной форме, экспрессируемой стабильно трансфецированными клетками MEF.

При иммунизировании клеток, адъювант смешивали с клетками в соотношении 1:1 об/об и осторожно перемешивали пипетированием перед интраперитонеальной инъекцией. При иммунизации белком, адъювант смешивали с белком в соотношении 1:1 об/об и перемешивали несколько раз. Всех мышей очищали перед тем, как они получали первичную вакцинацию, а затем активно поддерживали каждые 3 недели. По меньшей мере 3 последовательных забора крови, с интервалом по меньшей мере в 2 недели, собирали и анализировали для определения титра специфического IgG к hOX40L с использованием анализа на основе ИФА или проточной цитометрии.

Определение титров сыворотки с помощью FACS с использованием hOX40L человека, экспрессируемые CHO-S клетками

Клетки CHO-S, экспрессирующие hOX40L, или нетрансфецированные CHO-S клетки, разводили в FACS буфере (PBS + 1% мас./об. БСА + 0,1% мас./об. NaN3), распределяли на 96-луночный планшет с V-образным дном (Greiner) с плотностью 1×10^5 клеток на лунку. Клетки промывали раствором PBS по 150 мкл на лунку и центрифугировали при 300 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удаляли и добавляли раствор PBS по 150 мкл на лунку. Эта стадия промывки повторялась. Титрование мышиной сыворотки готовили, разбавляя образцы буфером FACS. Затем в лунку планшета добавляли по 50 мкл/лунку этой растительной мышиной сыворотки. До иммунизации сыворотку от каждого животного разводили 1 к 100 буфером FACS и добавляли по 50 мкл/лунку к клеткам, чтобы определить изменение уровня активности в результате иммунизации. Подходящее исходное антитело (антитело к OX40L MAB10541, R & D-системы) или контрольное антитело IgG1 мыши (Sigma) разводили FACS буфером (между 1-9 мкг/мл) и добавляли по 50 мкл к клеткам. Клетки инкубировали при 4°C в течение 30 минут.

Клетки дважды промывали раствором PBS по 150 мкл на лунку, центрифугировали после каждой стадии промывки и удаляли супернатант (центрифугировали при 300 об/мин в течение 3 минут). Чтобы обнаружить связывание антител, APC козьи антитела к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) разводили 1 к 500 буфером FACS и добавляли по 50 мкл на лунку к клеткам. Клетки инкубировали 30 минут при 4°C в темноте. Клетки дважды промывали раствором PBS по 150 мкл на лунку, центрифугировали после каждой стадии промывки и удаляли супернатант (центрифугировали при 300 об/мин в течение 3 минут). Для фиксации клеток добавляли 100 мкл 2% об./об. параформальдегида и инкубировали клетки в течение 30 минут при 4°C, клетки осаждали центрифугированием при 300 об/мин и планшеты ресуспендировали по 50 мкл на лунку буфера FACS. Интенсивность сигнала APC (geomean) измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием прибора BD FACS Array.

Определение титров сыворотки методом иммунноанализа DELFIA с использованием рекомбинантного hOX40L

Титры в образцах мышинной сыворотки определяли с использованием обратного OX40L протокола ИФА. Иммобилизованное антитело против IgG мыши (Southern Biotech) (развели до концентрации 4 мкг/мл в ФСБ, 50 мкл/лунку) адсорбировали 96-луночных планшетах с низким уровнем аутофлуоресценции, с высоким связыванием белка (Costar) в течение ночи при 4°C. Избыток IgG удаляют путем отмывки в ФСБ (0,1% об./об.), содержащем поверхностно-активное вещество Tween, и лунки блокировали 1% мас./об. сывороточным альбумином крупного рогатого скота (БСА, Sigma) в растворе ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего планшеты отмывали, как описано ранее. Титрование сыворотки мыши готовили разведением образцов в реагентном растворителе (0,1% мас./об. БСА/ФСБ). Затем к ИФА-планшетам добавляли по 50 мкл/лунку этой расститрованной мышинной сыворотки. Чтобы определить изменение уровня активности в результате иммунизации, сыворотку от каждого животного до иммунизации разводили 1 к 100 в реагентном растворителе и по 50 мкл/лунку добавляли в планшет ИФА. В качестве положительного контроля для связывания биотинилированного OX40L, связывающий антитела к OX40L (MAB10541, R & D системы) развели до 1 мкг/мл, добавляли в ИФА планшет по 50 мкл на лунку. Контроль изотипа IgG1 мыши (Sigma) включали как отрицательный контроль и развели реагентным растворителем до 1 мкг/мл и 50 мкл/лунку добавляли в планшет ИФА. В некоторых случаях образец сыворотки от иммунизированной мыши с невосприимчивым антигеном разводили 1 к 1000 и добавляли по 50 мкл/лунку в планшет ИФА. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение, по меньшей, мере 1 часа. После инкубации планшеты промывали, как прежде, для удаления несвязанных белков. Затем добавляли в планшеты биотинилированный OX40L (разводили 100 нг/мл реагентным растворителем, добавляли по 50 мкл/лунку) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Несвязанный биотинилированный человеческий OX40L удаляли путем отмывки в ФСБ, содержащем поверхностно-активное вещество Tween, (0,1% об./об.), в то время как оставшийся биотинилированный OX40L выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-европиум3 + (DELFIA®-детекция, PerkinElmer), разведенный в буферном растворе для анализа DELFIA® (Perkin Elmer) или разведенный в стрептавидин-HRP в реагентном растворителе.

В случае разведения с стрептавидин-HRP планшеты отмывали, как описано ранее, и в планшет добавляли по 50 мкл TMB на лунку (Sigma). Затем реакцию останавливали добавлением по 50 мкл 1M серной кислоты (аналит Fluka). Оптическую плотность при длинне волны 450 нм измеряли на планшетном анализаторе Envision (PerkinElmer).

В случае разведения с стрептавидин-европиум 3+ планшеты отмывали с ТБС (трис-буференный солевой раствор), содержащем поверхностно-активное вещество Tween (0,1% об./об.) и добавляли в планшет по 200 мкл/лунку усиливающего раствора DELFIA (Perkin Elmer). Флуоресценцию с временным разрешением при длине волны 615 нм измеряли на планшетном анализаторе Envision (PerkinElmer). Данные флуоресценции строят по мере того как насчитывают европия.

Выделение и препарирование мышиной ткани:

Селезенки вырезали из иммунизированных мышей и промывали в 1×ФСБ и выдерживали на льду до дальнейшей обработки. Ткани готовили в буфере, содержащем 1×ФСБ (Invitrogen) и 3% термоинактивированный FBS (Invitrogen). Спленоциты диспергировали путем измельчения ткани через сетчатый фильтр размером 45 мкм (BD Falcon) и промывали в 3% буферном растворе 30 мл FBS/ФСБ перед центрифугированием при 700 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Для удаления эритроцитов гранулированные спленоциты ресуспендировали в 4 мл лизирующем буфере красных кровяных телец (Sigma). Через 4 минуты инкубации реакцию лизиса останавливали добавлением 3% буфером ФСБ/1×ФСБ. Клеточные комочки отфильтровывали с помощью сетчатого фильтра размером 45 мкм. Остальные спленоциты осаждали для дальнейших процедур.

Слияние гибридомы

Для эксперимента KM055, осажденные спленоциты проходили непосредственно к слиянию CpG без какой-либо селективной или стимуляции в течение ночи. Для эксперимента KM040, B-клетки подвергались положительному методу отбора с использованием системы разделения MACS®. Клетки ресуспендировали в 80 мкл 3% буферном растворе FBS/ФСБ с плотностью на 1×10^7 клеток перед добавлением мышиного антитела к IgG1 плюс мышиного антитела к IgG2a+b MicroBeads (Miltenyi Biotec) и инкубировали в течение 15 минут при 4°C. Клетки/MicroBeads затем наносили на предварительно смоченную колонку LS, помещенную в магнитный сепаратор MACS, и отмывали 3% буферным раствором FBS/ФСБ. Положительные клетки с IgG собирали в меченую, колонкосвязывающей фракцию с 3% буферным раствором FBS/ФСБ.

Для эксперимента KM040 обогащенные B-клетки обрабатывали с использованием CpG в течение ночи (конечная концентрация 25 мкМ) и на следующий день отмывали один раз в буферном растворе для слияния BSA (0,3 М D-сорбит, 0,11 мМ гидрат ацетата кальция, 0,5 мМ тетрагидрат ацетата магния и 0,1% BSA (отношение об./мас.), доводили до pH 7,2). Для эксперимента KM055 осажденные спленоциты из лизиса эритроцитов промывали один раз в буферном растворе для слизи BSA в тот же день, что и тканевый препарат. После этого момента слияние клеток продолжили тем же способом для обоих экспериментов. Промытые клетки ресуспендировали в 200 мкл буферном растворе для слияния BSA и определяли количество клеток. Клетки SP2/0 обрабатывали таким же образом, но дважды отмывали буферным раствором для слияния BSA. Слияние B-клеток осуществляли в соотношении 3:1 с клетками миеломы SP2/0 с помощью электрофузии с использованием BTX ECM 2001 Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus). Каждый продукт слияния оставляли на ночь в восстановительной среде (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла - с высоким содержанием глюкозы (без фенолового красного, без L-G), содержащей OPI (Sigma), L-глутамакс (Gibco), 20% FBS (Gibco, испытанной в пробе для гибридомы) и 2-меркаптоэтанол). В последний день клетки осаждали и ресуспендировали в 1 части регенерирующей среды и до 9 частей полутвердой среды (ClonaCell-HY Hybridoma Selection Medium D, Stemcell Technologies), а затем высевали на чашки Петри диаметром 10 см. Колонии собирали через 12 дней в 96-луночные планшеты и культивировали еще 2-3 дня до скрининга.

Пример 2

Скрининг супернатанта гибридомы

После образования клонов гибридомы супернатант гибридомы оценивали в рамках последовательного первичного и вторичного скрининга, а соответствующие клоны гибридомы, выбирали на основании критериев связывания антитела с hOX40L, экспрессированным клетками CHO, и активности нейтрализации рецептора (см. детально в материалах и методах) (Таблица 1).

Для первичного скрининга изобретатели разработали следующие критерии отбора: лунки, содержащие клоны гибридомы, выбирали, если присутствующие в супернатанте антитела, могли связываться с естественно отображенным hOX40L, экспрессированным на поверхности клетки. Данное исследование проводили путем посева клеток линии CHO-S, экспрессирующих на поверхности hOX40L, с последующей инкубацией с супернатантом гибридомы и детектирующим антителом с флуоресцентной меткой. Присутствие антитела к OX40L в супернатанте считывали с помощью планшет-ридера, способного считывать соответствующую флуоресценцию. Кроме того, изобретатели исследовали супернатант гибридомы на предмет связывания с рекомбинантно экспрессированным OX40L человека с использованием HTRF анализа (гомогенный анализ флуоресценции с временным разрешением). Изобретатели также определяли, обладает ли супернатант гибридомы способностью ослаблять связывание рекомбинантного OX40L человека с OX40R Fc человека. На основании данных трех вышеупомянутых первичных скрининговых анализов из клонов, отвечающих определенным критериям отбора (см. дополнительное подробное описание ниже), были выбраны лучшие, которые и вошли во вторичный скрининг, где определялась способность каждого антитела нейтрализовать связывание hOX40L с его рецепторами, OX40-рецептор (aka CD 134). Изобретатели приняли решение проводить оценку с использованием HTRF анализа нейтрализации рецептора и анализ нейтрализации рецептора на основе проточной цитометрии. В заключение, изобретатели приняли решение исследовать супернатант гибридомы с помощью ППР для оценки кажущегося сродства антител к рекомбинантному трехмерному OX40L человека, а также перекрестной реактивности к OX40L макак-резус.

Антитела были определены с помощью вторичного «хита», когда антитела в супернатанте гибридомы связывались с hOX40L с высоким кажущимся сродством, также как перекрестные реакции с рекомбинантным OX40L макак-резус. Кроме того, в анализе HTRF или проточной цитометрии антитела супернатанта должны были продемонстрировать способность нейтрализовать связывание OX40L с его рецептором, то есть рецептором OX40 (также известный как CD134).

Материалы и методы

Первичный скрининг - Связывание с клеткой, экспрессирующей OX40L человека

Супернатанты, собранные из клеток гибридомы, тестировали с целью оценки способности секретируемых антител связываться с hOX40L, экспрессируемым на поверхности клеток линии CHO-S. Для определения связывания CHO-S hOX40L клетки сеяли в чистые дно-культуральные планшеты с 384 лунками (Costar или BRAND) в количестве 2×10^4 клеток/лунку в среде F12 (GIBCO) с добавлением 10% в объемном отношении FBS (GIBCO) и культивировали в течение ночи. Культуральную среду удаляли из 384-луночных планшетов. В каждую лунку были добавлены по меньшей мере 40 мкл супернатанта гибридомы или положительного контрольного антитела против OX40L человека (конечная концентрация 1 мкг/мл), или антитела к контрольному изотипу IgG1 (в некоторых случаях упоминается как Cm7, Sigma M9269, конечная

концентрация 1 мкг/мл), разведенные в среде, поддерживающей гибридому (HMM). Среда, поддерживающая гибридому, состояла из усовершенствованного DMEM (Gibco), дополненного 1× глутамакс (Gibco), FBS (Gibco) в количестве 20% в объемном отношении, 0,05 мМ β-меркаптоэтанола, 1× HT (Gibco) и 1× пенициллина/стрептомицина (Gibco). Культуральную среду аспирировали и добавляли 50 мкл антимышиных иммуноглобулинов козы, меченных Alexa Fluor 790 (Jackson ImmunoResearch, 115-655-071) в концентрации 1000 нг/мл, с добавлением 0,2 мкМ DRAQ5 (Biostatus), разведенного в FACS-буфере (PBS + 1% в отношении веса к объему, BSA + 0,1% в объемном отношении NaN3). Планшеты снова инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Супернатант отсасывали и добавляли 25 мкл параформальдегида, в объемном отношении 4%, и планшеты инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Планшеты дважды промывали 100 мкл PBS, после чего промывочный буфер полностью удаляли. Интенсивность флуоресценции считывали с помощью сканирования планшетов с использованием инфракрасной системы визуализации Odyssey (LI-COR®). Антимышиное связывание (канал 800 нм) было нормировано на количество клеток (канал 700 нм) в соответствии с алгоритмом, рекомендованным LI-COR®. Процентный эффект рассчитывали по описанию ниже (Уравнение 1). Общее связывание определяли с использованием эталонного антитела при конечной концентрации образца 1 мкг/мл. Неспецифическое связывание определяли с использованием контрольного изотипа IgG1 мыши (Sigma) при конечной концентрации образца 1 мкг/мл. Лунки были определены с помощью «хитов», где процентный эффект был больше или равен 5%.

Уравнение 1: вычисление процентного эффекта первичного скрининга (LI-COR) и HTRF

(С использованием Resp значений 800% (LI-COR) или соотношение 665/620 нм (см. Уравнение 2) (HTRF)

$$\text{Процентный эффект} = \frac{\text{Образец лунки - неспецифическое связывание}}{\text{Общее связывание - неспецифическое связывание}}$$

Неспецифическое связывание = значения из лунок, содержащих изотип-контроль IgG1 мыши или HMM, или буфер

Общее связывание (связывание HTRF и LICOR) = значения из лунок, содержащих эталонное антитело. Общее связывание (анализ OX40L/OX40RFc)=OX40L и OX40RFc.

