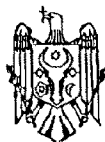




MD 4633 B1 2019.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4633** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2015 0102 (22) Data depozit: 2014.03.18 (31) Nr.: 13159794.0 (32) Data: 2013.03.18 (33) Țara: EP (41) Data publicării cererii: 2016.02.29, BOPI nr. 2/2016	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.06.30, BOPI nr. 6/2019 (85) 2015.10.12 (86) PCT/NL2014/050162, 2014.03.18 (87) WO 2014/148895 A1, 2014.09.25
(71) Solicitanți: BIOCEROX PRODUCTS B.V., NL; JANSSEN PHARMACEUTICALS INC., US (72) Inventatori: SIMONS Petrus Johannes, NL; BOON Louis, NL; LUO Jinquan, US; BREZSKI Randall, US; GOLDBERG Monica, US (73) Titulari: BIOCEROX PRODUCTS B.V., NL; JANSSEN PHARMACEUTICALS INC., US (74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila	

(54) Anticorpi umanizați anti-CD134 (OX40) și utilizarea acestora

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la anticorpi, care se leagă specific cu CD134 uman. Anticorpul anti-CD134 uman se leagă specific la domeniul extracelular al CD134 uman, inclusiv la domeniile de legare a ligandului non-OX40 (OX40L) al CD134 uman, care este exprimat, de exemplu, pe limfocitele T efectoare (Teff) CD4 și/sau CD8 umane activate uzual și pe limfocitele T reglatoare supresoare (Treg)

2

CD4 umane activate. Anticorpul anti-CD134 umanizat este util pentru tratamentul cancerului, de exemplu, pentru stimularea funcției efectoare anticanceroase a Teff și/sau pentru inhibarea funcției de supresie a Treg.

Secvențe: 151

Revendicări: 17

Figuri: 44

MD 4633 B1 2019.06.30

(54) Humanized anti-CD134 (OX40) antibodies and uses thereof

(57) Abstract:

1
The invention relates to antibodies that specifically bind to human CD134. Anti-human CD134 antibodies specifically bind to the extracellular domain of human CD134, including non-OX40 ligand (OX40L) binding domains on human CD134, which is expressed on e.g. activated human conventional effector CD4 and/or CD8 T lymphocytes (Teffs) and on activated human suppressive regulatory

2
CD4 T lymphocytes (Tregs). Humanized anti-human CD134 antibodies are useful (e.g. to empower Teffs anti-cancer effector function and/or to inhibit Tregs suppressive function) for cancer treatment.

Sequences: 151

Claims: 17

Fig.: 44

(54) Гуманизированные антитела анти-CD134 (OX40) и их использование

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим CD134. Человеческие антитела анти-CD134 специфически связываются с внеклеточным доменом человеческого CD134, включая, домены не связывающие лиганд OX40 (OX40L) человеческого CD134, которые выражены, например, на активированных обычных эффекторных человеческих CD4 и/или CD8 Т лимфоцитах (Teff) и на активированных

2
человеческих супрессивных регуляторных CD4 Т лимфоцитах (Treg). Гуманизированные антитела анти-CD134 пригодны для лечения рака, например, для стимуляции противораковой эффекторной функции Teff и/или для ингибирования супрессивной функции Treg.

Последовательности: 151

П. формулы: 17

Фиг.: 44

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la anticorpi, în special la anticorpii umanizați care se leagă la CD134 și la utilizarea unor astfel de anticorpi în tratamentul cancerului.

Stimularea funcției antitumorale a celulelor T reprezintă o abordare unică în tratamentul cancerului. Există dovezi importante, conform cărora celulele tumorale "evită" sistemul imunitar prin inducerea unei toleranțe imune active, mediate în mare măsură de limfocitele T reglatoare (Tregs Quezda et al. Immunol. Rev. 2011, no. 241, p. 104-118). Prin urmare, echilibrul dintre T-
10 limfocitele efectoare (Teff) (adică eradicarea directă sau indirectă a celulelor tumorale) și tolerigene (adică supresia funcțiilor efectoare și supraviețuirii Teff) Treg par a fi cruciale pentru eficiența imunoterapiei antitumorale. Cu alte cuvinte, un răspuns imun antitumoral eficient poate fi obținut prin creșterea funcției efectoare a Teff specifice tumorii și/sau prin atenuarea funcției
15 supresoare a Treg specifice tumorii. Un receptor - cheie, care a fost demonstrat să medieze aceste răspunsuri, este receptorul CD134 (OX40) (Sugamura K., Ishii N., Weinberg A. Therapeutic targeting of the effector T- cell co-stimulatory molecule OX40. Nature Rev. Imm., 2004, no. 4, p. 420-431).

CD134 (de asemenea cunoscut ca OX40, TNFRSF4 și ACT35) este un membru al superfamiliei receptorului factorului de necroză tumorală. Acest receptor costimulator de suprafață
20 CD134 este exprimat pe limfocitele T activate și joacă un rol important în supraviețuirea și funcția acestora. Prezența limfocitelor T care exprimă CD134 a fost demonstrată în diferite tumori maligne umane și în ganglionii limfatici regionali ai pacienților cu cancer (Ramstad et al. Am. J. Surg., 2000, no. 179, p. 400-406; Vetto et al. Am. J. Surg., 1997, nr. 174, p. 258-265).

Legarea *in vivo* a receptorului CD134 la șoareci (fie prin proteine solubile de fuziune ale
25 ligandului OX40 (OX40L) cu imunoglobulina la șoareci, fie prin OX40L care mimează la șoareci, cum ar fi anticorpii specifici anti-CD134 la șoareci) în cazul șoarecilor purtători de tumori amplifică imunitatea antitumorală, conducând la supraviețuire în lipsa tumorii la modelele murine pe diferite linii celulare tumorale maligne, de exemplu, în caz de limfom, melanom, sarcom, cancer de colon, cancer mamar și gliom (Sugamura et al. Nature Rev. Imm., 2004, no. 4, p. 420-
30 431).

A fost propusă stimularea răspunsului imun al unui mamifer la un antigen prin implicarea OX40R prin utilizarea unui agent de adeziune pentru OX40R [1]. Deși documentul se referă în general la agenții de adeziune pentru OX40, accentul se pune pe utilizarea OX40L sau a părților de acesta; menționarea anticorpilor anti-OX40 este în contextul echivalenței lor cu OX40L. Într-
35 adevăr, atunci când echipa Weinberg a repetat cercetarea într-un studiu cu primat non-umane, din nou, au ales în mod deliberat un anticorp care se leagă la situsul de legare a OX40L și care, în general, imită OX40L.

S-a mai utilizat un anticorp anti-OX40, numit OX86, care nu a blocat legarea OX40L, în scopul de a cerceta expresia diferențială a OX40 pe celulele T activate la șoareci [2]; sau în cadrul
40 unui model cu șoareci s-a utilizat OX86 împreună cu ciclofosfamida, în calitate de o chimioimunoterapie potențială [3]. Cu toate acestea, nu este de așteptat ca OX86 să se lege la OX40 uman și, la selectarea unui anticorp care ar fi eficient la oameni, conform opiniei lui Weinberg, ar putea fi selectat un anticorp care s-ar lega la situsul de legare a OX40L.

Legarea *in vivo* a receptorului uman CD134 (prin anticorpii umani specifici anti-CD134, care
45 interacționează cu domeniul de legare al OX40L pe CD134 uman; [4]) la șoarecii cu imunodeficiență combinată severă (SCID) sporește imunitatea antitumorală, ceea ce conduce la inhibarea creșterii tumorale a diferitor linii celulare tumorale maligne la oameni, de exemplu, în limfom, cancer de prostată, cancer de colon și cancer mamar.

Mecanismul exact al răspunsurilor imune antitumorale, mediate de legarea CD134 la oameni,
50 nu este încă elucidat, dar se crede că acesta este mediat prin calea transmembranară de semnalizare CD134, care este stimulată de interacțiunea cu OX40L. Această interacțiune este mediată de legarea OX40L trimeric la CD134. În terapiile curente anticanceroase, utilizarea ligandului trimerizat OX40 este propusă în calitate de un agent mai eficient, decât anticorpii anti-OX40 [5].

Prezenta invenție se referă la o moleculă de adeziune care conține:

- 55 a) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidică din fig. 27 sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi; și/sau
(b) o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidică din fig. 27, sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

Prezenta invenție se mai referă la o moleculă de adeziune care conține:

(a) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă din fig. 26, sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi; și/sau

(b) o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidă din fig. 26 sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

5 În unele realizări moleculele izolate de adeziune se leagă la CD134 uman. Moleculele de adeziune, conform invenției, nu împiedică legarea receptorului CD134 (OX40) uman la ligandul OX40 (OX40L).

Astfel de molecule de adeziune includ anticorpi potriviți anti-CD134, fragmente de legare a antigenului ale anticorpilor anti-CD134 și derivați ai anticorpilor anti-CD134. În unele realizări
10 molecula de adeziune se leagă la CD134 uman cu K_d de 1×10^{-7} M sau mai puțin. Molecula de adeziune are activitate agonistă pe CD134 uman de pe celulele T-efectoare și/sau activitate antagonistă pe CD134 uman de pe celulele T-reglatoare. În unele realizări ulterioare molecula de adeziune este un anticorp monoclonal uman, care leagă specific CD134 uman cu K_d de 100 nM sau mai puțin, de preferință mai puțin de 50 nM și mai preferabil mai puțin de 20 nM.

15 Prezența invenției asigură, de asemenea, o compoziție care conține una sau mai multe moleculele de adeziune și un purtător farmaceutic acceptabil. În unele realizări molecula de adeziune este un anticorp monoclonal anti-CD134 uman sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Compoziția ar mai putea cuprinde ulterior agenți farmaceutici suplimentari, cum ar fi agenți imunoterapeutici, agenți chimioterapeutici și agenți terapeutici hormonal.

20 Prezența invenției asigură în continuare metode de diagnostic și de tratament cu utilizarea moleculelor de adeziune. În unele realizări se asigură o metodă de tratament sau de prevenire a cancerului la un mamifer, care prevede administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente de moleculă de adeziune sau de o compoziție ce conține o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții. În alte realizări invenția se referă la o metodă de stimulare a răspunsului imun la
25 un mamifer, care cuprinde administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente de moleculă de adeziune sau de o compoziție ce conține o moleculă de adeziune. În anumite realizări molecula de adeziune, utilizată în metode, este un anticorp monoclonal anti-CD134 uman sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la CD134 uman, totodată anticorpul nu împiedică legarea receptorului uman CD134 (OX40) la ligandul OX40 (OX40L).

30 Prezența invenției se referă în continuare la molecule de acid nucleic, care codifică o secvență aminoacidă a unei molecule de adeziune, la vectori care conțin asemenea acizi nucleici, la celule gazdă care conțin vectori și la metode de preparare a moleculelor de adeziune.

Descrierea prezintă, de asemenea, și alte aspecte, care vor fi clare din descrierea completă, inclusiv și din revendicări.

35 Invenția se explică prin desenele din fig. 1-44, care reprezintă:

fig. 1 - efectul dependent de timp și doză al expunerii la PHA-M asupra expresiei CD134 uman de suprafață de către limfocitele T umane;

fig. 2 - expresia CD134 uman pe limfocitele T umane CD4 aflate în repaus și PHA-M – activate;

40 fig. 3 - caracteristicile adeziunii clonei ACT35, clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umanii de șoarece pe limfocitele T care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

fig. 4 - legarea clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece pe limfocitele T CD4, care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate și pe limfocitele T CD8;

45 fig. 5 - competiția încrucișată a clonei 20E5 nemarcate a anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece cu clona ACT35 comercializată a anticorpilor anti-CD134 de șoarece, conjugată cu PE cu sau clona L106 pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

fig. 6 - legarea simultană a clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umanii de șoarece cu OX40L uman pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

50 fig. 7 - efectul dependent de timp al expunerii la particulele sferice stimulative ale anticorpilor anti-CD3 uman/anti-CD28 uman asupra expresiei de CD134 uman de suprafață al limfocitelor T efectoare (Teff) și limfocitelor T reglatoare (Treg) umane;

fig. 8 - efectul dozo-dependent al expunerii la clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umanii de șoarece, sau la OX40L uman asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

55 fig. 9 - efectul combinării clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umanii de șoarece cu OX40L uman asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

fig. 10 - efectul expunerii la clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umanii de șoarece, sau la OX40L uman, asupra proliferării limfocitelor T efectoare umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimulative ale anticorpilor anti-CD3 uman/anti-CD28 uman;

fig. 11 - efectul expunerii la clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece, sau la OX40L uman, asupra proliferării limfocitelor T reglatoare umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimuloare ale anticorpilor CD3 anti-uman/ CD28 anti-uman;

5 fig. 12 - efectul anticorpului anti-CD134 uman de șoarece asupra proliferării mediate de OX40L uman a limfocitelor T efectoare (A) și reglatoare (B) umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimuloare ale anticorpilor CD3 anti-uman/ CD28 anti-uman;

fig. 13 - efectul expunerii la clona 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece sau la OX40L uman asupra supresiei proliferării limfocitelor T efectoare umane, care exprimă CD134 uman, mediate de limfocitele T reglatoare umane, care exprimă CD134 uman;

10 fig. 14 - legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ pe (minus și plus IL-2) limfocitele T CD8 și limfocitele T CD4, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice ale CD3/CD28;

fig. 15 - efectul clonei himerice umane 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau OX40L uman asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

15 fig. 16 - efectul dozo-dependent al expunerii la clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau la OX40L uman asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

fig. 17 - efectul combinării clonei himerice umane 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ cu OX40L uman asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-M – stimulate;

20 fig. 18 - efectul clonei himerice umane 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau OX40L uman asupra proliferării de limfocite T, care exprimă CD134 uman, stimulate de (minus și plus IL-2) particulele sferice ale CD3/CD28;

25 fig. 19 - legarea clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 umani de șoarece cu proteina redusă și neredusă de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman. (A) Condițiile de examinare fără reducere (a, b) și cu reducere (c, d). (B) Modelele de migrație electroforetică a proteinei de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman (rhuCD134) în condiții fără reducere (a, b) și cu reducere (c, d), utilizând colorarea cu albastru brilliant de Coomassie. (C) Western blot în cazul proteinei de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman fără (a, b) și cu reducere (c, d), expuse la anticorpul de control izotip IgG1κ de șoarece (mIgG1) sau la clona 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece (m20E5);

fig. 20 - reprezentarea schematică a domeniilor bogate în cisteină (CRD), în CD134 uman cu lungime completă (notate ca "CRD1") și în diferite forme trunchiate de CD134 uman (notate ca "CRD2", "CRD3", "CRD4" și "CRD4 trunchiat (tc)");

35 fig. 21 - legarea clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 umani de șoarece pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD2", "CRD3", "CRD4" și "CRD4 trunchiat (tc)");

40 fig. 22 - legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului anti-CD134 umani IgG4κ și/sau IgG1κ pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD2", "CRD3", "CRD4" și "CRD4 trunchiat (tc)");

45 fig. 23 - legarea anticorpului anti-CD134 uman de șoarece (A) și a clonei himerice umane 12H3 a anticorpului anti-CD134 IgG4κ (B) cu peptida derivată din CD134 uman, care corespunde secvenței de aminoacizi din A1-modulul cu subdomeniu CRD3 – A1-modul-CRD4 trunchiat (Morris et al. Mol. Immunol., 2007, no. 44, 3, p.112-113,121);

fig. 24 - regiuni variabile ale anticorpului monoclonal 20E5.

50 Regiuni variabile murine (m20E5VH și m20E5VL); lanțuri grele variabile ale 20E5 umanizat (hu20E5_h1, hu20E5_h2 și hu20E5_h3) și lanțuri ușoare variabile ale 20E5 umanizat (hu20E5_l1 și hu20E5_l2). m20E5VH: SEQ NO ID: 4; m20E5VL: SEQ ID NR 5.

fig. 25 - regiuni variabile ale anticorpului monoclonal de comparație;

fig. 26 - regiuni variabile ale 20E5 umanizat.

fig. 27 - regiuni variabile ale anticorpului umanizat de comparație;

55 fig. 28 – caracteristicile de adeziune ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) împotriva CD134 recombinant uman legat pe placă;

fig. 29 - caracteristicile de adeziune ale anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) împotriva CD134 recombinant uman legat pe placă;

5 fig. 30 - caracteristicile de adeziune ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece parental biotinitat împotriva CD134 recombinant uman legat pe placă;

fig. 31 - caracteristicile competitive ale anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) cu anticorpul anti-CD134 uman de șoarece parental biotinitat (la EC₅₀ 20 ng/ml) pentru legarea CD134 recombinant uman legat pe placă;

10 fig. 32 - nivelurile de expresie a CD134 uman cu o lungime completă pe clona nr. 5 (A) și pe clona nr. 23 (B) din linia celulară F-293 transfectată stabil;

fig. 33 - caracteristicile de adeziune ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) împotriva CD134 uman de suprafață pe clona nr. 5 din linia celulară F-293 transfectată stabil;

15 fig. 34 - caracteristicile de adeziune ale anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) împotriva CD134 uman de suprafață pe clona nr. 5 din linia celulară F-293 transfectată stabil;

fig. 35 - caracteristicile de adeziune ale anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) împotriva CD134 uman de suprafață pe clona nr. 23 din linia celulară F-293 transfectată stabil;

fig. 36 - legarea anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3, VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD3" și "CRD4");

25 fig. 37 - legarea clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1 pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD3" și "CRD4");

fig. 38 - caracteristicile de adeziune ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece parental biotinitat împotriva CD134 uman de suprafață pe clona nr. 5 din linia de celule F-293 transfectată stabil;

fig. 39 - caracteristicile competitive ale anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ umanizat versiunile VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) și VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) cu anticorpul anti-CD134 uman de șoarece parental biotinitat (la EC₅₀ 700 ng/ml) pentru legarea la CD134 uman pe clona nr. 5 din linia de celule F-293 transfectată stabil;

fig. 40 - supresia exprimării FOXP3 în Treg extinse (CD4 + CD25 + CD127 dim/-) cu OX40L solubil și anticorp anti-CD134 IgG1 uman de șoarece solubil în concentrațiile indicate. Axa Y arată media geometrică a intensității fluorescenței FOXP3 (GeoMFI), detectate folosind anticorp anti-FOXP3 cuplat la PE. Datele reprezintă o probă triplă de la un donator;

40 fig. 41 - histograma analizelor FACS indicand efectul inhibitor diminuat al Treg asupra proliferării Teff cu anticorpul anti-CD134 VL1VH1 uman umanizat legat pe placă în comparație cu controlul izotip. Celulele Teff au fost detectate cu Celltrace™ Violet. Raportul Treg:Teff este de 1:2;

fig. 42 - efectul exercitat de anticorpii anti-CD134 uman legați pe placă asupra proliferării celulelor Teff la un raport Treg:Teff de 0:1 (fără Treg) (fig. 42A) sau de 1:4 (fig. 42B), izolate de la donorul 7015, reprezentat grafic ca o funcție a indicelui de replicare. M = șoarece; h = himeric; h = uman. *p < 0.05; *p < 0.01; ** p < 0,001 comparativ cu controlul izotip mIgG1. OX40L uman s-a utilizat cu anticorpul anti-His (OX40L) sau fără anticorpul anti-His (OX40L, dar nu His);

50 fig. 43 - alinierea regiunilor variabile ale lanțului greu umanizate (VH) derivate din anticorpul anti-CD134 20E5 uman de șoarece parental. SEQ ID NR: sunt afișate pentru fiecare secvență la sfârșitul denumirii secvenței (20E5_VH1_64 = secvența aminoacidică din SEQ ID NO: 64, etc.);

fig. 44 - alinierea regiunilor variabile ale lanțului greu umanizate (VH) derivate din anticorpul anti-CD134 uman de șoarece parental.

55 Activarea celulelor T este mediată nu numai prin stimularea cu antigen prin receptori celulelor T, dar și prin semnale costimulatoare prin moleculele costimulatoare. Printre unele molecule costimulatoare, membrul familiei de receptori ai factorului de necroză tumorală (TNF), OX40 (CD134), joacă un rol cheie în supraviețuirea și homeostazia celulelor T efectoare și de memorie. Conform acordului convențional privind costimularea OX40, se produce o interacțiune între OX40 și ligandul OX40 (OX40L), când celulele T activate se leagă la celulele specializate

prezentatoare de antigen (CPA). Funcțiile celulelor T, inclusiv producerea de citokine, expansiunea și supraviețuirea, sunt apoi intensificate prin semnale costimulatoare ale OX40. Interacțiunea dintre OX40 și OX40L are loc în timpul interacțiunii celulă T – celulă dendritică (CD), peste 2...3 zile după recunoașterea antigenului. Celula T care exprimă OX40 poate, de asemenea, interacționa cu o celulă ce exprimă OX40L, alta decât CD și primi un semnal OX40 de la o celulă, care poate furniza semnale esențiale pentru generarea celulelor T de memorie, stimularea răspunsului Th2, și prelungirea răspunsurilor inflamatorii. Astfel, interacțiunea optimă dintre OX40 și OX40L ar putea fi formată în două etape: OX40L exprimat pe celulele T CD4 activate interacționează cu OX40 exprimat pe o altă celulă T CD4 responder, ceea ce duce la generarea optimă a celulelor T CD4 de memorie (Latza et al. Eur. J. Immunol., 1994, no. 24, p. 677- 683), sau OX40L exprimat pe celulele accesorii CD4+ poate promova supraviețuirea celulei Th2 prin interacțiunea cu OX40 pe celulele Th2 (Soroosh et al. J. Immunol., 2006, no. 176, p. 5975-5987). În plus, expresia OX40L pe celulele B este necesară pentru dezvoltarea Th2 *in vivo*, dar nu dezvoltarea Th1 (Kim et al. Immunity, 2003, no.18, p. 643-654), și mastocitele care exprimă OX40L stimulează direct funcția celulelor T efectoare prin interacțiunea dintre OX40 pe celulele T și OX40L pe mastocite (Linton et al. J. Exp. Med., 2003, no. 197, p. 875-883; Kashiwakura et al. J. Immunol., 2004, no. 173, p. 5247-5257). Suplimentar la aceasta, deoarece celulele endoteliale exprimă, de asemenea, OX40L (Nakae et al. J. Immunol., 2006, no. 176, p. 2238-2248), legarea OX40 la celulele endoteliale ar putea fi implicată în inflamația vasculară. Semnalele OX40 în exces, atât la celulele T responder, cât și la celulele T reglatoare, inhibă supresia imună, mediată de Treg. Semnalele OX40 ce trec la celulele T responder le fac rezistente la suprimarea mediată de Treg. Pe de altă parte, semnalele OX40 ce trec în celulele Treg inhibă direct funcția supresoare a Treg, deși este discutabil faptul dacă semnalele OX40 ar putea controla nivelul de expresie a Foxp3 în celulele Treg. În plus, stimularea lentă a OX40 inhibă diferențierea dependentă de TGF-beta a celulelor iTreg (celule Treg inductibile). Inhibiția poate fi mediată în parte de către citokinele efectoare, cum ar fi IL - 4 și IFN – gamma, produse de celulele T efectoare, stimulate cu OX40. Este important faptul că blocarea OX40L promovează semnificativ diferențierea iTreg și induce toleranța la grefă, care ar putea fi mediată prin celulele Treg. Prin urmare, OX40 ar putea prezenta o posibilă țintă moleculară pentru controlul autoimunității mediate de celulele T. În plus, studiile recente au raportat faptul că interacțiunea dintre OX40L exprimat de celulele mastocitare și OX40 exprimat de celulele Treg poate suprima reciproc funcția mastocitelor și funcția de supresie a celulelor Treg (Imura et al. J. Exp. Med., 1996, no. 183, p. 2185-2195; Gri et al. Immunity, 2008, no. 29, p. 771-781).

Șoarecii sunt un instrument experimental de elecție pentru imunologi, și studiul asupra răspunsurilor lor imune a oferit o înțelegere considerabilă cu privire la modul de funcționare a sistemului imunitar uman. Structura generală a șoarecelui și a sistemului uman par a fi destul de asemănătoare; cu toate acestea, există, de asemenea, diferențe semnificative. De exemplu, la șoareci, CD134 este exprimat pe Teff la activare, în timp ce Treg exprimă CD134 în mod permanent (Piconese et al. Blood, 2009, no.114, p. 2639-2648). La oameni, CD134 este exprimat atât pe Teff, cât și pe Treg, dar numai la activare (a vedea, de exemplu, exemplul 2 (g), "Expresia CD134 pe limfocitele T efectoare și reglatoare umane după stimularea cu particule sferice stimulatorie a anticorpului anti-CD3 uman/anticorpului anti-CD28 uman"). Mai mult decât atât, Treg de șoarece induc apoptoza Teff de șoarece pentru obținerea supresiei (Piconese et al. J. Exp. Med., 2008, no. 205, p. 825-839; Pandiyan et al. Nat. Immunol., 2007, no. 8, p. 1353), în timp ce Treg umane nu induc apoptoza în Teff umane pentru obținerea supresiei (Scheffold et al. Nat. Immunol., 2007, no. 8, p. 1285-1287). Împreună, aceste date indică diferite roluri ale CD134 în funcția de supresie a Treg în sistemul imunitar uman și cel murin.

Termenul "moleculă de adeziune" cuprinde (1) un anticorp, (2) un fragment de legare a antigenului al unui anticorp și (3) un derivat al unui anticorp, cum este definit aici. Termenul "se leagă la CD134" sau "legare la CD134" se referă la legarea unei molecule de adeziune, așa cum este definită aici, de receptorul CD134 într-un test *in vitro*, cum ar fi un test BIAcore sau Octet (rezonanța plasmonică de suprafață). Molecula de adeziune are, de preferință, o afinitate de legare (K_d) de 1×10^{-6} M sau mai puțin, de exemplu de circa 50×10^{-7} M sau mai puțin, de circa 1×10^{-7} M sau mai puțin, de circa 1×10^{-8} M sau mai puțin, de circa 1×10^{-9} M sau mai puțin, de circa 1×10^{-10} M sau mai puțin, de circa 1×10^{-11} M sau mai puțin, sau de circa 1×10^{-12} M sau mai puțin.

Termenul "anticorp izolat" sau "moleculă de adeziune izolată" se referă la un anticorp sau la o moleculă de adeziune care: (1) nu este asociată cu componente asociate în mod natural, care o însoțesc în starea sa nativă; (2) nu conține alte proteine din aceeași specie; (3) este exprimată de o celulă dintr-o specie diferită; sau (4) nu apare în natură. Exemplele de anticorpi izolați includ un

anticorp anti-CD134, care a fost purificat de afinitate prin utilizarea CD134, un anticorp anti-CD134, care a fost generat de hibridoame sau alte linii celulare *in vitro*, anticorpi anti-CD134 umanizați și un anticorp anti-CD134 uman, derivat de la un animal transgenic.

Termenul "agonist" se referă la o moleculă de adeziune, așa cum este definit aici, care, la legarea de CD134, (1) stimulează sau activează CD134, (2) stimulează, promovează, induce, crește sau prelungește activitatea, prezența sau funcția CD134, sau (3) stimulează, promovează, crește sau induce expresia CD134. Termenul "antagonist" se referă la o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, care la legarea de CD134, (1) inhibă sau suprimă CD134, (2) inhibă sau suprimă o activitate, prezența sau funcția CD134, sau (3) inhibă sau suprimă expresia CD134.

Termenul "anticorp" se referă la o moleculă de imunoglobulină, care este, de obicei, compusă din două perechi identice de lanțuri polipeptidice, fiecare pereche având un lanț «greu» (H) și un lanț «ușor» (L). Lanțurile ușoare umane sunt clasificate în kappa (κ) și lambda (λ). Lanțurile grele sunt clasificate: mu, delta, gama, alfa sau epsilon și definesc izotipul anticorpului ca IgM, IgD, IgG, IgA și IgE, respectiv. Fiecare lanț greu conține o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici ca HCVR sau VH) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunile constante ale lanțului greu din IgD, IgG și IgA sunt constituite din trei domenii - CH1, CH2 și CH3, iar regiunile constante ale lanțului greu din IgM și IgE sunt constituite din patru domenii - CH1, CH2, CH3 și CH4. Fiecare lanț ușor este constituit dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici ca LCVR sau VL) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu - CL. Regiunile constante ale anticorpilor pot media legarea imunoglobulinei la țesuturile sau factorii gazdă, incluzând diferite celule ale sistemului imun (de exemplu, celulele efectoare). Regiunile VH și VL pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, definite ca regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni suport (FR). Fiecare regiune VH și VL este compusă din trei CDR și patru FR, aranjate de la capătul amino-terminal până la capătul carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Regiunile variabile ale fiecărei perechi de lanțuri grele/ușoare (VH și VL), respectiv, formează situsul de legare a anticorpului. Distribuția de aminoacizi pentru fiecare regiune sau domeniu este în conformitate cu definițiile din Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 și 1991)) sau în conformitate cu definițiile Chothia et al. (Vercoulen et al. Plos ONE 2009, no. 4, e7183). Termenul "anticorp" cuprinde anticorpi murini, umanizați, umani și himerici, și un anticorp care este o formă multimerică de anticorpi, cum ar fi dimerii, trimerii sau multimerii de ordin superior ai anticorpilor monomerici. Anticorpul cuprinde, de asemenea, anticorpi monospecifici, bispecifici sau multipecifici și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină, care conține un situs de recunoaștere a antigenului de specificitate cerută.

Acesta cuprinde, de asemenea, un anticorp care este legat sau atașat la un fragment care nu este anticorp. În plus, termenul "anticorp" nu este limitat de nici o metodă specială de producere a anticorpului. De exemplu, acesta include anticorpi monoclonali, anticorpi recombinanți și anticorpi policlonali.

Termenul "derivat de anticorp" sau "derivat" al unui anticorp se referă la o moleculă care este capabilă să se lege la același antigen (de exemplu, CD134 uman), la care se leagă anticorpul, și care cuprinde o secvență de aminoacizi a anticorpului, corelată cu o structură moleculară suplimentară. Secvența aminoacidă a anticorpului, care se conține în derivatul de anticorp, poate fi un anticorp cu o lungime completă, sau poate fi orice porțiune sau porțiuni de anticorp cu o lungime completă. Structura moleculară suplimentară poate fi o moleculă biologică sau chimică. Exemple de entități moleculare suplimentare includ grupe chimice, peptide, proteine (cum ar fi enzime, anticorpi), aminoacizi și compuși chimici. Structura moleculară suplimentară poate fi utilizată ca un agent de detecție, semn de marcare, agent terapeutic sau farmaceutic. Secvența aminoacidă a unui anticorp poate fi atașată sau legată de structura suplimentară prin asociere necovalentă, cuplare chimică, fuziune genetică, sau într-un alt mod. Termenul "derivat de anticorp" cuprinde, de asemenea, anticorpi himerici, anticorpi umanizați și molecule derivate din modificările secvențelor de aminoacizi ale unui anticorp CD134, cum ar fi substituțiile, inserțiile și adăugările de aminoacizi pentru conservare.

Termenul "fragment de legare a antigenului" al unui anticorp se referă la una sau mai multe porțiuni ale unui anticorp cu o lungime completă, care păstrează abilitatea de a se lega la același antigen (de exemplu, CD134 uman), la care se leagă anticorpul. Termenul "fragment de legare a antigenului" cuprinde, de asemenea, o porțiune dintr-un anticorp, care face parte dintr-o moleculă mai mare, formată prin asociere necovalentă sau covalentă, sau dintr-o porțiune de anticorp cu una sau mai multe structuri moleculare. Exemple de structuri moleculare suplimentare includ

aminoacizi, peptide sau proteine, cum ar fi regiunea nucleului streptavidinei, care poate fi utilizată pentru a produce o moleculă tetramerică scFv (Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, Nature, 1989, no. 342 (6252), p. 877-883).

5 Termenul "anticorp himeric" se referă la un anticorp care cuprinde secvențe de aminoacizi, derivate de la două specii diferite, cum ar fi umană și murină, de obicei o combinație de regiuni variabile murine (de lanțuri grele și ușoare) și regiuni constante umane (lanțuri grele și ușoare).

Termenul "epitop" se referă la acea parte a unui antigen, care este capabilă de legare la un anticorp specific sau la receptorul celulei T, sau de un alt fel de interacțiune cu o moleculă. "Epitopul" este, de asemenea, menționat în domeniu ca "determinant antigenic". Un epitop constă, 10 în general, din grupe de suprafață chimic active ale moleculelor, cum ar fi aminoacizii, glucidele sau catenele laterale de glucoză. Un epitop poate fi "liniar" sau "neliniar/conformațional". Odată ce epitopul dezirabil este determinat (de exemplu, prin cartografierea epitopului), la acest epitop pot fi generați anticorpi. Generarea și caracterizarea anticorpilor poate furniza, de asemenea, informații despre epitopii dezirabili. Pe baza acestor informații, este posibil screening-ul 15 anticorpilor pentru cei care se leagă la același epitop, de exemplu, prin efectuarea de studii competiționale încrucișate pentru a găsi anticorpi care se leagă în mod competitiv unul cu altul, de exemplu, anticorpii concurează pentru legarea la antigen.

Termenul "celulă gazdă" se referă la o celulă, în care a fost introdus un vector de expresie. Termenul cuprinde nu doar celula subiectului respectiv, ci și descendentul unei astfel de celule. 20 Deoarece pot apărea anumite modificări în generațiile succesive, determinate fie de influențele mediului sau de mutații, un astfel de descendent poate să nu fie identic cu celula-mamă, dar este încă inclus în limitele termenului "celulă gazdă".

Termenul "anticorp uman" se referă la un anticorp care constă din secvențe de aminoacizi doar din secvențe de imunoglobulină umană. Un anticorp uman poate conține lanțuri de hidrocarburi 25 murine, în cazul în care este produs la șoareci, într-o celulă de șoarece sau într-un hibridom derivat dintr-o celulă de șoarece. Anticorpii umani pot fi produși printr-o varietate de metode cunoscute în domeniu.

Termenul "anticorp umanizat" se referă la un anticorp care conține o parte sau toate CDR dintr-un anticorp animal non-uman, în timp ce regiunile suport și constante ale anticorpului conțin 30 resturi de aminoacizi, derivate din secvențe de anticorp uman. Anticorpii umanizați sunt, de obicei, produși prin grefarea CDR de la un anticorp de șoarece în secvențe suport umane, urmată de substituția inversă a unor reziduuri de suport umane pentru reziduurile murine corespunzătoare din anticorpul sursă. Termenul "anticorp umanizat" se referă, de asemenea, la un anticorp de origine non-umană în care, de obicei, în una sau mai multe regiuni variabile au fost eliminați unul sau mai 35 mulți epitopi, care au predispoziție majoră de a constitui o celulă T umană și/sau epitop al celulei B în scopul de a reduce imunogenitatea. Secvența aminoacidică a epitopului poate fi îndepărtată complet sau parțial. Cu toate acestea, de obicei, secvența aminoacidică este modificată prin substituția unuia sau a mai multor aminoacizi, care constituie epitopul, cu unul sau mai mulți alți aminoacizi, schimbând astfel secvența aminoacidică pe o secvență care nu constituie o celulă T 40 umană și/sau epitop al celulei B. Aminoacizii sunt substituiți cu aminoacizii prezenți în poziția (pozițiile) corespunzătoare într-un lanț greu variabil sau într-un lanț ușor variabil uman corespunzător, după caz.

Termenul "mamifer" se referă la orice specie de animale din clasa Mamiferelor. Exemple de mamifere sunt: oamenii; animalele de laborator, cum ar fi șobolanii, șoarecii, maimuțele și cobaii; 45 animalele domestice, cum ar fi iepurii, vitele, oile, caprele, pisicile, câinii, caii, porcii și altele similare.

Termenul "acid nucleic izolat" se referă la o moleculă de acid nucleic de origine genomică, ADNc sau sintetică, sau o combinație a acestora, care este separată de alte molecule de acid nucleic, prezente în sursa naturală de acid nucleic.

50 Termenul " K_d " se referă la constanta de disociere a echilibrului unei interacțiuni anumite anticorp-antigen și este folosit pentru a descrie afinitatea de legare dintre un ligand (cum ar fi un anticorp) și o proteină (cum ar fi CD134). Cu cât este mai mică constanta de disociere a echilibrului, cu atât este mai strans legat ligandul, sau cu atât mai mare este afinitatea dintre ligand și proteină. K_d poate fi măsurată prin rezonanța plasmonică de suprafață, de exemplu folosind 55 sistemul BIACORE 1 sau Octet. Termenul "anticorp anti-CD134" se referă la un anticorp, așa cum este definit aici, capabil de legare la CD134 uman.

Termenii "receptorul OX40" și "receptorul CD134" sunt folosiți alternativ în prezenta invenție și includ CD134 uman, precum și variantele, izoformele și speciile omoloage acestuia. Corespunzător, moleculele umane de adeziune, descrise aici, pot să se lege, de asemenea, în

anumite cazuri, la CD134 de la alte specii decât cea umană. De exemplu, moleculele de adeziune, conform prezentei invenții, pot avea reactivitate încrucișată la alte antigene înrudite, de exemplu, la CD134 de la alte specii, cum ar fi de la o ființă umană sau maimuță, de exemplu *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno) sau *Pan troglodytes* (cimpanzeu, cimpanzeu). In alte cazuri, moleculele de adeziune pot fi complet specifice pentru CD134 uman și pot să nu prezinte specii sau alte tipuri de reactivitate încrucișată. De exemplu, ele nu se vor lega la CD134 de șoarece sau de șobolan.

Termenul "se leagă în mod specific la CD134 uman" înseamnă că K_d a unei molecule de adeziune pentru legarea la CD134 uman, este, de preferință, mai mare de 10 ori, de 50 ori sau, cel mai preferabil, mai mare de 100 de ori decât K_d pentru legarea sa, de exemplu, la CD40 uman, așa cum este determinat utilizând un test descris aici sau cunoscut de o persoană de specialitate în domeniu (de exemplu, testul BIAcore).

Determinarea legării specifice a unui anumit agent la receptorul OX40 poate fi alternativ realizată cu ușurință prin utilizarea sau adaptarea metodelor de rutină. Un test corespunzător *in vitro* se utilizează în metoda Western blot (descrisă în numeroase publicații de specialitate, de exemplu, (Kipriyanov et al. Hum. Antibodies Hybridomas, 1995, no. 6 (3), p. 93-101)). Pentru a determina dacă un agent de legare pentru receptorul OX40 se leagă specific la proteina umană OX40, este extrasă proteina celulară totală din celulele de mamifere, care nu exprimă antigenul OX40, cum ar fi celula nelimfocitară (de exemplu, o celulă COS sau o celulă CHO), transformată cu o moleculă de acid nucleic, care codifică OX40. În calitate de control negativ, proteina celulară totală este, de asemenea, extrasă din celulele corespunzătoare netransformate. Aceste preparate de proteine sunt apoi supuse electroforezei pe un gel de poliacrilamidă fără denaturare sau cu denaturare (PAGE). Ulterior, proteinele sunt transferate pe o membrană (de exemplu, nitroceluloză) prin Western blot și agentul de testat este incubat cu membrana. După spălarea membranei pentru a elimina agentul legat nespecific, prezența agentului legat este detectată prin utilizarea unui anticorp produs împotriva agentului testat, conjugat cu un agent de detectare, cum ar fi enzima fosfataza alcalină; aplicarea substratului de 5-brom-4-clor-3-indolilfosfat/nitrotetrazoliu albastru are drept rezultat producerea unui compus dens albastru de către fosfataza alcalină imuno-localizată. Agenții care se leagă specific la OX40 uman vor fi demonstrați, prin această tehnică, că se leagă la banda OX40 umană (care va fi localizată într-o anumită poziție pe gel, determinată de masa sa moleculară) în extractul de celule transformate OX40, în timp ce, în extractul de celule netransformate, va fi observată o legare nesemnificativă sau va lipsi orice legare. Legarea nespecifică a agentului la alte proteine poate să apară și poate fi detectată ca un semnal slab pe Western blot. Natura nespecifică a acestei legări va fi recunoscută de către un specialist în domeniu prin semnalul slab remarcat în Western blot, comparativ cu semnalul primar puternic, care rezultă din legarea agentului specific/proteina umană OX40. În mod ideal, un agent de legare a receptorului OX40 nu se va lega la proteinele extrase din celulele netransformate. Suplimentar la testele de legare cu utilizarea proteinelor extrase, agenții presupuși de legare a receptorului OX40 pot fi testați pentru a confirma capacitatea lor de a lega în mod substanțial numai receptorul OX40 *in vivo* prin conjugarea agentului la un marcaj fluorescent (cum ar fi FITC) și analiza legării sale de populațiile de celule T CD4+ antigen activate și neactivate prin Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Un agent care leagă în mod substanțial numai receptorul OX40 va colora doar celulele T CD4+ activate.

Termenul "vector" se referă la o moleculă de acid nucleic, capabilă să transporte o altă moleculă de acid nucleic într-o celulă gazdă. Exemplele de vectori includ plasmide, vectori virali, cosmide sau vectori fagi și vectori liberi de expresie a ADN sau ARN. Unii vectori sunt capabili de replicare autonomă în celula gazdă, în care aceștia au fost introduși. Unii vectori pot fi integrați în genomul unei celule gazdă la introducerea în celula gazdă, și, astfel, sunt reproduse împreună cu genomul gazdă. Alți vectori sunt capabili să dirijeze expresia genelor la care sunt legați operațional, și, prin urmare, pot fi menționați ca "vectori de expresie".

În prezenta invenție cei douăzeci de aminoacizi convenționali și abrevierile acestora sunt conforme definițiilor uzuale.

Anticorprii, ale căror lanț greu, lanț ușor, VH sau VL a secvențelor de aminoacizi diferă nesubstanțial de cele descrise aici, sunt incluși în volumul prezentei invenții. Diferențele nesemnificative sunt substituțiile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, sau 15 aminoacizi într-o secvență a regiunii variabile a anticorpului, care nu afectează în mod negativ proprietățile anticorpului. Secvențele de aminoacizi identice semnificativ cu secvențele regiunii variabile, descrise aici, sunt incluse în volumul prezentei invenții. În unele realizări identitatea secvenței

poate fi de circa 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau mai mare. Procentul identității poate fi determinat, de exemplu, prin alinierea pereche folosind setările implicite ale modului AlignX al Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Secvențele de proteine ale prezentei invenții pot fi utilizate ca o secvență de interogare pentru a efectua o căutare în bazele de date publice sau de brevete pentru, de exemplu, a identifica secvențe conexe. Programe exemplare, folosite pentru efectuarea unor astfel de căutări, sunt XBLAST sau setul de programe BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sau GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA), utilizând setările implicite.