Первичный скрининг: связывание с рекомбинантным OX40L человека:

Параллельно со скринингом на связывание с CHO-S, экспрессирующих OX40L, супернатанты, собранные из лунок с гибридомой, также тестировали на предмет способности секретируемых антител связываться с hOX40L, экспрессируемыми в виде рекомбинантного белка (продуцируемого в чистом виде, см. детально в примере 1). Связывание секретируемых антител с рекомбинантным hOX40L идентифицировали с помощью метода HTRF® (гомогенная флуоресценция с временным разрешением, Cisbio) с использованием биотинилированного hOX40L. 5 мкл супернатанта гибридомы переносили в белый 384-луночный полистирольный планшет с невзаимодействующей поверхностью (Greiner). Затем добавляли 5 мкл биотинилированного hOX40L (рабочая концентрация 20 нМ), разведенного в буфере HTRF (PBS (Sigma) + 0,53 M KF (Sigma) + 0,1% в объемном отношении BSA (Sigma). После этого вносили 5 мкл комбинированных детектирующих реагентов Стрептавидин D2 (Cisbio), разведенных в буфере в соотношении 1:100, для анализа HTRF окончательное разведение составляло 1:400, и антимышиные IgG козы (Southern Biotech), меченные криптоватом европия (Cisbio),

разведенные в буфере в соотношении 1:100, для анализа HTRF окончательное разведение составляло 1:400. Концентрация антимышиного IgG козы (Southern Biotech), меченного криптоватом европия, зависела от партии, а в некоторых случаях проводили разведение в соотношении 1:1000 для достижения конечной концентрации образца 1:4000. Чтобы отрегулировать общий объем образца до 20 мкл, во все лунки добавляли 5 мкл буфера для анализа HTRF. Для определения неспецифического связывания положительные контрольные антитела или гибридомную среду заменяли буфером для анализа HTRF или HMM. Планшет инкубировали в темноте в течение 3 часов до считывания флуоресценции с временным разрешением при длинах волн излучения 620 нм и 665 нм с использованием планшет-ридера En Vision (Perkin Elmer). Более подробная информация о технологии HTRF® предоставлена в Mathis (1995) Clinical Chemistry 41 (9), 1391-1397. Данные анализировали путем вычисления соотношения 665/620 и процентного эффекта для каждого образца согласно уравнению 2 и уравнению 1 соответственно.

Уравнение 2: Расчет соотношения 665/620

$$\text{665/620 соотношение} = (\text{образец 665/620 нм}) \times 10000$$

Для клонов, полученных из KM040-1 и KM055-1, изобретатели применяли критерии выбора, превышающие или равные 20 процентам при определении лунки с помощью связывания «хита» с рекомбинантным hOX40L, как описано в таблице 1.

Первичный скрининг: анализ связывания OX40L человека с OX40R Fc человека:

Для определения того, ингибировали ли супернатанты, собранные из лунок с гибридомой, связывание OX40L с OX40RFc, секретируемые антитела тестировали на предмет связывания OX40L/OX40RFc в рамках анализа HTRF. 5 мкл супернатанта гибридомы переносили в белый малообъемный 384-луночный полистирольный планшет с невзаимодействующей поверхностью (Greiner). Добавляли 5 мкл биотинилированного OX40L разведенного в буфере для анализа HTRF до рабочей концентрации 2,4 нМа. Затем OX40RFc разводили до рабочей концентрации 4,8 нМ и добавляли 5 мкл. Неспецифическое связывание определяли путем замены OX40RFc на буфер анализа или HMM. Криптат стрептавидина (CISBIO) и античеловеческий Fc D2 (CISBIO) разводили в буфере для анализа HTRF до рабочей концентрации 1: 100 и 5 нМ соответственно. Планшеты закрывали, защищали от света и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов до считывания флуоресценции с временным разрешением при длинах волн излучения 620 нм и 665 нм с использованием планшет-ридера En Vision (Perkin Elmer). Данные анализировали путем расчета соотношения 665/620 и процентного эффекта для каждого образца в соответствии с уравнением 2 и уравнением 5 соответственно.

Для клонов, полученных из KM040-1 и KM055-1, изобретателями был применен критерий выбора, меньше или равный 90 процентам аналитического сигнала связывания рецептора OX40 Fc с OX40L, при определении лунки с помощью «хита», как описано в таблице 1.

Вторичный скрининг: Связывание с клеткой, экспрессирующей рекомбинантный QX40L человека

С целью определить, присутствовали ли в лунках, выбранных с использованием критериев отбора первичного скрининга, требуемые характеристики, установленные изобретателями, был проведен ряд анализов. Клоны гибридомы, выбранные с помощью «хитов» при первичном скрининге, культивировали в течение 3 дней, а супернатанты, собранные из клеток гибридомы, исследовали на предмет секреции антител, которые связываются с CHO-S, экспрессирующими hOX40L, в некоторых случаях связываются

с нетрансфецированными клетками CHO-S, и обладают ли они способностью нейтрализовать связывание рекомбинантного FX OX40R с CHO-S hOX40L и способность нейтрализовать связывание OX40R с рекомбинантным биотинилированным hOX40L.

Связывание с CHO-S, экспрессирующими hOX40L, и нейтрализация рецептора:

Клетки CHO-S, экспрессирующие hOX40L, или нетрансфецированные клетки CHO-S, разведенные в FACS-буфере (PBS + 1% веса в отношении объема BSA + 0,1% веса в отношении объема NaN3), распределяли в 96-луночный планшет с V-образным дном (Greiner) с плотностью 1×10^5 клеток на лунку. Клетки промывали 150 мкл PBS и центрифугировали при 300×g в течение 3 мин. Супернатант отсасывали и добавляли 150 мкл PBS. Данная стадия промывки повторялась.

В промытые клетки добавляли 25 мкл супернатанта гибридомы или очищенного антитела из супернатанта гибридомы, разведенного в FACS-буфере, и инкубировали в течение 10-15 минут. Контрольное антитело или IgG1 мыши (Sigma) разводили в буфере FACS до концентрации 20 мкг/мл и добавляли к клеткам по 25 мкл. Затем в лунки добавляли 25 мкл OX40R Fc человека (в чистом виде), разведенного до 1000 нг/мл в буфере FACS. Клетки инкубировали при 4°C в течение 30 минут.

Клетки дважды промывали центрифугированием со 150 мкл PBS, после каждой стадии промывки супернатант аспирировали (центрифугировали при 300×g в течение 3 минут).

С целью обнаружения связывания антител и рецепторов к клеткам добавляли 50 мкл IgG-PE (Jackson ImmunoResearch) против IgG человека и APC-антимышиного IgG (Jackson ImmunoResearch), разведенных 1 в 500 в FACS-буфера. Клетки инкубировали 30 минут при 4°C в темноте.

Клетки дважды промывали центрифугированием со 150 мкл PBS, после каждой стадии промывки супернатант аспирировали (центрифугировали при 300×g в течение 3 минут).

Для фиксации клеток добавляли 100 мкл 2% в объемном отношении параформальдегида и клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C, клетки осаждали центрифугированием при 300×g и планшетами и ресуспендировали в 50 мкл FACS-буфера. Интенсивность сигнала PE и APC (средняя геометрическая) измерялась с помощью проточной цитометрии с использованием прибора BD FACS Array.

% контрольного связывания рассчитывали с использованием средней геометрической флуоресценции, как описано в уравнении 1, где общее связывание определяли как эталонное антитело при концентрации 10 мкг/мл и неспецифическое связывание как мышиные IgG1-антитела при концентрации 10 мкг/мл. % связывания рецептора вычисляли с использованием уравнения 3.

Уравнение 3: Процент связывания рецептора (FACS)

Основываясь на средней геометрической флуоресценции

$$\%\ \text{связывания рецептора} = \frac{\text{Объем образца - неспецифическое связывание}}{\text{Общее связывание - неспецифическое связывание}} \times 100$$

Неспецифическое связывание = Нет антител, нет рецепторов

Общее связывание = связывание рецептора (OX40R) (без ингибитора) + изотип-контроль в концентрации 10 мкг/мл

Вторичный скрининг - HTRF лиганд/рецептор нейтрализации

Для определения того, нейтрализуют ли антитела, идентифицированные при

первичном скрининге, связывание OX40L с OX40RFc, проводили анализ связывания OX40L человека / OX40R человека, как описано при первичном скрининге.

Планшеты оставляли для инкубации в темноте в течение 3 часов до считывания флуоресценции с временным разрешением при длинах волн излучения 620 нм и 665 нм с использованием планшет-ридера En Vision (Perkin Elmer). Более детальная информация о технологии HTRF® предоставлена в Mathis (1995) Clinical Chemistry 41 (9), 1391-1397. Данные анализировали путем вычисления дельта F, как описано в уравнении 4, и процентное содержание рецептора для каждого образца в соответствии с уравнением 5.

Уравнение 4: Расчет % дельта F

$$\%\ \text{дельта } F = \frac{(\text{Значение отношения образца 665/620 нм}) - (\text{неспецифическое контрольное значение соотношения 665/620 нм})}{(\text{Неспецифическое контрольное соотношение 665/620 нм})} \times 100$$

Уравнение 5: Процент связывания рецептора (HTRF)

На основании расчета % дельта F (Уравнение 4) или соотношения 665/620 (Уравнение 2)

$$\%\ \text{Связывания рецептора} = \frac{\text{Значение образца - неспецифическое связывание}}{\text{Общее связывание} - \text{неспецифическое связывание}} \times 100$$

Неспецифическое связывание = HMM или буфер + OX40L (без рецептора)

Общее связывание = рецептор (OX40R) и OX40L (без ингибитора)

Выбор критериев отбора вторичного скрининга:

Панель «хитов» была выбрана на основании анализа связывания и нейтрализации. «Хиты» в анализе связывания CHO-S OX40L были определены изобретателями как статистически значимое связывание с клетками CHO-S OX40L и отсутствие связывания с клетками CHO-S с помощью FACS. «Хиты» дополнительно определили, как обладающие способностью статистически значимо снижать связывание OX40RFc с рекомбинантным OX40L (HTRF), а также статистически значимо снижать связывание OX40RFc с hOX40L, экспрессируемым клетками CHO. Данные приведены в таблице 1. Также были рассмотрены измерения кажущегося сродства по SPR.

Пример 3

Основная характеристика антитела

На основании скрининга выбранные лунки увеличивали в объеме, а химерные антитела мыши/человека очищали с использованием стандартной аффинной хроматографии на основании очищенного протеина G (см. метод ниже). Антитела подвергли различным анализам с целью оценки их способности блокировать связывание hOX40L с его рецептором OX40R, а также способность каждого антитела связываться с OX40L человека, также как с OX40L макаки-резус, с высоким кажущимся сродством. Для определения лучших антител выбранные клоны тестировали с использованием анализа HTRF OX40L/OX40RFc и OX40L индуцировали высвобождение IL2 из первичных Т-клеток человека.

Таблица 1: Сводка основных mAb

Антитело	Связывание по FACS	Нейтрализация рецептора по HTRF IC_{50} нМ (+/- SEM)	Анализ первичных Т-клеток IC_{50} нМ (+/- SEM)	Кажущееся сродство hOX40L (нМ)	Кажущееся сродство RhsOX40L (нМ)
10A07 (гибридома)	ДА	+++	+++	CNROR	CNROR
10A07 (человек)	Нет данных	+++ 1,2 нМ (+/-0,17)	+++ 0.83 нМ (+/- 1,2)	CNROR	CNROR
2D10 (гибридома)	ДА	+++	ND	CNROR	CNROR
2D10 (человек)	Нет данных	+++ 0,75 нМ (+/- 0,04)	+++ 0.81 нМ (+/- 0,06)	CNROR	CNROR
9H04 (гибридома)	ДА	+	Нет данных	5,3	Нет данных
19H01 (гибридома)	ДА	++	Нет данных	2,2	Нет данных

CNROR = Невозможно определить скорость диссоциации

Данные IC_{50} представляют собой среднее арифметическое +/- стандартную ошибку среднего (SEM) для трех независимых экспериментов или доноров.

Материалы и методы:

Очистка антител от супернатанта гибридомы:

Антитела очищали с использованием аффинной хроматографии с применением протеина G. Антитела элюировали из протеин-в-содержащей среды с использованием элюента IgG (Pierce), а элюированные антитела перед использованием были заменены буфером PBS. Чистоту антител оценивали с помощью анализа SDS-PAGE и определяли количество с помощью спектрофотометра при длине волны OD280 нм.

Связывание антител, очищенных от супернатанта гибридомы, проводили, как описано здесь.

HTRF лиганд/рецептор нейтрализации:

Следующие методы проводили с титрованием ингибитора, чтобы установить активность клона, как измерено значениями IC_{50} в анализе. Антитело, выделенное из гибридомы, титровали путем разведения в буфере для анализа HTRF и 5 мкл этого титра переносили в белый полистирольный 384-луночный планшет с невзаимодействующей поверхностную (Greiner). Биотинилированный OX40L разводили в буфере для HTRF анализа до рабочей концентрации 2,4 нМ и вносили в количестве 5 мкл. Затем OX40RFc разводили до рабочей концентрации 4,8 нМ и вносили в количестве 5 мкл. Неспецифическое связывание определяли путем замены OX40RFc на буфер, применяемый в анализе, или HMM. Криптат стрептавидина (CISBIO) и античеловеческий Fc D2 (CISBIO) разводили в буфере для анализа HTRF до рабочей концентрации 1:100 и 5 нМ соответственно. Планшеты закрывали, защищали от света и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов до считывания разрешенной во времени флуоресценции при длинах волн излучения 620 нм и 665 нм с использованием планшет-ридера En Vision (Perkin Elmer). Данные анализировали путем вычисления дельта F, как

описано в уравнении 4, и процентное содержание рецептора для каждого образца в соответствии с уравнением 5 или в некоторых случаях уравнением 6. Значения IC_{50} определялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism путем подгонки кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения (Уравнение 7).

Уравнение 6: Процент связывания рецептора (HTRF)

На основании расчета % дельта F (уравнение 8)

$$\%\ \text{Процент связывания рецептора} = \frac{\text{Значение образца}}{\text{Общее связывание}} \times 100$$

Общее связывание = рецептор (OX40R) и OX40L (без ингибитора)

Уравнение 7: четырехпараметрический логистический расчет

Y = дно + (сверху вниз)/(1+10^((LogIC50-X)* угловой коэффициент Хилла))

X = логарифм концентрации

Y = специфическое связывание (уравнение 6)

Верх и дно = Плато в тех же единицах, что и Y (специфическое связывание)

Логарифм IC_{50} в тех же единицах, что и X. Y начинается с дна и переходит в верхнюю часть с сигмовидной формой. Специфическое связывание уменьшается по мере увеличения X.

Профилирование полностью человеческих рекомбинантных анти- OX40L антител в анализе HTRF нейтрализации лиганд/рецептор

Для определения того, действительно ли рекомбинантно экспрессируемый полностью человеческий очищенный IgG ингибирует связывание OX40L человека с OX40RFc, был применен следующий метод. Полностью человеческий очищенный IgG или другой ингибитор тестировали с целью установить эффективность клона, как измерено значениями IC_{50} в анализе. Рекомбинантно экспрессированные и очищенные антитела титровали путем разведения в буфере для анализа HTRF и 5 мкл титра переносили на белый полистирольный 384-луночный планшет с невзаимодействующей поверхностью (Greiner). Биотинилированный OX40L разводили в буфере для анализа HTRF до рабочей концентрации 2,4 нМ и вносили в количестве 5 мкл. OX40RFc, непосредственно меченный AF647, затем разводили до рабочей концентрации 10 нМ и вносили в количестве 5 мкл. Неспецифическое связывание определяли путем замены OX40RFC-AF647 на буфер, используемый для анализа, или НММ. Криптат стрептавидина (CISBIO) разводили в буфере для анализа HTRF до рабочей концентрации 1:100 и вносили в количестве 5 мкл во все лунки планшета. Планшеты закрывали, защищали от света и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов до считывания разрешенной во времени флуоресценции при длинах волн излучения 620 нм и 665 нм с использованием планшет-ридера En Vision (Perkin Elmer). Данные анализировали путем вычисления дельта F, как описано в уравнении 4, и процента содержания рецептора для каждого образца в соответствии с уравнением 5 или в некоторых случаях уравнением 6. Значения IC_{50} определялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism путем подгонки кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения (Уравнение 7) (рисунок 1).

Определение влияния анти-OX40b антител на выброс IL2 из первичных выделенных Т-клеток, индуцированный рекомбинантным OX40L

Рекомбинантный OX40L человека (собственного производства) разводили в культуральной среде до концентрации 400 нг/мл и вносили в количестве 50 мкл в 96-

луночный планшет, обработанный тканевой культурой (Costar). Анти-OX40L антитела или соответствующий вид изотип-контроля (Sigma или собственного производства) титровали в культуральной среде в 96-луночном планшете (greiner), а затем 50 мкл титра переносили в 96-луночный планшет, содержащий 50 мкл OX40L. Титр антител инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с рекомбинантным OX40L до добавления CD3-положительных Т-клеток.

PBMC были выделены из камер системы лейкоредукции (NHSBT) с использованием среды фиколл-пак плюс (GE Healthcare) посредством центрифугирования с градиентом плотности. CD3-положительные клетки (Т-клетки) выделяли из PBMC человека путем отрицательного отбора с использованием магнитных микрошариков (Miltenyi Biotech) в соответствии с рекомендациями производителя. Выделенные клетки центрифугировали при 300×g/5 мин, ресуспендировали в культуральной среде (культуральную среду определяли как RPMI (Gibco) + 10% в объемном отношении FBS или RPMI + 5% в объемном отношении человеческой AB-сыворотки) и 50 мкл клеточной суспензии вносили в 96-луночный планшет, содержащий рекомбинантный OX40L и титр антител до достижения конечной концентрации 2×10^5 клеток/лунку.

Затем во все лунки добавляли 50 мкл PHA в концентрации 8 мкг/мл до достижения конечной концентрации 2 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°C в течение 3 дней после чего супернатант собирали и анализировали на предмет содержания IL-2. Максимальное высвобождение IL-2 определяли стимуляцией OX40L в отсутствие ингибитора. Минимальный выброс IL-2 определяли только в культуральной среде (без OX40L).

Уровни IL-2 в супернатантах определяли с использованием наборов IL-2 человека Duoset ELISA (R & D) Systems в соответствии с рекомендациями производителя. Захваченные антитела IL-2 (4 мкг/мл, разведенные в PBS, 50 мкл/лунку) адсорбировали в 96-луночне планшеты с низкой аутофлуоресценцией с высоким содержанием белка (Costar) в течение ночи при 4°C. Избыток IgG удаляли промыванием PBS-твин, лунки блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего планшеты промывали, как описано ранее. Затем добавляли кондиционированную культуральную среду в количестве 50 мкл/лунку, а также в планшеты для ИФА добавляли эталонный IL-2 (от 2000 пг/мл, разведение 1:2) в качестве контроля ИФА, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 1 часа.

После инкубации планшеты промывали, как прежде, с целью удаления несвязанных белков. Затем в планшеты добавляли биотинилированный IL-2 определеное антитело (200 нг/мл в реагентном растворителе (0,1% BSA/PBS), 50 мкл/лунку) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Обнаруженное несвязанное антитело удаляли промыванием PBS-твин (0,1% в объемном отношении), в то время как оставшееся биотинилированное антитело было обнаружено с применением конъюгата стрептавидин-европиума 3+ (обнаружение DELFIA®, PerkinElmer). Флуоресценцию с временным разрешением измеряли при длине волны 615 нм на планшет-ридере Envision (PerkinElmer). Данные флуоресценции были сведены в график как подсчет Европиума или концентрация высвобожденного IL-2, рассчитанная по стандартной кривой путем линейной регрессии в соответствии с рекомендациями производителя. Значения IC_{50} определялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism путем подгонки кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения (Уравнение 7).

Анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса:

Анализ ППР проводился с использованием массива ProteOn™ XPR36 Array System

(BioRad). Антимышиный IgG (GE Healthcare BR-1008-38) иммобилизировали на поверхности биосенсора GLM, используя аминную связь, затем поверхность блокировали с использованием 1 М этаноламина. Тестируемые антитела были захвачены на этой поверхности, а рекомбинантный hOX40L (человек и резус) использовали в одной концентрации 256 нМ, сенсограммы связывания были дважды отражены с использованием буферной инъекции (т.е. 0 нМ) с целью удаления артефактов дрейфа базовой линии и инъекции. Кажущееся сродство при взаимодействии с OX40b-антителом определяли с использованием модели 1:1, присущей программному анализу ProteOn XPR36. Анализ проводили с использованием в качестве подвижного буфера HBS-EP (Teknova) при 25°C.

Пример 4

Последовательность восстановления основных кандидатов антител

После отбора и характеристики основных кандидатов их полностью человеческие вариабельные домены восстанавливали с использованием ОТ-ПЦР и смеси праймеров прямого и обратного действия. Антитела переформатировали в основную цепь IgG4 человека (IgG4-PE) и экспрессировали с использованием переходной экспрессирующей системы в клетках CHO-S. Сводка всех последовательностей приведена в списке последовательностей.

Выделение РНК из клеток гибридомы:

Общая РНК экстрагировалась из клеток гибридомы с использованием реагентов TRIzol™ (Invitrogen). Количество и качество выделенной РНК анализировали спектрофотометрически.

Восстановление вариабельного домена антитела с помощью RT-PCR:

Выбранные клоны использовали для получения полной РНК, которая использовалась в реакции ОТ-ПЦР для восстановления V-областей тяжелой цепи. Для тяжелых цепей использовали IgG специфические обратные праймеры и наборы Ig специфического для прямой последовательности праймера, или альтернативные IgG специфические обратные праймеры и специфичные для прямой последовательности праймеры с Ig 5-нетранслируемой областью (НТО). Для каппа-цепей OX40L были использованы каппа-специфические обратные праймеры с константной областью и наборы специфических прямых праймеров на основе каппа-лидерной последовательности или, альтернативно, специфические обратные праймеры с константной областью каппа и наборы праймеров, специфических для последовательности каппа с 5'НТО. Продукты ОТ-ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле с ДНК с предсказанным размером, секвенированным в прямом и обратном направлениях. Альтернативно, продукты ОТ-ПЦР субклонировали в клонирующий вектор и ДНК отдельных колоний представляли для секвенирования.

Клонирование рекомбинантных антител

ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи mAb 10A7, клонировали в плазмиду pREP4 (Invitrogen) в рамке с константной областью IgG1 человека, а ДНК, кодирующую вариабельный участок легкой цепи mAb 10A7, клонировали в плазмиду pREP4 в рамке с константной областью каппа-цепи человека с использованием стандартного расщепления рестрикционным ферментом и лигирования.

Кодирующие последовательности вариабельной области тяжелой цепи mAb 10A7 и 2D10 в рамке с константной областью IgG4-PE человека были ко доном, оптимизированным для экспрессии млекопитающих и клонированы в плазмиду pXC-18,4 (Lonza), а последовательности кодирования легкой цепи mAb 10A7 и 2D10 в рамке с константной областью каппа-цепи человека были кодоном, оптимизированным для экспрессии млекопитающих и клонированны в плазмиду pXC-17.4 (Lonza) с

использованием стандартного расщепления рестрикционным ферментом и лигирования. Для одновременной экспрессии тяжелых и легких цепей векторы pXC-17.4 и pXC-18.4 сливались в один единственный вектор, с использованием стандартного расщепления рестрикционным ферментом и лигирования.

Все конструкции были секвенированы, чтобы обеспечить правильную композицию их последовательности.

Транзиентная экспрессия антител OX40L

Для получения рекомбинантного белка антитела случайным образом экспрессировали с использованием суспензии адаптированной клеточной линии CHO-S Invitrogen FreeStyle™. Плазмиды трансфецировали в клетки с использованием ПЭИ (полиэтиленимин MW 40000) и оставляли для разрастания в течение 13 дней до сбора супернатанта для очистки. Для повышения производительности и продолжительности жизни клеток во время процесса разрастания их подпитывали ActiCHO™ Feeds A и B фирмы GE Healthcare. Во время процесса разрастания образцы регулярно собирали для контроля роста и жизнеспособности клеток.

Совокупность стабильных пулов Lonza

Антитела 10A7 и 2D10 OX40L переносили в систему Lonza GS Xceed для стабильной экспрессии с целью получить необходимое для исследований токсикологии граммовое количество. HC и LC для каждого антитела были первым кодоном, оптимизированным для экспрессии в клетках CHO Genewiz. Кассету HC (содержащую оптимизированную константную область IgG4PE) затем клонировали в вектор pXC18.4 Lonza, кассету LC (содержащую оптимизированную константную каппа-область), клонировали в вектор pXC17.4 Lonza с использованием стандартного расщепления рестрикционным ферментом и лигирования. Затем с помощью расщепления рестрикционным ферментом и лигирования был создан двойной генный вектор (DGV), кодирующий как HC, так и LC-последовательности, и последовательность была подтверждена до экспрессии.

Перед созданием стабильного пула одноцепочечные векторы, кодирующие HC и LC отдельно, а также DGV, содержащие обе последовательности, были экспрессированы в клеточной линии Lonza CHOK1SVKO случайным образом с использованием ПЭИ (полиэтиленимин MW 40000). Клетки оставляли разрастаться в течение 13 дней перед сбором супернатанта для очистки. Для повышения производительности и продолжительности жизни клеток в течение данного периода их подпитывали ActiCHO™ Feeds A и B фирмы GE Healthcare. Во время процесса разрастания образцы регулярно собирали для контроля роста и жизнеспособности клеток. После подтверждения транзиентной экспрессии и анализа очищенного материала антитела были экспрессированы в виде стабильных пулов.

Стабильные пулы создавались с использованием фирменных методов и питательных сред Lonza. Для каждого антитела было создано 4 пула и оставлено для восстановления в течение 10-15 дней. После того, как клетки были восстановлены, предварительно зараженные клетки (PSS) были заморожены для последующего восстановления и создания MCB. Затем для подпитки разросшейся партии клетки переносили в малообъемную (50 мл) встряхиваемую колбу с запатентованной средой Lonza. Клетки оставляли разрастаться в течение 14 дней. В течение данного периода клетки контролировали на предмет роста, жизнеспособность и уровень глюкозы. К клеткам соответственно добавляли запатентованную питательную среду Lonza и 400 г/л глюкозы. Также на протяжении всего процесса отбирались образцы для количественного определения необработанной выборки. В конце процесса разрастания собирали супернатант для очистки.

Стабильные пулы создавались с использованием фирменных методов и питательных сред Lonza. Для каждого антитела было создано 4 пула и оставлено для восстановления в течение 10-15 дней. После того, как клетки были восстановлены, предварительно зараженные клетки (PSS) были заморожены для последующего восстановления и создания MCB. Затем для подпитки разросшейся партии клетки переносили в малообъемную (50 мл) встряхиваемую колбу с запатентованной средой Lonza. Клетки оставляли разрастаться в течение 14 дней. В течение данного периода клетки контролировали на предмет роста, жизнеспособность и уровень глюкозы. К клеткам соответственно добавляли запатентованную питательную среду Lonza и 400 г/л глюкозы. Также на протяжении всего процесса отбирались образцы для количественного определения необработанной выборки. В конце процесса разрастания собирали супернатант для очистки.

В то время как последовательности 2D10 и 10A07 были сходны, профили экспрессии в стабильных пулах Lonza были разными: 10A07 экспрессировался в очень низких титрах, тогда как 2D10 экспрессировался в гораздо большем количестве титров (см. Таблицу 2) в оптимальных условиях при использовании встряхивающих колб в 4 отдельно созданных стабильных пулах.

Пример 5

Определение влияния антител к OX40L на аллогенные МЛПК в реакции смешанной культуры лимфоцитов

МЛПК выделяют в системе камер для лейкоредукции (NHSBT) методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). МЛПК предварительно инкубируют с митомицином С (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ в течение одного часа при 37°С. Затем клетки отмывают трижды в ФСБ путем центрифугирования при 300×g в течение 3 минут, удаляя надосадочную жидкость после каждой отмывки. Аллогенные МЛПК (необработанные митомицином С) распределяют в 96-луночном планшете, содержащем среду RPMI, содержащую 10 об. % FBS, в концентрации 2×10^6/мл, в объеме 50 мкл/лунку. Антитела к OX40L разводят культуральной средой и распределяют в 96-луночном планшете, содержащем МЛПК (необработанные митомицином С) в объеме 50 мкл/лунку. МЛПК, обработанные митомицином С, затем добавляют к аллогенным МЛПК (необработанным митомицином С) в 96-луночный планшет в конечном соотношении от 1:1 до 4:1 обработанных митомицином С клеток к необработанным митомицином С клеткам, исходя из количества клеток на лунку. Клетки инкубируют в течение пяти дней при 37°С/5% CO_2. Через 5 дней уровни TNF-α, IFN-γ и IL-2 определяют с использованием набора Duoset ELISA (R&D Systems) в соответствии с рекомендациями производителя. Уровень пролиферации определяют путем разведения с CFSE в соответствии с рекомендациями производителя.