De obicei, aceasta implică una sau mai multe substituții de aminoacizi conservative cu un aminoacid având caracteristici de sarcină, hidrofobe sau stereo chimice similare în situsul de legare a antigenului sau în cadrul fără a modifica în mod negativ proprietățile anticorpului. Substituțiile conservative pot fi realizate, de asemenea, în scopul îmbunătățirii proprietăților anticorpului, de exemplu, a stabilității sau afinității. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 sau 15 substituții de aminoacizi pot fi realizate în secvența VH sau VL. În unele realizări, 1, 2 sau 3 substituții sunt efectuate în VH sau VL ale anticorpului, conform prezentei invenții. Exemple de substituții de aminoacizi conservative sunt prezentate în tab. 1. În plus, orice reziduu nativ în polipeptidă poate fi, de asemenea, substituit cu alanină, așa cum a fost descris anterior pentru mutageneza cu scanare de alanină (Kiprianov et al. Hum. Antibodies Hybridomas, 1995, no. 6 (3), p. 93-101; MacLennan et al. Act Physiol. Scand. Suppl. 1998, no. 643, p. 55-67).

Anticorpul anti-CD134, descriși aici, care sunt modificați pentru a îmbunătăți stabilitatea, selectivitatea, reactivitate lor încrucișată, afinitatea, imunogenitatea sau alte proprietăți biologice sau biofizice dezirabile ale lor, sunt incluși în volumul prezentei invenții. Stabilitatea unui anticorp este influențată de o serie de factori, inclusiv (1) de ambalarea de bază a domeniilor individuale care afectează stabilitatea lor intrinsecă, (2) interacțiunile proteină/interfață proteină, care au un impact asupra conjugării HC și LC, (3) mascarea reziduurilor polare și cu sarcină, (4) rețea de adeziune H pentru reziduurile polare și cu sarcină; și (5) distribuirea reziduurilor polare și cu sarcină de suprafață printre alte forțe intra- și inter- moleculare (Sasaki et al. Adv. Biopsy's. 1998, no.35, p. 1-24). Reziduuri cu structură potențial destabilizatoare pot fi identificate pe baza structurii cristalului anticorpului și efectul reziduurilor asupra stabilității anticorpului pot fi testate prin generarea și evaluarea variantelor având mutații în reziduurile identificate.

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpul izolat conține 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în pozițiile reziduului liniar VH 11, 55 sau 99.

În unele realizări ale prezentei invenții 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi la pozițiile reziduurilor liniare VH sunt V11L, N55Q, N55A, N55E, M99L sau M99I.

Substituțiile la pozițiile reziduului liniar VH 11, 55 sau 99 pot îmbunătăți stabilitatea anticorpului și/sau spori activitatea agonistă a acestuia.

Substituțiile de aminoacizi poate fi realizate, de exemplu, prin mutageneză PCR (Worn et al. J. Mol. Biol., 2001, no.305, p. 989-1010). Bibliotecile de variante pot fi generate utilizand metode bine cunoscute, de exemplu, folosind codonii ronom (NNK) sau non-ronom, de exemplu, codonii DVK, care codifică 11 aminoacizi (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp) și screeningul bibliotecilor pentru variantele cu proprietăți dezirabile.

Deși exemplele de realizare ilustrate în exemple cuprind perechi de regiuni variabile, una dintr-un lanț greu și una dintr-un lanț ușor, un specialist în domeniu va recunoaște, că exemple de realizare alternative pot cuprinde regiuni variabile solitare ale lanțului greu sau ușor. O singură regiune variabilă poate fi utilizată pentru a detecta domeniile variabile capabile să formeze un fragment de legare a antigenului specific de două domenii capabil, de exemplu, de legare la CD134 uman, având secvența SEQ ID NO: 1. Screeningul poate fi realizat prin metode de screening de afișare a fagului, utilizând, de exemplu, abordarea ierarhică combinatorie dublă, cunoscută din literatura brevetară (US 4,683,195). În această abordare o colonie individuală conținând fie o clonă cu lanțul H sau L este utilizată pentru a infecta o bibliotecă completă de clone, care codifică celălalt lanț (L sau H) și domeniul de legare a antigenului specific cu două lanțuri rezultat este selectat în conformitate cu metodele de afișare cu fag, cum sunt descrise. Prin urmare, lanțurile polipeptidice individuale VH și VL sunt utile în identificarea anticorpilor suplimentari specifici de legare CD134 uman, având secvența SEQ ID NO: 1, utilizând metodele descrise în literatura de specialitate (WO1992/01047).

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpul care conține anumite secvențe CDR cu lanț greu și cu lanț ușor, așa cum sunt descrise aici, sunt anticorpi umani, umani sau DeImmunized™.

Anticorpul uman sau DeImmunized™ pot fi obținuți așa cum este descris aici. Anticorpul

umanizați se referă, de obicei, la un anticorp în care situsul de legare la antigen este derivat de la speciile neumane și cadrele regiunii variabile sunt derivate de la secvențe de imunoglobulină umană. Anticorpul umanizat pot include substituții în regiunile cadru, astfel, încât cadrul poate să nu fie o copie exactă a secvențelor imunoglobulinei umane exprimate sau genei de linie germinativă. Anticorpul umanizat împotriva CD134 pot fi generați, de exemplu, în șoareci Balb/c, utilizând metode standard. Anticorpul obținut în șoareci Balb/c sau alte animale non-umane pot fi umanizați folosind diverse tehnologii pentru a genera mai multe secvențe similare celor umane. Exemple de tehnici de umanizare, inclusiv de selecție a cadrelor acceptor umane sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și includ grefarea CDR (WO1992/01047), resurfacing (US 5,225,539), resurfacing-ul reziduurilor cu specificitate determinată (US 6,818,749), adaptarea umană (sau adaptarea cadrului uman) (Palin. Mol. Immunol. 1991, no. 28, p. 489-499), supraumanizare (US 2010/0261620) și selecția ghidată (US2009/0118127; US 7,709,226).

Anticorpul umanizat pot fi ulterior optimizați pentru îmbunătățirea selectivității sau afinității lor la un antigen desirabil prin incorporarea reziduurilor modificate de suport al cadrului pentru păstrarea afinității de adeziune (mutații inverse) prin tehnici cunoscute (Osborn et al. Methods, 2005, no. 36, p. 61-68; US 5,565,332; WO1990/007861).

Proprietățile efectoare imune ale anticorpilor prezentei invenții pot fi modulate prin modificări Fc prin metode cunoscute specialiștilor în domeniu. De exemplu, funcțiile efectoare Fc, cum ar fi legarea C1q, citotoxicitatea dependentă de complement (CDC), citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorpi (ADCC), fagocitoza, diminuarea reglării receptorilor celulari de suprafață (de exemplu, receptorului celulelor B; BCR), etc. pot fi modulate prin modificarea reziduurilor în Fc, responsabile pentru aceste activități, prin adeziunea la receptorii Fc gama de activare (FcγR) FcγRI, FcγRIIa sau FcγRIII, sau la receptorul inhibitor FcγRIIb. Proprietățile farmacocinetice pot fi, de asemenea, îmbunătățite prin mutația reziduurilor în domeniul Fc, care extinde timpul de înjumătățire a anticorpului prin modularea afinității de legare a Fc la receptorul Fc neonatal FcRn. Exemplele de modificări Fc sunt IgG4 S228P/L234A/L235A, IgG2 M252Y/S254T/T256E (WO1992/22653) sau IgG2 V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 sau V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S (Dall'Acqua et al. J. Biol. Chem., 2006, no. 281:235, p. 14-24; WO2011/066501) (numerotare a reziduurilor, conform Indicelui UE). Afinitatea anticorpului Fc la FcγRIIb inhibitor poate fi mărită pentru a amplifica semnalele anticorpului de reticulare încrucișată și agoniste. Exemplele de modificări Fc care sporesc legarea Fc la FcγRIIb sunt S267E/L328F și E233D/G237D/H268D/P271G/A330R (reziduu numerotat, conform Indicelui UE).

Prezenta invenție mai prevede un anticorp izolat, care se leagă la CD134 uman, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 98 și o regiune variabilă a lanțului greu (VH), conținând regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR) HCDR1, HCDR2 și HCDR3, având opțional 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VL a SEQ ID NO: 98.

SEQ ID NO: 98:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX₅KLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYX₆CQQGNTLPWTFGQGTKVEIKR,

în care X₅ reprezintă V sau P; și

X₆ reprezintă F sau Y.

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpul izolat conține VH conținând secvența aminoacidă SEQ ID NO: 134, având opțional 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VH a SEQ ID NO: 134.

SEQ ID NO: 134

QVQLVQSGAEX₁KKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWX₂GYINPYN
X₃GTKYNEKFKGRX₄TX₅TSDX₆SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSX₇DYWGQ
GTLVTVSS;

în care

X₁ reprezintă V sau L;

X₂ reprezintă M sau I;

X₃ reprezintă D, G, A, S sau E;

X₄ reprezintă V sau A;

X₅ reprezintă L sau I;

X₆ reprezintă T sau K; și

X₇ reprezintă M, L sau I

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține VH conținând secvența aminoacidă SEQ ID NO: 97, având opțional 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VH a SEQ ID NO: 97.

SEQ ID NO: 97:

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWX₁GYINPYN
DGTKYNEKFKGRX₂TX₃TSDX₄SASTAYMELSSLRSED₅TAVYYCANYYGSSLSMDYWGQG
TLVTVSS;

în care

X₁ reprezintă I sau M;

10 X₂ reprezintă A sau V;

X₃ reprezintă L sau I; și

X₄ reprezintă K sau T.

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține VL a SEQ ID NO: 99 și VH a SEQ ID NO: 134.

15 În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține HCDR3 conținând amino acid secvenței aminoacide SEQ ID NO: 8, 139 sau 140.

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține HCDR2 conținând amino acid secvenței aminoacide SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 sau 138.

20 În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține HCDR1 conținând secvența aminoacidă SEQ ID NO: 6.

În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține:

a. VL conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 62 sau 63; și

25 VH conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 sau 151, având opțional 1, 2 sau 3 substituții aminoacide la pozițiile rezidului aminoacid al VH linear 11, 56 sau 106; sau

b. VL și VH conțin secvențele aminoacide:

i. SEQ ID NO: 62 și 64, respectiv;

ii. SEQ ID NO: 62 și 65, respectiv;

iii. SEQ ID NO: 62 și 66, respectiv;

30 iv. SEQ ID NO: 63 și 64, respectiv;

v. SEQ ID NO: 63 și 65, respectiv; sau

vi. SEQ ID NO: 63 și 66, respectiv.

35 În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține: VL și VH ale SEQ ID NO: 62 și 64, 62 și 65, 62 și 66, 62 și 101, 62 și 102, 62 și 103, 62 și 104, 62 și 105, 62 și 106, 62 și 107, 62 și 108, 62 și 109, 62 și 110, 62 și 111, 62 și 112, 62 și 113, 62 și 114, 62 și 115, 62 și 116, 62 și 117, 62 și 118, 62 și 149, 62 și 150, 62 și 151, 63 și 64, 63 și 65, 63 și 66, 63 și 101, 63 și 102, 63 și 103, 63 și 104, 63 și 105, 63 și 106, 63 și 107, 63 și 108, 63 și 109, 63 și 110, 63 și 111, 63 și 112, 63 și 113, 63 și 114, 63 și 115, 63 și 116, 63 și 117, 63 și 118, 63 și 149, 63 și 150, 63 și 151,

40 În unele realizări ale prezentei invenții anticorpusul izolat conține 1, 2 sau 3 substituții aminoacide în pozițiile rezidului VH liniară 11, 56 sau 106.

În unele realizări ale prezentei invenții 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în pozițiile rezidului VH liniară sunt V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L sau M106I.

1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în pozițiile rezidului VH liniară 11, 55 sau 99 pot îmbunătăți stabilitatea anticorpusului și/sau amplifica activitatea agonistă.

45 Prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care conține:

(a) o regiune variabilă a lanțului greu, care conține secvența de aminoacizi din fig. 27 (SEQ ID NO: 99) sau o variantă a acelei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi; și/sau

(b) o regiune variabilă a lanțului ușor, care conține secvența de aminoacizi din fig. 27 (SEQ ID NO: 100) sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

50 Prezenta invenție mai prevede o moleculă de adeziune, care conține

(a) o regiune variabilă a lanțului greu, care conține secvența de aminoacizi din fig. 26 (SEQ ID NO: 97) sau o variantă a acelei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi; și/sau

(b) o regiune variabilă a lanțului ușor, care conține secvența de aminoacizi din fig. 26 (SEQ ID NO: 98) sau o variantă a acestei secvențe având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

55 În unele realizări molecula de adeziune se leagă la CD134 uman. În unele realizări molecula de adeziune nu împiedică legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L).

În unele realizări efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 50% pe celulele T care exprimă CD134 uman la sau depășind concentrația la care legarea la molecula CD134 menționată este saturată.

În unele realizări la o concentrație de 70 nM a moleculei de legare efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

În unele realizări moleculei de adeziune se leagă la un epitop din domeniul extracelular al CD134 uman, care cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 și/sau SEQ ID NO: 92.

În unele realizări molecula de adeziune este un fragment Fab, un fragment cu singur lanț Fv (scFv) sau un anticorp.

În unele realizări anticorpul este un anticorp IgG, IgA, IgD, IgE sau IgM, cum ar fi anticorpul IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4. În unele realizări anticorpul este un anticorp IgG1 sau IgG4.

Prezenta invenție mai prevede o moleculă de acid nucleic care codifică o moleculă de adeziune sau un anticorp, conform prezentei invenții. Se mai prevede, de asemenea, o moleculă de acid nucleic care codifică o regiune variabilă de lanț greu, un lanț greu, o regiune variabilă a lanțului ușor sau un lanț ușor al unui anticorp umanizat, conform prezentei invenții. Exemplele de anticorpi umanizați sunt anticorpii umanizați 20E5, conform prezentei invenții.

În câteva realizări molecula de acid nucleic codifică o regiune variabilă a unui anticorp umanizat al anticorpului parental de șoarece 20E5. Regiunile variabile caracteristice sunt regiunile variabile ale anticorpilor 20E5_VL1VH1; 20E5_VL1VH2; 20E5_VL1VH3; 20E5_VL2VH1; 20E5_VL2VH2 și 20E_VL2VH3. Secvențele de aminoacizi ale regiunilor variabile tipice sunt descrise în SEQ ID NR: 62, 63, 64, 65 și 66.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la o moleculă de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu a 20E5 umanizat prezentată în SEQ ID NO: 64, 65 și 66. Într-o altă realizare invenția prezintă o moleculă de acid nucleic care codifică secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor a 20E5 umanizat prezentată în SEQ ID NO: 62 sau 63.

Invenția prevede, de asemenea, o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat, care conține regiunea variabilă umanizată selectată dintre regiunile variabile umanizate ale anticorpilor 20E5_VL1VH1; 20E5_VL1VH2; 20E5_VL1VH3; 20E5_VL2VH1; 20E5_VL2VH2 sau 20E_VL2VH3 (așa cum este indicat anterior și în exemple).

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 82 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 83 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 84 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 82 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 83 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări molecula de acid nucleic care codifică lanțul greu sau ușor al unui anticorp umanizat sau regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor a unui anticorp umanizat este o moleculă de acid nucleic care codifică lanțul ușor 20E5 umanizat al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") sau lanțul greu al SEQ ID NO: 84 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

Moleculele de acid nucleic acid care codifică secvențele de aminoacizi prezente în SEQ ID NO: 62-66 și/sau SEQ ID NO: 82-86 sunt molecule de acid nucleic având secvența prezentată în SEQ ID NO: 72-76.

5 Secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 72 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 82. Acizii nucleici 58- 414 ai SEQ ID NO: 72 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 64.

Secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 73 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 83. Acizii nucleici 58 – 414 ai SEQ ID NO: 73 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 65.

10 Secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 74 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 84. Acizii nucleici 58 – 414 ai SEQ ID NO: 74 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 66.

Secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 75 codifică secvențele de aminoacizi arătate în SEQ ID NO: 85. Acizii nucleici 58 – 381 ai SEQ ID NO: 75 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 62.

15 Secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 76 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 86. Acizii nucleici 58 – 381 ai SEQ ID NO: 76 codifică secvența de aminoacizi arătată în SEQ ID NO: 63.

20 Unele realizări ale prezentei invenții se referă la o moleculă de acid nucleic conținând secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 și/sau SEQ ID NO: 76. Într-o realizare preferată molecula de acid nucleic conține secvența fără secvența de acid nucleic care codifică peptida semnal. Aceasta se datorează faptului că pot fi utilizate numeroase peptide semnal diferite. Astfel, invenția prevede o moleculă de acid nucleic conținând secvența de acid nucleic prezentată în SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 și/sau SEQ ID NO: 76, în care secvența de acid nucleic care codifică peptida semnal este absentă sau înlocuită cu o secvență de acid nucleic care codifică diferite peptide semnal potrivite pentru direcționarea excreției polipeptidei codificate.

În unele realizări prezenta invenție prevede molecule de acid nucleic conținând reziduurile de acid nucleic 58...414 of SEQ ID NO: 72;
30 reziduurile de acid nucleic 58...414 of SEQ ID NO: 73;
reziduurile de acid nucleic 58...414 of SEQ ID NO: 74;
reziduurile de acid nucleic 58...381 of SEQ ID NO: 75 sau
reziduurile de acid nucleic 58...381 of SEQ ID NO: 76.

În unele realizări prezenta invenție se referă la o moleculă de acid nucleic care codifică regiunea variabilă a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 101...118 sau 149...151.

Prezenta invenție se mai referă la un vehicul de livrare a genelor sau la un vector care conține un acid nucleic, conform invenției.

40 În continuare prezenta invenție se referă la o celulă izolată sau recombinantă, sau la culturi de celule *in vitro* conținând un acid nucleic sau un vector, conform invenției. Celula este de preferință o celulă gazdă definită în această descriere. În unele realizări celula este o celulă frecvent utilizată pentru producerea de anticorpi, cum ar fi o celulă CHO, o celulă CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), o celulă CHO-K1 (ATCC CRL-61), o celulă NSO (Colecția Europeană de Culturi de Celule (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Marea Britanie, ECACC N. 85110503), o celulă SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1,581), o celulă HEK 293-F, o celulă PER.C6, o celulă FO (ATCC CRL-1646), o celulă Ag653 (ATCC CRL-1580) sau un hibridom. Într-o altă realizare celula este o celulă de insectă.

Prezenta invenție se mai referă la o metodă pentru producerea unei molecule de adeziune caracterizată prin aceea, că se produce o moleculă de adeziune, conform revendicărilor, sau un anticorp, conform revendicărilor. Anticorpul produs este colectat din cultura de celule, supernatantul culturii de celule/ mediu sau dintr-o combinație a acestora. Anticorpul colectat este purificat și ambalat într-un container, de preferință un container de depozitare sau de transport.

Invenția se mai referă la o moleculă de adeziune sau la un anticorp, conform prezentei invenții, pentru utilizare în tratamentul unui individ, care are nevoie de îmbunătățirea unui răspuns imun.

55 De asemenea este prevăzută o moleculă de adeziune sau un anticorp, conform prezentei invenții, pentru utilizare în prevenirea sau tratarea cancerului la un individ care are nevoie de aceasta.

În continuare prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune sau un anticorp, conform invenției, pentru utilizare în tratamentul unui individ suferind de sau cu risc de a suferi o infecție viral și/sau bacteriană intracelulară cronică.

5 Prezenta invenție mai prevede o compoziție farmaceutică, care conține o moleculă de adeziune sau un anticorp, conform invenției, și un purtător farmaceutic acceptabil.

Prezenta invenție prevede molecule de adeziune izolate, care se leagă la CD134 uman, inclusiv la anticorpi anti-CD134, fragmente de legare a antigenului ale anticorpilor anti-CD134 și derivați ai anticorpilor anti-CD134. Moleculele de adeziune se caracterizează prin, cel puțin, una dintre următoarele proprietăți funcționale: (a) se leagă la CD134 uman cu K_d de 1×10^{-6} M sau mai puțin și (b) nu împiedică legarea receptorului CD134 (OX40) uman la ligandul OX40 (OX40L); (c) are activitate de agonist asupra CD134 uman pe celule T efectoare și/sau activitate de antagonist pe CD134 uman pe celulele T reglatoare; (d) nu se leagă la receptorul CD40 în concentrație de până la 500 nM; (e) nu se leagă la receptorul CD137 în concentrații de până la 500 nM; (f) nu se leagă la receptorul CD271 în concentrații de până la 500 nM; (g) sunt capabile să intensifice producerea de IL-2 de către celulele T umane izolate; (h) sunt capabile să intensifice răspunsului imun; (i) sunt capabile să inhibe creșterea celulelor tumorale și (j) au efect terapeutic asupra unui cancer. În unele realizări molecula de adeziune se leagă la CD134 uman cu K_d de 1×10^{-7} M sau mai puțin, sau 1×10^{-8} M sau mai puțin, sau 5×10^{-9} M sau mai puțin.

20 Anticorpii și alte molecule de adeziune ale prezentei invenții pot fi preparate prin tehnici uzuale și apoi sortate pentru a identifica și obține molecule de adeziune care nu împiedică legarea OX40L la CD134. De exemplu, molecule de adeziune care leagă CD134, chiar și atunci când CD134 a fost expus la o concentrație de saturație de OX40L, pot fi selectate.

Unele realizări ale prezentei invenții prevăd un anticorp de șoarece, uman sau umanizat care se leagă la CD134 uman. În unele realizări anticorpul de șoarece, uman sau umanizat este un anticorp monoclonal care se leagă specific la CD134 uman cu K_d de 100 nM sau mai puțin sau de 10 nM sau mai puțin și/sau are activitate agonistă asupra CD134 uman determinând stimularea celulelor T efectoare și/sau supresia celulelor T reglatoare. Un astfel de anticorp monoclonal tipic este clona anticorpului monoclonal 20E5. Secvența de aminoacizi a întregii lanț greu regiunii variabile și secvențele de aminoacizi ale celor trei CDR ale regiunii variabile a lanțului greu (VH) a clonei anticorp 20E5 sunt prezentate în SEQ ID NO: 4 și 6...8, respectiv. Secvența de aminoacizi a întregii regiuni variabile a lanțului ușor și secvențele de aminoacizi ale celor trei CDR ale regiunii variabile a lanțului ușor (VL) din clona anticorpului 20E5 sunt prezentate în SEQ ID NO: 5 și 9...11, respectiv. Încă alți anticorpi tipici sunt anticorpii umanizați 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2, 20E5_VL2VH3 și variantele optimizate ale acestora conținând regiunile variabile ale lanțului greu, cum este descris în exemplul 13. Acești anticorpi conțin secvențele regiunii variabile ale SEQ ID NO: 62 (20E5_VL1), SEQ ID NO: 63 (20E5_VL2), SEQ ID NO: 64 (20E5_VH1), SEQ ID NO: 65 (20E5_VH2), SEQ ID NO: 66 (20E5_VH3), regiunile variabile sunt prezentate în tabelele 6 și 9, având secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NO: 101...118 și 149...151.

40 Prezenta invenție se referă, de asemenea, la anticorpi conținând regiunea variabilă umanizată selectată dintre regiunile variabile umanizate ale anticorpilor 20E5_VL1VH1; 20E5_VL1VH2; 20E5_VL1VH3; 20E5_VL2VH1; 20E5_VL2VH2 sau 20E5_VL2VH3 (cum se indică anterior și în exemple) sau regiuni variabile ale lanțului greu ale SEQ ID NO: 101...119 și 149...151.

În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 82 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 83 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

50 În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 85 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 84 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 82 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 83 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

În unele realizări anticorpul umanizat este un anticorp 20E5 umanizat conținând lanțul ușor al SEQ ID NO: 86 (minus secvența semnal N-terminală "MEWSGVFMFLSVTAGVHS") și lanțul greu al SEQ ID NO: 84 (minus secvența semnal "MEWSGVFMFLSVTAGVHS").

Anticorpul prezentei invenții pot conține una sau mai multe dintre aceste CDR, sau una sau mai multe dintre aceste CDR cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi pentru CDR. Substituțiile pot fi substituții "conservative". Substituțiile conservative, care se referă la aminoacizi similari funcționali, sunt bine cunoscute în domeniu și sunt descrise, de exemplu, în tab. 1 (US 6,737,056), care este încorporat aici prin referință. Exemple de substituții conservative sunt prezentate în tab. 1. Aminoacizii sunt indicați folosind bine cunoscutul cod din trei litere.

Tabelul 1

Aminoacidul original	Substituție conservativă tipică
Ala	Val, Ile, Leu, Gly, Ser
Arg	Lys, His, Glu, Asn
Asn	Glu, His, Lys, Arg
Asp	Glu, Asn
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp, Glu
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Nle
Leu	Nle, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Glu, Asn, His
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala, Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, leu, Phe, Ala, Nle

Moleculele care conțin doar una sau două regiuni CDR (în unele cazuri, chiar și numai o singură regiune CDR sau o parte a acesteia, în special CDR3) sunt capabile să rețină activitatea de legare la antigen a anticorpului din care sunt derivate CDR. (WO 2010/019702; Laune et al. JBC, 1997, no. 272, p. 30937-44; Monnet et al. JBC 1999, no. 274, p. 3789-96; Qiu et al. Nature Biotechnology, 2007, no. 25, p. 921-992; Ladner et al. Nature Biotechnology, 2007, 25, p. 875-877; Heap et al. J. Gen. Virol., 2005, no. 86, p. 1791-1800; Nicaise et al. Protein Science, 2004, no. 13, p. 1882-1891; Vaughan și Sollazzo Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2001, no. 4, p. 417-430; Quijcho Nature, 1993, no. 362, p. 293-294; Pessi et al. Nature, 1993, no. 362, p. 367-369).

Respectiv, un exemplu de realizare a prezentei invenții prezintă un anticorp Anti-CD134 umanizat, care conține: (a) o regiune variabilă a lanțului grele, conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 4; (b) o regiune variabilă a lanțului ușor, conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 5.

Intr-o altă realizare a prezentei invenției este prevăzută o moleculă izolată de adeziune CD134, care conține: (a) un lanț greu CDR1, conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 6; și/sau (b) un lanț greu CDR2, conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 7 și/sau (c) un lanț greu CDR3 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 8.

Intr-o altă realizare a prezentei invenției este prevăzută o moleculă izolată de adeziune CD134, care conține: (a) un lanț ușor CDR1 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 9; și/sau (b) un lanț ușor CDR2 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 10; și/sau (c) un lanț ușor CDR3 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 11.

Clasa (de exemplu, IgG, IgM, IgE, IgA sau IgD) și subclasa (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4) anticorpilor anti-CD134 poate fi determinată prin orice metodă indicată, cum ar fi prin ELISA sau Western Blot, precum și prin alte metode. În mod alternativ, clasa și subclasa pot fi determinate prin secvențierea tuturor sau a unei părți dintre domeniile constante ale lanțurilor grele

și/sau uşoare ale anticorpilor, comparând secvenţele lor de aminoacizi cu secvenţele cunoscute de aminoacizi din diferite clase și din diferite subclase de imunoglobuline, determinând clasa și subclasa anticorpilor. Anticorpul anti-CD134 pot fi molecule de IgG, IgM, IgE, IgA sau IgD. De exemplu, anticorpul anti-CD134 poate fi o IgG, care este din subclasa IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.

5 Astfel, un alt aspect al invenției prevede o metodă de transformare a clasei sau subclasei unui anticorp anti-CD134 într-o altă clasă sau subclasă.

În unele realizări anticorpul anti-CD134 este al izotipului IgG4. Moleculele de adeziune, conform unei realizări a invenției, includ anticorpi monoclonali, fragmente ale acestora, peptide și alte structuri chimice. Anticorpul monoclonal pot fi produși printr-o metoda uzuală de imunizare a

10 unui mamifer, urmată de izolarea celulelor B plasmactice, producând anticorpii monoclonali de interes și fuziunea cu o celulă de mielom.

În diverse variante, în loc să fie un anticorp real, fragmentul de legare poate mima un anticorp (de exemplu, pe bază de schelet neanticorp), un aptamer ARN, o moleculă mică sau un CovX-corp.

15 Se consideră, că anticorpii care mimează (de exemplu, structuri de schelet neanticorp, care au un grad înalt de stabilitate și, totuși, permit introducerea variabilității în anumite poziții) pot fi utilizați pentru a crea biblioteci moleculare, din care pot fi derivate aceste reziduuri de legare. Specialiștii în domeniul biochimiei cunosc mai multe astfel de molecule. Aceste molecule pot fi utilizate ca fragment de legare la agentul din prezenta invenție.

20 Sunt discutate numeroase exemple de anticorpi care mimează (Bianchi et al. J. Mol. Biol., 1994, no. 236, p. 649-659) și includ: afficorpi (de asemenea numiți Trinectine; (Gao et al. J. Biol. Chem., 1994, no. 269, p. 32389-32393); CTLD (de asemenea numiți Tetranectine; (Skerra et al. Curr. Opin. Biotech., 2007, no.18, p. 295-304); adnectine (de asemenea numite monocorpi; (Nygren et al. FEBS J., 2008, no. 275, p. 2668-2676); anticaline (Thogersen et al. Innovations Pharmac. Technol. 2006, p. 27-30); DARPine (ankirine; (Koide et al. Meth. Mol. Biol., 2007, no. 352, p. 95-109); avimeri (Schlehuber et al. Drug Discovery Today, 2005, no. 10, p. 23-33); microcorpi (Binz et al. Nat. Biotechnol., 2004, no. 22, p. 575-582); aptameri peptidici (Silverman et al. Nat. Biotechnol., 2005, no. 23, p. 1556-1561); domenii Kunitz (Krause et al. FEBS J., 2007, no. 274, p. 86-95); afile (Borghouts et al. Expert. Opin. Biol. Ther., 2005, no. 5, p. 783-797).

30 Prin urmare, este de preferat ca anticorpul mimic să fie selectat din grupa care conține sau constă din: afficorpi, tetranectine (CTLD), adnectine (monocorpi), anticaline, DARPine (ankirine), avimeri, iMab, microcorpi, aptameri peptidici, domenii Kunitz, aptameri și afile.

Prin "moleculă mică" se subînțelege un compus organic cu o greutate moleculară mică de 900 Daltoni sau mai puțin. Deși biopolimerii mari, cum ar fi acizii nucleici, proteinele și polizaharidele (cum ar fi amidonul sau celuloza) nu sunt incluse ca "molecule mici", sunt incluși monomerii constitutivi ai acestora (ribo- sau dezoxiribonucleotidele, aminoacizii și monozaharidele, respectiv) și oligomerii (adică polimerii scurți, cum ar fi dinucleotidele, peptidele, cum ar fi glutatationul antioxidant, și dizaharidele, cum ar fi zaharoza). Producerea de molecule mici este descrisă în literatura de specialitate (Attucci et al. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2006, no. 318, p. 803-809; Hey et al. Trends. Biotechnol. 2005, no. 23, p. 514-522).

40 *Corpii CovX* sunt creați prin legare covalentă a unui farmacofor printr-o legătură cu situsul de legare al unui anticorp special proiectat, reprogramand eficient anticorpul (Mayes & Whitcombe, Adv. Drug Deliv. Rev., 2005, no.57, p.1742-1778). Rezultatul este o nouă clasă de structuri chimice, care se formează, în care fiecare component contribuie cu trăsături dezirabile la *corpul CovX* intact - în special, structura posedă acțiunile biologice ale peptidei și timpul prelungit de înjumătățire al anticorpului.

Anticorpul uman pot fi obținuți prin mai multe metode diferite, inclusiv prin utilizarea bibliotecilor de expresie a imunoglobulinelor umane (Stratagene Corp., La Jolla, California; Cambridge Antibody Technology Ltd., London, Anglia) pentru a produce fragmente de anticorpi umani (VH, VL, Fv, Fd, Fab, sau (Fab')₂), și de a utiliza aceste fragmente pentru a construi anticorpi umani întregi prin fuziunea porțiunii respective în acest sens, folosind metode similare celor pentru producerea de anticorpi himerici. De exemplu, anticorpul uman pot fi izolați din bibliotecii de afişare din fagi care exprimă regiunile variabile ale lanțului greu și lanțului ușor ale anticorpului ca proteine de fuziune cu proteina de înveliș a bacteriofagului pIX (Root-Bernstein & Dillon. Curr. Pharm. Des., 2008, no. 14, p. 55-62; Tryder et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, no. 17, p. 501-506). Anticorpul uman pot fi, de asemenea, produși în șoareci transgenici cu un genom de imunoglobulină umană. Astfel de șoareci sunt disponibili, de exemplu, de la Abgenix, Inc., Fremont, Regeneron (<http://www.regeneron.com>), Harbour Antibodies (<http://www.harbourantibodies.com>), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT)

(http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) și Ablexis (http://_www_ablexis.com). Adițional la conectarea regiunilor Fv ale lanțului greu și ale lanțului ușor pentru formarea unui singur lanț peptidic, Fab pot fi construite și exprimate prin metode similare (Shi et al. J. Mol. Biol. 2010, no. 397, p. 385-396).

Anticorpul Delimmunized™ reprezintă anticorpi, la care au fost eliminați epitopii celulelor T potențial imunogene (WO 09/085462). Prin urmare, se așteaptă că imunogenitatea la oameni va fi eliminată sau redusă substanțial, atunci când aceștia vor fi aplicați *in vivo*. Moleculele de adeziune, conform invenției, pe bază de imunoglobuline, pot avea epitopii lor imunogeni T celulari (dacă sunt prezenți), eliminați prin astfel de metode.

Toți anticorpul integral și parțial umani, descriși mai sus, sunt mai puțin imunogeni, decât anticorpul integral murin sau non-uman-derivați, cum sunt fragmentele și anticorpul cu o singură catenă. Este mai puțin probabil, prin urmare, ca toate aceste molecule (sau derivați ai acestora) să evoce un răspuns imun sau alergic. Ca rezultat, ele sunt mai potrivite pentru administrarea *in vivo* la oameni decât anticorpul non-uman în totalitate, în special atunci când este necesară administrarea repetată sau pe termen lung.

Anticorpul bispecific pot fi utilizați în calitate de agenți de legare încrucișată între CD134 umani din aceeași celulă țintă umană, sau CD134 umani de pe două celule țintă umane diferite. Astfel de anticorpi bispecifici au o specificitate pentru fiecare din cei doi epitopi diferiți de pe CD134 uman. Acești anticorpi și metoda de producere a acestora sunt descrise în literatura brevetară (M.J. Evans et al. J. Immunol. Meth., 1995, no. 184, p. 123-138) (Creative Biomolecules, Inc). Diferite variante de anticorpi bispecifici, descrise în brevet, includ legarea lanțului unic Fv cu cuplatorii de peptide, incluzând Ser-Cys, (Gly)₄-Cys, (His)₆-(Gly)₄-Cys, agenți de chelatizare, și cuplaje chimice sau disulfidice, inclusiv bismaleimidohehexan și bismaleimidocaproil.

Regiunile VL și/sau VH ale anticorpilor prezentei invenții pot fi proiectate în alte realizări de anticorpi bispecifici cu lungime completă, în care fiecare braț al anticorpului se leagă la un antigen sau epitop diferit. Astfel de anticorpi bispecifici pot fi produși, de exemplu, prin modularea interacțiunilor CH3 între lanțurile grele ale doi anticorpi pentru a forma anticorpi bispecifici folosind tehnologiile descrise în literatura de brevet (GB 98/01473; US 5,534,254; US 7,695,936; WO2004/111233; US2010/0015133; US2007/0287170; WO2008/119353; US 2009/0182127; US 2010/0286374; US 2011/0123532; WO 2011/131746). Structuri bispecifici suplimentare în care pot fi încorporate regiunile VL și/sau VH ale anticorpilor prezentei invenție sunt, de exemplu, imunoglobuline cu domeniu dublu variabil (WO 2011/143545) sau structurile care includ diverse domenii de dimerizare pentru conectarea celor două brațe de anticorpi cu specificitate diferită, cum ar fi leucina fermoar sau domenii de dimerizare a colagenului (US 2012/0149876; WO 2009/134776; WO 2012/022811).

Moleculele non-anticorpi pot fi izolate sau sortate de bibliotecile chimice prin metode uzuale. Un sistem automat pentru formarea și analiza unei biblioteci chimice este deja descris (US 5,932,448; US 6,833,441). O abordare mai focalizată implică modelarea tridimensională a situsului de legare, și, ulterior, producerea unei familii de molecule care se potrivesc modelului. Acestea sunt apoi sortate pentru identificarea celor cu caracteristici optime de legare.

O altă abordare ar consta în formarea bibliotecilor de peptide recombinante și, ulterior, analiza acestora pentru a identifica peptidele care se leagă la epitopul CD134 uman, care prezintă interes (US 5,901,069). Acest epitop este același cu cel legat de anticorpul monoclonal, descriși în exemple în continuare. Moleculele pot, de fapt, să fie generate sau izolate cu o facilități relativă în conformitate cu metodele bine cunoscute din domeniu, odată ce epitopul este cunoscut.

O altă variantă de realizare prevede derivații oricăruia dintre anticorpul anti-CD134, așa cum este descris mai sus. Într-un aspect particular, derivatul anticorpului își are originea din modificările secvențelor de aminoacizi ale clonei 20E5. Secvențele de aminoacizi din oricare regiuni ale lanțurilor de anticorpi pot fi modificate, cum ar fi regiunile suport, regiunile CDR sau regiunile constante. Modificările pot fi introduse prin metode standard cunoscute în domeniu, cum ar fi mutageneza direcționată pe situs și mutageneza aleatorie, mediată de PCR, și pot cuprinde aminoacizi naturali, precum și nenaturali. Tipurile de modificări includ inserții, deleții, substituții sau combinații ale acestora, ale unui sau mai multor aminoacizi dintr-un anticorp anti-CD134. În unele variante, derivatul anticorpului cuprinde 1, 2, 3 sau 4 substituții de aminoacizi în regiunile lanțurilor grele CDR și/sau o substituție de aminoacid în regiunile lanțurilor ușoare CDR. În unele variante aplicate, un derivat al unui anticorp anti-CD134 conține una sau mai multe substituții de aminoacizi în raport cu secvența de aminoacizi a liniei germinale din gena umană. Într-o variantă

particulară, una sau mai multe dintre aceste substituții ale liniei germinale se află în regiunea lanțului greu CDR2. Într-un alt model particular de realizare, substituțiile de aminoacizi în raport cu linia germinală se află în una sau mai multe dintre aceleași poziții, ca și substituțiile în raport cu linia germinală din clona 20E5 a anticorpului. Într-o altă variantă de realizare, substituția de aminoacizi va modifica una sau mai multe cisteine dintr-un anticorp la un alt reziduu, cum ar fi, fără limitare, alanina sau serina. Cisteina poate fi o cisteină canonică sau una necanonică. Substituția poate fi făcută într-o regiune CDR sau într-o regiune suport a unui domeniu variabil, sau în domeniul constant al unui anticorp. Un alt tip de substituție aminoacidă va elimina perechile asparagină-glicină, care formează situsuri potențiale de dezaminare, prin modificarea unuia sau a ambelor reziduuri. În alte variante substituția aminoacidului este o substituție de aminoacid conservativă. Într-o variantă de realizare, derivatul anticorpului are 1, 2, 3 sau 4 substituții de aminoacizi conservative în regiunile catenei grele CDR în raport cu secvența de aminoacizi a clonei 20E5. Un alt tip de modificare a unui anticorp anti-CD134 este modificarea modelului inițial de glicozilare a anticorpului. Termenul de "modificare" se referă la eliminarea uneia sau mai multor părți de carbohidrat, găsite în anticorp, și/sau adăugarea unuia sau mai multor situsuri de glicozilare, care nu sunt prezente în anticorp.

Glicozilarea anticorpilor este, de obicei, N-legată. N-legat se referă la atașarea fragmentului carbohidrat la catena laterală a unui reziduu de asparagină. Exemplele de alte modificări includ acilarea, amidarea, acetilarea, legarea încrucișată, ciclizarea, formilarea, hidroxilarea, iodurarea, metilarea, miristoilarea, formarea legăturilor disulfidice, demetilarea, formarea de legături încrucișate covalente, formarea de cisteină, oxidarea, fosforilarea, prenilarea, pegilarea, procesarea proteolitică și sulfatarea.

O altă variantă de realizare prevede un derivat de anticorp conținând un anticorp anti-CD134, sau fragmentul de legare a antigenului acestuia, conform prezentei invenții, legat la o structură moleculară suplimentară. Exemplele de structuri moleculare suplimentare includ agenți farmaceutici, peptide sau proteine și agenți de detectare sau de marcaj. Exemplele specifice de agenți farmaceutici, care pot fi legați la un anticorp anti-CD134, includ agenți citotoxici sau alți agenți anticanceroși și izotopi radioactivi. Exemplele specifice de peptide sau proteine, care pot fi legate la un anticorp anti-CD134, includ anticorpi, care pot fi reprezentați de același anticorp anti-CD134 sau de un anticorp diferit. Exemplele specifice de agenți de detectare sau marcaj, care pot fi legați de un anticorp anti-CD134 includ: (1) compuși fluorescenți, cum ar fi fluoresceina, izotiocianatul de fluoresceină, ficoeritrina, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalensulfonil clorură și fosfor lantanidele; (2) enzime, cum ar fi peroxidaza extrasă din hrean, fosfataza alcalină, luciferaza și glucozooxidaza; (3) biotina; (4) un epitop polipeptidic predeterminat, recunoscut de un reporter secundar, cum ar fi secvențele de perechi de leucină fermoar, domeniile de legare a metalelor, vârfuri de epitopi și situsuri de legare pentru anticorpi secundari. O altă variantă de realizare prevede un derivat de anticorp, care este o formă multimerică a unui anticorp anti-CD134, cum ar fi dimeri, trimeri de anticorpi sau multimeri de ordin superior ai anticorpilor monomerici. Monomerii individuali din cadrul unui multimer de anticorp pot fi identici sau diferiți, adică, ei pot fi multimeri heteromerici sau homomerici de anticorpi. Multimerizarea anticorpilor poate fi realizată prin agregare naturală. De exemplu, un anumit procent de preparate purificate de anticorpi (de exemplu, molecule IgG1 purificate) formează spontan agregate de proteine, care conțin homodimeri de anticorpi și alți multimeri de anticorpi de ordin superior. Alternativ, homodimerii de anticorp pot fi formați prin metode de legare chimică, cunoscute în domeniu. Agenții de reticulare corespunzători includ pe cei care sunt heterobifuncționali, cum ar fi esterul m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimidă, N-succinimidil-S-acetiltio-acetatul și succinimidil 4 - (maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilatul sau homobifuncționali (cum ar fi disuccinimidil suberatul). Astfel de linkeri sunt comercial accesibili. Anticorpul pot fi, de asemenea, multimerizați prin metode de ADN recombinant, cunoscute în domeniu.