МЛПК выделяли в системе камер для лейкоредукции (NHSBT) методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). МЛПК предварительно инкубировали с митомицином С (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ в течение одного часа при 37°С. Затем клетки отмывали трижды в ФСБ путем центрифугирования при 300×g в течение 3 минут, удаляя над осад очную жидкость после каждой отмывки. Т-лимфоциты (Т-клетки), в некоторых случаях CD3-положительные и в других случаях CD4- и CD8-положительные, были выделены из аллогенньгх МЛПК путем негативного отбора с использованием магнитных гранул (Miltenyi Biotech) в соответствии с рекомендациями производителя. В некоторых случаях вместо Т-клеток использовали необработанные митомицином С МЛПК. Выделенные

клетки центрифугировали при 300×g/5 мин, ресуспендировали в культуральной среде (в качестве культуральной среды использовали RPMI (Gibco) + 10 об. % FBS или RPMI + 5 об. % сыворотки человека AB), и 50 мкл суспензии клеток распределяли в 96-луночном планшете, содержащем рекомбинантный OX40L и титр антител для достижения конечной концентрации 2×10^5 клеток на лунку. Антитела к OX40L разводили культуральной средой до конечной концентрации для анализа, составляющей 100 нМ; в некоторых случаях проводилось титрование антител. Антитела распределяли в 96-луночном планшете, содержащем Т-клетки или МЛПК, необработанные митомицином С, в объеме 50 мкл на лунку. МЛПК, обработанные митомицином С, затем добавляли к Т-клеткам или МЛПК, необработанным митомицином С, в 96-луночный планшет в конечном соотношении от 1:1 до 4:1 обработанных митомицином С клеток к необработанным митомицином С клеткам, исходя из количества клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение пяти дней при 37°C /5% CO_2. Через 5 дней уровни IFN-γ определяли с использованием набора Duoset ELISA (R&D Systems) в соответствии с рекомендациями производителя.

Антитела к OX40L определяли как ингибиторы в реакции СКЛ с аллогенными МЛПК/Т-клетками или с МЛПК/МЛПК1 при ингибировании (см. формулу 8) высвобождения фактора (IFN-γ) на >20% относительно контрольных лунок в отсутствии антител. Из четырех проведенных экспериментов, в одном эксперименте произошел технический сбой, определяемый как отсутствие ответа в реакции СКЛ (высвобождение IFN-γ), которое отмечалось между аллогенными донорами. Из трех оставшихся экспериментов, все три продемонстрировали ингибирование (ингибирование высвобождения фактора (IFN-γ) на >20% относительно контрольных лунок в отсутствии антител) с 2D10, 10A07 и положительным контролем 1, однако в одном из трех экспериментов также наблюдалось существенное ингибирование с антителами контрольного изотипа (рис. 2). Для реакции СКЛ с МЛПК/МЛПК было проведено три эксперимента. В двух из трех экспериментов произошел технический сбой, т.к. высвобождение IFN-γ отсутствовало или было низким. Однако в другом эксперименте отмечалось ингибирование высвобождения IFN-γ под действием 10A07 по сравнению с контрольным изотипом.

Формула 8: Процент ингибирования (реакция СКЛ)

Вычисляется на основании значений для высвобождения IFN-γ или IL2 (пг/мл), как описано ниже:

$$\%\ \text{ингибирования} = 100 - \frac{\text{Величина в образце} - \text{отсутствие стимуляции}}{\text{Отсутствие IgG} - \text{отсутствие стимуляции}} \times 100$$

Отсутствие стимуляции = в лунки помещали только Т-клетки или МЛПК, необработанные митомицином С (МЛПК, обработанные митомицином С, отсутствуют)

Отсутствие IgG = в лунки помещали только Т-клетки или, в некоторых случаях, МЛПК, необработанные митомицином С, наряду с добавлением МЛПК, обработанных митомицином С, но без добавления IgG

Пример 6

Определение влияния антител к OX40L на примированные первичные CD3 Т-лимфоциты человека

Чтобы определить, обладает ли антитела к OX40L способностью индуцировать Т-клеточный ответ при отсутствии OX40L, проводился описанный ниже анализ с

использованием метода, адаптированного из Wang et al., Hybridoma (Larchmt)., 2009 Aug; 28 (4): 269-76, в котором описывалось агонистическое антитело к OX40L.

Мышиные антитела к антигену CD3 человека (Becton Dickinson) разводили до концентрации 0,5 мкл/мл в стерильном ФСБ, распределяли в 96-луночном стерильном планшете высокой сорбции в объеме 50 мкл/лунку и инкубировали в течение суток при 4°C.

После инкубации в течение суток планшет трижды отмывали 100 мкл стерильного ФСБ.

Т-клетки (CD3-положительные) выделяли из МЛПК, полученных из системы камер для лейкоредукции (NHSBT), как описано в примере 3. После выделения клетки добавляли в лунки в 100 мкл для достижения конечной концентрации 1×10^5 клеток/лунку.

Тестируемые антитела разводили в RPMI + 10% FBS и добавляли в объеме 50 мкл или 100 мкл/лунку в планшет для клеточной культуры для достижения конечной концентрации для анализа 10 мкг/мл. В некоторых случаях мышиные антитела к антигену CD28 человека (Becton Dickinson) также добавляли в лунки в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Планшет инкубировали в течение 5 дней. Через 5 дней супернатанты отбирали и определяли уровни IFN-γ в супернатанте, как описано в примере 5.

Анализ, проведенный у четырех независимых доноров, показал, что добавление 10A07 или 2D10 не влияет на формат антитела IgG4PE (высвобождение IFN-γ) по сравнению с антителом контрольного IgG4PE-изотипа человека.

Пример 7

Модель болезни «трансплантат против хозяина» на макаках-резус (БТПХ)

Эффективность антитела 2D10 IgG4PE в качестве профилактической монотерапии с целью предотвращения развития БТПХ была изучена на модели гаплоидентичной трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у макак-резус. Ранее было показано, что время выживания после выполнения ТГСК в данной модели на макаках составляло 6-8 дней (Miller, Weston P., et al. "БТПХ after haploidentical transplantation: a novel, MHC-defined rhesus macaque model identifies $CD28^-$ $CD8^+$ Tcells as a reservoir of breakthrough T cell proliferation during costimulation blockade and sirolimus-based immunosuppression." Blood, 116, 24(2010): 5403-5418.)

Все трансплантаты были между парами полусиблингов, которые несовместимы по одному гаплотипу MHC («гаплоидентичные-HCT»). У животных-реципиентов проводилось предтрансплантационное миелоаблативное кондиционирование с использованием линейного ускорителя. Мощность дозы: 7 сГр/мин. Доза составляла 1020 сГр за 4 раза. У жвотного-донора проводят мобилизацию под воздействием Г-КСФ и выполняют лейкаферез с помощью аппарата для сепарации компонентов крови «Spectra Optia». В таблице ниже приведены дозы общего количества ядерных клеток (TNC) CD3+ клеток и CD34+ клеток в пересчете на кг для четырех успешных экспериментов.

Таблица 3

Идентификационный номер реципиента	Номер животного	Масса тела реципиента (кг)	TNC (10^9/кг)	$CD3^+$ Т-клетки 10^6/кг	$CD34^+$Т-клетки 10^6/кг
A14079	#2	9,75	1,13	149,76	0,51
A14081	#4	7,02	2,99	389,08	4,79
A14082	#5	7,6	2,24	312,95	2,69
A14087	#6	5,75	3,44	385,66	9,99

2D10 IgG4PE вводили в/в в дозе 10 мг/кг в соответствии с запланированной схемой дозирования на -2-й, +5-й, +12-й, +19-й, +26-й, +33-й, +40-й, +47-й дни после трансплантации Ни у одного животного серьезных нежелательных побочных явлений в результате введения 2D10 IgG4PE не наблюдалось.

В ходе исследования проводили забор образцов для мониторинга донорского химеризма (таблица 4) и подсчета количества лейкоцитов. Первичная конечная точка основывалась на выживаемости длительностью до 15 дней, которая считается признаком успешной профилактической терапии (и по сравнению с документально подтвержденной выживаемостью в течение 6-8 дней без профилактики, Miller et al., 2010, supra). Хотя планируется проведение полного гистопатологического анализа БТПХ с использованием оценочной шаклы, определение маркеров пролиферации и активации Т-клеток (таких как Ki-67 и гранзим В) и генетический анализ с использованием биочипов, эти данные на момент составления рукописи были недоступны.

Методы для этих исследований по существу были аналогичны описанным в Miller WP et al., (2010) "БТПХ after haploidentical transplantation: a novel, MHC-defined rhesus macaque model identifies CD28- CD8+ T cells as a reservoir of breakthrough T-cell proliferation during costimulation blockade and sirolimus-based immunosuppression", Blood 116:5403-5418.

Клиническое стадирование БТПХ

Оценка клинических симптомов основывалась на данных наблюдения и клинического биохимического анализа, с классификацеий в соответствии с критериями, изложенными в таблице 5.

Гистопатология

При вскрытии проводили забор образцов тканей, включая легкие, печень, кожу и желудочно-кишечный тракт, которые затем фиксировали в формалине и заливали парафином. Делали срезы, помещали на предметное стекло и окрашивали гематоксилин-эозином или маркерами Т-клеток для визуализации инфильтрации тканей лимфоцитами. Гистопатолог выполняет специальную для БТПХ экспертизу приготовленных срезов с использованием полуколичественной системы оценки.

Проточная цитометрия

Продолжительный забор образцов периферической крови проводился до и после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток и при некропсии для проточного цитометрического анализа подгрупп лимфоцитов. Забор образцов тканей легкого, печени, толстой кишки и лимфатических узлов (подмышечных и паховых) осуществляли при некропсии или подвергали ферментативной обработке, если это требовалось для последующего анализа лимфоцитарных инфильтратов методом проточной цитометрии. Образцы анализировали методом многоцветной проточной цитометрии на цитофлуориметре LSRFortessa (BD Biosciences) с использованием меченых антител к антигенам Т-лимфоцитов: Антитела к антигену CD3 (меченые APC-Cy7; клон SP34-2,

BD Biosciences), антитела к антигену CD4 (меченые BV786; клон L200, BD Biosciences), антитела к антигену CD8 (меченые BUV395; клон RPA-T8, BD Bioscences), антитела к антигену CD28 (меченые PE-Cy7; клон CD28.2, eBioscience), антитела к антигену CD95 (меченые BV605; клон DX2, Biolegend). Популяции пролиферирующих клеток определяли с использованием антител к Ki-67 (меченых FITC, Dako). Субпопуляции CD4+ или CD8+ Т-клеток маркировали следующим образом: наивные Т-клетки (CD28+/CD95-), центральные Т-клетки памяти (CD28+/CD95+), эффекторные Т-клетки памяти (CD28-/CD95+).

Образцы крови забирали в пробирки с ЭДТА натрия и затем эритроциты лизировали с помощью лизирующего буфера, содержащего хлорид аммония. Оставшиеся лейкоциты отмывали в буфере FACS (ФСБ с 2% FBS) и окрашивали смесью антител (таблица 7) в течение 30 минут при 4°C. После окрашивания клетки отмывали и фиксировали в стабилизирующем фиксирующем буфере 1×BD Stabilizing Fixative. Сбор данных в потоке проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR Fortessa. Анализ данных проводился с помощью программы FloJo. Т-клетки определяли как CD3+CD14/CD20- лимфоциты.

Таблица 7. Перечень антител, используемых для иммунофенотипирования Т-клеток методом проточной цитометрии

Антитело	Флуорохром	Клон	Компания
CD3	APC-Cy7	SP34-2	BD Biosciences
CD4	BV786	L200	BD Biosciences
CD8	BUV395	RPA-T8	BD Biosciences
CD14	PerCP-Cy5.5	M5E2	BD Biosciences
CD20	PerCP-Cy5.5	2H7	eBioscience
CD28	PE-Cy7	CD28.2	eBioscience
CD45RA	APC	2H4LDH11LDB9	Beckman Coulter
CD95	BV605	DX2	Biolegend
CCR7 (CD197)	BV421	G043H7	Biolegend
OX40 (CD134)	PE	L106	BD Biosciences

Результаты.

1: Экспансия стволовых Т-клеток памяти после трансплантации

В модели острой болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) на нечеловекообразных приматах аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) приводит к ранней экспансии стволовых Т-клеток памяти CD4 и CD8 (Tscm-клетки: CD45RA+CCR7+CD95+) за счет восстановления истинных наивных Т-клеток (Tn-клетки: CD45RA+CCR7+CD95-) (рисунок 3). Данные Tscm-клетки циркулируют в крови, а также локализуются в лимфоидных (лимфатических узлах, селезенке) и в нелимфоидных органах (легких, печени и толстой кишке).

2: 2D10 IgG4PE ограничивает экспансию Tscm

Применение блокирующего антитела к OX40L, 2D10 IgG4PE, приводит к увеличению выживаемости у животных после аллогенной ТГСК и снижает выраженность

клинических симптомов острой БТПХ. Это замедление прогрессирования БТПХ было связано с ограниченной экспансией CD4+ Tscm-клеток и сохранением CD4+ Tn-клеток (рисунок 4).

3: Экспрессия OX40 на поверхности CD4 Tscm-клеток

Как показано на рисунке 5, CD4+ Tscm-клетки экспрессируют на своей поверхности OX40, чего не наблюдается в случае наивных Т-клеток. Кроме того, уровень экспрессии OX40 на CD4+ Tscm-клетках был сопоставим с таковым на центральных Т-клетках памяти (Tcm-клетках). Важно отметить, что экспрессия OX40 на CD4+ Tscm-клетках обнаруживалась повсеместно. Эти клетки обнаруживаются у ранее не получавших лечение обезьян перед трансплантацией (как в крови, так и в лимфоидных органах), а также в продуктах лейкофереза. Такая экспансия также отмечается у реципиентов ГСК после аллогенной трансплантации через продолжительное время.

4: Сравнительный анализ Tscm-клеток у животных, получавших антитело 02D10 Ig4PE, по сравнению со стандартной терапией БТПХ

Доля Tscm-клеток после ТГСК, отмечавшихся в периферической крови макак-резус, которые получали антитело 02D10 IgG4PE, сравнивали с Tscm-клетками из отдельных групп животных, получавших сиролимус (рапамицин) или такролимус в комбинации с метотрексатом (Так/МТТ). Результаты определения CD4+ Tscm-клеток показаны на рисунке 6a, а результаты определения CD8+ Tscm-клеток показаны на рисунке 6b. Данные свидетельствуют о том, что лечение антителом 02D10 IgG4PE к OX40L приводит к стойкому уменьшению доли Tscm-клеток в сравнении с лечением сиролимусом и Так/МТТ.

Выводы:

Субпопуляция OX40-экспрессирующих Tscm-клеток может быть чувствительна к блокированию OX40L, опосредованному 2D10 IgG4PE. Это блокирование может контролировать экспансию Tscm-клеток и ограничивать таким образом прогрессирование острой БТПХ. Сигнальный путь OX40 является потенциально новым механизмом в регуляции Tscm-клеток, который может использоваться в клинической практике для лечения иммуномодулированных заболеваний или улучшения результатов адаптивной иммунотерапии.

Химеризм

Химеризм в популяциях клеток периферической крови или Т-клеток (CD3+/CD20-) определяли с использованием различных для донора специфичных для реципиента микросателлитных маркеров, ассоциированных с MHC, путем сравнения высоты пиков для ампликонов донора и реципиента (Penedo MC et al., (2005) "Microsatellite typing of the rhesus macaque MHC region", Imunogenetics 57:198-209).