O altă variantă de realizare prevede un derivat de anticorp, care este un anticorp himeric, conținând o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-CD134 uman, descris aici anterior. Într-un alt exemplu, toate regiunile CDR ale anticorpului himeric sunt derivate de la anticorpi anti-CD134 umani. Într-un alt exemplu, CDR de la mai mult de un anticorp anti-CD134 uman sunt combinate într-un anticorp himeric. Mai mult decât atât, un anticorp himeric poate conține regiunile suport, derivate de la un anticorp anti-CD134 uman, și una sau mai multe regiuni CDR de la unul sau mai mulți anticorpi umani diferiți. Anticorpul himeric pot fi generați folosind metode uzuale cunoscute în domeniu. În unele variante particulare, anticorpul himeric conține una, două sau trei regiuni CDR din regiunea variabilă a lanțului greu sau din regiunea variabilă a lanțului ușor a unui anticorp selectat din clona 20E5 a anticorpului.

Exemplele de alți derivați de anticorpi, conform prezentei invenții, includ anticorpii cu un singur lanț, diacorpii, anticorpii de domeniu, nanocorpii și unicorpii. În unele variante anticorpii monoclonali pot fi anticorpi himerici, anticorpi umanizați, anticorpi umani, anticorpi Delmimmunized™, anticorpi cu un singur lanț, fragmente, inclusiv Fab, F(ab')₂, Fv sau alte
5 fragmente, care păstrează funcția de legare la antigen a anticorpului sursă. Anticorpii cu un singur lanț ("ScFv") și metoda de construcție este cunoscută (US 5,463,564).

Un "anticorp cu un singur lanț" (scFv) constă dintr-un singur lanț polipeptidic, care cuprinde un domeniu VL legat la un domeniu VH, unde domeniul VL și VH sunt împerecheate pentru a
10 forma o moleculă monovalentă. Anticorpii cu un singur lanț pot fi produși în conformitate cu metoda cunoscută în domeniu (US 5,723,322; US 4,946,778). Un "diacorp" constă din două lanțuri, fiecare lanț conținând o regiune variabilă a lanțului greu conectată la o regiune variabilă a lanțului ușor pe același lanț polipeptidic, cuplat printr-o peptidă scurtă de legătură, în care cele două regiuni de pe același lanț nu se cuplează una cu alta, dar cu domenii complementare de pe
15 celălalt lanț, pentru a forma o moleculă bispecifică. Metodele de preparare a diacorpilor sunt cunoscute în domeniu (Bird et al. Science, 1988, no. 242, p. 423-426; Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, no. 85, p. 5879-5883). Anticorpii de domeniu (dAc) sunt unități funcționale mici de legare a anticorpilor, care corespund regiunilor variabile ale lanțurilor grele sau ușoare ale anticorpilor. Anticorpii de domeniu sunt bine exprimați în sistemele de celule ale bacteriilor, drojdiilor și mamiferelor. Detaliile suplimentare despre anticorpii de domeniu și metodele de
20 producere ale acestora sunt cunoscute în domeniu (Holliger P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, no. 90, p. 6444-6448; Poljak R. J. et al. Structure, 1994, no. 2, p. 1121-1123; US 6,291,158; US 6,582,915; US 6,593,081).

Nanocorpii derivă din lanțurile grele ale unui anticorp. Un nanocorp conține, de obicei, un singur domeniu variabil și două domenii constante (CH2 și CH3), și păstrează capacitatea de
25 legare a antigenului a anticorpului original. Nanocorpii pot fi produși prin metode cunoscute în domeniu (WO 04/003019; WO 03/002609; US 6,765,087). Unicorpii sunt alcătuiți dintr-un lanț ușor și un lanț greu al unui anticorp IgG4. Unicorpii pot fi creați prin înlăturarea regiunii balama a anticorpilor IgG4. Detalii suplimentare despre unicorpi și metodele de preparare sunt prezentate în literatura brevatară (US 6,838,254).

Adițional la fragmentul de legare, moleculele prezentei invenții mai pot conține un fragment pentru creșterea timpului de înjumătățire *in vivo* al moleculei, cum ar fi, dar nefiind exhaustiv, polietilenglicol (PEG), albumină serică umană, grupe de glicozilare, acizi grași și dextran. Astfel de fragmente suplimentare pot fi conjugate sau combinate în alt mod cu fragmentul de legare,
30 folosind metode bine cunoscute în domeniu.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de acid nucleic, care codifică o secvență de aminoacizi a unei molecule de adeziune, care leagă CD134, conform primului aspect al invenției. Secvența de aminoacizi, codificată de către molecula de acid nucleic, poate fi orice porțiune a unui anticorp intact, cum ar fi CDR, o secvență care conține una, două sau trei CDR,
35 sau o regiune variabilă a unui lanț greu sau ușor, sau aceasta poate fi un lanț greu sau un lanț ușor cu o lungime completă. În unele realizări molecula de acid nucleic codifică o secvență de aminoacizi, care cuprinde: (1) o regiune CDR3, în special o regiune CDR3 a unui lanț greu al clonei 20E5 a anticorpului; (2) o regiune variabilă a unui lanț greu sau o regiune variabilă a unui lanț ușor al clonei 20E5 a anticorpului; sau (3) un lanț greu sau un lanț ușor al clonei 20E5 a anticorpului. În alte realizări molecula de acid nucleic codifică o polipeptidă care conține o
40 secvență de aminoacizi selectată din grupa constând din SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 sau 19, sau din grupa constând din SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau 11.

Moleculele de acid nucleic, conform prezentei invenții, pot fi obținute din orice sursă, care produce un anticorp CD134, în conformitate cu invenția. ARNm de la celulele producătoare de anticorpi anti-CD134 poate fi izolat prin metode standard, clonat și/sau amplificat prin PCR și
50 tehnici de construcție a bibliotecilor și sortat folosind protocoale standard pentru a obține molecule de acid nucleic, care codifică o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-CD134. ARNm poate fi utilizat pentru a produce ADNc pentru utilizarea acestuia în reacția de polimerizare în lanț (PCR) sau clonarea ADNc al genelor de anticorpi. Intr-o variantă, molecula de acid nucleic este obținută dintr-un hibridom care exprimă un anticorp anti-CD134, cum este descris mai sus, de preferință, un hibridom care are în calitate de unul dintre partenerii săi de fuziune o celulă non-umană de animal transgenic, care exprimă gene de imunoglobulină umană. Într-o altă variantă, hibridomul este derivat de la un animal non-transgenic, non-uman.

O moleculă de acid nucleic, care codifică lanțul greu al unui anticorp anti-CD134, poate fi construită prin fuzionarea unei molecule de acid nucleic, care codifică regiunea variabilă a lanțului

greu, cu o moleculă de acid nucleic, care codifică o regiune constantă a unui lanț greu. În mod similar, o moleculă de acid nucleic, care codifică lanțul ușor al unui anticorp anti-CD134 poate fi construită prin fuzionarea unei molecule de acid nucleic, care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor cu o moleculă de acid nucleic, care codifică o regiune constantă a unui lanț ușor. Moleculele de acid nucleic, care codifică lanțul VH și VL, pot fi transformate în gene de anticorpi cu lungime completă prin inserarea acestora în vectori de expresie, care deja codifică regiunile constante ale lanțului greu și regiunile constante ale lanțului ușor, respectiv, astfel încât segmentul VH este legat operațional la segmentul (segmentele) regiunii constante a lanțului greu (CH) din vector și segmentul VL este legat operațional la segmentul regiunii constante a lanțului ușor (CL) din vector. În mod alternativ moleculele de acid nucleic, care codifică lanțurile VH sau VL, sunt transformate în gene de anticorpi cu lungime completă prin unirea, de exemplu, ligarea, moleculei de acid nucleic, care codifică un lanț VH la o moleculă de acid nucleic, care codifică un lanț CH, folosind metode standard de biologie moleculară. Același lucru se poate realiza folosind molecule de acid nucleic, care codifică lanțurile VL și CL. Moleculele de acid nucleic, care codifică lanțurile grele și/sau ușoare cu lungime completă, pot fi apoi exprimate într-o celulă în care au fost introduse și anticorpii anti-CD134 izolați.

Moleculele de acid nucleic pot fi folosite pentru expresia recombinantă a unei cantități mari de anticorpi anti-CD134, cum este descris în continuare. Moleculele de acid nucleic pot fi, de asemenea, utilizate pentru a produce alte molecule de adeziune, conform prezentei invenții, cum ar fi anticorpii himerici, anticorpii cu un singur lanț, imunoadezinele, diacorpii, anticorpii mutanți și derivații de anticorpi, conform prezentei invenții. Într-o realizare o moleculă de acid nucleic este utilizată ca marker sau primer PCR pentru secvențe specifice de anticorpi. De exemplu, o moleculă marker de acid nucleic poate fi utilizată în metode de diagnostic sau o moleculă PCR primer de acid nucleic poate fi utilizată pentru a amplifica regiuni ale ADN-ului, care ar putea fi utilizate, printre altele, pentru a izola secvențe de acid nucleic pentru a fi folosite în producerea de regiuni variabile ale anticorpilor anti-CD134.

Moleculele de ADN obținute, care codifică segmentele VH și VL ale unui anticorp anti-CD134, pot fi manipulate în continuare prin tehnici de ADN recombinant, de exemplu, pentru a transforma genele regiunii variabile în genele lanțului anticorpului cu lungime completă, în gene ale fragmentului Fab, într-o genă scFv sau acestea pot fi incorporate în anticorpi bispecfici.

Intr-o altă realizare prezenta invenție prevede un vector, care conține o moleculă de acid nucleic, descrisă mai sus. Molecula de acid nucleic poate codifica o porțiune dintr-un lanț ușor sau dintr-un lanț greu (cum ar fi o regiune CDR sau o regiune variabilă), un lanț greu sau un lanț ușor cu lungime completă, o polipeptidă care conține o porțiune sau lungimea completă a unui lanț greu sau ușor, sau o secvență de aminoacizi a unui derivat al anticorpului sau un fragment de legare a antigenului.

Un exemplu de vector de expresie corespunzător este unul care codifică o secvență, completă din punct de vedere funcțional, de imunoglobulină CH sau CL umană, cu situsuri de restricție corespunzătoare, proiectate astfel, încât orice secvență VH sau VL poate fi inserată și exprimată. Vectorul de expresie, de asemenea, poate codifica o peptidă de semnalizare, care facilitează secreția secvenței de aminoacizi a lanțului anticorpului într-o celulă gazdă. ADN care codifică secvența de aminoacizi a unui lanț al anticorpului poate fi clonat în vector, astfel încât peptida de semnalizare este legată în cadrul la capătul amino-terminal al secvenței de aminoacizi din lanțul anticorpului. Peptida de semnalizare poate fi o peptidă de semnalizare imunoglobulinică sau o peptidă de semnalizare heteroloagă (adică, o peptidă de semnalizare dintr-o proteină neimunoglobulinică). Adicional la secvența de acid nucleic, care codifică o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-CD134 (VH, VL a anticorpului, gene cu lanț greu cu lungime completă și/sau lanț ușor cu lungime completă), vectorii de expresie poartă secvențe reglatoare, care controlează expresia genelor lanțului anticorpului într-o celulă gazdă. Proiectarea vectorului de expresie, inclusiv selecția secvențelor reglatoare, poate depinde de astfel de factori, cum ar fi selectarea celulei gazdă, care urmează să fie transformată, nivelul de expresie a proteinei dezirabile, etc. Secvențele reglatoare pentru expresia celulelor gazdă la mamifere includ elemente virale, care direcționează nivelurile ridicate de expresie proteică în celulele de mamifere, cum ar fi promotorii și/sau amplificatorii derivați din LTR retrovirale, citomegalovirus (CMV) (cum ar fi promotorul/amplificatorul CMV), Virusul Simian 40 (SV40) (cum ar fi promotorul/amplificatorul SV40), adenovirus, (de exemplu, promotorul tardiv principal al adenovirusului (AdMLP)), promotorii de Poliomavirus și cei puternici de mamifer, cum ar fi promotorii nativi de imunoglobulină și actină.

Celula gazdă poate fi o celulă de mamifer, insectă, plantă, bacterie sau o celulă de drojdie. Exemplele de linii celulare de mamifere, potrivite ca celule gazdă, includ celulele ovarului de hamster chinezesc (CHO), celulele NSO, celulele PER-C6, celulele SP2, celulele HEK-293T, celulele NIH-3T3, celulele HeLa, celulele rinichilor de pui de hamster (BHK), celulele rinichilor de maimuțe verzi africane (COS), celulele umane de carcinom hepatocelular (de exemplu, Hep G2), celulele pulmonare umane, celulele A549 și un număr de alte linii celulare. Exemplele de linii celulare de insecte includ celulele Sf9 sau Sf21.

Exemplele de celule gazdă de plante includ pe cele de *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lintiță, porumb, grâu, cartof, etc. Celulele gazdă bacteriene includ specii de *E. coli* și *Streptomyces*.

Exemplele de celule gazdă de drojdie includ *Saccharomyces cerevisiae* și *Pichia pastoris*.

Secvențele de aminoacizi ale unei molecule de adeziune, exprimate de diferite linii celulare sau la animale transgenice, pot avea diferite tipuri de glicozilare. Cu toate acestea, toate moleculele de adeziune, codificate de moleculele de acid nucleic, prezentate aici, sau care conțin secvențele de aminoacizi prezentate aici, sunt parte a prezentei invenții, indiferent de glicozilarea moleculelor de adeziune.

Un alt aspect al invenției prezintă o metodă de producere a unei molecule de adeziune la CD134, după cum a fost definită mai sus, folosind prezentarea în fagi. Metoda prevede: (a) sintetizarea unei biblioteci de anticorpi umani pe fag, (b) screening-ul bibliotecii cu CD134 sau unei porțiuni a acesteia, (c) izolarea fagului care se leagă la CD134 sau la o porțiune a acestuia, și (d) obținerea anticorpului de la fag. O metodă tipică de preparare a bibliotecii de anticorpi cuprinde etapa de: (a) imunizare a unui animal non-uman, conținând loci de imunoglobulină umană cu CD134 sau o porțiune antigenică a acestuia pentru a crea un răspuns imun; (b) extragerea celulelor producătoare de anticorpi de la animalul imunizat; (c) izolarea ARN care codifică lanțurile grele și ușoare ale anticorpilor anti-CD134 din celulele extrase; (d) transcrierea inversă a ARN pentru a produce ADNc; (e), amplificarea ADNc; și (f) inserarea ADNc într-un vector de prezentare a fagului, astfel încât anticorpii sunt exprimați pe fag. Anticorpii recombinanți anti-CD134 uman sau fragmentele de legare la antigen ale acestora pot fi izolate prin screening-ul unei biblioteci combinatorii de anticorpi recombinanți. Biblioteca poate fi o bibliotecă de prezentare a fagilor scFv, generată folosind ADNc al VL și VH uman, preparate din ARNm izolat din celulele B. Metodele de preparare și de examinare în astfel de biblioteci sunt cunoscute în domeniu. Seturile pentru generarea de biblioteci de prezentare a fagilor sunt comercial disponibile.

Intr-un exemplu de realizare preferat al prezentei invenții se prevede o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, care conține una sau o combinație de molecule de adeziune, conform prezentei invenții, și opțional un purtător farmaceutic acceptabil. Compozițiile pot fi preparate prin metode uzuale cunoscute în domeniu. În unele variante compoziția conține un anticorp anti-CD134 sau un fragment de legare a antigenului acestuia. Într-o variantă particulară compoziția conține clona 20E5 a anticorpului sau un fragment de legare a antigenului al anticorpului. În alte exemple compoziția conține un derivat al clonei 20E5 a anticorpului. În alte realizări compoziția farmaceutică conține anticorpul umanizat 20E5_VL1VH1, 20E5_VL1VH2, 20E5_VL1VH3, 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2 sau 20E5_VL2VH3. În alte realizări compoziția farmaceutică conține o variantă a anticorpilor umanizați, conform prezentei invenții, conținând regiunile variabile ale lanțului greu din SEQ ID NO: 101...119 sau 149...151. Termenul "purtător farmaceutic acceptabil" se referă la orice substanță inactivă, care este potrivită pentru utilizarea într-o formă de livrare a unei molecule de adeziune. Un purtător poate fi un antiadeziv, liant, agent de acoperire, agent de dezintegrare, umplutură sau diluant, conservant (cum ar fi un agent antioxidant, antibacterian, sau agent antifungic), edulcorant, agent de întârziere a absorbției, agent de umectare, agent de emulsifiere, tampon și altele similare.

Moleculele nepeptidice ale invenției pot fi administrate pe cale orală, inclusiv în suspensie, tablete, etc. Formele lichide pot fi administrate prin inhalarea de microcapsule liofilizate sau aerosolizate. Ar putea fi, de asemenea, utilizate supozitoarele. Excipienții farmaceutici adiționali pot fi folosiți pentru a controla durata de acțiune a moleculelor, conform prezentei invenții. Dozarea și regimul de administrare a formei selectate pot fi determinate prin metode standard, bine cunoscute în domeniu. Aceste metode implică extrapolarea unui regim estimat de dozare pe modele animale, iar apoi determinarea dozei optime într-un studiu variațional cu doze clinice umane.

Compozițiile pot fi sub orice formă potrivită, cum ar fi formele de dozare lichide, semisolide și solide. Diferite forme de dozare a compozițiilor pot fi preparate prin metode uzuale, cunoscute în domeniu.

Cantitatea relativă de o moleculă de adeziune, inclusă în compoziție, va varia în funcție de o serie de factori, cum ar fi eliberarea dezirabilă și caracteristicile farmacodinamice, molecula de adeziune specifică și purtătorii utilizați, și forma de dozare. Cantitatea de moleculă de adeziune într-o singură formă de dozare va fi, în general, aceea cantitate, care produce un efect terapeutic, dar poate fi, de asemenea, o cantitate mai mică. În general, această cantitate va varia de la aproximativ 0,001% până la aproximativ 99%, de la aproximativ 0,1% la aproximativ 70%, sau de la circa 1 până la circa 30%, în raport cu greutatea totală a formei de dozare.

Suplimentar la molecula de adeziune, în compoziție pot fi incluși unul sau mai mulți agenți terapeutici adiționali, sau în mod separat, ca parte din același regim de tratament. Exemplele de agenți terapeutici suplimentari sunt descrise aici în continuare. Cantitatea necesară de agent terapeutic suplimentar pentru a fi inclus în compoziție poate fi ușor selectată de către o persoană de specialitate în domeniu și va varia în funcție de o serie de factori, cum ar fi agentul special și purtătorii utilizați, forma de dozare și eliberarea dezirabilă, și caracteristicile farmacodinamice. Cantitatea de agent terapeutic suplimentar, inclus într-o singură formă de dozare, va fi în general, aceea cantitate de agent, care produce un efect terapeutic, dar poate fi și într-o cantitate mai mică, de asemenea.

Moleculele de adeziune și compozițiile farmaceutice, care conțin o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, sunt utile pentru scopuri diagnostice, terapeutice sau de alt tip, cum ar fi amplificarea unui răspuns imun, tratarea cancerului, creșterea eficienței altor tratamente anticanceroase sau stimularea eficienței vaccinurilor, și prezintă o serie de aplicații, cum ar fi pentru utilizarea în scop de medicament sau de agent de diagnostic. Astfel, în aspectul preferat, conform prezentei invenții, sunt prevăzute metode de utilizare a moleculelor de adeziune sau a compozițiilor farmaceutice.

Un alt aspect invenției prevede o metodă de modulare a răspunsurilor imune antitumorale, mediate de CD134 uman, inclusiv stimularea funcției efectoare a Teff umane cu expresia CD134 uman și/sau atenuarea funcției supresoare a Treg umane cu expresia CD134 uman, folosind molecule de adeziune, care se leagă la CD134 uman, inclusiv anticorpi anti-CD134 umani, care: (1) împiedică interacțiunea OX40L uman nativ cu receptorul uman CD134, și/sau (2) nu blochează semnalizarea celulară, mediată de CD134 uman, după ocuparea cu OX40L uman nativ.

Un alt aspect invenției prevede o metodă de modulare a răspunsurilor imune antitumorale, mediate de CD134 uman, inclusiv stimularea funcției efectoare a Teff umane cu expresia CD134 uman și/sau atenuarea funcției supresoare a Treg umane cu expresia CD134 uman, utilizând molecule de adeziune, care se leagă la CD134 uman, conform prezentei invenții.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o metodă de modulare a răspunsurilor imune antitumorale, mediate de CD134 uman, în care metoda menționată nu include molecule de adeziune, care se leagă la CD134 uman, inclusiv anticorpi anti-CD134 uman, cum ar fi OX40L umane care mimează, care interacționează cu domeniul de legare a OX40L uman pe receptorul uman CD134 și/sau blochează semnalizarea celulară CD134 uman - OX40L uman.

Prezenta invenție descrie molecule de adeziune, care se leagă la CD134 uman, incluzând anticorpi anti-CD134 uman, în scopuri terapeutice antitumorale. Anticorpul anti-CD134 uman se leagă la domeniul extracelular al CD134 uman. În unele realizări anticorpul anti-CD134 uman se leagă la regiuni de non-legare a OX40L (adică, anticorpul anti-CD134 uman nu blochează complet legarea OX40L uman la CD134 uman) pe domeniul extracelular al CD134 uman pe Teff umane și Treg umane activate.

Intr-un aspect particular sunt prezentate metodele de stimulare a răspunsului imun la un mamifer, care prevăd administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente dintr-o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții. În unele realizări molecula de adeziune este un anticorp anti-CD134 sau un fragment de legare a antigenului acestuia și mamiferul este omul. Într-o altă realizare molecula de adeziune este clona 20E5 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului din anticorp, din anticorpul 20E5 umanizat. Termenul "amplificarea răspunsului imun" înseamnă stimularea, evocarea, mărirea, ameliorarea sau sporirea oricărui răspuns al sistemului imun al unui mamifer. Răspunsul imun poate fi un răspuns celular (adică mediat de celule, cum ar fi mediat de limfocitele T citotoxice) sau un răspuns umoral (adică răspuns mediat de anticorpi), și poate fi un răspuns imun primar sau secundar. Exemplele de amplificare a răspunsului imun includ creșterea activității celulelor T helper CD4+ și generarea de celule T citolitice. Creșterea răspunsului imun poate fi evaluată, folosind o serie de măsurări *in vitro* sau *in vivo*, cunoscute specialiștilor în domeniu, incluzând, dar nefiind exhaustive, testele limfocitelor T citotoxice, eliberarea de citokine (de exemplu, producția de IL-2), regresia tumorilor, supraviețuirea animalelor care poartă tumori, producerea de anticorpi, proliferarea celulelor imune, expresia

marcherilor celulari de suprafață și citotoxicitatea. Într-o realizare metoda amplifică răspunsul imun celular, în special, răspunsul celulelor T citotoxice.

5 Intr-un aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care într-o concentrație de saturație sau depășind concentrația de saturație, reduce efectul asupra legării OX40L la CD134 cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman, la măsurarea printr-un test de citometrie în flux pe bază de fluorescență, cum este descris în Exemplul 2(f). Mai preferabil, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% sau mai puțin, sau, de preferință, fără reducerea legării

10 Un alt aspect invenția prezintă o moleculă de adeziune, care într-o concentrație de 70 nM reduce efectul asupra legării OX40L la CD134 cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman, la măsurarea printr-un test de citometrie în flux pe bază de fluorescență, cum este descris în exemplul 2(f). Mai preferabil, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult circa 60%, sau circa 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, sau mai puțin, de preferință, fără reducerea legării.

15 Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la o moleculă de adeziune, care concurează pentru legarea CD134 uman cu un anticorp, și care conține: (1) o regiune variabilă a lanțului greu, care conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 4 și (2) o regiune variabilă a lanțului ușor, care conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 5, cum este demonstrat prin competiție încrucișată
20 dintre o moleculă de adeziune menționată nemarcată și un anticorp menționat marcat fluorescent pe T-limfocitele cu expresia CD134 uman, stimulate cu PHA, măsurarea fiind efectuată prin citometrie în flux (descrisă în continuare în exemplul 2(e)). Preferabil, legarea anticorpului menționat în concentrația sa de saturație sau depășind concentrația sa de saturație este redusă cu cel puțin circa 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, sau aproximativ 80%, sau
25 aproximativ 90% sau mai mult, și este, de preferință, abolită la testarea prin competiție încrucișată împotriva moleculei de adeziune menționate.

Intr-un alt aspect prezenta invenție se referă la o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care reduce efectul asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman cu cel mult aproximativ 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ
30 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% sau mai puțin, și molecula de adeziune menționată nu împiedică ulterior răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și
35 care nu împiedică ulterior răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%,
40 sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și molecula de adeziune menționată stimulează răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și
45 care stimulează răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult aproximativ 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ
50 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și care nu împiedică ulterior răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și
55 care nu împiedică ulterior răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%,

sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin și care stimulează răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

5 Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care stimulează răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

10 Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin și care nu împiedică ulterior răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

15 Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu inhibă sau previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care nu împiedică răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

20 Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin și care inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman. Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu inhibă sau previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

O metodă potrivită de măsurare a legării simultane a OX40L și a anticorpului anti-CD134 este descrisă în continuare. Semnalul fluorescent FITC (media geometrică sau media intensității fluorescente (MFI)) al legării OX40L uman pe PBMC (celulele mononucleare ale sângelui periferic) PHA- stimulate, care exprimă CD134 uman, în absența anticorpului anti-CD134 uman, se stabilește la 100%. Semnalul fluorescent PE (MFI) al legării anticorpului anti-CD134 uman pe PBMC PHA-stimulate, care exprimă CD134 uman, în absența OX40L uman, se stabilește la 100%. Reducerea acestui semnal fluorescent FITC și a semnalului fluorescent PE atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, se adaugă simultan la PBMC PHA-stimulate, care exprimă CD134 uman, de preferință nedepășind aproximativ 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.

O metodă potrivită de măsurare a lipsei impedimentului asupra răspunsurilor proliferative ale Teff, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Modificările (adică reducerea sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman, (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28) de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.

O metodă potrivită de măsurare a stimulării răspunsurilor proliferative ale Teff, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Stimularea acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință depășește aproximativ 30%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, ori mai mult.

O metodă potrivită de măsurare a lipsei impedimentului asupra funcției supresoare a Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman, care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), după tratamentul cu OX40L uman, se stabilește la 100%. Modificările (adică reducerea sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care

exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.

5 O metodă potrivită de măsurare a stimulării funcției supresoare a Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman, care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), după tratamentul cu OX40L uman, se stabilește la 100%. Stimularea acestei incorporări a
10 timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), de preferință depășește aproximativ 30%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, ori mai mult.

15 O metodă potrivită de măsurare a lipsei impedimentului asupra răspunsurilor proliferative ale Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Treg care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Modificările (adică reducerea sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci
20 când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Treg activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.

O metodă potrivită de măsurare a inhibiției răspunsurilor proliferative ale Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Treg care exprimă
25 CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Reducerea acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpul anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Treg activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință depășește nivelul de aproximativ 30%, sau de aproximativ 40%, sau de aproximativ 50%, sau de aproximativ
30 60%, sau de aproximativ 70%, ori mai mult.

Un alt aspect al invenției prezintă o metodă de tratare a cancerului la un mamifer, care cuprinde administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente de o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții.

35 Intr-o realizare ulterioară preferată a invenției, molecula de adeziune este clona 20E5 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului al anticorpului. Intr-o altă variantă, mamiferul este omul.

Intr-o altă variantă preferată a invenției, se prezintă o metodă de prevenire a cancerului la un mamifer, care cuprinde administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente de o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții.

40 Termenul "profilaxia cancerului" sau "prevenirea cancerului" se referă la întârzierea, inhibarea sau prevenirea instalării unui cancer la un mamifer, în care debutul oncogenezei sau tumorigenezei nu este dovedit, dar este identificată o predispoziție pentru cancer, fie determinată de screening-ul genetic, de exemplu, sau într-un alt mod. Termenul cuprinde, de asemenea, tratarea unui mamifer cu stări precanceroase pentru a stopa progresia, sau pentru a produce regresia stărilor
45 precanceroase spre malignitate. Exemple de stări precanceroase includ hiperplazia, displazia și metaplazia. În unele variante, molecula de adeziune este un anticorp anti-CD134 sau un fragment al acestuia, conform prezentei invenții. Într-un alt exemplu al invenției, este prezentată o moleculă de adeziune, selectată dintre clona 20E5 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului oricărui anticorp. Într-o altă variantă, mamiferul este omul.

50 Termenii "tratare" sau "tratament" se referă atât la tratamentul terapeutic, cât și profilactic sau la măsurile preventive, în care obiectivul este de a preveni sau de a încetini (reduce) o modificare fiziologică indezirabilă sau o tulburare, cum ar fi dezvoltarea sau răspândirea tumorii sau celulelor tumorale. Rezultatele clinice benefice sau dezirabile includ ameliorarea simptomelor, reducerea stadiului de boală, stabilizarea (de exemplu, în una mai bună) stării de boală, întârzierea sau
55 încetinirea progresiei bolii, ameliorarea sau paliativul stării de boală și remisiune (fie parțială sau totală), indiferent dacă este detectabilă sau nedetectabilă. "Tratamentul" poate însemna, de asemenea, prelungirea supraviețuirii, comparativ cu supraviețuirea așteptată în cazul în care un subiect nu a administrat tratament. Cei care au nevoie de tratament includ persoane deja cu afecțiune sau boală, precum și indivizii predispuși să aibă afecțiunea sau tulburarea sau cei la care

starea sau afecțiunea poate să fie prevenită. Oricare dintre anticorpii, conform prezentei invenții, pot fi utilizați în metodele invenției.

O altă realizare a prezentei invenții este o metodă de tratare a cancerului, care prevede administrarea la un pacient, care are nevoie de aceasta, a unui anticorp anti-CD134 care conține
5 VH a SEQ ID NO: 134 și VL a SEQ ID NO: 98 pentru o perioadă de timp suficientă pentru tratarea cancerului.

O diversitate de tipuri de cancer, inclusiv malign sau benign, și/sau primar ori secundar, pot fi tratate sau prevenite printr-o metodă, conform prezentei invenții. Exemplele de astfel de tipuri de cancer sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și sunt enumerate în manualele standard, cum ar fi
10 Merk Manual of Diagnosis and Therapy (publicat de Merck).

În unele realizări cancerul este un cancer care de obicei este receptiv la imunoterapie, dar, de asemenea, cancerul care până în prezent nu a fost asociată cu imunoterapie. Exemplele de cancere sunt melanomul (de exemplu, melanomul malign metastatic), cancerul renal (de exemplu, carcinomul cu celule clare), cancerul de prostată (de exemplu, adenocarcinomul de prostată refractar la hormoni), adenocarcinomul pancreatic, cancerul mamar, cancerul de colon, cancerul pulmonar (de exemplu, cancer pulmonar cu celule non-mici), cancerul esofagian, carcinomul cu celule scuamoase al gâtului și capului, cancer de ficat, cancerul ovarian, cancerul de col uterin, cancerul tiroidian, glioblastomul, gliomul, leucemia, limfomul și alte boli maligne neoplazice. Cancerul poate fi carcinom malign refractar sau recurent, limfom, blastom, sarcom și leucemie,
20 cancer cu celule scuamoase, cancer pulmonar (inclusiv cancer pulmonar cu celule mici, cancer pulmonar cu celule non-mici, adenocarcinom pulmonar și carcinom scuamos al plămânului), cancer de peritoneu, cancer hepatocelular, cancer gastric sau de stomac (incluzând cancerul gastrointestinal), cancer pancreatic, glioblastom, cancer cervical, cancer ovarian, cancer de ficat, cancer de vezică urinară, hepatom, cancer mamar, cancer de colon, cancer colorectal, carcinom endometrial sau uterin, carcinom de glande salivare, cancer de rinichi sau cancer renal, cancer hepatic, cancer de prostată, cancer vulvar, cancer tiroidian, carcinom hepatic și diferite tipuri de cancer de cap și gât, precum și limfom cu celule B (inclusiv cu grad scăzut de malignitate/ limfom folicular non-Hodgkin (LNH), limfocitar mic (SL) NHL; cu grad intermediar/NHL folicular; NHL cu grad intermediar difuz; NHL cu grad ridicat imunoblastic; NHL cu grad ridicat limfoblastic;
30 NHL cu grad ridicat de celule mici non-clivate; boală voluminoasă NHL; limfom cu celule de mantă; limfom asociat cu SIDA și Macroglobulinemia Waldenstrom); leucemie limfocitară cronică (LLC); leucemie limfoblastică acută (ALL); leucemie cu celule păroase; leucemie mieloblastică cronică; mielom multiplu și tulburare limfoproliferativă post-transplant (PTLD).

Intr-o altă realizare a prezentei invenții moleculele de adeziune pot fi administrate separat în calitate de monoterapie sau pot fi administrate în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeuți sau terapii. Astfel, într-o altă realizare prezenta invenție se referă la o metodă de tratare sau de prevenire a cancerului printr-o terapie combinată, metodă care cuprinde administrarea unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, în combinație cu una sau mai multe terapii sau agenți terapeuți adiționali. Termenul "tratament adițional" se referă la o terapie care nu utilizează
40 o moleculă de adeziune, conform invenției, în calitate de agent terapeutic. Termenul "agent terapeutic adițional" se referă la orice agent terapeutic, cu excepția moleculei de adeziune, conform prezentei invenții. În unele realizări molecula de adeziune este clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman, un fragment de legare a antigenului din anticorp sau un anticorp 20E5 umanizat. Într-un aspect particular, prezenta invenție prevede o terapie combinată pentru tratarea cancerului la un mamifer, care cuprinde administrarea la mamifer a unei cantități terapeutic eficiente dintr-o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeuți adiționali. Într-o altă realizare mamiferul este o ființă umană.

În unele realizări cancerul este cancer de prostată, cancer de colon, cancer pulmonar, tumoare hematologică malignă, melanom sau cancer de vezică urinară.

50 În unele realizări cancerul este cancer de prostată.

În unele realizări cancerul este cancer de colon.

În unele realizări cancerul este cancer pulmonar.

În unele realizări cancerul este o tumoare hematologică malignă.

În unele realizări cancerul este melanom.

55 În unele realizări cancerul este cancer de vezică urinară.

În unele realizări cancerul pulmonar este cancer pulmonar cu celule mici, cancer pulmonar cu celule non-mici, adenocarcinom pulmonar sau carcinom scuamos al plămânului.

O mare diversitate de agenți terapeuți anticanceroși pot fi utilizați în combinație cu o moleculă de adeziune. Un specialist în domeniu va recunoaște prezența și dezvoltarea altor terapii

anticanceroase, care pot fi utilizate în combinație cu metodele și moleculele de adeziune din prezenta descriere, și nu se va limita la acele forme de terapie, stabilite aici. Exemplele de categorii ale agenților terapeutici suplimentari, care pot fi utilizați în terapia combinată pentru tratarea cancerului, includ: (1) agenți chimioterapeutici, (2) agenți imunoterapeutici și (3) agenți terapeutici hormonal.

Termenul "agent chimioterapeutic" se referă la o substanță chimică sau biologică, care poate provoca moartea celulelor canceroase, sau interferează cu diviziunea, reparația, creșterea și/sau funcția celulelor canceroase (WO 06/079372; WO 2007/059782; WO 2006/088639).

Termenul "agenți imunoterapeutici" se referă la substanțe chimice sau biologice, care pot ameliora un răspuns imun al unui mamifer. Exemplele de agenți imunoterapeutici includ: bacilul Calmette-Guerin (BCG); citokine, cum ar fi interferonii; vaccinuri, cum ar fi imunoterapia personalizată MyVax, Onyvax-P, Oncophage, GRNVACI, Favld, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX și NeuVax; și anticorpi, cum ar fi alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888, și anticorpi agoniști ai receptorului CD40 (WO 2006/129163).

Termenul "agent terapeutic hormonal" se referă la o substanță chimică sau biologică, care inhibă sau elimină producerea unui hormon, sau inhibă ori contracarează efectul unui hormon asupra creșterii și/sau supraviețuirii celulelor canceroase. Sunt cunoscute exemple de astfel de agenți potriviți pentru metodele descrise aici (US 20060153808). Exemple de agenți terapeutici hormonalii particulari includ: tamoxifenul (NOLVADEX), toremifenul (Fareston), fulvestrantul (FASLODEX), anastrozolul (ARIMIDEX), exemestanul (AROMASIN), letrozolul (FEMARA), acetatul de megestrol (MEGACE), goserelinul (ZOLADEX) și leuprolida (LUPRON). Moleculele de adeziune, conform prezentei invenții, pot fi, de asemenea, utilizate în combinație cu terapii hormonale nemedicamentoase, cum ar fi: (1) metode chirurgicale, care elimină toate sau o parte din organele sau glandele care participă la producerea de hormoni, cum ar fi ovarele, testiculele, glanda suprarenală și glanda pituitară, și (2) tratamentul radioterapeutic, în care organele sau glandele pacientului sunt supuse radiației într-o cantitate suficientă pentru a inhiba sau elimina producerea de hormon vizat.

Intr-o altă realizare prezenta invenție se referă la o metodă de tratare sau de prevenire a cancerului printr-o terapie combinată, metodă care cuprinde administrarea unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, și tratamentul chirurgical pentru a înlătura o tumoră. Molecula de adeziune poate fi administrată mamiferului până la, în timpul sau după intervențiile chirurgicale menționate.

Terapia combinată pentru tratarea cancerului cuprinde, de asemenea, combinarea unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, cu tratamentul radioterapeutic, cum ar fi radioterapia ionizantă (electromagnetică) (de exemplu, cu raze X sau raze gamma) și radioterapia cu fascicul de particule (de exemplu, radiații cu energie liniară înaltă). Sursa de radiație pentru mamifer poate fi externă sau internă. Molecula de adeziune poate fi administrată mamiferului până la, în timpul sau după tratamentul radioterapeutic.

Moleculele de adeziune și compozițiile, conform prezentei invenții, pot fi administrate pe orice cale enterală sau parenterală potrivită de administrare. Termenul "cale enterală" de administrare se referă la administrarea prin orice parte a tractului gastrointestinal. Exemplele de căi enterale includ calea orală, la nivelul mucoasei, bucală și calea rectală, sau calea intragastrică. "Calea parenterală" de administrare se referă la toate căile de administrare, cu excepția căii enterale. Calea și metoda de administrare corespunzătoare poate varia în funcție de o serie de factori, cum ar fi anticorpul specific utilizat, viteza de absorbție dezirabilă, forma specifică sau forma de dozare utilizată, tipul sau severitatea tulburării care este tratată, locul specific de acțiune, precum și starea pacientului, și pot fi ușor selectate de către o persoană de specialitate în domeniu.

Termenul "cantitate terapeutic eficientă" de o moleculă de adeziune se referă la o cantitate care este eficientă pentru un scop terapeutic dezirabil. De exemplu, în contextul creșterii unui răspuns imun, o "cantitate terapeutic eficientă" este orice cantitate, care este eficientă pentru stimularea, evocarea, creșterea, ameliorarea sau sporirea oricărui răspuns al sistemului imun al unui mamifer. În contextul de tratare a cancerului, o "cantitate terapeutic eficientă" este orice cantitate, care este suficientă pentru a cauza un efect benefic sau dezirabil la mamiferul care este tratat, cum ar fi inhibarea creșterii sau răspândirii în continuare a celulelor canceroase, moartea celulelor canceroase, inhibarea reapariției cancerului, reducerea durerii asociate cu cancerul sau ameliorarea supraviețuirii mamiferului. Într-o metodă de prevenire a cancerului, o "cantitate terapeutic

eficientă" este orice cantitate, care este eficientă în întârzierea, inhibarea sau prevenirea instalării unui cancer la un mamifer, la care se administrează molecula de adeziune.

Cantitatea terapeutic eficientă de o moleculă de adeziune, de obicei, variază de la aproximativ 0,001 până la aproximativ 500 mg/kg, și, mai frecvent, de la aproximativ 0,05 până la aproximativ 100 mg/kg de greutate corporală a mamiferului. De exemplu, cantitatea poate fi de aproximativ 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg sau de 100 mg/kg de greutate corporală a mamiferului. În unele realizări cantitatea terapeutic eficientă de un anticorp anti-CD134 uman este în intervalul de la aproximativ 0,1 până la 30 mg/kg de greutate corporală a mamiferului. Nivelul precis de dozare, care trebuie administrat, poate fi ușor determinat de către o persoană de specialitate în domeniu și va depinde de o serie de factori, cum ar fi tipul și severitatea tulburării care urmează a fi tratată, molecula de adeziune respectivă implicată, calea de administrare, timpul de administrare, durata tratamentului, terapia adițională specială folosită, vârsta, sexul, greutatea, starea generală, starea de sănătate și istoricul medical anterior al pacientului tratat și alți factori similari, bine cunoscuți în domeniu.

O moleculă de adeziune sau o compoziție este, de obicei, administrată de mai multe ori. Intervalele dintre prizele unice pot fi, de exemplu, săptămânale, lunare, o dată la trei luni sau anuale. Un regim de tratament exemplar implică administrarea o dată pe săptămână, o dată la fiecare două săptămâni, o dată la trei săptămâni, o dată la fiecare patru săptămâni, o dată pe lună, o dată la 3 luni sau o dată la fiecare trei până la 6 luni. Regimurile de dozare tipice pentru un anticorp anti-CD134 uman includ 1 mg/kg de greutate corporală sau 3 mg/kg de greutate corporală prin administrare intravenoasă, utilizând una dintre următoarele scheme de dozare: (i) la fiecare patru săptămâni pentru șase doze, apoi la fiecare trei luni; (ii) fiecare trei săptămâni; (iii) 3 mg/kg de greutate corporală o dată, urmată de 1 mg/kg greutate corporală la fiecare trei săptămâni.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, care nu împiedică legarea receptorului uman CD134 (OX40) la ligandul OX40 (OX40L). În unele realizări la sau depășind concentrația de saturație a moleculei menționate efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 50% pe celulele T care exprimă CD134 uman. În unele realizări la o concentrație de 70 nM a moleculei de adeziune efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

Invenția prevede în continuare o moleculă de adeziune conținând:

(a) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO:4 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide și/sau

(b) o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 5 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide.

Intr-o realizare molecula de adeziune, conform prezentei invenții, conține

(a) un lanț greu CDR1 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 6 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide;

(b) un lanț greu CDR2 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO:7 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide; și/or

(c) un lanț greu CDR3 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 8 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide.

Intr-o realizare molecula de adeziune, conform prezentei invenții, conține

(a) un lanț ușor CDR1 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 9 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide;

(b) un lanț ușor CDR2 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO:10 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide; și/or

(c) un lanț ușor CDR3 conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO:11 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide.

Intr-o realizare molecula de adeziune concurează pentru legarea CD134 uman cu un anticorp care conține:

(a) regiunea variabilă a unui lanț greu conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 4; și

(b) regiunea variabilă a unui lanț ușor conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 5.

Intr-o realizare molecula de adeziune se leagă specific la un epitop într-o secvență de aminoacizi a domeniului extracelular al CD134 uman. În unele realizări molecula de adeziune se leagă la un epitop în domeniul extracelular al CD134 uman care conține secvența de aminoacizi:

(a) SEQ ID NO: 34;

(b) SEQ ID NO: 38; și/sau

(c) SEQ ID NO: 92.

În unele realizări molecula de adeziune nu împiedică legarea receptorului CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) pe celulele imunocompetente umane care exprimă CD134 uman (de exemplu, Tef⁺ activate și/sau Treg activate), care sunt implicate în inhibarea creșterii celulelor tumorale umane.

5 În unele realizări molecula de adeziune stimulează răspunsurile de legare și/sau imunostimulatoare ale ligandului OX40 uman (OX40L) pe celulele imunocompetente umane care exprimă CD134 uman (de exemplu, Tef⁺ activate și/sau Treg activate), care sunt implicate în inhibarea creșterii celulelor tumorale umane.

10 În unele realizări molecula de adeziune nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) și nu împiedică răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare care exprimă CD134 uman.

15 Prezentă invenție mai prevede, de asemenea, o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, moleculă de adeziune care nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) și stimulează răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare care exprimă CD134 uman.

Prezentă invenție mai prevede o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, moleculă de adeziune care nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) și nu împiedică răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare care exprimă CD134 uman.

20 De asemenea este prevăzută o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, moleculă de adeziune care nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) și stimulează răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare care exprimă CD134 uman.

25 De asemenea este prevăzută o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, moleculă de adeziune care nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L), dar nu inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare care exprimă CD134 uman.

30 Cu toate acestea este prevăzută suplimentar o moleculă de adeziune care se leagă la CD134 uman, moleculă de adeziune care nu împiedică legarea CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L), dar nu inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare care exprimă CD134 uman.

O moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, este de preferință o moleculă de adeziune, care la sau depășind concentrația de saturație a moleculei respective, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 50% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

35 O moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, este de preferință o moleculă de adeziune, care la o concentrație de 70 nM reduce efectul de legare a OX40L la CD134 cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

Intr-o realizare o moleculă de adeziune, conform invenției, este un anticorp umanizat. Într-o altă realizare molecula de adeziune, conform prezentei invenții, este un anticorp himeric, umanizat sau DeImmunizedTM, sau un fragment al acestora.

40 Intr-o realizare o moleculă de adeziune, conform invenției, este un anticorp, un anticorp care mimează (de exemplu, bazat pe structuri de schelet neanticorp), un aptamer ARN, o moleculă mica sau un corp CovX.

În unele realizări molecula de adeziune, conform prezentei invenții, este un anticorp IgG, IgA, IgD, IgE sau IgM, cum ar fi un anticorp IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.

45 În unele realizări molecula de adeziune este un anticorp IgG4.

În unele realizări anticorpul este un fragment de legare a antigenului al unui anticorp, de exemplu selectat din grupa constând din: Fv (de exemplu Fv cu un singur lanț și Fv cu legătură disulfidică); fragmente similare Fab (de exemplu, fragmente Fab, fragmente Fab' și fragmente F(ab')₂) și domenii de anticorpi. În unele realizări fragmentul de legare a antigenului sau reziduul de legare este scFv. În unele realizări reziduul de legare este un anticorp recombinat. În unele realizări fragmentul de legare este un anticorp monoclonal.

Prezentă invenție se mai referă la o moleculă de acid nucleic care codifică o moleculă de adeziune, conform oricăreia dintre revendicările precedente, cu condiția că fragmentul de legare este un polipeptid.

55 De asemenea este prevăzut un vector care conține cel puțin o moleculă de acid nucleic, conform prezentei invenții.

În continuare se prevede o celulă gazdă care conține un vector sau un acid nucleic, conform prezentei invenții. Celula gazdă, de preferință, derivă de la un mamifer sau o insectă.

Invenția se mai referă la o metodă de preparare a unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, care prevede etapele de (i) preparare a moleculelor legate cu CD134 și (ii) de screening a moleculelor menționate în scopul de a identifica și obține molecule care nu împiedică legarea OX40L la CD134. Etapa (ii) prevede, de preferință, identificarea moleculelor de adeziune care se leagă la CD134 după expunerea CD134 la o concentrație de saturație de OX40L. În cazul în care molecula de adeziune este un anticorp monoclonal, metoda de preparare a unei molecule de adeziune prevede imunizarea unui animal cu CD134 uman, prepararea hibridoamelor care secretă anticorpi anti-CD134 și screeningul pentru hibridoame producătoare de anticorpi anti-CD134. Prezenta invenție mai prevede o moleculă de adeziune, conform invenției, sau produsă, conform invenției, pentru utilizare în prevenirea sau tratarea cancerului la un subiect care are nevoie de aceasta. În unele realizări cancerul este cancer pulmonar, cancer de prostată, cancer mamar, cancer al capului și gâtului, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de vezică urinară, cancer cervical, cancer uterin, cancer ovarian, cancer de ficat, cancer hematologic, melanom sau orice altă afecțiune sau tulburare caracterizată prin creștere celulară necontrolată.

În continuare se prevede o metodă de stimulare a unui răspuns imun la un subiect uman, cuprinzând administrarea la subiectul uman a unei cantități terapeutice eficiente de o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, sau produsă, conform invenției, și opțional un purtător farmaceutic acceptabil. Răspunsul imun consolidate poate cuprinde o creștere a funcției imunostimulatoare/efectoare a celulelor T efectoare, eventual drept consecință a proliferării acelor celule și/sau reglare de reducere a funcției imunosupresoare a celulelor T reglatoare, eventual fără expansiune a numărului de acele celule.

De asemenea este prevăzută o metodă de tratare a cancerului la un subiect uman care necesită aceasta, care prevede administrarea la subiectul uman a unei cantități terapeutice eficiente de o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, sau produse, conform prezentei invenții. În unele realizări cancerul este cancer pulmonar, cancer de prostată, cancer mamar, cancer al capului și gâtului, cancer esofagian, cancer de stomac, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de vezică urinară, cancer cervical, cancer uterin, cancer ovarian, cancer de ficat, cancer hematologic, melanom sau orice altă afecțiune sau tulburare caracterizată prin creștere celulară necontrolată.

De asemenea este prevăzută o metodă de reducere a dimensiunii unei tumori sau inhibarea creșterii celulelor canceroase la un subiect sau reducerea sau inhibarea dezvoltării cancerului metastatic la un subiect suferind de cancer, care prevede administrarea la subiectul uman a unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții sau produse, conform prezentei invenții.

Invenția se mai referă la utilizarea unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, sau produse, conform invenției, pentru prepararea unui medicament pentru tratamentul sau prevenirea cancerului.

De asemenea este prevăzută o compoziție farmaceutică care conține un fragment de legare, conform prezentei invenții, sau produse, conform invenției, împreună cu unul sau mai mulți diluanți sau cu excipienți farmaceutici acceptabili. Compoziția este de preferință potrivită pentru administrare parenterală în corpul uman, de exemplu prin administrare intravenoasă, intramusculară, intradermică, intraperitoneală, intratumorală, intravezicală, intraarterială, intratecală, intracapsulară, intraorbitală, intracardiacă, transtraheală, intraarticulară, subcapsulară, subarahnoidiană, intraspinală, epidurală, intrasternală sau subcutanată.

Alte realizări ale invenției

În continuare sunt prezentate anumite realizări numerotate ale prezentei invenții la descrierile prezentate în altă parte aici. Caracteristicile realizărilor invenției, prezentate mai sus, descrise ca având legătură cu invenția, se referă, de asemenea, la fiecare și fiecare dintre aceste exemple de realizare numerotate în continuare.

1. Anticorp izolat, care leagă CD134 uman, conținând o regiune variabilă a unui lanț ușor (VL) a SEQ ID NO: 98 și având o regiune variabilă a unui lanț greu (VH), care conține regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR)s HCDR1, HCDR2 și HCDR3, opțional având 1, 2 sau 3 substituții aminoacide în VH a SEQ ID NO: 98.

2. Anticorp, conform realizării 1, în care VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 134, opțional având 1, 2 sau 3 substituții aminoacide în VH a SEQ ID NO: 134.

3. Anticorp, conform realizării 1 sau 2, în care VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 97, opțional având 1, 2 sau 3 substituții aminoacide în VH a SEQ ID NO: 97.

4. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-3, în care HCDR3 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 8, 139 sau 140.

5. Anticorp, conform realizării 4, în care HCDR2 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 sau 138.
6. Anticorp, conform realizării 5, în care HCDR1 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 6.
- 5 7. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-6, în care:
- a. VL conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 62 sau 63; și
 - b. VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 sau 151, opțional având 1, 2 sau 3 substituții aminoacide în pozițiile rezidului aminoacid linar VH 11, 56 sau 106; sau
 - c. VL și VH conțin secvențele de aminoacizi
 - i. SEQ ID NO: 62 și 64, respectiv;
 - ii. SEQ ID NO: 62 și 65, respectiv;
 - iii. SEQ ID NO: 62 și 66, respectiv;
 - iv. SEQ ID NO: 63 și 64, respectiv;
 - v. SEQ ID NO: 63 și 65, respectiv; sau
 - vi. SEQ ID NO: 63 și 66, respectiv.
8. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-7, în care substituțiile în pozițiile rezidului aminoacid linar sunt V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L sau M106I.
- 20 9. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-8, în care anticorpul se leagă la un epitop al domeniului extracelular al CD134 uman conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 38 sau SEQ ID NO: 92.
10. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-9, în care anticorpul este umanizat sau DeImmunized™.
- 25 11. Anticorp, conform oricăreia din realizările 1-10, în care anticorpul este un agonist al CD134.
12. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-11, în care anticorpul este un izotip IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.
13. Anticorp, conform oricăreia dintre realizările 1-12, în care anticorpul conține o substituție în regiunea Fc.
- 30 14. Anticorp, conform realizării 13, în care substituția modulează legarea anticorpului la un receptor gamma Fc (FcγR) sau la un receptor Fc neonatal (FcRn).
15. Anticorp, conform realizării 14, în care în care substituția conține o substituție S267E/L328F, o substituție E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, o substituție V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S sau o substituție M252Y/S254T/T256E, în care numerotarea rezidului este în conformitate cu indexarea EU.
- 35 16. Moleculă de acid nucleic izolată, care codifică VH și VL, conform oricăreia dintre realizările 1-15.
17. Vector conținând o moleculă de acid nucleic, conform realizării 16.
- 40 18. Celulă gazdă conținând vectorul, conform realizării 17.
19. Anticorp agonist izolat care se leagă la CD134 uman, conținând o regiune variabilă a unui lanț ușor (VL) și o regiune variabilă a unui lanț greu (VH) conținând regiunile de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR)s HCDR1, HCDR2 și HCDR3 și regiunile de determinare a complementarității lanțului ușor (LCDR)s LCDR1, LCDR2 și LCDR3, în care
- 45
 - d. HCDR1 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 6;
 - e. HCDR2 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 sau 138;
 - f. HCDR3 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 8, 139 sau 140;
 - g. LCDR1 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 9;
 - h. LCDR2 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 10; și
 - i. LCDR3 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 11;
 cu condiția că anticorpul nu conține VH conținând HCDR1, HCDR2 și HCDR3 a secvențelor de aminoacizi SEQ ID NO: 6, 7 și 8, și VL conține LCDR1, LCDR2 și LCDR3 a secvențelor de aminoacizi SEQ ID NO: 9, 10 și 11.
- 55 Prezenta invenție prevede în continuare realizările:
- Z1. Moleculă de adeziune conținând:
- (a) o regiune variabilă a unui lanț greu conținând secvența de aminoacizi din fig. 26 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide; și/sau

(b) o regiune variabilă a unui lanț ușor conținând secvența de aminoacizi din fig. 26 sau o variantă a cărei secvență are 1, 2 sau 3 substituții aminoacide.

Z2. Moleculă de adeziune, conform realizării Z1, care se leagă la CD134 uman.

5 Z3. Moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-2, în care molecula de adeziune nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L).

Z4. Moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-3, în care la sau depășind concentrația la care legarea la molecula CD134 menționată este saturată, efectul de legare a OX40L la CD134 se reduce cu cel mult 50% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

10 Z5. Moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-4, în care la o concentrație de 70 nM a moleculei de adeziune efectul de legare a OX40L la CD134 se reduce cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman.

Z6. Moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-5, în care molecula de adeziune se leagă la un epitop al domeniului extracelular al CD134 uman conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38 și/or SEQ ID NO: 92.

15 Z7. Moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-6, care este un fragment Fab, un fragment cu un singur lanț Fv (scFv) sau un anticorp.

Z8. Anticorp, conform realizării Z7, care este un anticorp umanizat sau DeImmunized™ IgG, IgA, IgD, IgE sau IgM, cum ar fi un anticorp IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.

20 Z9. Moleculă de acid nucleic care codifică o moleculă de adeziune sau un anticorp, conform oricărei din realizările Z1-8.

Z10. Genă de livrare a vehiculului sau vectorului cu conținut de acid nucleic, conform realizării Z9.

Z11. Celulă izolată sau recombinantă sau cultură de celule in vitro cu conținut de acid nucleic sau vector, conform realizării Z9 sau Z10.

25 Z12. Metodă de producere a molecule de adeziune, caracterizată prin aceea, că se produce o moleculă de adeziune, conform oricărei din realizările Z1-7, sau un anticorp, conform realizării Z8.

Z13. Moleculă de adeziune sau anticorp, conform oricărei din realizările Z1-8, pentru utilizare în tratamentul unui individ care necesită stimularea răspunsului imun.

30 Z14. Moleculă de adeziune sau anticorp, conform oricărei din realizările Z1-8, pentru utilizare în tratamentul cancerului la un individ care necesită aceasta.

Z15. Compoziție farmaceutică cu conținut de o moleculă de adeziune sau de un anticorp, conform oricărei din realizările Z1-8, și un purtător farmaceutic acceptabil.

35 Această invenție este ilustrată suplimentar prin exemplele următoare, care nu trebuie să fie interpretate în nici un caz ca impunând restricții asupra volumului de aplicare a acesteia. Dimpotrivă, trebuie să se înțeleagă, că se poate recurge la diverse alte realizări, modificări și echivalente ale acestora care, după citirea prezentei descrieri, pot fi sugerate specialiștilor în domeniu, fără a se îndepărta de spiritul prezentei invenții și/sau scopul revendicărilor anexate.

Exemple

40 Exemplul 1 Generarea anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani la șoareci (=OX40)

(a) Generarea celulelor Sf9 de insecte, care exprimă CD134 de suprafață

ADNc care codifică proteina CD134 umană (GenBank ref CAB96543.1; a se vedea SEQ ID NO 1) a fost optimizat pentru expresia celulelor Sf9 la insecte (*Spodoptera frugiperda*) și sintetizat de GENEART, Regensburg, Germania (a se vedea SEQ ID NO 2 cat. nr. 0904551 (BC cod intern V076)). Acest ADNc a fost subclonat în plasmida de transfer a baculovirusului pVL1393 (setul de transfecție BD cat. nr. 560129; BD Biosciences). Ulterior, celulele Sf9 de insecte (ATCC) au fost cotransfectate cu plasmida de transfer pVL1393, conținând ADNc, care codifică CD134 uman împreună cu BaculoGold Baculovirus ADN (set de transfecție BD), și apoi incubate la 27°C timp de 4...5 zile. După această etapă de cotransfecție, supernatantul a fost colectat și depozitat la 4°C, și utilizat pentru a infecta mai multe celule Sf9 de insecte pentru amplificarea virusului. În acest scop, celulele Sf9 de insecte au fost transfectate cu baculovirus recombinant amplificat și apoi incubate la 27°C pentru 3...5 zile. Aceste celule Sf9 de insecte au fost recoltate, spălate cu PBS (soluție-tampon fosfat) sterilă și alicotate în cantitate de $\approx 2 \times 10^6$ celule/250 μ l în PBS și păstrate la -80°C pentru a obține lizate celulare. Înainte de depozitare, expresia de suprafață a CD134 uman pe celulele transfectate Sf9 de insecte a fost confirmată cu anti-CD134 uman de șoarece, conjugat cu 1:10 ficoeritrină (PE) (clona ACT35, BD Biosciences) și citometrie în flux.

(b) Imunizarea și generarea anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani de șoarece

Șoarecii BALB/c (femele, vârsta de 6 săptămâni; Laboratoarele Charles River) au fost injectați subcutanat cu ≈ 400 μ l lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman (250 μ l lizat celular din proba de analizat + 250 μ l de Adjuvant Complet Freund; Sigma) în ziua 0. Injecții subcutanate similare cu lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman și Adjuvant Incomplet Freund (Sigma) au fost administrate în ziua 21 și ziua 42. Injecții de rapel intraperitoneale cu lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman (250 μ l/șoarece), fără adjuvant s-au realizat în ziua 61 și în ziua 62. În ziua 65 splenocitele de la șoarecii imunizați au fost fuzionate cu celulele de mielom SP2/0 (DSMZ), folosind tehnologia hibridomului standard, descrisă inițial de Köhler și Milstein (WO 2003/040170). Succint, șoarecii imunizați au fost sacrificați.

Splenocitele au fost preparate cu ajutorul unui ac din splină și spălate în Opti-MEM I fără ser cu mediu GlutaMax (mediu SF; Invitrogen). Celulele de mielom SP2/0-Ag14 logaritmice crescute au fost spălate în mediu SF și adăugate la splenocitele rezultând un raport de 5:1 de splenocite la celule de mielom. Celulele au fost apoi peletate și supranatantul a fost îndepărtat. Un ml de 37% (v/v) soluție de polietilenglicol 4000 (Merck) s-a adăugat apoi prin picurare timp de 60 s, după care celulele au fost incubate pentru încă 60 de secunde la 37°C. Opt ml de mediu SF, urmate de 5 ml de opti-MEM I cu GlutaMax/10% (v/v) ser fetal de vițel (FCS; Bodinco) s-au adăugat apoi lent cu o agitare ușoară. După 30 minute la temperatura camerei, celulele au fost peletate, spălate în opti-MEM I cu GlutaMax/10% FCS pentru a îndepărta polietilenglicolul rezidual și în final placcate la o concentrație de 10^5 celule/200 μ l per godeu în opti-MEM I cu GlutaMax/10% FCS/50x aminopterina Hybri-MaxTM (de novo inhibitor al sintezei ADN; Sigma). Din ziua a 7 mediul de selecție cu aminopterina se completa la fiecare 2...3 zile și în ziua a 14 a fost înlocuit cu Opti-MEM I cu GlutaMax/10% FCS. Hibridoamele, care au produs anticorpi (clasa IgG de șoarece) împotriva CD134 uman (sortat cu testul convențional ELISA și tehnici de citometrie în flux, folosind CD134 recombinant uman: o proteină de fuziune Fc γ umană (R&D Systems, exemplul 11(a) în continuare) și blastele celulelor T CD4 PHA-stimulate, care exprimă CD134 uman (Roche) (exemplul 2 (a) în continuare) ca ținte, respectiv) au fost extinse, crioconservate și subclonate prin limitarea diluției. Anticorpii monoclonali specifici anti-CD134 umani au fost purificați, folosind coloane de proteină G (GE Healthcare), având drept rezultat clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece.

Exemplul 2 Caracteristica citometrică în flux a clonelor 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 umani la șoareci

(a) Expresia CD134 pe limfocitele T umane PHA-stimulate

Celulele umane mononucleare din sângele periferic (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat) au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, $1-2 \times 10^6$ PBMC/ml în mediu de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% de ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μ g/ml de gentamicină (Gibco), au fost stimulate cu 0; 0,1; 1,0 sau 10,0 μ g/ml de fitohemaglutinină-M (PHA-M; Roche) la temperatura de 37°C/5% CO₂, timp de 1...3 zile. După cultivare, PBMC au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție salină tamponată cu fosfat refrigerată, conținând 0,1% albumină serică de bovină (Sigma)/0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃), suplimentată cu 10% de ser uman combinat (HPS; receptori Fc γ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 10 μ g/ml clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, disponibilă comercial (izotip IgG1 de șoarece, BD Biosciences, Alphen aan de Rijn, Olanda), timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost ulterior incubate cu anticorpi IgG anti-șoarece de capră PE-conjugați și diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) conjugat cu anticorp anti-CD3 uman de șoarece diluat 1:20 (BD Biosciences), timp de 30 de min la 4°C pentru a detecta limfocitele T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃, timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Așa cum este arătat în fig. 1 ($n = 1$ de la fiecare donator), limfocitele T umane nestimulate/în repaus, derivate din sângele periferic, nu au exprimat nici un CD134, cu toate acestea, PHA a stimulat în funcție de doză limfocitele T umane CD3^{pozitive} pentru a exprima CD134 de suprafață. La expunerea la 10 μ g/ml PHA, nivelurile de expresie ale CD134 asupra limfocitelor T umane CD3^{pozitive} activate pare să ajungă la un platou între "ziua 1" și "ziua 2", cu toate acestea, în cadrul cercetării procentul de limfocite T umane CD134^{pozitive}/CD3^{pozitive} a crescut în funcție de timp.

(b) Expresia CD134 pe subpopulația de limfocite T CD4 umane PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 0 și 10 $\mu\text{g/ml}$, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (receptori $\text{Fc}\gamma$ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate, timp de 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences) sau cu anticorp anti-CD8 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences) în combinație cu clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece conjugată cu PE diluată 1:10, disponibilă comercial (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C . Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 2, expresia CD134 a fost observată pe limfocitele T umane $\text{CD4}^{\text{pozitive}}$ PHA-stimulate și nu pe limfocitele T umane $\text{CD4}^{\text{pozitive}}$, aflate în repaus. Expresia redusă a CD134 a fost determinată pe limfocitele T umane $\text{CD8}^{\text{pozitive}}$ activate cu PHA și nu pe limfocitele T umane $\text{CD8}^{\text{pozitive}}$, aflate în repaus (datele nu sunt prezentate).

(c) Legarea clonelor 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 umani de șoarece pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 $\mu\text{g/ml}$, timp de 2 zile; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (receptori $\text{Fc}\gamma$ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 0; 0,007; 0,02; 0,07; 0,2; 0,6; 1,9; 5,6; 16,7; 50,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, disponibilă comercial (izotip IgG1 de șoarece; BD Biosciences) și cu clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman, timp de 30 min la 4°C . După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior timp de 30 min la 4°C cu anticorpi IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate, timp de 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD3 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:20 (BD Biosciences), pentru a detecta limfocitele T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C . Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 3 (media $\pm$ DS, rezultatele observate la doi donatori), clona ACT35, clona 20H5 ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece au saturat moleculele de suprafață CD134 umane pe limfocitele T $\text{CD3}^{\text{pozitive}}$, PHA-stimulate la aproximativ 5,0...10,0 $\mu\text{g/ml}$. Folosind acești doi donatori, legarea pe jumătate maximală a fost observată la $\approx 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ pentru clona ACT35 și clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece.

(d) Legarea clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T CD4 pozitive și CD8 pozitive, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 20 $\mu\text{g/ml}$, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (receptori $\text{Fc}\gamma$ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ control izotip IgG1 κ de șoarece (BD Biosciences) sau cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, timp de 30 min la 4°C . După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior, timp de 30 min la 4°C cu anticorpi IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1:100 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate, timp de 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:20 (BD Biosciences) sau cu anticorp anti-CD8 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:20 (BD Biosciences), pentru a detecta subpopulațiile de limfocite T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C . Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 4, clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece au demonstrat o colorare pozitivă pe subpopulația de limfocite T $\text{CD4}^{\text{pozitive}}$ umane activate și o colorare slab pozitivă pe subpopulația de limfocite T $\text{CD8}^{\text{pozitive}}$ umane activate.

(e) Competiția încrucișată a clonei 20E5 nemarcate a anticorpului anti-CD134 umani de șoarece cu anticorpii anti-CD134 de șoarece comerciali PE-conjugați pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 $\mu\text{g/ml}$ sau la 20 $\mu\text{g/ml}$, timp de 4 zile sau timp de 1 zi, respectiv; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (receptori $\text{Fc}\gamma$ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate, timp de 30 min la 4°C cu 10 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 nemarcată a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece. Celulele au fost incubate ulterior, timp de 30 min la 4°C cu clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece conjugată cu PE diluată 1:20, disponibilă comercial (BD Biosciences) sau cu clona L106 (BD Biosciences; a se vedea, de asemenea, brevetul lui Godfrey). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor anti-CD134 PE-conjugați, disponibili comercial, a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 5, preincubarea cu clona nemarcată 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a blocat ușor legarea clonei comerciale L106 PE-conjugate a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la CD134 uman pe limfocitele T stimulate cu PHA. Preincubarea cu clona 20E5 nemarcată a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece și un anticorp de comparație nu a exercitat nici un efect asupra legării clonei comerciale ACT35, PE-conjugate, a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la CD134 uman pe limfocitele T stimulate cu PHA.

Aceste rezultate au demonstrat, că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece (i) a recunoscut în mod specific CD134 uman (blocarea ușoară a legării clonei L106) pe limfocitele T stimulate cu PHA, și (ii) s-a legat la un epitop neidentificat, care a fost recunoscut de clona comercială L106 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece par să recunoască epitopii CD134 umani pe limfocitele T stimulate cu PHA, care sunt diferiți de epitopul recunoscut de clona comercială ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Adicional, aceste rezultate au demonstrat că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece par să recunoască epitopi CD134 umani diferiți (acest fapt fiind demonstrat prin blocarea parțială vs. blocarea ușoară a legării L106, respectiv) pe limfocitele T stimulate cu PHA.

(f) Legarea simultană a ligandului recombinant uman OX40 și a clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 $\mu\text{g/ml}$, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (receptori $\text{Fc}\gamma$ blocați; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ ligand recombinant uman OX40, marcat cu polihistidină (IgG_1 de șoarece, clona AD1.1.10; R&D Systems) pentru 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi IgG anti-șoarece de capră conjugați cu FITC diluați 1:100 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 biotinitată (cu utilizarea N-hidroxisuccinimidobiotinei de la Pierce) a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate cu streptavidină conjugată cu PE diluată 1:100 (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C. Legarea OX40L uman și a anticorpilor anti-CD134 umani a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 6, clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece s-au legat simultan cu OX40L uman pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Aceasta indică, că clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu interacționează cu epitopii în regiunea de legare a OX40L pe receptorii CD134 umani. Această constatare vine în contrast cu clona L106, disponibilă comercial, a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (Universitatea Stanford/brevetul Godfrey (Morris et al. Mol. Immunol., 2007, no. 44, 3, p. 112-113,121), care a recunoscut un epitop din regiunea de legare a OX40L uman pe receptorii CD134 umani (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677- 683; Soroosh et al. J. Immunol. 2006, no. 176, p. 5975-5987; Kim et al. Immunity, 2003, no.18, p. 643-54).

(g) Expresia CD134 pe limfocitele T umane efectoare și reglatoare după stimularea cu particule sferice stimulative ale anticorpului anti-CD3 uman/anti-CD28 uman

Limfocitele T CD4 umane au fost purificate din PBMC prin selecție pozitivă, utilizând anticorpi anti-CD4 umani de șoarece conjugați cu microparticule sferice (Miltenyi Biotec) și coloane VarioMACS™ Magnet/LS (Miltenyi Biotec). Ulterior, aceste limfocite T CD4 au fost colorate cu anticorpi anti-CD4 umani de șoarece, conjugați cu FITC (Dako), și anticorpi anti-CD25 umani de șoarece conjugați cu PE (BD Biosciences). Limfocitele T efectoare (Teff) CD4^{pozitive}/CD25^{negative} convenționale și limfocitele T reglatoare (Treg) CD4^{pozitive}/CD25^{inalt} au fost sortate, folosind un sortator celular de citometrie în flux Altra (Beckman Coulter). Aceasta a dus la creșterea > 95% de Teff și > 95% de Treg. Teff și Treg au fost introduse în cantitate de $2,5 \times 10^5$ celule/ml în mediul de cultură RPMI-1640/glutamax (Gibco), suplimentat cu 0,02 mM piruvat (Gibco), 100 U/ml penicilină (Gibco), 100 μg/ml streptomicină (Gibco) și 10% HPS inactivat termic (HPS; de la LMI). Apoi, celulele au fost cultivate în cantitate de $2,5 \times 10^4$ celule/200 μl/godeu în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund (Greiner) și stimulate cu particule sferice stimulatorie de anticorp anti-CD3 uman de șoarece/anti-CD28 uman de șoarece (particule sferice CD3/CD28; Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/2 celule în prezența a 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană (Proleukin® de la Novartis Pharmaceuticals UK Ltd) la 37°C/5% CO₂, timp de 2...8 zile. După cultivare celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în PBS/0,2% BSA refrigerat și au fost colorate simultan cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:50 (Dako), anticorp anti-CD25 uman de șoarece conjugat cu PE diluat 1:10 (BD Biosciences), anticorp anti-CD3 uman de șoarece conjugat cu ECD™ diluat 1:50 (Beckman-Coulter), anticorp anti-CD134 uman de șoarece conjugat cu PE-Cy™5 diluat 1:10 (clona ATC35; BD Biosciences) și anticorp anti-CD127 uman de șoarece conjugat cu PE-Cy™7 diluat 1:10 (eBiosciences). Legarea anticorpilor a fost măsurată folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 7 (n = 1 de la fiecare donator), Teff umane și Treg umane, purificate din sangele periferic, nestimulate/aflăte în repaus (ziua 0), nu au exprimat nici un CD134, cu toate acestea, Teff umane și Treg umane, stimulate de particulele sferice CD3/CD28, au exprimat CD134 de suprafață. Expresia CD134 pe Teff umane și Treg umane activate a atins apogeul după 2 zile de cultivare și a fost atenuată peste 5 și 8 zile de cultivare.

Exemplul 3 Caracteristica biologică a clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece

(a) Proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, după tratamentul cu clonă 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (în 0 și 10 μg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2×10^6 celule/ml în mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost cultivate câte $0,1 \times 10^6$ celule/100 μl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning) și au fost expuse la 0; 0,025; 0,25; 2,5 sau 25,0 μg/ml de clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, sau/și în combinație cu 0; 0,01; 0,1 sau 1,0 μg/ml de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile. Peste 6 zile a fost măsurată proliferarea celulelor, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a celulelor ELISA™ (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în fig. 8 (media ± DS, n = 4, folosind un singur donator), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece au indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. În plus, OX40L uman, de asemenea, a indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. OX40L uman a indus proliferarea la 0,1 și 1,0 μg/ml. Limfocitele T umane CD134^{negative}, aflate în repaus (fără stimulare cu PHA), nu au manifestat nici un răspuns proliferativ după tratamentul cu clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece sau cu OX40L uman (datele nu sunt prezentate).

După cum este arătat în fig. 9 (media ± DS, n = 2, folosind un singur donator), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (la 2,5 și 25 μg/ml) și OX40L uman (la 1,0 μg/ml) au indus proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Lipsa tratamentului (doar mediul) sau tratamentul cu izotipul de control IgG1κ de șoarece (la 2,5 și 25 μg/ml; BD Biosciences) nu au exercitat nici un efect asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Combinațiile de clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece la 2,5 și 25 μg/ml (sau la concentrații mai joase; datele nu sunt

prezentate) și OX40L uman la 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (sau la concentrații mai joase; datele nu sunt prezentate) nu au demonstrat nici un efect reciproc (adică, sinergic sau aditiv, sau chiar inhibitor) asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

- 5 (b) Proliferarea limfocitelor T efectoare și T reglatoare, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice anti-CD3/anti-CD28 uman, după tratamentul cu clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece

Limfocitele T CD4 umane au fost purificate din PBMC prin selecție negativă, utilizând un amestec din anticorpi de șoarece (BD BioSciences), direcționat împotriva CD8 uman (clona RPA-T8), CD14 (clona M5E2), CD16 (clona 3G8), CD19 (clona 4G7), CD33 (clona P67.6), CD56 (clona B159) și CD235a (HIR2). După incubarea cu IgG anti-șoarece de berbec, conjugate cu Dynabeads® (Invitrogen), limfocitele T CD4 nelegate au fost colectate din Concentratorul de Particule Magnetice Dynal, MPC™-6 (Invitrogen). Dintre aceste limfocite T CD4 stimulate, au fost separate Treg CD25^{inalt} și Teff CD25^{negative} prin sortarea MACS, folosind 10 μl anticorpi anti-CD25 umani de șoarece, conjugati cu microparticule sferice (Miltenyi Biotec)/10⁷ celule și coloane MiniMACS™ Magnet/MS (coloane Miltenyi Biotec VarioMACS™ Magnet/LS (Miltenyi Biotec)). Aceasta a avut drept rezultat creșteri > 90% de Teff și > 90% de Treg. Teff și Treg au fost introduse în cantitate de 0,25x10⁶ celule/ml în mediul de cultură RPMI-1640/glutamax (Gibco), suplimentat cu 0,02 mM piruvat (Gibco), 100 U/ml penicilină (Gibco), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicină (Gibco) și 10% HPS_i. Ulterior, Teff și Treg au fost înșămânțate în cantitate de 2,5x10⁴ celule/200 μl /godeu (adică, 0,125x10⁶ celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund (Greiner) și au fost stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/5 celule cu sau fără 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems), o combinație dintre 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece) la 37°C/5% CO₂ pentru 4 sau 5 zile. Peste 4 sau 5 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind incorporarea a 0,5 μCi timidină tritiată (Perkin & Elmer) și un calculator β (Canberra-Packard).

După cum este arătat în fig. 10 (media $\pm$ DS), cu toate că particulele sferice stimulative CD3/CD28 au indus singure proliferarea considerabilă a Teff, care exprimă CD134 uman (adică, media). Clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu a indus proliferarea suplimentară a Teff, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

După cum este prezentat în fig. 11 (media $\pm$ SEM de la 5 donatori), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu au indus deloc sau au indus proliferarea redusă a Treg, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28, în timp ce OX40L uman a indus o proliferare foarte puternică a Treg, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

După cum este arătat în fig. 12A (media $\pm$ DS), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece în combinație cu OX40L uman nu a demonstrat nici un efect reciproc (adică, inhibitor, sinergic sau aditiv) asupra Teff, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (datele nu sunt prezentate).

- 45 (c) Funcția supresoare a limfocitelor T reglatoare, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28 uman după tratamentul cu clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece

Limfocitele T CD4 umane au fost purificate din PBMC, iar Teff și Treg au fost stimulate conform exemplului 3(b), descris mai sus. Teff și Treg au fost introduse în cantitate de 0,25x10⁶ celule/ml în mediul de cultură RPMI-1640/glutamax (Gibco), suplimentat cu 0,02 mM piruvat (Gibco), 100 U/ml penicilină (Gibco), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicină (Gibco) și 10% HPS_i. Ulterior, Teff și Treg au fost înșămânțate în cantitate de 2,5x10⁴ celule/200 μl /godeu (adică, 0,125x10⁶ Teff/ml) și cocultivate cu 2,5 x10⁴ Treg supresoare/200 μl /godeu (adică, 0,125x10⁶ Treg/ml; raportul Teff:Treg = 1:1) în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund (Greiner). Aceste co-culturi Teff/Treg au fost stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/10 celule cu sau fără 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems), la 37°C/5% CO₂, timp de 5

zile. Peste 5 zile proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind incorporarea a 0,5 μ Ci de timidină tritiată (Perkin & Elmer) și un calculator β (Canberra-Packard).

- 5 După cum este arătat în fig. 13 (media $\pm$ DS), Treg umane au suprimat răspunsurile proliferative ale Teff umane, induse de particulele sferice CD3/CD28 (adică, media). Această funcție de supresie a Treg umane a fost redusă în prezența OX40L uman. Clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu a manifestat nici un efect asupra funcției de supresie a Treg umane.

10 **Exemplul 4** Caracteristica moleculară genetică a clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece

(a) Izotiparea și degradarea Edman

- 15 Clasa imunoglobulinei de șoarece, izotipul și tipul lanțului ușor în cazul clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, purificat de Proteina G, s-au determinat, folosind Setul pentru Izotipul Anticorpului Monoclonal de șoarece IsoStripTM (Roche) și s-a arătat că clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece s-a dovedit a fi IgG1 de șoarece conținând lanțuri ușoare κ .

- 20 După electroforeza standard LDS-PAGE, utilizând sistemul cu gel prefabricat NuPage® Novex® (Invitrogen) în condiții reduse (DTT și încălzire 70°C), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a fost supusă electro-blottingului pe o membrană de transfer din fluorură de poliviniliden (PDVF/Immobilon-P) (Millipore) și colorată cu albastru brilliant de Coomassie (BioRad). Ulterior, benzile lanțurilor grele și ușoare (50 kDa și 25 kDa, respectiv) au fost excizate din membrana PVDF și utilizate pentru analiza degradării Edman (realizată cu EuroSequence, Groningen, Olanda) pentru a determina secvențele N-terminale ale aminoacizilor. Rezultatele sunt prezentate în SEQ ID NO 3 și SEQ ID NO 61 pentru clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece. Au fost determinați 11 aminoacizi la capătul N-terminal al lanțurilor grele și 11 aminoacizi la capătul N-terminal al lanțurilor ușoare.

(b) RT PCR

- 30 Celulele hibridomului din clona 20E5 au fost recoltate din cultura de celule. Celulele au fost spălate cu PBS, alicotate în flacoane conținând câte 5×10^6 celule și păstrate ca pelete la -80°C. Peletele de celule au fost folosite pentru a izola ARN, utilizând Mini Setul pentru Izolare RNează (QIAGEN). A fost determinată concentrația de ARN (A260 nm) și ARN a fost depozitat la -80°C. Randamentul total de ARN izolat: 27,3 μ g și 58,4 μ g pentru clona 20E5 (raportul A260/280 de 1,9). Cu transcriptaza inversă a fost sintetizat ADNc din 1 μ g de ARN, utilizând setul RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), acesta fiind depozitat la -20°C.

- 35 În baza izotipului (κ /IgG1 de șoarece) și analizei de degradare Edman a clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, primerii următori au fost desemnați pentru a amplifica regiunile V ale clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (tab. 2):

40 **Tabelul 2**

Primerul nr. *	Secvența**	SEQ ID No.	Direcția	Gena
201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	39	antisens	mkappa
266	CACTGGATGGTGGGAAGATG	40	antisens	mkappa
203	GGCCAGTGGATAGACAGATG	41	antisens	mIgG1
204	TGGACAGGGATCCAGAGTTC	42	antisens	mIgG1
259	GCGAAGTACAAYTNCARCARWSNGG	43	sens	20E5HC
260	GCGTACAATTACARCARWSNGGNCC	44	sens	20E5HC
265	GCGATATACARATGACNCARAC	45	sens	20E5LC

* nr. în conformitate cu sistemul intern de codificare Bioceros;

** primerii degenerați: N = A, C, G, sau T, Y = C, sau T, R = A, sau G, W = A, sau T și S = G, sau C.

Primerii 201 și 266 sunt proiectați antisens pentru a se hibridiza în regiunea constantă a genei kappa de șoarece în pozițiile 214...232 și 236...255, respectiv (pe baza numărului de acces V00807 [versiunea V00807.1]).

Primerii 203 și 204 sunt proiectați antisens pentru a se hibridiza în regiunea constantă a IgG1 de șoarece în pozițiile 115...134 și 221...240, respectiv (pe baza numărului de acces J00453 [versiunea J00453.1]).

Primerii 259 și 260 sunt primeri sens de degenerare (degenerare, respectiv, 512 și 256), hibridizați la capătul N-terminal (aminoacizii 1...8 și, respectiv, 2...9) al catenei grele din clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, conform degradării Edman.

Primerul 265 este un primer sens de degenerare (degenerare la 16), hibridizat la capătul N-terminal (aminoacizii 1...7) al lanțului ușor din clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, conform degradării Edman.

Primerii 201, 266, 203, 204, 259, 260 și 265 au fost utilizați în diferite combinații pentru a amplifica regiunile variabile ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Au fost efectuate diferite PCR, folosind ADNc generat ale ambelor clone în calitate de model.

ADN Polimeraza Pfx Accuprime™ (Invitrogen) a fost utilizată pentru a amplifica regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Produsele PCR au fost analizate pe 1% gel de agaroză. Produsele reacțiilor PCR au fost purificate pe gel și clonate în vectorul pCR-Blunt II-TOPO® pentru analiza secvenței. Din plasmidele care conțin o inserție PCR, inserțiile clonate au fost analizate prin secvențierea ADN (realizată cu ServisXS BV, Leiden, Olanda sau Macrogen, Amsterdam, Olanda), folosind T7 pentru a obține secvența consens pentru regiunile V ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Pentru clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 de șoarece au fost obținute 11 reacții informative ale secvențelor lanțului greu și 3 reacții informative ale secvențelor lanțului ușor. În baza acestor informații au fost determinate secvențele consens din regiunile V ale ambilor anticorpi (SEQ ID NO 4 și 5).

Exemplul 5 Generarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4/kappa și/sau IgG1/kappa (adică, schimbul domeniilor constante murine cu domeniile constante IgG/kappa umane)

Pe baza regiunilor V murine determinate (exemplul 4(b) de mai sus) ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 de șoarece, a fost realizat un design pentru a genera versiuni umane de anticorpi himerici. În acest scop secvențele ADNc optimizate ale celulelor CHO (SEQ ID NO 20 (care codifică clona himerică 20E5 a lanțului greu IgG4 uman), SEQ ID NO 21 (care codifică clona himerică 20E5 a lanțului ușor κ uman), SEQ ID NO 22 (care codifică clona himerică 20E5 a lanțului greu IgG1 uman), au fost comandate la GENEART (Regensburg, Germania), fiind codificate pentru o peptidă murină de semnalizare, urmată fie de lanțul ușor variabil, legat la regiunea constantă kappa umană, fie urmată de lanțul greu variabil, legat la regiunea constantă IgG umană. Acest design a fost realizat pentru ambii anticorpi; pentru clona 20E5, lanțul greu variabil a fost legat la regiunea constantă IgG4 umană sau IgG1 umană. Utilizând enzime de restricție corespunzătoare, moleculele de ADNc generate au fost subclonate în plasmide de expresie pcADN3.1-derivate. Anticorpii himerici au fost exprimați utilizând Sistemul de Expresie FreeStyle™ MAX CHO (celule CHO-S) (Invitrogen). Anticorpii exprimați au fost purificați, utilizând coloane cromatografice de afinitate a proteinei A (GE Healthcare). Pentru secvențele de aminoacizi himerici, a se vedea SEQ ID NO 25, 26, 27, 28 și 29.