Таблица 5

Стадия	Кожа	Печень (билирубин)	ЖКТ
0	Сыпь, связанная с БТПХ, отсутствует	< 4-кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем	Диарея отсутствует
1	Сыпь, охватывающая < 25% площади поверхности тела	4-кратное - 8-кратное увеличение уровня	Легкая диарея
2	Сыпь, охватывающая 25-50% площади поверхности тела	8-кратное - 20-кратное увеличение уровня	Умеренная диарея
3	Сыпь, охватывающая >50% площади поверхности тела	20-кратное - 50--кратное увеличение уровня	Тяжелая диарея
4	Генерализованная эритродермия с образованием пузырей	> 50-кратное увеличение уровня	Очень тяжелая диарея

Всего для ТГСК было отобрано шесть животных. Из этих 6 животных в ходе двух экспериментов произошел технический сбой, у одного животного наблюдалась реактивация вирусной инфекции, которая могла препятствовать приживлению, и было отмечено, что степень донорского химеризма изначально увеличивалась, но затем снижалась, что свидетельствует о том, что вторичная реконституция представляла собой восстановление популяции аутологичных клеток. Зарегистрированный однократно высокий уровень антител к цитомегаловирусу (ЦМВ) и лимфокриптовирусу макак-резус (rhLCV) наблюдался одновременно со снижением степени химеризма и размера популяции аутологичных клеток. Вторая техническая ошибка была результатом ошибки при анализе на аппарате для сепарации компонентов крови, позволяющем получить пригодный для трансплантации продукт. Поскольку животное-реципиент уже подвергалось облучению, оно должно было быть умерщвлено. Все остальные четыре животных выжили, достигнув первичной конечной точки длительностью 15 дней, демонстрируя увеличение выживаемости по сравнению с историческим контролем и одновременно исследуемым контролем без профилактики. Краткая информация о каждом животном в этом исследовании приведено ниже в таблице 6.

Пример 8

Фармакокинетика

Макаки-резус получали 10 мг/кг 2D10 или подходящего нефункционального антитела контрольного изотипа на 0-й день. Забор образцов проводился через +15 минут, +1 час, +8 часов, +24-36 часов, +72 часа, +96 часов, +8-й день, +11-й день, +15-й день, +18-й день, +22-й день, +25-й день. На 29-й день животным вводили 3 мг/кг 2D10 или соответствующего нефункционального антитела контрольного изотипа. Забор образцов проводился на 29-й день через +15 минут, +1 час, +8 часов, и затем через 24-36 часов после 29-го дня. Забор образцов продолжали выполнять на +32-й день, +33-й день, +36-й день, +39-й день, +43-й день, +46-й день, +50-й день, +53-й день, +57-й день, +60-й день, +64-й день, +67-й день и +71-й день.

Для определения ФК античеловеческое антитело IgG разводят до концентрации 8 мкг/мл в ФСБ и адсорбируют на 96-луночных планшетах с низким уровнем

аутофлуоресценции, с высоким связыванием белка (Costar), в течение суток при 4°C. Избыток IgG удаляют путем отмывки в ФСБ, содержащем поверхностно-активное вещество Tween, и лунки инкубируют в 5% мас./об. обезжиренном молоке (блокирующий буфер) в течение 1 часа при комнатной температуре. После периода инкубации планшеты отмывают. Образцы плазмы разводят блокирующим буфером (многократное последовательное разведение). Стандартную кривую также получают путем титрования положительного контрольного антитела к OX40L, разведенного в блокирующем буфере из 10 мк /мл (разведение 1 к 3). Титр антител или образец разведенной плазмы добавляют в планшет и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты отмывают и биотинилированный человеческий OX40L разводят до концентрации 500 нг/мл в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты отмывают и добавляют конъюгат стрептавидин-европий3+ (DELFIA®-детекция, PerkinElmer), разведенный в буферном растворе для анализа DELFIA® (Perkin Elmer). Затем планшеты отмывают 3 раза трис-буферным солевым раствором, содержащим 0,1% поверхностно-активного вещества tween. После этого усиливающий раствор DELFIA Enhancement solution (Perkin Elmer) добавляют в планшет и измеряют флюоресценцию с временным разрешением при длине волны 615 нм на планшетном анализаторе Envision (PerkinElmer). Концентрацию антител к OX40L в плазме рассчитывают путем экстраполяции значений флюоресценции в лунках с образами на значения, полученные с помощью стандартной кривой, полученной при титровании положительного контрольного антитела к OX40L, с использованием логистического подбора кривой с 4 параметрами.

Пример 9

Модель БТПХ на макаках-резус: влияние комбинированной профилактики 2D10 IgG4PE и рапамицином

Еще одно исследование БТПХ у макак-резус было проведено для определения влияния комбинированной профилактики 2D10 IgG4PE и рапамицином после ТГСК. Исследование проводилось, как описано в Примере 7, по следующей схеме: 2D10 IgG4PE вводили в/в в концентрации 10 мг/кг на -2-й день, +5-й день, +12-й день, +19-й день, +26-й день, +33-й день, +40-й день, +47-й день +56-й день после трансплантации. Рапамицин вводили в нагрузочной дозе 0,1 мг/кг в/м на -14-й день, а затем в поддерживающей ежедневной дозе 0,025 мг/кг до запланированного окончания исследования на +100-й день. Доза рапамицина корректировалась для поддержания минимальных уровней в сыворотке в диапазоне 5-15 нг/мл.

Результаты:

Применение 2D10 IgG4PE совместно с рапамицином приводило к увеличению выживаемости на фоне отсутствия БТПХ и увеличению абсолютной выживаемости (медиана времени выживаемости, MBB >82 дней, n=3) по сравнению с данными исторического контроля у животных, которые не получали экспериментальное лечение после ТГСК (MBB=8 дней, n=4, Furlan et al, Science Translational Medicine, Vol 7 (315); 315ra1910). Эффект комбинированного применения 2D10 IgG4PE и рапамицина также выше, чем суммарный эффект этих соединений при применении отдельно (Фигура 7: MBB при применении 2D10 IgG4PE и рапамицина после ТГСК составляло 19 и 17 дней соответственно; в обоих случаях n-4). Отмечено, что Furlan et al. приводят данные MBB при комбинированной профилактике такролимусом и метотрексатом, составляющей 49 дней. Ожидается, что комбинированное применение такролимуса и метотрексата совместно с антителом к OX40L (например, 2D10) или даже комбинированное применение такролимуса и антитела к OX40L (например, 2D10) также обеспечит

синергический эффект, отмечающийся в данном Примере.

Таблица 4

Животное No.	Животное ID	Продолжительность выживания (дни)	Химеризация цельной крови (%)																
			Сутки 0	Сутки 1	Сутки 4	Сутки 5	Сутки 6	Сутки 7	Сутки 8	Сутки 11	Сутки 12	Сутки 14	Сутки 15	Сутки 16	Сутки 18	Сутки 20	Сутки 21	Сутки 23	Сутки 26
(#1)	(13189)	(24)	0		6,6			27,5		90,4		81,8			19,7				
#2	14079	16	0	5,7		31,7			66,3		82,3		88,2	79,8					
(#3)	(14075)	(0)																	
#4	14081	26		22,9		68,2			82,9		92,1		97,5			98,4	98,7	98,8	98,7
#5	14082	22				91,4			98,4		98,6		99,1			99,2		98,6	
#6	14087	16		16,6		66,3			97,4		99,5		99,4						

Данные в скобках указывают на экспериментальную ошибку из-за инфекции (Животное 1) или технического сбоя (Животное 3).

Таблица 6

Исследование влияния 2D10 IgG4PE на БТПХ на макаках-резус	
Животное	**Подробности**
#1	Выживаемость до 24 суток. Получали 4 дозы 2D10 IgG4PE. Двухфазное восстановление гемопоэза; данные химеризма донорной периферической крови указывают на первоначальное приживление, за которым следует популяция аутологичных клеток, одновременно с признаками ЦМВ и rhLCV инфекции. Вирусная инфекция считается возможной причиной отторжения трансплантата. Записано как техническая ошибка.
#2	Выживаемость до 16 суток. Получали 3 дозы 2D10 IgG4PE. Пик химеризации донорной периферической крови 88% на 15 сутки. Нет доказательств CMV или rhLCV инфекции. Исследование прекратилось по ветеринарному совету из-за раны на участке катетера (не считалось лечением или связанной с БТПХ). БТПХ постановка при вскрытии: кожа 1 (сыпь <25%); печень 0 (без билирубина); GI 0 (нет диареи).
#3	Записано как технический сбой. Неисправность оборудования афереза привела к резкому субоптимальному продукту донорской крови.
#4	Выживаемость до 26 суток. Получали 4 дозы 2D10 IgG4PE. Чистое восстановление гемопоэза с пиком химеризации донорной периферической крови на 99% на 23 сутки. Никаких признаков заражения ЦМВ или rhLCV инфекции. Исследование прекратилось по ветеринарному совету из-за отека мошонки. БТПХ постановка при вскрытии: кожа 2 (сыпь 25-50%); печень 0 (без билирубина); GI 0 (нет диареи). Полное вскрытие подтвердило отсутствие открытого висцерального БТПХ.
#5	Выживание до 22 суток. Получали 4 дозы 2D10 IgG4PE. Чистое восстановление гемопоэза с пиком химеризации донорной периферической крови на 99% нв 12 суки. Никаких признаков заражения ЦМВ или rhLCV инфекции. Исследование прекратилось из-за устойчивого низкого количества тромбоцитов с высоким риском

Исследование влияния 2D10 IgG4PE на БТПХ на макаках-резус	
Животное	**Подробности**
	кровотечения и развития признаков острой системной БТПХ. БТПХ постановка при вскрытии: кожа 3 (сыпь> 50%); печень 1 (высота 4-8 х билирубина); GI 3 (тяжелая диарея).
#6	Выживание до 16 суток. Получали 3 дозы 2D10 IgG4PE. Чистое восстановление гемопоэза с пиком химеризации донорной периферической крови на 100% на 12 сутки. Отсутствие признаков ЦМВ или rhLCV инфекции. БТПХ постановка при вскрытии: кожа 2 (сыпь 25-50%); печень 1 (высота 4-8 х билирубина); GI 2 (умеренная диарея).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Kymab Limited
<120> АНТИТЕЛА, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ
<130> KYMBT/P60284PC
<140> GBPCT/GB2016/050565
<141> 2016-03-03
<150> US14/955843
<151> 2015-12-01
<150> US14/935937
<151> 2015-11-09
<150> GB1516008.8
<151> 2015-09-09
<150> US14/811163
<151> 2015-07-28
<150> US14/700896
<151> 2015-04-30
<150> PCT/GB2015/050614
<151> 2015-03-03
<160> 234
<170> BiSSAP 1.3.6
<210> 1
<211> 384
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 1

gaggtgcaac tggtggagtc tgggggagtc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttatatta tgacttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtgg tacatactac 180
gcagactcca tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgg 300
ttaggtccga ttactttggt tcgggggggc tattactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 2
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val 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
Ile Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
    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 Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asp Arg Leu Gly Pro Ile Thr Leu Val Arg Gly Gly Tyr Tyr
            100                 105                 110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 3

```
ggattcacct ttagcagtta tatt                                          24
```

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 4

```
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile
1               5
```

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 5

```
attagtggta gtggtggtgg taca                                          24
```

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 6

```
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1               5
```

<210> 7

<211> 63
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 7
gcgaaagatc ggttaggtcc gattactttg gttcgggggg gctattacta cggtatggac 60
gtc 63
<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 8
Ala Lys Asp Arg Leu Gly Pro Ile Thr Leu Val Arg Gly Gly Tyr Tyr
1 5 10 15
Tyr Gly Met Asp Val
20
<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 9
agttatatta tgact 15
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 10
Ser Tyr Ile Met Thr
1 5
<210> 11
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 11
ggtattagtg gtagtggtgg tggtacatac tacgcagact ccatgaaggg c 51
<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 12
Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Met Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 13
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 13
gatcggttag gtccgattac tttggttcgg gggggctatt actacggtat ggacgtc 57

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 14
Asp Arg Leu Gly Pro Ile Thr Leu Val Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val
<210> 15
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 15
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc gactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagttcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccgtcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcggac gttcggccaa 300
gggaccaggg tggaaatcaa a 321
<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 16
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 Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe 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 Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 17
cagagcatta gcgactat 18
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 18
Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
1 5
<210> 19
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 19
gctgcatcc 9
<210> 20
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 20
Ala Ala Ser
1
<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 21
caacagagtt acagtacccc tcggacg 27
<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 22
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 23
cgggcaagtc agagcattag cgactattta aat 33
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 24
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 25
gctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 26
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 27
caacagagtt acagtacccc tcggacg 27
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 28
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 29
<211> 1365
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 29
gaggtccagc tcgtggaaag cggaggagtg ctcgtgcagc ctggaggcag cctcaggctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctacatca tgacctgggt gaggcaggct 120
cccggaaaag gcctggagtg ggtgtccggc atctccggat ccggaggagg cacatactac 180
gccgacagca tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca atagcaagaa taccctctac 240
ctgcaaatga acagcctgcg ggtggaggat accgccgtgt actactgcgc caaagatagg 300
ctgggcccca ttaccctcgt gaggggaggc tattactacg gcatggatgt gtggggccag 360
ggcaccaccg tgacagtgtc cagcgccagc accaagggcc cttccgtgtt ccccctggcc 420
ccttgcagca ggagcacctc cgaatccaca gctgccctgg gctgtctggt gaaggactac 480
tttcccgagc ccgtgaccgt gagctggaac agcggcgctc tgacatccgg cgtccacacc 540
tttcctgccg tcctgcagtc ctccggcctc tactccctgt cctccgtggt gaccgtgcct 600
agctcctccc tcggcaccaa gacctacacc tgtaacgtgg accacaaacc ctccaacacc 660
aaggtggaca aacgggtcga gagcaagtac ggccctccct gccctccttg tcctgccccc 720
gagttcgaag gcggacccag cgtgttcctg ttccctccta agcccaagga caccctcatg 780
atcagccgga cacccgaggt gacctgcgtg gtggtggatg tgagccagga ggaccctgag 840
gtccagttca actggtatgt ggatggcgtg gaggtgcaca acgccaagac aaagccccgg 900
gaagagcagt tcaactccac ctacagggtg gtcagcgtgc tgaccgtgct gcatcaggac 960
tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtcagcaata agggactgcc cagcagcatc 1020
gagaagacca tctccaaggc taaaggccag ccccgggaac ctcaggtgta caccctgcct 1080
cccagccagg aggagatgac caagaaccag gtgagcctga cctgcctggt gaagggattc 1140
taccccttccg acatcgccgt ggagtgggag tccaacggcc agcccgagaa caattataag 1200
accacccctc ccgtcctcga cagcgacgga tccttctttc tgtactccag gctgaccgtg 1260
gataagtcca ggtggcagga aggcaacgtg ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg 1320
cacaatcact acacccagaa gtccctgagc ctgtccctgg gaaag 1365