Exemplul 6 Caracteristica legării clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4/kappa și/sau IgG1/kappa

(a) Caracteristicile de legare ale clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ pe limfocitele T CD4 pozitive, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu 0; 0,007; 0,02; 0,07; 0,2; 0,6; 1,9; 5,6; 16,7; 50,0 μg/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ, timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi anti-IgG4 umani de șoarece conjugați cu FITC diluați 1:50 (Sigma). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃ celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu PE diluat 1:10 (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃ celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în

PBS/BSA/NaN₃, timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ a saturat moleculele de suprafață CD134 umane pe limfocitele T CD4^{pozitive}, PHA-stimulate la circa 5,0...10,0 μg/ml (datele nu sunt prezentate). Legarea pe jumătate maximală a fost observată la ≈ 1,0 μg/ml pentru clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (datele nu sunt prezentate).

(b) Legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ pe limfocitele T CD4 pozitive și CD8 pozitive, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate
 Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de 1...2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu sau fără 20,0 μg/ml de clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior timp de 30 minute la 4°C cu anticorpi anti-IgG umani de capră (Fcγ specifici) conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃ celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences), sau cu anticorp anti-CD8 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences) pentru a detecta subpopulațiile de limfocite T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃, timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ a demonstrat o colorare pozitivă pe subpopulația de limfocite T umane CD4^{pozitive}, PHA-activate, și o colorare slab pozitivă pe subpopulația de limfocite T umane CD8^{pozitive}, PHA-activate (datele nu sunt prezentate).

(c) Legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ pe limfocitele T CD4 pozitive și CD8 pozitive, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman/anti-CD28 uman

Celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat) au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, 1x10⁶ PBMC/ml în mediul de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco) au fost stimulate cu particule sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman de șoarece/anti-CD28 uman de șoarece (particule sferice CD3/CD28; Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/4 celule în absența sau prezența a 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană (PeproTech) la 37°C/5% CO₂, timp de 1 zi. După cultivare, PBMC au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu sau fără 20,0 μg/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi anti-IgG umani de capră (Fcγ specifici) conjugați cu FITC diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃ celulele au fost incubate, timp de 30 min la 4°C cu anticorp anti-CD4 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences) sau cu anticorp anti-CD8 uman de șoarece conjugat cu FITC diluat 1:10 (BD Biosciences) pentru a detecta subpopulațiile de limfocite T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃, timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 14, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ a demonstrat o colorare pozitivă pe subpopulația de limfocite T umane CD4^{pozitive}, activate de particulele sferice CD3/CD28, și o colorare slab pozitivă pe subpopulația de limfocite T umane CD8^{pozitive}, activate de particulele sferice CD3/CD28. La utilizarea suplimentului de IL-2 recombinantă umană nu a fost observat nici un efect aparent.

Exemplul 7 Caracteristica biologică a clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4/kappa

(a) Proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, după tratamentul cu clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2x10⁶ celule/ml în

mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost cultivate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 μl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning) și au fost expuse la 25,0 μg/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau la 25,0 μg/ml anticorp uman de control anti-CD40 uman IgG4κ (PG102; Pangenetics), sau la 1,0 μg/ml de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile. Peste 6 zile a fost măsurată proliferarea celulelor, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISATM (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în fig. 15 (media ± DS), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (hu20E5) și OX40L uman au indus proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Lipsa tratamentului (doar mediul) sau tratamentul cu anticorpul uman de control anti-CD40 uman IgG1κ (huIgG4) nu au exercitat nici un efect asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

(b) Proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, după tratamentul cu clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ în combinație cu OX40L uman recombinant

Au fost generate limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml, timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2×10^6 celule/ml în mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost cultivate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 μl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning) și au fost expuse la 0; 0,025; 0,25; 2,5 sau 25,0 μg/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau/și în combinație cu 0; 0,01; 0,1 sau 1,0 μg/ml de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile. Peste 6 zile a fost măsurată proliferarea celulelor, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISATM (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în fig. 16 (media ± DS), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (hu20E5) și OX40L uman au indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ a indus donator-dependent proliferarea fie la 2,5 și 25 μg/ml (donatorul 1), fie la 0,25; 2,5 și 25 μg/ml (donatorul 2). În plus, OX40L uman a indus donator-dependent proliferarea fie la 0,1 și 1,0 μg/ml (donatorul 1), fie la 0,01; 0,1 și 1,0 μg/ml (donatorul 2).

După cum este arătat în fig. 17 (media ± DS), combinația dintre clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (hu20E5) în concentrație de 2,5 și 25 μg/ml (sau în concentrații mai reduse; datele nu sunt prezentate) și OX40L uman în concentrație de 0,1 și 1,0 μg/ml (sau în concentrații mai joase; datele nu sunt prezentate) nu a manifestat nici un efect reciproc (adică, sinergic sau aditiv, sau chiar inhibitor) asupra proliferării limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

(c) Proliferarea limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particulele sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman/anti-CD28 uman, după tratamentul cu clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ

Celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat) au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, PBMC au fost cultivate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 μl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning) în mediul de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco), și au fost stimulate cu particule sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman de șoarece/anti-CD28 uman de șoarece (particule sferice CD3/CD28; Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/2 celule în absența sau în prezența a 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană (PeproTech) la 37°C/5% CO₂. Peste 1 sau 2 zile aceste limfocite T, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (minus și plus interleukina-2), au fost expuse la 25,0 μg/ml de clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau la 1,0 μg/ml de OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența unui raport molar de 1:5 de anticorp anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile sau timp de 5 zile,

respectiv. Celulele care au fost inițial stimulate cu combinația de particule sferice CD3/CD28 și interleukină-2 recombinantă umană, au fost stimulate în mod repetat cu 1 zi înainte de măsurările proliferării celulelor cu 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană. Peste 6 zile sau peste 5 zile de expunere la clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau la OX40L uman recombinant, a fost măsurată proliferarea celulelor, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISA™ (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în fig. 18 (media ± DS, n=3, folosind un singur donator), deși particulele sferice stimulator CD3/CD28 au indus singure o proliferare considerabilă a limfocitelor T, care exprimă CD134 uman (adică, mediul), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (hu20E5) și OX40L uman au indus o proliferare suplimentară a limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particulele sferice CD3/CD28. Se pare că adiția interleukinei-2 doar a amplificat proliferarea bazală (adică, mediul) în cazul limfocitelor T, care exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

(d) Răspunsurile imunostimulator la maimuțele Macac Rhesus după tratamentul cu clona umană (himerică) 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman

Primatele non-umane, maimuțele Macac Rhesus, pot fi imunizate cu proteina virusului de imunodeficiență simiană, gp130 (US 20070117809).

Se așteaptă ca ganglionii limfatici regionali de la maimuțele imunizate, tratate cu clonele umane (de exemplu, himerice sau imunizate, sau deimunizate; de exemplu, subclassele umane IgG1 sau IgG4) 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani, să fie măriți, comparativ cu maimuțele imunizate de control. Se așteaptă ca maimuțele tratate cu clonele umane (de exemplu, himerice sau imunizate, sau deimunizate) 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani să prezinte creșterea titrurilor de anticorpi gp130-specifiți și răspunsuri amplificate de lungă durată ale celulelor T, în comparație cu loturile de control. La maimuțele tratate nu ar trebui să existe semne evidente de toxicitate.

Exemplul 8 Caracterizarea domeniilor și epitopilor CD134 uman, recunoscuți de clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece

(a) Legarea clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece cu CD134 uman recombinant redus și neredus: proteina de fuziune Fcγ umană (western blotting)

Au fost supuse electroforezei 1300 sau 650 ng/bandă (pentru colorarea cu albastru brilliant de Coomassie) sau 250 ng/bandă (pentru western blotting) de CD134 uman recombinant: proteină de fuziune Fcγ umană (IgG1) (R&D Systems), folosind 4...12% geluri Tris-bis și soluție-tampon continuu MOPS (Invitrogen), într-o varietate de condiții de nereducere și de reducere (fig. 19-A) în sistemul prefabricat LDS-PAGE de electroforeză de denaturare NuPage® Novex®. Ulterior, CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fcγ umană a fost fie colorată cu albastru brilliant de Coomassie (BioRad), fie supusă electro-blotting-ului pe o membrană de transfer din fluorură de poliviniliden (PDVF) (Millipore). După blocarea cu PBS/0,05% Tween 20/1% fracțiune V BSA (Roche) timp de 20 minute la temperatura camerei, membranele PDVF au fost incubate pentru 1 oră la temperatura camerei cu 100 ng/ml clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece. În paralel, în calitate de control negativ, au fost folosite 100 ng/ml de anticorp de control izotip IgG1κ de șoarece (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, legarea clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a fost determinată cu 1:5000 anticorpi diluați de capră Fcγ-specifiți anti-șoarece, conjugați cu peroxidază de hrean (Jackson ImmunoResearch), timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o soluție de substrat TMB (Sigma), gata pentru utilizare, pentru detectarea colorimetrică.

După cum este arătat în figura 19-B, CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fcγ umană în condiții de nereducere (și denaturante LDS fără și cu denaturare termică, condiția a și b, respectiv) a demonstrat o masă moleculară de ≈ 130-140 kDa. Non-reducerea, fără încălzire (condiția a), a arătat două benzi din imediata apropiere, ceea ce a sugerat că o fracțiune de CD134 uman recombinant:proteină de fuziune Fcγ umană a fost incomplet denaturată/desfășurată. Non-reducerea, cu încălzire (condiția b), a arătat o bandă, care a sugerat că CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fcγ umană a fost complet denaturată/desfășurată. CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fcγ umană în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția c și d, respectiv) a avut drept rezultat benzi de ≈ 110 kDa (condiția c) și de ≈ 60...65 kDa (condiția d). Observațiile anterioare au sugerat reducerea incompletă a CD134 uman

recombinant: proteinei de fuziune Fc γ umane, iar observațiile ulterioare au sugerat reducerea completă/ruptura punților disulfidice, care unesc două fragmente IgG1 Fc γ - derivate umane în fiecare CD134 uman recombinant: moleculă de proteină de fuziune Fc γ umană.

După cum este arătat în fig. 19-C, clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fc γ umană în condiții de non-reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția a și b, respectiv) la predominant $\approx$ 130 kDa. În contrast, clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a arătat o legare puternică cu CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fc γ umană în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția c și d, respectiv).

Aceste rezultate atestă, că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut în mod specific CD134 uman. Aceste rezultate au sugerat faptul că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut un epitop pe CD134 uman, care nu este sensibil la denaturare (tratament termic și cu LDS) și nu este sensibil la reducere (adică, la ruperea punții (-ilor) disulfidice de către DTT - cel mai probabil, legate de CRD).

(b) Legarea clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece cu constructul de CD134 uman cu lungime completă și diferite structuri trunchiate ale CD134 uman, exprimate pe linia celulară 293-F (cartografierea domeniilor)

Pentru a analiza specificitatea față de clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, localizarea epitopului (-ilor) recunoscuți de către clonele 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece a fost determinată prin cartografierea domeniilor. Abilitatea clonelor 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani de șoarece de a se lega la structurile trunchiate de CD134 uman, exprimat pe suprafața celulelor 297-F (HEK-derivate), a fost determinată prin analiza FACS.

În baza datelor din literatura de specialitate (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683; Swiss-Prot: P43489.1; Bodmer et al. Trends Biochem. Sci., 2002, no. 27, p. 19-26; Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330; US 2011/0028688 A1) au fost identificate domeniile bogate în cisteină (CRD) și o structură balamă în regiunea extracelulară a CD134 uman. CRD au fost codificate ca CRD1, CRD2, CRD3 (trunchiat), CRD4 (trunchiat) (fig. 20). CRD conțin tipuri de module distincte din punct de vedere topologic, numite modulul A și modulul B (fig. 20). Modulele A sunt structuri în formă de C, iar modulele B sunt structuri în formă de S. Un domeniu CRD tipic este, de obicei, compus din modulele A1-B2 sau modulele A2-B1 (sau, mai puțin frecvent, o altă pereche de module, cum ar fi A1-B1) cu 6 reziduuri de cisteină conservate, în care numeralul reprezintă numărul de punți disulfidice în fiecare modul (fig. 20). După cum este arătat în fig. 20, au fost generate și exprimate 5 structuri diferite ale CD134 uman: (1) constructul CD134 uman cu lungime completă, care începe cu CRD1 N-terminal (adică, modulul CRD1 A1-B2 acoperă aminoacizii 29...65), și, prin urmare, notat ca "CRD1", și conține aminoacizii 1...277 (SEQ ID NO 1), (2) constructul "CRD2", care începe cu CRD2 N-terminal (adică, modulul CRD2 A1-B2 acoperă aminoacizii 66...107) și conține aminoacizii 66...277, legați la aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO 30), (3) constructul "CRD3", care începe cu CRD3 N-terminal (adică, modulul CRD3 A1-B1 acoperă aminoacizii 108...146 (Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330) sau modulul CRD3 A1 trunchiat acoperă aminoacizii 108...126 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683) și conține aminoacizii 108...277, legați la aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO 31), (4) constructul "CRD4", care constă din CRD4 N-terminal sau modul B1/modul CRD4 A1 trunchiat al subdomeniului CRD3 (adică, modulul CRD4 A1-B1 acoperă aminoacizii 127...167 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683), sau o combinație (nu este prezentată în fig. 20) de modul B1 al subdomeniului CRD3 și modul CRD4 A1 trunchiat, care acoperă aminoacizii 127...146 cu aminoacizii 147...167, respectiv (Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330), și conține aminoacizii 127...277, legați la aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO 32), și (5) constructul "CRD4 trunchiat (tc)", care constă din CRD4 N-terminal trunchiat sau modulul B1 al subdomeniului CRD4 (adică, modulul CRD4 A1 trunchiat acoperă aminoacizii 147...167 (Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330) sau modulul B1 al subdomeniului CRD4 (nu este prezentat în fig. 20 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683) acoperă aminoacizii 147...167)), și conține aminoacizii 147...277, legați la aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO 33). Prin asamblarea PCR, utilizând ADN Polimerază Pfx Accuprime™ (Invitrogen), aceste 5 structuri CD134 umane au fost generate cu utilizarea primerilor prezentați în tabelul 3 care urmează:

Tabelul 3

Primerul nr. *	Secvența**	SEQ ID No.	Direcția	Gena
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	sens	lider CD134
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGGCCA	55	antisens	CD134 terminal
364	ACTGTCACTGGACCCTGCGGTCCC	52	sens	CRD2
365	GGGACCGCAGGGTCCAGTGACAGT	53	antisens	CRD2
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	sens	CRD3
367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	antisens	CRD3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCT	57	sens	CRD4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	antisens	CRD4
370	ACTGTCACTGGATGCACCCTGGCT	59	sens	CRD4 trunchiat
371	AGCCAGGGTGCATCCAGTGACAGT	60	antisens	CRD4 trunchiat

* Nr. primerului în conformitate cu sistemul intern de codificare Bioceros

În sumar, ADNc care codifică aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare și ADNc care codifică aminoacizii 66...277 din CD134 uman au fost amplificați, folosind perechea de primeri 362/365 și, respectiv, 364/363 într-o reacție PCR cu CD134 uman cu lungime completă ca model. Ulterior, constructul "CRD2" a fost generat prin utilizarea acestor două produse de PCR într-o asamblare PCR, folosind perechea de primeri 362/363. ADNc care codifică constructul "CRD2" a fost subclonat într-o plasmidă de expresie pcADN3.1-derivată, folosind situsuri de restricție corespunzătoare. În mod similar, constructul "CRD3" (aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare, legați la aminoacizii 108...277 din CD134 uman), constructul "CRD4" (aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare, legați la aminoacizii 127...277) și constructul "CRD4 trunchiat" (aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare, legați la aminoacizii 147...277) au fost generați și subclonați în plasmide de expresie pcADN3.1-derivate, utilizând primerii corespunzători, prezentați în tabelul menționat anterior. Mai mult decât atât, CD134 uman cu lungime completă (SEQ ID NO 1) a fost, de asemenea, clonat repetat într-o plasmidă de expresie pcADN3.1-derivată.

Utilizând Sistemul de Expresie FreeStyle™ 293 (Invitrogen), celulele FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) au fost transfectate tranzitoriu cu 5 variante generate de CD134 uman. Peste 48...72 h, expresia CD134 uman de suprafață pe celulele transfectate a fost analizată prin analiza FACS. În acest scop, celulele transfectate au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 . Celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de clone 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani de șoarece. În paralel, în calitate de control negativ au fost utilizate 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de anticorp de control izotip IgG1 κ de șoarece (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi IgG anti-șoarece de capră ($\text{Fc}\gamma$ specifici) conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 21, clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut CD134 uman cu lungime completă (notat ca construct "CRD1") pe celulele transfectate 293-F, în timp ce clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu a arătat nici o legare pe celulele fals-transfectate 293-F. Mai mult decât atât, clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut variantele trunchiate ale CD134 uman, care nu aveau CRD1 și CRD1-CRD2 (notate ca construct "CRD2" și construct "CRD3", respectiv) pe celulele transfectate 293-F. În contrast, clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a arătat o legare puternică la varianta trunchiată a CD134 uman, care nu avea CRD3 A1-modul CRD1-CRD2-trunchiat (notat ca construct "CRD4") și la varianta trunchiată de CD134 uman, care nu avea modulul A cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 CRD1-CRD2-trunchiat (Latza et al. Eur. J.

Immunol. 1994, no. 24, p. 677- 683), sau, in mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul (Compaan et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330), notat ca construct "tcCRD4").

5 Aceste rezultate au demonstrat că clonele 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece au recunoscut in mod specific CD134 uman (compararea transfecției CD134 uman cu lungime completă vs. transfecție falsă). Aceste rezultate au demonstrat că clona clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu pare să recunoască un epitop al CD134 uman în CRD1, CRD2 și in modulul A1 trunchiat cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677- 683)sau, in mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul (Compaan et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330). Aceste rezultate au demonstrat că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece pare să recunoască un epitop liniar sau neliniar/conformațional în CRD4 A1-modulul trunchiat (Compaan et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330), și, posibil, în structura balama, cu secvența de aminoacizi 147-214 (SEQ ID NO: 36) pe CD134 uman extracelular.

15 Folosind o cristalografie, Compaan et al. (Compaan et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330) au descoperit recent implicarea critică a CRD1, CRD2 (în special a buclei A1 și a reziduurilor imediat următoare), și a CRD3 (în primul rând, a buclei A1) pe CD134 uman în timpul interacțiunii ligandului OX40 (CD252)/CD134 (= OX40). Această descoperire în concordanță cu concluziile noastre, conform cărora (1, a se vedea mai sus), clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece pare să nu recunoască un epitop al CD134 uman în 20 CRD1, CRD2 și modulul A1 cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677- 683), sau, in mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modulul (Compaan et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330) pe CD134 uman extracelular, și (2, a se vedea mai sus) clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece s-a legat simultan cu OX40L uman pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Aceasta a sugerat că 25 clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut un epitop pe CD134 uman, care nu a avut o implicație critică în interacțiunea dintre CD134 uman și OX40L uman.

(c) Cartografierea epitopului (2) clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, utilizând Tehnologia CLIPS de Cartografiere a Epitopului cu Pepscan
30 Tehnologia CLIPS de Cartografiere a Epitopului cu Pepscan (Lelystad, Olanda) poate fi utilizată pentru a determina epitopii recunoscuți de către clonele 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece. Această tehnologie CLIPS permite determinarea epitopilor liniari, conformaționali, discontinui și complecși, care implică complexe proteice dimerice sau multimerice. În acest scop, secvența liniară de aminoacizi a CD134 uman = OX40 (SEQ ID NO: 35 1) este folosită ca proteină-țintă.

Exemplul 9 Caracteristica domeniilor și epitopilor CD134 uman, recunoscuți de către clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4/kappa și/sau IgG1/kappa

40 (a) Legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ cu constructul CD134 uman cu lungime completă și diferite structuri trunchiate ale CD134 uman, exprimate pe linia celulară 293-F (cartografierea domeniului)

Pentru a analiza specificitatea fină a clonelor himerice umane 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG 4κ și/sau IgG1κ, localizarea epitopului (-ilor), recunoscută de 45 către clonele himerice umane 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani IgG4κ și/sau IgG1κ, a fost determinată cu ajutorul cartografierii domeniului. Abilitatea clonelor himerice umane 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ de a se lega la structurile trunchiate ale CD134 uman (exemplul 8(b) de mai sus), exprimate pe suprafața celulelor 297-F (HEK-derivate), a fost determinată prin analiza FACS.

Utilizand Sistemul de Expresie FreeStyle™ 293 (Invitrogen), celulele FreeStyle™ 293-F 50 (Invitrogen) au fost transfectate tranzitoriu cu 5 variante generate de CD134 uman (a se vedea mai sus). Peste 48...72 ore expresia CD134 uman de suprafață pe celulele transfectate a fost analizată prin analiza FACS. În acest scop celulele transfectate au fost recoltate și introduse în cantitate de 1...2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate pentru 30 de min la 4°C cu sau fără 20,0 μg/ml de clone himerice umane 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani IgG 4κ și/sau IgG1κ. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au 55 fost incubate ulterior cu anticorpi anti-IgG umani de capră (Fcγ specifici), conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃, timp de 30 de min

la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este prezentat în fig. 22, clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ a demonstrat caracteristici de legare la diferite structuri trunchiate ale CD134 uman pe celulele transfectate, care au fost identice cu caracteristicile de legare ale omologilor lor parentali corespunzători ai clonelor 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece (exemplul 8(b) de mai sus; pentru comparație, a se vedea fig. 22 vs. fig. 21).

Exemplul 10 Generare de clone umanizate 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani IgG4κ

În baza regiunilor V murine determinate (exemplul 2 (b) de mai sus) ale clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece au fost generate versiuni de anticorpi umanizați.

Secvențele umanizate ale regiunii variabile a lanțului ușor și secvențele umanizate ale regiunii variabile a lanțului greu ale clonelor 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 umani de șoarece s-au obținut folosind tehnologia PDL (realizată de Panaroma Research Institute, Sunnyvale, CA, Statele Unite ale Americii). Pentru secvențele de acizi nucleici ale regiunii variabile a lanțului ușor și ale regiunii variabile a lanțului greu umanizate a se vedea SECV ID NO: 62 (20E5-VL1), 63 (20E5-VL2), 64 (20E5-VH1), 65 (20E5-VH2), 66 (20E5-VH3).

Conform acestui design, secvențele optimizate de *Cricetulus griseus* (vezi SECV ID NO: 72, 73, 74 (care codifică versiunile clonei 20E5 cu lanț greu IgG4 umanizat cu lungime completă, adică, VH1, VH2, VH3, respectiv), SEQ ID NO: 75, 76 (care codifică versiunile clonei 20E5 cu lanț ușor IgG4 umanizat cu lungime completă, adică, 20E5_VL1, 20E5_VL2, respectiv), disponibile de la GENEART (Regensburg, Germania), care codifică o peptidă de semnalizare urmată fie de regiunea variabilă a lanțului greu umanizat legată la regiunea constantă IgG4 umană, sau urmată de regiunea variabilă a lanțului ușor umanizat legată la regiunea constantă kappa umană: pentru exprimarea versiunilor umanizate ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman, o imunoglobulină de șoarece a lanțului greu al peptidei de semnalizare s-a utilizat pentru ambele lanțuri ușoare și grele umanizate, o imunoglobulină umană a lanțului greu al peptidei de semnalizare s-a utilizat pentru lanțurile grele umanizate și o imunoglobulină kappa umană a lanțului unei peptide de semnalizare - pentru lanțurile ușoare umanizate. Mai mult decât atât, toți anticorpii umanizați au fost exprimați ca molecule IgG4 umane stabilizate, conform Angal și colab. (Angal et al. Mol. Immunol., 1993, vol. 30, no. 1, pp. 105-108). Utilizând enzimele de restricție potrivite, cADN generați au fost subclonați în plasmide de expresie pcADN3.1-derivate.

Versiunile umanizate ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman au fost exprimate utilizând sistemul de expresie FreeStyle™ MAX CHO (Life Technologies). Anticorpii umanizați generați au fost purificați utilizând coloane cu proteină A de cromatografie de afinitate (GE Healthcare). În acest mod s-au generat șase versiuni umanizate purificate ale clonei 20E5 a anticorpului, adică, 20E5_VL1VH1, 20E5_VL1VH2, 20E5_VL1VH3, 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2 și 20E5_VL2VH3.

Pentru secvențele de aminoacizi umanizate a se vedea SEQ ID NO: 82, 83, 84 (care codifică versiunile umanizate ale clonei 20E5 cu lanț greu IgG4 cu lungime completă, adică, VH1, VH2, VH3, respectiv), SEQ ID NO: 85, 86 (care codifică versiunile umanizate ale clonei 20E5 cu lanț ușor IgG4 cu lungime completă, adică, VL1, VL2, respectiv).

Exemplul 11 Caracteristica legării clonei umanizate 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ

(a) Legarea clonelor umanizate 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 umani IgG4κ cu CD134 uman recombinant: proteina de fuziune Fcγ umană (ELISA)

Plăcile ELISA cu 96 godeuri cu fundul plat (Corning) au fost acoperite cu 50 ng/godeu de CD134 uman recombinant: proteină de fuziune FcΓ (IgG1) umană (R&D Systems) în PBS pe noapte la 4°C. După spălare extensivă în PBS/0,05% Tween 20, plăcile au fost blocate în PBS/0,05% Tween 20/1% fracția V BSA (Roche) pentru 1 oră la temperatura camerei. Ulterior, plăcile au fost incubate cu 0, 0,0003...20,0 μg/ml (etapele de diluție de 3 ori în tampon bloc) de clonă 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman parental de șoarece, clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ și șase versiuni ale clonei umanizate 20E5 sau 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ pentru 1 oră la temperatura camerei. După spălare extensivă în PBS/0,05% Tween 20, legarea anticorpilor a fost determinată cu anticorpi anti-IgG umani de capră (Fcγ-specifici) conjugați cu peroxidază de hrean diluați 1:5000 (Jackson ImmunoResearch)

sauna cu anticorpi κ -specificali anti-umani de capră conjugați cu peroxidază de hrean diluați 1: 4000 (Southern Biotech) timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o soluție de substrat TMB gata de utilizat (Invitrogen) pentru detectarea colorimetrică. După adăugarea a 1 M H₂SO₄, au fost măsurate densitățile optice la o lungime de undă de 450 nm (lungimea de undă de referință de 655 nm) cu un cititor de microplăci (BioRad).

Așa cum este prezentat în fig. 28 ($n = 2$), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și toate șase versiuni ale clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ doză-dependent și specific se leagă la CD134 recombinant uman. Clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și versiunile umanizate ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2 și 20E5_VL2VH3 manifestă curbe de titrare identice, care indică că antigenul lor CD134 cu afinitate de legare a fost identic (jumătatea din maximumul de legare EC₅₀ $\approx$ 100 ng/ml), în timp ce versiunea umanizată a clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ 20E5_VL1H1 și 20E5_VL1H2 par să manifeste afinitate de legare puțin mai redusă (EC₅₀ $\approx$ 150 ng/ml). Datorită utilizării anticorpilor secundari cu lanțuri specifice diferite de imunoglobulină (de exemplu, anticorpii de șoarece au fost detectați cu anticorpi specifici cu lanț anti-Fc Γ , în timp ce anticorpii umanizați și umani himerici au fost detectați cu anticorpi specifici cu lanț anti- κ), compararea între curba de titrare (date nu sunt prezentate) de la clona parentală 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece și curbele de titrare de la versiunile umane himerice și umanizate ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ nu se poate efectua.

(c) Legarea clonelor umanizate 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4 κ cu constructul CD134 uman cu lungime completă exprimat pe linia de celule 293-F (FACS)

Pentru a analiza legarea clonei umanizate 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4 κ în detaliu, a fost determinată capacitatea de legare a clonelor umanizate 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4 κ cu suprafață CD134 uman cu lungime completă (transfetanți stabili) pe liniile de celule 293-F prin citometrie în flux, și, totodată, comparată cu caracteristicile de legare ale omologilor lor parentali ai anticorpului Anti-CD134 uman de șoarece respectiv.

CD134 uman cu lungime completă (SEQ ID NO: 1) a fost re-clonat într-o plasmidă de expresie-pcDNA3.1 derivat (exemplul 11 (d) în continuare). Această plasmidă CD134 uman cu lungime completă a fost transfectată în celulele FreeStyle™ 293-F (Life Technologies), utilizând sistemul de expresie FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Celulele stabil transfectate-CD134 uman cu lungime completă (clona nr. 5 cu nivel înalt de expresie a CD134 de suprafață și clona nr. 23 cu nivel intermediar de expresie a CD134 de suprafață; fig. 32) au fost selectate folosind 125 μ g/ml G418 (Gibco) și au fost recoltate și plasate câte 1...2x10⁶ celule/ml în PBS răcit cu gheață/BSA/NaN₃ suplimentat cu 50 μ g/ml de IgG umană purificată (Sigma; blocarea receptorilor Fc Γ). Celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu 0, 0,005...50 μ g/ml (etape de diluție de 10 ori în PBS/BSA/NaN₃; toate versiunile clonei 20E5) de clonă parentală 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și șase versiuni ale clonei umanizate 20E5 sau 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ .

În paralel, controlul izotipul IgG1 κ de șoarece (BD Biosciences; 50,0 sau 20,0 μ g/ml) și controlul izotipul himeric IgG4 κ uman (clona ch5D12 de la PanGenetics; 50,0 sau 20,0 μ g/ml) au fost folosiți ca martori negativi. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost ulterior incubate pentru 30 min la 4°C cu anticorpi (Fc Γ specifici) IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1: 200 (Jackson ImmunoResearch) sau cu anticorpi (Fc Γ specifici) IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1: 200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ pentru 30 min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată folosind citometria în flux (FACSCalibur; BD Biosciences).

După cum se arată în fig. 33 (CD134 uman cu lungime completă-celule transfectate clona nr. 5 cu nivel înalt de expresie a CD134 de suprafață; $n = 1$), clona parentală 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și șase versiuni ale clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ doză-dependent și specific se leagă la celulele de suprafață care exprimă CD134 uman. Clona parentală 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și versiunile clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2 și 20E5_VL2VH3 prezintă curbe de titrare

similare, care indică că afinitatea lor de legare a antigenului CD134 este foarte asemănătoare, în timp ce versiunea VL1H1 și VL1H2 a clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ pare să manifeste o afinitate de legare puțin mai redusă.

Împreună, aceste rezultate ale citometriei în flux demonstrează, că versiunile clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2, 20E5_VL2VH3, clona parentală 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece și clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ manifestă afinități de legare a antigenului CD134 similare, în timp ce versiunile clonei umanizate 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ 20E5_VL1H1 și 20E5_VL1H2 par să manifeste o afinitate de legare a antigenului CD134 ceva mai reduse.

(d) Legarea clonei umanizate 20E5 a anticorpului cu constructul CD134 uman cu lungime completă și diferite structuri trunchiate ale CD134 umane exprimate pe linia de celule 293-F (cartografierea domeniului FACS).

Pentru a analiza specificitatea față de clonele umanizate 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman, localizarea epitopului recunoscut de către clonele umanizate 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman a fost determinată prin cartografierea domeniilor. Abilitatea clonelor umanizate 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de a se lega la structurile trunchiate de CD134 uman, exprimat pe suprafața celulelor 297-F (HEK-derivate), a fost determinată prin analiza de citometrie în flux.

În baza datelor din literatura de specialitate (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683; Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683; Swiss-Prot: P43489.1; Bodmer et al. Trends Biochem. Sci., 2002, no. 27, p. 19-26; Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330; US 2011/0028688 A1), au fost identificate domeniile bogate în cisteină (CRD) și o structură balamă în regiunea extracelulară a CD134 uman. CRD au fost codificate ca CRD1, CRD2, CRD3 (trunchiat), CRD4 (trunchiat) (fig. 20). CRD conțin tipuri de module distincte din punct de vedere topologic, numite modul-A și modul-B (de asemenea fig. 20). Modulele-A sunt structuri în formă de C și modulele-B sunt structuri în formă de S. Un domeniu CRD tipic este de obicei compus din A1-B2-module sau A2-B1-module (sau, mai puțin frecvent, o altă pereche de module, cum ar fi A1-B1) cu 6 reziduuri conservate de cisteină, în care numeralul reprezintă numărul de punți disulfidice în fiecare modul (de asemenea fig. 20). După cum este arătat în fig. 20, 5 diferite structuri ale CD134 uman au fost generate și exprimate: (1) constructul CD134 uman cu lungime completă, care începe cu CRD1 N-terminal (adică, modulul CRD1 A1-B2 acoperă aminoacizii 29...65), și, prin urmare, notat ca "CRD1", și cuprinde aminoacizii 1...277 (SEQ ID NO: 1), (2) constructul "CRD3", care începe cu CRD3 N-terminal (adică, modulul CRD3 A1-B1 acoperă aminoacizii 108...146 (Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330) sau modulul CRD3 A1 trunchiat acoperă aminoacizii 108...126 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683) și conține aminoacizii 108...277, legați de aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO 31), (3) constructul "CRD4", care constă din CRD4 N-terminal sau modul B1/modul CRD4 A1 trunchiat al subdomeniului CRD3 (adică, modulul CRD4 A1-B1 acoperă aminoacizii 127...167 (Latza et al. Eur. J. Immunol. 1994, no. 24, p. 677-683), sau o combinație (nu este prezentată în fig. 20) dintre modulul B1 al subdomeniului CRD3 și modulul CRD4 A1 trunchiat, care acoperă aminoacizii 127...146 cu aminoacizii 147...167, respectiv (Compaa et al. Structure, 2006, no. 14, p. 1321-1330), și conține aminoacizii 127...277, legați la aminoacizii peptidei de semnalizare 1...28 (SEQ ID NO: 32). Prin asamblarea PCR, folosind ADN Polimerază Accuprime™ Pfx (Invitrogen), aceste 3 structuri CD134 umane au fost generate cu utilizarea primerilor prezentați în tab. 4.

Tabelul 4

Primerul nr.*	Secvența**	SEQ ID No.	Direcția	Gena
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	sens	lider CD134
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGGCCA	55	antisens	CD134 terminal
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	sens	CRD3

367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	antisens	CRD3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCCT	57	sens	CRD4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	antisens	CRD4

* Nr. primerului în conformitate cu sistemul intern de codificare Bioceros

În sumar, ADNc care codifică aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare și ADNc care codifică aminoacizii 66...277 din CD134 uman au fost amplificați, folosind perechea de primeri 362/367 și, respectiv, 366/363 într-o reacție PCR cu CD134 uman cu lungime completă ca model. Ulterior, structura "CRD3" a fost generată prin utilizarea acestor două produse de PCR într-o asamblare PCR, folosind perechea de primeri 362/363. ADNc care codifică structura "CRD3" a fost subclonat într-o plasmidă de expresie pcADN3.1-derivată, folosind situsuri de restricție corespunzătoare. În mod similar, structura "CRD4" (aminoacizii 1...28 din peptida de semnalizare, legați la aminoacizii 127...277) a fost generată și subclonată în plasmide de expresie pcADN3.1-derivate, utilizând primerii corespunzători, prezentați în tabelul menționat anterior. Mai mult decât atât, CD134 uman cu lungime completă (SEQ ID NO: 1) a fost de asemenea clonat repetat într-o plasmidă de expresie pcADN3.1-derivată.

Utilizând Sistemul de Expresie FreeStyle™ 293 (Invitrogen), celulele FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) au fost transfectate tranzitoriu cu 3 variante generate de CD134 uman. Peste 48 ore, expresia CD134 uman de suprafață pe celulele transfectate a fost analizată prin analiza FACS. În acest scop, celulele transfectate au fost recoltate și introduse în cantitate de $1...2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 suplimentată cu 50 $\mu\text{g/ml}$ de IgG umană purificată. Celulele au fost incubate pentru 30 min la 4°C cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de clonă parentală de șoarece 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman, cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și cu 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de versiune umanizată a clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ - 20E5_VL1VH1. În paralel, în calitate de controale negative au fost utilizate 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de anticorp de control izotip IgG1 κ de șoarece (BD Biosciences) și 20,0 $\mu\text{g/ml}$ de anticorp de control izotip IgG1 κ uman himeric (clona ch5D12 de la PanGenetics). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi (Fc γ specifici) IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch) sau cu anticorpi (Fc γ specifici) IgG anti-umani de capră conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior pentru 30 min la 4°C cu anticorpi (Fc γ specifici) IgG anti-șoarece de capră conjugați cu PE diluați 1:200 (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 , timp de 30 de min la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în fig. 36 clona parentală de șoarece 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman a demonstrat legătură strânsă împotriva variantei CD134 uman trunchiate, lipsite de CRD1-CRD2- CRD3 trunchiat modul A1 (notată ca construct 'CRD4') pe celulele transfectate 293-F, ceea ce confirmă faptul că acestea din urmă celule 293-F exprimă această versiune de CD134 trunchiat de suprafață.

Așa cum este prezentat în fig. 37, clona parentală de șoarece 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umani, clona himerică umană 20E5 a anticorpului CD134 anti-uman IgG4 κ și versiunea umanizată a clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ - 20E5_VL1VH1 - au recunoscut CD134 uman cu lungime completă (notat ca structura "CRD1") și varianta CD134 umană trunchiată lipsită de CRD1-CRD2 (notată ca construct 'CRD3') pe celulele transfectate 293-F, în timp ce clona parentală de șoarece 20E5 a anticorpilor anti-CD134 umani, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și versiunea umanizată a clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ - 20E5_VL1VH1- nu au manifestat nici o legare pe celulele fals-transfectate 293-F.

Aceste rezultate au demonstrat că clona parentală de șoarece 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 clona umanizată 20E5_VL1VH1 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ au recunoscut în mod specific CD134 uman (compararea transfecției CD134 uman cu lungime completă vs. transfecție falsă). Aceste rezultate au demonstrat că clona clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ și clona umanizată 20E5 VL1VH1 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ par să nu recunoască un epitop al CD134 uman în CRD1,

CRD2 și în CRD3 A1-modul trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 1994, no. 24, p. 677- 683). Aceste rezultate au demonstrat că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ și clona umanizată 20E5 VL1VH1 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ par să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în CRD4 A1-modul trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 1994, no. 24, p. 677- 683), și, posibil, în structura balama, cu secvența de aminoacizi 127...214 (SEQ ID NO 92) pe CD134 uman extracelular.

Exemplul 12 Anticorpii anti-CD134 suprimă exprimarea FOX3P în celulele Treg

10 Izolarea și expansiunea Treg: Leukopacks a fost achiziționat de la Biological Specialties (Colamar, PA) și celule roșii de sânge au fost lizate cu tampon ACK (Stemcell technologies, Vancouver, BC, Canada) pe gheață. Celulele au fost spălate și resuspendate în tampon de lucru AutoMACS. Treg au fost izolate cu CD4+CD25+CD127dim/-setul Treg atârnat pe coloana AutoMACS Pro, cât și/sau pe coloana LD cu QuadroMACS, toate de la Miltenyi Biotec (San Diego, CA), urmând instrucțiunile producătorului. Treg au fost numărate și 1×10^6 Treg/godeu au fost extinse în plăci cu 24 de godeuri în mediu TeXmacs cu particule sferice de expansiune Treg (particule MACSiBead pre-încărcate cu anticorpi CD3 și CD28; Miltenyi Biotec), urmând instrucțiunile producătorului. Celulele au fost cultivate în raport de 4 particule sferice/celulă în prezența ~ 500 UI/ml de IL-2 și Rapamicină (100 nM). După izolare, timp de 5 zile, celulele au fost transferate în 6 godeuri/placă și s-au adăugat 40 μl de particule sferice/godeu și mediu cu IL-2 (500 UI/ml) și Rapamicină (100 nM). Mediul, conținând IL-2, a fost adăugat după necesitate și celulele au fost transferate pe plăci rotunde de 10 mm și extinse ulterior. Peste 30 de zile particulele sferice au fost îndepărtate cu un MACSiMAG înaintea aplicațiilor în continuare.

25 Activarea Treg: Treg extinse au fost marcate cu Celltrace Violet, conform instrucțiunilor producătorului (Life Technologies, Grand Island, NY). $1,5 \times 10^5$ Treg extinse și 3×10^5 particule sferice de expansiune Treg (particule MACSiBead preîncărcate cu anticorpi CD3 și CD28; Miltenyi Biotec) au fost placcate pe plăci cu fund rotund cu 96 de godeuri și incubate la 37°C în mediu X-VIVO 15 suplimentat cu 5% ser, 1% Pen-Strep și ~ 500 UI/ml de IL-2 cu sau fără OX40L uman (1 μg/ml, R&D Systems) și anti-His mAc (1 μg/ml, R&D Systems). Peste 3 zile celulele au fost restimulate cu Leukocyte Activation Cocktail, cu BD GolgiPlug (2 μl/ml, BD Biosciences, San Jose, CA) timp de 5 ore, spălate și colorate cu LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), urmând instrucțiunile producătorului. Celulele au fost spălate o dată și colorarea intracelulară a fost realizată după fixare/permeabilizare cu Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA), în conformitate cu 35 protocolul producătorului. S-au folosit următorii anticorpi: CD3 V500 (SP34-2 clona, BD Biosciences); FOXP3 PE (clona 206D, Biolegend); CD4 PerCP (clona OKT4, Biolegend) și OX40 (clona ACT35, eBioscience). Celulele au fost incubate pentru 30 de min la 4°C și spălate. Celulele au fost direcționate într-un citometru de flux BD Canto (BD Biosciences) și analizate folosind FlowJo (Ashland, OR), separarea pe singlete vii CD3+CD4+. A fost înregistrată Intensitatea fluorescență medie geometrică derivată din anti-FOXP3 PE (R-ficoeritrină) (geoMFI).

40 Fig. 40 arată, că OX40L uman reduce expresia FOXP3 în Treg proliferate (CD4+ CD25-CD127 dim/-). Datele reprezintă o probă triplă de la un donator.

Exemplul 13 Optimizarea anticorpilor umanizați

45 Optimizarea anticorpilor 20E5 umanizați

HCDR2 a regiunilor variabile ale lanțului greu (VH) 20E5_VH1, 20E5_VH2 și 20E5_VH3 umanizat conține un motiv de izomerizare la pozițiile reziduului VH 56...57 (DG, D₅₆G₅₇). La testarea efectului substituțiilor la poziția 56, reziduul aspartat (D) este mutat la glicină (G), alanină (A), serină (S) sau glutamat (E).

50 HCDR3 a regiunilor variabile ale lanțului greu 20E5_VH1, 20E5_VH2 și 20E5_VH3 umanizat conține o metionină (M) la poziția 106 (M106). Metionina este, probabil, într-o mare măsură mascată, totuși, pentru a reduce riscul de oxidare, metionina din poziția 106 este mutată la leucină (L) sau izoleucină (I).

55 Poziția 11 în regiunile variabile ale lanțului greu 20E5_VH1, 20E5_VH2 și 20E5_VH3 umanizat conține o valină (V). Substituțiile la această poziție pot avea un impact structural asupra anticorpului și, astfel, asupra funcției acestuia (Klein et al. mAbs, 2013, no. 5, p. 22-33). La testarea efectului substituțiilor la poziția 11, reziduul de valină (V) se mută la leucină (L).

Mutații sunt încorporate la fiecare regiune variabilă a lanțului greu 20E5_VH1, 20E5_VH2 și 20E5_VH3 folosind metode standard. Secvențele HCDR2 mutante sunt prezentate în tabelul 5 și

secvențele HCDR3 mutante sunt prezentate în tabelul 6. Regiunile variabile 20E5 umanizate optimizate conținând substituții solitare sunt prezentate în tabelul 7. Alinierea regiunilor VH parentale și optimizate este prezentată în fig. 43A și fig. 43B. S-a făcut denumirea regiunilor VH optimizate, indicată VH parentală, și substituția. Regiunile variabile optimizate suplimentare pot fi generate prin substituții simultane la pozițiile 11, 56 și/sau 106 folosind metode standard.

Regiunile VH rezultate sunt împerecheate cu regiunile variabile ale lanțului ușor 20E5_VL1 sau 20E5_VL2 și anticorpilor care rezultă sunt exprimați ca IgG4/κ utilizand metode standard. Anticorpilor sunt testați ulterior pentru legarea lor la CD134 folosind ELISA, în conformitate cu protocolul descris în exemplul 11A. Anticorpilor sunt testați suplimentar pentru abilitatea lor de a induce proliferarea celulelor Teff și a diminua efectul inhibitor al Treg asupra proliferării Teff, în conformitate cu protocoalele descrise în exemplul 13. Anticorpilor, având proprietăți mai comparabile, decât anticorpilor parentale umanizați 20E5, sunt selectați pentru studii ulterioare.

Tabelul 5

SEQ ID NO:	Secvența HCDR2	Substituția
135	YINPYNGGTKYNEKF KG	D56G
136	YINPYNAGTKYNEKF KG	D56A
137	YINPYNSGTKYNEKF KG	D56S
138	YINPYNEGTKYNEKF KG	D56E

Tabelul 6

SEQ ID NO:	Secvența HCDR3	Substituția
139	YYGSSLSDY	M106L
140	YYGSSLIDY	M106I

Tabelul 7

SEQ ID NO:	Denumirea VH optimizate
101	20E5_VH1_D56G
102	20E5_VH2_D56G
103	20E5_VH3_D56G
104	20E5_VH1D56A
105	20E5_VH2_D56A
106	20E5_VH3_D56A
107	20E5_VH1D56S
108	20E5_VH2_D56S
109	20E5_VH3_D56S
110	20E5_VH1D56E
111	20E5_VH2_D56E
112	20E5_VH3_D56E
113	20E5_VH1M106L
114	20E5_VH2_M106L
115	20E5_VH3_M106L
116	20E5_VH1M106I
117	20E5_VH2_M106I

118	20E5_VH3_M106I
149	20E5_VH1_V11L
150	20E5_VH2_V11L
151	20E5_VH3_V11L

LISTA SECVENTELOR

<110> BiocerOX Products B.V.

<120> ANTICORPI ANTI-CD134 (OX40) ŞI UTILIZAREA ACESTORA

<130> P101024PC00

<150> ep 13159794.0

<151> 2013-03-18

<150> EP 13159794.0

<151> 2013-03-18

<160> 152

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (215)..(235)

<400> 1

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

MD 4633 B1 2019.06.30

55

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> 2
<211> 834
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> Secvență cADN optimizată-celule de insecte Sf9 pentru CD134 uman

<400> 2
atgtgctgtg ggcctcgtcg tctgggtcgt ggtccctgcg ctgctctgct gctgctgggt 60
ctgggcctgt ccactgtcac tggactccac tgcgtgggcg acacctaccc ctccaacgac 120
cgttgctgcc acgaatgcag gcctggcaac ggcatggtgt ccggttgctc ccgttccag 180
aacacogtgt gcctccctg cggccccgtt ttctacaacg acgtggtgtc ctccaagccc 240
tgcaagcctt gcacttggtg taacctccgc tcgggttcgg agcgcaagca gctgtgcacc 300
gctaccocagg acactgtctg taggtgcagg gctggcaccg agccctgga ctccataaag 360
cccggtgtcg actgcgctcc ctgccccctt ggtcacttct ctcccgggga caaccaggct 420
tgcaaaccat ggaccaactg caccctggct ggcaagcaca ccctgcagcc cgcttccaac 480
tcctcogacg ctatctgcga ggacgtgac cccctgcta ctcaacctca ggagactcag 540
ggtcccccgg ctgctcccat caccgtgcag cccaccgagg cttggccccg tacctccaa 600
ggacocagca ctaggcctgt ggagggtgcc ggtggctcgt ctgtggctgc tatcctgggc 660
ctgggtctgg tgctgggcct gctgggtccc ctggctatcc tgctggctct gtacctcctg 720
cgtcgtgacc agcgtctgcc ccccgacgct cacaagcccc ctgggtggtgg ttccttcctg 780

MD 4633 B1 2019.06.30

56

accccatcc aggaggagca ggctgacgct cactccaccc tggccaagat ctaa

834

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificială

<220>

<223> Secvență aminoacidă N-terminală a lanțului greu al clonei 20E5

<400> 3

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

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului greu al clonei 20E5

<400> 4

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului ușor al clonei 20E5

<400> 5

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

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

MD 4633 B1 2019.06.30

57

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului greu CDR1 al clonei 20E5
<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului greu CDR2 al clonei 20E5
<400> 7

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului greu CDR3 al clonei 20E5
<400> 8

Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR1 al clonei 20E5

MD 4633 B1 2019.06.30

58

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR2 al clonei 20E5

<400> 10

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR3 al clonei 20E5

<400> 11

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 20

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența cADN optimizată-CHO care codifică pentru lanțul IgG4 al clonei
himerice
20E5 umane

<400> 20

atggagtgga gcgagtggt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagag	60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc	120
tgtaaagcta gcggtacac cttcactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc	180
ggccagggcc tggagtggat cggctatatt aacccctata acgacggcac taagtataac	240
gagaagttta agggcaaggc taccctgact agcgataagt ctagctctac cgcctatatg	300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgcgctaa ctactacggc	360
tctagcctgt ctatggacta ctggggccag ggcactagcg tgaccgtgtc tagcgctagc	420
actaagggcc ctagegtgtt cccctggcc ccctgtctta gatctactag cgagtctacc	480
gccgtctctg gctgccttgt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat	540
agcggcgctc tgactagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc tagcggcctg	600
tatagtctgt ctagegttgt cacogtgcct agttctagcc tgggcaactaa gacctacacc	660
tgtaacgttg accacaagcc ctctaact aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac	720
ggccctccct gccccccctg cctgcccct gaatttcttg gcggacctag tgtgttcctg	780
ttccaccta agctaagga caccctgatg atctctagaa cccccaagt gacctgcgtg	840
gtggtggacg tgtcacagga agatcccag gtccagtta attggtacgt ggacggcgtg	900

MD 4633 B1 2019.06.30

59

```
gaagtgcaca acgctaagac taagcctaga gaggaacagt ttaactctac ctatagggtc      960
gtcagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta taagtgtaaa      1020
gtgtctaaca agggcctgcc tagctctatc gaaaagacta tctctaaggc taagggccag      1080
cctagagaac ctcaggtcta caccctgccc cctagtcagg aagagatgac taagaatcag      1140
gtgtcactga cctgtctggt caagggcttc taccctagcg atatcgccgt cgagtgggag      1200
tctaacggcc agcccgagaa caactataag actacccccc ctgtgctgga tagcgacggt      1260
agcttcttcc tgtactcacg gctgaccgtg gataagtota ggtggcagga aggcaacgtc      1320
tttagctgta gcgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acactcagaa gtcactgagc      1380
ctgagcctgg gcaagtga                                1398
```

<210> 21
<211> 702
<212> DNA
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența cADN optimizată-CHO care codifică pentru lanțul kappa al clonei
himerice
20E5 umane

```
<400> 21
atggagtgga gcgagtggt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagat      60
attcagatga ctcagactac ctctagcctg agcgctagcc tgggcgatag agtgactatt      120
agctgtagag ctagtcagga tatctctaac tacctgaact ggtatcagca gaaaccgcag      180
ggcacogtga agctgctgat ctactacacc tctagactgc actcaggcgt gccctctagg      240
tttagcggta gcggtagtgg caccgactat agcctgacta tctctaacct ggaacaggaa      300
gatatogcta cctacttctg tcagcagggc aacaccctgc cctggacctt cggcggaggc      360
actaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gtcacctcag tgtttatott cccacctagc      420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgctagc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctaccct      480
agagaagcta aggtgcagtg gaaagtggat aacgccctgc agtcaggcaa ctctcaggaa      540
tcagtcaccg agcaggactc taaggatagc acctatagcc tgtctagcac cctgaccctg      600
tctaaggccg actacgagaa gcacaaggtc tacgcctgcg aagtgactca ccagggactg      660
tctagccccc tgactaagtc ctttaataga ggcgagtgt ga                                702
```

<210> 22
<211> 1407
<212> DNA
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența cADN optimizată-CHO care codifică pentru lanțul IgG1 al clonei
himerice
20E5 umane

```
<400> 22
atggagtggt caggcgtggt catgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagag      60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc      120
tgtaaagcta gcggctacac cttcactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc      180
ggtcagggcc tggagtggat cggctatatt aaccctata acgacggcac taagtataac      240
```

MD 4633 B1 2019.06.30

60

```

gagaagttta agggtaaagc taccctgact agcgataagt ctagctctac cgcctatatg      300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgocgctaa ctactacggc      360
tctagcctgt ctatggacta ctgggggtcag ggcactagcg tgaccgtgtc tagcgctagc      420
actaaggggc ctagcgtggt ccccttgagg cctagctcta agtctactag cggcggcacc      480
gccgcctctg gctgcctggg caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat      540
agcggcgctc tgactagcgg agtgacacacc ttccccgccg tgctgcagtc tagcggcctg      600
tatagtctgt ctagcgtggg caccgtgcct agttctagcc tggggactca gacctatc      660
tgtaacgtga accacaagcc ctctaact aagggtggaca agaaggtgga acctaagtcc      720
tgcgataaga ctacacactg tccccctg cctgccccctg agctgctggg aggacctagt      780
gtgttctctg tcccaccta gctaaggac accctgatga tctctagaac ccccgaaagt      840
acctgcgtgg tgggtggacgt cagtcacgag gacctgaag tgaagtttaa ttggtacgtg      900
gacggcgctg aagtgcacaa cgctaagact aagcctagag aggaacagta taactctacc      960
tatagggctg tcagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg taaagagtat     1020
aagtgtaaag tgtctaaca ggccctgccg gccctatcg aaaagactat ctctaaggct     1080
aagggtcagc ctagggaacc tcaggtctac accctgcccc ctagtaggga cgagctgact     1140
aagaatcagg tcagcctgac ttgtctggtc aagggttct accctagoga tatcgccgtc     1200
gagtgggagt ctaacgggtc gcccgagaac aactataaga ctaccccccc tgtgctggat     1260
agcgacggta gcttcttct gtactctaaa ctgaccgtgg ataagtctag gtggcagcag     1320
ggtaacgtgt tcagctgtag cgtgatgcac gaggccctgc acaatcacta cactcagaag     1380
tcactgagcc tgagccccgg taagtga                                           1407

```

<210> 25
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Artificială

<220>
 <223> Secvența aminoacidă a lanțului IgG4 al clonei himerice 20E5 umane
 <400> 25

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

MD 4633 B1 2019.06.30

61

Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	100	105	110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	115	120	125	
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	130	135	140	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	145	150	155	160
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	165	170	175	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	180	185	190	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	195	200	205	
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	210	215	220	
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	225	230	235	240
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	245	250	255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	260	265	270	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	275	280	285	
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	290	295	300	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	305	310	315	320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	325	330	335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	340	345	350	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	360	365	
Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	370	375	380	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				

MD 4633 B1 2019.06.30

62

385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 26
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului kappa al clonei himerice 20E5 umane
<400> 26

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn
85 90 95

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

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

MD 4633 B1 2019.06.30

63

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 27

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului IgG1 al clonei himerice 20E5 umane

<400> 27

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp
115 120 125

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

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

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

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

MD 4633 B1 2019.06.30

64

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

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

$\langle 210 \rangle$	30
$\langle 211 \rangle$	240

MD 4633 B1 2019.06.30

65

<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a CD134_CRD2 umană (aa 1-28 >< 66-277)

<220>
<221> SEMNAL
<222> (1)..(28)

<220>
<221> TRANSMEM
<222> (178)..(198)

<400> 30

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 Pro Cys Gly Pro
20 25 30

Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr
35 40 45

Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala
50 55 60

Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp
65 70 75 80

Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe
85 90 95

Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu
100 105 110

Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile
115 120 125

Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly
130 135 140

Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg
145 150 155 160

Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg
165 170 175

Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly
180 185 190

Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg
195 200 205

Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr
210 215 220

Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
225 230 235 240

MD 4633 B1 2019.06.30

66

<210> 31
<211> 198
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a CD134_CRD3 umană (aa 1-28 >< 108-277)

<220>
<221> SEMNAL
<222> (1)..(28)

<220>
<221> TRANSMEM
<222> (136)..(156)

<400> 31

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 Arg Cys Arg Ala
20 25 30

Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro
35 40 45

Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro
50 55 60

Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser
65 70 75 80

Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln
85 90 95

Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro
100 105 110

Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val
115 120 125

Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu
130 135 140

Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu
145 150 155 160

Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly
165 170 175

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His
180 185 190

Ser Thr Leu Ala Lys Ile
195

<210> 32
<211> 179

MD 4633 B1 2019.06.30

67

<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a CD134_CRD4 umană (aa 1-28 >< 127-277)

<220>
<221> SEMNAL
<222> (1)..(28)

<220>
<221> TRANSMEM
<222> (117)..(137)

<400> 32

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 Pro Cys Pro Pro
20 25 30

Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
35 40 45

Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser
50 55 60

Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu
65 70 75 80

Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala
85 90 95

Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro
100 105 110

Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly
115 120 125

Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg
130 135 140

Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu
165 170 175

Ala Lys Ile

<210> 33
<211> 159
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a CD134_CRD4 umană trunchiată (aa 1-28 ><
147-277)

MD 4633 B1 2019.06.30

68

<220>
<221> SEMNAL
<222> (1)..(28)

<220>
<221> TRANSMEM
<222> (97)..(117)

<400> 33

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 Cys Thr Leu Ala
20 25 30

Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys
35 40 45

Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro
50 55 60

Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr
65 70 75 80

Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
85 90 95

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
100 105 110

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu
115 120 125

Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro
130 135 140

Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
145 150 155

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val
1 5 10 15

Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln
20 25 30

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu
35 40 45

Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro
50 55 60

Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile

MD 4633 B1 2019.06.30

69

65 70 75 80

Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser
 85 90 95

Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
100 105

```
<210> 36
<211> 68
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 36

Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser
1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu
20 25 30

Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala
35 40 45

Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro
50 55 60

Gly Gly Arg Ala
65

```
<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 37

Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala Pro
1 5 10 15

Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Gly Cys
20 25

<210>	39
<211>	20
<212>	ADN
<213>	Artificială

```
<220>
<223> primerul mkappa antisens (primerul nr: 201)
```

```
<400> 39
gacagttggt gcagcatcag 20
```

<210>	40
<211>	20
<212>	ADN
<213>	Artificială

```
<220>
<223> primerul mkappa antisens (primerul nr: 266)
```

<400> 40

MD 4633 B1 2019.06.30

70

cactgggatgg tgggaagatg 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul mlgG1 antisens (primerul nr: 203)

<400> 41
ggccagtgg tagacagatg 20

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul mlgG1 antisens (primerul nr: 204)

<400> 42
tggacaggga tccagagttc 20

<210> 43
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul 20E5HC sens (primerul nr: 259)

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 43
gcgaagtaca aytnccarcar wsnngg 25

<210> 44
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul 20E5HC sens (primerul nr: 260)

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 44
gcgtacaatt acarcarwsn ggncc 25

<210> 45
<211> 22

MD 4633 B1 2019.06.30

71

```
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul 20E5LC sens (primerul nr: 265)

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 45
gcgatataca ratgacncar ac 22

<210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul CD134 lider sens (primerul nr: 362)

<400> 51
ctcggatccg ccaccatgtg cgtg 24

<210> 52
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul RD2 sens (primerul nr: 364)

<400> 52
actgtcactg gaccctgcgg tccc 24

<210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul CRD2 antisens (primerul nr: 365)

<400> 53
gggaccgcag ggtccagtga cagt 24

<210> 54
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul CRD3 sens (primerul nr: 366)

<400> 54
actgtcactg gaaggtgcag ggct 24

<210> 55
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primerul CD134 terminal(primerul nr: 363)

<400> 55
agaattctta ttagatcttg gcca 24
```

<210> 56
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificială

<220>
 <223> primerul CRD3 antisens (primerul nr: 367)

<400> 56
 agccctgcac cttccagtga cagt 24

<210> 57
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificială

<220>
 <223> primerul CRD4 sens (primerul nr: 368)

<400> 57
 actgtcactg gaccctgccc ccct 24

<210> 58
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificială

<220>
 <223> primerul CRD4 antisens (primerul nr: 369)

<400> 58
 agggggggcag ggtccagtga cagt 24

<210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificială

<220>
 <223> primerul CRD4 trunchiat sens (primerul nr: 370)

<400> 59
 actgtcactg gatgcaccct ggct 24

<210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificială

<220>
 <223> primerul CRD4 trunchiat antisens (primerul nr: 371)

<400> 60
 agccaggggtg catccagtga cagt 24

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificială

<220>
 <223> Secvența aminoacidă N-terminală a lanțului ușor al clonei 20E5

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 1 5 10

MD 4633 B1 2019.06.30

73

<210> 62
<211> 108
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului ușor VL1 al clonei 20E5
PDL-umanizate

<400> 62

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 63
<211> 108
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului ușor VL2 al clonei 20E5
PDL-umanizate

<400> 63

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

MD 4633 B1 2019.06.30

74

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

<210> 64
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului greu VH1 al clonei 20E5
PDL-umanizate

<400> 64

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului greu VH2 al clonei 20E5
PDL-humanizate

<400> 65

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

MD 4633 B1 2019.06.30

75

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială
```

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a lanțului greu VH3 al clonei 20E5
PDL-umanizate

<400> 66

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 72
<211> 1398
<212> ADN
<213> Secvența Artificială
```

<223> Secvența cADN optimizată-Cricetulus griseus care codifică pentru clona 20E5
cu lanț greu IgG4 conținând VH1 PDL-umanizată

```
<400> 72
atggaatgga gcggcgtgtt catgttcttg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagtcag 60
```

MD 4633 B1 2019.06.30

76

```
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg ggcctccgt gaaggtgtcc 120
tgcaaggcct cggctacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggcccct 180
ggccagagac tggaatggat gggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac 240
gagaagttca agggcagagt gaccatcacc tccgacacct cgcctccac cgcctacatg 300
gaactgtcct cctgcgagg cgaggacacc gccgtgtact actgcgcaa ctactacggc 360
tcctccctgt ctatggacta ctggggccag gccacctcg tgacctgtc ctctgctagc 420
accaagggcc cctcgtgtt tcctctggcc ccttgtcca gatccacctc cgagtctacc 480
gccgtcttgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 540
tctggcgccc tgacctcgg cgtgcacaca ttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 600
tactccctgt cctcgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcaccaa gacctacacc 660
tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 720
ggccctcctt gccaccctg cctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttctg 780
tttcccccaa agccaagga caccctgatg atctccgga ccccggaagt gacctgctg 840
gtggtggatg tgtcccagga agatcccgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 900
gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 960
gtgtccgtgc tgacctgtc gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 1020
gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1080
ccccgggaac cccaggtgta cactgtcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1140
gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1200
tccaaaggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tgtaactctc cctgacctg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg 1320
ttctcctgct ctgtgatgca caggccctg cacaaccact acaccagaa gtcctgtcc 1380
ctgtctctgg gcaagtag 1398
```

<210> 73
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Secvența Artificială

<220>
 <223> Secvența cADN optimizată-Cricetulus griseus care codifică pentru clona 20E5
 cu lanț greu IgG4 conținând VH2 PDL-umanizată

```
<400> 73
atggaatgga gggcggtgtt catgttctc ctgtccgtga cgcggggagt gcattctcag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg ggcctccgt gaaggtgtcc 120
tgcaaggcct cggctacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggcccct 180
ggccagagac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac 240
gagaagttca agggcagagc caccatcacc tccgacacct ctgcctccac cgcctacatg 300
gaactgtcct cctgcgagg cgaggacacc gccgtgtact actgcgcaa ctactacggc 360
tcctccctgt ctatggacta ctggggccag gccacctcg tgacctgtc ctctgctagc 420
accaagggcc cctcgtgtt tcctctggcc ccttgtcca gatccacctc cgagtctacc 480
gccgtcttgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 540
```

MD 4633 B1 2019.06.30

77

tctggcgccc tgacctccg cgtgcacaca tttccagctg tgetgcagtc ctccggcctg	600
tactccctgt cctccgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcaccaa gacctacacc	660
tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac	720
ggccctcctt gccaccctg cctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttctg	780
tttccccaa agccaagga caccctgatg atctcccgga cccccaagt gacctgogtg	840
gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggogtg	900
gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg	960
gtgtccgtgc tgacctgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgaag	1020
gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag	1080
ccccgggaac ccagggtgta cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag	1140
gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag	1200
tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgttgga ctccgacggc	1260
tccttcttcc tgtactctcg cctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg	1320
ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtcctgtcc	1380
ctgtctctgg gcaagtag	1398
<210> 74	
<211> 1398	
<212> ADN	
<213> Secvența Artificială	
<220>	
<223> Secvența cADN optimizată-Cricetulus griseus care codifică pentru clona 20E5 cu lanț greu IgG4 conținând VH3 PDL-umanizată	
<400> 74	
atggaatgga gcggcgtgtt catgttctctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcattctcag	60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg gcgcctccgt gaaggtgtcc	120
tgcaaggcct ccggtacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggcccct	180
ggccagagac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac	240
gagaagttca agggcagagc caccctgacc tccgacaagt ctgcctccac cgcctacatg	300
gaactgtcct cctgcccggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccaa ctactacggc	360
tcctccctgt ctatggacta ctggggccag ggcaccctcg tgacctgtc ctctgctagc	420
accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc ccttgtcca gatccacctc cgagtctacc	480
gccgtctctg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac	540
tctggcgccc tgacctccg cgtgcacaca tttccagctg tgetgcagtc ctccggcctg	600
tactccctgt cctccgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcaccaa gacctacacc	660
tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac	720
ggccctcctt gccaccctg cctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttctg	780
tttccccaa agccaagga caccctgatg atctcccgga cccccaagt gacctgogtg	840
gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggogtg	900
gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg	960
gtgtccgtgc tgacctgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgaag	1020

MD 4633 B1 2019.06.30

78

gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1080
ccccgggaac ccaggtgta cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1140
gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctcccg atatcgccgt ggaatgggag 1200
tccaacggcc agcotgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tgtactctcg cctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg 1320
ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtcctgttcc 1380
ctgtctctgg gcaagtag 1398

<210> 75
<211> 702
<212> ADN
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența cADN optimizată-Cricetulus griseus care codifică pentru clona 20E5
cu lanț ușor conținând VL1 PDL-umanizată

<400> 75
atggaatgga gcggcgtgtt catgttcctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagcgac 60
atccagatga ccagtcctcc ctccagcctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc 120
acctgtcggg cctcccagga catctccaac tacotgaact ggtatcagca gaagcccggc 180
aaggccccca agctgctgat ctactacacc tccggctgc actccggcgt gccctctaga 240
ttttccggct ctggctccgg caccgactat accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcca cctactactg ccagcagggc aacaccctgc cctggacctt tggccagggc 360
accaaggtgg aaatcaagcg gaccgtagcc gcccttccg tgttcatctt tccaccctcc 420
gacgagcagc tgaagtctgg caccgcttcc gtcgtgtgcc tgetgaacaa cttctacccc 480
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtcgggcaa ctcccaggaa 540
agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgctctccac cctgaccctg 600
tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660
tctagccccg tgaccaagtc tttcaaccgg gcgcagtget ag 702

<210> 76
<211> 702
<212> ADN
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența cADN optimizată-Cricetulus griseus care codifică pentru clona 20E5
cu lanț ușor conținând VL2 PDL-umanizată

<400> 76
atggaatgga gcggcgtgtt catgttcctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagcgac 60
atccagatga ccagtcctcc ctccagcctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc 120
acctgtcggg cctcccagga catctccaac tacotgaact ggtatcagca gaaaccgggc 180
aaggccgtga agctgctgat ctactacacc tccggctgc actccggcgt gccctctaga 240
ttttccggct ctggctccgg caccgactat accctgacca tcagctccct gcagcccag 300
gacttcgcta cctacttctg tcagcaaggc aacaccctgc cctggacctt tggccagggc 360
accaaggtgg aaatcaagcg gaccgtagcc gcccttccg tgttcatctt tccaccctcc 420

MD 4633 B1 2019.06.30

79

```
gacgagcagc tgaagtctgg caccgcttcc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 480
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtcoggcaa ctcccaggaa 540
agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600
tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgacca ccagggcctg 660
tctagccccg tgaccaagtc tttcaaccgg ggcgagtgct ag 702
```

<210> 82
<211> 465
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 20E5 cu lanț greu IgG4 conținând VH1 PDL-umanizate

<400> 82

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp
115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160

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

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

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

MD 4633 B1 2019.06.30

80

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
210 215 220

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 83

<211> 465

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 20E5 cu lanț greu IgG4 conținând VH2

MD 4633 B1 2019.06.30

81

PDL-umanizate

<400> 83

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp
115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
210 215 220

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
275 280 285

MD 4633 B1 2019.06.30

82

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 84
<211> 465
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 20E5 cu lanț greu IgG4 conținând VH3
PDL-umanizate

<400> 84

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

MD 4633 B1 2019.06.30

83

Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
	130					135					140				
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
145					150					155					160
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
				165					170					175	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
			180					185					190		
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		195					200					205			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp
	210					215					220				
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr
225					230					235					240
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
				245					250					255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			260					265					270		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp
		275					280					285			
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	290					295					300				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
305					310					315					320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
				325					330					335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
			340					345					350		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
		355					360					365			

MD 4633 B1 2019.06.30

84

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 85
<211> 233
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 20E5 cu lanț ușor conținând VL1
PDL-umanizate

<400> 85

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr
100 105 110

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

MD 4633 B1 2019.06.30

85

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 86

<211> 233

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 20E5 cu lanț ușor conținând VL2
PDL-umanizate

<400> 86

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr
100 105 110

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

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

MD 4633 B1 2019.06.30

86

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 87
<211> 467
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a clonei umanizate 12H3 cu lanț greu IgG4 conținând VH1
PDL-umanizate

<210> 92
<211> 88
<212> PRT
<213> Secvența Artificială
<220>
<223> Secvența aminoacidă a CRD4 A1-B1-modulului

<400> 92

Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys
1 5 10 15

Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala
20 25 30

Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr
35 40 45

Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln
50 55 60

Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro
65 70 75 80

Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
85

<210> 93
<211> 108
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a clonei 20E5 cu regiunea variabilă a lanțului ușor VL1
PDL-umanizate

MD 4633 B1 2019.06.30

87

<400> 93

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a clonei 20E5 cu regiunea variabilă a lanțului ușor VL2
PDL-umanizate

<400> 94

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 97

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

MD 4633 B1 2019.06.30

88

<220>
<223> Anticorp umanizat 20E5 cu lanț greu variabil

<220>
<221> VARIANTA
<222> (48)..(48)
<223> poate fi, de asemenea, Met

<220>
<221> VARIANTA
<222> (68)..(68)
<223> poate fi, de asemenea, Val

<220>
<221> VARIANTA
<222> (70)..(70)
<223> poate fi, de asemenea, Ile

<220>
<221> VARIANTA
<222> (74)..(74)
<223> poate fi, de asemenea, Thr

<400> 97

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 108
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Anticorp umanizat 20E5 cu lanț ușor variabil

<220>
<221> VARIANTA
<222> (44)..(44)
<223> poate fi, de asemenea, Pro

<220>
<221> VARIANTA

MD 4633 B1 2019.06.30

89

<222> (87)..(87)

<223> poate fi, de asemenea,Tyr

<400> 98

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 101

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 101

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

MD 4633 B1 2019.06.30

90

<210> 102
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 102

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 103

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

MD 4633 B1 2019.06.30

91

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 104
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 104

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 105

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

MD 4633 B1 2019.06.30

92

50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 106

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 107
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 107

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

MD 4633 B1 2019.06.30

93

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 108

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

MD 4633 B1 2019.06.30

94

<220>

<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 109

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 110

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

MD 4633 B1 2019.06.30

95

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 111

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvennta Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 112

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Glu Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

MD 4633 B1 2019.06.30

96

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 113

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 114

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

MD 4633 B1 2019.06.30

97

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 115

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 116

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

MD 4633 B1 2019.06.30

98

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 117
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 117

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 118
<211> 119

MD 4633 B1 2019.06.30

99

<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 118

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<220>
<221> VARIANTA
<222> (11)..(11)
<223> poate fi, de asemenea,Leu

<220>
<221> VARIANTA
<222> (48)..(48)
<223> poate fi, de asemenea,Ile

<220>
<221> VARIANTA
<222> (56)..(56)
<223> poate fi, de asemenea,Gly, Ala, Ser sau Glu

<220>
<221> VARIANTA
<222> (68)..(68)
<223> poate fi, de asemenea,Ala

<220>
<221> VARIANTA
<222> (70)..(70)
<223> poate fi, de asemenea,Ile

MD 4633 B1 2019.06.30

100

<220>
<221> VARIANTA
<222> (74)..(74)
<223> poate fi, de asemenea,Lys

<220>
<221> VARIANTA
<222> (106)..(106)
<223> poate fi, de asemenea,Leu sau Ile

<400> 134

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 135
<211> 18
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 135

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 136

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 137

Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Ser	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 138

Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 139

Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Asp	Tyr
1				5				10	

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența CDR2 a anticorpului

<400> 140

Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Tyr
1				5				10	

<210> 149
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

MD 4633 B1 2019.06.30

102

<220>

<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 149

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvența Artificială

<220>

<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 150

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 151
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvența Artificială

<220>
<223> Secvența lanțului greu al anticorpului

<400> 151

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. WO 99/42585 A1 1999.08.26
2. Weinberg et al. J. Immunother, no. 29, 2006, p. 575-585
3. AL-Shamkhani et al. Eur. J. Chem. no 26, 1996, p. 1695-1699
4. Hirschhorn-Cymerman et al. J.Exp. Med. No 206, 2009, p. 1103-1116
5. US 2009/0214560 A1 2009.08.27

(57) Revendicări:

1. Anticorp izolat, care leagă CD134 uman, conținând o regiune variabilă a unui lanț ușor (VL) din SEQ ID NO: 98, sau având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VL din SEQ ID NO: 98 și având o regiune variabilă a unui lanț greu (VH), unde VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 134, sau având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VH din SEQ ID NO: 134 sau VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 97, sau având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în VH din SEQ ID NO: 97, unde
 - a. HCDR3 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 8, 139 sau 140;
 - b. HCDR2 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 sau 138; și
 - c. HCDR1 conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 6.
2. Anticorp, conform revendicării 1, în care:
 - a. VL conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 62 sau 63; și VH conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 sau 151, sau având 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în pozițiile rezidului aminoacid liniar VH 11, 56 sau 106, în VH din SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 sau 151; sau
 - b. VL și VH conțin secvențele de aminoacizi:
 - i. SEQ ID NO: 62 și 64, respectiv;
 - ii. SEQ ID NO: 62 și 65, respectiv;
 - iii. SEQ ID NO: 62 și 66, respectiv;
 - iv. SEQ ID NO: 63 și 64, respectiv;
 - v. SEQ ID NO: 63 și 65, respectiv; sau
 - vi. SEQ ID NO: 63 și 66, respectiv.
3. Anticorp, conform revendicării 2, în care VL conține SEQ ID NO: 63 și VH conține SEQ ID NO: 66.
4. Anticorp, conform revendicării 2, în care 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în pozițiile rezidului aminoacid liniar VH sunt V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L sau M106I.
5. Anticorp, conform revendicării 2, în care anticorpul se leagă la un epitop al domeniului extracelular al CD134 uman conținând secvența de aminoacizi SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 sau SEQ ID NO: 92.
6. Anticorp, conform revendicării 1, în care anticorpul este umanizat sau deimmunizat.
7. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, în care anticorpul este un agonist al CD134.
8. Anticorp, conform revendicării 7, în care anticorpul este un izotip IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.
9. Anticorp, conform revendicării 8, în care anticorpul conține o substituție în regiunea Fc.
10. Anticorp, conform revendicării 9, în care substituția conține o substituție S267E/L328F, o substituție E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, o substituție V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S sau o substituție M252Y/S254T/T256E, în care numerotarea rezidului este în conformitate cu indexarea EU.
11. Moleculă de acid nucleic izolată, care codifică VH și VL, conform oricăreia din revendicările 1-3.
12. Vector conținând o moleculă de acid nucleic, conform revendicării 11.
13. Celulă gazdă conținând vectorul, conform revendicării 12.
14. Metodă de amplificare a răspunsului imun la un subiect, cuprinzând administrarea la subiectul, care necesită aceasta, a anticorpului, conform oricăreia din revendicările 1-10, pentru o perioadă de timp suficientă pentru amplificarea răspunsului imun.
15. Metodă de tratament al cancerului la un subiect, cuprinzând administrarea la subiectul, care necesită aceasta, a anticorpului, conform oricăreia din revendicările 1-10, pentru o perioadă de timp suficientă pentru tratamentul cancerului.
16. Metodă, conform revendicării 15, în care cancerul este cancer de prostată, cancer de colon, cancer pulmonar, neoplasmi maligne hematologice, melanom sau cancer de vezică urinară.
17. Compoziție farmaceutică cu conținut de anticorp, conform oricăreia din revendicările 1-10 și un purtător farmaceutic acceptabil.