<210> 30
<211> 455
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 30

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val 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
Ile Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
    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 Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asp Arg Leu Gly Pro Ile Thr Leu Val Arg Gly Gly Tyr Tyr
            100                 105                 110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
    130                 135                 140
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
        195                 200                 205
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240
Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
    290                 295                 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
                325                 330                 335
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
```

340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

<210> 31
<211> 642
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 31
gacatccaga tgacccagtc cccttcctcc ctgtccgcct ccgtgggaga cagggtgacc 60
atcacctgcc gggccagcca gtccatcagc gactacctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ctaagttcct gatctacgcc gcttcctccc tgcagtccgg agtgcccagc 180
aggttttccg gctccggatc cggcaccgac ttcaccctga ccgtgtccag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agctacagca cccccaggac atttggccag 300
ggcacccggg tggagatcaa gaggaccgtc gctgcccccc ccgtgtttat cttccccccc 360
agcgacgagc agctgaaatc cggcaccgcc tccgtggtct gcctgctgaa taacttctac 420
cctcgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg aaactcccag 480
gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac tccacatact ccctgtcctc caccctgaca 540
ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga 600
ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 32
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 Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe 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 Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 33

gaggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGTC cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacttttagc aactatgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagcggaa gtggtggtgc cacaaggtat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccata tccagagaca attccaggaa cacggtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccgttt tttactgtac gaaagatcgg 300
ctcattatgg ctacggttcg gggaccctat tactacggta tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 34
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 34

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

115 120 125

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 35
ggattcactt ttagcaacta tgcc 24
<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 36
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5
<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 37
attagcggaa gtggtggtgc caca 24
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 38
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr
1 5
<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 39
acgaaagatc ggctcattat ggctacggtt cggggaccct attactacgg tatggacgtc 60
<210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 40
Thr Lys Asp Arg Leu Ile Met Ala Thr Val Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15
Gly Met Asp Val
20
<210> 41
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 41
aactatgcca tgaac 15

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 42
Asn Tyr Ala Met Asn
1 5
<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 43
actattagcg gaagtggtgg tgccacaagg tatgcagact ccgtgaaggg c 51
<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 44
Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 45
<211> 54
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 45
gatcggctca ttatggctac ggttcgggga ccctattact acggtatgga cgtc 54
<210> 46
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 46
Asp Arg Leu Ile Met Ala Thr Val Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15
Asp Val
<210> 47
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 47
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgagacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtcacagtg tctcattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321
<210> 48
<211> 107

<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 48
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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu 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 Glu 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 Ser His Ser Val Ser Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 49
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 49
cagagcatta gcagctat 18
<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 50
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5
<210> 51
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 51
gctgcatcc 9
<210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 52
Ala Ala Ser
1
<210> 53
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 53

caacagagtc acagtgtctc attcact 27

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 54
Gln Gln Ser His Ser Val Ser Phe Thr
1 5

<210> 55
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 55
cgggcaagtc agagcattag cagctattta aat 33

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 56
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 57
gctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 58
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 59
caacagagtc acagtgtctc attcact 27

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 60
Gln Gln Ser His Ser Val Ser Phe Thr
1 5

<210> 61

<211> 1362
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 61

gaagtgcaac tggtggagtc cggaggaggc ctggtgcagc ctggaggaag cctgaggctg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aactacgcca tgaactgggt gaggcaggcc 120
cctggcaagg gactggagtg ggtctccacc atcagcggct ccggaggcgc tacacggtac 180
gccgatagcg tgaagggccg gtttaccatt tcccgggaca actcccggaa caccgtgtac 240
ctccagatga acagcctgag ggtggaggat accgccgtgt tctactgcac caaggacagg 300
ctgattatgg ccaccgtgag gggaccttac tactatggca tggatgtgtg gggccagggc 360
acaaccgtca ccgtgtcctc cgcctccacc aagggaccta gcgtgttccc tctcgccccc 420
tgttccaggt ccacaagcga gtccaccgct gccctcggct gtctggtgaa agactacttt 480
cccgagcccg tgaccgtctc ctggaatagc ggagccctga cctccggcgt gcacacattt 540
cccgccgtgc tgcagagcag cggactgtat agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc 600
tccagcctcg gcaccaaaac ctacacctgc aacgtggacc acaagccctc caacaccaag 660
gtggacaagc gggtggagag caagtacggc ccccccttgcc ctccttgtcc tgcccctgag 720
ttcgagggag gaccctccgt gttcctgttt ccccccaaac ccaaggacac cctgatgatc 780
tcccggacac ccgaggtgac ctgtgtggtc gtggacgtca gccaggagga ccccgaggtg 840
cagttcaact ggtatgtgga cggcgtggag gtgcacaatg ccaaaaccaa gcccagggag 900
gagcagttca attccaccta cagggtggtg agcgtgctga ccgtcctgca tcaggattgg 960
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg gactgcccag ctccatcgag 1020
aagaccatca gcaaggctaa gggccagccg agggagcccc aggtgtatac cctgcctcct 1080
agccaggaag agatgaccaa gaaccaagtg tccctgacct gcctggtgaa gggattctac 1140
ccctccgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatggccagc ccgagaacaa ctacaaaaca 1200
acccctcccg tgctcgatag cgacggcagc ttctttctct acagccggct gacagtggac 1260
aagagcaggt ggcaggaggg caacgtgttc tcctgttccg tgatgcacga ggccctgcac 1320
aatcactaca cccagaagag cctctccctg tccctgggca ag 1362

<210> 62
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 62

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

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
130 135 140
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
195 200 205
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220
Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
325 330 335
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 63
<211> 642
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 63
gacatccaga tgacccagtc cccttcctcc ctgagcgcta gcgtgggaga tagggtgacc 60

atcacctgca gggcctccca aagcatctcc tcctacctga actggtacca gcagaaaccc 120
ggcaaggccc ccaacctgct gatctacgct gcctcctccc tccagtccgg cgtgcctagc 180
aggtttagcg gctccggaag cgagaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcaa tcccacagcg tgtccttcac cttcggcccc 300
ggcaccaagg tggacatcaa gaggaccgtg gccgcccccc ccgtgttcat ctttcccccc 360
tccgatgaac agctgaagag cggcaccgct agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagtccgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctaca gcctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaaa gtgtacgcct gcgaagtgac ccatcagggc 600
ctgagctccc ccgtgaccaa gtcctttaac aggggcgagt gc 642

<210> 64
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 64

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu 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 Glu 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 Ser His Ser Val Ser Phe
85 90 95
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
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 65
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 65

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctcgatt caccctcagt gactactaca tgacctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtaatac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
agtgggagct actgggacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 66

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

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 67

cgattcaccc tcagtgacta ctac 24

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 68

Arg Phe Thr Leu Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 69

attagtagta gtggtaatac cata 24

<210> 70

<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 70
Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile
1 5
<210> 71
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 71
gcgagagatc tgagtgggag ctactgggac tactactacg gtatggacgt c 51
<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 72
Ala Arg Asp Leu Ser Gly Ser Tyr Trp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val
<210> 73
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 73
gactactaca tgacc 15
<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 74
Asp Tyr Tyr Met Thr
1 5
<210> 75
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 75
tacattagta gtagtggtaa taccatatac tacgcagact ctgtgaaggg c 51
<210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 76
Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 77

<211> 45
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 77
gatctgagtg ggagctactg ggactactac tacggtatgg acgtc 45
<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 78
Asp Leu Ser Gly Ser Tyr Trp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15
<210> 79
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 79
gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcgcttgcc gggcaagtca gggcattaac aatgctttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 80
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Ala
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala 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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 81
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 81
cagggcatta acaatgct 18

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 82
Gln Gly Ile Asn Asn Ala
1 5
<210> 83
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 83
gatgcctcc 9
<210> 84
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 84
Asp Ala Ser
1
<210> 85
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 85
caacagttta atagttaccc tcggacg 27
<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 86
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5
<210> 87
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 87
cgggcaagtc agggcattaa caatgcttta gcc 33
<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 88
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Ala Leu Ala
1 5 10
<210> 89
<211> 21

<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 89
gatgcctcca gtttggaaag t 21
<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 90
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 91
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 91
caacagttta atagttaccc tcggacg 27
<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 92
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5
<210> 93
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 93
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGTC ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgaagg tgggacaaca 180
gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gattttctat ggttcgggga gttccctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369
<210> 94
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala

50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Asp Phe Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 95
ggattcactt tcagtaacgc ctgg 24

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 96
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
1 5

<210> 97
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 97
attaaaagca aaactgaagg tgggacaaca 30

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 98
Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr
1 5 10

<210> 99
<211> 42
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 99
accacagatt ttctatggtt cggggagttc ccttttgact ac 42

<210> 100
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 100
Thr Thr Asp Phe Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 101
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 101
aacgcctgga tgagc 15
<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 102
Asn Ala Trp Met Ser
1 5
<210> 103
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 103
cgtattaaaa gcaaaactga aggtgggaca acagactacg ctgcacccgt gaaaggc 57
<210> 104
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 104
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 105
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 105
gattttctat ggttcgggga gttccctttt gactac 36
<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 106
Asp Phe Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 107
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 107
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaaattc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 108
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 108

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 Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 109
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 109

cagggcatta gcaattat 18

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 110

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 111

gctgcatcc 9

<210> 112
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 112

Ala Ala Ser
1

<210> 113
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 113
caaaagtata acagtgcccc tcggacg 27
<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 114
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr
1 5
<210> 115
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 115
cgggcgagtc agggcattag caattattta gcc 33
<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 116
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 117
gctgcatcca ctttgcaatc a 21
<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 118
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 119
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 119
caaaagtata acagtgcccc tcggacg 27
<210> 120
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo Sapiens
<400> 120
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr
1 5
<210> 121
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 121
gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981
<210> 122
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 122
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
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
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
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
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
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
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
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
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 123
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 123

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccgtgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 124

<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 124

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
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
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
180 185 190
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
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
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
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
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
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 125
<211> 981

<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 125
gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981
<210> 126
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 126
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
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
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

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

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

Lys 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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 127
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 127

gcctccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacggccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccagt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcgcctgaat ttgaggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtca tcgatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggatcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 128
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 128

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
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
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
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
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
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
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 129
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 129

gcctccacca agggacctag cgtgttccct ctcgcccccт gttccaggtc cacaagcgag 60
tccaccgctg ccctcggctg tctggtgaaa gactactttc ccgagcccgt gaccgtctcc 120
tggaatagcg gagccctgac ctccggcgtg cacacatttc ccgccgtgct gcagagcagc 180

ggactgtata gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagct ccagcctcgg caccaaaacc 240
tacacctgca acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagagc 300
aagtacggcc ccccttgccc tccttgtcct gcccctgagt tcgagggagg accctccgtg 360
ttcctgtttc cccccaaacc caaggacacc ctgatgatct cccggacacc cgaggtgacc 420
tgtgtggtcg tggacgtcag ccaggaggac cccgaggtgc agttcaactg gtatgtggac 480
ggcgtggagg tgcacaatgc caaaaccaag cccagggagg agcagttcaa ttccacctac 540
agggtggtga gcgtgctgac cgtcctgcat caggattggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtgt ccaacaaggg actgcccagc tccatcgaga agaccatcag caaggctaag 660
ggccagccga gggagcccca ggtgtatacc ctgcctccta gccaggaaga gatgaccaag 720
aaccaagtgt ccctgacctg cctggtgaag ggattctacc cctccgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaaaacaa cccctcccgt gctcgatagc 840
gacggcagct tctttctcta cagccggctg acagtggaca agagcaggtg gcaggagggc 900
aacgtgttct cctgttccgt gatgcacgag gccctgcaca atcactacac ccagaagagc 960
ctctccctgt ccctgggcaa g 981

<210> 130
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 130

gccagcacca agggcccttc cgtgttcccc ctggcccctt gcagcaggag cacctccgaa 60
tccacagctg ccctgggctg tctggtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgagc 120
tggaacagcg gcgctctgac atccggcgtc cacacctttc ctgccgtcct gcagtcctcc 180
ggcctctact ccctgtcctc cgtggtgacc gtgcctagct cctccctcgg caccaagacc 240
tacacctgta acgtggacca caaaccctcc aacaccaagg tggacaaacg ggtcgagagc 300
aagtacggcc ctccctgccc tccttgtcct gccccgagt tcgaaggcgg acccagcgtg 360
ttcctgttcc ctcctaagcc caaggacacc ctcatgatca gccggacacc cgaggtgacc 420
tgcgtggtgg tggatgtgag ccaggaggac cctgaggtcc agttcaactg gtatgtggat 480
ggcgtggagg tgcacaacgc caagacaaag ccccgggaag agcagttcaa ctccacctac 540
agggtggtca gcgtgctgac cgtgctgcat caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtca gcaataaggg actgcccagc agcatcgaga agaccatctc caaggctaaa 660
ggccagcccc gggaacctca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag ggattctacc cttccgacat cgccgtggag 780
tgggagtcca acggccagcc cgagaacaat tataagacca cccctcccgt cctcgacagc 840
gacggatcct tctttctgta ctccaggctg accgtggata agtccaggtg gcaggaaggc 900
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca atcactacac ccagaagtcc 960
ctgagcctgt ccctgggaaa g 981

<210> 131
<211> 981
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 131

gcctccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
agcacggccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccagt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcgcctccag ttgcgggggg accatcagtc 360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtca tcgatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
gacggatcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 132
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 132

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
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
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
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
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
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
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 133
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 133
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agtggagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cgcgggggca 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 134
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 134
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
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
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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala 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
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
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
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
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
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
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
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 135
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 135
cgtacggtgg ccgctccctc cgtgttcatc ttcccacctt ccgacgagca gctgaagtcc 60
ggcaccgctt ctgtcgtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag 120
tggaaggtgg acaacgccct gcagtccggc aactcccagg aatccgtgac cgagcaggac 180
tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag 240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag 300
tctttcaacc ggggcgagtg t 321
<210> 136
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 136
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
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
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
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 137
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 137
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggag 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgccgg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 138
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 138
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
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Asp Ser
50 55 60
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 Gly Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 139
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 139
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
cggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggag 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 140
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 140

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
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Arg Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Asp Ser
50 55 60
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
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 141
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 141

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaac tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 142
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 142

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
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 143
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 143
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcaac accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg c 321

<210> 144
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 144
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
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Asn 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
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 145
<211> 312
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 145
cccaaggcca accccacggt cactctgttc ccgccctcct ctgaggagct ccaagccaac 60
aaggccacac tagtgtgtct gatcagtgac ttctacccgg gagctgtgac agtggcttgg 120
aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga gtggagacga ccaaaccctc caaacagagc 180
aacaacaagt acgcggccag cagctacctg agcctgacgc ccgagcagtg gaagtcccac 240
agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa gggagcaccg tggagaagac agtggccccct 300
acagaatgtt ca 312

<210> 146

<211> 104
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 146

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

<210> 147
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 147

ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60
gccaacaagg ccacactagt gtgtctgatc agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctacag aatgttca 318

<210> 148
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 148

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

<210> 149
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 149
ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60
gccaacaagg ccacactagt gtgtctgatc agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctacag aatgttca 318
<210> 150
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 150
ggccagccta aggccgctcc ttctgtgacc ctgttccccc catcctccga ggaactgcag 60
gctaacaagg ccaccctcgt gtgcctgatc agcgacttct accctggcgc cgtgaccgtg 120
gcctggaagg ctgatagctc tcctgtgaag gccggcgtgg aaaccaccac cccttccaag 180
cagtccaaca acaaatacgc cgcctcctcc tacctgtccc tgaccctga gcagtggaag 240
tcccaccggt cctacagctg ccaagtgacc cacgagggct ccaccgtgga aaagaccgtg 300
gctcctaccg agtgctcc 318
<210> 151
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 151
ggccagccta aagctgcccc cagcgtcacc ctgtttcctc cctccagcga ggagctccag 60
gccaacaagg ccaccctcgt gtgcctgatc tccgacttct atcccggcgc tgtgaccgtg 120
gcttggaaag ccgactccag ccctgtcaaa gccggcgtgg agaccaccac accctccaag 180
cagtccaaca acaagtacgc cgcctccagc tatctctccc tgaccctga gcagtggaag 240
tcccaccggt cctactcctg tcaggtgacc cacgagggct ccaccgtgga aaagaccgtc 300
gcccccaccg agtgctcc 318
<210> 152
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 152
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 153
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 153
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctacag aatgttca 318

<210> 154
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 154
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 155
<211> 312
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 155
cccaaggctg ccccctcggt cactctgttc ccaccctcct ctgaggagct tcaagccaac 60
aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac ttctacccgg gagccgtgac agttgcctgg 120
aaggcagata gcagccccgt caaggcgggg gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc 180
aacaacaagt acgcggccag cagctacctg agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac 240
aaaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa gggagcaccg tggagaagac agttgccccct 300
acggaatgtt ca 312

<210> 156
<211> 104
<212> PRT

<213> Homo Sapiens
<400> 156

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

<210> 157
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 157