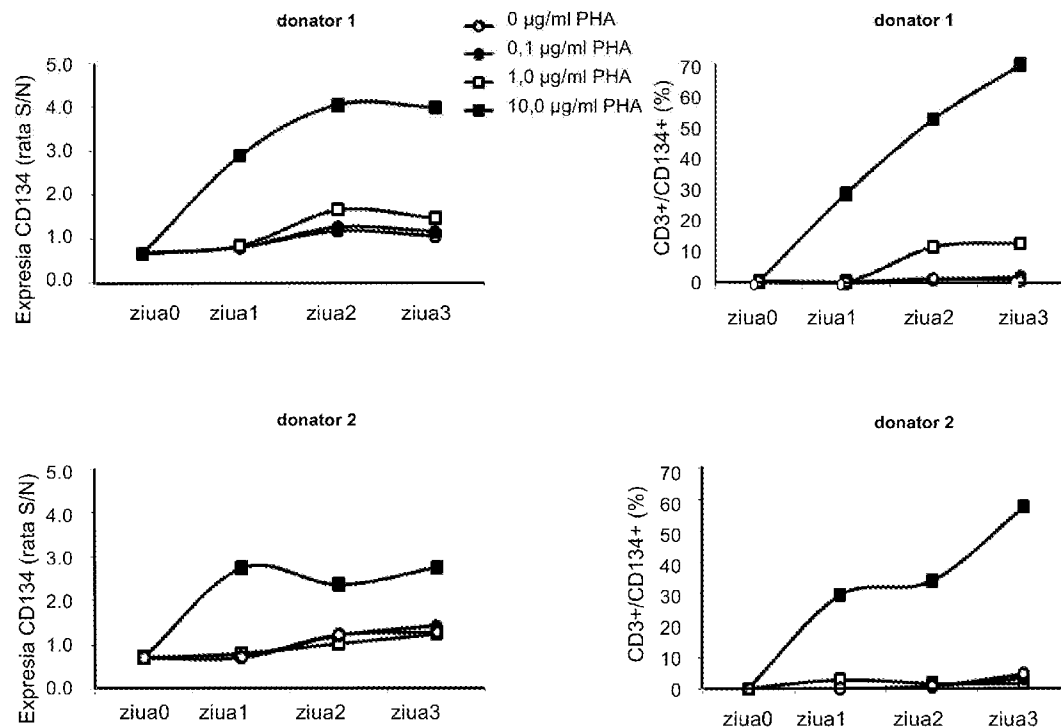


Fig. 1

Celulele T CD4 aflate în repaus Celulele T CD4 PHA-stimulate/activate

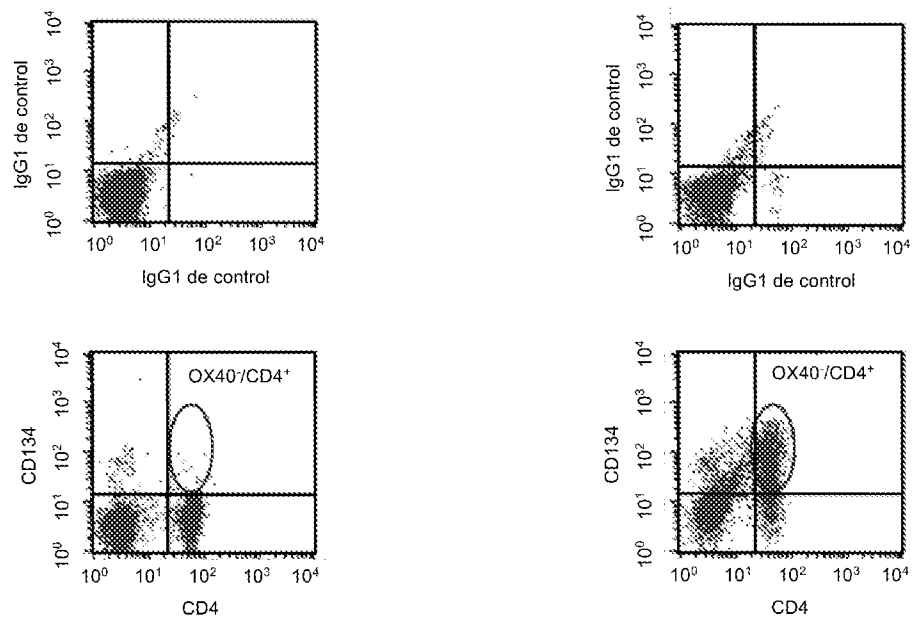


Fig. 2

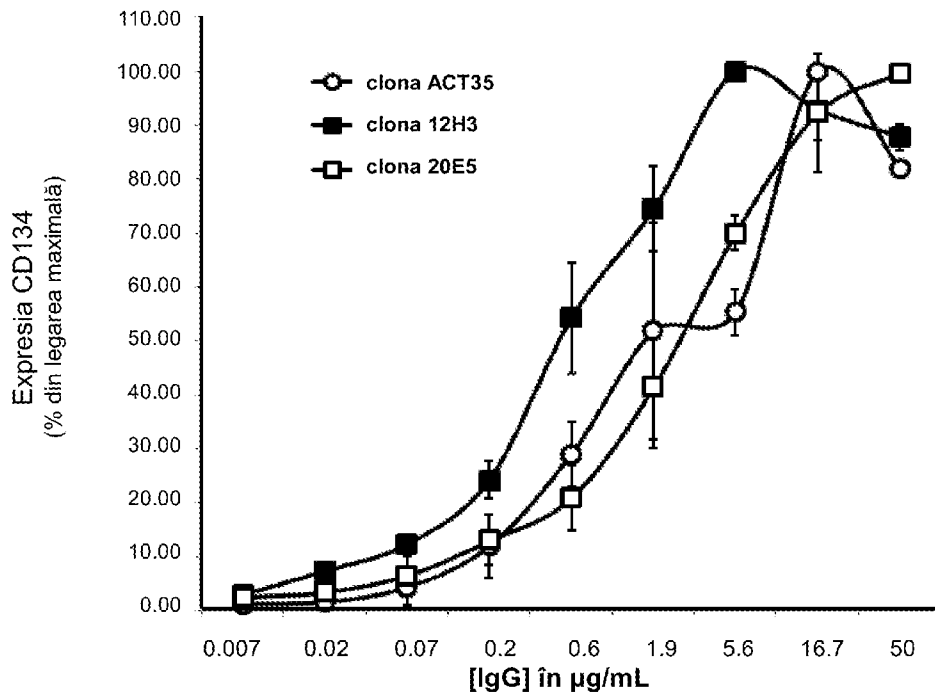


Fig. 3

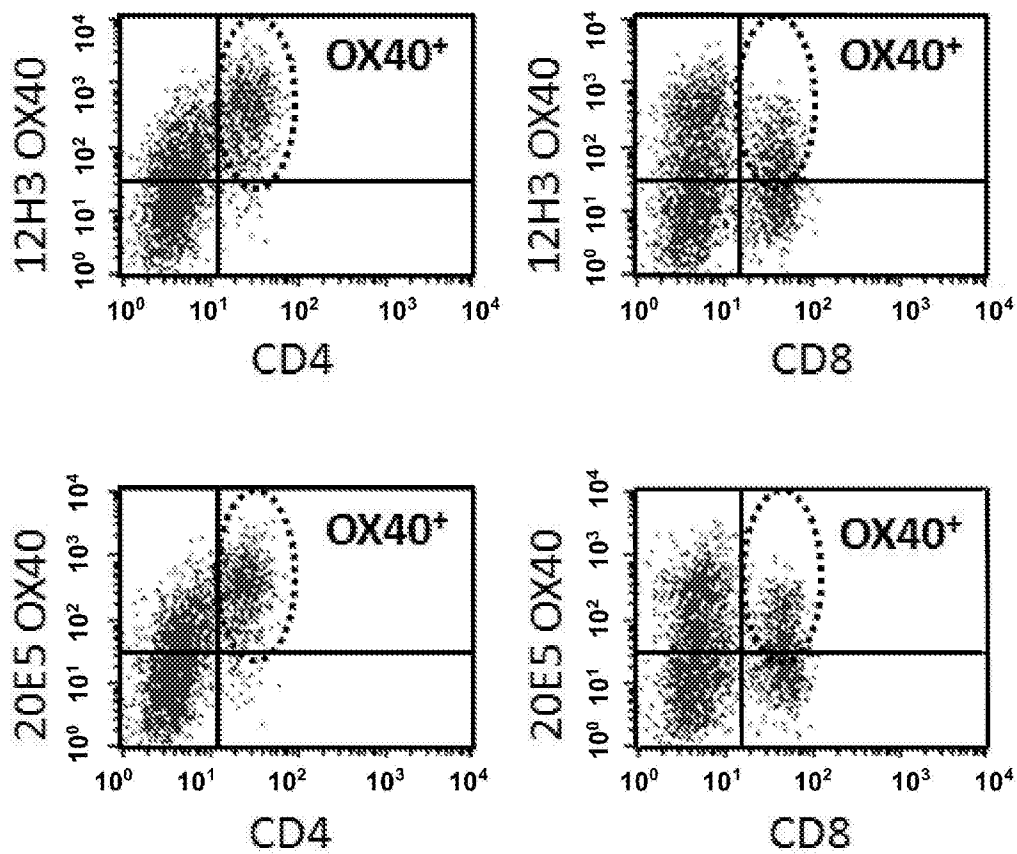


Fig. 4

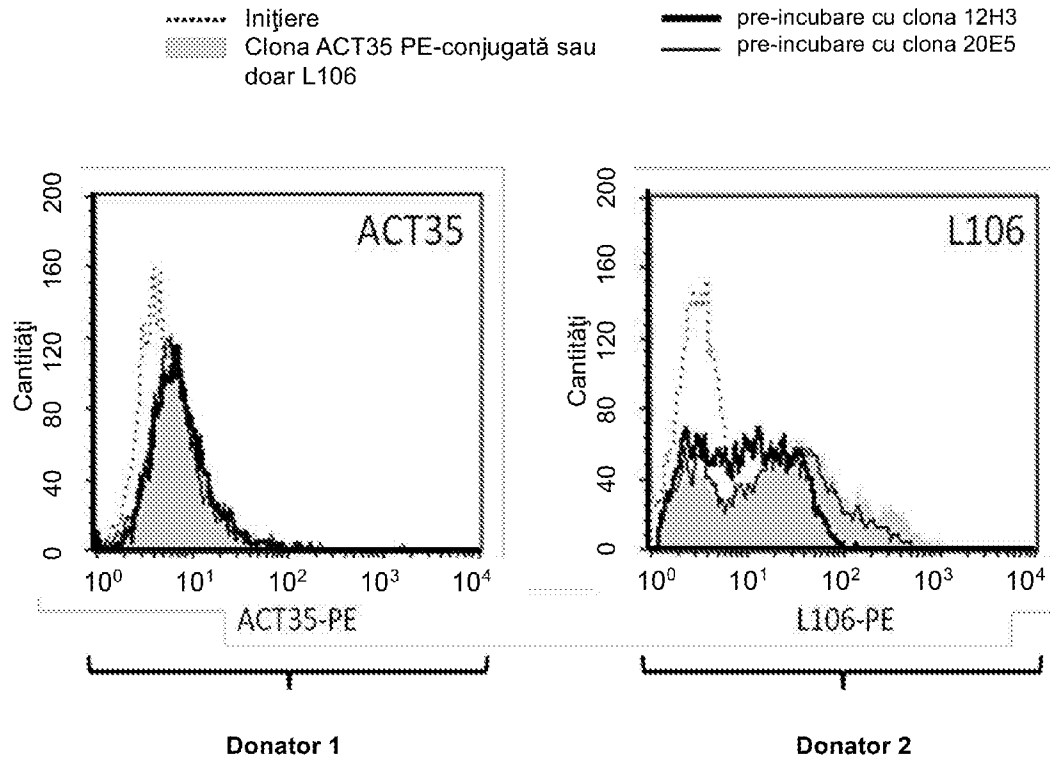


Fig. 5

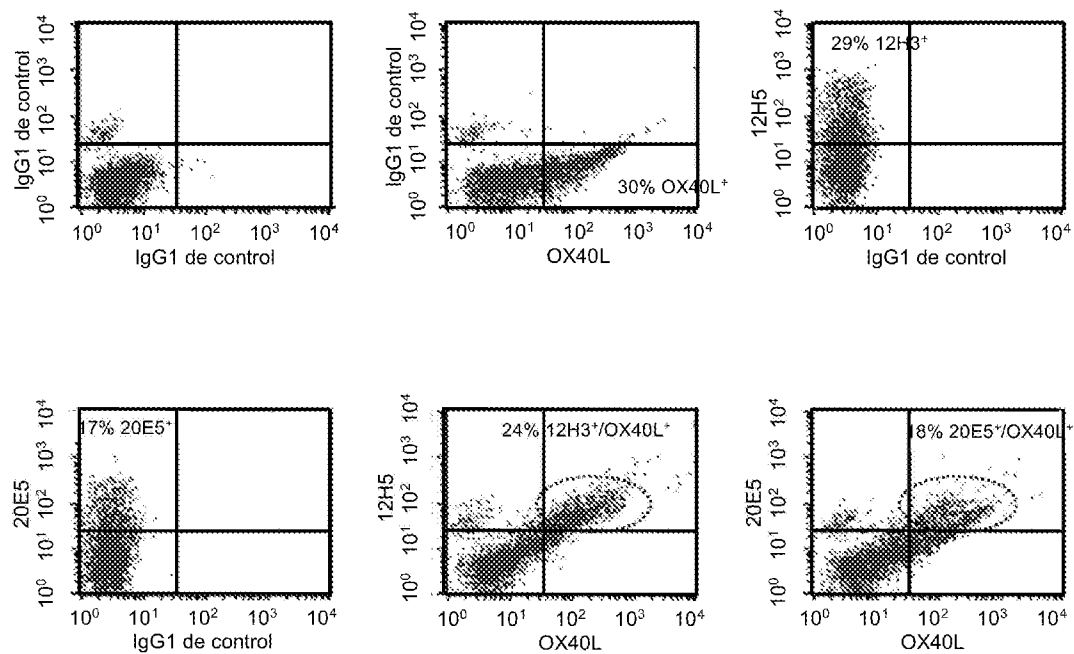


Fig. 6

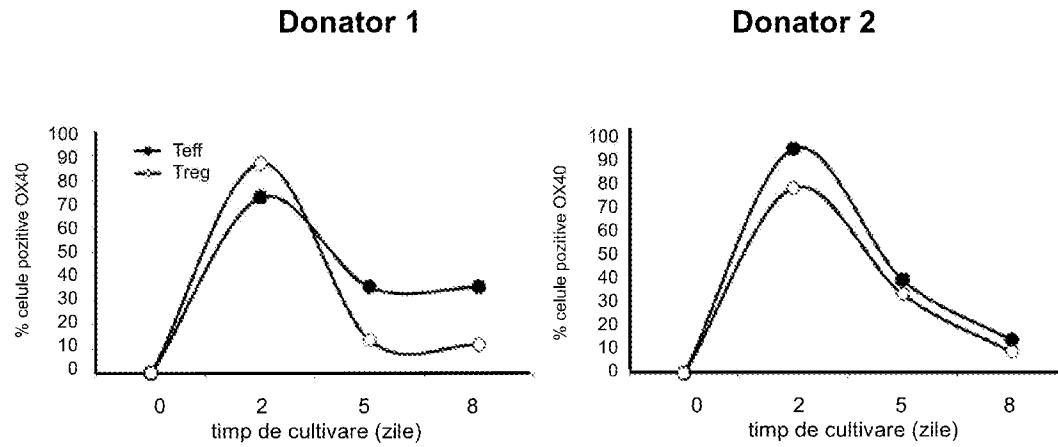


Fig. 7

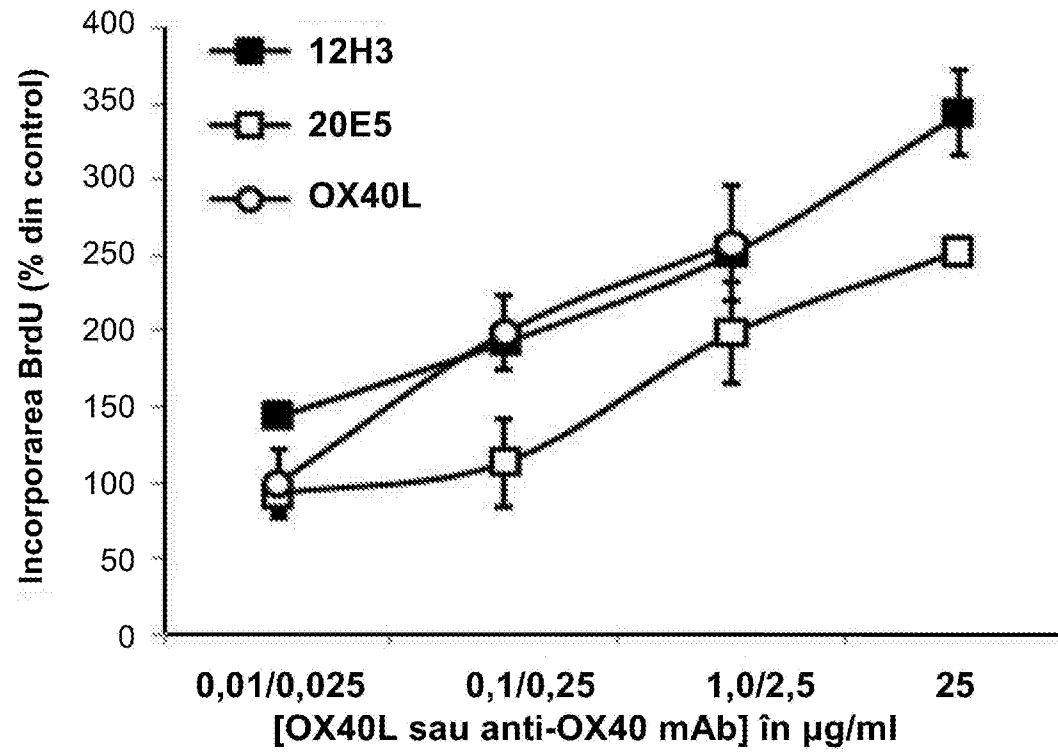


Fig. 8

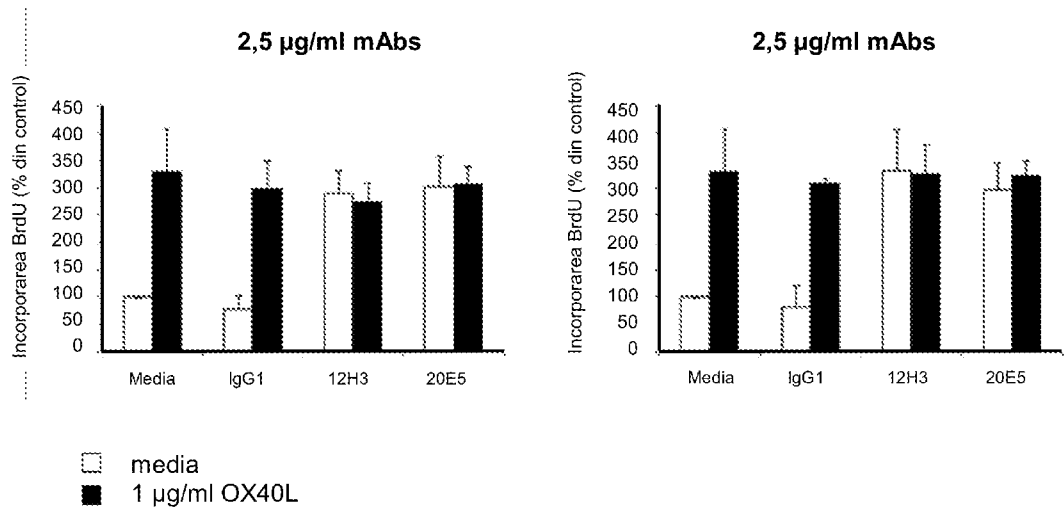


Fig. 9

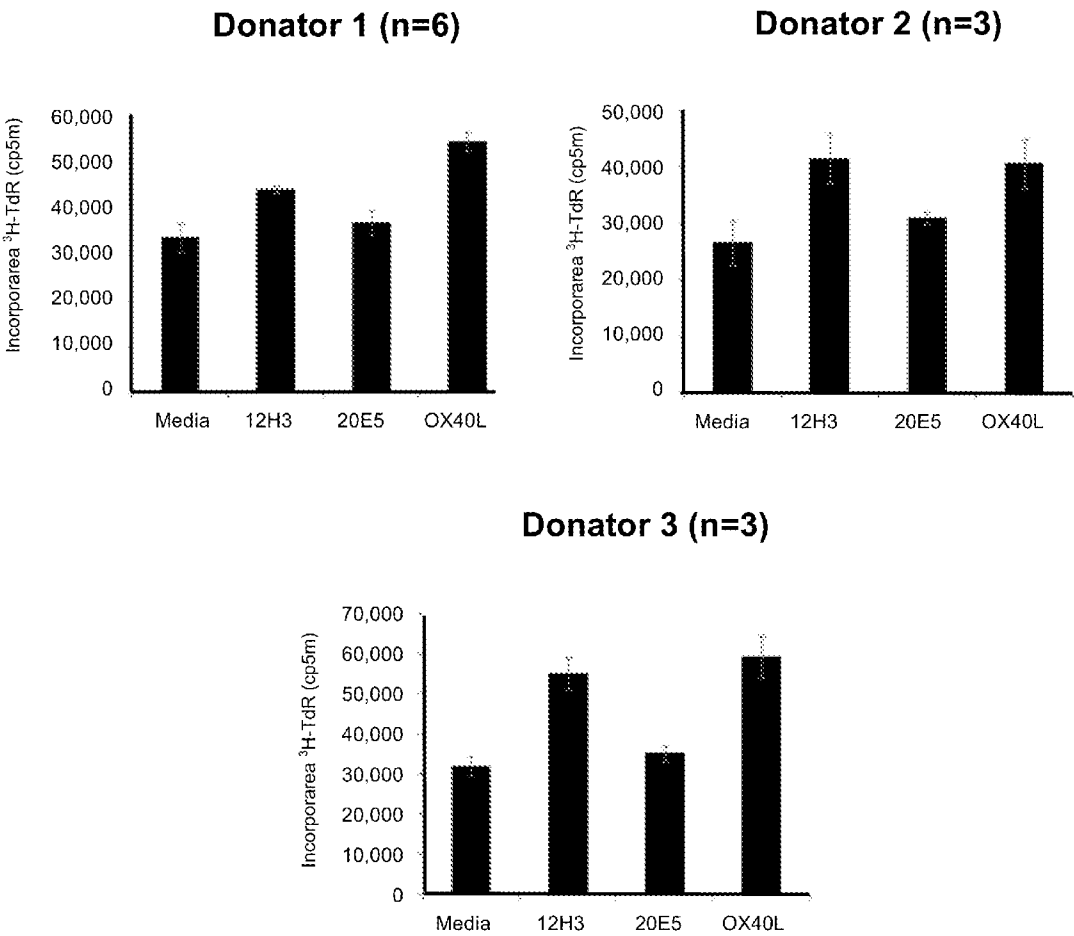


Fig. 10

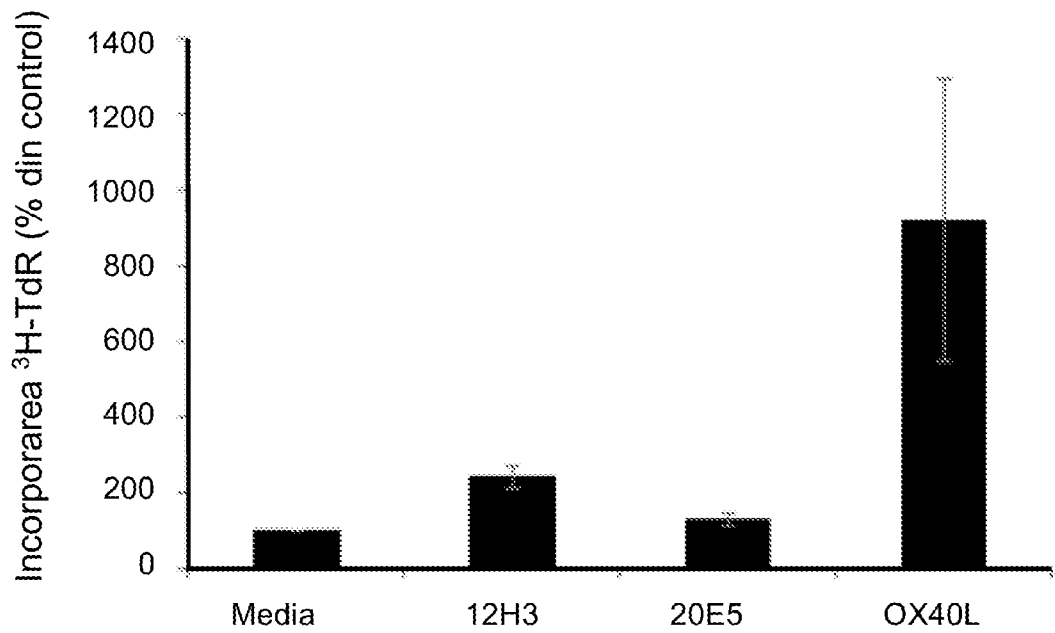


Fig. 11

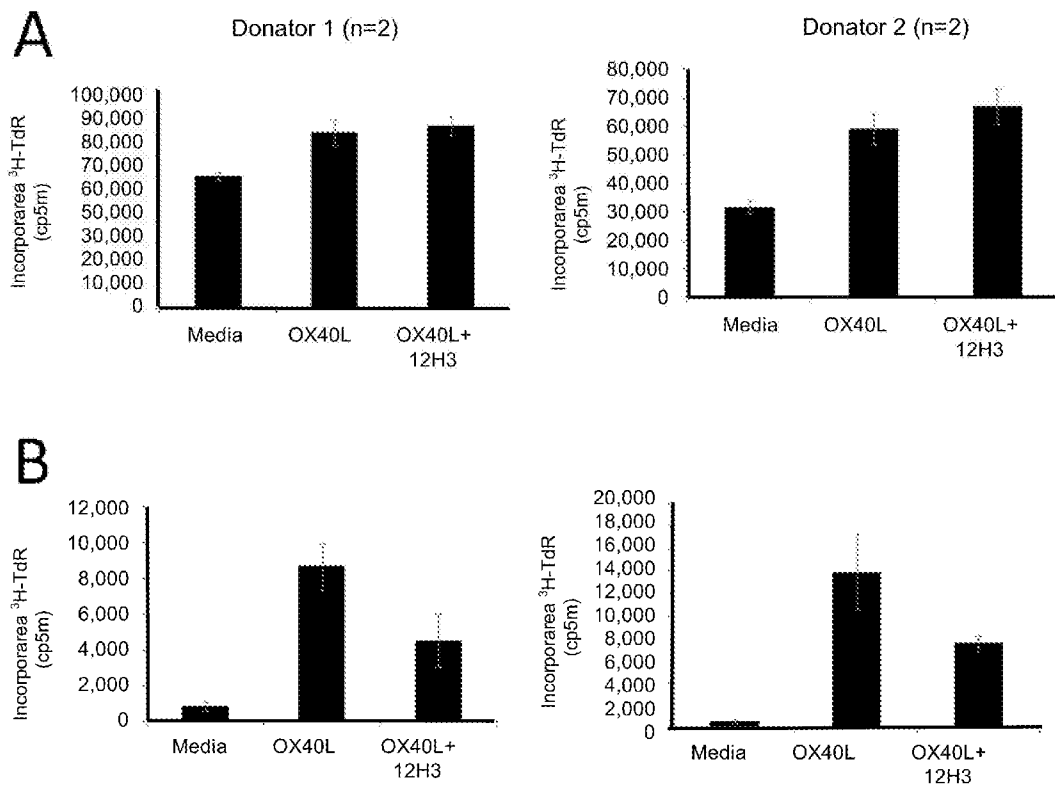


Fig. 12

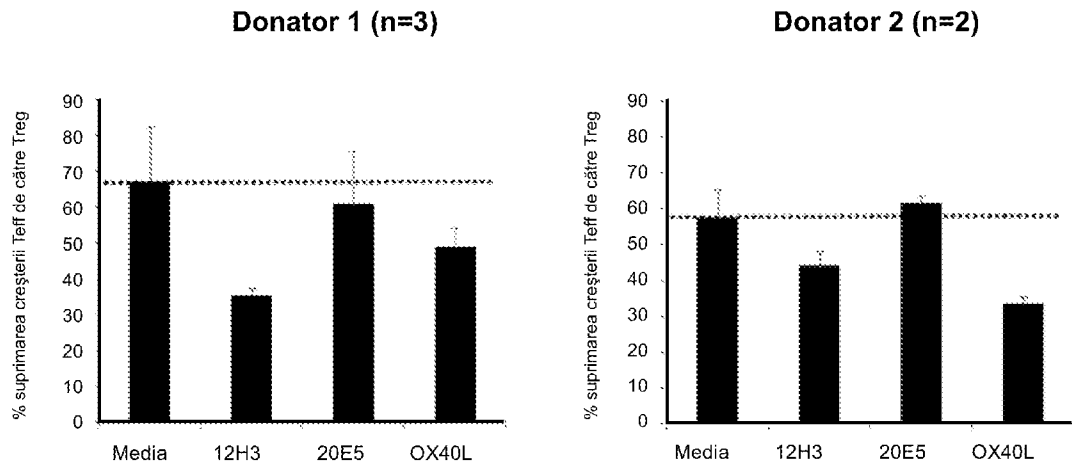


Fig. 13

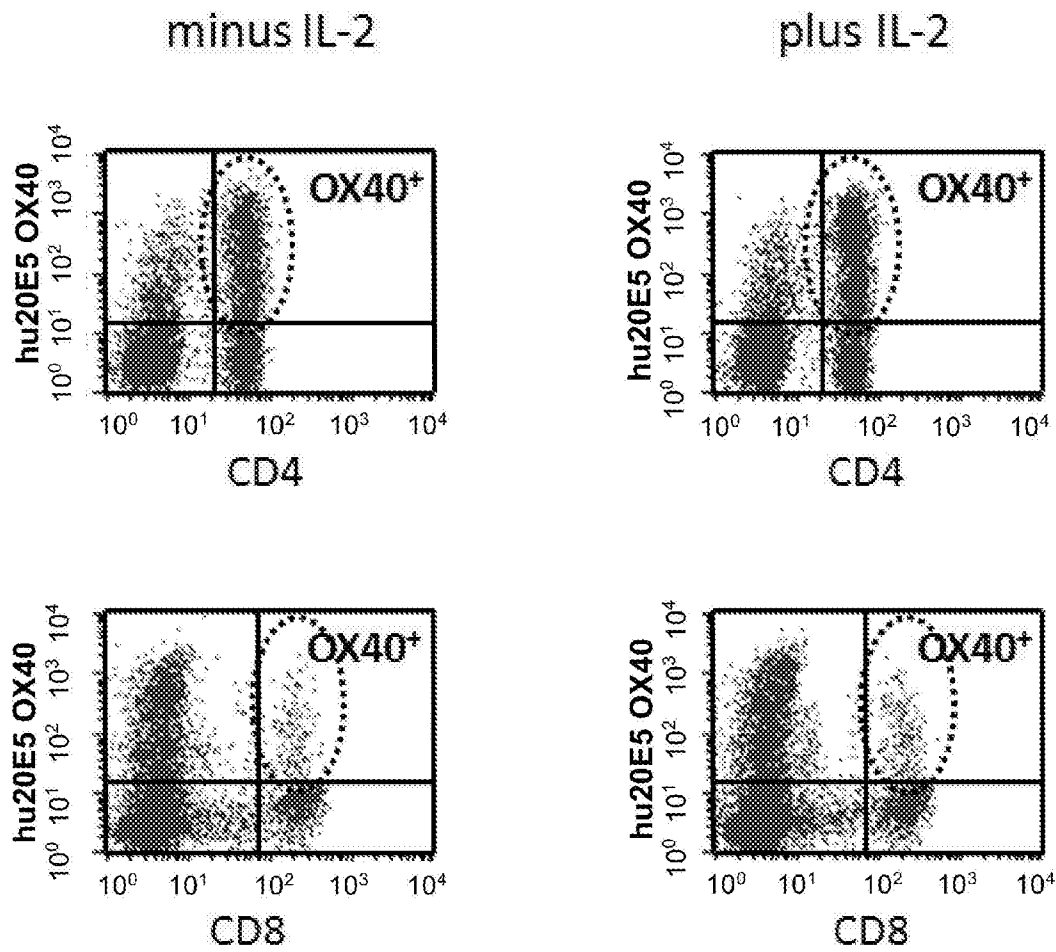


Fig. 14

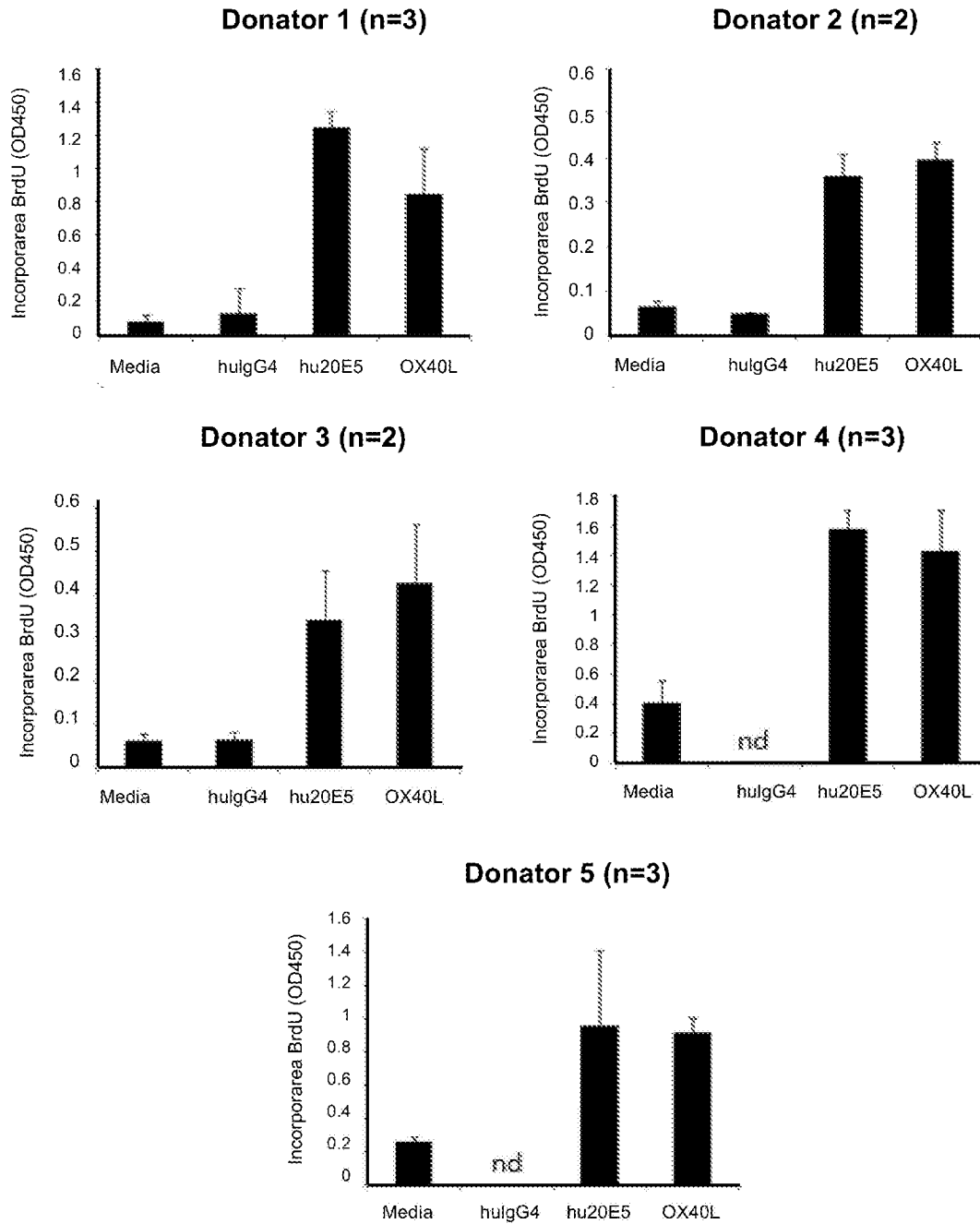


Fig. 15

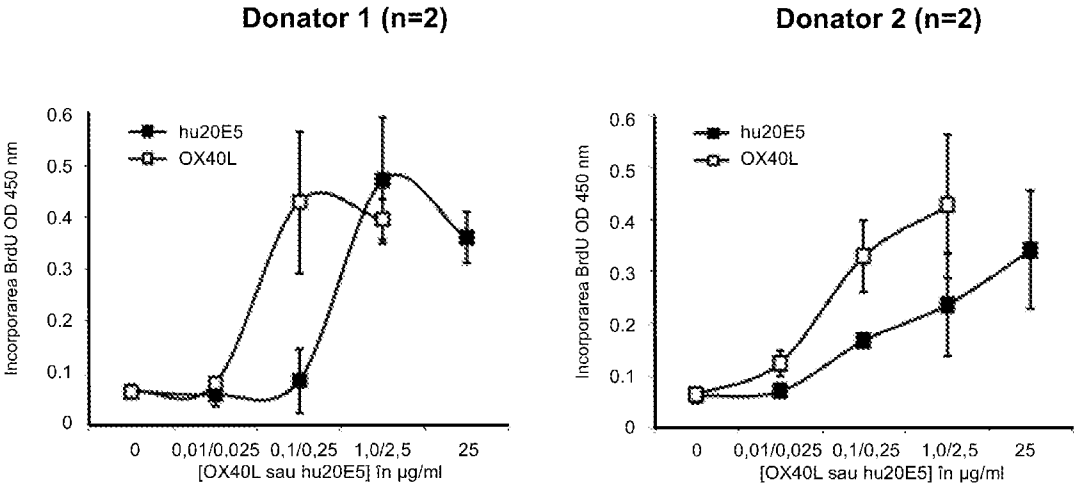


Fig. 16

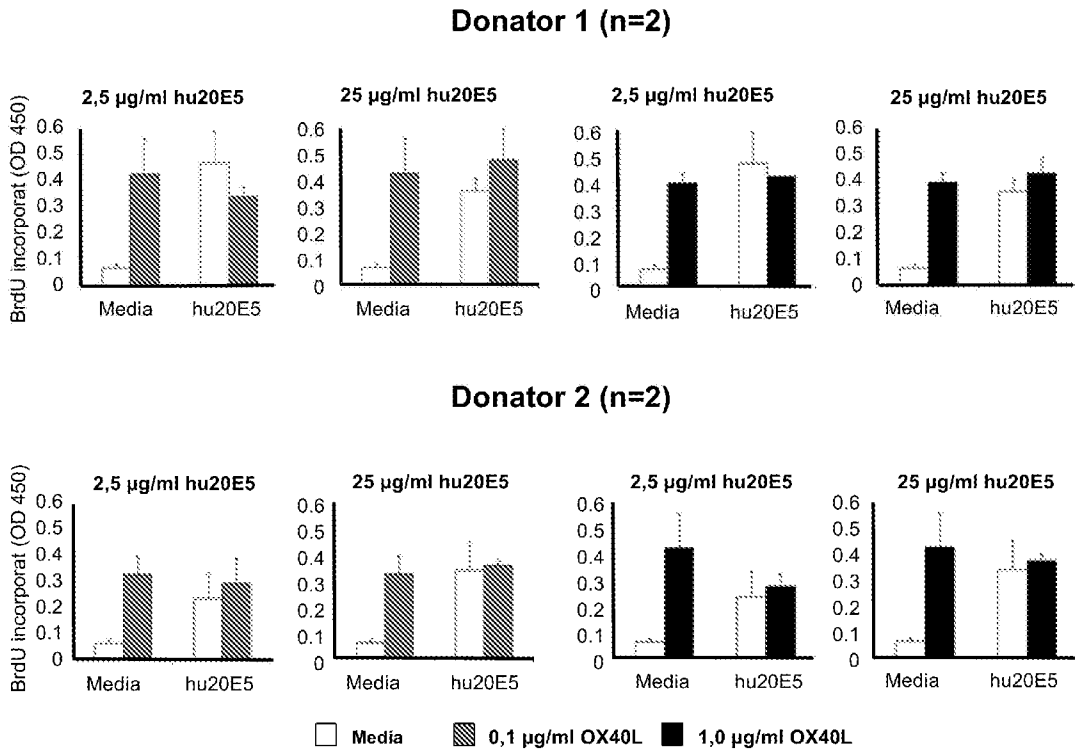


Fig. 17

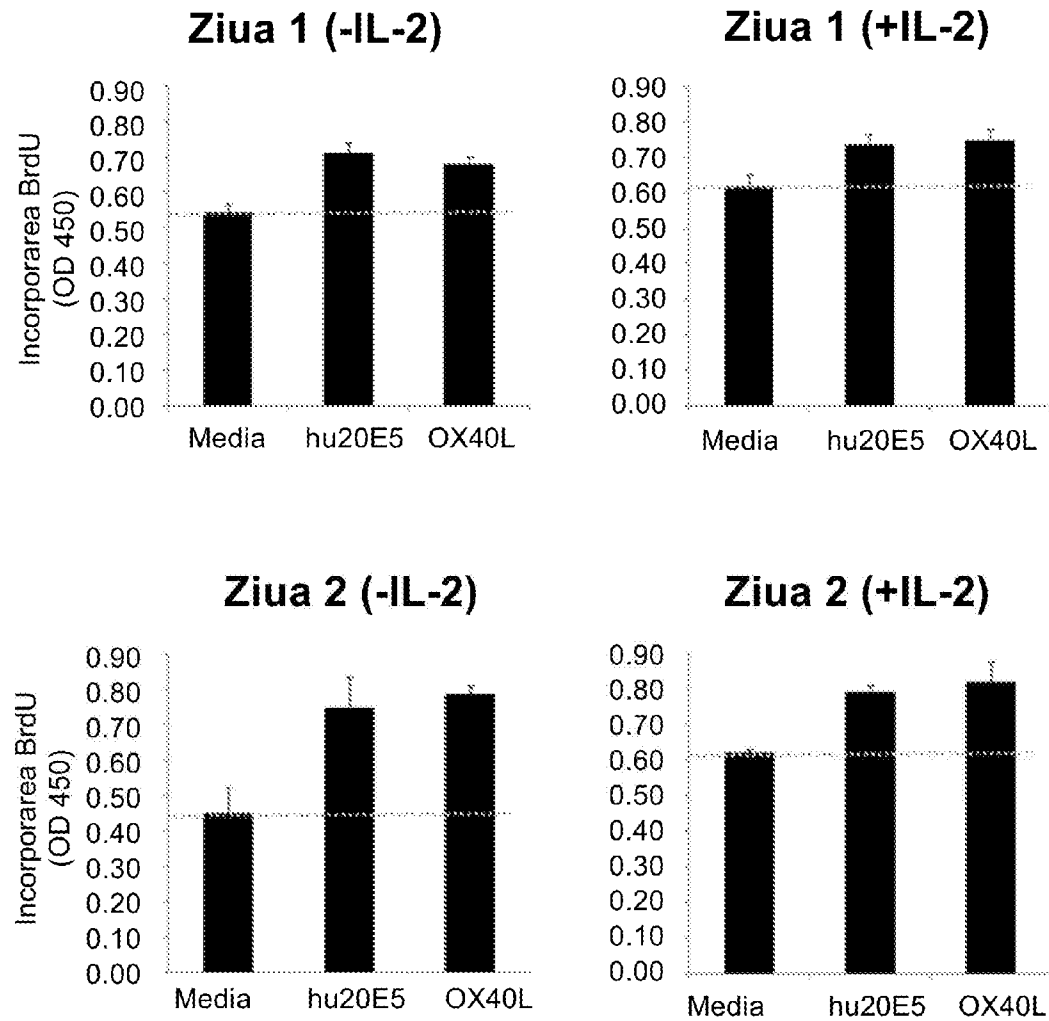


Fig. 18

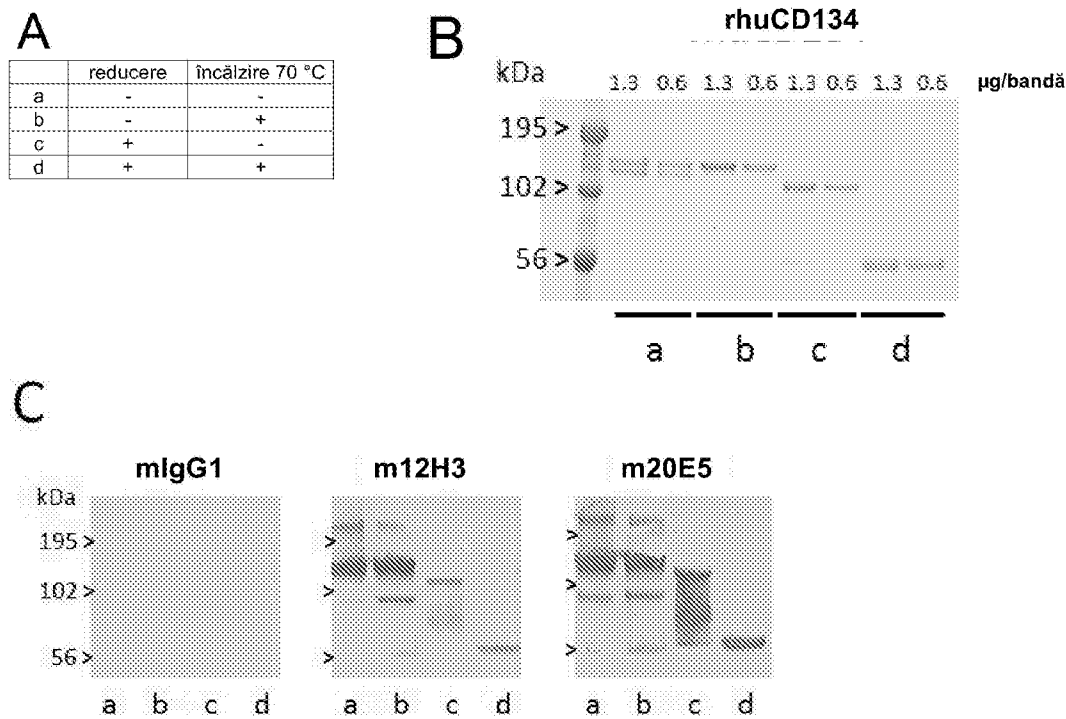


Fig. 19

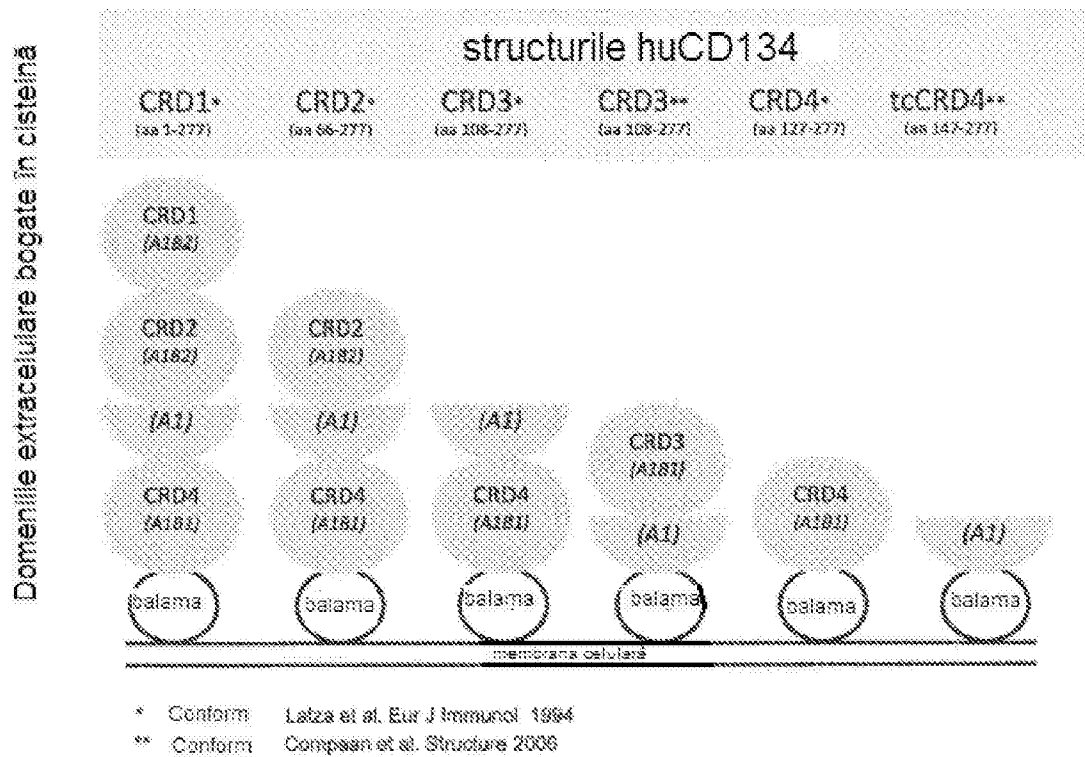


Fig. 20

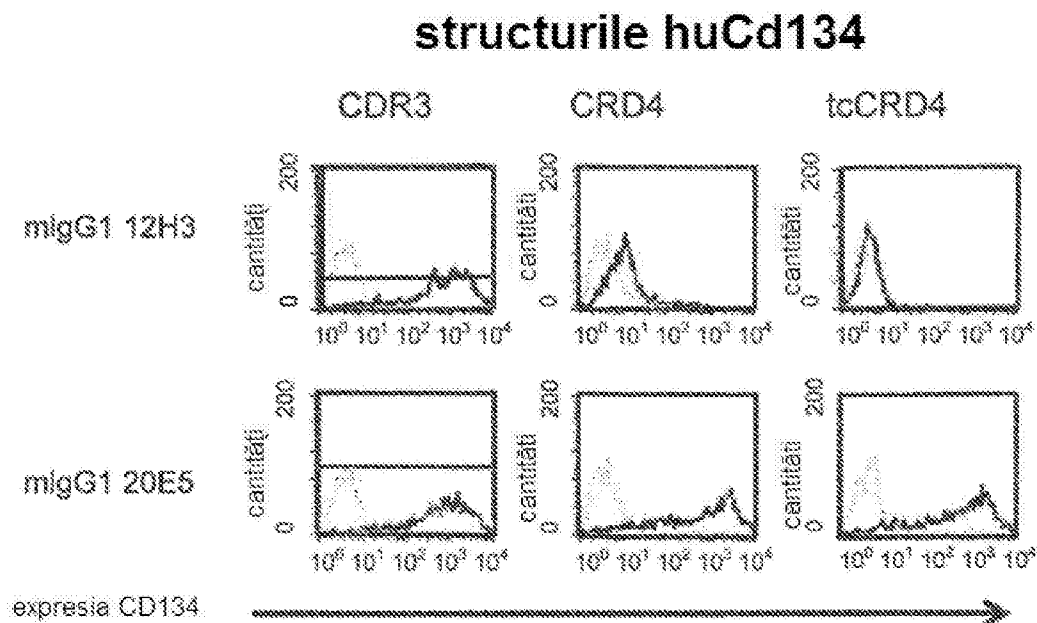
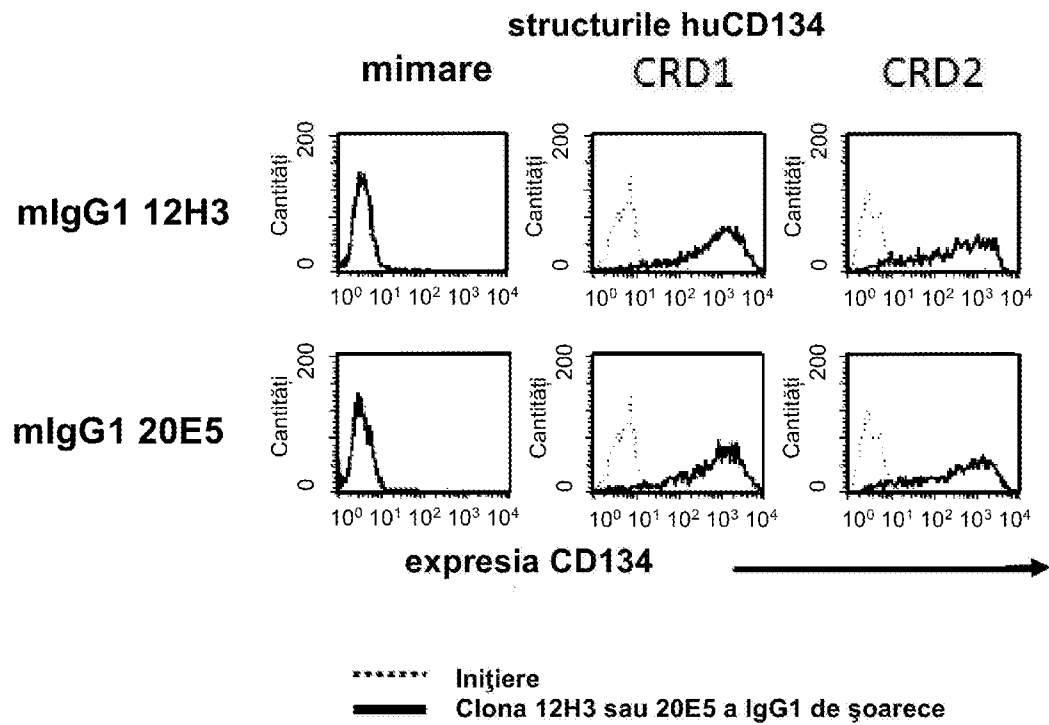


Fig. 21

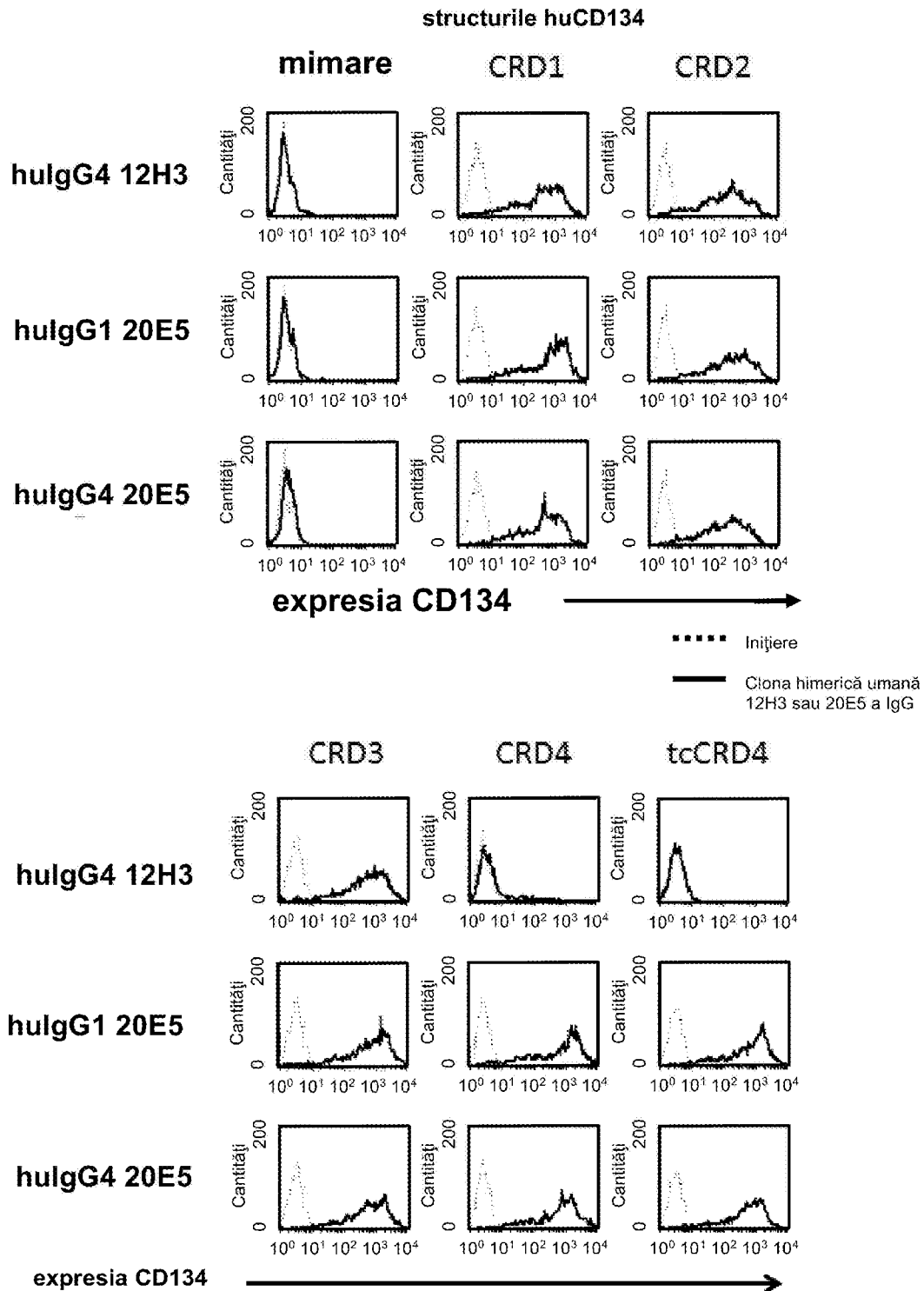


Fig. 22

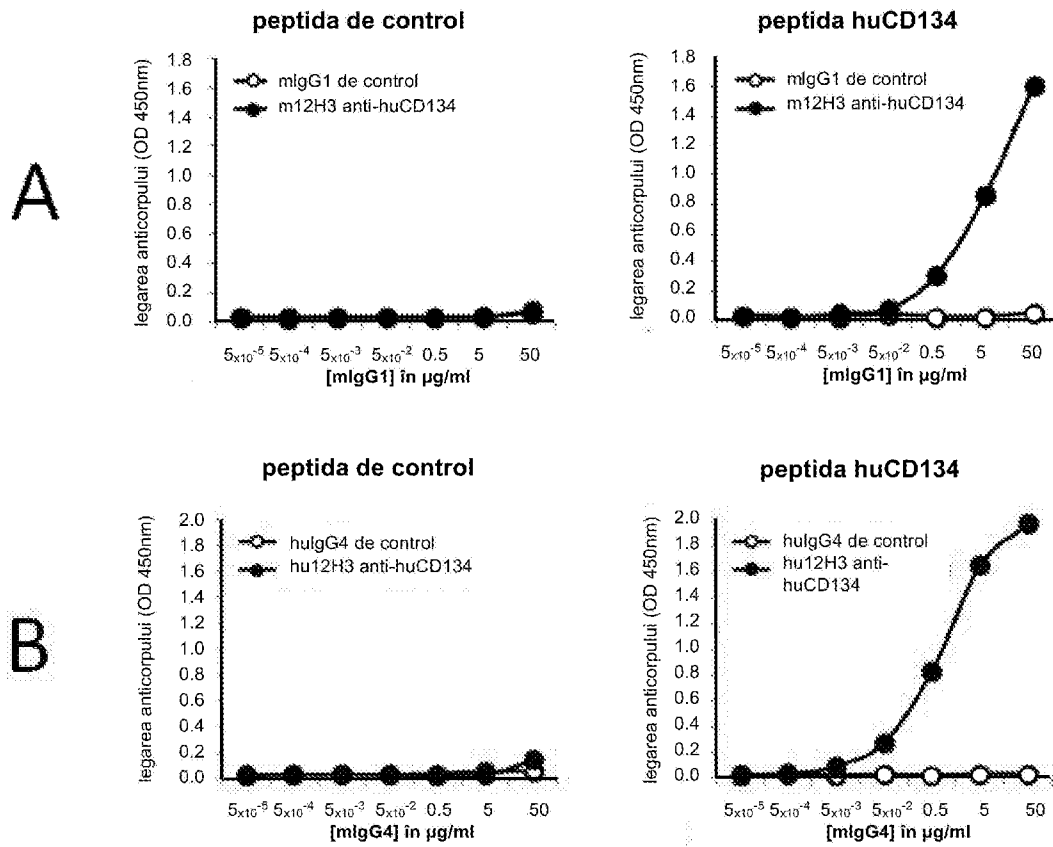


Fig. 23



Fig. 24

Fig. 25

în care: $X_5 \approx Y$ sau P și
 $X_5 \approx F$ sau Y .

Fig. 26

Regiunea variabilă umanizată a lanțului greu al anticorpului 12H3 (SEQ ID NO: 99)

QVQLV QGQSG VVKRW SSVKX SKKAS QSTPM DTPNH NVEQA YSQGL DMALG KIPNN GGGTY NQNFY DRK₂IN₄ TK₁DMG
TSTAY KRLSS LASSD TAVYY CARNG YHGMH LDIDY NGQST TTVYQ G₁

în care $X_1 \sim I$ sau M ,

$X_2 \sim A$ sau V ,

$X_3 \sim L$ sau I și

$X_{10} \sim V$ sau A .

Regiunea variabilă umanizată a lanțului ușor al anticorpului 12H3 (SEQ ID NO: 100)

DIGMT QGPHS LSKAV SSVVT YPKKA SQDNG KAVAN YQKQP DNAPK LILYN ASFPH TGVPX₁₁ RFSCY₁₂ GGGTD FTLPY
SSLQF SDFPH YTCQQ YINYN KTFGG GYVH IKR

în care $X_{11} \sim D$ sau S și

$X_{12} \sim G$ sau S .

Fig. 27

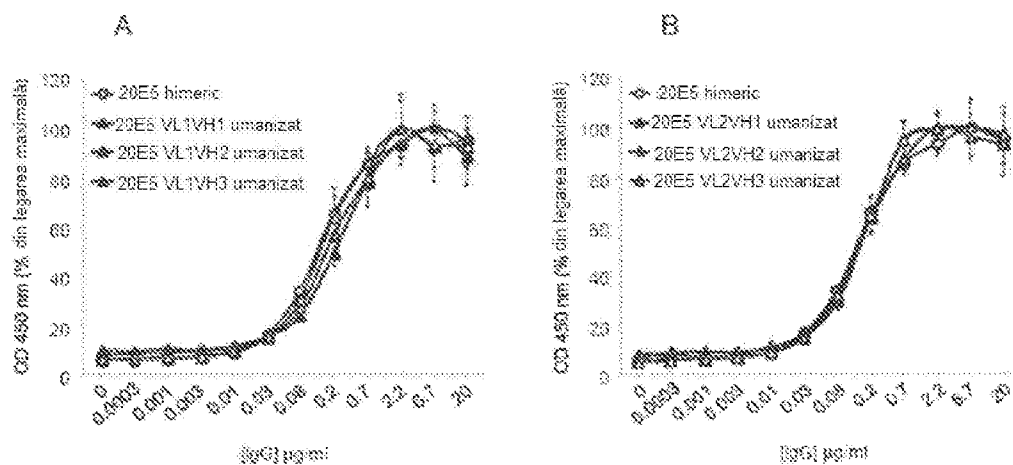


Fig. 28

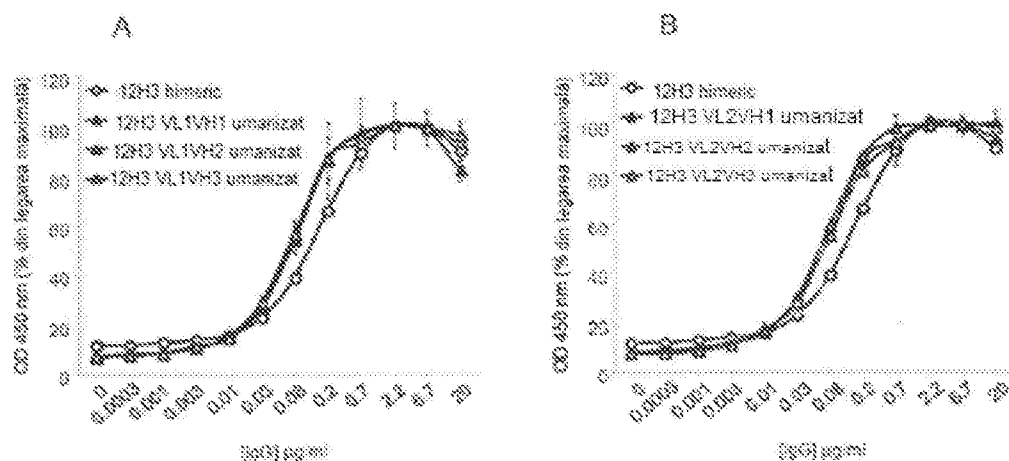


Fig. 29

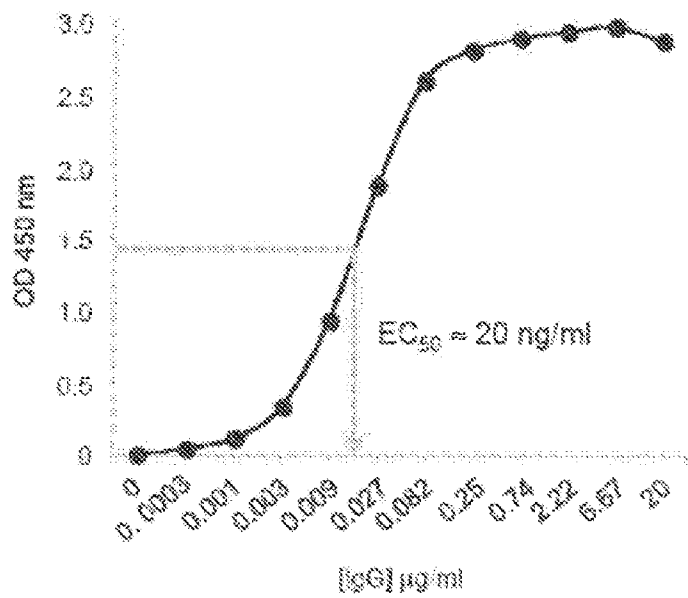


Fig. 30

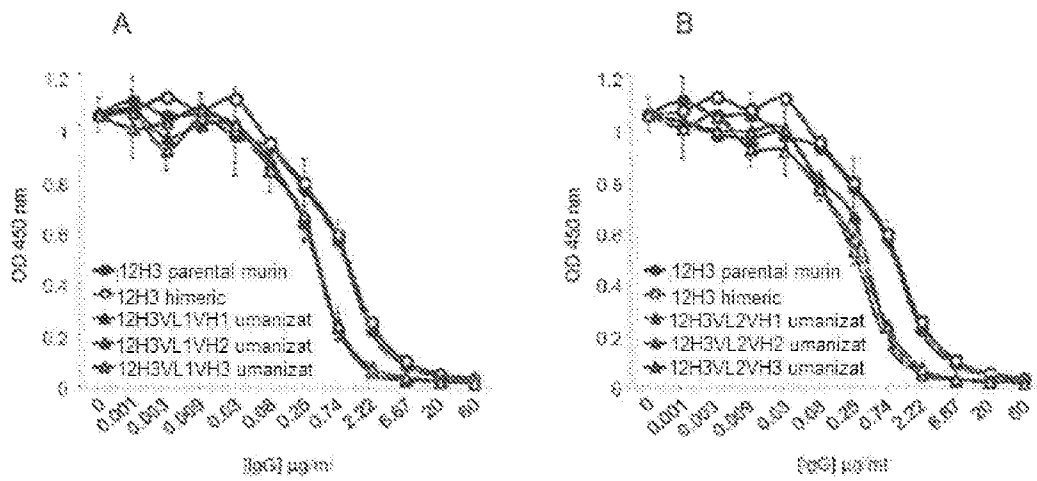


Fig. 31

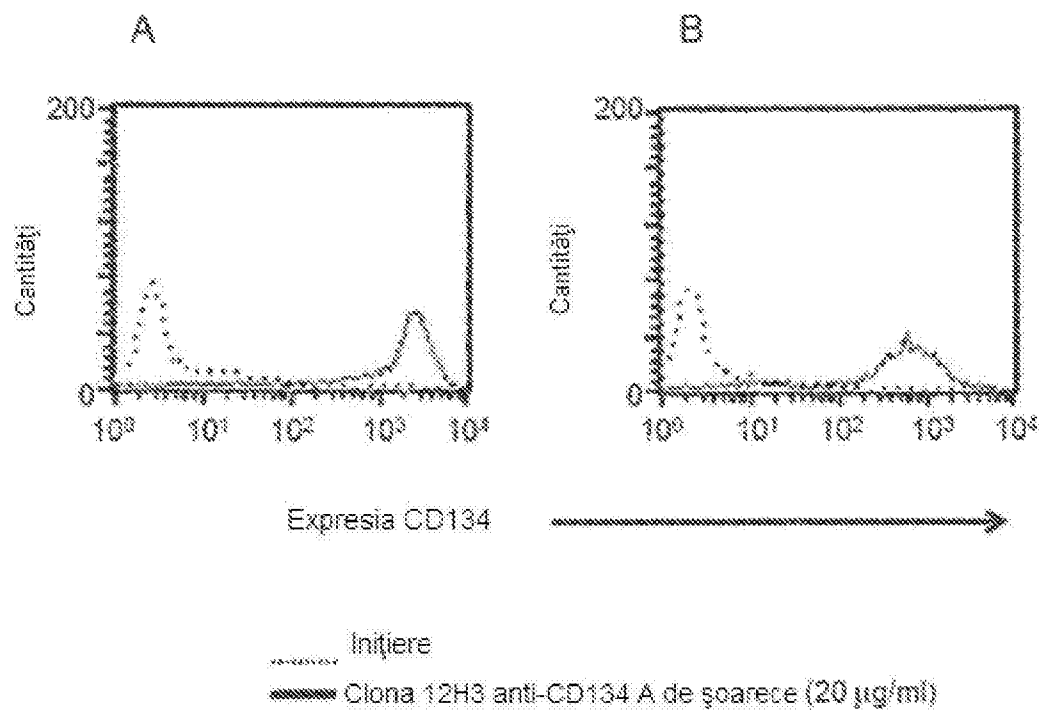


Fig. 32

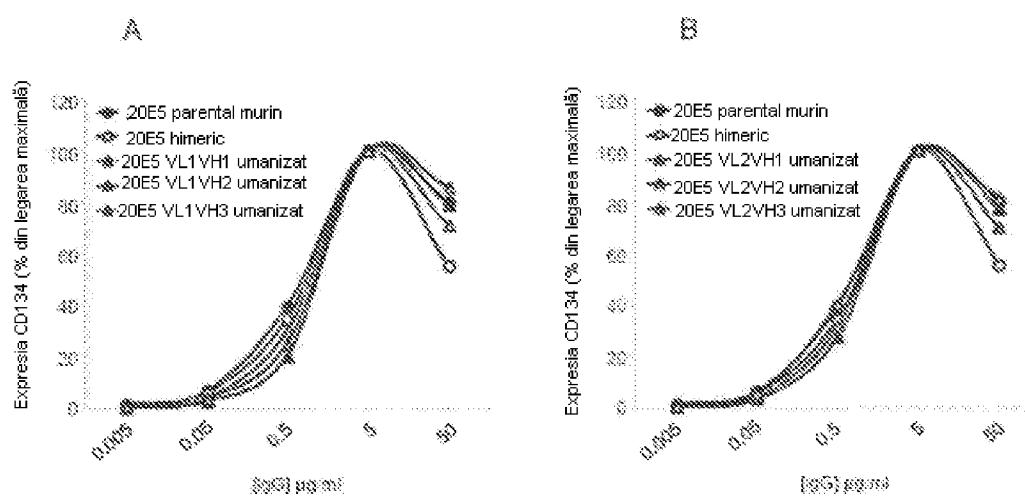


Fig. 33

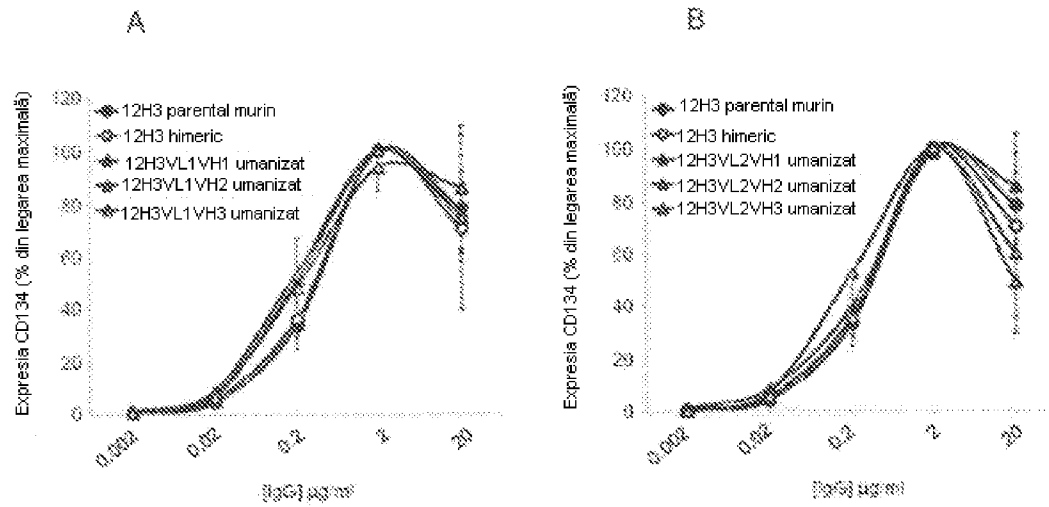


Fig. 34

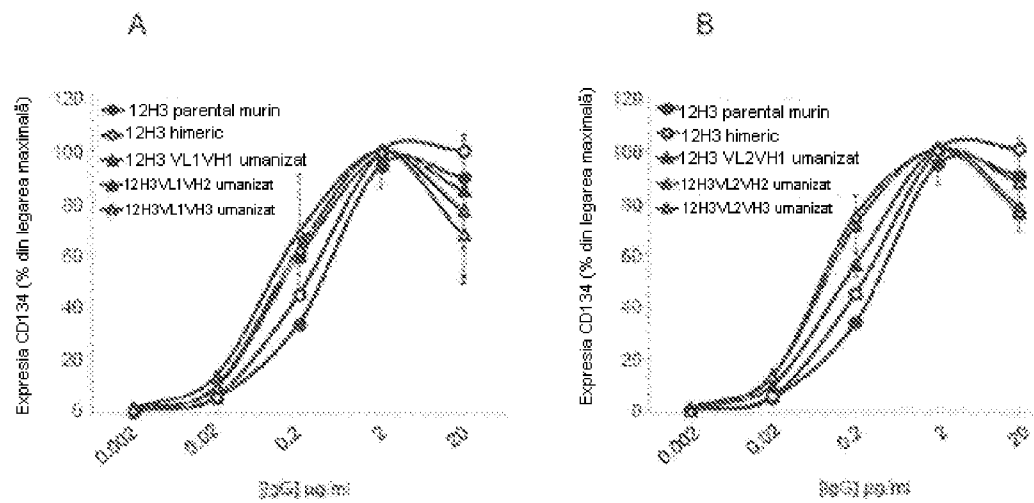


Fig. 35

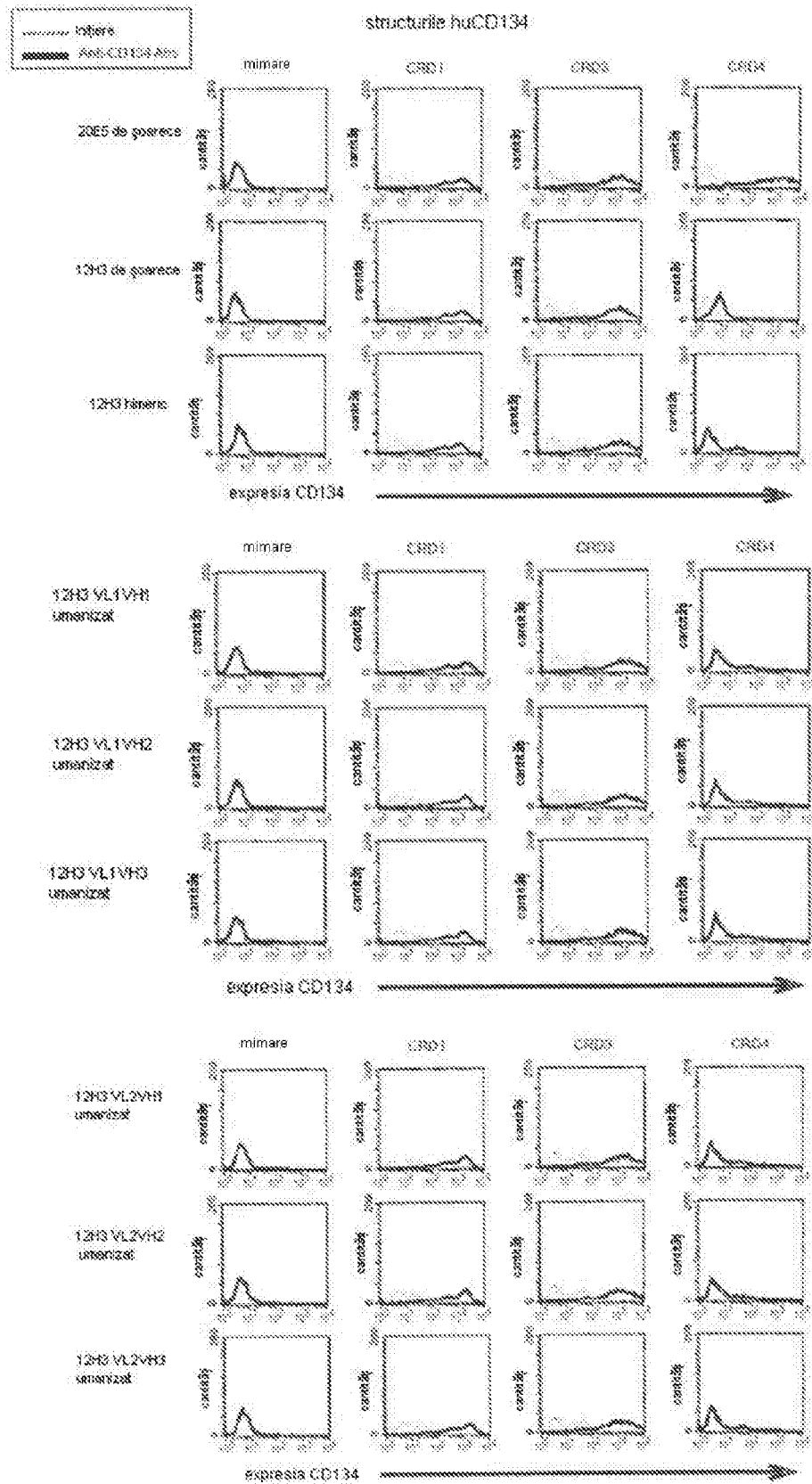


Fig. 36

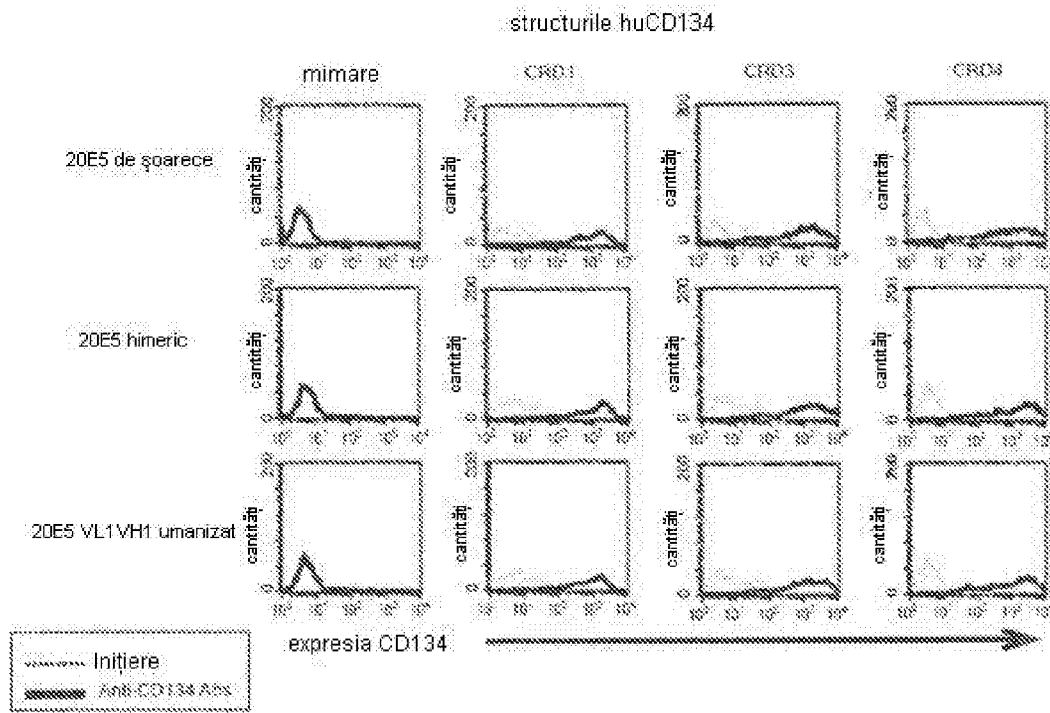


Fig. 37

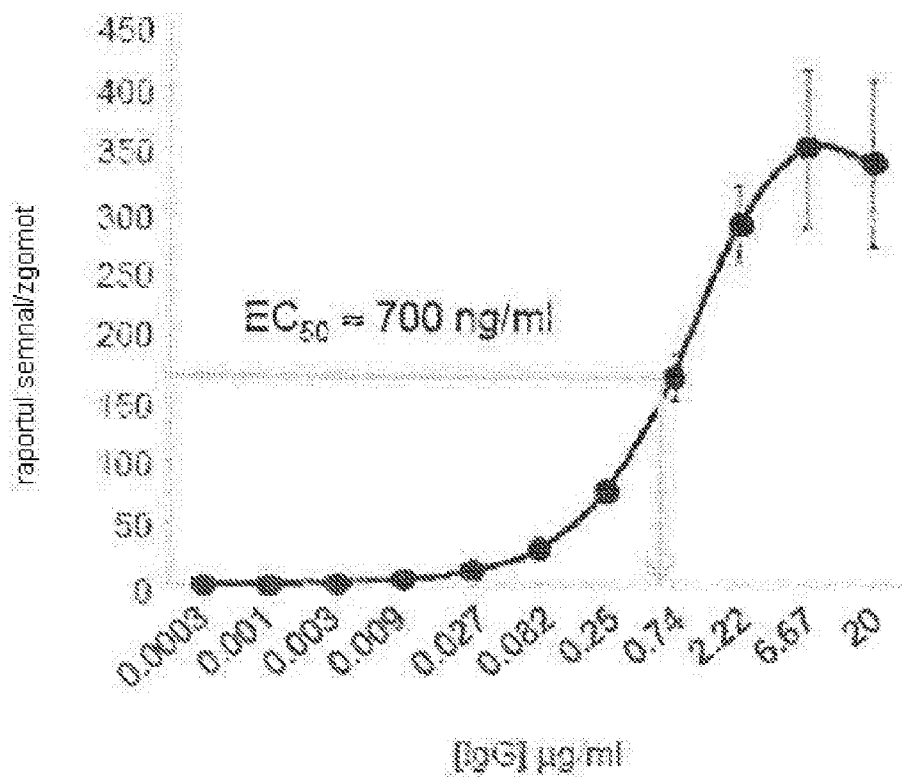


Fig. 38

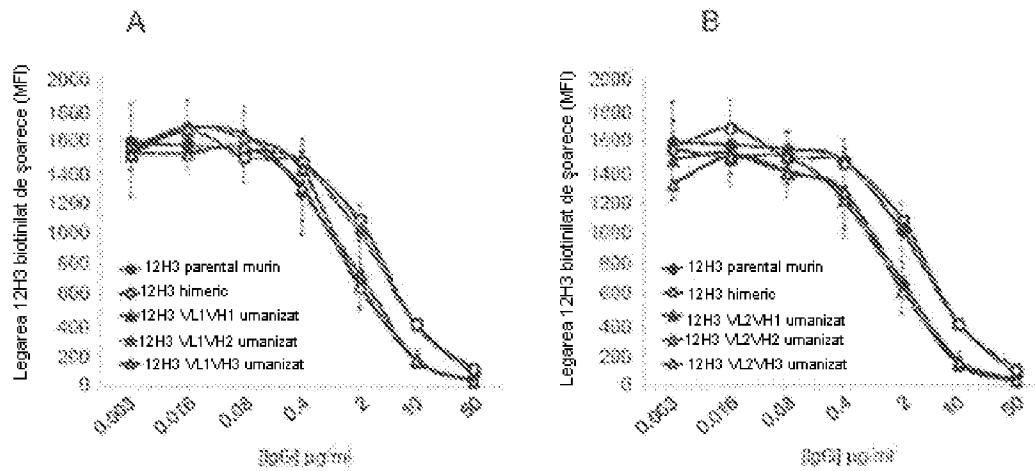


Fig. 39

FOXP3

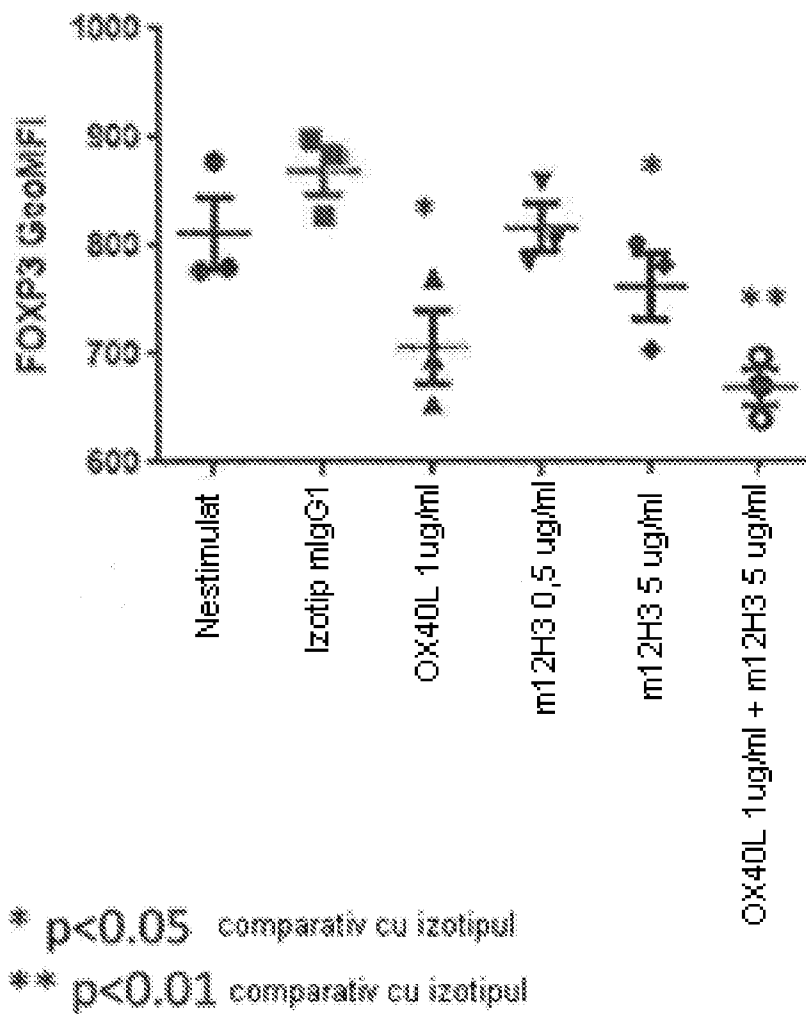


Fig. 40

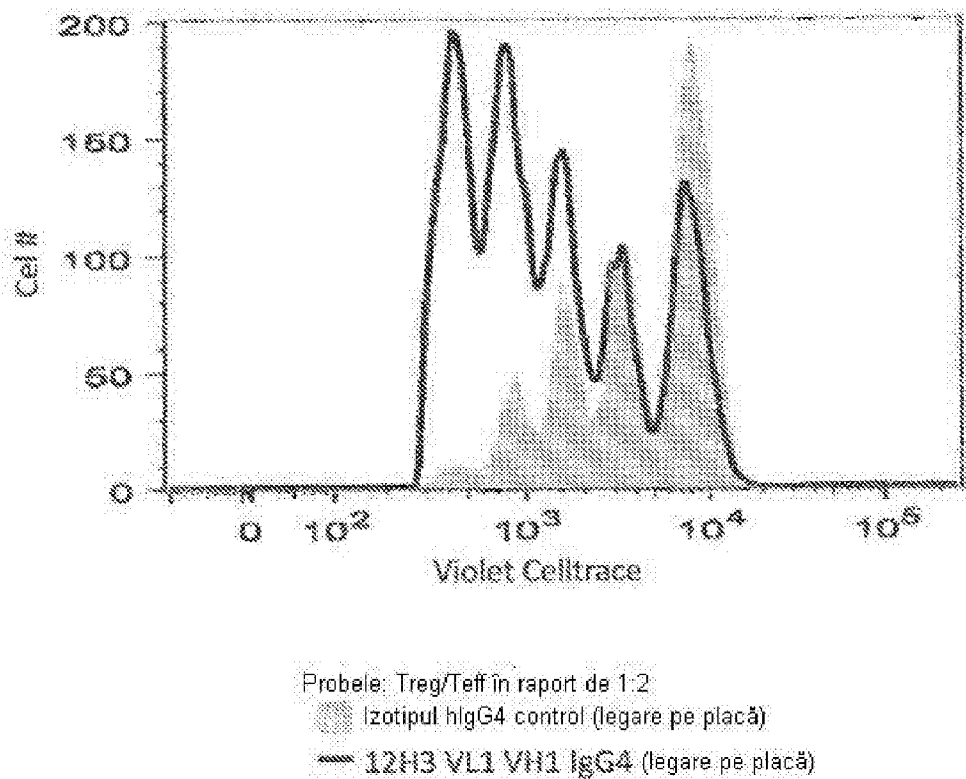


Fig. 41

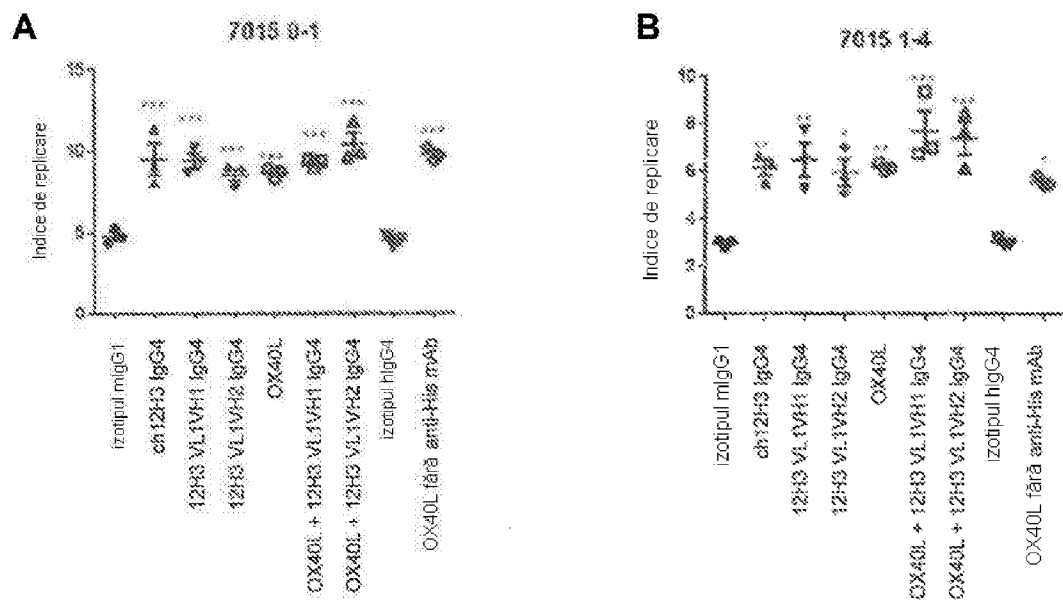


Fig. 42

Fig. 43

Fig. 44

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: a 2015 0102 (32) Data de prioritate recunoscută: 2013.03.18 (22) Data depozit: 2014.03.18 Raport de documentare internațională: ☒ da (71) Solicitant: BIOCEROX PRODUCTS B.V., NL; JANSSEN PHARMACEUTICALS INC., US (54) Titlul: Anticorpi umanizați anti-CD134 (OX40) și utilizarea acestora		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): Int.Cl: <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) anticorpi anti-CD 134, OX-40, limfocite T efectoare, limfocite T supresoare, "Worldwide" (Espacenet): Int.Cl: <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) anti CD 134 antibodies, OX-40, effector T lymphocytes, suppressive T lymphocytes EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) антитела анти- CD 134, OX-40, эффекторные Т лимфоциты, супрессорные Т лимфоциты		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorie*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	WO 99/42585 A1 1999.08.26	1-56
A, D	Weinberg et al. J. Immunther, no. 29, 2006, p. 575-585	1-56
A, D	AL-Shamkhani et al. Eur. J. Chem. no 26, 1996, p. 1695-1699	1-56
A, D	Hirschhorn-Cymerman et al. J.Exp. Med. No 206, 2009, p. 1103-1116	1-56
A, D, C	US 2009/0214560 A1 2009.08.27	1-56
X	WO 2013/028231 A1 2013.02.28	1-56

X	WO 2012/027328 A2 2012.03.01	1-56
A	WO 2006/119107 A2 2006.11.09	1-56
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție	
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete	
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri	
Data finalizării documentării 2018.06.15		
Examinator	GROSU Petru	