```
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa      60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccggggcc agtgacagtt     120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag gcgggggtgg agaccaccac accctccaaa     180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag     240
tcccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg     300
gcccctacgg aatgttca                                                   318
```

<210> 158
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 158

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

<210> 159
<211> 318

<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 159
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctacag aatgttca 318
<210> 160
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 160
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105
<210> 161
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 161
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctacag aatgttca 318
<210> 162
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 162
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 163
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 163
ggtcagccca aggctgcccc atcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgcctgatc agtgacttct acccgggagc tgtgaaagtg 120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaac acgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctgcag aatgttca 318

<210> 164
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 164
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45
Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
100 105

<210> 165
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 165
ggtcagccca aggctgcccc atcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcgta agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaag gtgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180

caaagcaaca acaagtatgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccgggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctgcag aatgctct 318

<210> 166
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 166

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

<210> 167
<211> 615
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 167

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgat 60
tacaaggatg acgacgataa gcgtatgaaa cagatcgaag ataaaattga agagatcttg 120
agcaaaatct atcatatcga aaacgaaatt gcgcgtatca aaaagctgat tggcgaacgt 180
ggcggtggca gcggtggcgg tagcggcggt ggcagccagg tgtcccaccg ataccccagg 240
atccagtcca tcaaggtcca gttcaccgag tacaaaaagg agaagggatt catcctgacc 300
tcccaaaagg aggacgagat catgaaggtg caaaacaact ccgtgatcat caactgcgac 360
ggcttctacc tgatctccct gaagggctac ttctcccagg aggtgaacat ctccctgcac 420
taccagaagg acgaggagcc cctgttccag ctgaagaagg tgaggtccgt gaattccctg 480
atggtggcca gcctgaccta caaggacaag gtctacctga acgtgaccac cgacaacacc 540
agcctggacg acttccatgt caacggcggc gagctgatcc tgatccatca gaaccccggc 600
gagttttgcg tcctg 615

<210> 168
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 168

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg Met Lys Gln Ile
20 25 30
Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn

35 40 45

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly Ser
50 55 60
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg
65 70 75 80
Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly
85 90 95
Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn
100 105 110
Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys
115 120 125
Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp
130 135 140
Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu
145 150 155 160
Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr
165 170 175
Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu
180 185 190
Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
195 200 205

<210> 169
<211> 615
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 169

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgat 60
tacaaggatg acgacgataa gcgtatgaaa cagatcgaag ataaaattga agagatcttg 120
agcaaaatct atcatatcga aaacgaaatt gcgcgtatca aaaagctgat tggcgaacgt 180
ggcggtggca gcggtggcgg tagcggcggt ggcagccagg tgtcccacca ataccccagg 240
atccagtcca tcaaggtcca gttcaccgag tacaaaaagg aggagggatt catcctgacc 300
tcccaaaagg aggacgagat catgaaggtg caaaacaact ccgtgatcat caactgcgac 360
ggcttctacc tgatctccct gaagggctac ttctcccagg aggtgaacat ctccctgcac 420
taccagaagg acgaggagcc cctgttccag ctgaagaagg tgaggtccgt gaattccctg 480
atggtggcca gcctgaccta caaggacaag gtctacctga acgtgaccac cgacaacacc 540
agcctggacg acttccatgt caacggcggc gagctgatcc tgatccatca gaaccccggc 600
gagttttgcg tcctg 615

<210> 170
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 170

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg Met Lys Gln Ile
20 25 30
Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn
35 40 45

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly Ser
50 55 60
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Ser His Gln Tyr Pro Arg
65 70 75 80
Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Glu Gly
85 90 95
Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn
100 105 110
Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys
115 120 125
Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp
130 135 140
Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu
145 150 155 160
Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr
165 170 175
Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu
180 185 190
Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
195 200 205

<210> 171
<211> 1332
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 171

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcctg 60
cattgcgtgg gcgacaccta tccctccaac gacaggtgct gccacgagtg caggcctgga 120
aacggcatgg tgagcaggtg cagccggtcc cagaataccg tgtgtaggcc ctgcggcccc 180
ggcttttaca acgacgtggt gtcctccaag ccctgcaagc cctgcacatg gtgcaacctg 240
cggtccggca gcgagaggaa gcagctctgc acagccaccc aggacaccgt ctgtaggtgt 300
agggctggca cccagcctct ggactcctac aagcccggcg tggattgtgc tccttgccct 360
cccggccatt tctcccctgg cgacaaccag gcttgcaagc cctggaccaa ctgtaccctg 420
gccggcaagc atacactgca gcctgcttcc aactcctccg acgctatctg cgaggatagg 480
gaccccccctg ccacacaacc ccaggagaca cagggccctc ctgctaggcc catcacagtc 540
caacccaccg aagcctggcc caggacatcc caaggccctt ccaccaggcc tgtggaagtg 600
cctggaggaa gggctgtggc cattgaaggt cgtatggatg aacccaagtc ctgcgacaag 660
acccacacct gtcccccttg tcctgcccct gaactgctgg gcggaccttc cgtgttcctg 720
ttcccccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccccgaagt gacctgcgtg 780
gtggtggatg tgtcccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840
gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt acaactccac ctaccgggtg 900
gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 960
gtgtccaaca aggccctgcc tgcccccatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020
ccccgggaac cccaggtgta cacactgccc cctagcaggg acgagctgac caagaaccag 1080
gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1140
tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1200
tcattcttcc tgtacagcaa gctgacagtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg 1260
ttctcctgct ccgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1320
ctgagccccct ga 1332

<210> 172
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 172

```
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1               5                  10                  15
Val His Ser Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg
            20                  25                  30
Cys Cys His Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser
        35                  40                  45
Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn
    50                  55                  60
Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu
65                  70                  75                  80
Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr
                85                  90                  95
Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro
            100                 105                 110
Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp
        115                 120                 125
Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His
    130                 135                 140
Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg
145                 150                 155                 160
Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg
                165                 170                 175
Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly
            180                 185                 190
Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ile
        195                 200                 205
Glu Gly Arg Met Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    210                 215                 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            260                 265                 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
```

340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 173
<211> 552
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 173

atggagaggg tgcagcccct cgaggagaac gtgggaaacg ccgccaggcc taggttcgag 60
aggaacaagc tgctgctggt ggcttccgtg atccaaggac tcggcctgct gctctgcttc 120
acctacatct gcctccactt cagcgccctg caggtgtccc accgataccc caggatccag 180
tccatcaagg tccagttcac cgagtacaaa aaggagaagg gattcatcct gacctcccaa 240
aaggaggacg agatcatgaa ggtgcaaaac aactccgtga tcatcaactg cgacggcttc 300
tacctgatct ccctgaaggg ctacttctcc caggaggtga acatctccct gcactaccag 360
aaggacgagg agcccctgtt ccagctgaag aaggtgaggt ccgtgaattc cctgatggtg 420
gccagcctga cctacaagga caaggtctac ctgaacgtga ccaccgacaa caccagcctg 480
gacgacttcc atgtcaacgg cggcgagctg atcctgatcc atcagaaccc cggcgagttt 540
tgcgtcctgt aa 552

<210> 174
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 174

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

```
        115                 120                 125
Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
    130                 135                 140
Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145                 150                 155                 160
Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
                165                 170                 175
Pro Gly Glu Phe Cys
            180
<210> 175
<211> 834
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 175
atgtgcgtgg gggctcggcg gctgggccgc gggccgtgtg cggctctgct cctcctgggc      60
ctggggctga gcaccgtgac ggggctccac tgtgtcgggg acacctaccc cagcaacgac     120
cggtgctgcc acgagtgcag gccaggcaac gggatggtga gccgctgcag ccgctcccag     180
aacacggtgt gccgtccgtg cgggccgggc ttctacaacg acgtggtcag ctccaagccg     240
tgcaagccct gcacgtggtg taacctcaga agtgggagtg agcggaagca gctgtgcacg     300
gccacacagg acacagtctg ccgctgccgg gcgggcaccc agcccctgga cagctacaag     360
cctggagttg actgtgcccc ctgccctcca gggcacttct ccccaggcga caaccaggcc     420
tgcaagccct ggaccaactg caccttggct gggaagcaca ccctgcagcc ggccagcaat     480
agctcggacg caatctgtga ggacagggac cccccagcca cgcagcccca ggagacccag     540
ggcccccggg ccaggcccat cactgtccag cccactgaag cctggcccag aacctcacag     600
ggaccctcca cccggcccgt ggaggtcccc gggggccgtg cggttgccgc catcctgggc     660
ctgggcctgg tgctggggct gctgggcccc ctggccatcc tgctggccct gtacctgctc     720
cggagggacc agaggctgcc ccccgatgcc cacaagcccc ctgggggagg cagtttccgg     780
acccccatcc aagaggagca ggccgacgcc cactccaccc tggccaagat ctga           834
<210> 176
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 176
Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1               5                   10                  15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
            20                  25                  30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
        35                  40                  45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
    50                  55                  60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65                  70                  75                  80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
                85                  90                  95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
            100                 105                 110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
```

115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 177
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 178
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 178

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

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

<210> 179
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 179

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

<210> 180
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Tyr Gly Thr Ser Glu Ala Asp Ser Val

50 55 60

Arg Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Thr
65 70 75 80
Leu His Leu Ser Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Glu His Thr Leu Gly Arg Pro Ser Arg Ser Gln Ile Asn Tyr
100 105 110
Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 181
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 181

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

<210> 182
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 182

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

100 105 110
Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 183
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 183
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Arg Phe Ile Ser Asn
20 25 30
Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Ala Phe
35 40 45
Val Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Ala Lys Ser Thr Val
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asp Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Ala Asp Gly Gly Ala Val Arg Asp Leu Thr Thr Asn Leu Pro
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 184
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 184
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ile Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Arg Ser Gly Ile Thr Thr Arg Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Pro Tyr Val Glu Gln Thr Leu Gly Leu Tyr Gln Thr Leu
100 105 110
Gly Pro Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 185
<211> 124
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 185
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30
Tyr Ala Lys Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
35 40 45
Val Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Ala Val Gly Gly Ala Thr Thr Val Thr Ala Ser Glu Trp Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 186
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 186
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30
Tyr Ala Lys Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
35 40 45
Val Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Ala Val Gly Gly Ala Thr Thr Val Thr Ala Ser Glu Trp Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 187
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 187
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

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

<210> 188
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 188

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

<210> 189
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 189

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Ala Val Gly Gly Ala Thr Thr Val Thr Ala Ser Glu Trp Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 190
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 190

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

<210> 191
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 191

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

<210> 192
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 192

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

<210> 193
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 193

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

<210> 194
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 194

```
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
```

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

<210> 195
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 195

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

<210> 196
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 196

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30
Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Ala Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 197
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 197

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

<210> 198
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 198

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 199
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 199

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

<210> 200
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 200

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

<210> 201
<211> 117
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 201
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30
Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 202
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 202
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30
Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 203
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 203
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

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

<210> 204
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 204

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

<210> 205
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 205

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

Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 206
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 206
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30
Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Lys Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 207
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 207
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30
Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Lys Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 208
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 208

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

<210> 209
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 209

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

<210> 210
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 210

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
```

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

<210> 211
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 211

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

<210> 212
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 212

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 Leu 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
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
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
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
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
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
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
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
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
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
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> 213
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 213

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 Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 214
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 214

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> 215
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 215

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> 216
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 216

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
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
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 217

<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 217

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> 218
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 218

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

<210> 219
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 219

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 Ala 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> 220
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 220

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> 221
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 221

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 Ser Tyr
20 25 30
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
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 222
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 222
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Arg Tyr
20 25 30
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
Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
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
<210> 223
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 223
Gln Lys Gln Leu Val Glu Phe 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 Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 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 Arg Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 224
<211> 104

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 224
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala 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 Tyr
20 25 30
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
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
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
<210> 225
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 225
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> 226
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 226
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

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
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 227
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 227
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> 228
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 228
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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 229
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 229

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 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
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
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
115

<210> 230
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 230

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> 231
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 231

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

<210> 232
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 232
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Met Tyr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 233
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 233
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Val Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Val Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ile Arg Gly Arg Gly Asn Phe Tyr Gly Gly Ser His Ala Met Glu Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 234
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 234

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

(57) Формула изобретения

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с человеческим OX40L (hOX40L) и ингибируют связывание hOX40L с человеческим OX40 (hOX40), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH-домен, который содержит:

HCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 36 или 42;

HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 38 или 44 и

HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40 или 46;

и где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VL-домен, который содержит:

LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 50 или 56;

LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 52 или 58; и

LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 54 или 60.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с hOX40L и ингибируют связывание hOX40L с hOX40 и содержат тяжелую и легкую цепи, где:

а) тяжелая цепь содержит VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 и

б) легкая цепь содержит VL-домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 или 2, которые содержат константную область гамма-4-цепи иммуноглобулина человека.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, которые содержат константную область тяжелой цепи, представляющую собой IgG4-PE.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, которые содержат константную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 128.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь каппа.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь каппа, содержащую константную область, выбранную из группы, состоящей из константной области легкой цепи каппа с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 136, 138, 140, 142 и 144.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 и 2, которые содержат первую и вторую копии указанного VH-домена.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 и 2, которые содержат первую и вторую копии указанного VL-домена.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 и 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полностью человеческое антитело.

11. Антитело по любому из пп. 1 и 2, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62, а аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 или 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом указанного hOX40L с Kd от 1 нМ до 10 пМ при оценке методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1 и 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с эпитопом OX40L макаки-резус с Kd от 10 нМ до 100 пМ при оценке методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

14. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-13 в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния.

15. Применение по п. 14, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

16. Способ лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта, включающий введение указанному человеку терапевтически эффективного количества антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-13.

17. Способ по п. 16, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

18. Способ связывания hOX40L путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-13.

19. Фармацевтическая композиция для связывания hOX40L, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, составленная для парентерального введения, выбранного из внутривенного или подкожного введения.

21. Комбинация для лечения и/или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 и дополнительное терапевтическое средство, выбранное из ингибитора mTOR и иммуносупрессанта, который модулирует передачу сигнала IL-2.

22. Комбинация по п. 21, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус).

23. Комбинация по п. 21, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

24. Применение комбинации по п. 21 для изготовления лекарственного средства для лечения и/или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния.

25. Применение по п. 24, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

26. Способ лечения или предотвращения OX40L-опосредованного заболевания или состояния у субъекта путем введения указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-13 в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, выбранным из ингибитора mTOR и иммуносупрессанта, который модулирует передачу сигнала IL-2.

27. Способ по п. 26, где дополнительное терапевтическое средство представляет собой рапамицин (сиролимус).

28. Способ по п. 26, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

29. Набор для лечения и/или предотвращения hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека, включающий фармацевтическую композицию по любому из пп. 19, 20 или комбинацию по любому из пп. 21, 22 и 23.

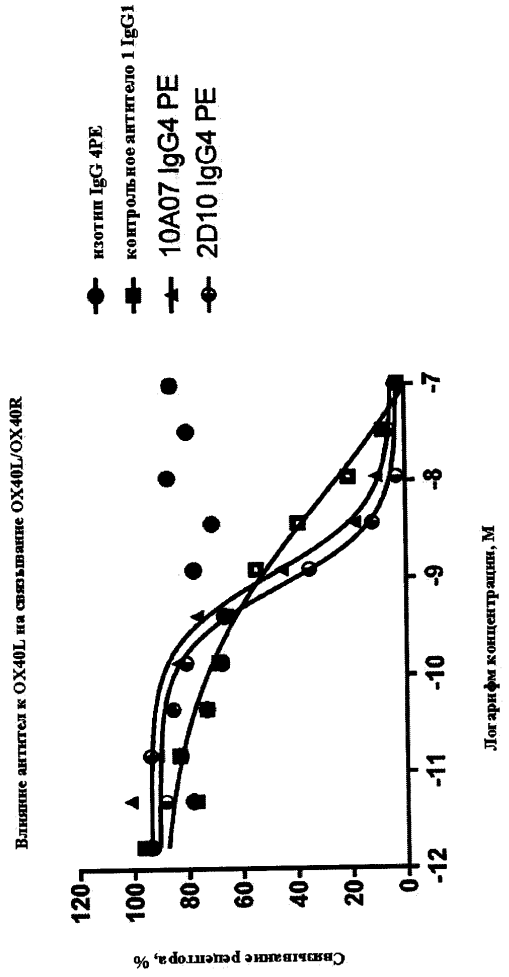
30. Набор по п. 29, содержащий этикетку или инструкции по применению для лечения и/или предотвращения указанного hOX40L-опосредованного заболевания или состояния у человека.

31. Набор по п. 29 или 30, где hOX40L-опосредованное заболевание или состояние выбрано из болезни «трансплантат против хозяина» и дерматита.

32. Набор по п. 30, где этикетка или инструкции содержат номер регистрационного удостоверения.

33. Набор по любому из пп. 30-32, который содержит устройство для внутривенного введения или инъекций, которое содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 или фармацевтическую композицию по п. 19.

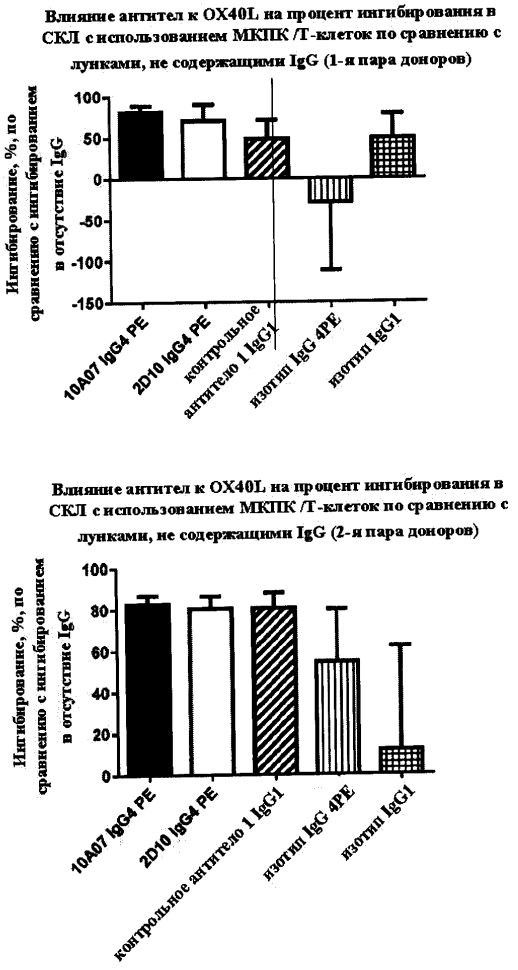
1


Влияние антител к OX40L на связывание OX40L/OX40R
изотип IgG 4PE
контрольное антитело 1 IgG1
10A07 IgG4 PE
2D10 IgG4 PE
Связывание рецептора, %
120
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Логарифм концентрации, М

Фиг. 1

2

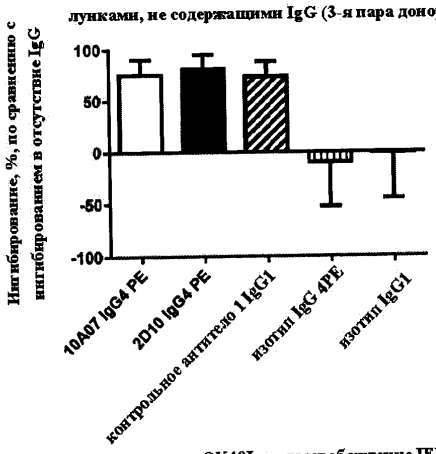
Фиг. 2


Влияние антител к OX40L на процент ингибирования в СКЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (1-я пара доноров)
Ингибирование, %, по сравнению с ингибированием в отсутствие IgG
100
50
0
-50
-100
-150
10A07 IgG4 PE
2D10 IgG4 PE
контрольное антителю 1 IgG1
изотип IgG 4PE
изотип IgG1
Влияние антител к OX40L на процент ингибирования в СКЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (2-я пара доноров)
Ингибирование, %, по сравнению с ингибированием в отсутствие IgG
100
80
60
40
20
0
10A07 IgG4 PE
2D10 IgG4 PE
контрольное антителю 1 IgG1
изотип IgG 4PE
изотип IgG1

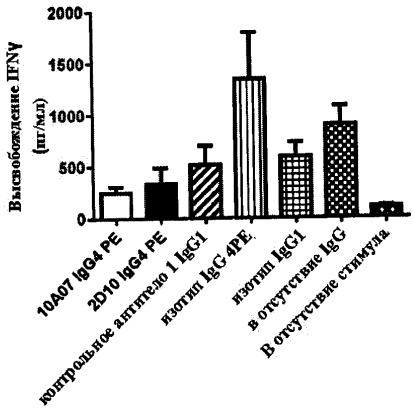
3

ФИГУРА 2 (продолжение)

Влияние антител к OX40L на процент ингибирования в СКЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (3-я пара доноров)



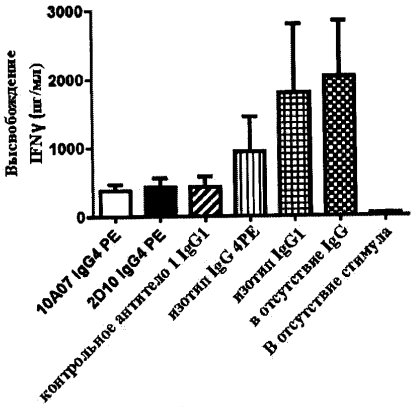
Влияние антитела к OX40L на высвобождение IFN-гамма в СРЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (1-я пара доноров)



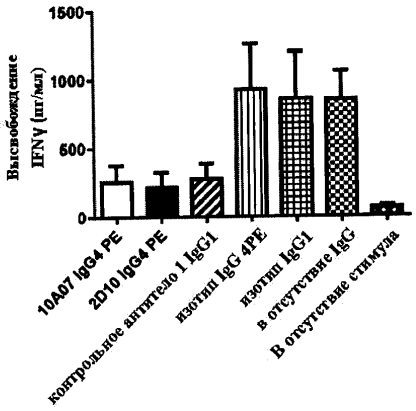
4

ФИГУРА 2 (продолжение)

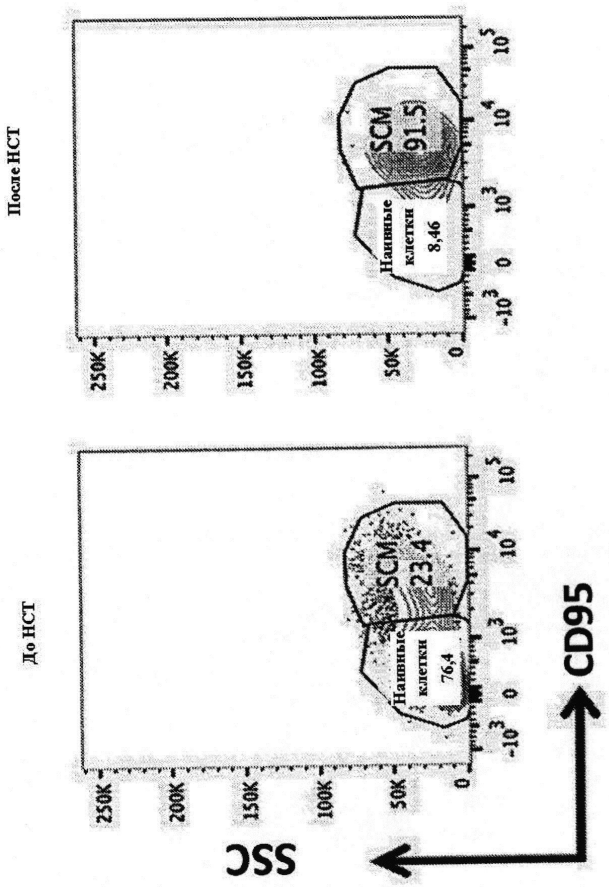
Влияние антитела к OX40L на высвобождение IFN-гамма в СРЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (2-я пара доноров)



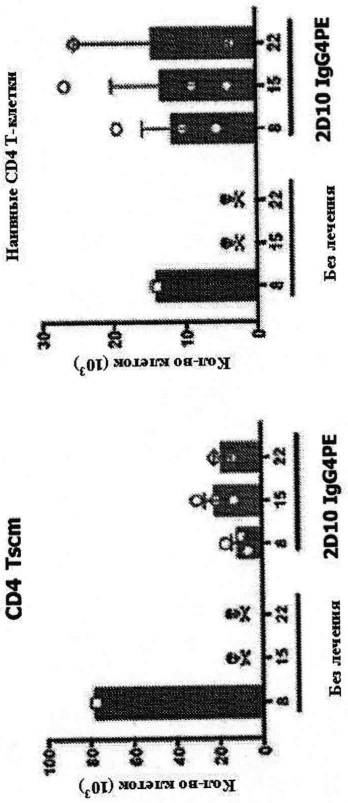
Влияние антитела к OX40L на высвобождение IFN-гамма в СРЛ с использованием МКПК /Т-клеток по сравнению с лунками, не содержащими IgG (3-я пара доноров)



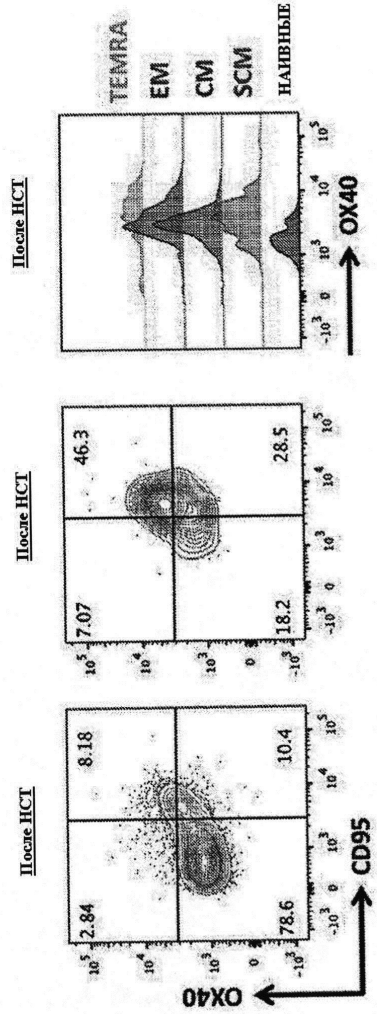
ФИГУРА 3


После НСТ
До НСТ
SSC
CD95
SCM
91.5
Наивные клетки
8.46
SCM
23.4
Наивные клетки
76.4
250K
200K
150K
100K
50K
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

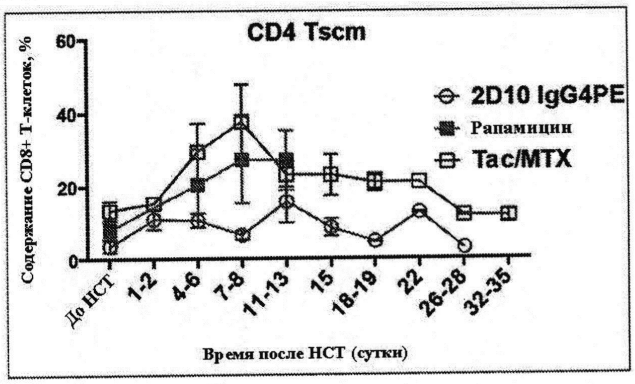
Фиг. 4


Наивные CD4 Т-клетки
Кол-во клеток (10^3)
0
10
20
30
4
15
22
Без лечения
8
15
22
2D10 IgG4PE
CD4 Tscm
Кол-во клеток (10^3)
0
20
40
60
80
100
8
15
22
Без лечения
8
15
22
2D10 IgG4PE

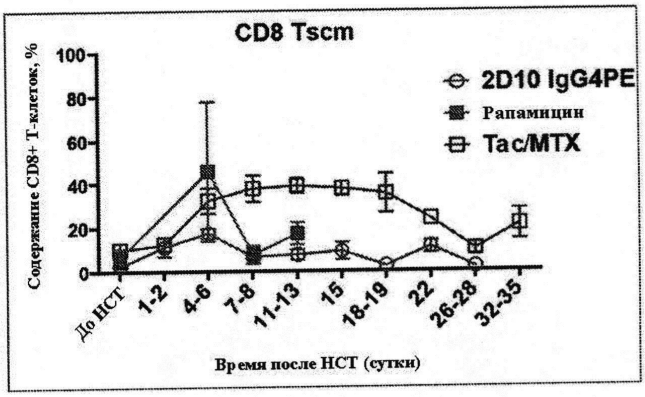
Фиг. 5


После НСТ
После НСТ
После НСТ
2.84
8.18
78.6
10.4
7.07
46.3
18.2
28.5
OX40
CD95
TEMRA
EM
CM
SCM
НАИВНЫЕ
OX40

Фиг. 6a



Фиг. 6b



9

Фиг. 7

Отсутствие симптомов БТПХ на 41-е сутки
Отсутствие симптомов БТПХ на 82-е сутки
Выживаемость в отсутствие БТПХ к 104-м суткам (конец протокола)
3
2
1
2D10 + Рапамицин (—)
2D10 (—)
Контрольная группа, не получавшая лечения (—)
Рапамицин * (- - -)
Выживание, %
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Сутки после трансплантации